

MEMOIRE

50376
1975
174

50376
1975
174

PRESENTE A L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

par

André CHERON

ETUDES SUR LE LAIT DE VACHE

1° LES IMMUNOGLOBULINES G

- a - Isolement et fractionnement
- b - Détermination de la structure des glycopeptides obtenus par hydrolyse enzymatique.

2° LA LACTOTRANSFERRINE

- a - Isolement et étude physico-chimique
- b - Isolement et étude de la structure des 2 glycopeptides
Mise en évidence d'une microhétérogénéité des glycanes.
- c - Étude de sa dégradation par les enzymes digestives du Nourrisson.



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

- MM. J. MONTREUIL
- M. MONSIGNY
- G. BISERTE
- P. JOLLES
- G. FONTAINE
- Melle G. SPIK

Président

} Rapporteurs

} Examineurs



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

Nos recherches ont bénéficié d'une aide de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (contrat 61 - FR - 170).

A MA FEMME

Tes sacrifices d'épouse et de mère n'ont pas été vains.
Ta compréhension et ta patience ont toujours été pour
moi un précieux réconfort. Que ce travail soit, pour toi,
un témoignage de mon Amour.

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL

Professeur de Chimie Biologique à l'Université
des Sciences et Techniques de LILLE I.

Passionné et infatigable, vous avez consacré votre vie à
la recherche. Votre vocation m'a profondément marqué.
Soyez remercié de m'avoir accueilli dans votre Laboratoire
et croyez en ma sincère gratitude.

Monsieur le Professeur M. MONSIGNY

Professeur sans chaire à l'Université des Sciences
d'ORLEANS.

Dès mon arrivée au Laboratoire, ton enthousiasme pour la
recherche et ton ardeur au travail ont été pour moi un
exemple. J'ai toujours apprécié les conseils que tu m'as
prodigués dans une ambiance de sincère amitié. Je te
remercie, aujourd'hui, d'avoir accepté de juger ce travail.
Crois à ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur G. BISERTE

Professeur à l'Université du Droit et de la
Santé de LILLE.

Votre notoriété scientifique et votre très grande simplicité
font de vous un homme apprécié et aimé. Je vous remercie
de m'avoir ouvert les portes de votre Institut pour
réaliser une partie de mon travail.

Croyez à mon profond respect.

Monsieur le Professeur P. JOLLES

Directeur de Recherche au Centre National de
la Recherche Scientifique.

Par vos travaux, vous avez acquis une autorité scienti-
fique incontestée. Je vous remercie sincèrement d'avoir
accepté de juger ce travail.

Soyez assuré de mes sentiments respectueux.

Monsieur le Professeur G. FONTAINE

Professeur à l'Université du Droit et de la
Santé de LILLE.

Votre compétence en pédiatrie est connue de tous et
votre aide me fut précieuse. Votre jugement et vos
conseils me seront très utiles dans la poursuite de
mes travaux.

Soyez en remercié très sincèrement.

Mademoiselle G. SPIK

Maître de Conférence à l'Université des Sciences
et Techniques de LILLE I.

J'ai toujours apprécié ta disponibilité et ta gentillesse.
Tu as toujours été attentive à mes questions et prête à
m'aider. Je n'oublie pas qu'une partie de ce travail a
été réalisée grâce à tes recherches sur les enzymes.
Je te remercie et crois à ma sincère reconnaissance.

J'adresse mes plus vifs remerciements

à Mademoiselle BAR d'avoir participé à nos expérimentations sur les nourrissons.

Monsieur et Madame HENNETTE, et Monsieur et Mademoiselle BRUN, qui nous ont fourni le lait de vache avec beaucoup de gentillesse

Tous les membres du Laboratoire et plus particulièrement à P. CHARET, B. FOURNET, B. BAYARD, J. MAZURIER, B. BRUNET, S. BOUQUELET, G. STRECKER et A. VERBERT dont la collaboration m'a été très précieuse.

Mesdames M. BENAÏSSA, A.F. BOUQUELET, R. DEBRAY, M. LECOQ et Messieurs P. TIMMERMAN, Y. LEROY, J.P. DECOTTIGNIES pour leur collaboration technique efficace.

Mademoiselle J. PROVOYEUR, secrétaire, et Madame COELEN, photographe.

QUE TOUS CEUX QUI M'ONT ACCORDE LEUR AIDE ET LEUR AMITIE
SOIENT ICI REMERCIÉS.

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, CORSIN, 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.

PRESIDENTS HONORAIRES DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. J. LOMBARD.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. CONSTANT Eugène	Electronique
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. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
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.	LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
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.	SALMER Georges	Electronique
M.	SCHILTZ René	Physique Atomique et Moléculaire
Mme	SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M.	SEGUIER Guy	Electrotechnique
M.	TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M.	TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
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.	BODARD Marcel	Biologie Végétale
M.	BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M.	BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M.	CAPURON Alfred	Biologie Animale
M.	CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M.	DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des entreprises
M.	DEPREZ Gilbert	Physique Théorique
M.	DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M.	GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M.	GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M.	LACOSTE Louis	Biologie Végétale
Mme	LEHMANN Josiane	Analyse
M.	LENTACKER Firmin	Géographie
M.	LOUAGE Francis	Electronique
Mlle	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.	SLIWA Henri	Chimie Organique

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés d'Enseignement)

M.	ADAM Michel	Sciences Economiques
M.	ANTOINE Philippe	Analyse
M.	BART André	Biologie Animale
M.	BEGUIN Paul	Mécanique
M.	BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M.	BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M.	BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M.	BOSCQ Denis	Probabilités
M.	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie

M.	CARREZ Christian	Informatique
M.	CORDONNIER Vincent	Informatique
M.	COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
Mlle	DACHARRY Monique	Géographie
M.	DEBENEST Jean	Sciences Economiques
M.	DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M.	DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M.	DHAINAUT André	Biologie Animale
M.	DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
M.	DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M.	DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M.	DUBOIS Henri	Physique
M.	DUEE Gérard	Géologie Appliquée
M.	DYMENT Arthur	Mécanique
M.	ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
Mme	EVARD 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.	GUILLAUME Henri	Sciences Economiques
M.	HECTOR Joseph	Géométrie
M.	HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M.	JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Mlle	KOSMAN Yvette	Géométrie
M.	KREMBEL Jean	Biochimie
M.	LAURENT François	Automatique
Mlle	LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle	LEGRAND Solange	Algèbre
M.	LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
M.	LEROY Yves	Electronique
M.	LHENAFF René	Géographie
M.	LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M.	LOUCHET Pierre	Sciences de l'Education
M.	MACKE Bruno	Physique
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.	RICHARD Alain	Biologie
M.	ROGALSKI Marc	Analyse
M.	ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
M.	SIMON Michel	Sociologie
M.	SOMME Jean	Géographie
Mlle	SPIK Geneviève	Biochimie
M.	STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M.	STEEN Jean-Pierre	Informatique

M. THERY Pierre
M. TOULOTTE Jean-Marc
M. TREANTON Jean-René
M. VANDORPE Bernard
M. VILLETTE Michel
M. MALLART Francis
M. WERNIER Georges
M. WATERLOT Michel
Mme ZINN-JUSTIN Nicole

Electronique
Automatique
Sociologie
Chimie Minérale
Mécanique
Chimie
Informatique
Géologie Générale
Algèbre

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

---oo0oo---

I N T R O D U C T I O N	1
-------------------------	---

---oo0oo---

G E N E R A L I T E S	6
-----------------------	---

---oo0oo---

: : L E S I M M U N O G L O B U L I N E S . :	6
---	---

I.- <u>I N T R O D U C T I O N .</u>	7
--------------------------------------	---

II.- <u>V A R I A T I O N D U T A U X D E S A N T I C O R P S A V A N T L A N A I S S A N C E .</u>	8
---	---

A - Chez le Veau.	8
-------------------	---

B - Chez le Nourrisson.	8
-------------------------	---

C - Mode de transmission.	8
---------------------------	---

D - Activité immunologique des immunoglobulines transmises.	12
--	----

III.- <u>LES ANTICORPS DES LAITS ET DES COLOSTRUMS DE FEMME ET DE VACHE.</u>	12
A - Importance des anticorps des laits pour le Nourrisson et pour le Veau.	12
B - Les IgA du lait et du colostrum de Femme.	17
C - Les anticorps du lait et du colostrum de Vache.	22
D - Origine des globulines immunes du lait et du colostrum.	40
IV.- <u>DESTINEE DES IMMUNOGLOBULINES DES LAITS.</u>	42
A - Chez le Veau.	42
B - Chez le Nourrisson.	50
C - Conclusions.	51
V.- <u>COMMENT FACILITER L'IMMUNISATION PASSIVE DU NOURRISSON.</u>	54
A - Immunisation avant la naissance.	55
B - Immunisation passive et active après la naissance.	56
C - Conclusions.	56

VI.- <u>CONCLUSIONS GENERALES.</u>	57
------------------------------------	----

: : : LES LACTOTRANSFERRINES. : : :	59
---	----

I.- <u>INTRODUCTION.</u>	59
--------------------------	----

II.- <u>PREPARATION DES LACTOTRANSFERRINES.</u>	60
---	----

A - Préparation de la lactotransferrine humaine.	60
--	----

B - Préparation de la lactotransferrine du lait de Vache.	60
---	----

III.- <u>PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET STRUCTURE DES LACTOTRANSFERRINES.</u>	66
--	----

IV.- <u>REPARTITION ET ROLE BIOLOGIQUE.</u>	66
---	----

A - Variation du taux des lactotransferrines au cours de la lactation.	66
--	----

B - Répartition.	69
------------------	----

C - Rôle biologique.	69
----------------------	----

V.- <u>CONCLUSIONS.</u>	72
-------------------------	----

TRAVAUX PERSONNELS.

--ooOoo--

: :
: M E T H O D E S. :
: :

I.- <u>METHODES ANALYTIQUES.</u>	76
A - Compositions centésimale et molaire.	76
B - Méthodes électrophorétiques et immunologiques.	79
C - Détermination des masses moléculaires.	81
II.- <u>FRACTIONNEMENT DES IMMUNOGLOBULINES ET SEPARATION DES CHAINES H ET L.</u>	84
A - Fractionnement des immunoglobulines.	84
B - Séparation des chaînes H et L.	85
III.- <u>METHODES RELATIVES A L'ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES.</u>	87
A - Isolement des glycopeptides pronasiques.	87
B - Isolement des glycopeptides chymotrypsiques et trypsiques.	87

IV.- <u>METHODES RELATIVES A LA DETERMINATION DE LA LIAISON</u> <u>PROTEINE - GLYCANNE.</u>	91
A - Réaction d'Edman.	91
B - Hydrolyse partielle des glycopeptides.	91
C - Recherche des liaisons O-glycosidiques.	92
D - Recherche des liaisons "Ester".	92
V.- <u>METHODES RELATIVES A LA DETERMINATION DE LA</u> <u>STRUCTURE PEPTIDIQUE.</u>	93
A - Identification des acides aminés C-terminaux.	93
B - Identification des acides aminés N-terminaux.	94
C - Détermination de la séquence peptidique : réaction d'Edman.	96
VI.- <u>METHODES RELATIVES A LA DETERMINATION DE LA STRUCTURE</u> <u>GLYCANNIQUE.</u>	98
A - Méthylation des glycopeptides et des oligosacchari- des.	98
B - Oxydation periodique des glycopeptides.	101
C - Hydrazinolyse et diazotation.	103
D - Rupture de la liaison protéine-glycane et hydrazinolyse - diazotation du glycane libéré : position du fucose.	106

---ooOoo---

RESULTATS PERSONNELS.

CHAPITRE I.

LES IMMUNOGLOBULINES.

---ooOoo---

: I S O L E M E N T E T F R A C T I O N N E M E N T :
: D E S I M M U N O G L O B U L I N E S . :
:-----

I.- <u>ISOLEMENT DES IMMUNOGLOBULINES.</u>	111
A - Fractionnement du colostrum par le sulfate d'ammonium.	113
B - Fractionnement du colostrum par le rivanol	114
C - Discussion - conclusion.	114
II.- <u>FRACTIONNEMENT DES GLOBULINES IMMUNES.</u>	119
A - Etude des précipités obtenus par le fractionnement au sulfate d'ammonium.	121

B - Etude du précipité obtenu par le fractionnement au rivanol.	132
III.- <u>CONCLUSIONS.</u>	135

:-----:
: LOCALISATION DES GLUCIDES :
: SUR LES CHAINES H. :
:-----:

I.- <u>ISOLEMENT DES CHAINES L.</u>	139
A - Isolement des chaînes selon la technique de Fleischman.	139
B - Isolement des chaînes selon la technique de Grant.	142
II.- <u>ELECTROPHORESE EN GEL D'AMIDON.</u>	142
III.- <u>CONCLUSION .</u>	145

:-----:
: ETUDE DES MODALITES DE LA :
: LIAISON ENTRE LA PROTEINE ET :
: LES GLYCANNES DANS LES IgG₁. :
:-----:

I.- <u>ISOLEMENT ET COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES.</u>	147
--	-----

A - Isolement des glycopeptides.	147
B - Composition des glycopeptides.	147
C - Détermination de la masse moléculaire des glycopeptides.	151
D - Discussion - conclusion.	151

II.- DETERMINATION DE LA NATURE DE LA LIAISON PROTEINE - GLYCANNE. 154

A - Réaction d'Edman	154
B - Hydrolyse partielle de la fraction glycopeptidique III.	156
C - Recherche de liaison O - glycosidique.	156
D - Discussion - conclusion.	159

: ETUDE DE LA SEQUENCE :
: PEPTIDIQUE AU VOISINAGE :
: DU POINT D'ATTACHE :
: PROTEINE - GLYCANNE. :

I.- ISOLEMENT ET FRACTIONNEMENT DES GLYCOPEPTIDES. 160

A - Isolement des glycopeptides pronasiques.	160
B - Isolement et fractionnement des glycopeptides chymotrysiques.	161
C - Isolement et fractionnement des glycopeptides	165

II.- <u>COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE DES GLYCOPEPTIDES.</u>	168
A - Composition des glycopeptides pronasiques.	168
B - Composition des glycopeptides chymotrypsiques.	170
C - Composition des glycopeptides trypsiques.	175
III.- <u>DETERMINATION DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE.</u>	175
A - Détermination de la séquence peptidique des glycopeptides pronasiques.	175
B - Détermination de la séquence peptidique des glycopeptides chymotrypsiques.	183
C - Détermination de la séquence peptidique des glycopeptides trypsiques.	188
IV.- <u>DISCUSSION - CONCLUSION.</u>	188
<p style="text-align: center;"> :-----: : E T U D E D E L A S T R U C T U R E : : D E S F R A C T I O N S G L Y C A N N I Q U E S : : D E S I g G 1 D U C O L O S T R U M D E V A C H E. : :-----: </p>	
I.- <u>COMPOSITION EN MONOSACCHARIDES DES GLYCOPEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES :</u>	
<u>A - B - C - D.</u>	194
II.- <u>METHYLATION DIRECTE DES GLYCOPEPTIDES.</u>	194

III.-	<u>OXYDATION PERIODIQUE DES GLYCOPEPTIDES.</u>	196
IV.-	<u>HYDRAZINOLYSE ET DIAZOTATION.</u>	199
	A - Les oligosaccharides neutres isolés des glycopeptides IC1A et IC1D.	199
	B - Les oligosaccharides acides isolés du glycopeptide IC1A.	210
V.-	<u>DETERMINATION DE L'ANOMERIE DES LIAISONS.</u>	
	A - Action de la neuraminidase de <u>Clostridium perfringens</u>	213
	B - Action de la β - <u>D</u> - galactosidase de Fève Jack.	
	C - Action de la α - <u>D</u> - mannosidase de "Bromelain"	
	D - Action de la β - <u>D</u> - glucosaminidase de Fève Jack.	
VI.-	<u>DETERMINATION DU POINT DE BRANCHEMENT DE L'ACIDE N - ACETYL - NEURAMINIQUE DANS LE GLYCOPEPTIDE IC 1A.</u>	
VII.-	<u>CONCLUSION.</u>	

CHAPITRE II.

--oOo--

LA LACTOTRANSFERRINE.

---ooOoo---

: ISOLEMENT ET PROPRIETES :
: PHYSICO - CHIMIQUES DE LA :
: LACTOTRANSFERRINE DE VACHE. :
: -----

I.- <u>PROCEDE D'ISOLEMENT.</u>	220
A - Procédé général.	220
B - Recherche des conditions expérimentales pour obtenir un rendement optimal	221
C - Isolement de la lactotransferrine à partir d'un lactosérum de fromagerie.	224
II.- <u>PROPRIETES PHYSICO - CHIMIQUES.</u>	225
A - Propriétés physiques.	226
B - Propriétés chimiques.	226

III.- FRACTIONNEMENT DE LA LACTOTRANSFERRINE. 232

A - Fractionnement sur DEAE - Sephadex A-50. 232

B - Dosages des glucides. 234

IV.- CONCLUSIONS.

: LES GLYCOPEPTIDES DE LA :
: LACTOTRANSFERRINE DE VACHE. :
:-----

I.- GLYCOPEPTIDES PRONASIQUES. 238

A - Isolement des glycopeptides 238

B - Fractionnement. 238

C - Composition et séquence peptidique. 238

II.- GLYCOPEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES. 242

A - Isolement et composition des glycopeptides
chymotrypsiques. 242

B - Fractionnement et structure peptidique des
glycopeptides CII et CIII. 247

III.- GLYCOPEPTIDES TRYPSIQUES. 252

IV.- CONCLUSIONS. 252

:
:
: RESISTANCE DE LA LACTOTRANSFERRINE
:
: DE VACHE AUX ENZYMES DIGESTIVES
:
: DU NOURRISSON.
:

I.- TRAITEMENT DES SELLES ET DOSAGE DE LA LACTOTRANSFERRINE
REJETEE. 255

II.- ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE ET ELECTROPHORETIQUE DE LA
LACTOTRANSFERRINE REJETEE. 255

III.- CONCLUSION. 258

---ooOoo---

CONCLUSIONS GENERALES. 260

---ooOoo---

BIBLIOGRAPHIE.

ABREVIATIONS UTILISEES.

- A T C A : acide trichloracétique.
- E D T A : acide éthylène diamine tétra-acétique.
- Tris : 2 - amino - 2 - hydroxyméthyl - 1,3 - propane - diol
(ou Tri-hydroxyméthyl amino-méthane)
- Rivanol : lactate de 6,9 diamino - 2 - éthoxy - acridine.
- D E A E : diéthylaminoéthyl.
- S E : sulfoéthyl.
- S P : sulfopropyl.
- P O P O P : p - bis - (2 - (5 - phényloxazolyl)) - benzène.
- P P O : 2,5 - diphényloxazole.
- c.p.m. : coup par minute.
- D.O. : densité optique.

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

--oo0oo--

Nos recherches sur le lait de Vache s'inscrivent dans le cadre d'un travail d'équipe effectué au Laboratoire sur la "maternisation" des laits.

Notre choix fut guidé par le fait que ce substrat représente la base de l'alimentation infantile. S'il y a encore une proportion importante de jeunes mamans qui allaitent leur Nouveau-né (ou du moins le désirent) très vite, dès les premières semaines, le lait de Vache devient l'aliment exclusif du Nourrisson. A cela plusieurs raisons d'ordres médical et social peuvent être invoquées : production insuffisante de lait ; fatigue excessive de la mère ; infection de la glande mammaire ; incompatibilité sanguine ; impératifs professionnels ; souci esthétique de la femme....

Il n'en reste pas moins vrai que le lait de Femme est le mieux adapté à l'alimentation du Nourrisson . Les intolérances au lait de Vache sont bien connues et les statistiques de GYÖRGY (101) sont, à cet égard, démonstratives (Tableau I p.2). C'est pourquoi des recherches ont été entreprises dans différents laboratoires en vue de "materniser" le lait de Vache dans l'espoir de lui conférer certaines propriétés bénéfiques du lait de Femme. Seule la connaissance parfaite de la composition du lait de Femme, d'une part, et du lait de Vache, d'autre part, peut permettre d'atteindre ce but. Les résultats acquis jusqu'à ce jour

.../

T A B L E A U I.

Taux de morbidité et de mortalité chez les enfants
nourris au sein ou recevant une alimentation mixte
ou artificielle, d'après GYORGY (101).

Type d'alimentation	Nombre de cas	Mortalité p.1000	Morbidité p.1000	Mortalité par morbidité p.1000
Sein	971	10,2	223,4	4,6
Mixte.	1.441	25,7	464,2	5,5
Artificielle .	854	57,3	573,7	10,0

ont permis à l'Industrie de commercialiser des laits dont les teneurs en éléments "énergétiques" (protides, glucides et lipides), en vitamines et en minéraux se rapprochent fortement de celles du lait de Femme. Si l'aspect "quantitatif" de la "maternisation" du lait de Vache semble arrivé à une perfection qu'il paraît difficile de dépasser dans l'état actuel de nos connaissances sur la composition des laits, l'aspect "qualitatif" est loin d'être résolu.

Dans une revue générale concernant les globulines immunes du lait, CAMPBELL et PETERSEN (40) définissaient l'importance de ce dernier de la manière suivante :

" It is a traditional concept of long standing that the function of the mammary gland is primarily nutritional and that its biological survival value depends upon its contribution to the nutrition of the young mammal. We will demonstrate that the relationship between the infant and the mammary gland is more complex than has hitherto been realized. Furthermore, we will proffer the suggestion that the importance of the mammary gland to the mammal and indeed the biological survival value of this organ is related not to its function as a source of nourishment to the young mammal but as a mechanism of the immunological protection of the otherwise helpless newborn."

Dans ce préambule, les auteurs retraçaient l'évolution des idées concernant le lait. Longtemps, en effet, on crut que son importance était d'ordre purement nutritionnel. Elle est devenue d'ordre biologique depuis la découverte, dans le lait, à côté des constituants "énergétiques", de composés doués d'activités biologiques diverses, comme les oligosaccharides libres, les globulines immunes, la lactotransferrine, les inhibiteurs trypsiques et le lysozyme.

Le travail qui nous a été confié concerne l'étude des immunoglobulines et de la lactotransferrine du lait de Vache en vue de les comparer aux éléments semblables du lait de Femme pour faire apparaître

les éventuelles différences ou ressemblances : le but ultime de notre recherche étant de substituer dans l'alimentation du Nourrisson les composants actifs du lait de Femme par ceux du lait de Vache.

Dans une première série de travaux, nous nous sommes limité à la recherche de procédés d'isolement et de purification des immunoglobulines et de la lactotransferrine . Notre objectif était l'obtention de ces éléments actifs par une méthode possédant les deux qualités réclamées par l'Industrie : rapidité et rendement élevé.

Dans un deuxième temps, nous avons entrepris l'étude de la structure des fractions glucidiques et des séquences peptidiques au voisinage de la liaison des groupements glycaniques avec la protéine. Ceci pour répondre à deux problèmes de recherche fondamentale : d'une part, le codage par la chaîne peptidique de la fixation sur l'asparagine du premier résidu de la N-acétyl-glucosamine, première étape de la biosynthèse du groupement glycanique, et d'autre part, l'enchaînement séquentiel des mono ou oligosaccharides lors de la biosynthèse.

Nous ferons précéder l'exposé de nos travaux par un chapitre concernant l'état actuel de nos connaissances sur les immunoglobulines et sur la lactotransferrine. Nous ne prétendons pas faire une revue générale exhaustive, mais nous insisterons sur les différences et les ressemblances existant, d'une part, entre le lait de Femme et le lait de Vache et, d'autre part, entre l'immunité passive ou active du Nourrisson et du Veau dès leur naissance. Cette revue aura l'avantage de faire ressortir une direction de recherche appliquée pour la "maternisation" du lait de Vache.

.../

Nos résultats seront rassemblés dans deux chapitres distincts : le premier concernera - Les Immunoglobulines et, le second - La Lactotransferrine.

Ils seront précédés de la description des différentes techniques que nous avons utilisées.

Notre travail a fait l'objet des communications et publications suivantes :

Communications :

- I.- A. CHERON et J.MONTREUIL, Modalités de l'attache glucide - protéine dans les globulines Ig G, Colloque européen sur les glucides de BOCHUM, Octobre 1968.
- 2.- A. CHERON, N.CLERET-DUQUESNE, D.BOUVERESSE-FRENOVE et J.MONTREUIL, Modalités de la liaison glycanne - protéine dans les globulines Ig G, (Colloque franco-slovaque sur les glucides) BRATISLAVA Septembre 1969

Publications :

- I.- J.MONTREUIL, M.MONSIGNY, G.SPIK, N.DUQUESNE, A.CHERON, J.DESCAMPS et B.FOURNET - Etudes sur les glycoprotéines. XXXV. Procédés d'exploration de la liaison glucide - peptide dans les glycoprotides. Hypothèse d'un codage par les chaînes peptidiques du point de conjugaison des groupements glycaniques, Z. physiol.Chem, 1969, 350, p.664
- 2.- A. CHERON - Les Globulines immunes du lait, Ann. Nutr.Alim, 1971, 25 A.135 - A 179 (Revue générale).

GENERALITES

--oo0oo--

Ce chapitre sera divisé en deux parties :
la première sera consacrée aux immunoglobulines, la
seconde aux lactotransferrines et à leur rôle bactériostatique, seules ou associées aux immunoglobulines.

.../

Except in such qualified senses, the weight of evidence at present is against the transmission of passive immunity to the circulation of the human infant after birth, though there is a much more credible case for thinking that colostral antibodies may afford protection against enteric infections of the alimentary tract in the human.

F.W.R. BRAMBELL (29)

LES IMMUNOGLOBULINES

I.- INTRODUCTION.

Nous nous proposons d'envisager les problèmes posés par l'immunisation passive du Nouveau-né et de faire un bilan comparatif des connaissances actuelles concernant le développement du système immunitaire chez le Nouveau-né et chez le Veau. Nous pourrons, ainsi, apprécier l'efficacité immunologique pour le Nourrisson des immunoglobulines transmises par l'allaitement maternel. Il nous sera possible, alors, de dégager une direction

.../

de recherche à suivre en vue de supplémer l'alimentation artificielle du Nourrisson par des anticorps de Vache bien que les travaux dans ce domaine soient peu nombreux.

II.- VARIATION DU TAUX DES ANTICORPS AVANT LA NAISSANCE.

A - CHEZ LE VEAU. - Le Veau ne possède aucune immunité passive transmise par la Vache et, à sa naissance, son sérum est presque totalement dépourvu d'anticorps. (Fig.1, p.9)

Le jour du vélage, le taux des immunoglobulines ne représente que 1 à 2,5 % seulement des protéides totaux tandis qu'il atteint dans le sérum de l'animal adulte 14 à 34 %. On sait, en effet, que le placenta de la Vache - comme celui de la Chèvre, du Porc et du Cheval -, constitue avec ses 7 couches de tissus, une barrière infranchissable aux anticorps. (SCHNEIDER et SZATHMARY) (241) et (RATNER, JACKSON et GRUEHL).(230)

B - CHEZ LE NOURRISSON. - Dans l'espèce humaine, le phénomène est totalement différent car le Nouveau-né possède, dès sa naissance, une immunité passive très importante et la transmission des anticorps de la mère au fœtus est en relation directe avec la structure plus perméable du placenta.(Tableau II , p. 10) Les anticorps sont décelables dès la 12ème semaine de la vie foetale (voir la revue générale de PAUPE et MEYER. (218)

C - MODE DE TRANSMISSION.- Dans le sang du Nouveau-né, ces différentes classes d'immunoglobulines ne sont pas également représentées. Seules, en effet, les Ig G sont effectivement transmises de la mère au fœtus (Fig.2, p. 11) et la plupart des chercheurs sont d'accord pour admettre que les Ig A et les Ig M, décelées à l'état de traces chez le Nourrisson aussitôt après la naissance,

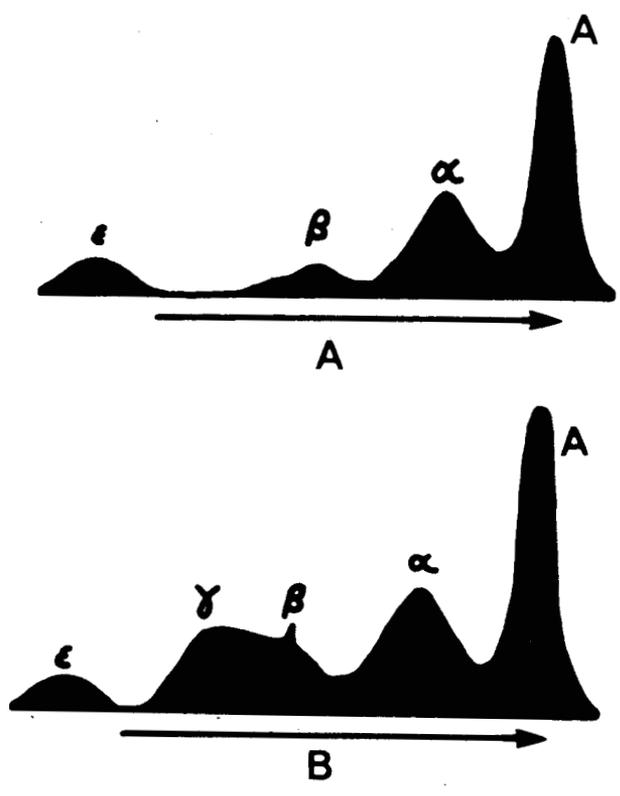


Figure 1.

Diagrammes électrophorétiques du sérum de Veau avant l'ingestion de colostrum de Vache (A) et 24 heures après l'ingestion (B). On remarquera, dans ce dernier cas, l'élévation du pic " γ ", correspondant aux globulines immunes. (HANSEN et PHILLIPS) (106)



T A B L E A U II.

Perméabilités placentaire et mammaire aux anticorps chez diverses espèces de Mammifères (NICOL, GIRARD, CORVAZIER, CHEYROUX, RECOLARD et SIZARET) (205).

Groupes	Structure des placentas	Perméabilité mammaire	Perméabilité placentaire	Espèces du groupe
I.	Epithélio-chloriale à 7 couches de tissus.	+++++	----+	Jument, Vache, Chèvre, Truie, etc...
2.	Syndesmo-choriale à 5 couches de tissus.	++++-	----+	Brebis
3.	Endothélio-choriale	++---	----+	Chienne, Chatte, Louve, Chacale, etc...
4.	Hémo-choriale	+----	+++++	Femme, femelle des Primates et des Ron-geurs.



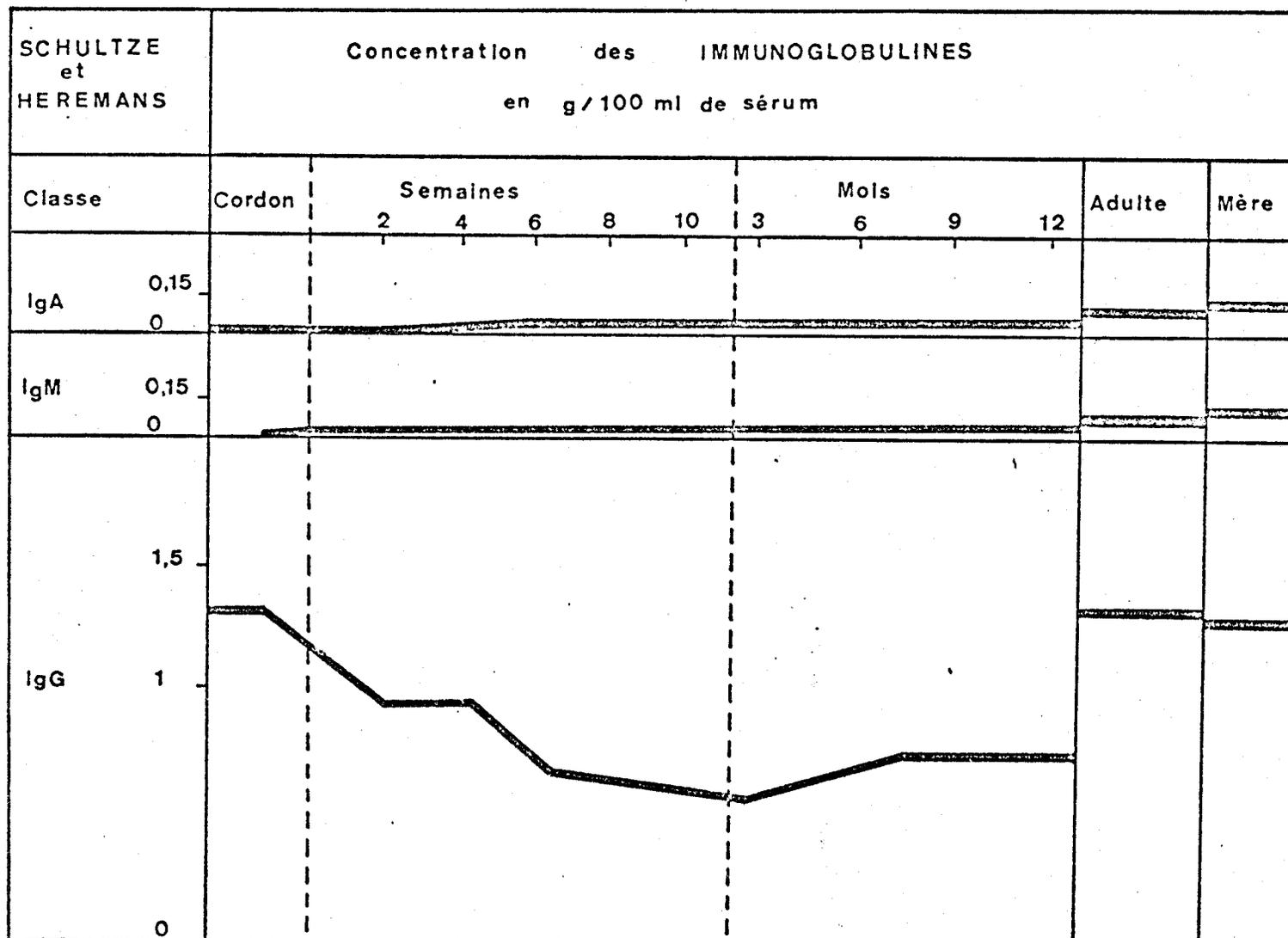


Figure 2.

Variation de la concentration des différentes classes
d'immunoglobulines dans le sang de cordon et dans le sang du
Nourrisson au cours des 12 premiers mois après la naissance,



sont synthétisées par le système immunitaire propre du Nouveau-né. Cette sélection, dans la transmission des anticorps, peut s'expliquer, tout au moins dans le cas des Ig M, par leur taille trop importante. Toutefois, la connaissance plus approfondie de la structure des immunoglobines a confirmé l'hypothèse d'un transport actif. En effet, des expérimentations effectuées chez le Lapin ont apporté les résultats suivants : 1°) l'injection à l'animal des fragments papainiques I, II et III d'Ig G permet de démontrer que la pièce III (ou fragment Fc) est transmise au fœtus 11 fois plus rapidement que la pièce I et 6 fois plus rapidement que la pièce II ; 2°) l'injection de fragments III provenant des différentes classes d'immunoglobulines montre que, seule, la pièce III des Ig G est présente dans le sang du cordon à la naissance (PAUPE et MEYER). (218) En outre, le fait que, chez le Nouveau-né, le taux des Ig G sériques soit souvent supérieur à celui de la mère est en faveur de ce transfert actif.

D - ACTIVITE IMMUNOLOGIQUE DES IMMUNOGLOBULINES TRANSMISES. - L'efficacité de cette immunité passive est très discutée. Nous avons, toutefois, précisé dans le tableau III (p. 13) l'immunité acquise vis-à-vis de certains germes pathogènes par le Nourrisson pendant sa vie intra-utérine, d'après les travaux effectués par différents auteurs et rapportés par PAUPE et MEYER (218) et par SCHULTZE et HEREMANS (242). Ce tableau, bien qu'il soit très incomplet, démontre, que le Nourrisson bénéficie, à la naissance d'une défense immunitaire acquise seulement quand les anticorps qui sont les supports d'une activité sont, chez la mère, du type Ig G. A cet égard, l'existence d'un phénomène d'immunisation transplacentaire chez la Femme diminue, - comparée au lait de Vache -, l'importance du lait de Femme dans l'immunisation passive du Nourrisson.

III.- LES ANTICORPS DES LAITS ET DES COLOSTRUMS DE FEMME ET DE VACHE.

A - IMPORTANCE DES ANTICORPS DES LAITS POUR LE NOURRISSON ET POUR LE VEAU.

La transmission des anticorps du colostrum est vitale pour le Veau : ainsi que nous l'avons vu plus haut, son sérum est, en effet,

T A B L E A U III.

Nature des anticorps transmis par la voie transplacentaire (d'après PAUPE et MEYER (218) et SCHULTZE et HEREMANS (242)).

Anticorps	Passage transplacentaire	Taux chez le Nourrisson	Protection	types d'immunoglobulines	
				chez la mère	transmises
Staphylococciques	++++	++++	?	7S-19S	7S
Streptococciques	++++	++++	++++	-	-
Pneumococciques	++++	++++	++++	-	-
Antibacillaire de Pfeiffer	++	+	+	-	-
Coquelucheux	++	++	+	-	-
Diphthériques	++++	++++	++++	-	-
Tétaniques	++++	++++	++++	-	-
Colibacillaires	+	+	+	IgM	-
Thyphoïdiques- H	++	++	+ ?	IgG-IgM	IgG
" - O	+	+	+ ?	IgG-IgM	-
Antishigella	++	+	+	IgA-IgM	-
Anticholériques	++	+	+	-	-
Mycobactériens	+	+	+	-	-
Syphilitiques	++	++	+	IgA-IgM-IgG	IgG
Toxoplasmiques	++++	++++	++++	-	IgG
Plasmodiaux	++	++	++	-	-
Histoplasmiques	++	++	?	-	-
Coccidioidomycosiques	+++	+++	++	-	-
Poliomyélitiques	++++	++++	-	-	IgG
Rickettsiens	++++	++++	-	-	IgG
De la Varicelle	++++	++++	-	-	IgG
Grippaux	++++	++++	-	-	IgG
De la Rougeole	++++	++++	-	-	IgG
De la lymphogranulomatose vénérienne	++++	++++	-	-	IgG
De l'encéphalite japonaise B.	++++	++++	-	-	IgG
Rubéoleux	++++	++++	-	-	IgG
Anticoxsaïe	++++	++++	-	-	IgG
Des oreillons	++++	++++	-	-	IgG
De l'adénovirus type 12.	++++	++++	-	-	IgG
Des virus Echo 1-2-8-11-20.	++++	++++	-	-	IgG
De la maladie des inclusions cytomégalytiques.	++++	++++	-	-	IgG
De l'herpès	+ ?	+ ?	+ ?	IgA ?	-
Vaccinaux	++	++	+ ?	-	-



dépourvu d'immunoglobulines à la naissance et le Veau les acquiert en ingérant du colostrum (Fig.1, p. 9). Au contraire, à la naissance, le sérum du Nourrisson possède un taux d'anticorps déjà très élevé que ne font pas varier les ingestions de colostrum.

Quelle place convient-il donc de donner à l'allaitement maternel, en matière d'immunisation de l'Enfant ? Pour répondre, en partie à cette question, nous examinerons le problème, à la fois, du point de vue quantitatif, en étudiant la cinétique de la lactation, et du point de vue qualitatif, en analysant l'activité immunologique des anticorps du lait.

1°.- Variations quantitatives des anticorps au cours de la lactation.

Les premières recherches ont été effectuées, sur le lait de Vache, en 1916, par CROWTER et RAISTRICK (58) qui observèrent que le taux des globulines obtenues par relargage par les sels neutres passait de 81,8 g p.l de colostrum du 1er jour à 7,4 g p.l de lait du 8ème jour (voir aussi, ENGEL et SCHLAG) (75). Ultérieurement, l'application de l'électrophorèse permis d'obtenir des résultats plus précis.

Les premières études électrophorétiques ont été effectuées par SMITH (247) en 1946, qui montra que, dans les laits colostraux, les "lactoglobulines immunes" représentaient la fraction protéique majeure du colostrum de Vache (50 à 60 % des protéides totaux et 85 à 90 % des protéides du lactosérum (SMITH) (247). Au contraire, elle devient une fraction mineure dans les diagrammes d'électrophorèse des laits parfaits (SMITH) (248).

Les premières études cinétiques précises des variations des protéides du lait ont été réalisées en 1947 par GRONWALL (97) et et par DEUTSCH (64). GRONWALL montra que pendant les 37 jours de son expérience, le taux des globulines diminuait très rapidement

pour se stabiliser vers le 7ème jour. Selon DEUTSCH, la "stabilisation" du lait de Vache serait réalisée dès le 2ème jour. Des analyses électrophorétiques réalisées par différents auteurs confirmèrent l'ensemble de ces résultats (Mc MEEKIN (174), HEYNDRICKX et DE VLEESCHAUWER (110); WAITE (279); LARSON et KENDALL (141) ; LARSON et al. (142) ; MONTREUIL et al. (187) ; KOBUS (133); ANTONY (4). Ces derniers auteurs ont calculé que l'élimination journalière de globulines immunes atteignait 300 à 350 g le 1er jour de la lactation et tombait à 20 à 25 g au bout du 19ème jour. Les laits colostraux représentent donc le matériel de choix pour effectuer l'isolement des globulines immunes. En effet, non seulement, ils sont riches en globulines immunes, mais ils sont, en outre, pauvres en autres protéides, tandis que les proportions sont inversées dans les laits parfaits (Fig. 3, p. 16).

Des variations identiques ont été observées à propos du lait de nombreux autres Mammifères, comme la Femme, la Truie, la Chèvre, la Jument et la Brebis (voir en particulier, DEUTSCH) (64). Les variations qualitatives et quantitatives des protéides du lait de Femme, au cours de la lactation, ont été particulièrement bien étudiées, et depuis les dosages de HYTTEN (122) les analyses électrophorétiques ont montré la rapide diminution des globulines immunes du lait dont la "stabilisation" est réalisée vers le 6ème jour (BISERTE et MASSE) (23) ; (BISERTE et al.) (20); DEUTSCH (64) ; FONTAINE (80); MONTREUIL et al. (185); NARDUCCI et PALAZZETTI (202); NORDBRING (210); SAGER (237); SCHULTZE et MULLER (243). En outre, l'application de l'immuno-électrophorèse a permis d'identifier et de suivre l'évolution des protéides du lait de Femme et de démontrer que les globulines immunes du colostrum humain étaient essentiellement des Ig A (voir, à ce sujet, la revue générale de HANSON) (107); en effet, la répartition des globulines du système gamma est la suivante : Ig A 90 % ; Ig G 10 % (DE MURALT et al.) (197).

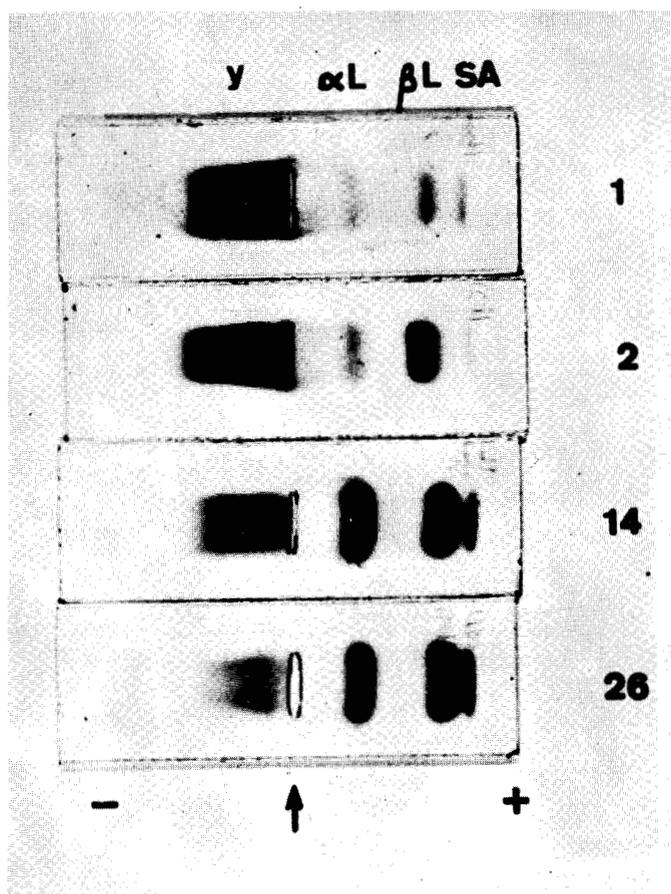


Figure 3.



Electrophorèse en gélose des protéides du lactosérum de colostrums et de laits de Vache à différentes périodes de la lactation. Les prélèvements ont été effectués matin et soir (le numéro 26 correspond donc au 13ème jour après le vélage) (KOBUS)(133)

2°.- Propriétés immunologiques des anticorps. - Nous avons résumé dans le tableau IV (p. 18), les travaux rapportés à ce sujet par PAUPE et MEYER (218). Ils démontrent sans ambiguïté que les anticorps du colostrum et du lait humains possèdent des activités immunologiques bien définies.

3°.- Conclusions. - Le fait que le taux des anticorps présents dans les laits des premiers jours de lactation soit très élevé, d'une part, et que les lacto-anticorps possèdent des activités immunologiques bien spécifiques d'autre part, démontre l'importance de l'allaitement maternel et, bien que ces mécanismes de défense, chez le Veau et chez le Nourrisson, semblent différents, - car les anticorps du lait de Femme ne se retrouvent pas dans le sérum du Nourrisson - , on ne peut affirmer, a priori, que l'allaitement maternel soit plus important pour le Veau que pour le Nourrisson.

B - LES Ig A DU LAIT ET DU COLOSTRUM DE FEMME.

Les globulines immunes du colostrum et du lait de Femme ont fait l'objet de très nombreux travaux immunologiques dont on trouvera les exposés dans les revues générales de MURALT, GUGLER et ROULET (198) et de HANSON (107). Les trois types de globulines immunes G, M et A ont été mis en évidence avec toutefois une prédominance des Ig A principalement dans les laits colostraux. En outre, en ce qui concerne les Ig G, l'application de méthodes électrophorétiques et immuno-chimiques quantitatives ont permis de démontrer qu'elles étaient essentiellement représentées, - comme dans le colostrum et dans le lait de Vache -, par des globulines "rapides". Jusqu'à présent, seules les Ig A ont fait l'objet de recherches approfondies, en raison même de leur taux élevé dans le lait de Femme.

Les Ig A du colostrum et du lait humains possèdent une particularité qui les différencie essentiellement des Ig A sériques :

.../

T A B L E A U IV.

Anticorps présents dans le colostrum et dans le
lait humains (d'après PAUPE et MEYER) (218).

Anticorps	Références
Antitoxine diphtérique	: LEMETAYER <u>et al.</u> (1948); LIEBLING <u>et</u> SCHMITZ (1943) : VON GENDERSEN (1934); SUGG (1935); VIGNES <u>et al.</u> : (1948); ARNON <u>et al.</u> (1959)
Antitoxine tétanique	: DEBRE <u>et al.</u> (1930; LEMETAYER <u>et al.</u> (1950)
Antistreptolysines	: MALMAS <u>et al.</u> (1951); NORDBRING (1957)
Antistaphylolysines	: VIGNES <u>et al.</u> (1948); NORDBRING (1957); DOBIAS <u>et al.</u> : (1957).
Anticorps coquelucheux	: ADAMS <u>et al.</u> (1947)
Anticorps typhiques O et H	: LECLAINDRE (1927); TIMMERMAN (1931); CASTAIGNE : (1897); SCHUBERT <u>et</u> GRUNBERG (1949).
Agglutinines dysentériques	: WONG <u>et</u> WONG (1930)
Anticorps colibacillaires	: ABRAHAM (1929); TOOMEY (1934); SCHNEIDER <u>et</u> PAPP : (1938); MALMAS <u>et al.</u> (1951); ARNON <u>et al.</u> (1959) : HODES (1964); SUSSMAN (1961); ADINOLEFI <u>et al.</u> (1966)
Anticorps grippaux	: HUMMELER (1953).
Anticorps poliomyélitiques	: SABIN (1950); PINTER (1953); GONZAGA <u>et al.</u> (1963); : HODES <u>et al.</u> (1962) (1964); MICHAELS (1965).
Anticorps antioxsakie B ₅	: HODES (1964).
Anticorps ourliens	: HUMMELER (1953).
Anticorps vaccinaux	: WEISS (1939).

l'existence d'un fragment supplémentaire qui réunit vraisemblablement par des ponts disulfures, deux molécules de "lacto-Ig A". Ce fragment est appelé pièce de sécrétion (pièce S) ou pièce de transport (pièce T). Les études en microscopie électronique réalisées par SVEHAG et BLOTH (267) révélèrent une structure en Y, suggérant que la molécule d'Ig A de sécrétion est formée de deux unités d'Ig A 7S superposées, insérant une chaîne de sécrétion. Ce schéma dimérique associé à la pièce de sécrétion se retrouve dans toutes les Ig A d'"excrétion", comme, par exemple, les Ig A des expectorations /BISERTE et al.(21)/ (voir aussi le tableau XIV, p. 53). Plus récemment, un quatrième type de chaîne fut découvert par HALPERN (103) dans les polymères d'Ig A (Ig A colostrales de Femme, de Lapine et Ig A de myélome). Les auteurs émirent l'hypothèse que cette chaîne contribuait à l'édification de la forme polymérique des Ig A : ils l'appelèrent J ("joining"). Cette chaîne fut également mise en évidence dans les Ig M par MESTECKY et al. (176) qui en étudièrent la composition en acides aminés et démontrèrent qu'elle était totalement différente des chaînes légères et de la chaîne de sécrétion. Les mêmes auteurs tirèrent argument de la forte teneur en cystéine de la chaîne J pour lui attribuer une hypothétique contribution dans le maintien de la structure tertiaire des polymères d'Ig A et d'Ig M.

1°.- Préparation et purification. Les méthodes de préparation des Ig A mettent à profit des différences de charge et de masse moléculaire qui existent entre les Ig G et les Ig M, d'une part, et les Ig A, d'autre part. TOMASI et BIENENSTOCK (274) ont décrit une méthode qui consiste à associer l'électrophorèse à la chromatographie sur un échangeur d'ions. Les Ig A obtenues sont finalement purifiées par un tamisage moléculaire (Fig.4, p.20) MONTREUIL et al.(185) ont décrit un procédé général de fractionnement des protéides des milieux biologiques à l'aide d'un gradient de concentration en sulfate d'ammonium associé à un gradient de pH (Fig. 5, p. 21). Les auteurs ont appliqué la méthode aux protéides du lait de Femme ; ils obtiennent des Ig A dans les précipités P₄ et P₆ qu'ils ont ensuite

.../

Colostrum ajusté à pH 4,6 avec de l'acide acétique



Surnageant, neutralisé et soumis à l'électrophorèse en gel d'amidon. Récupération des fractions contenant des Ig A.



Fractionnement sur DE - 52, avec des tampons phosphates 0,01 M. de pH 7,5 - 0,1 M de pH 6,4. La seconde fraction contient les Ig A.



Chromatographie sur Sephadex G-200 dans NaCl 0,14 M.



Ig A

Figure 4.

Schéma de préparation des Ig A colostrales humaines (d'après TOMASI et BIENENSTOCK.)(274)



LACTOSERUM

Amené à 33 % de saturation en
sulfate d'ammonium et à pH 7

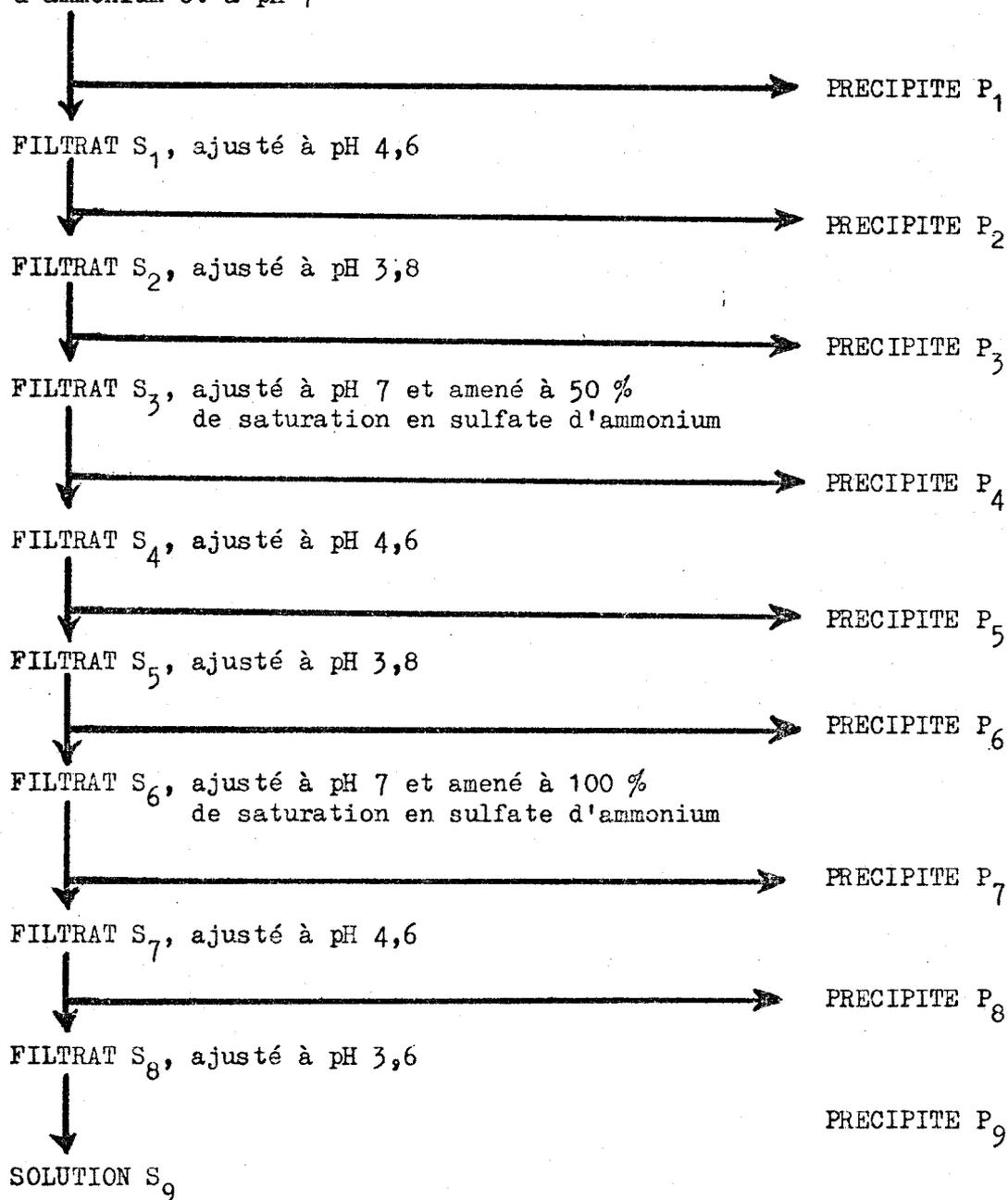


Figure 5.

Schéma de fractionnement du lactosérum selon
le procédé de MONTREUIL et al. (185)

purifiés sur Amberlite XE - 64. Plus récemment, DESCAMPS (62) a amélioré le procédé en supprimant l'étape de la chromatographie sur Amberlite XE - 64 et en la remplaçant par deux purifications successives, l'une sur colonne de Sephadex G 150, et l'autre sur C M -Sephadex C 50 ou D E A E - Sephadex A 50.

2°.- Propriétés physico-chimiques des Ig A colostrales humaines. Nous avons résumé les propriétés physico-chimiques des Ig A dans les tableaux V (p. 23) et VI (p. 24). Les résultats obtenus au laboratoire par DESCAMPS (62) divergent quelque peu en ce qui concerne le taux des acides sialiques : 2,1 % au lieu de 0,65 %. En outre, DESCAMPS caractérise deux types d'osamines : 4 % de glucosamine et 0,8 % de galactosamine.

3°.- Structure. Mise à part l'hypothèse, partiellement vérifiée, de l'existence d'un édifice moléculaire stable (liaisons covalentes) composé de deux molécules d'Ig A, de la pièce de sécrétion et de la chaîne J, les études de structure sont encore peu nombreuses.

On peut citer les travaux de DESCAMPS, MONSIGNY, et MONTREUIL (63). Ces auteurs ont démontré l'existence de deux types de liaison entre la protéine et les groupements glucidiques : 8 de ces derniers, d'une masse moléculaire moyenne de 1800 sont conjugués à la fraction protéique par des liaisons O - galactosaminidiques , 4 à la sérine et 4 à la thréonine. 12 autres d'une masse moléculaire moyenne de 3000 sont unis à la protéine par des liaisons alcali-stables, du type "N-(β - aspartyl) - glucosaminylamine."

C - LES ANTICORPS DU LAIT ET DU COLOSTRUM DE VACHE.

Contrairement aux immunoglobulines humaines, les anticorps du lait et du colostrum de Vache sont essentiellement des Ig G. Néanmoins, MACH, PAHUD et ISLIKER (161) ont caractérisé dans le colostrum de Vache une Ig A avec une pièce de sécrétion, mais il semble actuellement difficile d'accorder un rôle important à cette Ig A comparativement à celles qui existent en proportions élevées dans le lait de Femme. Les auteurs ont isolé cette Ig A par chromatographie sur DEAE - cellulose et sur Sephadex G-200, mais n'ont pu obtenir une fraction bien homogène et signalent l'existence d'Ig G polymérisées dans leur préparation d'Ig A. Ils ont, néanmoins, identifié une spéci-

T A B L E A U V.

Propriétés physico-chimiques des Immunoglobulines A du
colostrum et du lait humains.

Propriétés	Ig A	Pièce de sécrétion		Pièce J.
	(a)	(a)	(b)	(c)
Coefficient de sédimentation $S^{\circ}_{20} w.x 10^{13}$	11,4	4,2	5	-
Masse moléculaire	385.000(*)	58.000	75.500	26.000
Volume spécifique partiel	0,723	0,726	0,730	-
Glucides totaux (p.100)	-	9,5	-	7,6
Hexoses	6,2	-	-	-
- Galactose	-	-	3,12	1,61
- Mannose	-	-	3,95	2,27
Fucose	0,73	-	2,26	0,38
Hexosamines	4,1	-	4,36	1,93
Acides sialiques	0,65	-	1,9	1,42

(a) - TOMASI et BIENENSTOCK (274)

(b) - KOBAYASHI (132)

(c) - MESTECKY et al.(175); NIEDERMIER et al.(207)

* - pour deux molécules d'Ig A et une molécule de P.S.



T A B L E A U VI.

Composition en amino-acides des Ig A du lait humain

(en résidus pour 1000) /d'après MESTECKY et al.(177)/.

Acides aminés	Chaîne H	Chaîne L	Pièce de sécrétion	Chaîne J
Acide aspartique	72,2	84	81,5	149,4
Thréonine	99,9	83,3	88,1	81,2
Sérine	115,6	111,7	114,4	52,1
Acide glutamique	91,9	111,6	101,5	112,9
Proline	89,6	73,5	74,7	72,3
Glycocolle	79,8	67,4	88,5	21,8
Alanine	67,6	70,3	65,7	48,4
Cystéine	28,8	26,9	28,6	50,7
Valine	80,3	76,7	77,8	75,7
Méthionine	11	6	8,4	9,6
Isoleucine	15,3	36,6	19,7	67,4
Leucine	92,6	79,2	88,8	68
Tyrosine	26,8	42,2	29,6	46,1
Phénylalanine	30,9	30,2	30,9	11,8
Lysine	38,9	56,7	44,7	48,2
Histidine	18	14,9	15,7	10,2
Arginine	40,5	28,7	41,3	74,2



ficité immunologique différente de celles des Ig G. Ces résultats sont en accord avec le taux de glucides qui est de 5 à 6 % tandis que celui-ci ne représente que 1,2 à 1,5 % des Ig G selon MACH, PAHUD et ISLIKER (161) et MACH (160). Depuis ces travaux, PORTER et NOAKES (229) ont amélioré les techniques de fractionnement et ont isolé des Ig A du lait, de la salive et des sécrétions intestinales. Dans ces dernières, les Ig A représentent la fraction majeure des immunoglobulines. Quant aux Ig M, elles sont présentes dans le lait mais leur taux est inférieur à celui des Ig A.

1°.- Préparation des immunoglobulines. Les premières tentatives d'isolement d'une globuline dont la présence dans le lait avait été pressentie par HAMMARSTEN (104), furent faites en 1885 par SEBELIEN (244) par précipitation par le sulfate de magnésium. Elles furent reprises, en 1894, par WASSERMANN (282) qui appliqua au lait un fractionnement au sulfate d'ammonium. CROWTHER et RAISTRIC (58), en 1916, appliquèrent le procédé au sulfate de magnésium pour préparer les globulines du lait qu'ils fractionnèrent ensuite en euglobulines insolubles dans l'eau pure à leur point isoélectrique et en pseudoglobulines solubles dans l'eau à leur point isoélectrique, même en l'absence de sels.

SMITH (247), en 1946, démontra l'hétérogénéité des préparations obtenues par les fractionnements au sulfate de magnésium et décrivit deux procédés de préparation des globulines immunes du colostrum et du lait par relargage au sulfate d'ammonium. Depuis, diverses méthodes ont été proposées par différents auteurs. Elles fournissent des préparations généralement hétérogènes et on conçoit aisément que nos connaissances sur les propriétés physico-chimiques des globulines du lait et du colostrum soient encore très fragmentaires.

a) - Procédés de SMITH. Les modes opératoires sont différents suivant qu'ils concernent le colostrum ou le lait.

- Préparation des globulines immunes du colostrum de Vache.

(SMITH) (247). Le fractionnement des protéides du colostrum

.../

de Vache selon ce procédé de SMITH (247) est schématisé dans la fig.6 (p.27). L'analyse électrophorétique montre que la fraction C renferme 85 % de globulines immunes et que, seule, la fraction B est constituée de globulines immunes pures. Par dialyse, elle fournit des euglobulines et des pseudoglobulines dans un rapport pseudoglobulines / euglobulines de 0,75.

- Préparation des globulines immunes du lait de Vache (SMITH) (248). Le procédé de fractionnement des globulines immunes du lait de Vache décrit par SMITH est illustré par le schéma de la fig.7 (p.28) dans laquelle nous avons précisé la composition en globulines immunes des diverses fractions déterminée par électrophorèse. On voit que la fraction E est hétérogène mais qu'elle fournit, par dialyse, des euglobulines et des pseudoglobulines électrophorétiquement homogènes. Toutefois, l'ultracentrifugation révèle une certaine hétérogénéité due principalement à la présence de composés "lourds" 20 S.

- b) - Procédé de MONTREUIL et al. - MONTREUIL et al. ont fractionné les protéides du colostrum décaséiné selon le protocole expérimental décrit plus haut (voir p.21). Les auteurs ont observé que certains laits colostraux fournissaient des précipités P 1 (15 à 20 g p.l de colostrum) ne renfermant que des Ig G. Dans d'autres cas, celles-ci sont accompagnées d'Ig M que l'on met aisément en évidence par l'analyse immunoélectrophorétique et que l'on élimine par chromatographie sur DEAE - cellulose utilisée en analyse "frontale". Les précipités P 3 (1 à 1,5 g p.l de colostrum) sont constitués d'Ig G et d'Ig M, les précipités P 4 (1,5 à 5 g p.l de colostrum), d'Ig G et parfois d'Ig A. Dans les deux cas, les globulines immunes sont souillées de lactalbumine, de lactoglobuline et de sérum albumine. La chromatographie sur DEAE - cellulose permet d'obtenir des fractions pures d'immuno-globulines.
- c) - Procédé de fractionnement éthanolique du lait de BAIN et DEUTSCH. (11). BAIN et DEUTSCH ont tenté d'appliquer au lait la méthode de fractionnement éthanolique des protéides du sang décrite par COHN et al. (55). Les auteurs ont isolé, de cette manière, plusieurs

2 l. de colostrum collecté 1 h. après le vêlage sont écrémés par centrifugation et décaséinés.

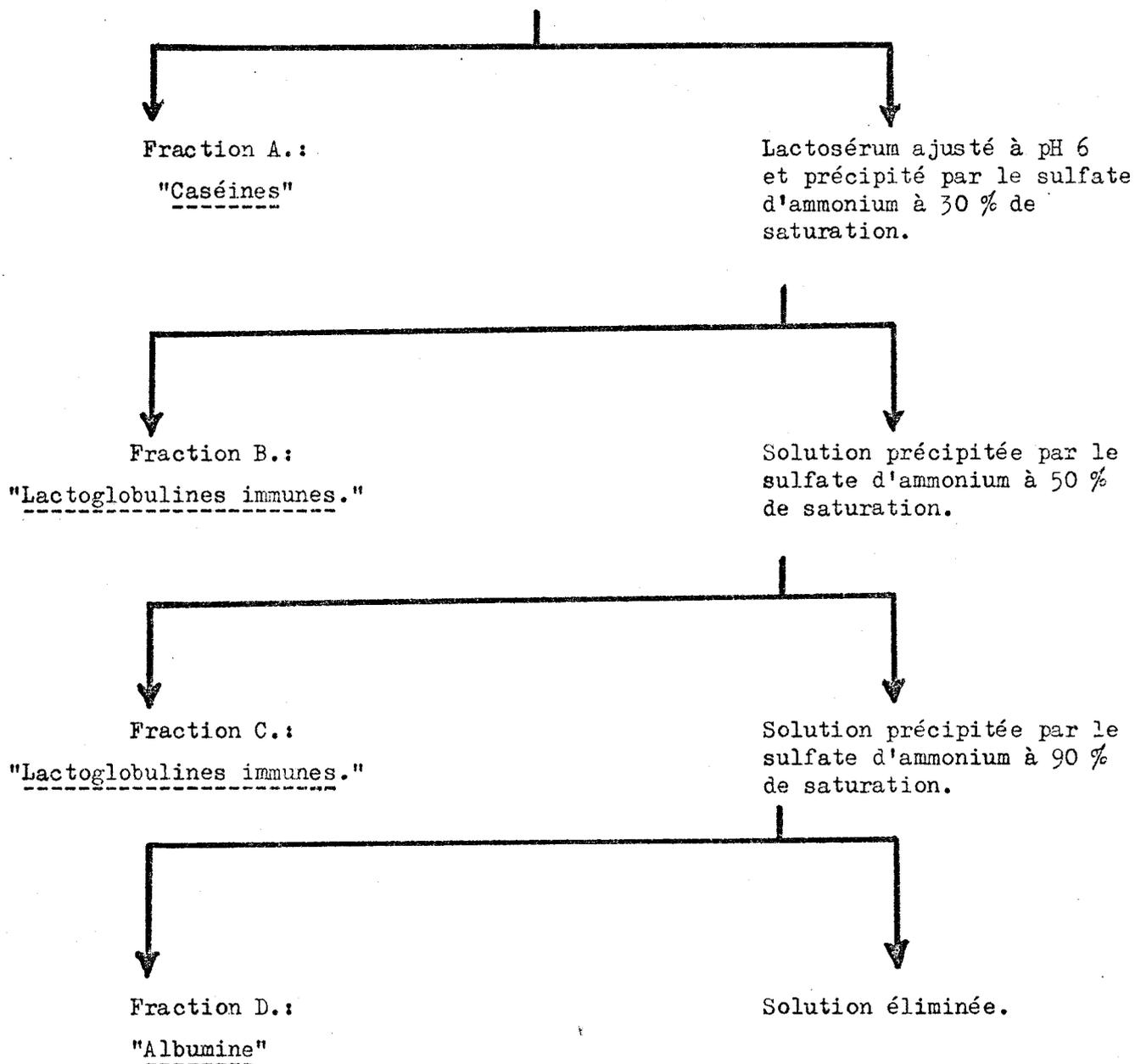


Figure 6.

Schéma de fractionnement des globulines

immunes du colostrum de Vache. (d'après SMITH) (247)

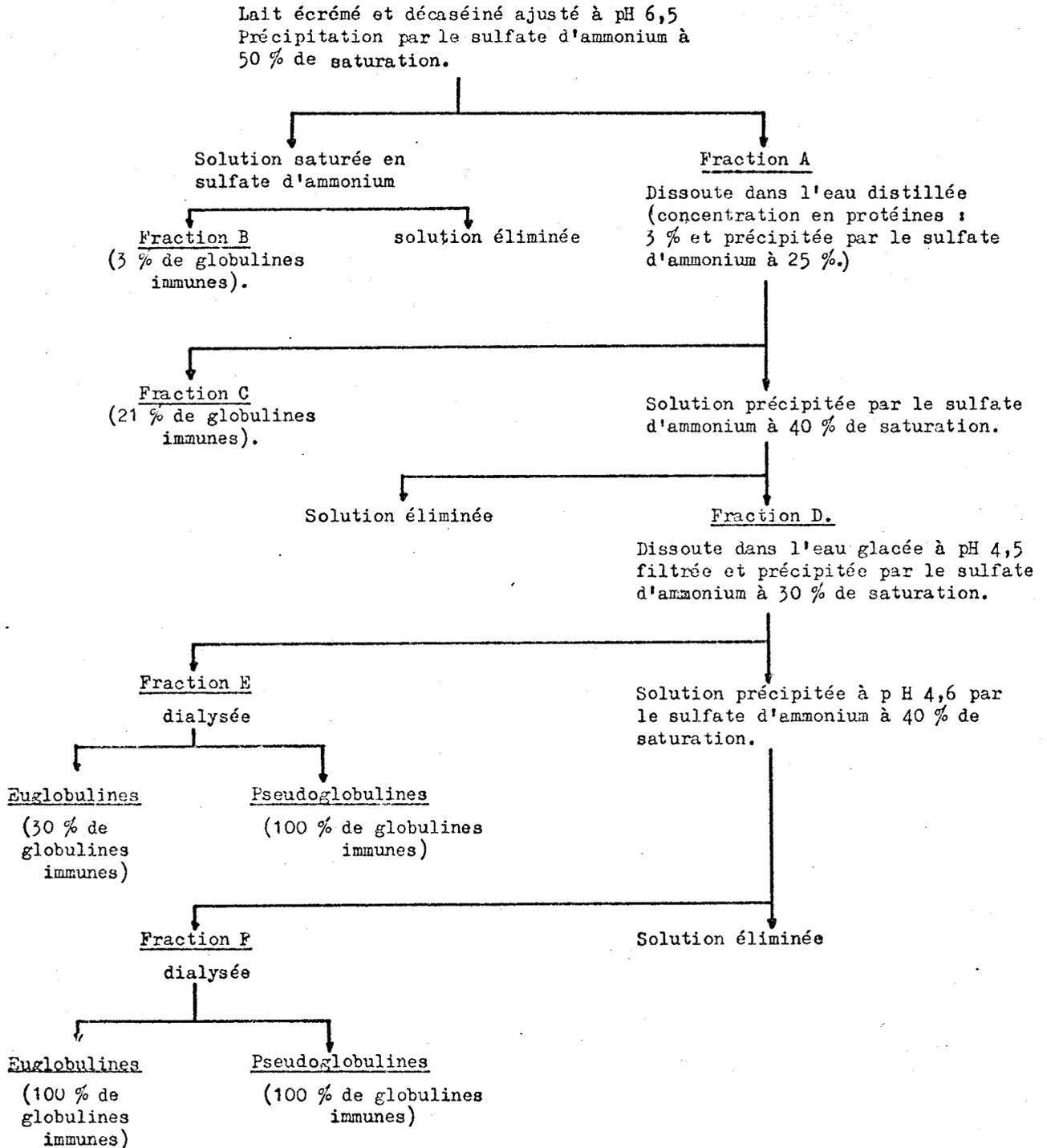


Figure 7.
Schéma de fractionnement des globulines immunes
du lait de Vache. (selon SMITH) (248)



fractions globuliniques parmi lesquelles se trouvait une fraction de globulines immunes homogène à l'électrophorèse à p H 8,6, mais hétérogène en p H neutre ou acide.

d) - Procédé au rivanol de KENYON, ANDERSON et JENNESS.(127).

HOREJSI et SMETANA (116) ont décrit, en 1956, un procédé d'isolement des globulines immunes du sérum fondé sur la propriété que possède le rivanol de précipiter la totalité des protéides sériques sauf les globulines immunes (et la transferrine) que l'on isole de la solution surnageante par un fractionnement éthanolique. Sur le même principe, KENYON et al.(127) ont mis au point un procédé de préparation des globulines immunes du colostrum et du petit lait de Vache. Le mode opératoire est le suivant : à un volume de colostrum ou de lait, délipidé et décaséiné, on ajoute 3,5 volumes d'une solution aqueuse de rivanol à 0,4 % (p/v) et on ajuste le p H à 8,5. Le précipité est éliminé par centrifugation ou par filtration. Le liquide surnageant est débarrassé du rivanol par absorption sur charbon activé. L'analyse électrophorétique des solutions protéiques montre que l'on peut obtenir à partir du lait, des préparations renfermant 89 % de globulines immunes homogènes en électrophorèse libre (mobilité électrophorétique : - 1,8 à 2,2 $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{sec}^{-1}$ à p H 8,6 force ionique 0,1) mais hétérogènes en électrophorèse de zone et immunoélectrophorèse. En effet, elles sont accompagnées de lactalbumine, de sérum albumine et de lactotransferrine (ANTONY) (4). En outre, le charbon absorbe des quantités élevées de globulines immunes et les rendements sont faibles. Toutefois, l'élimination du rivanol par le chlorure de sodium ou par le Sephadex et la chromatographie sur DEAE - cellulose améliorent notablement les performances de la méthode au rivanol.

e) - Procédés électrophorétiques et chromatographiques. La séparation des protéides du lait délipidé, décaséiné et dialysé a été réalisée par HILPERT et al.(113) par électrophorèse continue sur papier (Appareil Spinco ; tampon véronal de p H 8,6 et de force

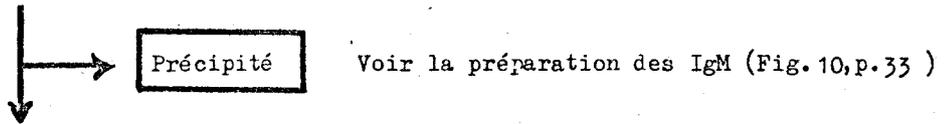
ionique 0,02 ; papier filtre cartonné SCHLEICHER et SCHULL 2668 ; 1000 V et 75 m A ; 100 mg de protéide/ ml). Les auteurs ont obtenus 5 fractions dont l'une est riche en globulines immunes que la dialyse a séparées en eu - et en pseudo-globulines mais ont limité leurs recherches à la lactalbumine et aux lactoglobulines.

L'électrophorèse préparative sur acétate de cellulose a été appliquée au fractionnement des protéides du lactosérum par MHATRE et al. (178) (tampon véronal de p H 8,6 et de force ionique 0,05 : 200 V, 15 mn.) L'auteur obtient cinq fractions qu'il élue par un mélange d'éthanol et de chloroforme et qu'il étudie, ensuite, par électrophorèse libre. Les fractions A, B et C sont hétérogènes, mais sont enrichies, respectivement, en sérum albumine, β - lactoglobulines et α - lactalbumine. Les fractions D (pseudoglobuline) et E (euglobuline) paraissent homogènes. L'auteur ne précise pas les rendements qu'il a obtenus et n'a pas effectué de recherches physico-chimiques sur les protéides isolés.

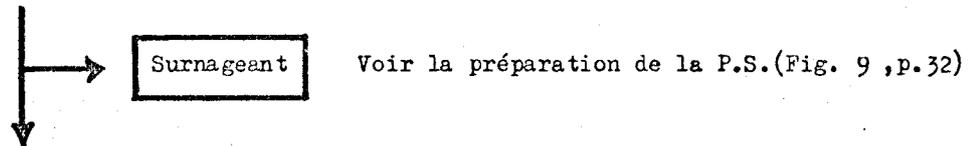
f) - Procédé de BUTLER, CHARLOTTE et MAXWELL (36) - Les auteurs utilisent quatre procédés généraux bien connus : précipitation par les sels, électrophorèse, tamisage moléculaire et chromatographie sur échangeurs d'ions - les figures 8, 9 et 10 (p.31, 32 et 33) précisent les différentes étapes de ce mode opératoire.

2°.- Fractionnement des Ig G. - L'isolement des Ig G du lait et du colostrum de Vache est assez aisé. Toutefois, ces Ig G possèdent une très grande hétérogénéité interne. Les premières méthodes de préparation des Ig G du lait et du colostrum de Vache utilisent le relargage par des sels neutres (SMITH) (247 et 248). Par cette méthode, on ne pouvait mettre en évidence l'hétérogénéité des Ig G. Celle-ci fut démontré par la chromatographie sur échangeurs d'ions et par l'électrophorèse qui ont permis de séparer différents types d'Ig G. Ces Ig G se subdivisent en deux grandes familles : les Ig G "lentes" (Ig G 2) et les Ig G "rapides" (Ig G 1) (CAROLL (44), MURPHY, AALUND, OSEBOLD et CAROLL (200) ; (Fig 11, p. 34). En 1965, ANTONY (4)

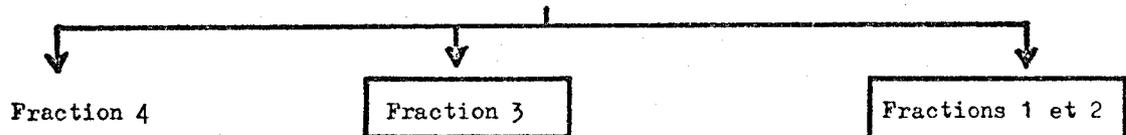
Le lactosérum est dialysé contre de l'eau distillée pendant 3 jours à 4°C puis centrifugé.



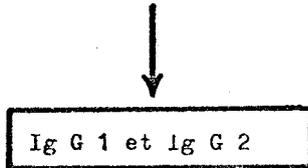
Le surnageant est amené à 33 % en saturation de $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ à 22°C et centrifugé.



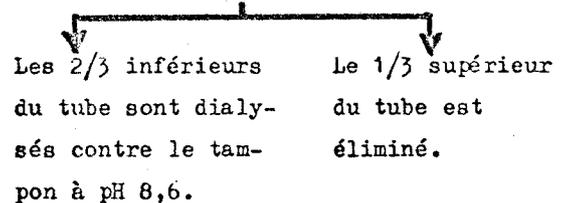
Le précipité est dialysé contre un tampon à pH 8,6 (Tris 0,1M ; NaCl 0,9 M ; Na_2N_3 0,02 % ; E.D.T.A. 0,003 M) puis chromatographié sur une colonne de Sephadex G 200 stabilisée dans le tampon précédent.



Chromatographie sur une colonne de D E A E - Sephadex stabilisé dans un tampon à pH 8,3 (Tris 0,1 M ; NaCl 0,05 M). L'élué est réalisée par un gradient de NaCl (concentration finale 0,22 M).



Ajouter 1 volume d'une solution de NaCl 0,195 M - Na Br 7,6 M puis centrifuger.



Chromatographie sur une colonne de Sephadex G 200 (avec ou sans guanidine).

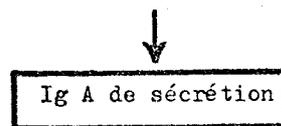
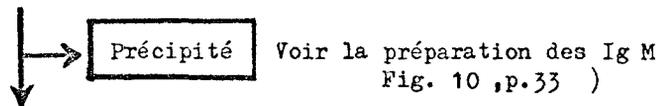


Figure 8.

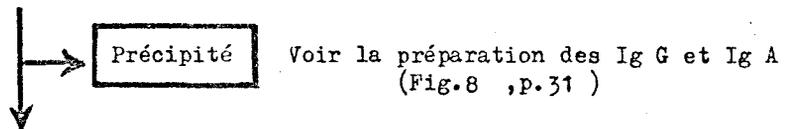
Préparation des Ig G et Ig A du lait de Vache.

/ d'après BUTLER et al. (36)./

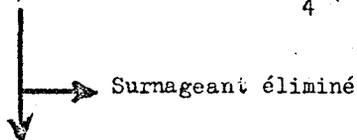
Le lactosérum est dialysé contre de l'eau distillée pendant 3 jours à 4°C puis centrifugé



Le surnageant est amené à 33 % en saturation de $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ à 22°C et centrifugé.



Le surnageant est amené à 50 % en saturation de $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ à 22°C et centrifugé.



Le précipité est chromatographié sur une colonne de D E A E -Sephadex A 50



La fraction contenant la pièce de sécrétion (P.S.) est recueillie et chromatographiée sur une colonne de Sephadex G 200 pour éliminer les Ig G et autres contaminants de masse moléculaire faible.

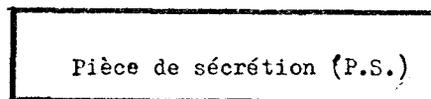
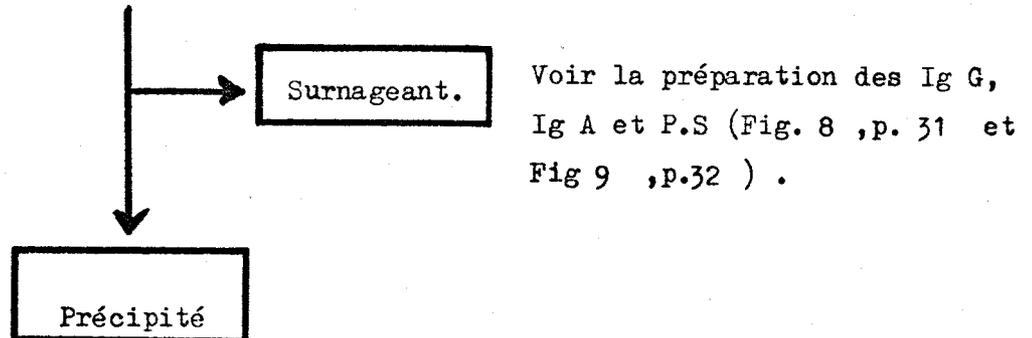


Figure 9.

Préparation de la pièce de sécrétion (P.S.) du lait de Vache. / d'après BUTLER et al. (36)/

Le lactoserum est dialysé contre de l'eau distillée pendant 3 jours à 4° C puis centrifugé



On le solubilise dans un tampon à pH 8,3 (Tris 0,1 M + NaCl 0,15 M) auquel on ajoute un volume d'une solution de NaCl 0,195 M - NaBr 7,6 M. On centrifuge l'ensemble dans un tube.

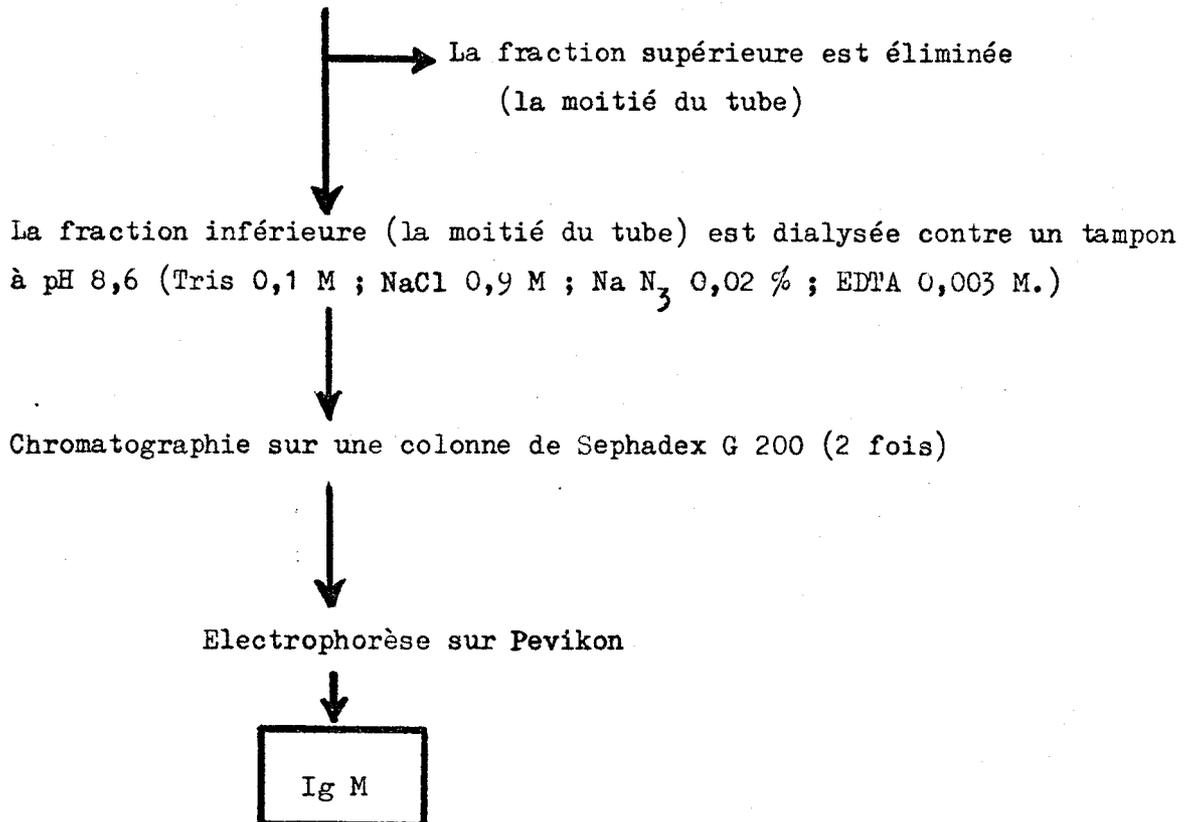


Figure 10.

Préparation des Ig M du lait de Vache
/d'après BUTLER et al. (36)/

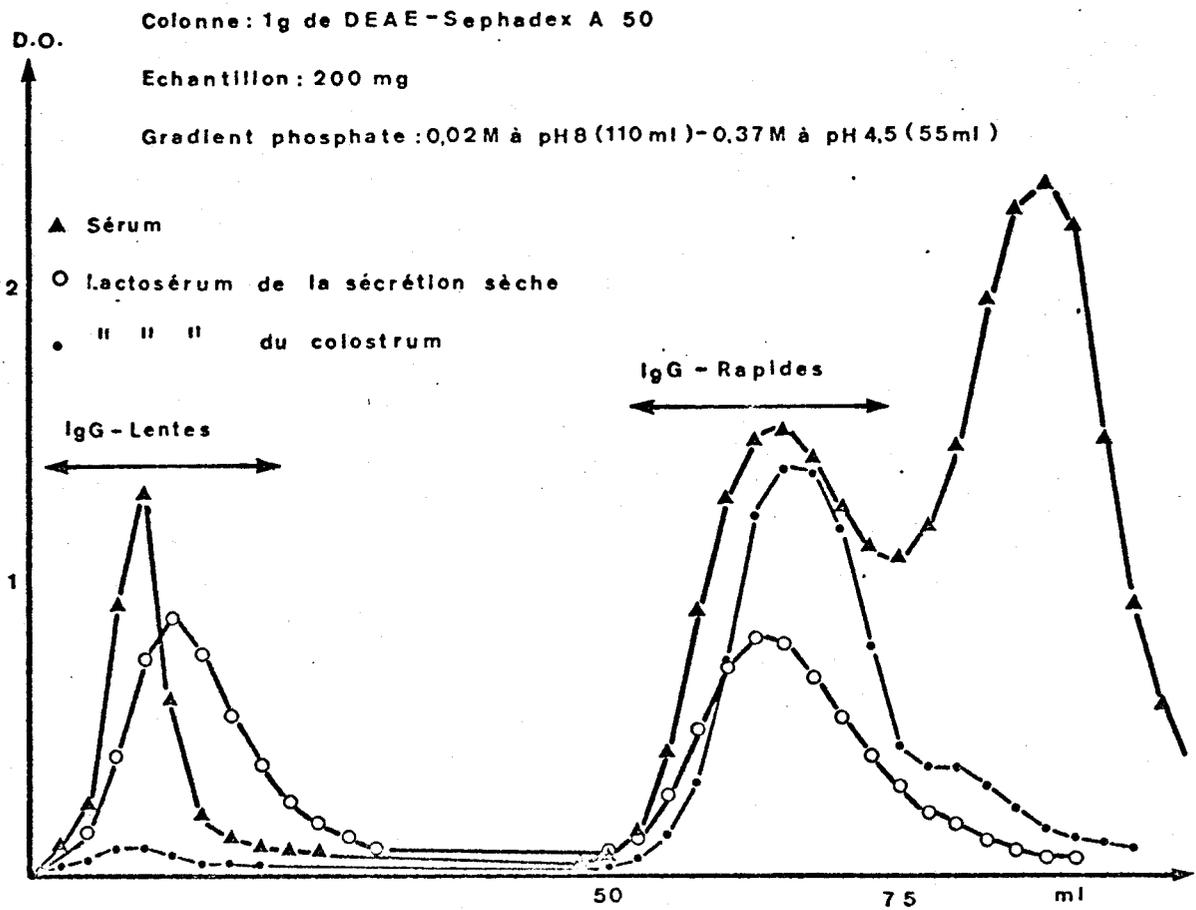


Figure 11.

Courbes d'élution des fractionnements sur D E A E -
 Sephadex A-50 du lactosérum de la " sécrétion sèche ", du
 colostrum et du sérum de Vache (MURPHY et al.) (200)



observait que le colostrum ne contenait qu'un seul type d'Ig G : la fraction des Ig G du sérum dite "rapide". Par immunoelectrophorese, cet auteur démontra la parenté étroite qui existait entre les Ig G "rapides" du sérum et les Ig G du colostrum de Vache.

KICKHOFEN, HAMMER et SCHEEL (128) ont isolé du sérum de Vache trois types d'Ig G qu'ils nommèrent $\gamma 1$, $\gamma 2$ et γG_S , tandis qu'ils ne mettaient en évidence dans le colostrum que les γG_S qui correspondent aux Ig G "rapides". En outre, les auteurs ont introduit une distinction entre les γG_S du sérum et les γG_S du colostrum, ces dernières étant plus riches en résidus de cystéine. Les Ig G appelées $\gamma 1$ et $\gamma 2$ représentent deux sous-groupes des Ig G "lentes".

BUTLER et al (36) arrivent à la même conclusion, à savoir que la majeure partie des Ig G sont du type Ig G₁.

3°- Propriétés physico-chimiques des Immunoglobulines.

Les propriétés physico-chimiques des globulines immunes du colostrum et du lait de Vache sont rapportées dans les tableaux VII (p.36), VIII (p.37), et IX (p.38) respectivement pour les Ig G, les Ig A (et la P.S.) et les Ig M. La composition en acides aminés des IgG est précisée dans le tableau X (p. 39).

4°- Structure.

L'étude de la structure des Ig G du lait et du colostrum de Vache se limite actuellement aux séquences peptidiques voisines de la liaison protéine-glycane et à la nature de cette liaison. NOLAN et SMITH (209) ont déterminé la séquence peptidique N-terminale au voisinage du point d'attache. Au laboratoire, dès 1965, nous avons, d'une part, démontré l'existence d'une liaison entre la fonction réductrice de la N-acétyl-glucosamine et la fonction amide de l'asparagine et, d'autre part, établi la séquence tripeptidique C-terminale au voisinage de ce point d'attache. (cité par MONSIGNY) (181)

T A B L E A U VII.

Propriétés physico-chimiques des IgG₁
du colostrum de Vache.

Propriétés	KICAHOFEN <u>et al.</u> (128)	ANTONY (4)	SMITH (247)	NOLAN et SMITH (209)	SMITH <u>et al.</u> (250)	LISOWSKI <u>et al.</u> (156)
Masse moléculaire	159 500 (a)	132 600 ± 5 500(a)	160 000 (a)	-	-	153 000 (a)
	166 800 (a)	123 000 ± 8 000(b)	190 000 (a)	-	-	
Coefficient de sédimentation	6,71	6,5 ± 0,2	7	-	-	6,55
S ⁰ _{20 w} x 10 ¹³	6,60					
Volume spécifique partiel	0,735 ± 0,003 (à 25°C)	0,75 (à 20°C)	-	-	-	
Coefficient de diffusion	3,82	-	-	-	-	3,94
D ⁰ _{20 w} x 10 ⁷						
f/fo	1,54	-	-	-	-	1,53
Coefficient d'extinction						
E ₁ ¹ p.100 E ₁ cm						
Tampon phosphate (λ:278 m μ)	13,68 ± 0,08	-	-	-	-	-
0,1 HCl (λ:278 m μ)	13,7 ± 0,06	-	-	-	-	-
0,1 NaOH (λ:290 m μ)	14,77	-	-	-	-	-
(λ:283 m μ)	14,73	-	-	-	-	-
Glucides p.100						
Hexoses	1,13 ± 0,04	1,60 à		0,93	2,65 ± 0,1	1,79
Fucose	0,20 ± 0,03	2,40		0,18 ± 0,01		
Osamines	1,55 ± 0,04	0,90 à 1,19	-	1,50	1,48 ± 0,09	1,09
Acides sialiques	0,28 ± 0,05	0,65 à 1,03	-	0,30	-	0,47
Glucides, en mole par mole d'Ig G						
Galactose	10,2	6	-	6	-	-
Mannose		6	-	3	-	-
Fucose	2	2	-	2	-	-
Osamines	11,4(e)	8 (d)	-	15	-	-
Acides sialiques	1,5	4 (e)	-	1,5	-	-

(a) - par ultracentrifugation
(b) - par diffusion de la lumière
(c) - N-acétyl-glucosamine + N-acétyl-galactosamine dans le rapport 25:1.

(d) - N-acétyl glucosamine exclusivement
(e) - Acides N-glycolyl et N-acétylneuraminique.

T A B L E A U VIII.

Propriétés physico-chimiques des Ig A et de la P.S.
du colostrum de Vache.

Propriétés	Ig A		Pièce de sécrétion
	BUTLER (35)	PORTER et NOAKES (229)	BUTLER (35)
Masse moléculaire x 10 ⁻³	385 ± 15(a) 440 (b)	-	86 ± 1 (a) 75 (x)(b) et 69 (xx)(b)
Coefficient de sédimentation S ₂₀ ^w x 10 ¹³	10,9	11,2	4
Glucides (p.100)	-	-	-
-Oses neutres	5,5	-	5
-Osamines	-	-	3,1

(a)- par équilibre de sédimentation.

(b)- par tamisage moléculaire.

(x) - en absence de guanidine.

(xx)- en présence de guanidine.



T A B L E A U IX.

Propriétés physico-chimiques des Ig M du
colostrum de Vache.

Propriétés	MUKKUR et FROESE (196)	MACH <u>et</u> <u>al.</u> (161)	BUTLER (34)	KUMAR et MI- KOLAJCIK (138)
Masse moléculaire x 10 ⁻³	1030	-	900	900
Coefficient de sédimenta- tion S° ₂₀ ^w x 10 ¹³	19,7	19,2	-	18,2 - 19,8
Volume spécifique partiel	0,726	-	-	-
Glucides (p.100)	-	-	-	-
- Hexoses	-	-	-	5,13 ± 0,12
- Mannose	-	-	-	3,42 ± 0,08
- Galactose	-	-	-	1,71 ± 0,08
Hexosamines	-	-	-	2,9 ± 0,1
- Glucosamine	2,08	-	-	-
- Galactosamine	0,72	-	-	-
Fucose	-	-	-	1,25 ± 0,05
Acides sialiques	-	-	-	1,39 ± 0,06

T A B L E A U X.

Composition en amino-acides des Ig G₁ du colostrum de Vache

(en g de résidus pour 100 g de protéine sèche).

Acides aminés	ANTONY (4)	KICKHÖFEN <u>et al.</u> (128)				LISOWSKI <u>et al.</u> (156)
Acide aspartique	9,65	7,71	7,88	7,95	7,99	7,5
Acide glutamique	13,55	9,64	9,85	10,08	10,15	9,22
Arginine	3,49	4,42	4,40	4,74	4,31	4,96
Histidine	2,41	1,80	1,85	1,84	1,86	1,43
Lysine	7,27	5,92	6,09	5,90	6,10	6,74
Alanine	3,40	3,21	3,36	3,39	3,41	3,76
Cystéine	2,96	3,01	3,18	3,18	-	4,35
Glycocolle	3,47	4,09	3,78	3,77	3,82	3,61
Isoleucine	3,30	2,43	2,46	2,41	2,32	5,12
Leucine	7,35	6,54	6,76	6,78	6,61	7,11
Méthionine	-	0,76	0,77	0,76	0,79	0,85
Phénylalanine	3,98	3,34	3,34	3,34	3,34	3,94
Proline	7,90	7,12	7,31	7,05	7,26	7,43
Sérine	9,55	10,98	10,37	11,13	10,98	10,8
Thréonine	7,80	8,80	8,99	9,26	9,28	9,73
Tryptophane	3,17	3,08	3,09	3,15	3,07	-
Tyrosine	4,20	5,52	5,39	5,45	5,51	6,13
Valine	8,02	8,08	8,22	8,21	7,70	7,79
N - terminaux	Asp.Glu	-				



Depuis, nous avons, en combinant l'hydrolyse trypsique et l'hydrolyse chymotrypsique des Ig G "rapides" du colostrum de Vache obtenu des séquences plus longues encore. Ces résultats seront exposés et discutés dans nos travaux personnels. (p.189)

D - ORIGINE DES GLOBULINES IMMUNES DU LAIT ET DU COLOSTRUM.

Le problème de l'origine des globulines immunes du lait et du colostrum n'est pas encore établi et, à l'heure actuelle, chacune des trois hypothèses suivantes, émises en 1954 par CANTARUTTI (43), conserve toute sa valeur.

- a) - Transfert dans la glande mammaire des globulines immunes sériques intactes.
- b) - Transfert dans la glande mammaire de globulines sériques modifiées.
- c) - Synthèse par la glande mammaire de globulines immunes spécifiques.

En outre, on ne peut exclure, a priori, l'intervention simultanée de ces trois mécanismes. Sur la base des expérimentations biologiques, physiologiques, métaboliques et immunologiques, il est impossible de trancher la question tant les arguments invoqués en faveur de chacune de ces hypothèses sont démonstratifs et convaincants (voir, à ce sujet, la revue générale de CAMPBELL et PETERSEN) (40). Certaines expériences sont toutefois en faveur d'une synthèse de globulines immunes dans la glande mammaire.

Par exemple, WORK et al. (285) ont montré que la radioactivité des immunoglobulines du lait était nettement supérieure à celle des immunoglobulines du sérum 6 heures après l'injection de 14 C-glycocolle à la Lapine et concluent à une synthèse des globulines immunes par la glande mammaire. D'autre part, l'injection d'antigènes dans le pis de la Vache par le canal mammaire (voie diathélique, selon CAMPBELL et PETERSEN) provoque l'apparition d'anticorps spécifiques dans le lait et non dans le sang (CAMPBELL et al.) (42). Les auteurs proposent

même une hypothèse séduisante selon laquelle la pénétration des antigènes dans le pis, au cours de la têtée, serait provoquée par la salive du Nouveau-né. Il semble, enfin, que la synthèse des anticorps est réalisée par les plasmocytes dont la glande est extrêmement riche au début de la lactation et cette plasmocytose pourrait parfaitement expliquer la richesse particulière des laits colostraux en globulines immunes (CAMPBELL et al.) (41).

Ces résultats qui ont été acquis par l'application de méthodes immunologiques et immunophorétiques ne peuvent, à eux seuls, résoudre le problème de l'origine des anticorps du lait. Certes, les globulines immunes du lait et du sang donnent lieu à des réactions d'identité en apparence parfaites. Mais elles ne peuvent, en aucun cas, constituer une démonstration de l'identité absolue des deux groupes de substances et permettre de conclure que les globulines immunes proviennent du sang ou d'éléments "mobiles" du sang, comme les plasmocytes. Seule, une meilleure connaissance des propriétés physico-chimiques, de la composition et de la structure des globulines immunes préalablement isolées du sang et du lait, associée aux observations accumulées depuis un siècle dans les différents domaines, permettra de résoudre la double énigme de la nature et de l'origine des globulines immunes des laits.

Actuellement, on admet que les globulines immunes du colostrum de Vache proviennent des plasmocytes sanguins et que leur synthèse s'effectue dans la glande mammaire qui présente, d'ailleurs, au début de la lactation, une plasmocytose intense (CAMPBELL et al.) (41). Ensuite, une "filtration" sélective est réalisée par la glande mammaire : seules les Ig G "rapides" passent dans le colostrum de Vache, accompagnées par de très faibles quantités d'Ig G "lentes", d'Ig M et d'Ig A (MURPHY et al.)(200). Récemment, MOSSMAN et al.(195) ont montré que les Ig G₂ du sérum ne sont pas transférées dans le colostrum. En outre, LISOWSKI et al. (156) ont mis en évidence quelques différences quant aux propriétés

physico-chimiques entre les Ig G₁ d'origine colostrale et celles d'origine sérique.

IV.- DESTINEE DES IMMUNOGLOBULINES DES LAITS.

A - CHEZ LE VEAU (*)

1°) Mise en évidence de l'immunisation passive. L'existence d'un phénomène d'immunisation passive transmise par la mère aux Mammifères nouveaux-nés est connue depuis longtemps puisque la première observation remonte à 1799, quand HUFELAND (120) remarqua que la descendance de vaches qui avaient été atteintes du "small pox" était réfractaire à cette maladie. HUFELAND, dès cette époque, suggéra que le lait jouait un rôle dans cette protection immunitaire. BURCKHARDT (33) et RICHEL (cité par BURCKHARDT) obtinrent des résultats identiques en 1879 ; les auteurs inoculèrent le "small pox" ovin à des brebis, 6 semaines avant la fin de la gestation et observèrent que les agneaux résistaient à cette maladie. Par la suite, les expériences se multiplièrent et confirmèrent la transmission par la mère, à sa descendance, d'une résistance à diverses affections : anthrax de la Brebis (CHAUVEAU, 1880) (49), de la Vache (ARLOING et al, 1882)(7) et du Cobaye (KITASATO, 1890) (130); rage du Chien (HOEGYES, 1889) (114). Depuis, un nombre considérable de travaux ont été effectués qu'il nous est impossible de rapporter en totalité dans notre mémoire et nous renvoyons le lecteur à l'excellente revue générale de CAMPBELL et PETERSEN (40).

.../

* - Des expérimentations ont été effectuées chez le Mouton / MACKENZIE et LASCELLES (162) / et chez le Porc / LEECEL (124) ; PIERCE et SMITH (222) (223) ; WITTY, BROWN et SMITH (284) . / Elles démontrent l'importance, comme dans le cas du Veau, de l'absorption des globulines immunes (de type Ig G) présentes dans le lait de Brebis et de Truie.

L'immunisation du Mammifère nouveau-né par la mère fut d'abord considérée comme un phénomène héréditaire, mais on sait actuellement que l'immunisation est réalisée, soit par la voie transplacentaire, soit par la voie buccale, - et dans ce cas, les anticorps sont apportés par le lait maternel -, soit par les deux voies successivement.

L'immunisation passive du Nouveau-né par le lait fut mise en évidence, dès 1892, grâce aux travaux d'EHRlich (72), puis de KLEMPERER (131) qui immunisèrent des animaux nouveaux-nés vis-à-vis de certains germes, en leur administrant du lait d'animaux préalablement immunisés par les méthodes classiques vis-à-vis de ces mêmes germes. Le phénomène est particulièrement important et facile à mettre en évidence lorsque le placenta est totalement imperméable aux protéides sériques de la mère.

La première observation sur ce sujet fut faite en 1912 par FAMULENER (78) qui trouva qu'il n'existait pas de transmission placentaire chez la Chèvre. En effet, l'auteur démontra, d'une part, l'absence d'hémolysines dans le sang de chevreaux issus de mères particulièrement immunisées vis-à-vis des hématies de Mouton et, d'autre part, l'apparition de ces anticorps dès la première ingestion de lait ou de sérum maternel. FAMULENER suggéra même que les anticorps du lait et du sang devaient être identiques et que la glande mammaire servait de "dépôt" à ces derniers.

Les expériences les plus convaincantes furent effectuées à propos de l'immunisation du Veau. On sait, en effet, que le placenta de la Vache, comme celui de la Chèvre, du Porc et du Cheval constitue avec ses 7 couches de tissus, une barrière infranchissable aux anticorps /SCHNEIDER et SZATHMARY (241); RATNER, JACKSON et GRUEHL (230)%. Il n'est donc pas surprenant que, dans le sérum de Veau, la proportion de globulines immunes ne représente, au jour du vélage, que de 1 à 2,5 % seulement des protéides totaux, tandis qu'elle atteint, dans le sérum de

l'animal adulte, 14 à 34 %. Ces résultats posent le problème de l'origine des globulines immunes dans le sérum de Veau. Cette énigme a été résolue et l'on sait, à présent, que les premiers anticorps synthétisés par le Veau, ne recevant pas de colostrum, n'apparaissent dans son sang qu'à la 3ème semaine et n'atteignent leur taux maximal qu'au bout de la 8ème semaine. Au contraire, les anticorps sont présents dans le sérum de Veau moins de 24 h. après l'absorption de colostrum. Des études identiques effectuées sur différentes espèces ont montré que l'importance de l'immunisation des animaux nouveaux-nés par voie buccale était une fonction inverse de la perméabilité du placenta. (Tableau XI, p. 45).

L'origine colostrale des anticorps sériques du Veau fut ultérieurement confirmée par les travaux de nombreux auteurs, HOWE (118), le premier, démontra, en le fractionnant par des sels neutres, que le sérum du Veau nouveau-né, prélevé avant l'ingestion de colostrum, était dépourvu de la "fraction globulinique" précipitable par le sulfate d'ammonium à 17,4 %. Cette fraction apparaît dans le sérum de Veau dès l'ingestion de colostrum et HOWE l'appela "pseudoglobuline I." D'autre part, HOWE (118) identifia cette fraction aux "euglobulines" du colostrum que l'on savait être, dès cette époque, le support de l'immunité.

L'importance du colostrum dans l'immunisation des animaux nouveaux-nés fut confirmée par les expériences d'immunisations réalisées par différents auteurs (voir, par ex. SMITH et LITTLE (251, 252, 253); LITTLE et ORCUTT (157); ORCUTT et HOWE (213); MASSON et al. (166) et par des études électrophorétiques qui démontrèrent l'apparition des anticorps dans le sérum de Veaux nouveaux-nés alimentés avec du colostrum et permirent de suivre leur évolution au cours de l'allaitement. Les résultats obtenus par HANSEN et PHILLIPS (106) et par JAMESON et al. (123) sont, à cet égard, les plus démonstratifs. HANSEN (106) montra que le pic d'électrophorèse correspondant aux globulines gamma, absent dans les sérums de Veau à la naissance, apparaissait 24 h.

T A B L E A U X I.

Relation entre la structure du placenta et le mode de transfert passif des globulines immunes de la mère au foetus et au Nouveau-né (d'après VAHLQUIST) (276).

Espèces	Nombre de couches entre les circulations maternelle et foetale à terme	Transmission placentaire ou amniotique	Importance du colostrum dans l'immunisation
Porc	6	0	+++
Ruminants	5	0	+++
Carnivores	3	+	+
	2	+ (amniotique)	+
	2	+++ (placentaire)	0
Homme	2	+++ (placentaire)	0



après l'ingestion de colostrum (voir Fig. 1 p. 9) JAMESON a étudié l'évolution des différents protéides sériques chez le Veau, nourri avec du colostrum pendant les 5 jours qui suivirent le vélage et démontré que la proportion des globulines immunes atteignait son maximum au 3ème jour, dépassant même la proportion d'anticorps du sang maternel (Tableau XII, p. 47). D'après PORTER (226), les trois types de lacto-anticorps Ig G, Ig A et Ig M, traverseraient la paroi intestinale du jeune Veau comme dans le cas du Porcelet.

Sachant que la proportion normale des immunoglobulines, dans le sang, n'est atteinte qu'au bout de la 8ème semaine chez le Veau qui ne reçoit pas de colostrum, on réalise l'importance de ce dernier dont l'absorption immunise le Veau nouveau-né par un mécanisme compensateur qui pallie l'absence de synthèse de globulines immunes par l'animal pendant les premiers jours qui suivent sa naissance. Ce mécanisme immunitaire est l'apanage exclusif des laits colostraux. En effet, l'administration à des Veaux nouveaux-nés de laits "parfaits" au lieu de colostrum ne détermine pas d'augmentation du taux des anticorps sériques (DEUTSCH et SMITH (65); voir aussi la revue générale de STECK (266) et ces observations posent le problème de l'absorption des globulines immunes colostrales.

2°) - Mécanisme de l'absorption des globulines immunes du colostrum.

L'absorption des globulines colostrales par la voie digestive est extrêmement rapide puisqu'on les retrouve dans le sérum de l'animal nouveau-né, moins de 12 à 24 h. après l'ingestion du colostrum (voir Fig. 1 , p. 9 et Tableau XIII, p. 48). Introduites par une canule duodénale, les globulines colostrales apparaissent dans le sang 20 à 30 mn plus tard (BALFOUR et COMLINE) (12). De nombreux travaux (voir en particulier, SMITH (253); COMLINE et al. (56); PAYNE et al. (219) ont démontré que l'absorption des globulines immunes du colostrum s'effectuait préférentiellement dans le duodénum.

L'apparition, dans le sang, de globulines du système gamma

T A B L E A U XII.

Variation des proportions (en % de protéides totaux) des protéides sériques chez le Veau alimenté par la Vache dès le vélage (d'après JAMESON et al.) (123).

Age du Veau	γ -globulines	β -globulines	α -globulines	Sérum albumine
Nouveau-né	0 ou traces	5,9	36,8	57,3
18 heures	6,0	9,2	75,3	49,5
36 heures	41,6	7,2	21,8	29,8
3 jours	49,2	5,7	17,8	27,3
5 jours	48,7	6,0	10,5	34,9
2 ans	43,7	6,2	9,9	40,2



T A B L E A U XIII.

Augmentation de la proportion de γ -globulines sériques
chez le Veau après l'administration de colostrum à
différents âges (d'après HANSEN et PHILIPS) (106).

Age du Veau (en jours)	Proportion de γ -globulines sériques (en p.100 de protéides totaux)	
	Avant l'ingestion	24 h. après l'ingestion
0	1,1	19
1	1,2	10,7
2	2,5	6,1
7	4,5	4,2



apportées par la voie digestive pose une énigme. En effet, ce transfert implique que ces protéides ont traversé la paroi intestinale sans avoir subi de modifications profondes sous l'action des enzymes protéolytiques du tube digestif. Une solution satisfaisante n'a pas encore été apportée à ce problème et l'explication du phénomène reste du domaine de l'hypothèse. On peut, en effet, appuyer sur de solides arguments expérimentaux, aussi bien la thèse du passage dans le sang des anticorps intacts que celle du passage des anticorps partiellement dégradés.

a - Hypothèse de l'absorption des globulines colostrales intactes.

On peut parfaitement envisager que les globulines gamma ne subissent aucune modification dans le tractus digestif du Mammifère nouveau-né en invoquant, d'une part, la qualité de protéines "homologues" qu'elles possèdent et qui les met à l'abri de l'action des protéases digestives et, d'autre part, la présence de l'inhibiteur tryptique (LASKOWSKI) (140) dans les laits colostraux. Cependant, l'intervention de ce dernier ne suffit pas, à elle seule, pour expliquer l'absorption des γ -globulines intactes. En effet, celle-ci est maximale dans les premières heures qui suivent la naissance. Or, l'inhibiteur tryptique est présent dans le lait pendant 2 ou 3 jours. Cette observation conduisit BALFOUR et COMLINE (12) à démontrer qu'il existait, dans le lait colostrale, trois facteurs qui favorisent l'absorption des globulines immunes. Il s'agit : 1) des phosphates inorganiques ; 2) du glucose-6-phosphate et 3) d'un protéide précipitable de faible poids moléculaire qui agirait comme un agent tensio-actif ou en se liant aux mucopolysaccharides de l'épithélium intestinal. Selon BALFOUR et COMLINE, l'action combinée de ces trois facteurs et de l'inhibiteur tryptique serait nécessaire à l'absorption des globulines immunes.

b - Hypothèse de l'absorption des globulines colostrales partiellement dégradées. - Le transfert de l'immunité par la voie

digestive peut parfaitement s'expliquer même si les globulines immunes subissent une protéolyse digestive, à la condition toutefois d'être fragmentées en gros polypeptides. On sait, en effet, depuis les travaux de PETERMANN (221), de BRIDGMANN (30) et de PORTER (228) que les γ -globulines conservent leur activité immunologique même après avoir subi une dégradation partielle et PORTER (227), en 1950, démontra qu'une γ -globuline de Lapin anti-ovalbumine conservait son activité biologique initiale après une digestion papainique. Le même auteur, en 1958 (228), réussit à isoler de l'hydrolysate, trois fragments principaux dont deux avaient conservé l'activité anticorps, tandis que le troisième était le support de l'activité antigénique de la molécule.

Les travaux de MORRIS (192) ont montré que le fragment III des γ -globulines administré par voie buccale à des jeunes souris ou rats, traversait la muqueuse gastro-intestinale.

Enfin, un facteur "anatomique" et "physiologique" intervient : il s'agit de la "perméabilité transitoire" de l'intestin du Mammifère nouveau-né. En effet, l'absorption des globulines colostrales par le tube digestif est limitée aux premiers jours qui suivent la naissance. Selon HANSEN et PHILIPS (106), cette absorption est maximale à la naissance. Le tableau XIII (p. 48) est, à cet égard, démonstratif. On voit que l'augmentation du taux des anticorps sériques chez le Veau est plus importante lorsque le colostrum est administré dès la naissance. Elle est nulle, si la première ingestion de colostrum a lieu une semaine après le vêlage.

B - CHEZ LE NOURRISSON.

Nous avons vu que le Nourrisson possédait déjà un taux élevé d'anticorps sériques dès sa naissance, qui lui ont été transmis par la voie transplacentaire. Il n'est donc pas inquiétant pour le Nouveau-né que les Ig A du colostrum de Femme ne traversent pas la paroi intestinale comme l'ont démontré plusieurs auteurs (voir

à ce sujet, la revue générale de PAUPE et MEYER) (218). La conséquence de cette non-absorption est que le système immunitaire de l'Enfant est obligé de se développer plus rapidement pour que celui-ci assure personnellement sa défense vis-à-vis des germes pathogènes. Dans ces conditions, quel peut être le rôle des Ig A de sa mère, que transmet massivement au Nourrisson le colostrum ?

On ne peut, pour l'instant, répondre qu'en émettant l'hypothèse que les Ig A sont présentes pour protéger l'intestin de l'enfant. Plusieurs observations sont, à cet égard, intéressantes, car elles démontrent que les Ig A peuvent demeurer intactes dans le tractus digestif, bien que le colostrum humain ne semble pas contenir d'inhibiteur trypsique spécifique. En effet, SHIM, KANG, KIM, CHO et LEE (246) ont montré que les Ig A inhibaient l'action de la trypsine et évitaient ainsi leur propre destruction. COUNITCHANSKY, BERTHILLIER et GOT (57) ont confirmé ces résultats et mis en évidence la formation de complexes entre la trypsine et la chymotrypsine, d'une part, et des protéides du colostrum, d'autre part. Ce phénomène pourrait donc compenser l'absence d'un inhibiteur trypsique et les Ig A se trouveraient partiellement protégées contre une destruction rapide par les enzymes digestives. Récemment, DESCAMPS (62) a mis en évidence l' α_1 -antitrypsine sérique à l'état de trace dans le lait humain. Ces immunoglobulines peuvent donc persister quelque temps dans l'intestin où elles joueraient de deux manières un rôle de protection de ce dernier : 1°) en intervenant en tant qu'anticorps contre certains germes pathogènes et, 2°) en se conjuguant aux mucines et en renforçant le rôle protecteur de ces dernières.

C - CONCLUSION.

Du point de vue immunologique, le lait de Femme paraît donc moins important pour le Nourrisson que ne l'est le colostrum de Vache pour le Veau, et le rôle des Ig A du lait humain semble se limiter à une action protectrice de l'intestin. Il est, à cet égard intéressant de constater que les Ig A sont présentes dans la plupart

des sécrétions (Tableau XIV p. 53) et qu'elles possèdent la même structure d'un dimère associé à une pièce S. Le rôle de protection locale que l'on attribue aux Ig A est encore renforcé par les résultats obtenus par BUTLER et al. (38) ; PORTER et NOAKES (229) et MACH et al. (161). Ces auteurs démontrent que chez la Vache les Ig A représentent la fraction majeure des immunoglobulines contenues dans les larmes, la salive et les sécrétions intestinales. La seule énigme reste la faible teneur en Ig A du lait et du colostrum de Vache. PORTER (229) explique ce fait comme une adaptation physiologique pour permettre le développement et le fonctionnement de l'estomac des ruminants. De plus, il retrouve ce faible taux d'Ig A chez un autre ruminant : la Chèvre. BUTLER et al. (38) pensent que ce déficit vient de la trop grande quantité de lait réclamée des vaches domestiques et citent LEE et al. (144) qui démontrent une synthèse importante d'Ig A chez une chèvre non-lactante. On peut néanmoins constater que si chez le Porc et le Cheval /VAERMAN (275)/ les Ig G représentent la fraction majeure des immunoglobulines du colostrum, les Ig A deviennent très vite les anticorps principaux dans les laits "stabilisés". Et pourtant, dans ces deux cas, les lacto-anticorps sont transmis aux Nouveaux-nés à travers la paroi intestinale. La Vache serait-elle une exception ?

Il est troublant, en outre, d'observer que très souvent, dans les sécrétions, la lactotransferrine est elle aussi présente (voir p. 69) et on peut poser en hypothèse qu'elle vient renforcer par ses propriétés de fixation de fer, l'activité anti-infectieuse des globulines immunes.

Cependant, les Ig A du lait intéressent certains processus immunitaires. En effet, on a observé que des Nourrissons alimentés au sein résistait mieux, pendant les premiers jours de leur existence, au virus poliomyélitique que les Nouveaux-nés alimentés au lait de Vache (WARREN, LEPOW, BARTSCH et ROBBIN) (281). En outre, l'ingestion de colostrum humain (SABIN, MICHAELS, KRUGMAN, EIGER, BERMAN et WARREN) (236) ou de colostrum de Vache contenant

T A B L E A U XIV.

Nature des immunoglobulines présentes dans diverses sécrétions après infection ou immunisation. (in TOMASI et BIENENSTOCK) (274).

Sécrétions	Antigènes	Classes d'immunoglobulines			Références
		IgG	IgA	IgM	
Nasales	Parainfluenza Type 1	Tr	+	-	SMITH <u>et al.</u> (1967)
	Influenza A 2	+	+	-	ARTENSTEIN <u>et al.</u> (1964) BELLANTI <u>et al.</u> (1965)
	Poliovélite I, II, III	-	+	-	OCRA <u>et al.</u> (1968)
	<u>Francisella tularensis</u>	-	+	-	BUESCHER <u>et BELLANTI</u> (1966)
	<u>Salmonella typhosa</u> (endotoxine)	Tr	+	-	BELLANTI <u>et al.</u> (1967) ROSSEN <u>et al.</u> (1967 b)
	Rhinovirus	Tr	+	-	DOUGLAS <u>et al.</u> (1967) ROSSEN <u>et al.</u> (1966 c)
		-	+	-	CATE <u>et al.</u> (1966)
Salivaires	Poliovélite	-	+	-	BERGER <u>et al.</u> (1967)
	Rhinovirus	Tr	+	-	DOUGLAS <u>et al.</u> (1967)
Lacrymales	Rhinovirus	-	+	-	DOUGLAS <u>et al.</u> (1967)
Colostrales	Poliovélite, Coxsackie, Escherichia coli, Staphy-		+		HODES <u>et al.</u> (1964)
Duodénales	Poliovélite	-	+	-	BERGER <u>et al.</u> (1967) OCRA <u>et al.</u> (1968)
	<u>Salmonella typhi</u> "H" Clostridium tetani Substances de Groupes sanguins	+	+	-	TURNER <u>et ROWE</u> (1964) TURNER <u>et ROWE</u> (1967)
Urinaires	Poliovélite	+	Tr	-	HANSON <u>et TAN</u> (1965) FRAGER <u>et BEARDEN</u> (1965)
	<u>Escherichia coli</u> "O"	+	-	-	BERGER <u>et al.</u> (1967) VOSTI <u>et REMINGTON</u> (1968)

+ : activité ; Tr : trace activité ; - : pas d'activité ; * : activité probable



des anticorps antipoliomyélitiques (GONZAGA, WARREN et ROBBIN) (88) exerce un effet inhibiteur sur la vaccination par le virus poliomyélitique vivant (voir, à ce sujet, la revue générale de PAUPE et MEYER) (218).

V.- COMMENT FACILITER L'IMMUNISATION PASSIVE DU NOURRISSON.

Dans l'état actuel de nos connaissances, encore très fragmentaires, de l'évolution des mécanismes de défense immunitaire, passive ou active du Nouveau-né, la question se pose de savoir s'il est possible d'intervenir dans ce système de défense.

On sait que durant sa vie intra-utérine, le Nouveau-né acquiert une immunité passive qui lui est transmise par la voie transplacentaire, alors que son propre système immunitaire commence à fonctionner (Fig.2 p.11) (voir, à ce sujet, la revue générale de PAUPE et MEYER) (218). Dès sa naissance, le lait maternel lui apporte en outre, des immunoglobulines du type Ig A. Si nous postulons que le rôle de ces dernières se limite à la protection des épithéliums, puisqu'elles ne franchissent pas la barrière intestinale, nous parvenons à la conclusion que le Nourrisson possède trois systèmes de défense : son système immunitaire propre, certes encore peu développé ; les anticorps que lui a fournis sa mère in utero ; une protection locale réalisée au niveau de l'appareil digestif par les Ig A (et, peut-être aussi, par la lactotransferrine). Dans ces conditions, tenter de materniser le lait de Vache du point de vue des anticorps revient à envisager essentiellement la protection de l'intestin par ces derniers. Toutefois, il demeure intéressant d'étendre le problème et d'envisager les phénomènes qui peuvent se dérouler pendant les deux périodes de la vie du Nourrisson ; avant et après sa naissance. Il nous sera, de cette manière, plus aisé de répondre à la question de savoir s'il est possible d'intervenir dans l'une ou l'autre de ces deux périodes pour faciliter l'immunisation active ou passive de l'enfant sans nuire au développement de son système immunitaire propre.

.../

A - IMMUNISATION AVANT LA NAISSANCE.

- 1°) - Immunisation active. L'existence d'une réponse immunitaire chez le foetus humain est actuellement démontré - (voir la revue générale de PAUPE et MEYER) (218). Cette réponse est du type primaire : la production des Ig M est toujours supérieure à celle des Ig G. PAUPE et MEYER (218) avec REES et CARBUTT (231) pensent qu'il serait possible de stimuler le système immunitaire du foetus par vaccination de ce dernier, de manière à permettre au Nouveau-né de répondre plus efficacement à des infections précoces, jusqu'à présent cette voie ne semble pas avoir été retenue, en raison peut être de la difficulté technique de vacciner un foetus et des risques encourus.
- 2°) - Immunisation passive. Au contraire, il serait plus aisé d'hyperimmuniser la mère (KEMPE et BENENSON) (126). On sait, en effet, que si celle-ci synthétise des anticorps du type Ig G actifs contre certains germes, le Nouveau-né est en partie protégé à la naissance vis-à-vis de ces mêmes germes. Cette immunisation passive du foetus doit cependant être contrôlée. En effet, la vaccination du Nourrisson obtient une réponse généralement plus prononcée si l'infection de l'antigène n'est pas effectuée aussitôt après la naissance. (voir PAUPE et MEYER) (218). Cet effet inhibiteur est dû à la présence des anticorps transmis par la mère au cours de la vie intra-utérine. Le développement du système immunitaire du Nourrisson est donc ralenti par les anticorps d'origine maternelle. Il convient donc d'éviter ce phénomène d'inhibition afin de ne pas risquer d'exposer à des agressions extérieures un être dépourvu de défense personnelle au moment où l'immunisation acquise passivement commence à perdre de son efficacité. Toutefois, cette règle n'a rien d'absolu et il ne faudrait pas, sur la foi de quelques faits expérimentaux, supprimer toute immunisation passive chez le Nourrisson. D'ailleurs, cette manière de voir est contestée par certains auteurs comme DI SANT AGNESE (66) qui ne croit pas à une action néfaste des anticorps transmis

par la voie transplacentaire sur l'immunisation active ultérieure du Nourrisson. Il semble, toutefois, à la lumière des connaissances actuelles qu'une certaine immunisation passive du Nourrisson est souhaitable car elle le protège, dès sa naissance, mais qu'il faut éviter une hyperimmunisation qui risquerait de bloquer ou de ralentir le développement de son système immunitaire.

B - IMMUNISATION PASSIVE ET ACTIVE APRES LA NAISSANCE.

L'accord étant loin d'être fait sur le rôle bénéfique pour le Nourrisson de l'immunisation passive, on peut, dès lors, s'interroger sur le mode d'action des Ig A du lait maternel. Pour répondre à cette question, il faut savoir que la flore saprophyte joue un rôle déterminant dans le développement de l'immunité active du Nouveau-né. PAUPE et MEYER (218), dans leur revue générale, ont rapporté les travaux de différents auteurs qui conduisent à la conclusion que la flore intestinale saprophyte stimule la production d'anticorps chez l'enfant, elle s'oppose, en outre, au développement des germes pathogènes. Il est donc capital de maintenir dans l'intestin cette flore saprophyte qui est en compétition permanente avec une flore pathogène et qui ne doit, à aucun moment, céder le pas à celle-ci. Dans cette défense des germes bénéfiques interviendraient les Ig A du lait maternel, seules ou aidées par la lactotransferrine, le lysozyme et par des facteurs protidiques favorables à la multiplication des germes comme les lactobacillus. Il ne faut cependant pas négliger l'intervention d'autres facteurs nutritionnels qui, en déclenchant des diarrhées provoquent, du même coup, l'élimination des formes saprophytes

C - CONCLUSIONS.

Du point de vue immunologique, materniser le lait de Vache revient à faire produire par la Vache des anticorps neutralisants les germes pathogènes au niveau de l'appareil digestif du Nourrisson.

.../

L'effet bénéfique de tels anticorps a reçu un début de démonstration à la suite des travaux de GONZAGA, WARREN et ROBBIN -(88) sur le virus poliomyélitique (voir p.54). La production de tels anticorps pourrait être envisagée chez la Vache, par l'injection d'antigènes par voie diathélique (CAMPBELL, SARWAR et PETERSEN) (42). Cette méthode a été reprise par LEPINE (150) qui désirait obtenir des anticorps en vue de les injecter à d'autres Mammifères comme le Singe.

VI.- CONCLUSIONS GENERALES.

En faisant le bilan de nos connaissances sur les immunoglobulines du lait, on s'aperçoit qu'elles sont encore très fragmentaires. Toutefois, elles sont suffisantes pour nous permettre de conclure, dès à présent, que leur rôle ne s'explique pas par un simple mécanisme d'immunisation passive. Certes, chez le Veau, - et dans une très faible proportion -, chez l'Enfant, elles sont massivement assimilées dès après la naissance et contribuent à assurer l'immunisation de l'animal. Cependant, ce phénomène ne dure que quelques jours au-delà desquels, comme chez le Nourrisson, les lacto-anticorps maternels ne traversent plus la paroi intestinal. Dès lors se pose, aussi bien dans le cas du Nourrisson que dans celui du Veau, la question du rôle et de l'importance de ces immunoglobulines.

On admet, actuellement, que chez l'Enfant, les anticorps du lait maternel, - qui semblent résister à l'action des protéinases digestives -, contribuent à éliminer des germes pathogènes présents dans le tractus digestif, probablement aidés dans cette action par la lactotransferrine et par le lysozyme. De cette manière, est préservée la flore intestinale dont l'une des propriétés est de stimuler la production d'anticorps chez l'Enfant et qui, en outre, protège l'intestin lui-même contre toute agression de germes pathogènes. Toutefois, ces facteurs ne sont pas capables, à eux seuls, de maintenir l'équilibre de la flore intestinale et ce serait une erreur de négliger les facteurs nutritionnels. Ceux-ci sont, en effet,

déterminants dans le déclenchement de syndrômes diarrhéiques qui s'accompagnent, dans la majorité des cas, de la disparition de la flore saprophyte.

La question se pose, à présent, de savoir si les immunoglobulines du lait de Vache "actives" vis-à-vis de germes pathogènes pour le Nourrisson et obtenues, par exemple, par injection diathélique d'antigènes, sont susceptibles de jouer le rôle des Ig A du lait maternel. La réponse est malaisée. En effet, les immunoglobulines du lait de Vache sont très différentes de celles du lait de Femme. Elles sont du type Ig G et ne possèdent pas, en outre, la structure moléculaire des Ig A humains d'excrétion. D'autre part, on ignore tout de leur comportement vis-à-vis des protéines du tube digestif de l'enfant. Seules, des expérimentations poussées, effectuées dans des conditions physiologiques, et une meilleure connaissance des propriétés et de la structure des lacto-anticorps permettra de répondre à ces questions. A l'heure actuelle, une seule expérience a été réalisée dans ce but. ZINKERNAGEL et al. (289) ont alimenté des Nourrissons de trois semaines avec du lactosérum de Vache qui contenait environ 70 % d'Ig G. Ils ont récupéré dans les selles de ces Enfants entre 13 et 20 % des Ig G₁ ingérées. Quand les Ig G₁ fournies au Nouveau-né étaient spécifiques d'une bactérie, elles conservaient leur activité agglutinante dans les selles.

En conclusion, nous pensons que le problème de la maternisation du lait de Vache du point de vue des anticorps peut être abordé avec beaucoup d'optimisme. En effet, il semble exclu, à présent, que les lacto-anticorps jouent, chez l'Enfant, le moindre rôle dans l'immunisation passive. Le problème délicat de leur transfert sous une forme plus ou moins dégradée, au travers de la paroi intestinale ne se pose donc pas. Si au contraire, on parvenait à démontrer que des anticorps présents dans le lait de certains Mammifères, - et pas seulement dans celui de la Vache -, actifs vis-à-vis de germes pathogènes pour l'Enfant, conservaient leur activité dans l'intestin de celui-ci, ce problème particulier de la maternisation des laits serait bien près d'être résolu.

:
: LES LACTOTRANSFERRINES. :
:

I.- INTRODUCTION.

En vue de substituer la lactotransferrine du lait de Femme par celle du lait de Vache dans l'alimentation du Nourrisson, quand l'allaitement maternel est déconseillé, nous ferons une revue succincte comparative de ces deux glycoprotéines. Celle-ci mettra en lumière leurs ressemblances et leurs différences tant en ce qui concerne leurs propriétés physico-chimiques que leur activité biologique.

.../

II.- PREPARATION DES LACTOTRANSFERRINES.

La lactotransferrine a été découverte et isolée pour la première fois du lait de Femme, en 1960, simultanément, par MONTREUIL et al. (188), et par JOHANSSON (124). Par contre, une protéine rouge dans le lait de Vache avait été signalée dès 1939 par SØRENSEN (257). Elle fut véritablement purifiée en 1960 par GROVES (98) à partir de la fraction caséinique, puis en 1965 /GROVES (99)/ à partir du lactosérum. Les deux glycoprotéines possèdent en commun la propriété de fixer réversiblement deux atomes de fer en deux sites spécifiques.

A.- PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE. Toutes les méthodes

de préparation associent un fractionnement préliminaire par le sulfate d'ammonium, l'éthanol ou le rivanol et une purification ultime sur colonne d'échangeurs de cations ou d'anions./JOHANSSON (124) ; JOHANSSON (125); BLANC et ISLIKER (28) ; GOT (91) ; MASSON et HEREMANS (167) /. Nous ne décrivons que la méthode mise au point au Laboratoire par MONTREUIL et al. (191) et modifiée par DESCAMPS (62). Nous avons rassemblé les différentes étapes de cette purification dans la figure 12 (p.61). Cette méthode fournit des préparations de lactotransferrine homogène en électrophorèse sur différents supports et d'après SPIK (260) il ne semble pas exister de polymorphisme héréditaire de cette glycoprotéine.

B.- PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE DU LAIT DE VACHE. Nous

avons résumé les protocoles expérimentaux utilisés par GROVES (99) (Fig. 13 et 14; p. 62 et 63), SZUCHET - DERECHIN et JOHNSON (269) (Fig.15 p.64) et ORAM et REITER (212) (Fig.16 p. 65). C'est volontairement que nous avons reporté les principaux schémas de fractionnement afin de mettre en évidence leur complexité et de démontrer de ce fait la nécessité d'une recherche d'un nouveau mode d'isolement d'autant plus que le lait de Vache contient très peu de lactotransferrine.

Précipitation des protéines du lactosérum par un gradient de pH
et de concentration en sulfate d'ammonium. Isolement des précipités P7-P8

(voir fig.5 ; p.21)



Fractionnement de 3 g des précipités P7-P8 sur colonne (2 X 60 cm) de CM-cellulose stabilisée avec un tampon d'acétate de sodium 0,04 M de pH 5,6. Passage de tampons d'acétate de sodium de pH 5,6 de molarités croissantes (0,04 M - 0,2 M - 0,4 M). Le tampon acétate 0,4 M fournit une préparation (LTF - CM) de lactotransferrine pure à 95 %.



Purification de la lactotransferrine par chromatographie de 700 mg LTF-CM sur colonne (3 X 100 cm) de Sephadex G-100. Développement avec tampon de pH 8 ; 0,1 M en Tris et 1 M en NaCl.

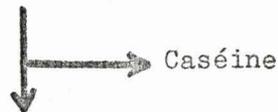


Cristallisation de la lactotransferrine par dissolution de 500 mg de lactotransferrine dans 50 ml d'eau distillée. Dialyse de la solution à + 4°C, dans des sacs de cellophane Nojax contre 50 ml de polyéthylène glycol. La gomme rouge qui se dépose est recueillie et maintenue à + 4°C pendant plusieurs semaines. La lactotransferrine cristallise alors en longues plaquettes souvent rassemblées en faisceaux.

Figure 12.

Schéma de la préparation de la lactotransferrine humaine /d'après MONTREUIL et al. (191) et DESCAMPS (62)/.

Lait délipidé. Précipitation de la caséine à pH 4,6. Filtrer.

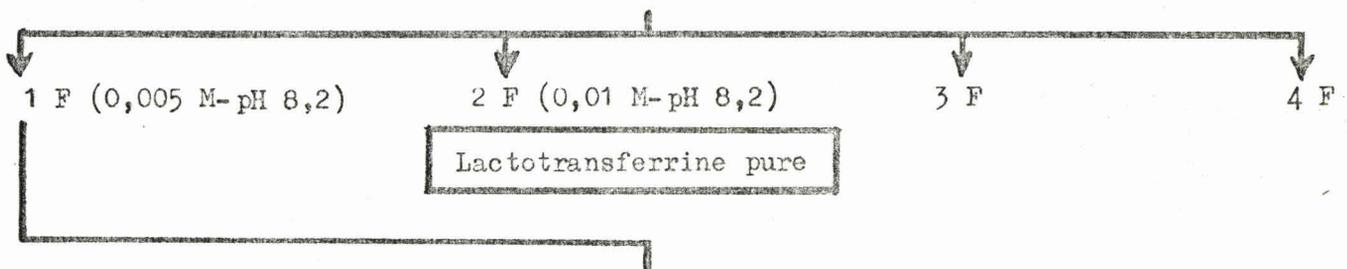


Le lactosérum est saturé en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ et centrifugé.

Le précipité est mis en dialyse et centrifugé.



Le surnageant (WHEY F) est chromatographié sur une colonne de D E A E - cellulose stabilisée dans un tampon de phosphate de sodium 0,005 à pH 8,2. Elution avec des tampons de molarité croissante.



Chromatographie sur une colonne de phospho-cellulose stabilisée dans un tampon de phosphate de sodium 0,05 M à pH 5. Elution avec des tampons de molarité et de pH croissants.

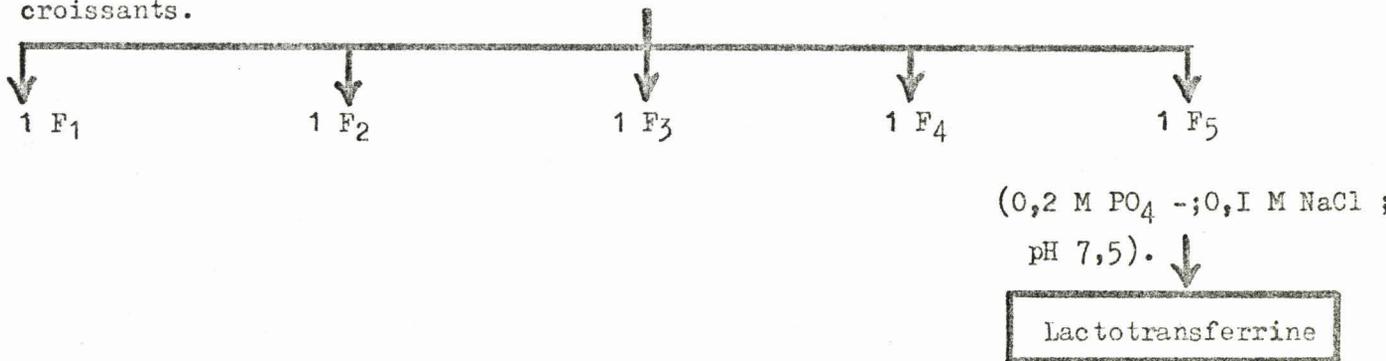
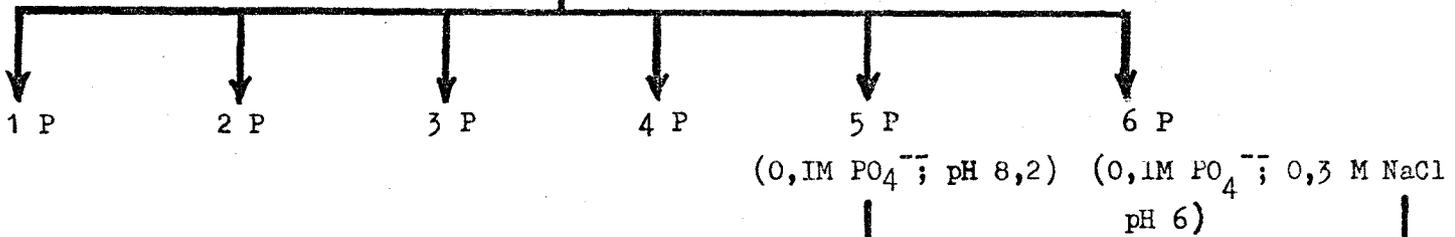


Figure 13.

Préparation de la lactotransferrine du lait de Vache
/ d'après GROVES (99)./

WHEY P (voir fig.13 p.62)

Chromatographie sur une colonne de D E A E - cellulose, stabilisée dans un tampon de phosphate de sodium 0,005 M à pH 8,2 - Elution par des tampons de molarité croissante.



Chromatographie sur une colonne de D E A E -cellulose à pH 6 dans un tampon de phosphate de sodium. La fraction éluee par un tampon de molarité supérieure à 0,1 M est récupérée.

Chromatographie sur une colonne de phosphocellulose stabilisée dans un tampon de phosphate de sodium 0,05 M à pH 6. Elution comme lors de la chromatographie de la fraction 1 F (voir fig.13 ; p.62). La lactotransferrine est éluee dans les fractions 5

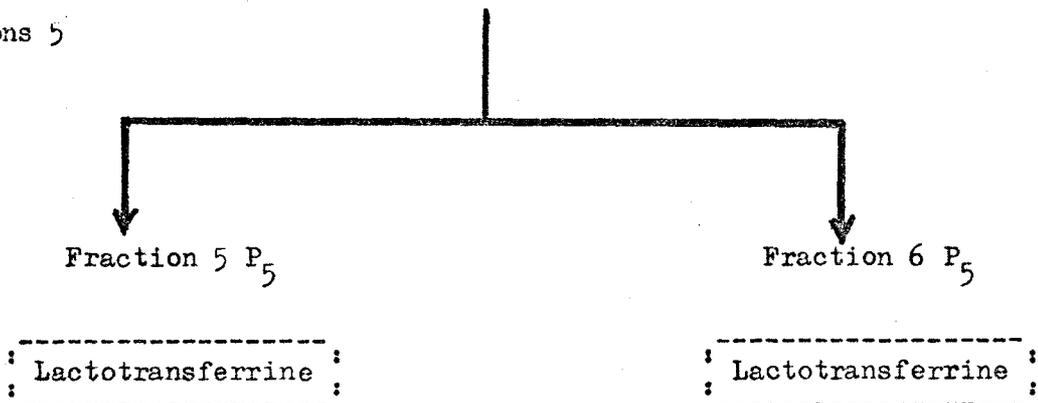
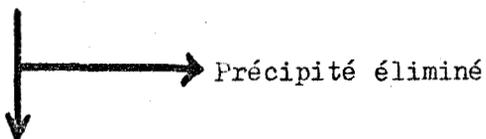


Figure 14.

Préparation de la lactotransferrine du lait de Vache
/d'après GROVES (99)./

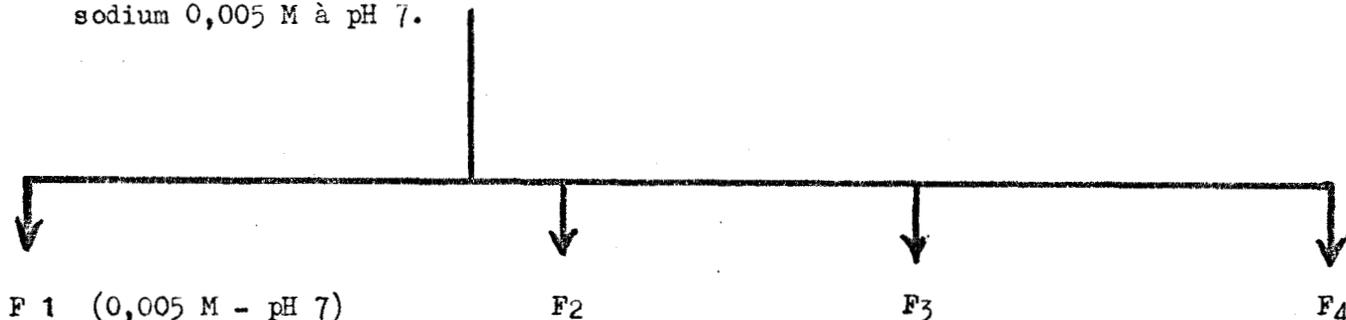
Lait chauffé à 40° C. Ajouter 20 g de $\text{SO}_4 \text{Na}_2$ pour 100 ml. Centrifuger.



Le surnageant est dialysé et lyophilisé. Il représente la "Fraction-Albumine" (F.A.)
La F.A. est dissoute dans un tampon de phosphate de sodium 0,005 M à pH 7

Mélanger 500 ml de cette solution contenant 60 g de F.A. à de la D E A E -
cellulose équilibrée dans le même tampon.

Les protéines non-absorbées - "Batch fraction" -(F.B.) sont chromatographiées sur
une colonne de D E A E.-cellulose, stabilisée dans un tampon de phosphate de
sodium 0,005 M à pH 7.



Chromatographie sur une colonne de Sephadex G 75
stabilisée dans un tampon de phosphate de sodium 0,05 M à pH 7

: Lactotransferrine :

Figure 15.

Préparation de la lactotransferrine du lait de Vache
/d'après SZUCHET-DERECHIN et JOHNSON (269)./

Lactosérum ajusté à pH 6,5 avec NaOH 4 N, agité avec de l'Amberlite CG 50 (forme Na⁺) pendant 1 h à 20°C. Filtrer et laver la résine (jusqu'à l'obtention d'une D.O. de 0,01 dans le filtrat). Mettre la résine dans une colonne. Eluer avec des solutions d'acétate de sodium de molarité croissante.

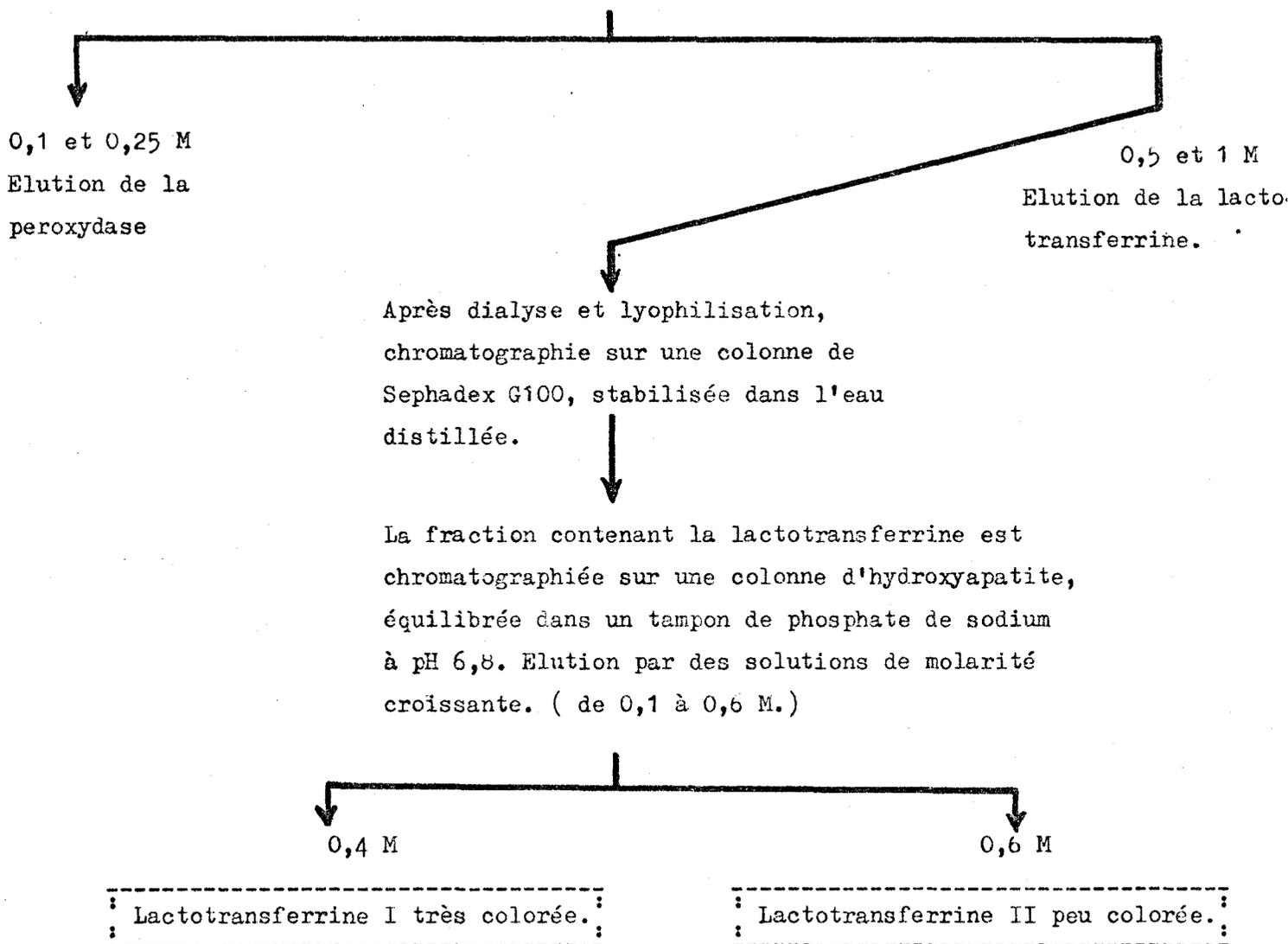


Figure 16.

Préparation de la lactotransferrine du lait de Vache.
/ d'après ORAM et REITER (212)./

III.- PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES ET STRUCTURE DES LACTOTRANSFERRINES.

Nous avons rassemblé dans trois tableaux les propriétés comparées des deux lactotransferrines : dans le tableau XLV (p.227) leurs propriétés physiques ; dans le tableau XLVI(p.229) leur composition en glucides et dans le tableau XLII(p.233) leur composition en acides aminés.

Au regard de toutes ces propriétés la différence majeure se situe au niveau de leur composition en glucides. Quant au point isoélectrique, l'accord est loin d'être fait à propos de la lactotransferrine humaine. En effet, cette glycoprotéine précipite près de son pHi et il est alors très difficile d'apprécier véritablement la valeur de ce dernier.

Seule la lactotransferrine humaine a fait l'objet d'études structurales. Celles-ci ont porté à la fois sur la fraction glucidique et la fraction peptidique. SPIK et al.(262) ont déterminé la structure des deux groupements glycaniques et MAZURIER et al. (172) ont isolé sept fragments peptidiques après l'action du bromure de cyanogène. Les deux glycannes possèdent la même structure (Fig. 17,p.67) mais les séquences peptidiques au niveau de leur branchement sur la protéine sont nettement différentes (Fig. 18, p.67).

IV.- REPARTITION ET ROLE BIOLOGIQUE.

A.- VARIATION DU TAUX DES LACTOTRANSFERRINES AU COURS DE LA LACTATION.

1.- Dans le lait de Femme.- Depuis très longtemps, on savait que le taux de la lactotransferrine variait au cours de la lactation pour se stabiliser à 1 à 2 g/litre /MONTREUIL et al. (188)/. Récemment NAGASAWA et al. (201) ont dosé cette glycoprotéine par la méthode de LAURELL (143). Leurs résultats sont rassemblés dans le tableau XV (p. 68). Ils confirment ceux de MASSON et HEREMANS (168). Ces derniers auteurs avaient dosé $4,2 \pm 1,4$ g de lactotransferrine par litre de colostrum récolté entre le premier et le neuvième jour après l'accouche-

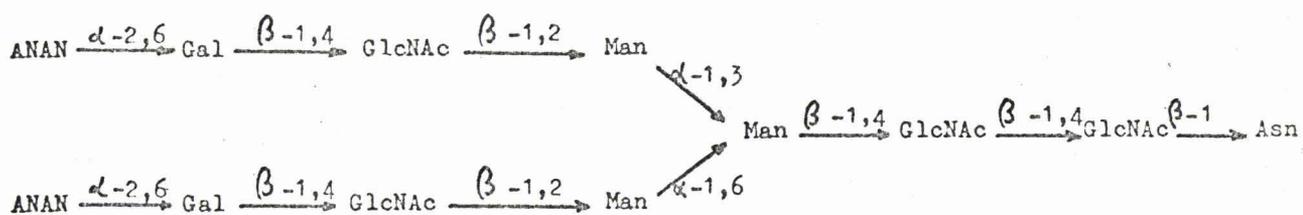


Figure 17.

Schéma de structure des deux groupements
glycanniques de la lactotransferrine humaine.
(d'après SPIK et al.) (262)

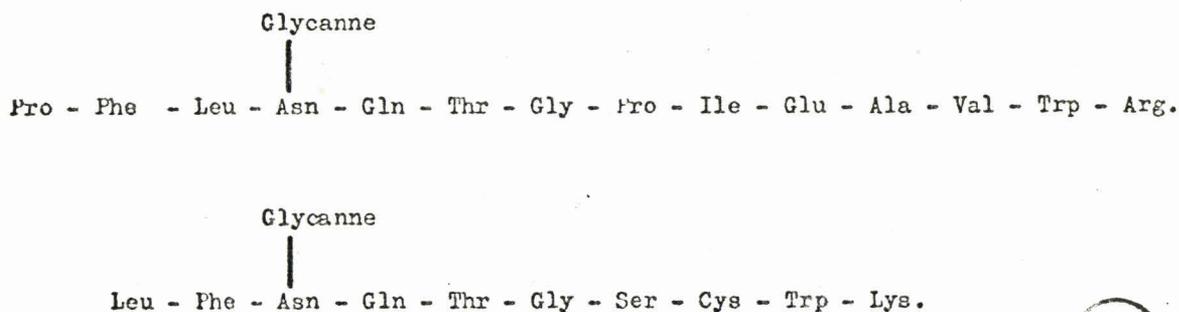


Figure 18.

Séquences peptidiques au niveau du
branchement des deux groupements glycanniques
sur la lactotransferrine humaine./d'après
SPIK et al. (263)./



T A B L E A U XV.

Variation de la concentration de la lactotransferrine humaine
au cours de la lactation. /d'après NAGASAWA et al. (201)/

Nombre de jours après l'accouchement.	Nombre d'échan- tillons	Quantité de lactotransferrine (exprimée en mg/100 ml)		
		minimale.	maximale.	moyenne.
2 à 5	8	400	630	490
6 à 10	10	360	600	450
11 à 60	43	160	360	210
61 à 210	25	50	210	160



ment.

2.- Dans le lait de Vache.- Le dosage de la lactotransferrine dans le lait de Vache au cours de la lactation n'a pas été effectué d'une manière continue. MASSON (164) rapporte des valeurs de 20 à 200 $\mu\text{g/ml}$ de lait. ORAM et REITER (212) signalent une forte augmentation de cette glycoprotéine en fin de lactation. SMITH et al. (249) ont confirmé ce résultat. Ils ont isolé la lactotransferrine à partir du lait de Vache non-lactante pendant la sécrétion sèche. D'après ces auteurs, 30 à 50 % des protéines possédant une mobilité électrophorétique de type " γ -globuline" à p H 8,9 étaient identifiés à la lactotransferrine. Cette variation du taux de cette dernière au cours de la lactation semble être due à un effet de dilution vu que la quantité totale excrétée reste assez constante. Il serait alors normale que ce taux soit plus élevé dans le colostrum et le lait de fin de lactation.

B.- REPARTITION.-

La lactotransferrine humaine a été considérée comme une protéine spécifique du lait jusqu'à ce que BISERTE et al.(21) aient démontré par immuno-électrophorèse sa présence dans les expectorations bronchiques. En outre, elle a été identifiée dans la salive /MASSON et al.(165) (170)/et dans les sécrétions nasales, les larmes, la bile, le suc pancréatique, les sécrétions génitales et l'urine. /MASSON et al.(169) ; MASSON et HEREMANS (167)/.Un peu plus tard, LOISILLIER et al. (159) ont démontré la présence de lactotransferrine dans les tissus sains d'origines gastrique et colique. Simultanément, MORRISON et ALLEN (193) démontraient chez la Vache la présence de la lactotransferrine dans les glandes salivaires et lacrimales.

C.- ROLE BIOLOGIQUE.-

1.- Des lactotransferrines seules.- La large répartition des

lactotransferrines pose la question de leur rôle biologique dans l'organisme. Celui-ci n'est pas limité au problème nutritionnel de l'apport du fer au Nouveau-né /voir la revue générale de SPIK (260)/. Dès 1960, MONTREUIL et al. (191) émettaient l'hypothèse d'une activité bactériostatique. Ces auteurs se référaient aux travaux de SCHADE et CAROLINE (240) qui avaient démontré l'effet inhibiteur de la transferrine humaine par son action ferriprive sur la croissance de certaines bactéries qui nécessitent, pour se développer, un milieu contenant du fer libre.

Cette activité bactériostatique de la lactotransferrine humaine fut démontrée in vitro pour Staphylococcus aureus /BLANC (26)/ et pour Staphylococcus albus et Pseudomonas aeruginosa /MASSON et HEREMANS (167)/. ORAM et REITER (212) ont expérimenté sur Bacillus stearothermophilus et Bacillus subtilis avec les lactotransferrines des laits de Femme, de Vache et de Chèvre. Ces glycoprotéines possèdent toutes une activité bactériostatique pourvu qu'elles ne soient que partiellement saturées en fer. Si on ajoute du fer ferreux au milieu cette activité est supprimée. BULLEN et al. (32) ont démontré ce même phénomène. La prolifération de Escherichia Coli O III/B₄ était ralentie par la lactotransferrine humaine isolée et par le lait humain et le colostrum de Vache. Cet effet était aboli par l'apport de fer. Récemment, REITER et al. (232) ont étudié de nouveau l'action de la lactotransferrine du colostrum de Vache. Ces auteurs démontrent le rôle joué par le p H comme l'avaient signalé BULLEN et al. (32). Mais ils précisent que si le milieu de culture doit être tamponné à un p H supérieur à 7,5, la présence de bicarbonate de sodium est indispensable pour que l'activité bactériostatique se manifeste. Ces deux conditions doivent être réunies. De plus, la présence de chélateurs, tels que le citrate de sodium, ayant une forte affinité pour le fer supprime toute activité bactériostatique. Les auteurs expliquent ce phénomène en admettant que la

bactérie utilise plus facilement le fer complexé au citrate que le fer piégé par la lactotransferrine.

Cette activité bactériostatique des lactotransferrines de diverses origines explique leur présence dans les sécrétions externes. Dans le cas du lait de Femme, la cinétique de lactation accentue son rôle possible dans la défense du tractus digestif de l'enfant. Par contre, le lait Vache ne contient que très peu de lactotransferrine. Mais la présence d'une lactoperoxydase pourrait pallier ce déficit. ORAM et REITER (211) ont montré que des excréments comme le lait et la salive possédaient un pouvoir bactéricide important lié à la présence de peroxydase, d' $H_2 O_2$ et d'ions tels que le thiocyanate./Voir HOGG et JAGO (115)./ Or le lait de Vache contient un taux de lactoperoxydase plus élevé que le lait humain /Voir la revue de GOT (92)./La quantité excrétée est maximale au 4ème jour après le vêlage /KIERMEIER et KAYSER (129)/ puis diminue graduellement pour atteindre une concentration de 30 mg/litre dans le lait stabilisé./POLIS et SHMUKLER (225)/. Il est logique de penser que l'activité bactériostatique du lait de Vache est supportée à la fois par la lactoperoxydase et la lactotransferrine alors que dans le lait humain cette activité est principalement liée au taux élevé de lactotransferrine. L'activité inhibitrice de la lactoperoxydase pourrait expliquer sa présence dans différents tissus excréteurs de la Vache /MORRISON et al.(194)./

2.- Des lactotransferrines associées aux anticorps.- Les résultats de BULLEN et al.(32) sont à ce propos très significatifs. Ces auteurs démontrent que l'activité bactériostatique de la lactotransferrine envers E.Coli O III/B₄/H₂ est fortement augmentée en présence d'anticorps dirigés spécifiquement contre E.Coli. On pouvait penser que les effets de la lactotransferrine et des anticorps étaient additifs. Or, en saturant la lactotransferrine à 200 % toute l'activité

inhibitrice disparaît. Il semble donc qu'il y ait une action synergique dont le mécanisme est actuellement inconnu. Cet effet bactériostatique lié à la fois aux anticorps et à la lactotransferrine a été récemment confirmé par REITER et al. (232). De plus d'après SMITH et al. (249) la lactotransferrine formerait déjà des complexes avec les Ig G dans le lait de Vache pendant la sécrétion sèche.

V.- CONCLUSIONS.

Cette revue très rapide sur les propriétés des deux lactotransferrines nous a permis de mettre en lumière leurs différences et leurs ressemblances.

Elles possèdent en commun, le fait d'être des glycoprotéines à caractère basique et de posséder une masse moléculaire semblable bien que leur composition en glucides soit très différente. Par contre, leur activité biologique est identique. Dans le cadre de la "maternisation" des laits, ce point est capital. Qu'elle soit isolée du lait humain ou du lait de Vache, cette glycoprotéine possède toujours une activité bactériostatique accentuée par la présence d'anticorps spécifiques de la bactérie étudiée.

Le rôle des laits dans la protection locale au niveau de l'intestin du Nourrisson ou du Veau est certes dû en partie aux anticorps et à la lactotransferrine. Mais cette défense de l'intestin peut aussi être expliquée par la présence du lysozyme et du facteur antitrypsique (et dans le lait de Femme peut-être par des facteurs de croissance pour Lactobacillus bifidus). Le premier lyse les parois des bactéries et spécialement des bactéries Gram-positives. Quant au second, son action est encore assez mal connue. Les anticorps et la lactotransferrine, pense-t-on, seraient protégés par son intermédiaire de l'action protéolytique des enzymes digestibles. CHANDAN et al. (46) ont comparé les taux de lysozyme dans le lait de Femme et le lait de Vache. Ce dernier en contient 3.000 fois

moins que le lait humain où on le trouve à une concentration de 400 mg/litre. Par contre, le taux de l'inhibiteur trypsique est plus élevé dans le lait de Vache que dans le lait de Femme. D'après LASKOWSKI et LASKOWSKI (140) la concentration de cet inhibiteur est maximale dans le colostrum de Vache entre le 2ème et le 3ème jour après le vélage. Il protégerait les anticorps contre l'activité protéolytique du lait de Vache lui-même /WARNER et POLIS (280)/ et peut-être contre les enzymes du tractus intestinal. En effet, l'immunisation passive chez le Veau est en totalité apporté par le colostrum alors que chez le Nourrisson celle-ci lui est transmis à travers le placenta (voir p.9 et 10).

Pour "materniser" les laits, il faudrait donc tenir compte de tous ces composés pris, d'une part, séparément et d'autre part, dans leur ensemble pour vérifier leur action synergique éventuelle. Et vu l'activité bactériostatique de la lactotransferrine de Vache, celle-ci pourrait, semble-t-il, remplacer la lactotransferrine humaine dans l'alimentation du Nouveau-né, si, du moins, les enzymes du tube digestif du Nourrisson ne la dégradent pas.

TRAVAUX PERSONNELS.

: :
: M E T H O D E S. :
: :
: :

I. METHODES ANALYTIQUES.

A - COMPOSITIONS CENTESIMALE ET MOLAIRE.

1.- Composition centésimale en glucides.

La composition centésimale en glucides a été déterminée à l'aide des méthodes suivantes : (voir la revue générale de MONTREUIL et SPIK) (189).

a - les monosaccharides "neutres", par la méthode à l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (273), modifiée par RIMINGTON.(233).

b - les osamines, par la méthode d' ELSON et MORGAN (74) modifiée par BELCHER et al. (17) après hydrolyse des composés par l'acide chlorhydrique 4 N, redistillé et exempt de fer, à 100°C pendant 4 h, en tube scellé sous vide.

c - les acides sialiques, par la méthode à la diphenylamine de WERNER et ODIN (283)

2.- Composition molaire en glucides.

a - Identification et rapports molaires des oses "neutres"

Les rapports molaires des "oses" neutres ont été déterminés par deux techniques :

- par chromatographie quantitative sur papier, selon le mode opératoire décrit par MONTREUIL et al.(190).

- par chromatographie en phase gazeuse de leurs dérivés trimethylsilylés d'après le procédé de SWEELEY et al. (268)

mise au point au Laboratoire par FOURNET (81).

Celles-ci demandent une hydrolyse préalable (HCl 1,5 N; à 100°C; pendant 1,5 h) suivie d'une purification sur résines échangeuses de cations (Dowex 50 x 8, "mesh" 25 - 50 ; forme acide) et d'anions (Duolite A - 102 D; "mesh" 25 - 50 ; forme formiate).

b - Identification et rapports molaires des osamines:

Les osamines libérées au préalable par une hydrolyse chlorhydrique (4 N) ont été identifiées et dosées par les trois méthodes suivantes :

- méthode de désamination de GARDELL et al.(84).

Désamination à chaud par la ninhydrine de la glucosamine et de la galactosamine, respectivement en arabinose, et en lyxose qui sont aisément identifiables par chromatographie sur papier.

- méthode de chromatographie sur colonne de GARDELL (83).

Les osamines sont identifiées par chromatographie sur colonnes d'échangeurs de cations (Dowex 50 x 8 ; "mesh" 200 - 400) : la glucosamine et la galactosamine sont éluées par HCl 0,3 N en deux fractions bien distinctes.

- méthode chromatographique à l'Auto-analyseur des acides aminés selon les techniques employées pour le dosage de ces derniers. (p.78).

c - Identification et rapports molaires simultanés des oses "neutres" des osamines et des acides sialiques :

La composition molaire en monosaccharides a été déterminée après méthanolyse sous forme de dérivés trifluoro-acétylés par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode de

ZANETTA et al. (288) adaptée au Laboratoire par FOURNET (81

Les glycoprotéines étaient préalablement lavées par des mélanges binaires de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ dans les rapports 2 : 1 puis 1 : 2 et enfin par du méthanol seul. Les glycopeptides étaient méthanolysés directement.

3.- Composition molaire en amino-acides.

a - Méthode générale :

La composition en acides aminés, à l'exclusion du tryptophane, est déterminée après hydrolyse par HCl 5,6 N, redistillé, sous vide, à 105°C pendant 24 heures. Les constituants des hydrolysats sont dosés,

- soit à l'Auto-analyseur Technicon selon le procédé général de PIEZ et MORRIS (224) modifiée par MONSIGNY (182).
- soit à l'Auto-analyseur BECKMAN Multichrom suivant le principe général de SPACKMAN et al. (258) adaptée par CHARET et al. (48) à l'analyse simultanée des osamines.

b - Identification du tryptophane :

Le tryptophane a été identifié selon le procédé appliqué par LIU et CHANG (158). L'hydrolyse des glycopeptides est effectuée par l'acide p.toluène sulfonique en présence d'un dérivé indolique, le 3 - (2 - amino éthyl) - indole, qui joue un rôle de protection vis-à-vis du tryptophane.

Le tryptophane est ensuite repéré à l'Auto-analyseur Multichrom BECKMAN. Il est élué après l'ammoniaque et avant l'arginine.

c - Dosage du tryptophane :

Nous avons utilisé la méthode spectrophotométrique de BENCZ et SCHMID (18).

B - METHODES ELECTROPHORETIQUES ET IMMUNOLOGIQUES.

1.- Electrophorèse en gélose.

Nous avons analysé nos échantillons par la méthode de micro-électrophorèse en gélose de GORDON et al. (90). Cette technique fut décrite en détail par ANTONY (4).

2.- Immuno-électrophorèse en gélose.

Les plaques de gélose sont soumises comme précédemment à un champ électrique. Puis on fait diffuser, l'un vers l'autre, l'échantillon analysé et l'immunsérum correspondant (ANTONY) (4)

3.- Technique d' OUCHTERLONY (214).

Dans cette méthode la diffusion de l'échantillon et de l'immunsérum a lieu sans électrophorèse préalable.

4.- Electrophorèse en gel d'amidon.

Les électrophorèses en gel d'amidon horizontal sont réalisées suivant le procédé général de SMITHIES (254) avec le tampon contenant de l'urée soit à pH acide soit à pH basique.

a - gel d'amidon à pH 3 (EDELMAN et POULIK) (70).

- tampon du gel à pH 3 : HCOOH 0,05 M ; NaOH 0,01 N ;
8 M urée.

- tampon aux électrodes à pH 3 : HCOOH 0,2 M ; NaOH 0,08 N.

b - gel d'amidon à pH 8,8 (COHEN et PORTER) (54)

- tampon du gel à pH 8,8 : glyco-colle 0,035 M ; NaOH 0,06 N ;
8 M urée.

- tampon aux électrodes à pH 8,2 : H_3BO_3 0,3 M ; NaOH 0,06 M

La migration des échantillons s'effectue sous une tension de 5 volts/cm pendant 15 h. à 4° C. Après l'électrophorèse le gel est immergé dans un colorant à l'Amido-schwartz puis dans plusieurs bains décolorants (acide acétique à 0,5 %.)

5.- Détermination du pHi de la lactotransferrine.

La détermination du pHi a été réalisée par la méthode décrite par VESTERBERG et SVENSSON (278) dans une colonne LKB, type 8100. Le gradient de pH est établi en utilisant des ampholytes synthétiques, les ampholines (LKB). La gamme de pH s'étend de 3,5 à 10. La concentration finale des ampholytes est de 1 %. La colonne est montée de la façon suivante :

- Cathode en bas : - éthylènediamine 0,4 ml ; eau distillée 14 ml
saccharose 12 g.
- Solution dense : - eau distillée 40,2 ml ; saccharose 28 g ;
ampholine 1,8 ml.
- Solution légère : - ampholine 0,7 ml ; solution-échantillon 10 ml
(contenant 5 mg de protéine) eau distillée
q.s.p.60 ml.

Le gradient de saccharose est formé avec l'appareil à gradient (LKB) à raison de 1 ml par minute.

- Anode en haut : - acide phosphorique 0,1 ml ; eau distillée
10 ml.

L'électrofocalisation est effectuée à 4° C sous une tension de 400 volts pendant des temps variant de 40 à 45 heures. La colonne est ensuite vidée à la vitesse de 56 ml par heure, par fractions de 2 ml. La densité optique est mesurée à 280 et 254 nm. La mesure des pH est effectuée avec un pH mètre Radiometer.

C - DETERMINATION DES MASSES MOLECULAIRES.

1.- Détermination de la masse moléculaire des glycopeptides.

La masse moléculaire des glycopeptides a été déterminé expérimentalement par trois procédés :

- le premier, basé sur la loi de STOKES qui associe la constante de sédimentation et le volume spécifique partiel de l'échantillon
- le second, sur la théorie de tamisage moléculaire.
- le troisième, sur le dosage des groupements N - terminaux des amino-acides.

a - Application de la loi de STOKES (voir la revue générale d'ELIAS (73)).

Nous avons appliqué la loi de STOKES selon laquelle la masse moléculaire d'un composé peut être déterminée en utilisant la formule suivante :

$$M = 9 \sqrt{2} \cdot \frac{N\pi}{V} \left[\frac{\eta S_0 V}{1 - v_e} \right]^{3/2}$$

où

N : nombre d'AVOGADRO ;

V : volume spécifique partiel, calculé d'après la composition molaire. Le volume spécifique d'une molécule est égal à la moyenne des Vsp de ses constituants. Les valeurs des Vsp des acides aminés ont été précisées par COHN et EDSALL (52) et celles des oses par SQUIRE et al. (264) et BEZKOROVAINY et DOHERTY (19).

η : viscosité du solvant en poises ;

e : densité du solvant ;

S_0 : constante de sédimentation, exprimée en secondes, à 20° C, pour une dilution infinie.

- b - Application du tamisage moléculaire (voir la revue générale de ANDREWS) (3).

Nous avons utilisé une colonne (1 x 130 cm) de Bio-gel P6 (100 - 200 mesh) stabilisée dans une solution de NaCl 0,14 M contenant 0,2 p.1000 de NaN_3 . Nous l'avons étalonnée avec des composés glucidiques isolés du lait de l'homme par GRIMMONPREZ (96).

- c - Dosage des groupements N - terminaux :

Les groupements N - terminaux des amino-acides sont dosés selon la technique au fluoro-dinitro benzène de GHUYSEN et al. (86). Les dosages sont effectués par rapport à des témoins constitués par les acides aminés dont la position N-terminale a été préalablement déterminée par l'application des procédés décrits plus loin (voir p.94). On élimine de cette manière, la cause d'erreur due aux différences d'absorbance molaire des DNP - amino - acides.

Le dosage permet de préciser le nombre de micromoles de l'acide aminé N - terminal pour une masse connue sèche de glycopeptide. La masse moléculaire est calculée en appliquant la formule

$$M = \frac{P \cdot 1000}{\mu^M}$$

où :

P : poids de substance en mg

μ^M : nombre de micromoles d'acide
N - terminal pour le poids P.

2.- Détermination de la masse moléculaire de la lactotransferrine.

- a - Tamisage moléculaire : Nous avons utilisé une colonne (2 x 140 cm) de Sepharose 6 B. stabilisée dans une solution de chlorure de sodium 1 M. Elle a été étalonnée avec de la sérumalbumine, des IgG bovines et de la transferrine et de la lactotransferrine humaines.
- b - Electrophorèse en gel de polyacrylamide (*) : Nous avons employé la méthode en gel de polyacrylamide de NEVILLE (203) mise au point au Laboratoire par CACAN (39). La courbe d'étalonnage est obtenue en reportant la valeur du RF de chaque substance et le logarithme de sa masse moléculaire. (SHAPIRO et al.) (245).
- c - Equilibre de sédimentation: (**) La masse moléculaire a été déterminée à l'équilibre de sédimentation selon la méthode décrite par CHEVENKA (51). L'expérimentation a été réalisée avec l'Ultracentrifugeuse analytique BECKMAN modèle E. L'ultracentrifugation se déroulait à 20° C pendant 8 heures à 17 000 t/mn. Nous avons utilisé la valeur du volume spécifique partiel ($V_{sp} = 0,722$) donnée par CASTELLINO et al. (45). L'échantillon était auparavant chromatographié sur une colonne de Sephadex G - 100 (2 x 100 cm) pour éliminer les complexes de masse moléculaire élevée.

(*) - L'expérimentation a été réalisée par R.CACAN et J.P. DECOTTIGNIES.

(**) - L'expérimentation a été réalisée par C.DUPIRE sous la responsabilité du Docteur A. VERBERT.

d - Dosage du fer : Nous avons admis que la lactotransferrine saturée fixe deux atomes de fer par molécule. Le fer a été dosé par la méthode à la bathophénantroline décrite par SPIK (259).

II. FRACTIONNEMENT DES IMMUNOGLOBULINES ET SEPARATION DES CHAINES H ET L.

A - FRACTIONNEMENT DES IMMUNOGLOBULINES.

1.- Chromatographie sur colonne de Sephadex G 100.

Les colonnes (6 x 120 cm ou 5 x 180 cm) de Sephadex G - 100 (40 - 120 μ) sont stabilisées dans un tampon à pH 8 (0,1 M Tris ; 1 M NaCl ; HCl concentré pour amener le pH à 8.) (GELOTTE et al.) (85). On injecte de 0,5 à 2 g de protéines dissoutes dans 10 à 20 ml du même tampon à pH 8. On collecte deux fractions de 15 ml par heure.

2.- Chromatographie sur colonne de DEAE - Sephadex A - 50.

La DEAE - Sephadex (colonne de 3 x 40 cm ou 3 x 20 cm) est stabilisée dans un tampon de phosphate de sodium 0,02 M à pH 8. Les substances retenues sont éluées par un tampon de phosphate de sodium 0,37 M à pH 4,5 (FAHEY et al.) (76); (MURPHY et al.) (200).

3.- Chromatographie sur colonne de SE - Sephadex C - 50.

La SE - Sephadex C - 50 (colonne de 3 x 40 cm ou 3 x 20 cm) est stabilisée dans un tampon d'acétate de sodium 0,01 M à pH 5,5. Les substances sont éluées par deux gradients ; l'un, discontinu, de 0,02 M à 0,04 M en acétate de sodium à pH 5,5, l'autre, continu de 0,04 M à 1 M en acétate de sodium à pH 5,5.

B - SEPARATION DES CHAINES H ET L.

Nous avons utilisé deux techniques. Dans la première, les ponts disulfures sont rompus puis bloqués avant la séparation des chaînes H et L. Dans la seconde, la séparation des chaînes H et L est réalisée juste après la rupture des ponts disulfures.

1.- Protocole N°1 (rupture - blocage - séparation).

a - Rupture des ponts disulfures et blocage à l'iodo-acétamide.

Nous avons utilisé la méthode d'EDELMAN et al. (69). 500 mg d'IgG₁ sont dissous dans 17 ml d'un tampon à pH 8 dégazé (0,15 M Tris ; 0,15 M NaCl ; 0,002 M EDTA). L'ensemble est mis sous courant d'azote pendant 1 heure à 20° C. Puis on ajoute du β - mercapto - éthanol pour obtenir une concentration de 0,3 M. De nouveau, la solution est abandonnée pendant 1 heure à 20° C sous courant d'azote. Le milieu réactionnel est ensuite refroidi à 0° C avant d'y ajouter de l'iodo - acétamide pour obtenir une concentration de 0,6 M. Le pH est maintenu à 8 avec de la triéthylamine. Après 30 mn de contact, on vérifie l'absence de groupement thiol par le réactif au nitroprussiate (mélange de nitroprussiate à 1 % et d'ammoniaque 2 N - v/v) avant de mettre la solution en dialyse contre de l'eau distillée.

b - Chromatographie sur colonne de Sephadex G-100 (FLEISCHMAN et al. (79) (Fig. 34 ,p. 141)

La colonne (4 x 120 cm) de Sephadex G-100 est stabilisée dans une solution d'acide propionique N. Avant de déposer l'échantillon d'IgG₁ dont les ponts disulfures ont été rompus et bloqués celui-ci est dialysé contre de l'eau distillée puis contre de l'acide propionique N.

L'éluat de la colonne est récupéré par fraction de 7 ml

à raison de 2 fractions par heure.

2.- Protocole N°II (rupture - séparation - blocage)

a - Rupture des ponts disulfures.

Nous avons utilisé la technique de GRANT et al. (94) que nous avons légèrement modifiée. Les IgG₁ étaient dissoutes dans un tampon à pH 8 (au lieu de pH 8,6) (Tris - HCl : 0,1 M) à raison de 30 mg/ml. La rupture des ponts disulfures était réalisée avec du β - mercapto - éthanol (au lieu du dithiothréitol) à raison de 70 μl pour 10 ml de solution. Après 1 heure de réaction à 25° C, la solution était dialysée contre de l'acide formique 0,1 N (au lieu d'acide acétique N) pendant 1 à 2 heures.

b - Séparation des chaînes H et L (Fig.35 p. 143)

Après rupture des ponts disulfures, la solution était chromatographiée sur une colonne (5 x 100 cm) de Bio-gel P 150 stabilisée dans de l'acide formique 0,1 N. L'éluat était récupéré par fraction de 10 ml à une cadence de 3 fraction par heure.

c - Blocage à l'iodo-acétamide.

Les chaînes L récupérées après la chromatographie sur Bio-gel P 150 étaient de nouveau soumises à une réduction avant de bloquer les groupements thiols. Nous avons suivi le protocole de GALL et al. (82.) décrit page 88, à la différence près que nous avons utilisé l'iodo-acétamide au lieu de l'éthylène-imine.

.../

III. METHODES RELATIVES A L'ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES.

A - ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES PRONASIQUES. (Fig. 37 , p. 149).

Nous avons appliqué, dans ses grandes lignes, le procédé que YAMASHINA et MAKINO (287) ont appliqué à l'ovalbumine en apportant, toutefois, les trois modifications suivantes (MONSIGNY) (182) ; (SPIK) (259) ; (SPIK et al.) (261)

- abandon de la solution boratée, employée par les auteurs pour tamponner les hydrolysats et stabilisation du pH à l'aide d'un pH - stat ;
- fixation de l'acide trichloracétique, utilisé pour purifier les hydrolysats, par un échangeur d'anions, en remplacement de l'extraction par l'éther sulfurique qui provoque des pertes sensibles de rendement en glycopeptides ;
- l'application de 4 hydrolyses pronasiques successives même lorsque la consommation de soude devient nulle à partir du 3ème hydrolysats. En effet, la libération des derniers amino-acides au voisinage de la liaison glycanne-protide n'entraîne plus de consommation de soude perceptible.

La pronase utilisée provenait de la firme CALBIOCHEM.

B - ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES ET TRYPSIQUES.

Pour obtenir les glycopeptides chymotrypsiques et trypsiques des glycoprotéines, nous avons suivi les étapes suivantes :

- rupture des ponts disulfures et blocage des groupements thiols par l'éthylène-imine ;

- isolement des glycopeptides par chromatographie sur papier ;
- fractionnement par électrophorèse en veine liquide ou sur papier

1.- Coupage des ponts disulfures et blocage à l'éthylène-imine.

Les ponts disulfures ont été réduits puis bloqués selon la méthode de GALL et al. (82). Le milieu réactionnel, tamponné à pH 8,5, possédait la composition suivante :

Tris : 1,5 M ; Urée : 8 M ; E.D.T.A.: 0,003 M ; HCl 12 N
q.s.p. obtenir un pH de 8,5.

La solution tamponnée était dégazée puis mise sous courant d'azote avant d'y introduire un poids de protides pour obtenir une concentration de 5 % (p/v). Après dissolution de ceux-ci, du 2 - mercapto - éthanol était additionné en plusieurs fois par petites fractions. La quantité de celui-ci à ajouter au milieu réactionnel était déterminée en tenant compte de la masse molaire de la glycoprotéine et du nombre de groupements thiols par mole. Le résultat était ensuite multiplié par 10.

Les protéines restaient 24 h. en présence de l'agent réducteur. Les groupements thiols libérés ainsi que l'excès du 2 - mercapto - éthanol étaient bloqués avec de l'éthylène - imine. Celle-ci était ajoutée par petites fractions deux fois en excès par rapport à la quantité de 2 - mercapto - éthanol introduit. La réaction était poursuivie durant 24 h. Pendant cette durée, le pH était maintenu à une valeur de 8,5. Quand la réaction au nitroprussiate ammoniacal (p. 85) était négative la solution de protéine était mise en dialyse pendant 8 jours en remplaçant l'eau distillée toutes les 24 h. La solution dialysée était alors soit lyophilisée, soit diluée pour obtenir une concentration de 0,5 % en protéine.

Une variante de ce procédé de rupture des ponts disulfures a été utilisée. Deux conditions de la réaction ont été modifiées :

- concentration en urée : 4,6 M au lieu de 8 M.
- temps de contact avec l'agent réducteur : 4 h. au lieu de 24 h.

On appellera respectivement : rupture I et rupture II ces deux modes d'opérateurs.

2.- Hydrolyse par la chymotrypsine (SMYTH) (255).

Après rupture des ponts disulfures et blocage des groupements thiols par l'éthylène-imine les glycoprotéines étaient solubilisées dans de l'eau distillée pour obtenir une concentration de 0,5 %. La température et le pH étaient maintenus constants pendant l'hydrolyse : la température à 37° C par un bain thermostaté et le pH à 8,5 par addition d'ammoniaque 1 N. Trois additions successives de chymotrypsine (*), activée dans une solution d'acétate de calcium 0,01M, étaient réalisées toutes les 4 heures. Chacune des deux premières représentaient 1 % ou 1 p.50 (p/p) du substrat et la dernière 1 p.50 ou 1 p.25. L'hydrolyse était poursuivie pendant 24 heures. L'hydrolysats était ensuite congelé et lyophilisé.

3.- Hydrolyse trypsique (SMYTH) (255).

Le protocole était identique à celui employé lors de l'hydrolyse par la chymotrypsine. L'hydrolyse était effectuée sur les glycoprotéines après avoir rompu les ponts disulfures par le 2 - mercapto - éthanol et les avoir bloqués par l'éthylène-imine. Le pH était maintenu à 8. Les deux premières additions de trypsine (**), représentaient 1/50 du substrat et la dernière 1/25 (p/p). L'hydrolyse

.../

(*) - L' α chymotrypsine (3 - 4 - 4 - 5) du pancréas de boeuf provenait de la firme Miles - Seravac (n° de code : 36 - 112).

(**) - Trypsine du pancréas de boeuf (3 - 4 - 4 - 4) obtenue de la firme Seravac (n° de code : 36 - 555).

était prolongée pendant 24 heures.

4.- Purification des glycopeptides.

- a - Chromatographie sur gel de Sephadex G 50. 5 g de l'hydrolysât étaient dissous dans environ 30 à 40 ml d'eau distillée. Le pH était ajusté à 7,9-8 avec de l'ammoniaque. La suspension obtenue était centrifugée. Le surnageant (environ 40 ml) était chromatographié sur une colonne (5 x 120 cm) de gel de Sephadex G 50 (40 - 120 μ) stabilisée dans une solution d'acétate d'ammonium 0,01 M. Les glycopeptides étaient repérés dans l'éluat par la méthode de DUBOIS et al. (67).
- b - Chromatographie sur gel de Sephadex G 25. Les glycopeptides purifiés sur une colonne de gel de Sephadex G 50 (40 - 120 μ) étaient dessalés sur une colonne (3 x 140) de gel de Sephadex G 25 (40 - 120 μ) stabilisée dans de l'eau distillée.
- c - Chromatographie préparative sur papier.

Les glycopeptides purifiés sur gel de Sephadex G 50 et dessalés sur gel de Sephadex G 25 sont soumis à une chromatographie préparative sur papier Whatman n°3 dans le système solvant de PARTRIDGE (216) (n-butanol, acide acétique, eau ; 4 - 1 - 5) pour éliminer les nombreux peptides qui souillent les préparations. Les glycopeptides étaient repérés par le réactif de MONTGOMERY et WU (183) et élués de la feuille de papier avec de l'eau distillée.

5.- Fractionnement des glycopeptides.

- a - Electrophorèse en veine liquide.

Les glycopeptides obtenus par chromatographie préparative sur papier étaient fractionnés par électrophorèse en veine liquide. L'appareil utilisé était du type ELPHOR - VAP II.

La chambre était remplie d'une solution d'acide acétique N/2. Ce film de liquide s'écoulait à un débit de 120 ml/h. Les compartiments des électrodes étaient remplis avec de l'acide acétique N. La température était stabilisée et maintenue à 7° C. La chambre était ensuite soumise à une tension de 1700 volts. L'ampèremètre indiquait alors une intensité de 110 mA. 30 mg de glycopeptides étaient dissous dans 1 ml d'acide acétique N/2. L'échantillon était injecté très lentement (1 ml/heure) au 3ème point d'injection (compté à partir de l'anode). Après l'électrophorèse les fractions glycopeptides étaient repérées par le réactif de DUBOIS et al. (67).

b - Electrophorèse préparative sur papier.

Dans certaines expériences l'électrophorèse en veine liquide était remplacée par une électrophorèse préparative sur papier à pH 3,9 dans le tampon de MICHL (179) (pyridine : 7,5 ml ; acide acétique : 25 ml ; eau q.s.p : 1000 ml) ou à pH 2,4 dans une solution d'acide acétique 1 N (12 volts/cm - pendant 4 h.)

IV. METHODES RELATIVES A LA DETERMINATION DE LA LIAISON
PROTEINE - GLYCANE.

A - REACTION D'EDMAN (p.96).

Après la réaction d'EDMAN, nous avons isolé le PTH - amino - acide glycanne dérivé. Nous l'avons soumis à une hydrolyse partielle (HCl 1,5 N ; 1,5 heure ; 100° C). Puis une électrophorèse à pH 3,9 (MICHL) (179) sur papier Arches n°304 a permis l'isolement de divers composés. L'utilisation d'acide chlorhydrique (HCl 4 N ; 4 heures ; 100° C et de soude (NaOH 0,1 N ; 10 heures ; 120° C) (VAN ORDEN et CARPENTER) (277) nous a permis de déterminer leur composition.

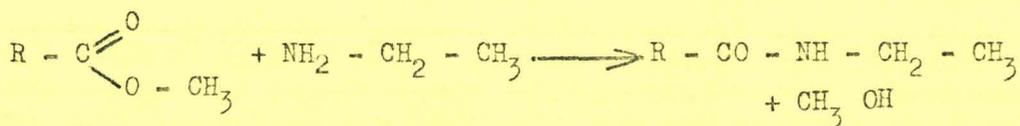
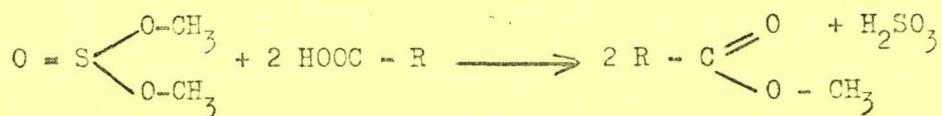
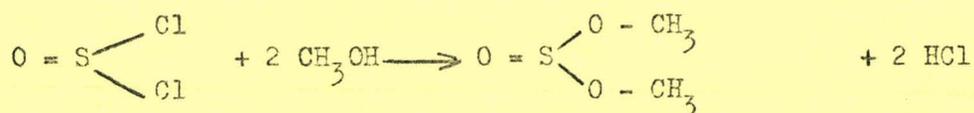
B - HYDROLYSE PARTIELLE DES GLYCOPEPTIDES.

Nous avons soumis les glycopeptides à une hydrolyse chlorhy-

drique partielle selon le procédé d'ADAM - CHOSSON (1). Puis les divers constituants furent séparés par électrophorèse à pH 3,9.(MICHL) (179). La fraction, correspondante au point d'attache lui-même, est purifiée par une chromatographie de 72 heures sur papier Macherey-Nagel 807 dans le système solvant de PARTRIDGE (216). L'analyse de ce composé purifié fut réalisé à l'auto-analyseur Technicon après une hydrolyse préalable (HCl 5,6 N ; 100° C ; 24 heures). Le pouvoir réducteur de ce composé, correspondant au point d'attache est déterminé par la méthode au ferricyanure de PARK et JOHNSON (215).

C - RECHERCHE DES LIAISONS O - GLYCOSIDIQUES.

Nous avons fait agir la soude 0,1 N en présence de borohydrure de sodium(3 jours à 20° C)après l'avoir amidé selon le protocole de SOKOLOVSKY et al. (256) résumé ci-dessous :



Ensuite, nous avons analysé les produits obtenus à l'auto-analyseur Technicon, après une hydrolyse préalable (HCl 5,6 N ; 24 h. ; 105° C.)

D - RECHERCHE DES LIAISONS "ESTER."

La recherche des liaisons "ester" a été effectuée par action de la soude diluée pendant des temps très courts (NaOH 0,1 N ; 100° C ; 5 à 10 mn.)

V - METHODES RELATIVES A LA DETERMINATION DE LA
STRUCTURE PEPTIDIQUE.

A - IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES C - TERMINAUX.

Pour identifier les acides aminés en position C - terminale nous les avons libérés de la chaîne peptidique soit par l'hydrazine anhydre soit par la carboxypeptidase A.

1.- Méthode d'hydrazinolyse.

L'amino-acide C - terminal est détaché de la chaîne polypeptidique par l'hydrazine anhydre selon la méthode d'AKABORI et al. (2)(*). Il ne subit aucune modification contrairement aux amino-acides non C - terminaux. On obtient deux fractions éluées d'une colonne d'Amberlite IRC - 50, l'une à l'eau (fraction I), l'autre (fraction II) par un tampon d'acétate d'ammonium. (DE LA LLOSA et al.) (61).

2.- Hydrolyse par la carboxypeptidase A.

La carboxypeptidase A (EC 3.4.2.1.), fournie par la firme WORTHINGTON; 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. Elle est préalablement traitée par le DIFP (di-isopropyl fluoro phosphate) pour inhiber les traces de trypsine et de chymotrypsine souillant les préparations.

Mode opératoire :

1 μM de glycopeptide et 0,5 μM de norleucine (témoin interne) sont dissoutes dans 2 ml de tampon bicarbonate 0,1 M de pH 8,5. La carboxypeptidase A est alors ajoutée (E/S = 1 : 50) à la solution. On réalise une cinétique en effectuant des prélèvements de 200 μl qui sont immédiatement acidifiés par de

(*) - Hydrazine anhydre obtenue selon le procédé de KUSAMA (139)

l'acide acétique puis congelés. Les acides aminés libérés sont ensuite analysés à l'auto-analyseur BECKMAN Multichrom.

B - IDENTIFICATION DES ACIDES AMINÉS N - TERMINAUX.

Les acides aminés N - terminaux ont été déterminés par trois techniques : la méthode des DNP - amino-acides de SANGER (239); la méthode des DANSYL - amino-acides de GRAY et HARTLEY (95) et la méthode d'EDMAN.

1.- Méthode des DNP - amino-acides.

Le principe est fondé sur la formation des dérivés dinitro-phénylés. La technique fut décrite par BISERTE *et al.* (22). Elle a été appliquée par MONSIGNY (182) aux glycopeptides.

Après dinitrophénylation, le DNP - glycopeptide est purifié par extraction à l'éther. Ce dérivé contenu dans la phase aqueuse est ensuite hydrolysé (HCl 5,6 N ; à 105° C; pendant 16 h.) L'hydrolysat est dilué puis les D N P amino-acides sont extraits par l'éther. La phase organique contient des D N P - amino-acides éthéro-solubles et la phase aqueuse les D N P - amino-acides hydrosolubles et les acides aminés non modifiés. Les D N P - amino-acides sont ensuite identifiés par chromatographie bi-dimensionnelle sur papier.

2.- Méthode des DANSYL - amino-acides.

Nous avons utilisé la méthode de HARTLEY (109). Le chlorure de dansyl (1 - diméthyl - amino - 5 - naphthalène sulfonyl) (DNS Cl) réagit avec le groupement NH_2 de l'acide aminé - N - terminal. Cet acide aminé dansylé est ensuite identifié par chromatographie sur couche mince après une hydrolyse préalable des liaisons peptidiques.

a - Dansylation.

5 n M de glycopeptide sont dissoutes dans 10 μ l d'une

solution de bicarbonate de sodium 0,2 M à pH 9,2. L'ensemble est évaporé à siccité et le résidu est repris par 10 μ l d'eau bidistillée auxquelles on ajoute 10 μ l d'une solution acétonique de DNS Cl (2,5 mg/ml). Le tube est bouché avec une feuille de papier paraffiné et la réaction est poursuivie pendant 1 heure à 37° C.

La solution est ensuite évaporée à sec et le glycopeptide est hydrolysé par 50 μ l de HCl 5,6 N à 105° C pendant 16 heures. L'hydrolysate est séché et les dansyl - amino - acides sont extraits par 2 fois 25 μ l d'acétate d'éthyl saturé d'eau. Le DNS Arg, les α et ϵ DNS Lys et le DNS His sont extraits par un mélange acide acétique - acétone (3 : 2 ; v/v.).

b - Identification des dansyl - amino - acides .

Les dansyl - amino - acides sont séparés grâce à la chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de polyamide (5 x 5 cm). La première migration est effectuée dans de HCOOH 1,5 % (v/v), la deuxième, après séchage de la plaque, dans le mélange benzène - acide acétique (9 : 1 ; v/v.). Grâce à leur fluorescence en lumière UV, les dansyl - amino - acides sont identifiés par comparaison avec une carte "témoin" et à l'aide de témoins internes.

3.- Méthode des PTH - amino - acides.

Ce procédé est fondé sur le principe de la dégradation récurrente d'EDMAN. L'acide-amino N - terminal est détaché de la chaîne polypeptidique sous forme de phénylthiohydantoïne (PTH). On peut, à la fois :

- doser les amino - acides avant et après cette réaction d'EDMAN (KONIGSBERG et HILL) (135) ; (LIGHT et GREENBERG) (154).
- et identifier le P T H - amino - acide libéré (voir la détermination de séquence peptidique page 97, pour les détails

techniques).

C - DETERMINATION DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE : REACTION D'EDMAN.

Nous avons utilisé la méthode récurrente d'EDMAN. Après chaque cycle, nous avons déterminé l'acide aminé N - terminal, soit :

- par identification du P T H amino - acide libéré,
- soit, par analyse du peptide résiduel (méthode soustractive).

Le protocole utilisé est celui mis au point par HAN et al. (105).

1 - Etape de couplage :

2 μ M de glycopeptide sont dissoutes dans 400 μ l de tampon n - propanol /eau/ diméthylallylamine (15 : 10 : 1,2) (v/v) ajusté à pH 9,5 par de l'acide trifluoroacétique. On ajoute 10 μ l de phénylisothiocyanate. La réaction est effectuée sous atmosphère d'azote, à 50° C, pendant 40 mn. Le tube est agité toutes les 5 mn.

On contrôle l'efficacité du couplage en refroidissant sous eau froide. Le phénylisothiocyanate en excès doit alors précipiter. Dans le cas contraire, on recommence la réaction de couplage pendant 20 mn en ajoutant 5 μ l de phénylisothiocyanate.

Après cette étape, les phénylthiourées sont éliminées par extraction au benzène (7 fois 1 ml). Le reste est séché sous courant d'azote. Pour parfaire le séchage, quelques gouttes d'acétate d'éthyle sont ajoutées puis évaporées sous azote. Le tube à réaction est ensuite placé dans un dessiccateur sur P₂O₅, à 60° C, sous vide, pendant 30 mn pour obtenir un résidu rigoureusement sec afin d'effectuer la réaction de clivage.

2 - Etape de clivage :

Le résidu est dissous par agitation dans 150 μ l d'acide

trifluoroacétique anhydre et mis sous atmosphère d'azote. La réaction de clivage est poursuivie pendant 7 mn à 50° C. L'acide est ensuite éliminé par un courant d'azote. La thiazolinone est extraite par trois fois 2 ml d'éther sans peroxyde renfermant 0,1 % de dithioerythritol. Le peptide résiduel est séché sur KOH pendant 30 mn avant d'opérer un nouveau cycle de dégradation.

3 - Etape de conversion.

La phase étherée est séchée. L'étape de conversion de la thiazolinone est effectuée par 200 μ l d'acide chlorhydrique N, à 80° C, pendant 10 mn, sous atmosphère d'azote. Le P T H amino-acide formé est extrait par 2 fois 1 ml d'acétate d'éthyle.

4 - Identification des P T H amino - acides.

Après extraction la phase organique contenant les P T H dérivés est séchée sous courant d'azote et repris par 20 μ l d'acétate d'éthyle.

Les P T H amino -acides sont séparés par chromatographie sur couche mince de gel de silice 60 F 254 . Les chromatoplaques de 0,25 mm d'épaisseur sont fournies par la firme MERCK. Nous avons utilisé deux systèmes solvant :

Systeme H₁ (EDMAN et BEGG) (71)

- chlorure d'éthylène 60 ml ; acide acétique 14 ml.

Systeme E modifié (HAN et al.) (105).

- acétate de butyle 97 ml ; eau 3 ml.

Après agitation on laisse décanter pendant une nuit. La phase supérieure est recueillie et on y ajoute 4 ml de formamide et 3 ml d'acide propionique.

L'identification des P T H - amino - acides est réalisée grâce à des témoins latéraux.

VI - METHODES RELATIVES A LA DETERMINATION DE LA
STRUCTURE GLYCANNIQUE.

A - METHYLATION DES GLYCOPEPTIDES ET DES OLIGOSACCHARIDES (*).

Au Laboratoire, FOURNET (81) a fait une étude critique des différents procédés de méthylation. Les méthodes de KUHN et al. (137) et de HAKOMORI (102) se sont révélées être les plus efficaces. La première, car moins drastique, est particulièrement recommandé pour des oligosaccharides possédant un monosaccharide terminal réducteur. Pour méthyler nos glycopeptides et nos oligosaccharides qui ne possèdent pas un tel groupement, nous avons utilisé la technique d'HAKOMORI, qui fournit un rendement plus élevé en produits méthylés.

1.- Réaction de méthylation.

- 80 mg d'une dispersion d'hydrure de sodium (***) à 50 % sont agités sous courant d'azote et à 20° C pendant 15 mn dans 5 ml de diméthylsulfoxyde.
- 10 mg de glycopeptide desséché sous vide à 40° C pendant 24 h., préalablement dissous dans 500 μ l de diméthylsulfoxyde sont mélangés à la solution précédente de diméthylsulfinyl carbanion. Après une agitation de 6 h. sous courant d'azote, on introduit 500 μ l d'iodure de méthyle. La réaction d'étherification est poursuivie pendant 15 h. toujours sous courant d'azote. On ajoute alors 10 ml d'eau au milieu réactionnel d'où l'on extrait le glycopeptide méthylé par

.../

(*) - La méthylation des oligosaccharides a été réalisée en partie par nous-mêmes et en partie par Yves LEROY, dans les deux cas, sous la direction de Bernard FOURNET.

(**) - L'hydrure de sodium est commercialisé sous forme d'un mélange avec de la paraffine dans le rapport 1/1 (p/p).

5 fois 5 ml de chloroforme. Les phases chloroformiques rassemblées sont ensuite lavées par 2 fois 10 ml de thiosulfate de sodium à 1 % dans l'eau, puis séchées par du sulfate de sodium anhydre. La phase chloroformique anhydre obtenue est évaporée sous courant d'air et mise à dessécher dans un excicateur. On recommence ensuite 2 cycles identiques de méthylation.

Dans le cas de fragments oligosaccharidiques, nous disposons de quantités beaucoup plus faibles. Les réactifs étaient ajoutés en excès par rapport au nombre de groupements à méthyler, 5 fois pour le méthylsulfinyl - carbanion (*) et 10 fois pour l'iodure de méthyle.

2.- Hydrolyse des produits perméthylés.



Après les trois cycles de méthylation, le résidu sec et repris par quelques gouttes de méthanol, était hydrolysé à 100° C pendant 4 heures par 1 ml d'acide chlorhydrique 4 N. Ce dernier était éliminé par codistillation avec de l'éthanol. Le résidu sec était placé pendant 18 h. dans un dessiccateur en présence de soude et d'anhydride phosphorique. Dans le cas d'oligosaccharides ne contenant pas de résidus de N - acétyl - glucosamine l'hydrolyse était poursuivie pendant 1,5 h. avec de l'acide chlorhydrique 1,5 N.

3.- Fractionnement des hydrolysats des glycopeptides.

Les hydrolysats des glycopeptides qui contiennent des résidus de glucosamine méthylée sont fractionnés par une électrophorèse préparative sur papier Whatman n°3 à pH 3,9

.../

(*) - préparé selon la méthode de SANFORD et CONRAD (238) rapportée par FOURNET (81).

(MICHL) (179) (7 volts/cm pendant 4 heures). La révélation de bandes latérales par le réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (217) et par le réactif à la ninhydrine permet de localiser la bande neutre des monosaccharides neutres -O - méthylés et la bande basique des -O - méthyl - glucosamines N - méthylées. Ces deux bandes sont éluées par de l'eau distillée additionnée de quelques gouttes d'acide acétique. Les éluats sont évaporés à siccité dans un évaporateur rotatif et les dernières traces d'eau sont éliminées dans un dessiccateur.

4 - Identification des éthers méthyliques (*).

a.- Identification des éthers méthyliques des monosaccharides neutres.

0,1 mg de monosaccharides neutres - O - méthylés sont méthyl - glycosilés par 0,1 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 sont chromatographiés en phase gazeuse sur une colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de chromosorb WAMHDS (mesh 60 - 80) contenant 3 % de carbowax 6000. La température de la colonne est de 180° C, de l'injecteur 200° C et du détecteur 210° C (détection à ionisation de flamme). Le débit d'azote, gaz vecteur, est de 20 ml/mn. Les 2, 3, 4 et 3, 4, 6 - tri - O - méthyl - α - D - mannosides possèdent dans ces conditions le même temps de rétention. Les deux dérivés sont séparés sous forme de dérivés triméthylsilylés dans les conditions décrites

.../

(*) - L'analyse en phase gazeuse des monosaccharides méthylés a été réalisée par Yves LEROY sous la direction de Bernard FOURNET.

par FOURNET (81). Cette dernière technique permet d'ailleurs d'augmenter la sensibilité de l'analyse au détecteur à ionisation de flamme.

b - identification des méthyl-osamines.

Les osamines méthylées sont triméthylsilylées selon le procédé de SWEELEY et al. (268). 0,1 mg de la fraction "osamine" sont dissous 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 mn, puis séché sous courant d'azote. Le résidu est repris par 1 ml d'heptane et la solution est centrifugée. Le surnageant est séché sous courant d'azote. Le résidu sec est repris par 50 μ l d'heptane et 1 μ l de la solution est soumis à la chromatographie en phase gazeuse dans les conditions suivantes : colonne de verre de 0,3 x 180 cm ; chromosorb WAWHMDS (mesh : 100 - 120) contenant 3 % de silicone OV17 ; débit du gaz vecteur (N_2) 20 ml/mn ; température du four 120° C, de l'injecteur 200° C et du détecteur 210° C -(ionisation de flamme).

B - OXYDATION PERIODIQUE DES GLYCOPEPTIDES.

GOLDSTEIN et al. (87) ont décrit un procédé de dégradation de la fraction glycanique des glycoprotides appelée couramment dégradation récurrente de SMITH. Le principe du mode opératoire est le suivant : la fraction glucidique est d'abord oxydée par l'acide periodique qui transforme les oses conjugués porteurs de fonctions α -glycoliques en dialdéhydes ; dans un second temps, les fonctions aldéhydiques sont réduites en fonctions alcooliques par le borohydrure de potassium ; dans un troisième temps, les liaisons glycosidiques, labilisées par la transformation des oses en acétals linéaires, sont hydrolysées en milieu acide dilué. On sépare ensuite les différents fragments pour obtenir la fraction glucidique non oxydée liée à la chaîne peptidique.

1.- Modalités de l'oxydation.

L'oxydation est réalisée à 5° C dans une solution 0,01 M en acide periodique et le rapport molaire entre le glycopeptide et l'agent oxydant est de 100. 40 mg de glycopeptide sont dissous dans 80 ml d'eau et cette solution est additionnée de 80 ml d'acide periodique 0,02 M. L'oxydation est suivie en mesurant la diminution de la densité optique à 310 nm pendant 8 jours. L'acide periodique en excès est détruit par l'addition d'1 ml d'une solution d'éthylène glycol diluée au quart.--(laisser 30 mn sous agitation à 20° C).

2.- Réduction du polyaldéhyde.

La solution précédente est amené doucement à pH 7 avec de la soude 0,1 N. Les fonctions aldéhydiques sont réduites par l'addition de 700 mg de borohydrure de potassium. L'ensemble est maintenu pendant 18 h à 4° C. L'excès de réducteur est détruit en ajustant le milieu à pH 6 avec de l'acide acétique. Ensuite, par addition de soude 1 N le pH est élevé à 7.

3.- Elimination des réactifs.

Après concentration à l'évaporation rotatif, la solution (3 à 4 ml) est chromatographiée sur une colonne de Sephadex G 25 (40 - 120 μ)(2 x 60 cm) stabilisée dans de l'eau distillée. Le glycopeptide modifié est repéré dans l'éluat par la réaction au phénol - sulfurique de DUBOIS et al. (67).

4.- Isolement de la fraction glycopéptidique non modifiée.

L'éluat précédent contenant le glycopeptide modifié était évaporé à sec. Le résidu était hydrolysé par 30 ml de H₂SO₄ 0,16 N pendant 15 h à 20° C.

L'acide sulfurique était éliminé en amenant l'hydrolysat à pH 7 avec une solution de Ba (OH)₂ saturée. L'ensemble était maintenu à 4° C pendant 1 heure. Après centrifugation, le

surnageant était concentré et chromatographié sur une colonne de Sephadex G 15 (1 x 110 cm ; 40 - 120 μ). La fraction glycopeptidique non modifiée (FGOP) était repérée dans l'éluat comme précédemment par le réactif de DUBOIS et al. (67).

C - HYDRAZINOLYSE ET DIAZOTATION.

La mise au point du procédé d'hydrazinolyse - diazotation des oligosaccharides libres et conjugués a été réalisée au Laboratoire par BAYARD (14) et par BAYARD et MONTREUIL (15).

1.- Principe.

L'hydrazine employée tout d'abord par AKABORI et al.(2) et ensuite par MATSUSHIMA et FUJII (171) coupe spécifiquement les liaisons amides. Les N - acétyl - glucosamines sont désacétylées et la liaison protéine - glycanne entre l'asparagine et la N - acétyl-glucosamine est rompue. Les osamines désacétylées sont alors désaminées par l'acide nitreux. Cette désamination entraîne une coupure spécifique de la chaîne glucidique au niveau de la glucosamine/(MATSUSHIMA et FUJII (171)). Celle-ci est transformée en 2,5 - anhydro - D - mannose. On obtient par ce procédé des oligosaccharides ne contenant plus de glucosamine et possédant un résidu de 2,5 - anhydro - D - mannose en position terminale réductrice. De plus, l'acide N - acétyl - neuraminique est désacétylé et désaminé en partie.

2.- Protocole expérimental.

a - L'hydrazinolyse.

100 mg de glycopeptide, desséché sous P_2O_5 pendant 48 h, sont mis en solution dans 1 ml d'hydrazine anhydre. L'ensemble est porté à 100° C pendant 30 h. L'hydrazinolysat est repris par 100 ml de toluène et évaporé sous vide à 40° C.

L'hydrazine est alors entraînée par le toluène. Cette opération est répétée encore deux fois. Le résidu sec est repris par 3 à 4 ml d'une solution d'acide acétique à 15 % dont la température a été préalablement descendue à 4° C. L'ensemble est chromatographié sur une colonne de Sephadex G 50 (40 - 120 μ ; 3 x 100 cm) stabilisée à 4° C dans de l'eau distillée. Le glycanne N - désacétylé est récupéré et les contaminants tels que l'hydrazine et les hydrazides d'acides sont éliminés.

b - Désamination nitreuse.

La désamination nitreuse du glycanne préalablement N - désacétylé est réalisée selon le procédé de HORTON et al. (117). L'éluat de la colonne de Sephadex G 50 contenant le glycanne N - désacétylé est évaporé à sec et repris par 6 ml d'eau distillée contenant 166,8 mg de nitrite de sodium et 90 μ l d'acide acétique glacial. La solution est maintenue à 4° C pendant 20 heures sous agitation magnétique.

c - Dessalage et séparation des fractions neutres et acides.

Après action du nitrite de sodium, la solution est chromatographiée à 4° C successivement sur des colonnes (2 x 20 cm) d'échangeurs de cations (Dowex 50 x 8 ; mesh 25 - 50 ; forme acide) et d'anions (Dowex 1 x 4 ; mesh 200 - 400 ; forme formiate). Les solutions effluentes contiennent les oligosaccharides neutres et les oligosaccharides acides sont ensuite élués de l'échangeur d'anions par une solution d'acide formique à 2 %.

d - Détermination des rapports molaires des oligosaccharides et monosaccharides présents dans l'éluat neutre des diazotats des glycopéptides.

La présence d'un seul résidu de 2,5 - anhydro - D - mannose en position réductrice terminale par fragment glucidique permet

d'en déterminer les rapports molaires par comptage de la radioactivité portée par les oligosaccharides, préalablement réduits par le borohydrure tritié et séparés par chromatographie sur papier.

Mode opératoire :

L'éluat neutre des diazotats est concentré sous vide. On en prélève 20 μ l contenant environ 0,5 mg de glucides auxquels on ajoute 20 μ l d'une solution de KOH 0,01M contenant 0,1 m Ci de borohydrure de sodium tritié (activité spécifique 10 Ci/m M) et environ 460 μ l d'eau distillée. L'ensemble est abandonné pendant 2 heures à 20° C. La réduction est rendue totale par addition de quelques mg de borohydrure de sodium froid. Après 4 heures de réaction le borohydrure en excès est détruit par projection de Dowex 50 x 8 (mesh 25 - 50 ; forme acide). La suspension est filtrée et évaporée sous vide. Le résidu sec est repris (deux à trois fois) par le mélange méthanol/acide acétique (95 : 5) et évaporé de nouveau. La plus grande partie de l'acide borique est codistillée avec le méthanol. Les dernières traces sont éliminées par une électrophorèse préparative sur papier dans le tampon de MICHL (179) à pH 3,9. Les oligosaccharides migrent au niveau des oses neutres. Après repérage, la bande contenant ces glucides réduits est éluée par de l'eau distillée. Après élution, la solution est évaporée sous vide. Les olisaccharides terminés par le 2,5 - anhydro - D - mannitol ainsi que le 2,5 - anhydro - D - mannitol lui-même sont séparés par chromatographie sur papier Whatman n°3 dans le système solvant : acétate d'éthyle, pyridine, acide acétique, eau (5 : 5 ; 1 : 3). Après 12 heures de migration, le chromatogramme, séché, est découpé en bandes (1 cm de large et 5 cm de long) que l'on place dans 10 ml du mélange scintillant : toluène - PPO - POPOP. Tous ces échantillons sont ensuite passés dans un compteur de radioactivité. Le nombre de c.p.m. est proportionnel au nombre de moles de chaque oligosaccharide. On en déduit leurs rapports molaires.

e - Fractionnement des oligosaccharides neutres.

Les oligosaccharides neutres sont fractionnés par chroma-

tographie préparative sur papier Whatman n°3 dans le système solvant cité précédemment (p.105). Grâce au résidu de 2,5 anhydro - D - mannose en position réductrice terminale, ils sont révélés soit par le réactif à l'urée chlorhydrique de DEDONDER (60) soit par celui de PARTRIDGE (217) à l'oxalate d'aniline.

D - RUPTURE DE LA LIAISON PROTEINE - GLYCANNE ET HYDRAZINOLYSE - DIAZOTATION DU GLYCANNE LIBRE : POSITION DU FUCOSE.

La combinaison des résultats obtenus après les méthylations, l'oxydation périodique et d'hydrazinolyse - diazotation a prouvé que, dans les glycanes, le résidu de fucose était branché sur une N - acétyl - glucosamine. Il nous fallait déterminer l'emplacement de cette osamine. Il y avait de fortes présomptions pour brancher ce résidu de fucose sur l'osamine impliquée dans la liaison protéine - glycanne. Le principe de notre manipulation fut de modifier ce résidu de N - acétyl - glucosamine de telle sorte qu'il puisse être distingué des autres résidus de N - acétyl - glucosamine.

1.- Rupture de la liaison protéine - glycanne.

Nous avons suivi le protocole préconisé par LEE et SCOCCA (145). La N - acétyl - glucosamine est alors transformé en osaminitol.

40 mg de glycopeptide sont dissous dans 15 ml d'une solution de NaOH 1 M et BH_4K 1 M. L'ensemble est porté à 100° C pendant 6 heures puis refroidi dans un bain de glace. L'excès de borohydrure est détruit en amenant la solution à pH 6 par addition d'acide acétique. La solution est concentrée partiellement et centrifugée pour éliminer la plus grande partie du borate. Le surnageant est chromatographié sur une colonne (2 x 60 cm) de Sephadex G 15. Les premières fractions de l'éluat

donnant une réaction positive au phénol - sulfurique de DUBOIS et al. (67) étaient rassemblées, concentrées puis lyophilisées.

2.- Hydrazinolyse - diazotation.

Les N - acétyl - glucosamines non réductrices sont en majeure partie désacétylées par l'action de la soude. Néanmoins nous avons préféré faire agir, en outre, l'hydrazine anhydre suivant le protocole décrit page 103.

L'action de l'acide nitreux nous fournit de nouveau des fragments glucidiques portant un résidu de 2,5 - anhydro - D - mannose réducteur. Mais d'après BANDO et MATSUSHIMA (13) la glucosaminitol se transforme en quatre composés :

- le 2 - désoxy - D - arabino - hexose (2 - désoxy - D - glucose),
- le 2 - désoxy - 3 - hexulose,
- le 2 - hydroxyméthyl - 2 - désoxy - D - arabino - pentose,
- le D - mannitol,

qui se trouvent avant et après réduction respectivement dans les proportions suivantes : 45/17/22/4 et 55/14/16/4.

Pour obtenir une grande proportion de 2 - désoxy - glucitol, nous avons réduit la phase neutre obtenue après le traitement à l'acide nitreux (p. 104).

3.- Séparation des produits obtenus.

Les produits réduits ne réagissent plus au réactif à l'urée chlorhydrique ni à celui à l'oxalate d'aniline. Nous avons donc opéré, dans un premier temps, une réduction au borohydrure de sodium tritié pour avoir un moyen de repérage lors de la séparation des constituants. Les produits sont fractionnés par chromatographie sur papier Whatman n°3 dans le

système solvant cité page 105.

E - HYDROLYSES ENZYMATIQUES (*)

1.- Action d'une neuraminidase.

La neuraminidase de Clostridium perfringens (E.C.3.2.1.1) utilisée est fournie par la firme WORTHINGTON. L'hydrolyse est effectuée dans un tampon de pH 5,6 (acétate de sodium 0,05 M ; chlorure de sodium 0,06 M ; chlorure de calcium 0,004 M) (ROBINSON et PIERCE) (234). Le rapport enzyme/glycopeptide était de 1/100.

Après 24h d'hydrolyse à 37° C, la solution est chromatographiée sur une colonne (1 x 110 cm) de Bio-gel P2 (mesh 200 - 400). Les différents constituants de l'éluat sont repérés par le réactif au phénol - sulfurique de DUBOIS et al. (67) et par le réactif à la diphenylamine de NIAZI et STATE (204) modifiée par WERNER et ODIN (283).

2.- Action d'une galactosidase.

Nous avons employé la β - D - galactosidase (E.C.3.2.1.2) de Fève Jack préparée selon la méthode de LI et LI (153).

A 100 μ l d'une solution d'oligosaccharides contenant 1 μ M de galactose sont additionnés 900 μ l d'un tampon à pH 6 ($\text{PO}_4 \text{HNa}_2$ 0,05 M ; acide citrique 0,05 M). On ajoute alors 40 μ l de la solution enzymatique. L'hydrolyse est poursuivie pendant 20 h. à 37° C.

.../

(*) - Ces hydrolyses enzymatiques ont été réalisées grâce aux conseils du Docteur Geneviève SPIK.

Dans les mêmes conditions, $10\mu\text{l}$ de la solution enzymatique libèrent en 10 mn $0,025\ \mu\text{M}$ de p - nitrophénol à partir de l'hétéroside de synthèse du galactose se trouvant pendant l'hydrolyse à une concentration de $0,05\ \text{m M}$.

L'hydrolysats est dessalé sur échangeurs de cations (Dowex 50 x 8 ; mesh 25 - 50 ; forme acide) et d'anions (Duolite A 102 D ; mesh 25 - 50 ; forme formiate). L'éluat neutre est évaporé puis soumis à une chromatographie sur papier Whatman n°3 dans le système solvant : acétate d'éthyle - pyridine - acide acétique - eau - (5 - 5 - 1 - 3). Grâce à des témoins latéraux de quantité connue et croissante, l'on détermine la quantité d'ose libéré par l'enzyme.

3.- Action d'une mannosidase.

L' α - D - mannosidase a été isolée selon le protocole de LI et LEE (152) à partir de la "Bromelain"

L'hydrolyse est effectuée dans un tampon à pH 4,25 (citrate de sodium $0,05\ \text{M}$) pendant 20 heures à $37^\circ\ \text{C}$. Le protocole est identique à celui appliqué lors de l'hydrolyse par la β - D galactosidase (p. 108).

4 - Action de la β - D - N - acétyl - glucosaminidase (EC : 3.2.1.30)

La β - D - glucosaminidase a été préparée selon le protocole de LI et LI (153) à partir de Fève Jack.

L'hydrolyse a été poursuivie pendant 48 h à $37^\circ\ \text{C}$ à pH 5 (tampon citrate de sodium $0,05\ \text{M}$) (153). Les oligosaccharides ou les glycopeptides modifiés étaient ensuite isolés par chromatographie sur une colonne de Bio-gel P₂ ou P₄ suivant la masse moléculaire de ces derniers.

RESULTATS PERSONNELS

CHAPITRE I.

: LES IMMUNOGLOBULINES. :

Ce chapitre sera divisé en cinq parties :

- 1.- Isolement et fractionnement des immunoglobulines.
- 2.- Localisation des groupements glycaniques.
- 3.- Etude des modalités de la liaison entre la protéine et les glycannes.
- 4.- Détermination de la séquence peptidique autour du point d'attache protéine-glycane.
- 5.- Etude de la structure des groupements glycaniques.

 : I S O L E M E N T E T F R A C T I O N N E M E N T :
 :
 : D E S I M M U N O G L O B U L I N E S . :
 :

Les deux objectifs que nous nous étions fixés, à savoir :

- isoler rapidement et en grande quantité les anticorps du lait de Vache en vue de compléter l'alimentation du Nourrisson.
- et étudier la structure des glycanes de ces immunoglobulines

nous imposaient, dans un premier temps, d'une part, de choisir le substrat de départ et une méthode efficace d'isolement, et d'autre part, de fractionner suffisamment les immunoglobulines pour obtenir une famille homogène avant d'entreprendre des études structurales.

I.- ISOLEMENT DES IMMUNOGLOBULINES.

Pour obtenir des globulines IgG en grande quantité, nous avons fractionné du colostrum et non du lait de Vache pour la raison citée antérieurement (voir p. 14) et que nous avons nous-mêmes vérifiée (voir Tableau XVI ; p.112).

Nous avons employé deux techniques. L'une s'identifie à celle de SMITH (247) et utilise les effets additionnels d'un gradient de concentration en sulfate d'ammonium et d'un gradient de pH (MONTREUIL et al.)(185) L'autre est calquée sur la méthode au rivanol de KENYON et al. (127) décrite par ANTONY (4). Elle met à profit la propriété précipitante de l'éthanol sur les protéines. Nous discuterons la valeur de ces deux méthodes.

.../

T A B L E A U XVI.

Rendement en précipité P_1 (voir Fig. 5 ; p. 21)
 en fonction de la chronologie des traites
 exprimé en g. de protéines/litre de colostrum
 de Vache.

Traites	Rendement pondéral
5 h. après le vélage	63,5
10 h. après le vélage	18
22 h. après le vélage	4,8
34 h. après le vélage	2,75



A - FRACTIONNEMENT DU COLOSTRUM PAR LE SULFATE D'AMMONIUM.

1.- Préparation du lactosérum.

Pour utiliser ce procédé au sulfate d'ammonium, il faut obtenir au préalable un lactosérum limpide. Le colostrum utilisé est fait de la traite qui suit de quelques heures le vêlage (a). Ce lait colostrale est maintenu en chambre froide à 5° C pendant 24 h. avant d'être délipidé (16 000 t/mn ; "rotor-batch" modèle SPINCO). Par cette méthode, le colostrum est débarrassé de son beurre et de ses "boues" (b). Il est ensuite décaséiné par le procédé de LINDERSTRØM-LANG (155) en acidifiant à pH 4,6 par l'acide chlorhydrique 0,15 N (c). Le précipité des caséines est éliminé par centrifugation ("rotor-batch" - 1600 t/mn) après un repos de 24 h. en chambre froide (5°C). Nous disposons alors d'un lactosérum limpide que l'on soumet au fractionnement par le sulfate d'ammonium.

2.- Précipitation par le sulfate d'ammonium.

Le mode opératoire de ce procédé fut décrit en détail par ANTONY (4). Le schéma du fractionnement est reporté dans la figure 5(p.2†).

.../

-
- (a) - Nous remercions chaleureusement Mr. et Mme HENNETTE de nous avoir fourni ce colostrum avec tant de gentillesse et de bonne humeur.
- (b) - Précipité jaunâtre très abondant dans le colostrum des premières traites et disparaissant, peu à peu, les jours suivants.
- (c) - Au lieu de diluer au 1/5 le lait comme dans la méthode originale, on ajoute un volume d'eau au colostrum délipidé avant d'amener son pH à 4,6. Mais comme le volume d'eau à ajouter au colostrum délipidé est variable suivant l'échantillon pour précipiter les caséines à pH 4,6, nous préférons, après avoir ajusté le pH du colostrum délipidé à 4,6, dialyser la solution pendant deux ou trois jours avant d'éliminer les caséines par centrifugations.

Nous avons pu vérifier, comme ANTONY (4) que les globulines immunes se trouvaient rassemblées dans les précipités P_1 et P_4 (Fig.19 ; p. 115) et qu'ils ne contiennent pratiquement que des globulines immunes. En outre, au regard des résultats pondéraux et de la composition des différents précipités (Fig 20, p.116) on peut admettre en première approximation que 95 % de ces globulines immunes se trouvent rassemblées dans ces deux précipités P_1 et P_4 .

L'immuno-électrophorèse révèle dans ces deux précipités quelques impuretés constituées par les protides suivants : α -lactalbumine, β -lactoglobuline, serum albumine et lactotransferrine (Fig.20 , p.116)

B - FRACTIONNEMENT DU COLOSTRUM PAR LE RIVANOL.

Pour effectuer ce fractionnement suivant le mode opératoire utilisé par DUQUESNE (68), pour isoler les globulines immunes du serum de Boeuf nous avons pris comme matériel de départ du colostrum délipidé.

Les précipités récupérés (P_1 , P_2 et P_3) (Fig.21 , p.117) contiennent tous du rivanol. Celui-ci est éliminé des précipités P_2 et P_3 en dissolvant la poudre obtenue après lyophilisation, dans une solution de chlorure de sodium à 5 % à pH 5,2 (pH ajusté avec de l'acide chlorhydrique concentré). Après centrifugation le surnageant est dialysé contre de l'eau distillée et lyophilisé. Le produit final est pratiquement exempt de rivanol. Quant au précipité P_1 , il se pose un problème de redissolution après centrifugation. Néanmoins, plusieurs essais furent réalisés pour tenter de le redissoudre. Dans tous les cas, le résultat n'était pas satisfaisant. Cependant, on a pu réaliser des électrophorèses et immuno-électrophorèses en gélose sur la partie soluble (Fig.22 , p.118)

C - DISCUSSION ET CONCLUSION.

Lors du fractionnement par le rivanol, les globulines immunes précipitent déjà au cours de la première étape. Il était assez difficile de quantifier cette perte. Aussi avons-nous appliqué les deux méthodes de

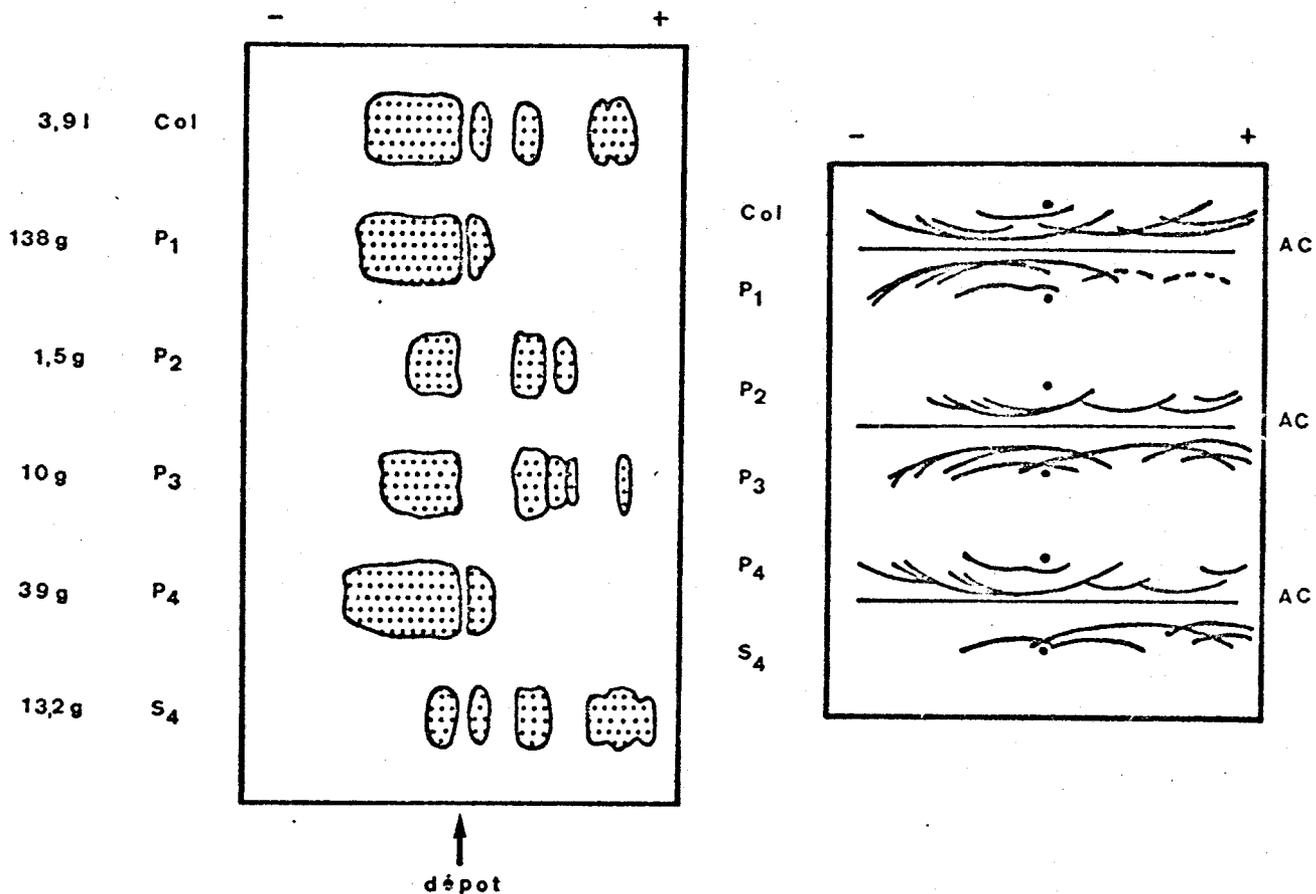


Figure 19.



Rendements pondéraux et schémas des électrophorèses et immuno-électrophorèses des produits obtenus après fractionnement du colostrum par le sulfate d'ammonium.

A C : immunsérum de lapin anti-protéines colostrales.

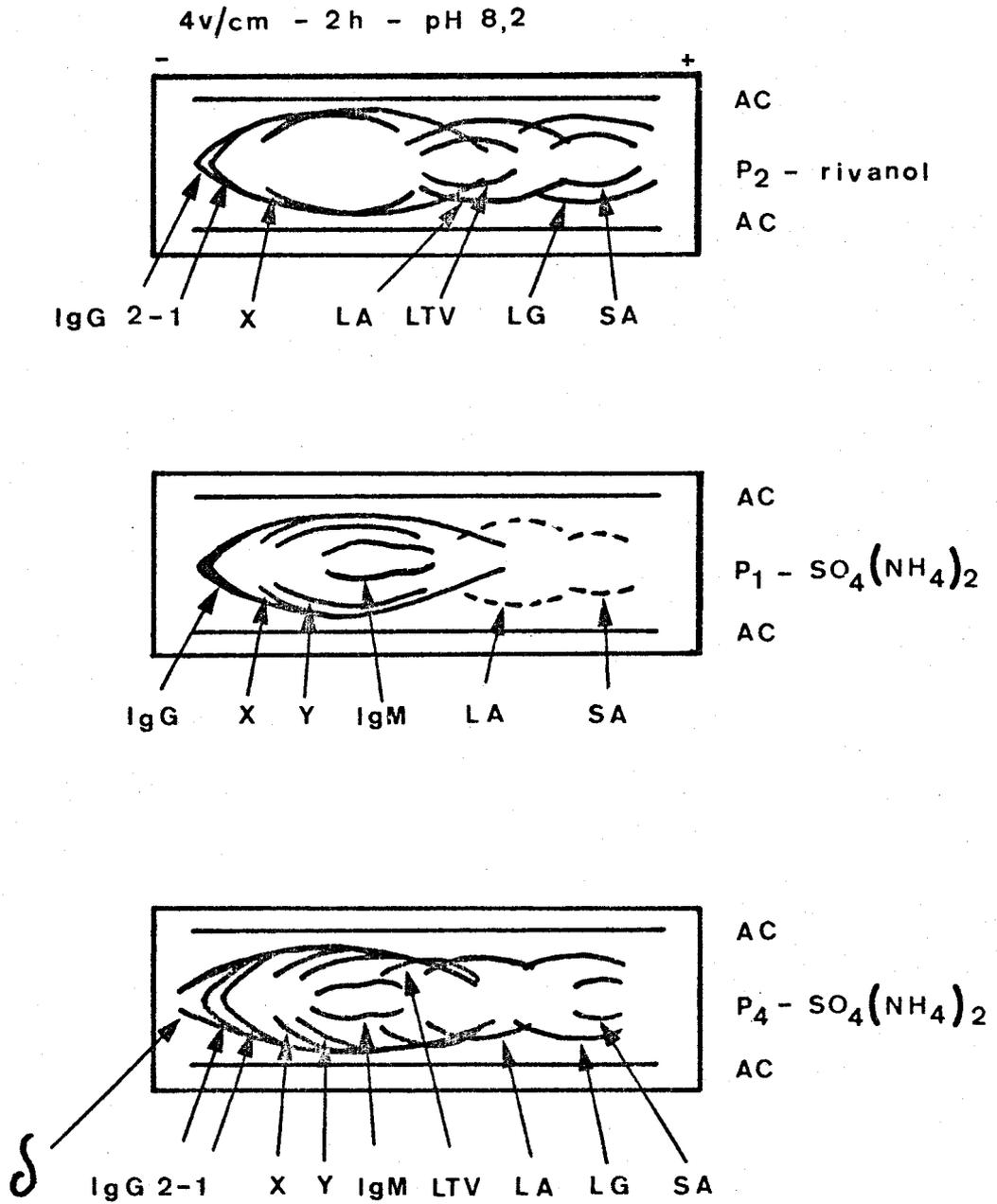


Figure 20.

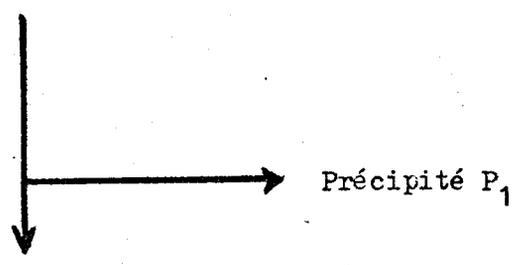
Schémas des immuno-électrophorèses des précipités P₂ (Rivanol) et P₁ et P₄ (sulfate d'ammonium)



AC : immunsérum de lapin anti-protéines colostrales; IgG₁ ; IgG₂ ; IgM : immunoglobulines . LTV : lactotransferrine ou "Red Protein". LA : α - lactalbumine . LG : lactoglobuline . SA : serumalbumine.

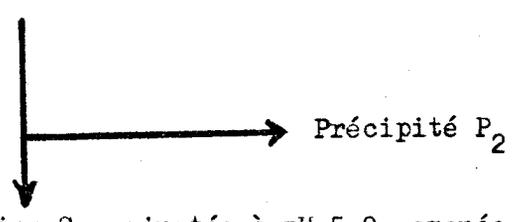
Solution de colostrum délipidé additionnée de trois volumes d'une solution de rivanol à 0,4 % et ajustée à pH 7,7

- attendre une demi-heure



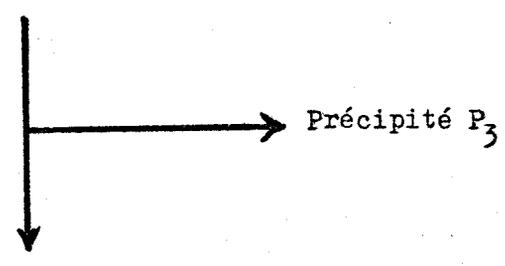
Solution S₁, ajustée à pH 6,8 amenée à 25 % d'éthanol

- attendre 3 à 4 heures à -10°C



Solution S₂, ajustée à pH 5,8, amenée à 40 % d'éthanol

- attendre 15 heures.



Solution S₃

- dialyser

Figure 21.

Schéma du fractionnement du colostrum de Vache par le rivanol.

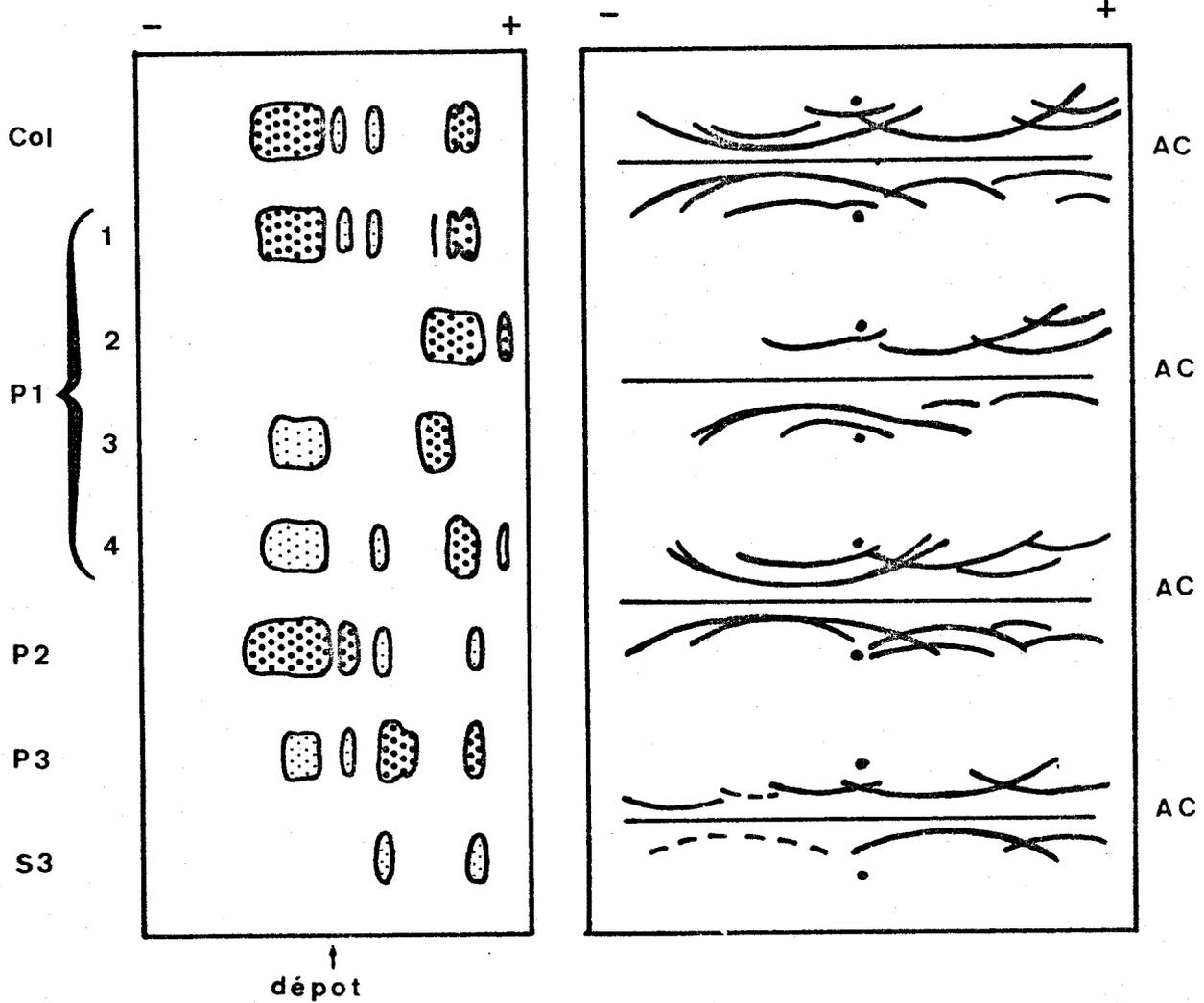


Figure 22.

Schémas des électrophorèses et des immuno-électrophorèses des précipités obtenus par le fractionnement au rivanol.

- P₁ : 1 - dissolution dans NaCl à 5 %
 2 - " " " tampon citrate M à pH 8,2
 3 - " " " " " " " pH 7,15 et 6 M urée
 4 - " " " citrate M

AC : immunosérum de lapin anti-protéines colostrales.



précipitation sur un même lot de colostrum. Seuls les précipités contenant des globulines immunes ont retenu notre attention, à savoir : les précipités P₁ et P₄ obtenus par le fractionnement au sulfate d'ammonium et P₂ et P₃ isolés par la méthode au rivanol. Par cette dernière technique on constate une perte très importante en globulines immunes (Tableau XVII; p. 120). En outre, l'immuno-électrophorèse révèle plus d'impuretés dans le précipité P₂ (Fig. 20 p. 116) obtenu par le fractionnement au rivanol que dans le précipité P₁ recueilli par le procédé au sulfate d'ammonium.

C'est pourquoi nous avons choisi pour nos études ultérieures la technique au sulfate d'ammonium. En partant du colostrum, nous obtenons par cette méthode des quantités importantes de globulines immunes et dans un état de pureté satisfaisant.

II.- FRACTIONNEMENT DES GLOBULINES IMMUNES.

L'hétérogénéité des immunoglobulines obtenues par les fractionnements au sulfate d'ammonium et au rivanol nous a amené à entreprendre leur sous-fractionnement avant d'envisager leurs études structurales.

Nous avons choisi comme substrat de départ les précipités P₁ et P₄ /SO₄ (NH₄)₂/. Malgré la complexité du précipité P₂ (Rivanol) et son rendement faible, nous l'avons soumis à une analyse rapide. Car l'immuno-électrophorèse révèle la présence d'un composé possédant une migration analogue à la "Red protein" de GROVES (99) (Fig 20, p. 116).

Pour déterminer les différents groupes de globulines immunes nous avons employé deux types de chromatographie : la chromatographie de tamisage moléculaire et la chromatographie sur échangeurs d'ions.

T A B L E A U XVII.

Rendements comparatifs des précipités obtenus à partir
d'un même lot de colostrum de Vache par les techniques
au sulfate d'ammonium et au rivanol.

Fractionnement de 1 litre de colostrum décaséiné (exprimé en g.)		
Précipités	$\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$	Rivanol
P ₁	35,5	Insoluble
P ₂	0,38	18,2
P ₃	2,5	1
P ₄	10	-
S ₃	-	non récupéré dénaturation
S ₄	3,4	-

A - ETUDE DES PRECIPITES OBTENUS PAR LE FRACTIONNEMENT AU SULFATE D'AMMONIUM.

1.- Etude du précipité P₁.

a)- Chromatographie sur Sephadex G.100.

La chromatographie du précipité P₁ fournit un seul pic avec un épaulement. On a voulu parfaire la séparation en recyclant ce composé croyant à la présence d'Ig M (Fig.23 a p.122). Mais la fraction I (F I) nous a semblé trop importante. L'étude immuno-électrophorétique donnerait un résultat interprétable à la condition de séparer nettement les fractions I et II (F I et F II.). On a donc recyclé deux fois 1,5 g de la fraction F II. Cet échantillon avait été dialysé et lyophilisé une fois de plus que le précipité P₁ natif. On remarque dès le premier cycle de la chromatographie que la fraction I (FI_a) était nettement individualisée de la fraction II (F II_a) (Fig.23 b , p.122). On a obtenu à la fin du deuxième recyclage les fractions FI_c et FII_c bien séparées. L'analyse immuno-électrophorétique montre que la fraction FI_c possède une migration de γ 1 et la fraction FII_c une migration de γ 2. Ce résultat nous a intrigués bien que tout laissait croire à une séparation en deux groupes distincts, différents par leur masse moléculaire (d'après le principe de la filtration sur gel). De nouveau, nous avons chromatographié la fraction FII_c après l'avoir dialysée et lyophilisée. Nous n'avons pas été surpris de voir de nouveau apparaître deux fractions (Fig.23c p.122). Car ce phénomène de polymérisation après congélation (lors de la lyophilisation) a déjà été signalé par HANSSON (108) avec les immunoglobulines humaines.

b)- Chromatographie sur DEAE - Sephadex A - 50.

Nous avons chromatographié sur DEAE - Sephadex A - 50 la fraction F II (venant du fractionnement du précipité P₁ sur Sephadex G 100) (Fig.23a; p.122). Aucune substance n'est éluée avec le tampon phosphate 0,02 M à pH 8 (Fig.24 p.123). Toute la fraction FII est récupérée après le passage du deuxième tampon. Nos résultats confirment ceux de MURPHY (199). Le précipité P₁ du lactosérum du colostrum ne contient que des IgG "rapides"

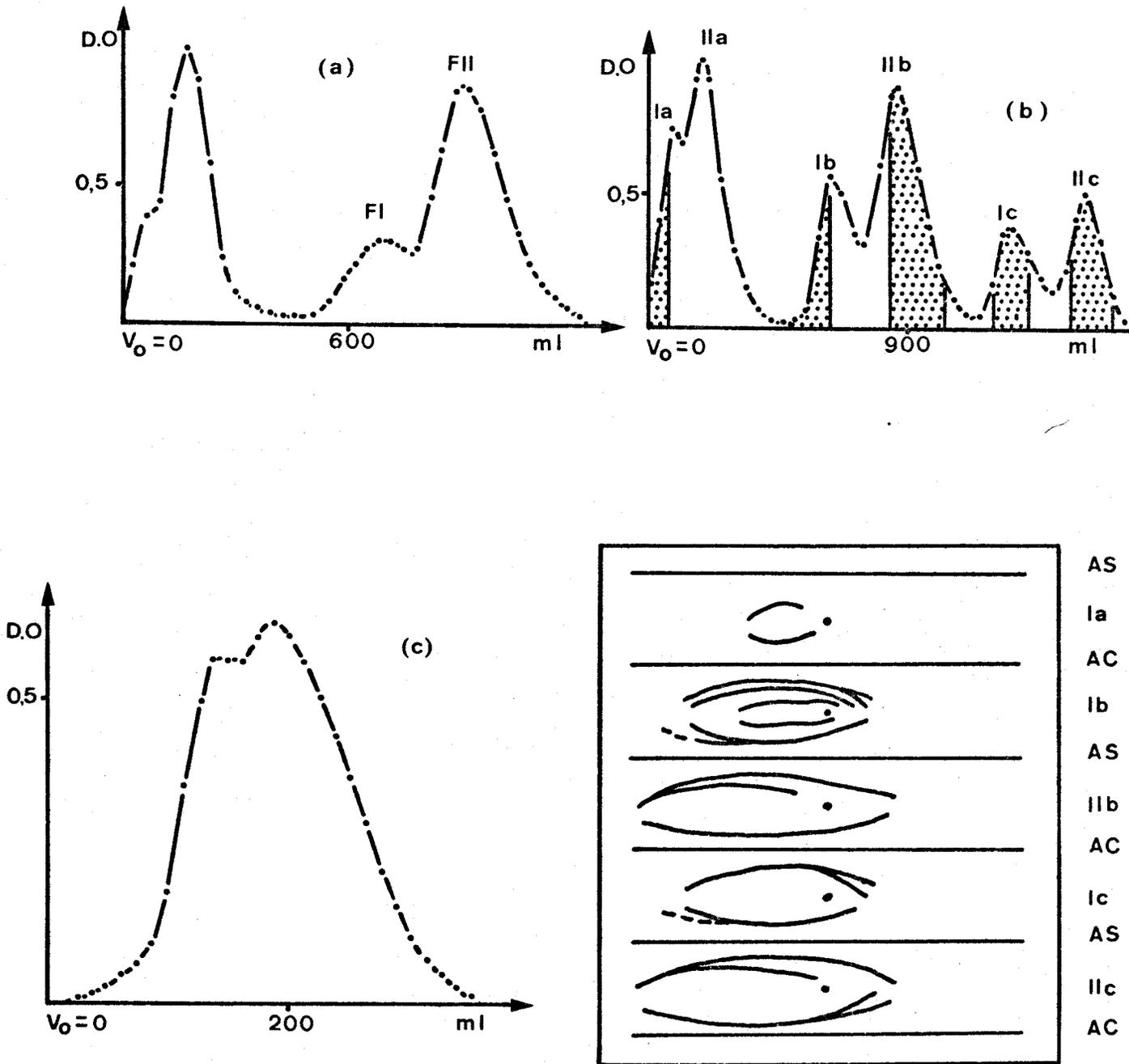


Figure 23.

Courbe d'élution du fractionnement sur Sephadex G.100

(a) - du précipité $P_1 - SO_4 (NH_4)_2$ (b) - de la fraction F II

(c) - de la fraction F II_c et schémas des immunoélectrophorèses du fractionnement (b).

A C : immunsérum de lapin anti-protéines colostrales.

A S : " " " " " " sériques.



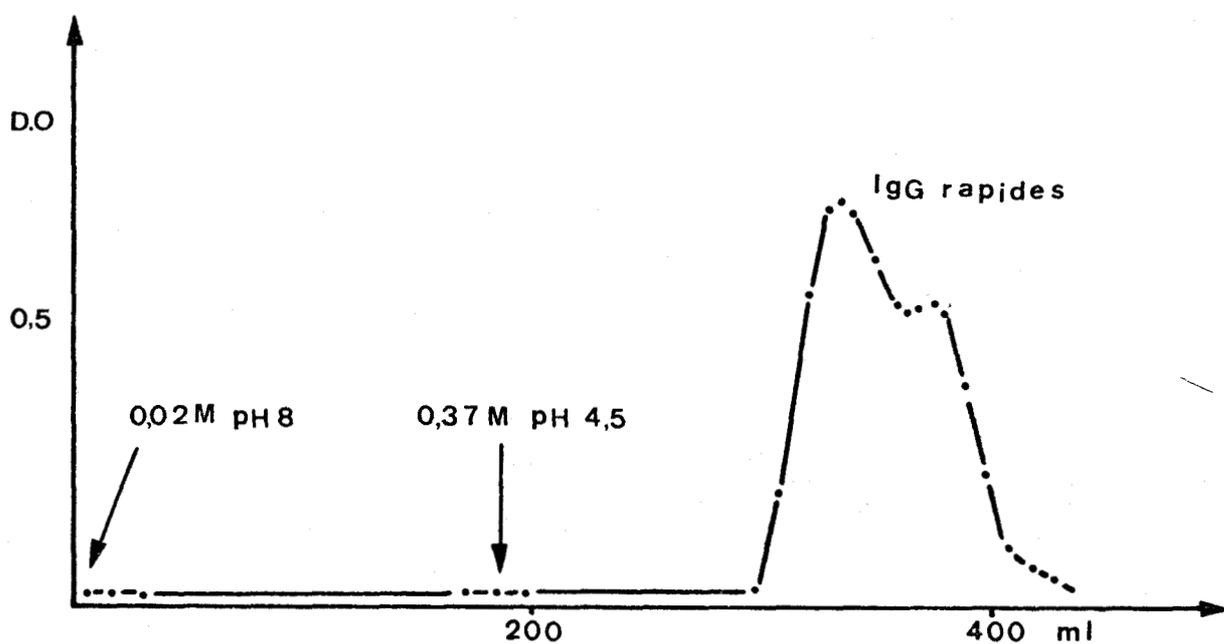


Figure 24.

Courbe d'élution du fractionnement sur DEAE - Sephadex
A-50 de 700 mg de la fraction II (P_1) - Tampon phosphate
de sodium - Colonne : 3 x 40 cm - Débit : 15 ml/h -
Rendement : 79 %.



(Ig G₁) mais la courbe d'élutions laisse apparaître une certaine hétérogénéité.

c) - Chromatographie sur SE - Sephadex C-50.

La fraction F II a été chromatographiée sur SE - Sephadex C-50. On obtient deux groupes d'Ig G : l'une éluee par un tampon d'acétate de sodium 0,04 M à pH 5,5, l'autre, par un gradient de molarité en acétate de sodium (0,04 à 1 M) (Fig 25 A, p.125). Le premier groupe (I) se subdivise en cinq fractions (a, b, c, d, e) avec les tampons 0,02 M et 0,04 M en acétate de sodium à pH 5,5 (Fig. 25 B, p.125). Nous n'avons pas essayé de fractionner le groupe II qui paraît néanmoins hétérogène.

d) - Conclusions.

Le précipité P₁ ne renferme que des Ig G dites "rapides" (Ig G₁). Elles peuvent être divisées en deux groupes hétérogènes suivant le schéma de la figure 26 (p.126)

En outre, des IgM ont été mises en évidence par immunoelectrophorèse. Mais leur taux est très faible et, de ce fait, le précipité n'est pratiquement composé que d'Ig G₁.

2 - Etude du précipité P₄.

a) - Chromatographie sur Sephadex G 100.

La chromatographie du précipité P₄ fournit un diagramme d'élution plus complexe que le précipité P₁ (Fig.27 p.127). On obtient par un découpage artificiel six fractions. L'immunoélectrophorèse révèle que les fractions 3 et 4 ne contiennent que des IgG. La fraction 6 renferme un composé de migration très cathodique que nous avons appelé la protéine "δ".

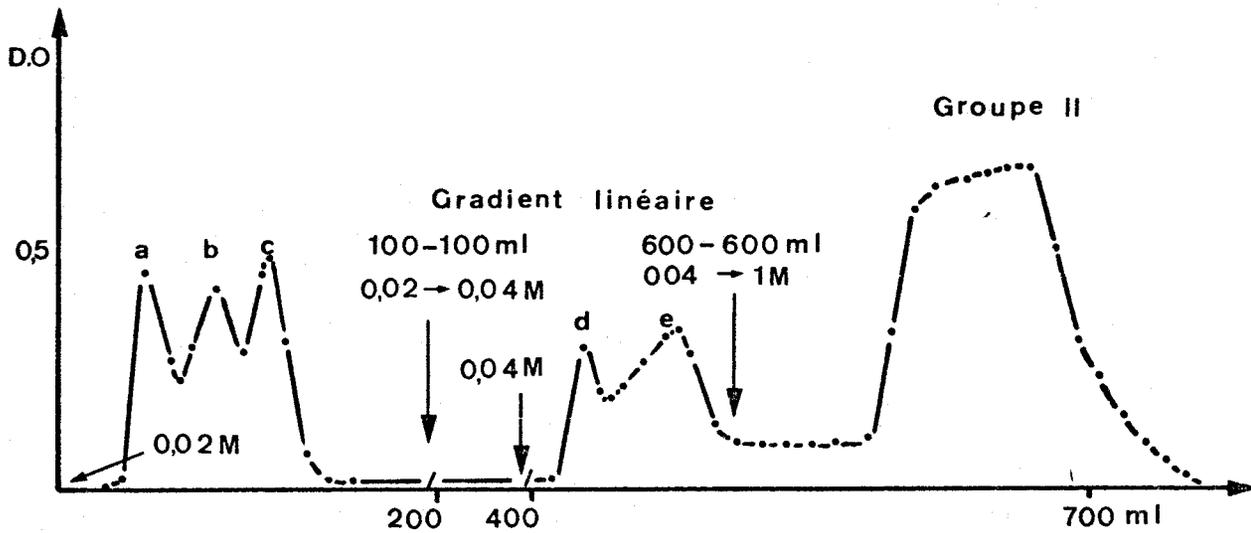
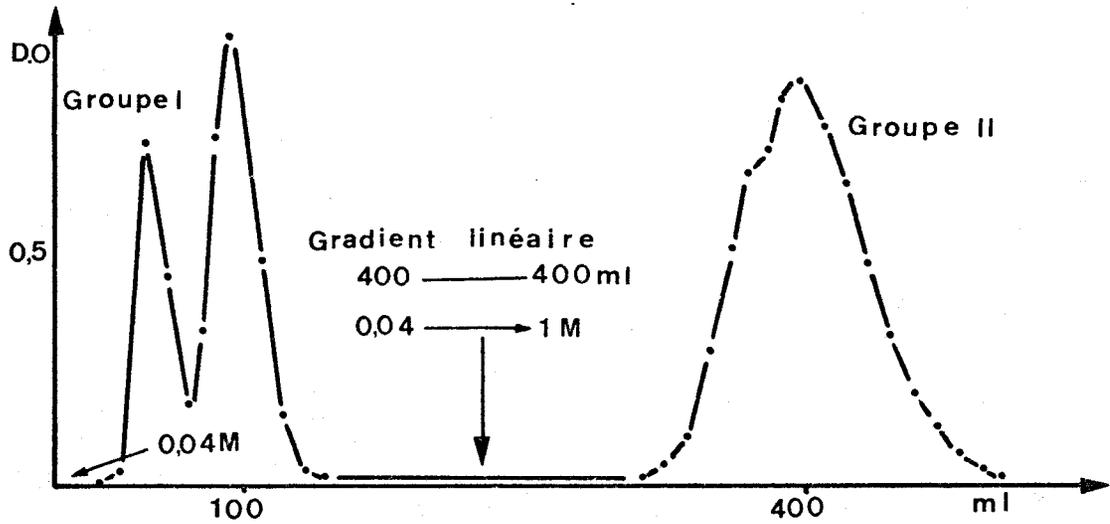


Figure 25.



Courbes d'élution du fractionnement sur SM - Sephadex C-50 de 600 mg (A) et 500 mg (B) de la fraction II (P_1) - Tampon acétate de sodium à pH 5,5 - Colonne : 3 x 40 cm - Débit : 15 ml/h Rendement : 70 %.

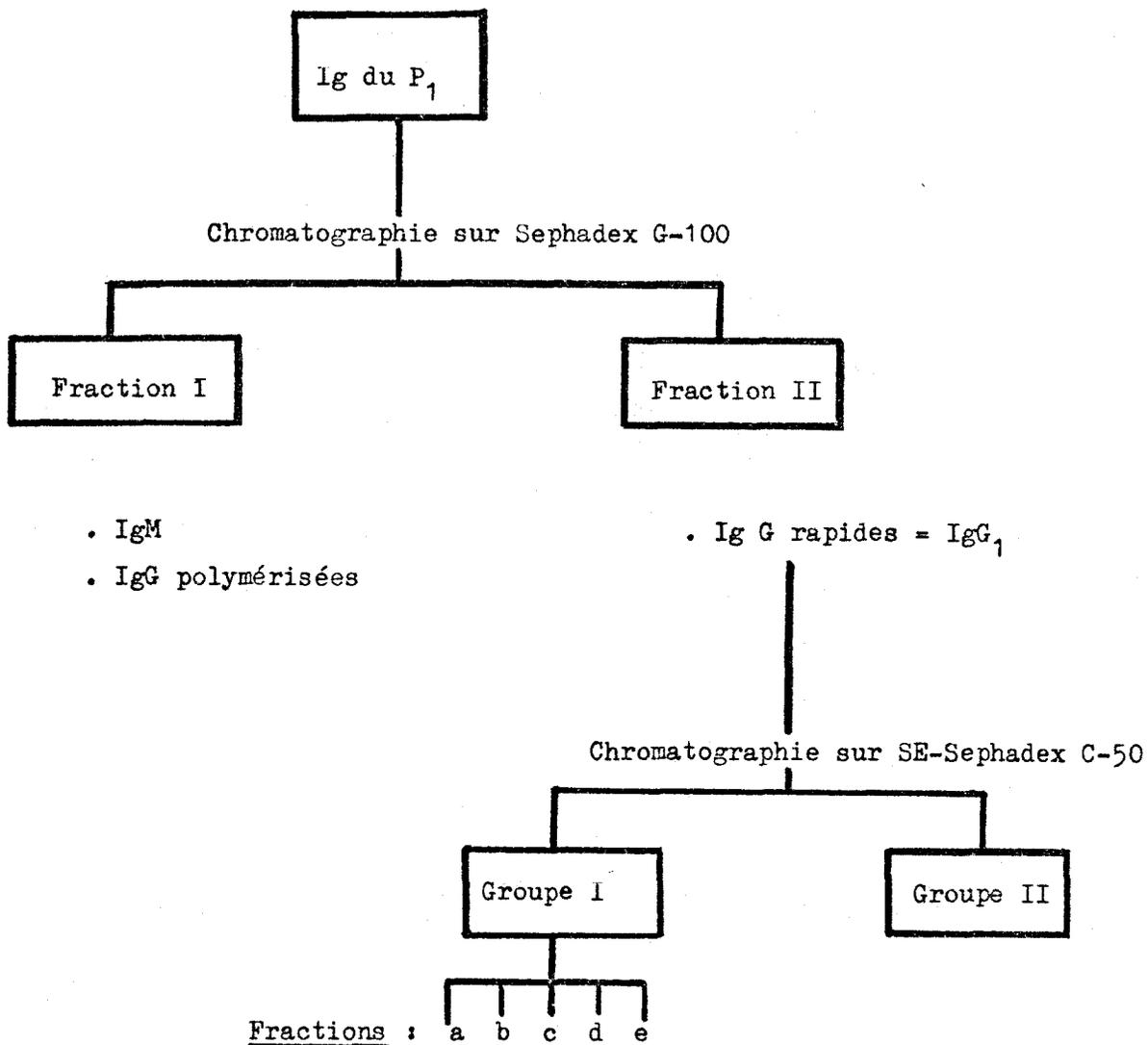


Figure 26.

Schéma de fractionnement des immunoglobulines du précipité P_1 du colostrum de Vache.



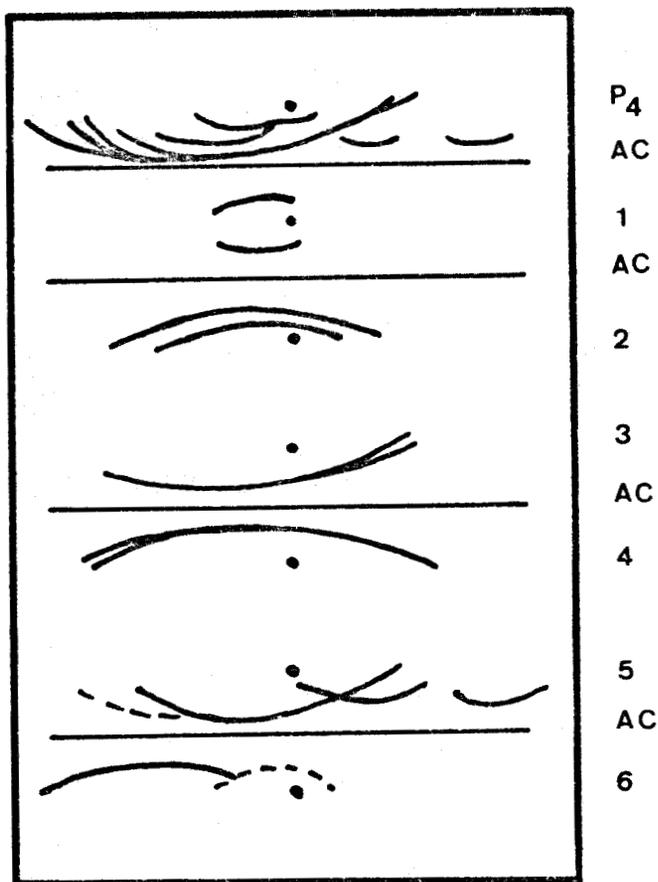
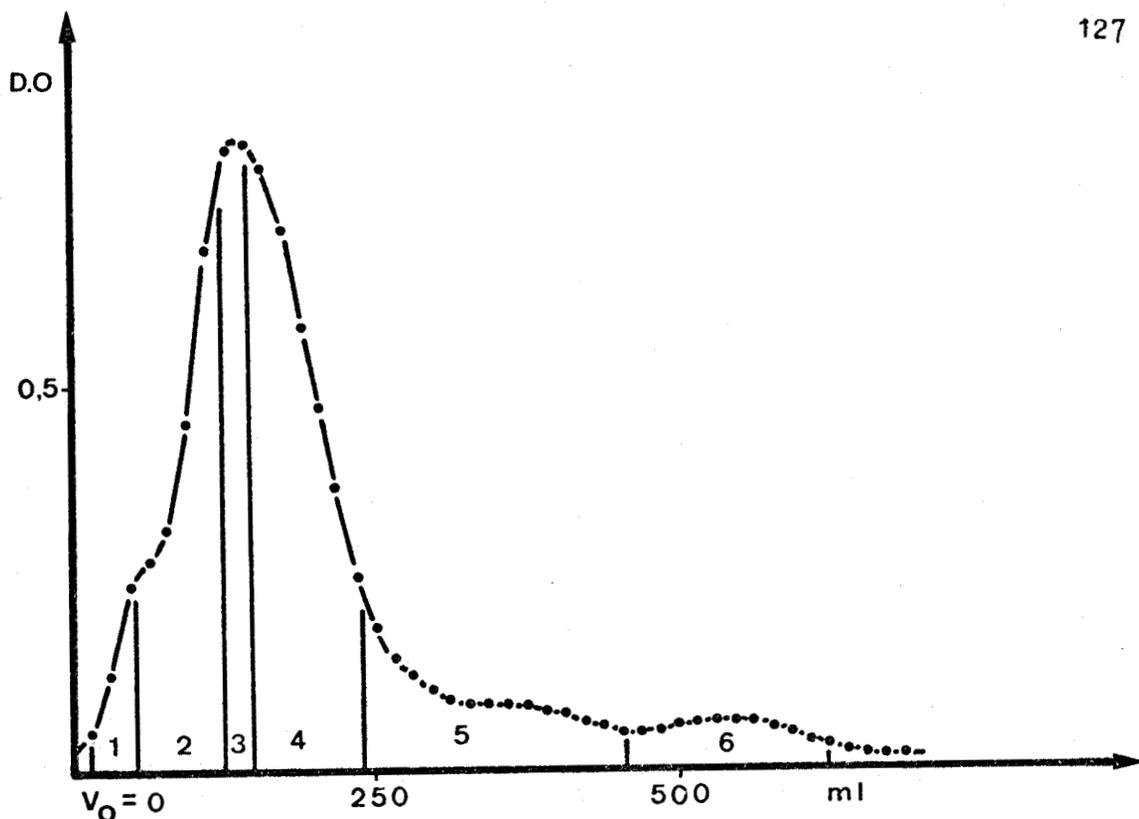


Figure 27.

Courbe d'éluion de la chromatographie sur Sephadex G-100 du précipité P₄ et schémas des immunoélectrophorèses des fractions obtenues - Colonne : 6 x 120 cm - Tampon : Tris 0,1 M ; NaCl 1 M ; pH 8 - Débit 30 ml/h - Echantillon : 1 g - A C : immunsérum de lapin anti-protéines colostrales.

b) - Chromatographie sur DEAE - Sephadex A-50.

La fraction 4 fut soumise à une chromatographie sur D E A E - Sephadex A - 50. Contrairement au précipité P₁, on obtient une fraction d'Ig G "lentes", divisée en deux sous-fractions, éluee par le tampon phosphate 0,02 M à pH 8. Le passage du tampon phosphate 0,37 M à pH 4,5 fournit une autre fraction hétérogène composée d'IgG "rapides" (Fig.28 ,p.129). L'immuno-électrophorèse révèle bien la différence de migration entre les deux sortes d' Ig G.(FAHEY et HORBETT) (77) ; (MURPHY) (199).

c) - Chromatographie sur S E - Sephadex C - 50.

Les Ig G₁, obtenus par le fractionnement sur une colonne de DEAE - Sephadex A - 50 d'une fraction du précipité P₄, furent chromatographiées sur SE - Sephadex C - 50. Comme pour le précipité P₁, on obtient deux groupes (I et II) (Fig.29 p.130). Le groupe I, constitué de trois composés, est élué par un tampon d'acétate de sodium 0,04 M à pH 5,5 et le second par un tampon de force ionique plus élevée (environ 0,37 M en acétate de sodium).

d) - Conclusions.

Le précipité P₄ contient des IgG lentes et rapides. Les IgG rapides peuvent comme celles du précipité P₁ se diviser en deux groupes hétérogènes suivant le schéma de la figure 30 (p.131). Les IgG rapides du précipité P₄ et du précipité P₁ possèdent presque le même comportement chromatographique sur SE- Sephadex C - 50. Mais l'emploi de la technique d'OUCHTERLONY (214) révèle néanmoins la présence d'un caractère antigénique supplémentaire dans les Ig G₁ du précipité P₁.

En conclusion de tous ces fractionnements, on peut affirmer que les IgG₁ représentent la fraction majeure du précipité P₄.

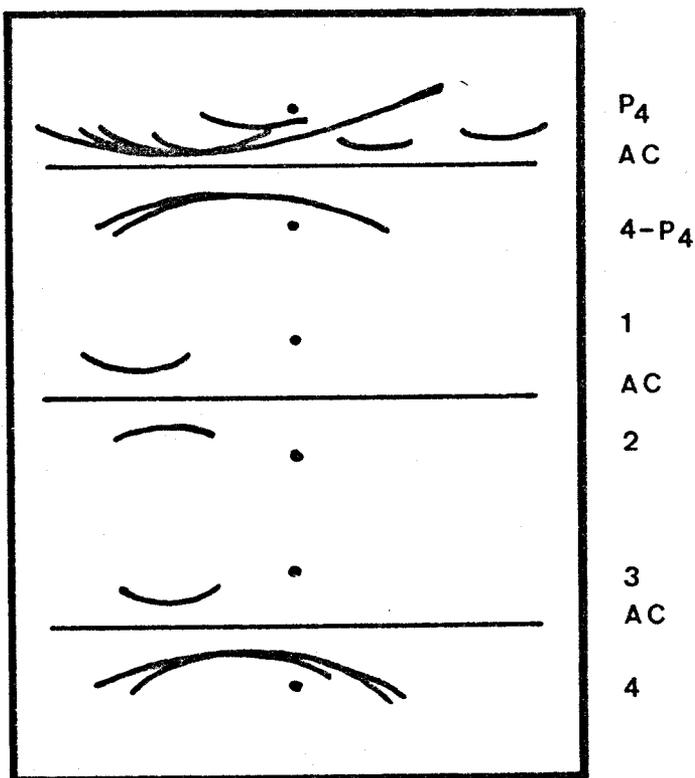
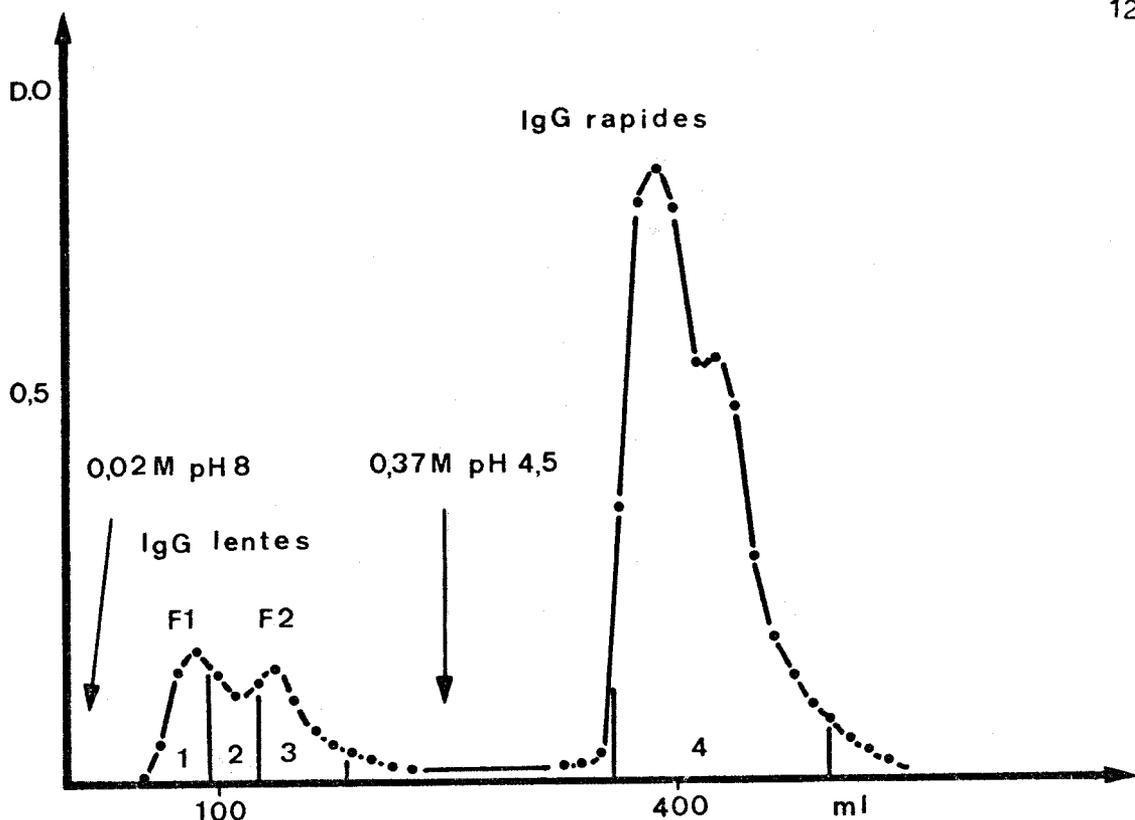


Figure 28.

Courbe d'élution de la chromatographie sur D E A E - Sephadex
 A - 50 des IgG du précipité P₄ et schémas des immunoelectrophorèses des fractions obtenues. Colonne : 3 x 20 cm - Tampon : phosphate de sodium - Débit : 15 ml/h - Echantillon : 550 mg - Rendement : 78 %.
 A C : immunsérum de lapin anti-protéines colostrales.

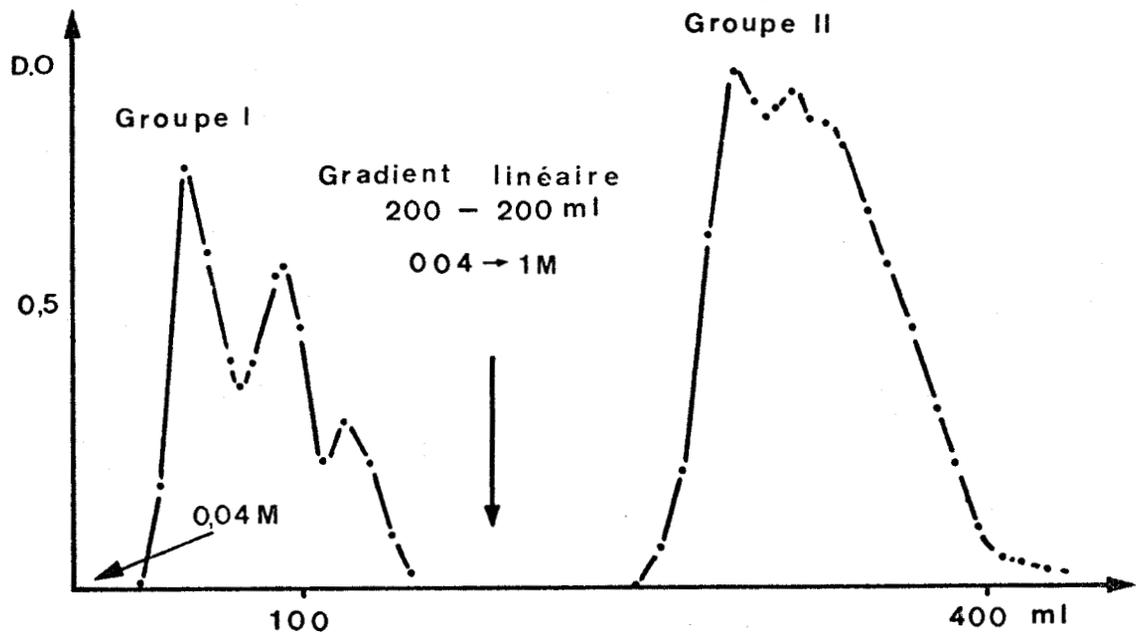


Figure 29.

Courbe d'élution de la chromatographie sur S E - Sephadex C - 50 des IgG "rapides" du précipité P₄.

Colonne : 3 x 40 cm - Tampon : acétate de sodium à pH 5,5 - Débit : 15 ml/h - Echantillon : 380 mg.



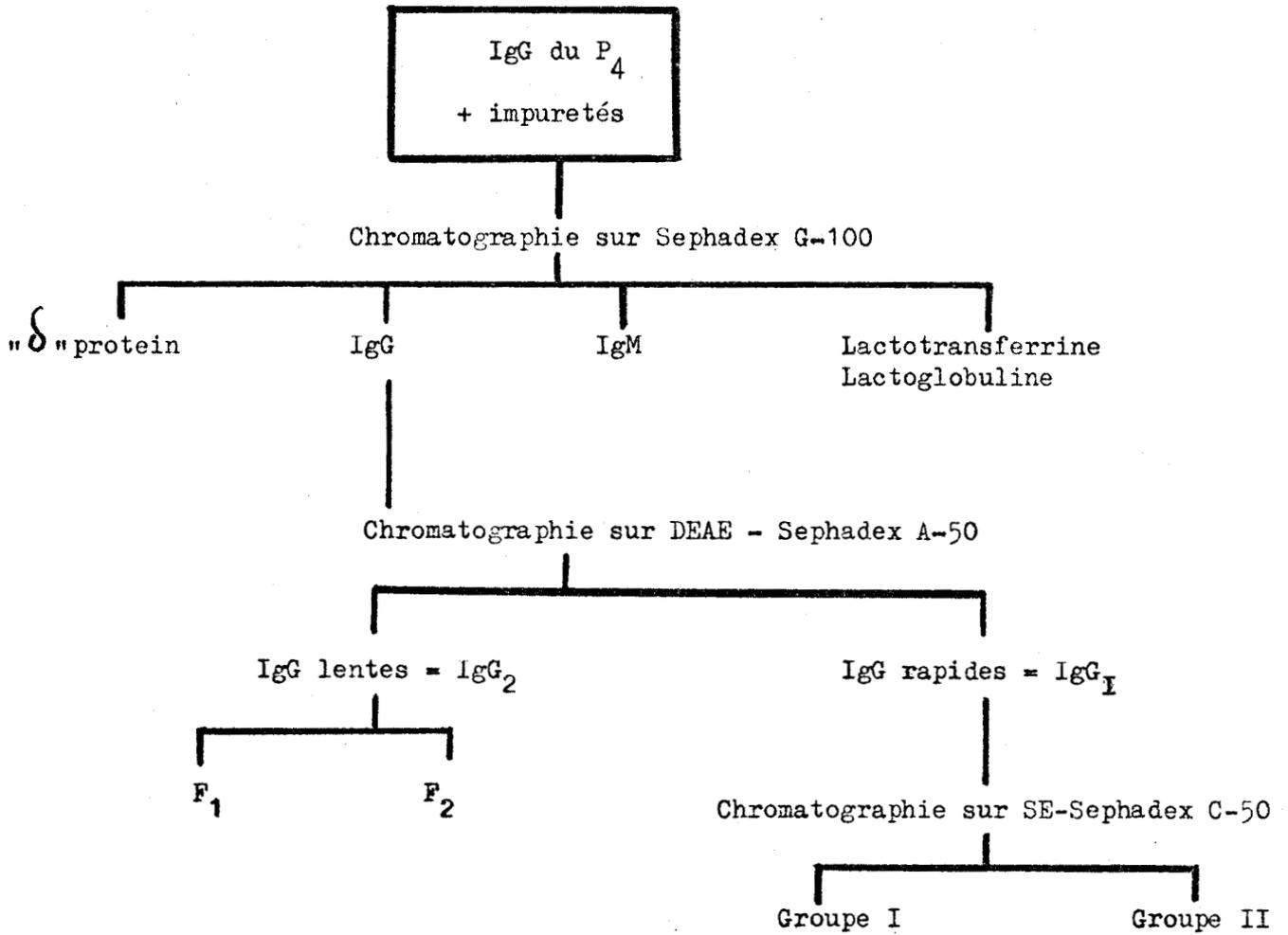


Figure 30.

Schéma de fractionnement des IgG du précipité
P₄ obtenu par le fractionnement au sulfate d'amonium.

B - ETUDE DU PRECIPITE OBTENU PAR LE FRACTIONNEMENT AU RIVANOL.

L'image immuno-électrophorétique de ce précipité P₂ est très complexe (Fig.20 , p.116). De plus, une première étude nous avait permis de montrer que cette technique au rivanol entraînait une perte importante en immunoglobulines. Aussi, avons-nous simplement voulu vérifier si le composé possédant la migration de la "Red protein" de GROVES (99) était véritablement la même protéine (*).

1.- Chromatographie sur Sephadex G 100.

Le précipité P₂ a été chromatographié sur une colonne de Sephadex G - 100. L'immuno-électrophorèse de la fraction 3 révèle la présence de ce composé ressemblant à la "Red protein" (A) (Fig.31 ,p.133).

2.- Chromatographie sur SE - Sephadex C - 50.

Une chromatographie sur une colonne de SE - Sephadex C - 50 du précipité P₂ a permis d'isoler le composé (A) dans un état de pureté satisfaisant.

L'immuno-électrophorèse de la fraction 5 (Fig. 32;p.134),réalisée avec un immunosérum anti-protéines lactées, révèle un arc bien net et une plage foue (absorption sur la gélose). Un immunosérum anti-protéines sériques ne réagit pas avec ce composé (A).

(*) - Nous remercions vivement Monsieur GROVES pour son envoi de "Red protein" reçu le 20 Mai 1965.

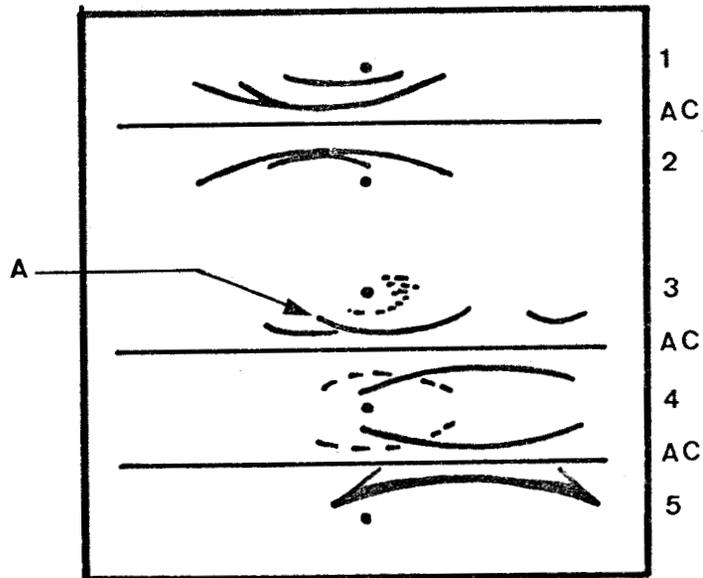
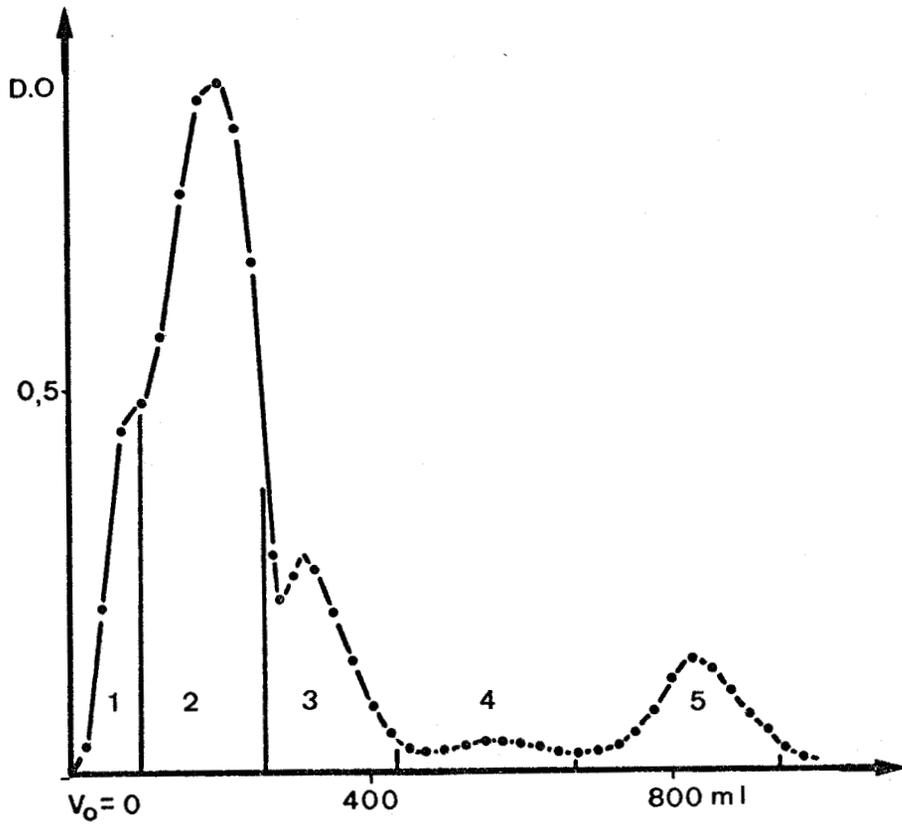


Figure 31.



Courbe d'éluion de la chromatographie sur Sephadex G-100 du précipité P_2 (Rivanol) et schémas des immunoélectrophorèses des fractions obtenues. Colonne : 6 x 120 cm - Tampon : Tris 0,1 M ; NaCl 1 M ; pH 8 - Débit : 30 ml/h - Echantillon : 1 g. A C : immunserum de lapin anti-protéines colostrales.

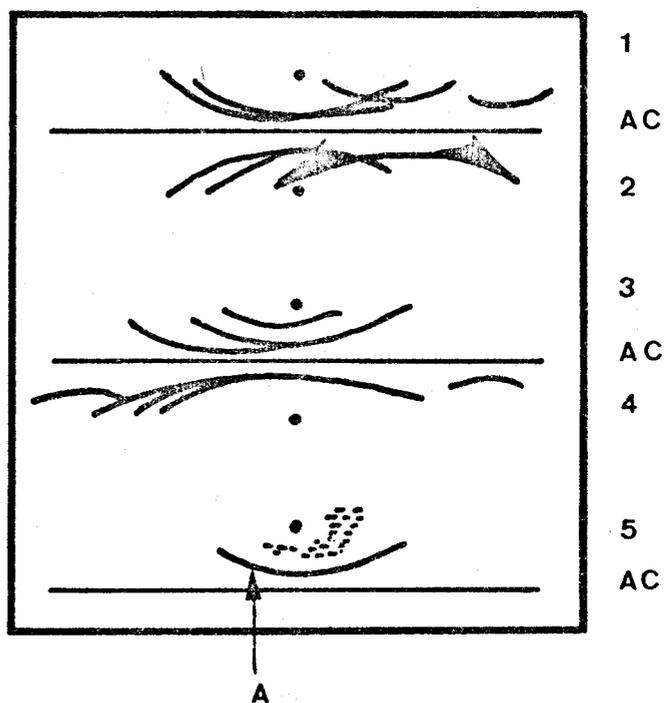
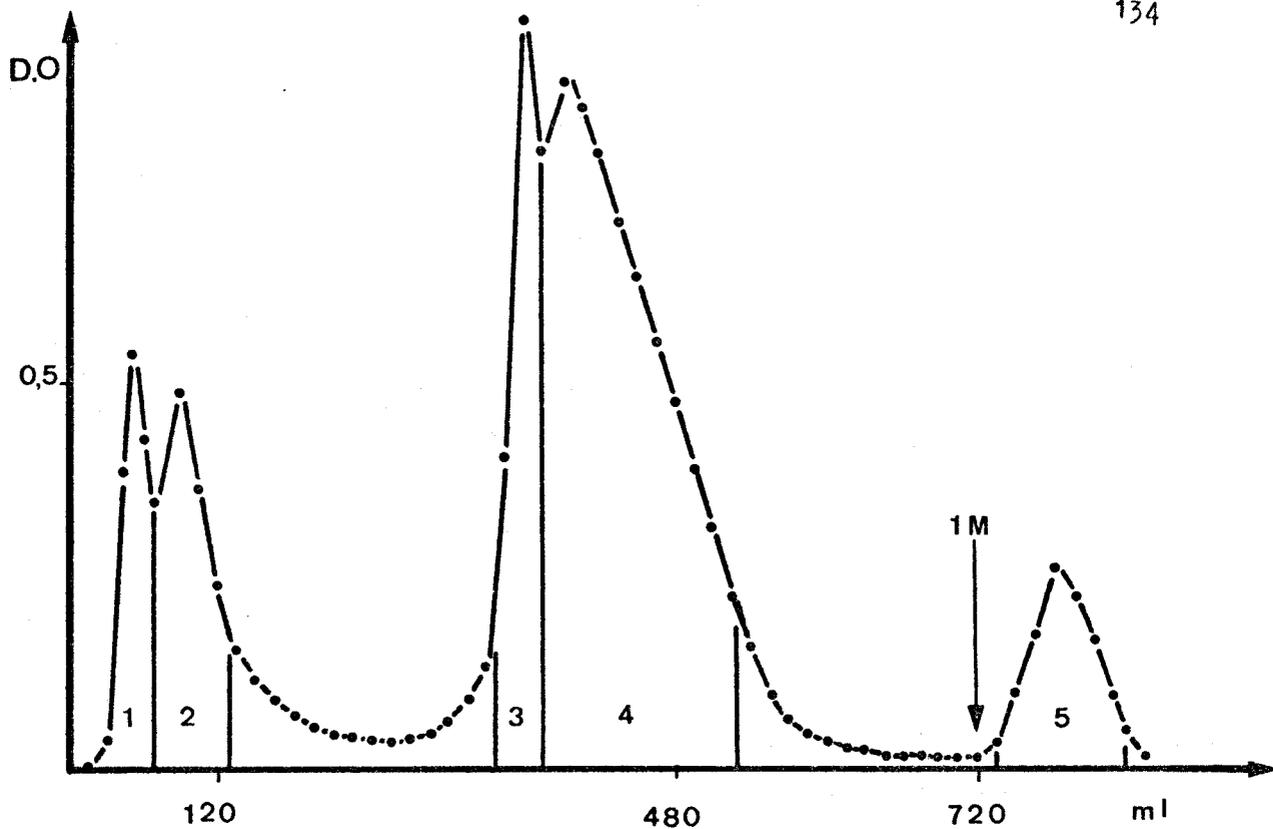


Figure 32.



Courbe d'élution de la chromatographie sur S E - Sephadex C - 50 du précipité P_2 (Rivanol) Colonne : 3 x 30 cm - Tampon : acétate de sodium à pH 5,5 ; gradient (400 - 400 ml) 0,04 à 1 M - Débit : 10 ml/h - Echantillon : 300 mg.

A C : immunsérum de lapin anti-protéines colostrales.

Par la technique d'OUCHTERLONY (214), nous avons obtenu un raccordement parfait entre la "Red peotein" et le composé (A) de couleur rose. Nous l'avons appelé "lactotransferrine" par analogie avec le lait de Femme. (MONTREUIL et al. (184)./

3.- Conclusion.

Si ce précipité P₂ n'est pas un substrat de choix pour l'isolement des immunoglobulines, il permet, par contre, l'obtention rapide de la lactotransferrine. (p. 220).

III.- CONCLUSIONS.

Nous avons tenté d'établir une relation directe entre les différents arcs présents dans les immuno-électrophorogrammes des précipités P1 et P4 (sulfate d'ammonium) et les différents groupes obtenus par des fractionnements chromatographiques de ces mêmes précipités.

Nous avons résumé dans la figure 33 (p.136) les correspondances possibles.

L'arc dénommé " δ " protéine correspond à la migration du fragment 5 S /F (ab')₂/ décrit par BUTLER et MAXWELL (37). Le composé Y que nous désignons "IgG-polymérisées" a été identifié à des IgG₂ polymérisées par ces mêmes auteurs. D'après nos résultats cette polymérisation peut s'étendre aux Ig G₁ (Fig. 23, p. 122). L'arc X correspond d'après BUTLER et MAXWELL (37) à l'emplacement des Ig A. Et des traces de cette immunoglobuline dans les Ig G₁ du précipité P₁ (sulfate d'ammonium) expliquerait le caractère antigénique supplémentaire des Ig G₁ de ce précipité par rapport aux Ig G₁ du précipité P₄ (sulfate d'ammonium).

Quant au composé Z qui n'est révélé que par un immunosérum anti-protéines sériques nous n'avons pu définir sa nature.

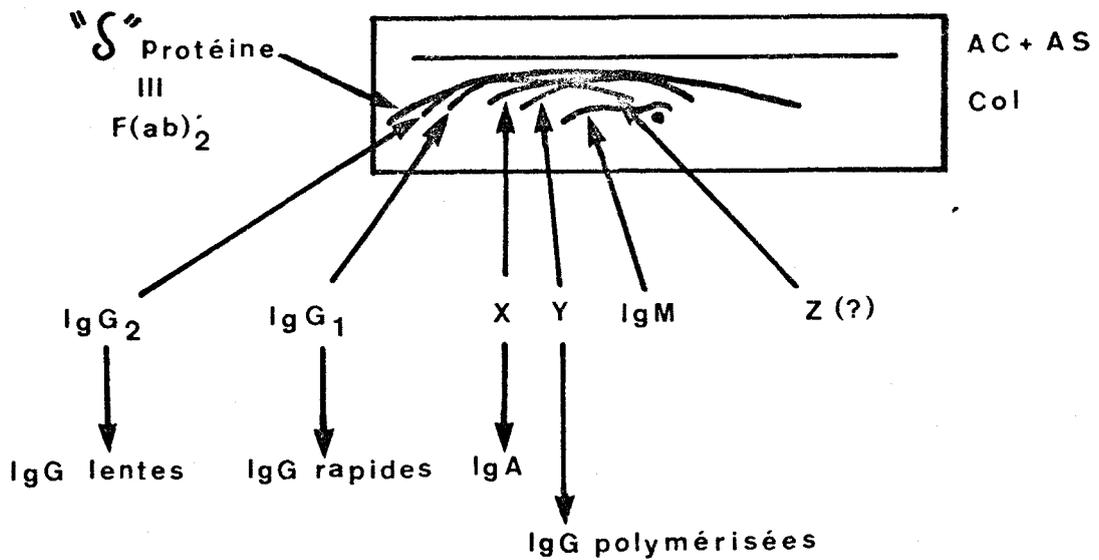


Figure 33.

Correspondance entre le colostrum et les fractions séparées par chromatographie des différents arcs présents dans les immunoélectrophorégrammes (ne figure que la fraction γ - globulinique)

Z : n'est révélé que par un immunsérum anti-protéines sériques.

A C: immunsérum de lapin anti-protéines colostrales.

A S: " " " " " " sériques.

Col: colostrum.



Les Ig G rapides totales sont analogues aux Ig G_s de KICKOFEN et al. (128). Les Ig G lentes du précipité P₄ (sulfate d'ammonium) divisées en fractions 1 et 2 ressemblent au Ig G de type γ 2 et γ 1 obtenues par ces mêmes auteurs à partir d'un sérum de Boeuf.

Nos divers fractionnements confirment que le colostrum de Vache contient principalement des immunoglobulines de type Ig G et plus particulièrement de mobilité électrophorétique Ig G₁.

Nous avons dosé les glucides des Ig G₁ purifiées sur D E A E - Sephadex à partir des précipités P₁ et P₄ (sulfate d'ammonium) (Tableau XVIII. p. 138). Ces deux types d'Ig G₁ se différencient légèrement par leur taux en acides sialiques et leurs rapports molaires en oses neutres. Mais ces variations ne sont pas significatives pour parler véritablement de deux familles différentes d' Ig G₁.

Ces mêmes dosages centésimaux ont été effectués sur les sous-fractions d'Ig G₁ obtenues par chromatographie sur colonne de S E -Sephadex des Ig G₁ du précipité P₁ (sulfate d'ammonium). Mais les pourcentages en oses neutres, basiques et acides étaient identiques à ceux des Ig G₁ totales. Ceci nous incita à entreprendre immédiatement les études structurales sur les fractions glycaniques de l'ensemble des IgG₁ du précipité P₁ : l'hétérogénéité chromatographique étant due, semble-t-il, aux parties variables des chaînes H et L.

T A B L E A U XVIII

Compositions centésimale et molaire des IgG₁

des précipités P₁ et P₄ /SO₄(NH₄)₂/

obtenues après chromatographie sur DEAE-Sephadex.

Osés	Composition centésimale		Rapports molaires	
	P ₁	P ₄	P ₁	P ₄
Osés neutres	1,32 à 1,53	1,28	-	-
Gal	-	-	2,1 (a)	2 (b)
Man	-	-	3 (a)	3 (b)
Fuc	-	-	0,6 (a)	0,5 (b)
Glc NAc	1,1 à 1,2	1,13	3,4	4
Acides sialiques	0,45 à 0,50	0,62	0,8	1,5

(a) - selon le mode opératoire de MONTREUIL et al. (190)

(b) - selon le procédé de SWEELEY et al. (268)



: LOCALISATION DES GLUCIDES :
: SUR LES CHAINES H. :

Nous nous sommes limité à déterminer si véritablement les glycanes n'étaient localisés que sur les chaînes H. En effet, NIEDERMEIER et al. (206) ont étudié les Ig G de diverses origines y compris celles du sérum de Boeuf. D'après ces auteurs, les polysaccharides seraient répartis sur les chaînes H et L. (Tableau XIX, p.140).

Pour répondre à cette question, il fallait préparer des chaînes L en quantité importante pour doser les polysaccharides dans des conditions satisfaisantes. Nous avons utilisé deux techniques, la première (protocole n°1 - p.85) est la technique devenue classique décrite par FLEISCHMAN et al. (79), la seconde (protocole n°2 - p.86) a l'avantage de séparer les chaînes H et L avant de bloquer les groupements thiols /GRANT et al. (94)/.

I.- ISOLEMENT DES CHAINES L.

A - ISOLEMENT DES CHAINES SELON LA TECHNIQUE DE FLEISCHMAN et al. (79).

Le protocole expérimental (N°1) a été décrit à la page 85. Il se résume en trois étapes : réduction des ponts disulfures, blocage des groupements thiols et tamisage moléculaire. La figure 34 (p.141) représente la courbe d'élution de la colonne de Sephadex G-100. Trois composés ont été

T A B L E A U X I X .

Compositions centésimale et molaire des IgG du
sérum de Boeuf /d'après NIEDERMEIER et al.(206)/

Uses	Composition centésimale		Composition molaire	
	Chaîne H	Chaîne L	Chaîne H(a)	Chaîne L (b)
Fuc	0,19	0,05	0,6	0,06
Man	0,85	0,28	2,4	0,3
Gal	0,35	0,22	1	0,2
GlcNA _c	0,96	0,33	2,7	0,4
Acides sialiques	0,10	0,08	0,2	0,05

(a) - pour une masse moléculaire de 50 000

(b) - pour une masse moléculaire de 20 000



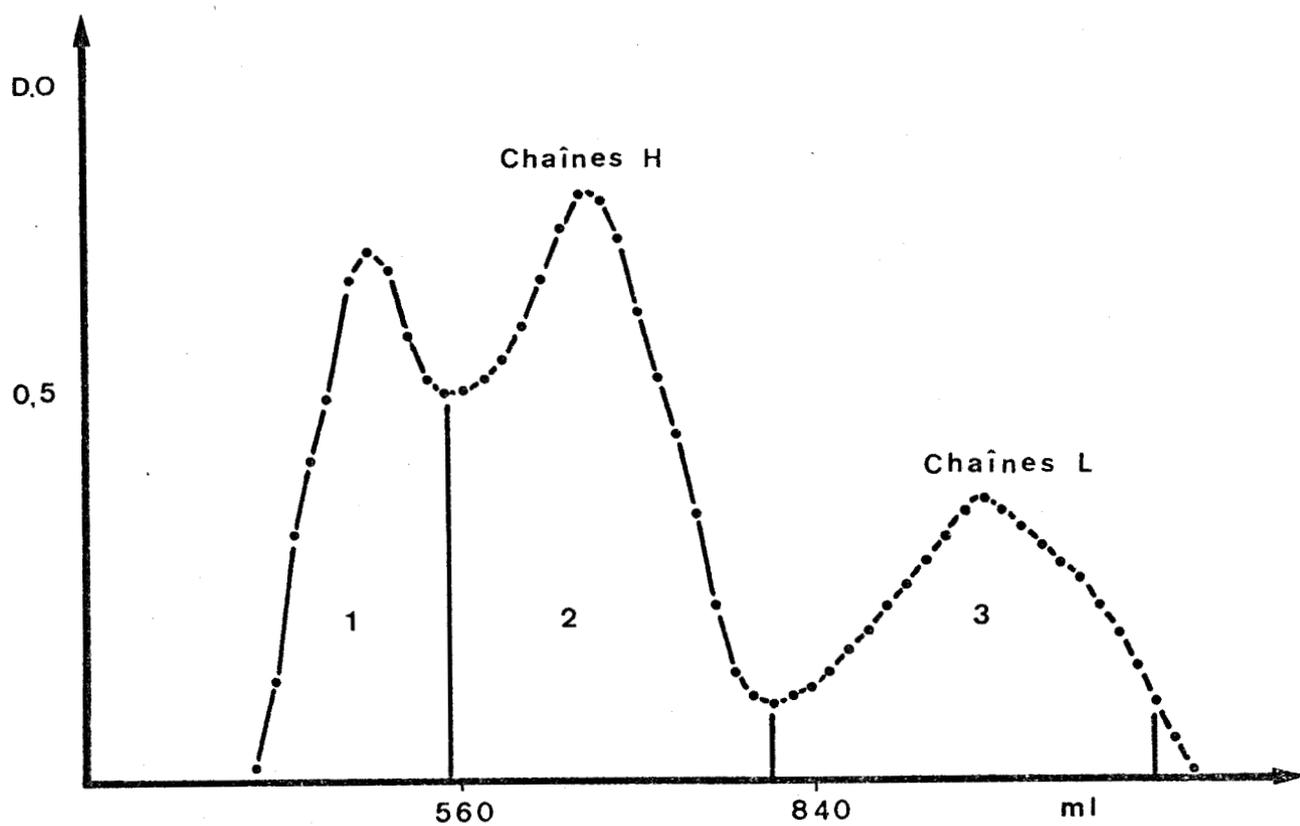


Figure 34.

Courbe d'élution de la chromatographie sur Sephadex G - 100
des chaînes H et L selon le procédé de FLEISCHMAN et al. (79)
Colonne : 4 x 120 cm - Eluant : acide propionique N - Débit 14 ml/h.

séparés. La fraction n°3 est constituée de chaîne L, la fraction n°2 de chaînes H et la fraction n°1 d'un mélange de chaînes partiellement séparées (H - H ; H - H - L et H - L) d'après ASKONAS et WILLIAMSON (8). Les trois fractions ont été repérées en lumière U.V. et par le réactif au phénol-sulfurique de DUBOIS et al. (67). Seuls les fractions n°1 et n°2 donnaient une réaction positive avec ce réactif

B - ISOLEMENT DES CHAINES SELON LA TECHNIQUE DE GRANT et al. (94).

Contrairement au mode opératoire précédent dans le protocole n°2 décrit page 86 l'ordre des étapes est inversé : le blocage des groupements thiols a lieu après l'isolement des chaînes L. Nous avons reporté dans la figure 35 (p.143) le profil d'éluion de la chromatographie sur Bio-gel P 150 du mélange des chaînes H et L réduites. Comme précédemment trois fractions sont séparées, elles sont composées respectivement de :

- fraction n° 1 : Ig G₁ incomplètement réduites
- fraction n° 2 : Chaînes H
- fraction n° 3 : Chaînes L.

II.- ELECTROPHORESE EN GEL D'AMIDON.

Nous avons soumis à l'électrophorèse en gel d'amidon les chaînes L obtenues par les deux techniques pour s'assurer de l'efficacité de la deuxième méthode. Deux types d'électrophorèse ont été réalisés, l'un à pH acide pour séparer les chaînes L des chaînes H et l'autre, à pH basique pour fractionner les chaînes L. Les diagrammes de ces électrophorèses sont reportés dans la figure 36 (p. 144). D'après ces résultats la technique de FLEISCHMAN et al. (79) peut être remplacée sans risque par celle de GRANT et al. (94).

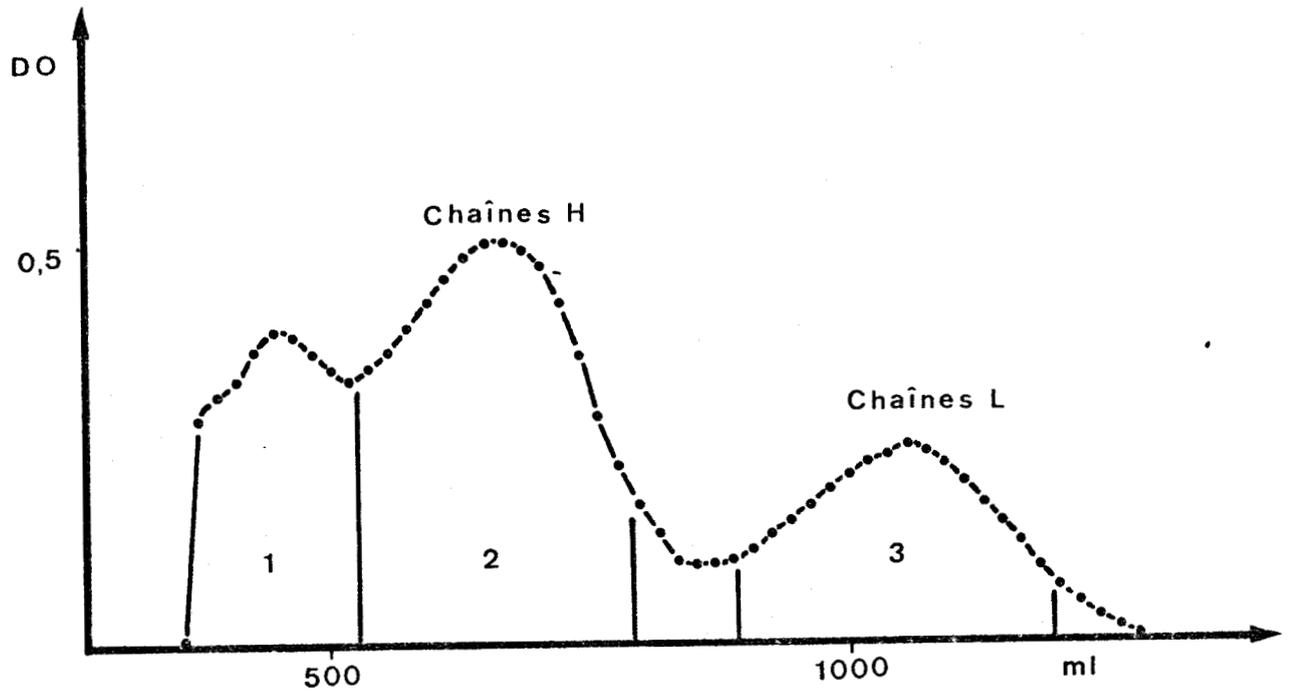


Figure 35.

Courbe d'élution de la chromatographie sur Bio-gel P - 150
des chaînes H et L selon le protocole de GRANT et al. (94)

Colonne : 5 x 100 cm - Eluant : acide formique 0,1 N - Débit :
30 ml/h.



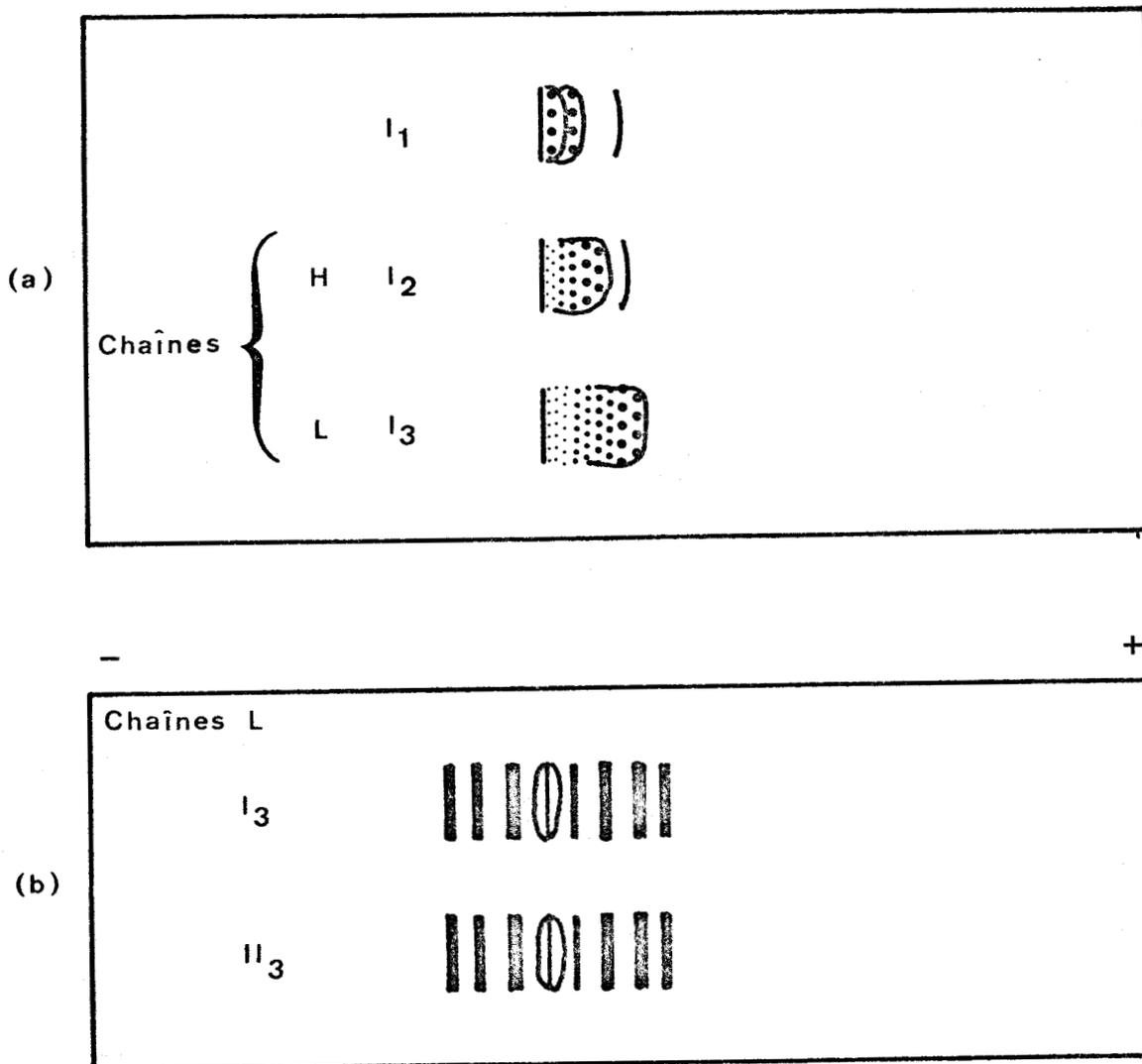


Figure 36.

Schémas des électrophorégrammes des électrophorèses sur gel d'amidon.

(a) - à pH acide - séparation des chaînes H et L.

(b) - à pH basique - fractionnement des chaînes L.

I₁ ; I₂ ; I₃ (voir figure 34 p.141) II₃ (voir figure 35 p.143)



III.- CONCLUSION.

Nous avons entrepris cette étude critique des deux méthodes de fractionnement des chaînes H et L car la technique de FLEISCHMAN et al. (79) contient une étape difficile : la chromatographie de tamisage moléculaire dans l'acide propionique. Après trois chromatographies nos colonnes ne possédaient aucun pouvoir séparateur alors que l'isolement des chaînes L avant le blocage des groupements thiols ne perturbait pratiquement pas ce même pouvoir séparateur.

Nous avons dosé les glucides dans les chaînes L par les techniques colorimétriques classiques décrites à la page 76. La composition centésimale en glucides est la suivante : oses neutres : 0,38 %; osamines : 0,43 % et acides sialiques : 0,12 %. Mais les disproportions entre les polysaccharides et la protéine sont si importantes que les colorations obtenues lors des dosages ne possèdent pas un spectre normal. Aussi nous sommes très réservés quant à affirmer l'existence de polysaccharides dans les chaînes L des Ig G₁ du colostrum de Vache. D'autant plus que lors de l'isolement des chaînes L nous n'avons pu mettre en évidence d'oses neutres par la technique de DUBOIS et al. (67).

D'après les résultats de NIEDERMEIER et al. (206), toutes les chaînes L ne possèdent pas de groupements glycaniques. Et, si véritablement, ceux-ci existaient, il n'y aurait que 10 % de chaînes L à contenir des polysaccharides. Or, si on compare les rapports molaires des monosaccharides (Tableau XIX, p. 140) déterminés par ces auteurs avec ceux des glycanes dont nous avons déterminé la structure (Fig. 50, p. 216) on est surpris de constater qu'ils sont identiques. Et l'hypothèse, émise d'ailleurs par NIEDERMEIER et al. (206) eux-mêmes, d'après laquelle les chaînes L pourraient être souillées par des fractions peptidiques semblables au fragment Fc semble d'après nos études structurales se confirmer. Par conséquent, à notre avis, les chaînes L des Ig G₁ du colostrum de Vache ne contiennent pas de polysaccharides.

: : : : : : : : : :
 : ETUDE DES MODALITES DE LA :
 : LIAISON ENTRE LA PROTEINE ET :
 : : : : : : : : : :
 : LES GLYCANNES DANS LES IgG1. :
 : : : : : : : : : :

Au début de notre travail, l'idée d'entreprendre l'étude du point d'attache protéine-glycane d'un mélange aussi complexe de protéines nous semblait voué à l'échec. C'était l'une des raisons qui nous avaient orienté vers les essais de fractionnement de ce groupe d'Ig G1. Or, les études structurales entreprises par plusieurs auteurs sur les immunoglobulines humaines (myélomateuses) faisaient ressortir le fait que toute chaîne H ou L possédait une séquence peptidique C -terminale constante et une autre N -terminale variable et que les polysaccharides se trouvaient liés à la fraction C -terminale des chaînes lourdes (H) /voir les revues générales de COHEN et MILSTEIN (53); STANWORTH et PARDOE (265); LENNOX et COHN (149); PERY (220) et MIHAESCO (180)/.

Le mode de liaison des groupements glycaniques devait , en principe, être identique dans tout le groupe des IgG1 du colostrum de Vache. Notre hypothèse de travail revenait à admettre que nous étions en présence d'un groupe complexe de protéines qui pouvaient être assimilées à un composé unique et homogène.

Pour aborder cette étude, nous avons hydrolysé les Ig G1 par la pronase, mélange d'enzymes qui possède une spécificité de coupure très large. Notre choix fut guidé par le fait qu'il nous fallait obtenir des glycopeptides possédant une chaîne peptidique très courte et, si possible, des glyco-amino-acides.

Nous envisagerons donc successivement les problèmes suivants :

- 1.- Isolement et composition des glycopeptides.
- 2.- Détermination des modalités des liaisons protéine-glycane.

I.- ISOLEMENT ET COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES.

Nous avons hydrolysé les précipités P1 obtenus à partir du fractionnement par le sulfate d'ammonium du colostrum de Vache. Ceux-ci étaient soumis aux critères de pureté électrophorétique et immuno-électrophorétique. Nous avons choisi les précipités exempts d'IgM. Notre matériel n'était constitué, de ce fait, que d'IgG rapides (Ig G1). Les compositions centesimale et molaire des différents oses constituant les groupements glycaniques ont été rapportées dans le tableau XX (p.148).

A - ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES.

L'hydrolysât pronasique des IgG₁ fournit après plusieurs étapes de purification une "fraction glycopeptidique III" (voir le schéma de purification - Fig. 37 ; p.149). Nous avons rassemblé, dans le tableau XXI (p.150) les rendements obtenus pour les fractions glycopeptidiques II et III.

B - COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES.

Les compositions centésimales comparées en oses des fractions glycopeptidiques II et III montre un léger enrichissement en glycopeptides -(Tableau XXII , p. 150)

L'analyse, effectuée à l'auto-analyseur Technicon, de la fraction glycopeptidique III, hydrolysée par l'acide chlorhydrique 5,6 N, permet de déterminer la composition molaire en acides

T A B L E A U XX.

Compositions centésimale et molaire en glucides
des IgG₁ calculée pour une masse moléculaire
de 132 600 déterminée par ANTONY. (4)

Oses	Composition centésimale	Composition molaire
Oses neutres	1,53	-
Gal	-	4,2
Man	-	6
Fuc	-	1,4
GlcNAc	1,2	8 (a)
Acides sialiques	0,5	2 (a)

(a) - calculés à partir de la composition centésimale.



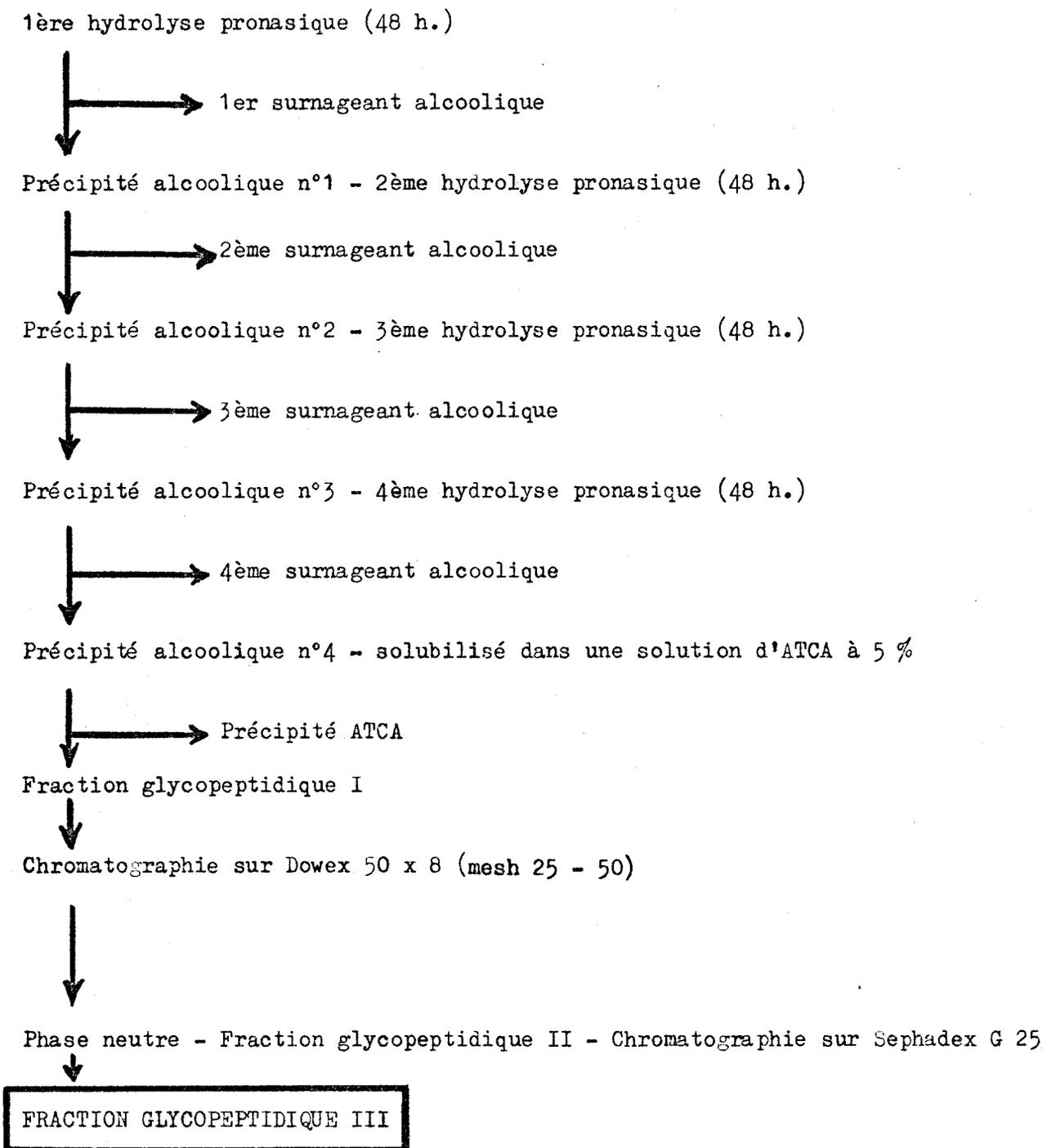


Figure 37.

Schéma de purification des hydrolysats
 pronasiques des IgG₁ et de la lactotransferrine.

T A B L E A U XXI.

Rendement des fractions glycopeptidiques II et III
à partir de 20 g d'IgG1 (voir Fig.37 ;p.149)

	Rendements
Rendement théorique en oses totaux uniquement	environ 600 mg
Fraction glycopeptidique II	553 mg
Fraction glycopeptidique III	461 mg

T A B L E A U XXII.

Compositions centésimales comparées en oses
des fractions glycopeptidiques II et III

	oses neutres	osamine:	acides sialiques
Fraction glycopeptidique II	39,8	25,3	11,3
Fraction glycopeptidique III	42,7	27,5	11,9



aminés, rapportée aux 8 résidus de N-acétyl-glucosamine présents dans la molécule native d'IgG₁.

Les rapports molaires des oses neutres ont été calculés par rapport à 3 résidus de mannose.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau XXIII (p.152).

C - DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE DES GLYCOPÉPTIDES.

Nous avons déterminé la masse moléculaire de la fraction glycopeptidique III par trois méthodes.

- 1 - la méthode de GHUYSEN (86) au fluoro-dinitrobenzène.
- 2 - en appliquant la loi de STOKES. L'ultracentrifugation a été réalisée dans un tampon phosphate de force ionique 0,1 M à pH 6,89. Le seul composé décelé possède un S_{20}^w de 0,76. Le volume spécifique partiel a été calculé d'après la composition molaire de la fraction glycopeptidique III ($V_{sp} = 0,618$).
- 3 - par tamisage moléculaire. Pour étalonner la colonne de Bio-gel P6, nous avons utilisé des glycanes branchés neutres isolés du lait de Femme par GRIMMONPREZ (96). La fraction glycopeptidique III, après chromatographie, se fractionne en deux composés : l'un contient de l'acide sialique (III A), l'autre en est dépourvu (III N.)

Les résultats sont rassemblés dans le tableau XXIV (p.153)

D - DISCUSSION - CONCLUSION.

L'hydrolyse pronasique des IgG₁ nous a permis d'isoler une fraction glycopeptidique III très purifiée.

T A B L E A U XXIII.

Rapports molaires des acides aminés et
des oses de la fraction glycopeptidique III.

Acides aminés (a)		Oses neutres (b)	
Asp	1,98	Gal	2,1
Ser	1,74	Man	3
Thr	1,21	Fuc	0,6
Glu	0,08		
Gly	0,07		
Ala	0,07		
Val	0,02		
GlcN	8		

(a) - rapportés à 8 résidus de N-acétyl-glucosamine

(b) - rapportés à 3 résidus de mannose.



T A B L E A U XXIV.

Masse moléculaire des glycopeptides des IgG₁

Méthodes	Fraction glycopeptidique III
- par dosage des NH ₂	2 800
- calculée d'après la loi de Stokes	2 550
- par tamisage moléculaire	2 800 (III A) 2 300 (III N)



Il existe quelques discordances quant aux taux des oses par rapport à ceux du substrat de départ (IgG1). La perte d'acides sialiques peut provenir de la fragilité des liaisons "sialyl" vis à vis des agents d'hydrolyse. D'autre part, nous avons toujours constaté que les oses neutres étaient dosés par excès par rapport aux osamines dans les glycopeptidides. Ce désaccord peut s'expliquer par les traces de glucose que l'on a pu mettre en évidence dans la fraction glycopeptidique III.

D'après le pourcentage des oses dans la molécule native d'IgG1 (pour une masse moléculaire de 132600 calculée par ANTONY) (4) la masse glycanique représente 4282 (oses neutres : 2028 ; osamines : 1591 et acides sialiques : 663). Les trois méthodes utilisées pour déterminer la masse moléculaire des glycopeptides bien que donnant des résultats différents démontrent l'existence de deux groupements glycaniques par molécule d'IgG1. On peut, dès à présent, en déduire la composition molaire présumée des deux groupes de glycopeptides (avec ou sans acides sialiques) (Tableau XXV , p.155). Le nombre de résidus d'acides aminés est calculé par rapport à 4 de GlcNAc, celui des oses neutres par rapport à 3 de mannose et celui des acides sialiques est déduit de la composition centésimale (nous nous sommes reporté à la composition de la fraction glycopeptidique III). La masse moléculaire calculée d'après cette composition est en accord avec la masse moléculaire déterminée expérimentalement.

Nous pouvons donc entreprendre l'étude de la liaison protéine-glycane sur la fraction glycopeptidique III totale. L'hétérogénéité des glycopeptides résulte principalement dans la variation du taux de fucose et d'acides sialiques.

II - DETERMINATION DE LA NATURE DE LA LIAISON PROTEINE-GLYCANNE.

A - REACTION D'EDMAN.

Après la réaction d'EDMAN (voir p.91) nous avons

T A B L E A U XXV.

Composition molaire de la fraction glycopeptidique III
 déduite d'après les déterminations expérimentales de la masse
 moléculaire de cette fraction.

Constituants	Asp	Ser	Thr	GlcNAc	Gal	Man	Fuc	A.S. (a)
Nbre de résidus	1	1	1	4	2,1 (2)	2,8 (3)	0,6 (1)	0-1-2
Masse	115	87	101	812	324	486	146	0-291-582

masses moléculaires des glycopeptidiques calculées :

- sans A.S. : 2071
- avec 1 résidu d'A.S. : 2362
- avec 2 résidus d'A.S. : 2653

(a) - A.S. : Acides sialiques.



isolé dans la phase aqueuse un PTH - amino- acide - glycanne - dérivé . L'hydrolyse partielle de ce dernier fournit après électrophorèse à pH 3,9 (MICHL) (179) quatre composés 1-2-3-4 (Fig. 38 ,p.157). Les spots n°1 - 2 et 3 sont révélables par le réactif des PTH - dérivés (CHERBULIEZ et al.) (50). Le composé n°1 migre au même niveau que le PTH-aspartique. Le constituant n°2 possède le R_f du PTH - aspartyl - N - acétylglucosamine et le spot n°3, celui du PTH - aspartyl - glucosamine (voir MONSIGNY) (182). Le dernier composé n'est décelable qu'au réactif à la ninhydrine. Il possède le même comportement électrophorétique que la glucosamine. Les constituants n°2 et 3 furent soumis à une électrophorèse préparative. L'électrophorèse à pH 3,9 (MICHL) (179) de ces mêmes composés après une hydrolyse acide partielle fournit le PTH - aspartique et la glucosamine. L'acide aspartique des constituants n° 2 et 3 fut régénéré par action de la soude (p. 91). Il fut mis en évidence par une électrophorèse à pH 3,9.

B - HYDROLYSE PARTIELLE DE LA FRACTION GLYCOPEPTIDIQUE III.

L'électrophorèse de la fraction glycopeptidique III après hydrolyse partielle fournit neuf spots. La fraction n°8 a été préparé en grande quantité et purifiée par une chromatographie préparative dans le système solvant de PARTRIDGE (216). Cette fraction, appelée glycopeptide IV, possède la composition rapportée dans le tableau XXVI (p.158). Ce glycopeptide IV n'est pas réducteur et il ne possède aucun ose neutre.

C - RECHERCHE DE LIAISON O - GLYCOSIDIQUE.

Nous avons fait agir la soude en présence de borohydrure de sodium sur la fraction glycopeptidique III avant et après réamidation. Avant amidation, la soude ne fait pas varier la composition peptidique. Les résultats obtenus après amidation sont rassemblés dans le tableau XXVII(p.158).

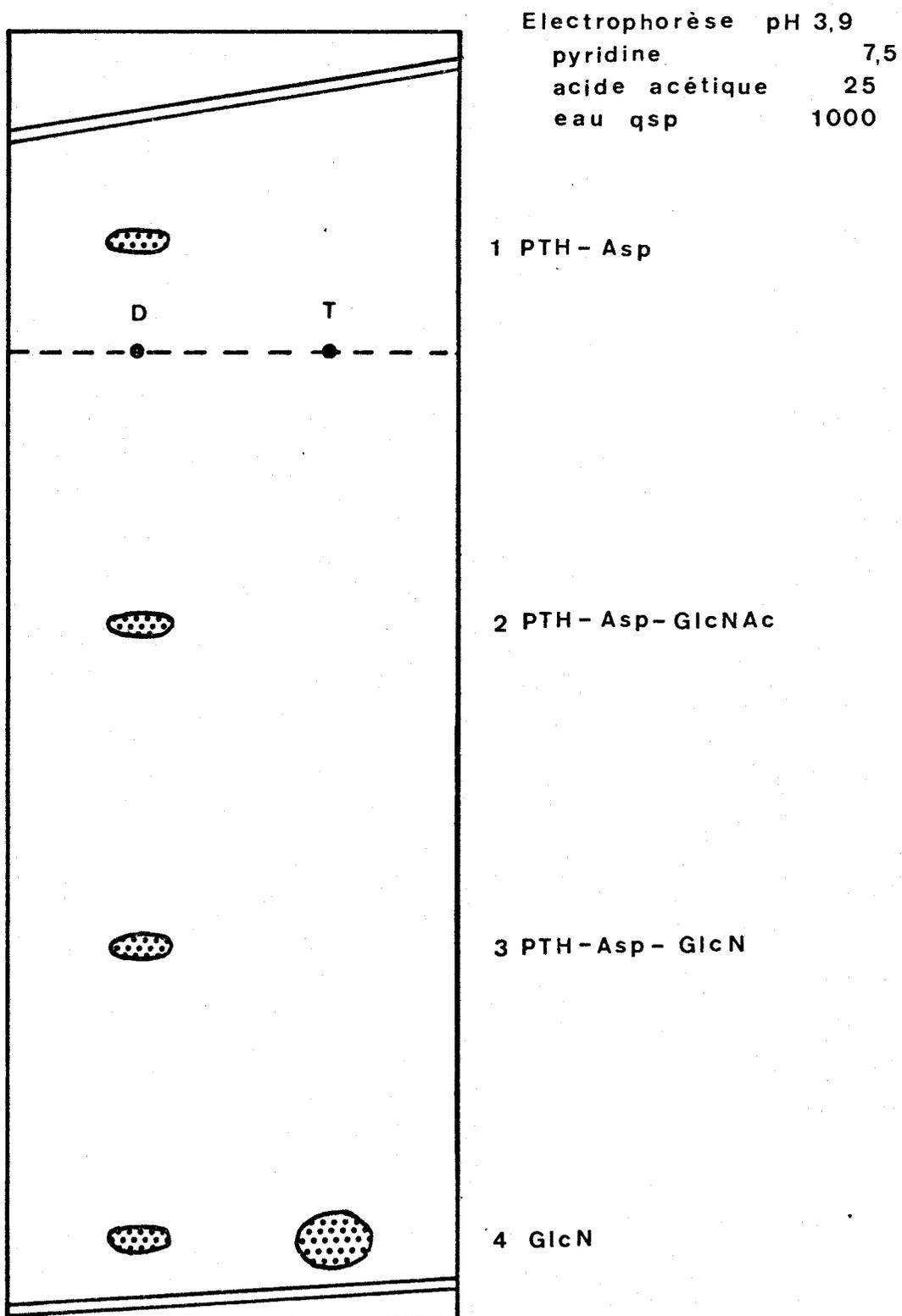


Figure 38.

Electrophorégramme du PTH - aspartique - glycane
 dérivé partiellement hydrolysé.



T A B L E A U XXVI.

Composition du glycopeptide IV dérivant de
la fraction glycopeptidique III

Constituants	Expérience 1	Expérience 2
Glc N	1	1
Asp	1	1
Ser	0,4	0,2
Gly	-	0,14

T A B L E A U XXVII.

Composition de la fraction glycopeptidique III
amidé avant et après action de la soude en présence
borohydrure de sodium.

Constituants	Fraction glycopeptidique III amidée	
	avant action de Na OH	après action de Na OH
Asp	1,88	1,91
Ser	1,64	1,63
Thr	1,08	0,98
Glc N (référ.)	8	8

BUS
LILLE

D - DISCUSSION - CONCLUSION.

Le résultat négatif obtenu après action de la soude sur la fraction glycopeptidique III amidée élimine l'existence d'une liaison O - glycosidique entre le glycanne et la sérine ou (et) la thréonine.

L'isolement du PTH - aspartyl - N - acétylglucosamine, du PTH - aspartyl - glucosamine et du glycopeptide IV (exempt d'oses neutres) implique la participation de la glucosamine et de l'acide aspartique (ou l'asparagine) dans la liaison protéine-glycanne.

L'obtention de ce PTH - aspartyl - glycanne réclame la participation du carboxyl β de l'acide aspartique dans la liaison glycanne - protéine.

Le glycopeptide IV n'était pas réducteur. Le carbone n°1 de la glucosamine participe donc à la liaison.

Cette liaison n'est pas du type ester. L'action de la soude diluée pendant des temps très courts (100° C - 5 à 10 mn) sur la fraction glycopeptidique III fournit, après passage sur résine Dowex 50 x 8, un composé identique à la fraction glycopeptidique III. Il faut admettre une liaison entre l'asparagine et la glucosamine. Cette conclusion est confirmée par l'obtention de l'asparagine en position C - terminale (voir p. 177 détermination de la séquence peptidique).

Les différents résultats obtenus permettent d'affirmer l'existence d'une liaison du type 1 - N (β - aspartyl) - 1 - 2 didésoxy - 2 - acétamido - glucosylaminique.

 : ETUDE DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE :
 : AU VOISINAGE DU POINT D'ATTACHE :
 : PROTEINE - GLYCANNE :
 : -----

Pour déterminer la séquence peptidique au voisinage du point d'attache protéine-glycane dans les Ig G1 nous les avons hydrolysées par trois enzymes : la pronase, la chymotrypsine et la trypsine. Nous avons réalisé les hydrolyses pronasiques sans modifications préalables de la fraction peptidique. Par contre, avant de faire agir la trypsine et la chymotrypsine, nous avons réduit les "ponts" disulfures et bloqué les groupements thiols par l'éthylène-imine (voir méthode p. 89). Nous avons choisi la trypsine et la chymotrypsine car ces enzymes sont connues pour leur spécificité restreinte.

Pour aborder cette étude structurale, nous examinerons successivement plusieurs problèmes :

1.- isolement et fractionnement des glycopeptides

- a - pronasiques
- b - chymotrypsiques
- c - tryptiques

2.- compositions centésimale et molaire de ces glycopeptides.

3.- et enfin, détermination de leur séquence peptidique.

I - ISOLEMENT ET FRACTIONNEMENT DES GLYCOPEPTIDES.

A.- ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES PRONASIQUES.

Les glycopeptides pronasiques ont été préparés suivant le

protocole décrit à la page 149.

B.- ISOLEMENT ET FRACTIONNEMENT DES GLYCOPEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES.

Avant d'hydrolyser les IgG1 par l' α -chymotrypsine bovine, les "ponts" disulfures étaient rompus par le 2 - mercapto-éthanol et les groupements thiols libérés, bloqués par l'éthylèneimine (voir p. 149). L'hydrolysât était chromatographié sur un gel de Sephadex G - 50 stabilisé dans une solution d'acétate d'ammonium (0,01 M) pour éliminer, d'une part, les portions des IgG1 incomplètement hydrolysées et l' α -chymotrypsine, et d'autre part, les petits peptides et les amino-acides libérés. Les fractions contenant les glycopeptides étaient rassemblées, lyophilisées puis ceux-ci étaient dessalés sur une colonne de Sephadex G - 25.

Nous avons décrit à la page 88 deux protocoles de rupture des "ponts" disulfures désignés par rupture I et rupture II. L'ensemble des glycopeptides chymotrypsiques obtenus après la chromatographie sur Sephadex G - 25 sera dénommé I C ou II C suivant les conditions de rupture des "ponts" disulfures (voir schéma de fractionnement - Fig. 39 , p. 162). Par chromatographie préparative sur papier (pendant 8 jours) (système solvant de PARTRIDGE) (216) des glycopeptides IC et II C nous avons obtenu trois fractions pour chacun d'eux : I C 1, I C 2 , I C 3 et II C1, II C2 , II C3. Une électrophorèse analytique sur papier à pH 2,4 (acide acétique N) a révélé quatre ou deux sous-fractions majeures suivant les glycopeptides (Fig. 40 , p. 163 et Fig. 41 , p. 164) . Celles-ci furent préparées en grande quantité par électrophorèse en veine liquide (voir p. 90) à pH 2,4. Elles possèdent la nomenclature suivante :

- glycopeptide I C :

I C 1 A (la plus anodique), I C 1 B, I C 1 C, I C 1 D

I C 2 A (" " "), I C 2 B

I C 3 A (" " "), I C 3 B

.../

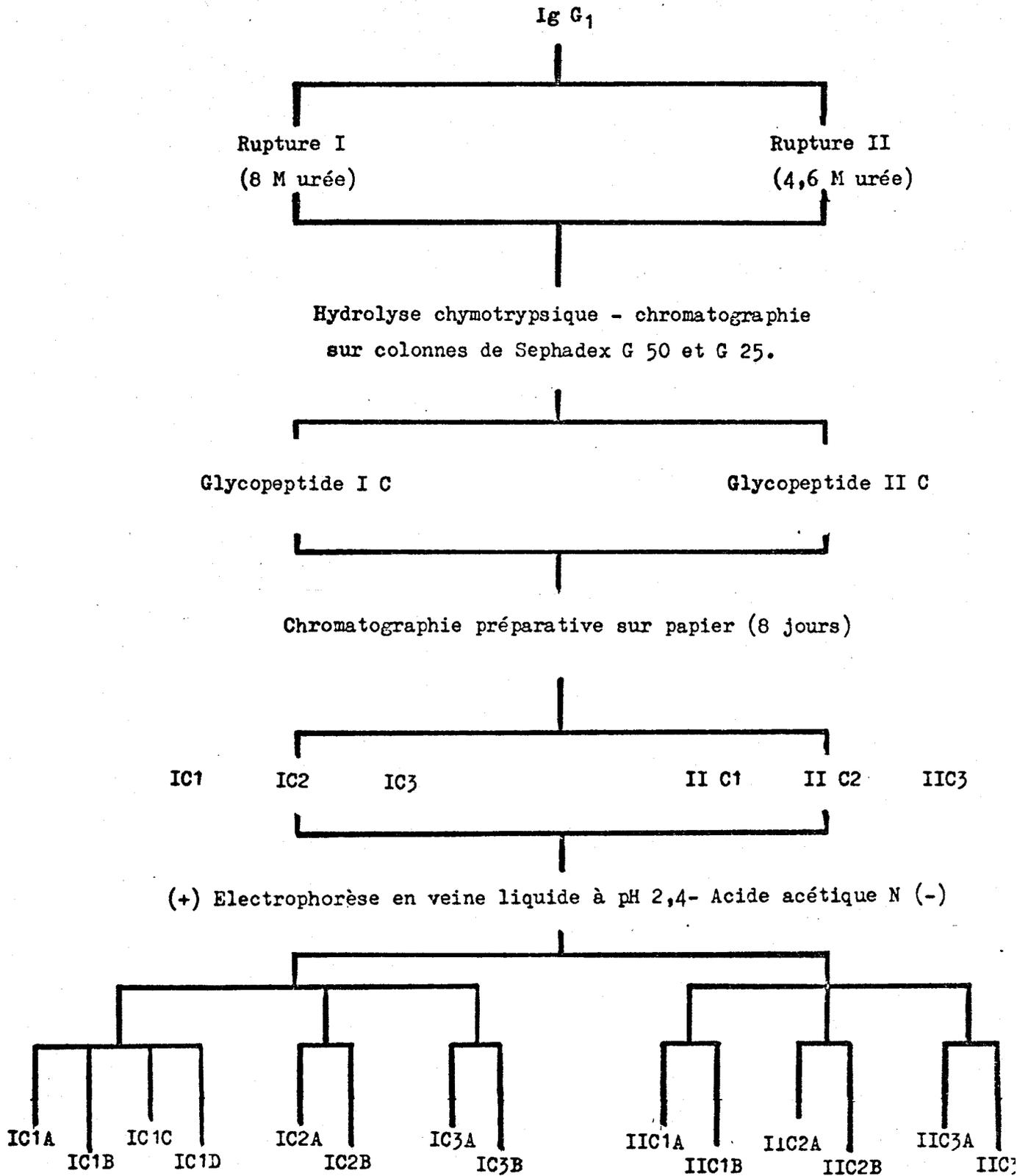


Figure 39.

Schéma de fractionnement des glycopeptides obtenus par hydrolyse chymotrypsique des Ig G₁.

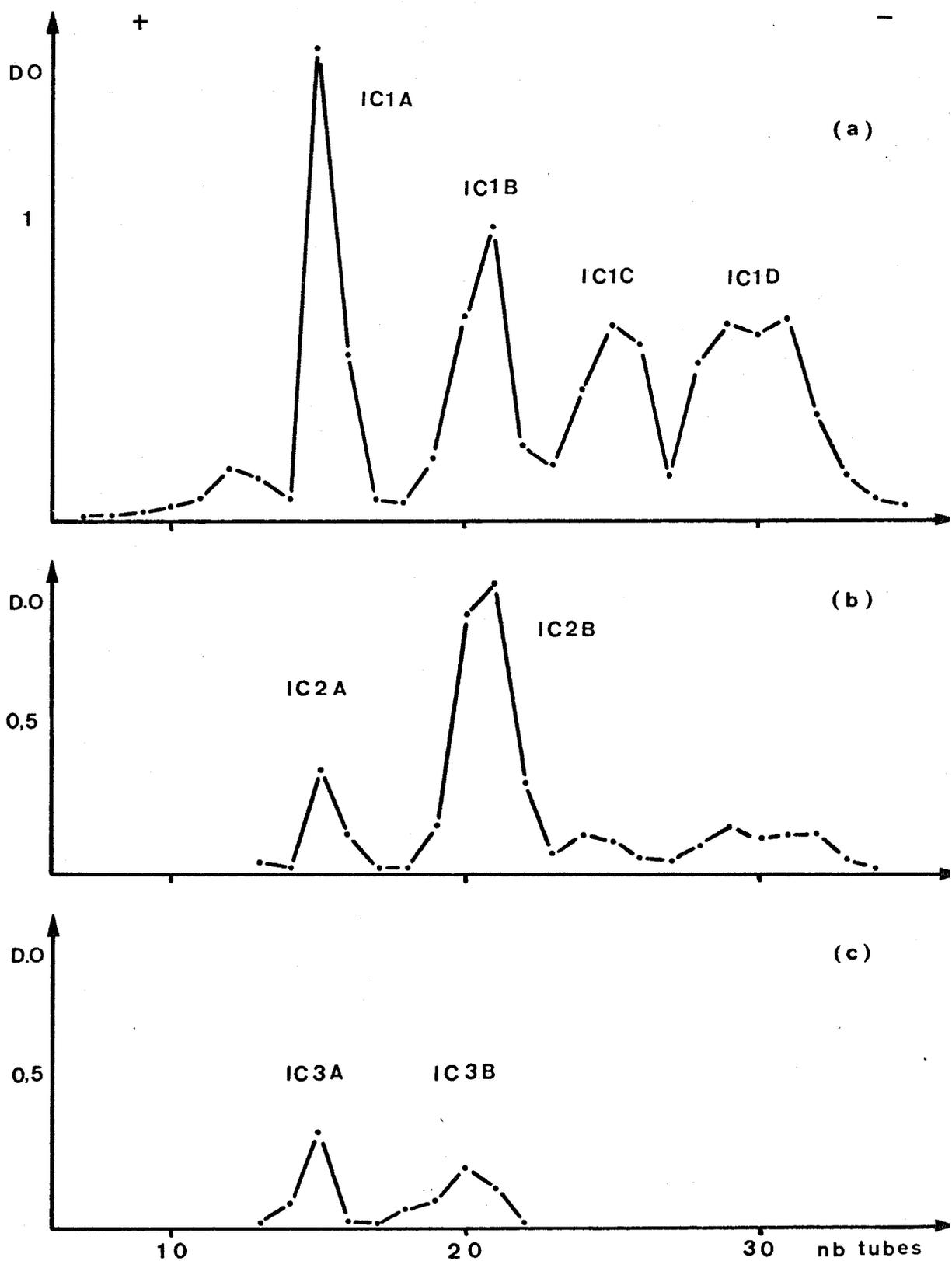


Figure 40.

BUS
LILLE

Schéma du fractionnement des glycopeptides IC 1(a) ;
IC 2(b) et IC 3 (c) par électrophorèse en veine liquide
à pH 2,4 - dosage par la méthode de DUBOIS et al. (67)

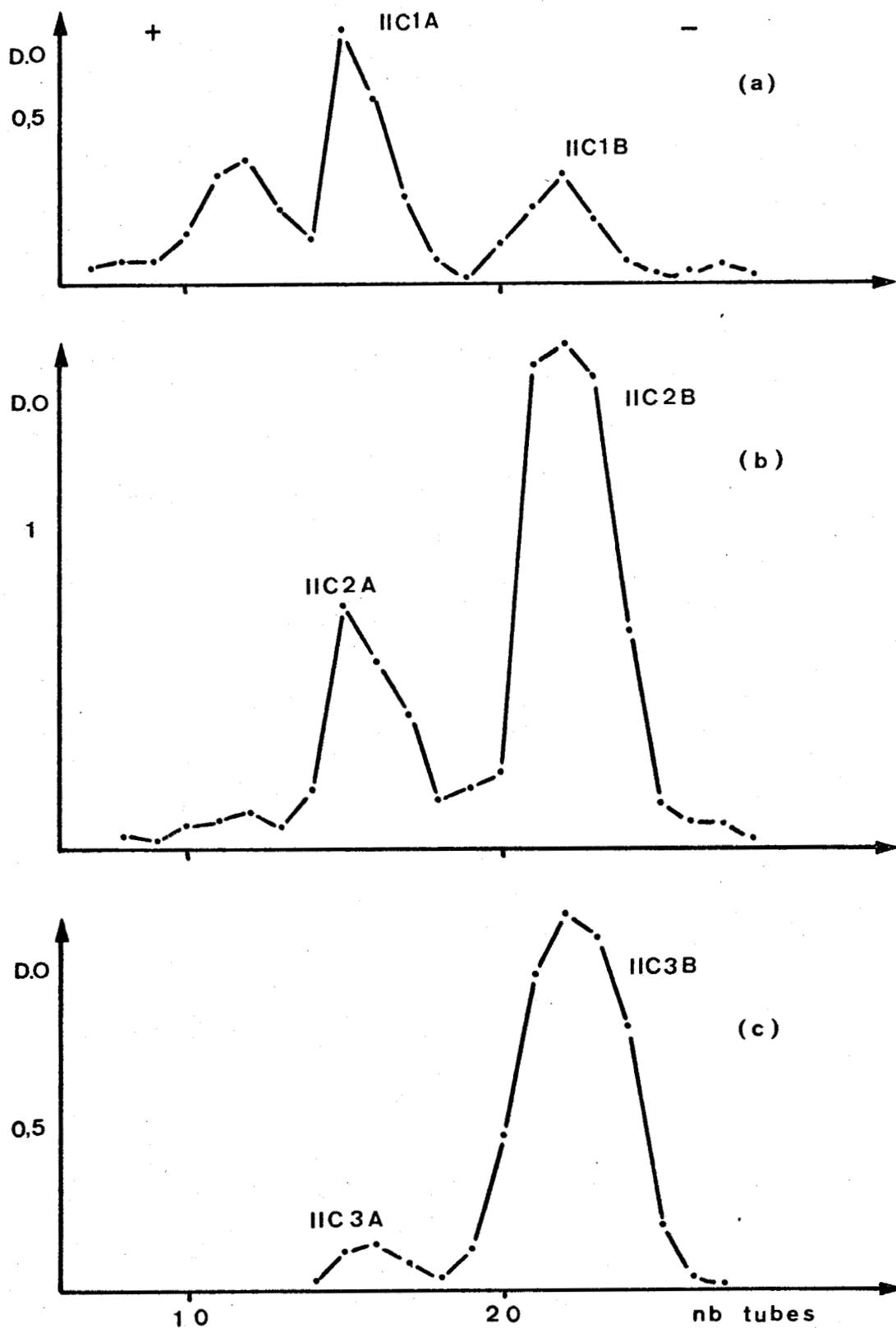


Figure 41.



Schéma du fractionnement des glycopeptides II C 1 (a) ;
 II C 2 (b) et II C 3 (c) par électrophorèse en veine liquide
 à pH 2,4 - dosage par la méthode de DUBOIS et al. (67)

- glycopeptide II C :

II C 1A (la plus anodique), II C 1B
 II C 2A (" " "), II C 2B
 II C 3A (" " "), II C 3B

Nous avons rassemblé dans le tableau XXVII (p.166) les rendements des glycopeptides suivant le type de rupture I ou II et le rapport E/S lors de l'hydrolyse enzymatique.

On peut s'apercevoir que ces rendements varient avec la nature de la rupture I ou II. Lorsque les IgG1 sont fortement dénaturées l'action de la chymotrypsine est plus profonde. L'on obtient 18 à 20 mg de glycopeptides par gramme d'Ig G1 dans le premier cas (rupture I) tandis que dans le second (rupture II) seulement 10 à 12 mg. Les glycopeptides des types C et D sont inexistantes dans le cas de la rupture II. En outre, quand le rapport E/S diminue la proportion des glycopeptides des types A et B augmente relativement à celle des types C et D. Nous pouvons poser en hypothèse que les glycopeptides A et B sont plus accessibles à l'hydrolyse que les glycopeptides C et D.

C.- ISOLEMENT ET FRACTIONNEMENT DES GLYCOPEPTIDES TRYPSIQUES.

Avant d'entreprendre l'hydrolyse des IgG1 par la trypsine (voir p. 89), les "ponts" disulfures avaient été rompus et les groupements thiols bloqués par l'éthylène-imine dans les conditions de la rupture II. Nous avons ensuite suivi le protocole utilisé lors de l'isolement et du fractionnement des glycopeptides chymotrypsiques (voir Fig. 39 , p.162). On appellera II T l'éluat de la colonne de Sephadex G.25; II T1, II T2 et II T3, les 3 fractions isolées par chromatographie sur papier et les sous-fractions obtenues à partir de ces trois dernières par électrophorèse en veine liquide (voir Fig. 42 , p.167)

T A B L E A U XXVIII.

Rendements en mg des fractions glycopeptidiques obtenues
après hydrolyse chymotrypsique des IgG1.

Type de rupture	I.			II.
Additions d'enzyme E/S				
1/50 ; 1/50 ; 1/25	+	+	-	+
1/100 ; 1/100 ; 1/50	-	-	+	-
IgG1	20 g	28,5 g	40 g	8,5 g
Glycopeptides				
I C	-	3 900	-	-
IC1	323	828	1 041	-
IC2	226	542	526	-
IC3	124	270	318	-
IC 1A	78	137	137	-
IC 1B	33	130	108	-
IC 1C	37	68	132	-
IC 1D	34	93	176	-
IC 2A	33	39	-	-
IC 2B	114	181	124	-
IC 3A	5	10	11	-
IC 3B	27	10	37	-
II C				1 285
II C1				73
II C2				118
II C3				88
II C1A				12
II C1B				5,2
II C2A				21
II C2B				42
II C3A				2
II C3B				17
Rendements par g. d'IgG1	18 mg	23,5mg	18 mg	11,7 mg

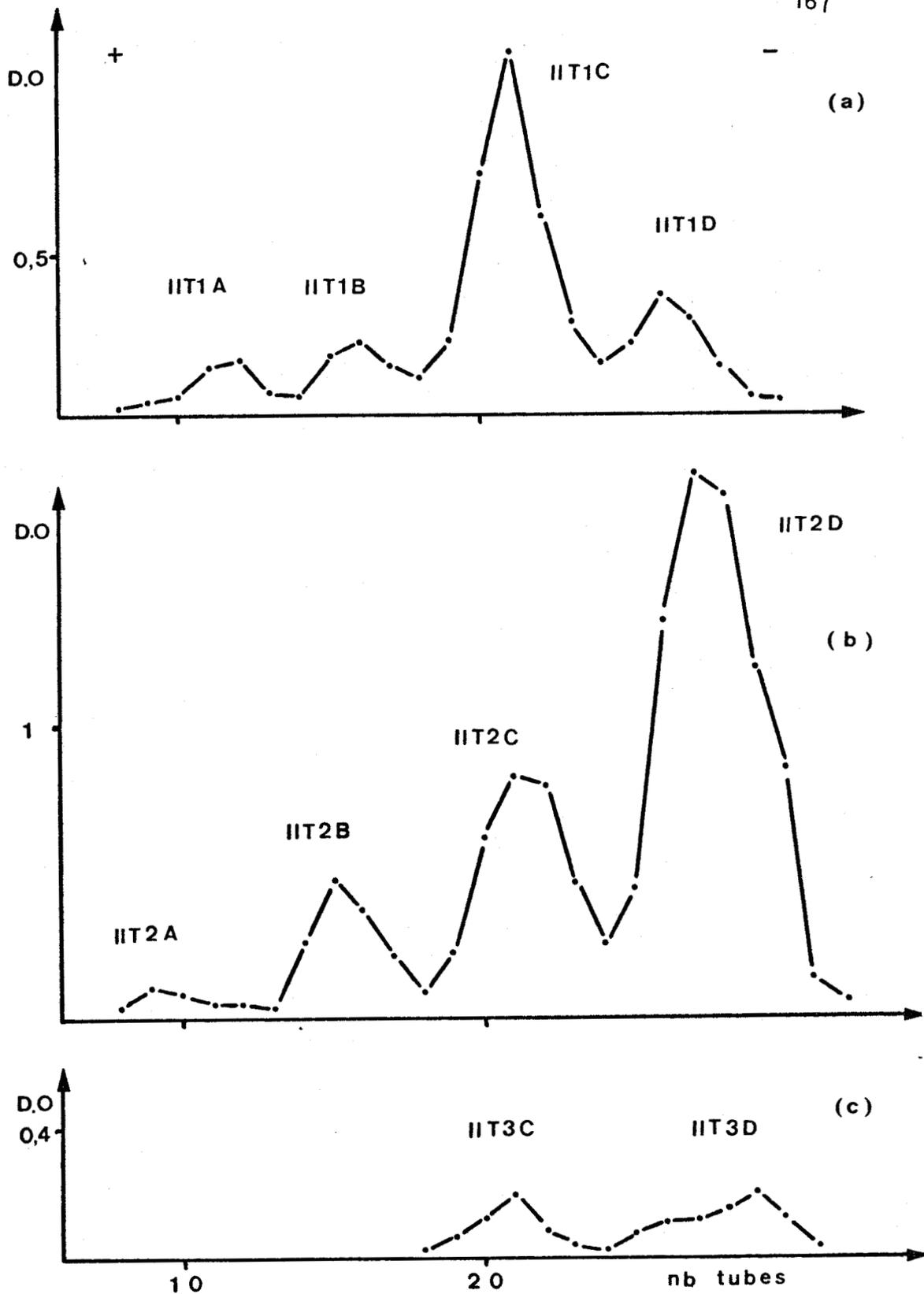


Figure 42.

Schéma du fractionnement des glycopeptides II T 1 (a) ;
 II T 2 (b) et II T 3 (c) par électrophorèse en veine liquide
 à pH 2,4 - dosage par la méthode de DUBOIS *et al.* (67)

- II T1A (la plus anodique), II T1B, II T1C et II T1D.
- II T2A (" " "), II T2B, II T2C et II T2D.
- II T3A (" " "), II T3B, II T3C et II T3D.

Dans la fraction II T3, les sous-fractions II T3A et II T3B sont presque inexistantes. Nous avons néanmoins conservé la dénomination II T3C et II T3D pour garder une certaine homogénéité au regard de leur migration électrophorétique comparée à celle des autres sous-fractions.

Au début de notre expérimentation après la chromatographie du glycopeptide II T sur papier (pendant 3 jours et non 8.) nous ne récupérons que les glycopeptides restés au trait de départ. Ils étaient ensuite fractionnés par une électrophorèse préparative sur papier à pH 2,4. Par cette méthode, nous avons obtenu trois sous-fractions que nous avons désignées II T 1B, II T 1C et II T 1D au regard de leur migration électrophorétique.

Dans le tableau XXIX (p. 169) nous avons rassemblé les rendements de ces fractions et de leurs sous-fractions. La récupération globale après toutes les étapes de purification représente environ 10 mg de glycopeptides par gramme d'IgG1 hydrolysées. Par la suite, seuls les glycopeptides majeurs II T 1C et II T 2D retiendront notre attention.

II - COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLLAIRE DES GLYCOPEPTIDES.

A.- COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES PRONASLIQUES.

La composition centésimale de la fraction glycopeptidique II été rapportée dans le tableau XXII (p. 150) et les compositions molaires en oses et en acides aminés dans le tableau XXIII (p. 152).

.../

T A B L E A U XXIX.

Rendements en mg des fractions glycopeptidiques obtenues
après hydrolyse trypsique des IgG1 -type de rupture II.

	Séparation des glycopeptides par électrophorèse	
	en veine liquide	sur papier
Ig G1	8,5 g	1,6 g
Glycopeptides		
II T	651	63
II T1	31	37
II T2	71	-
II T3	22	-
II T 1A	1	-
II T 1B	2	2
II T 1C	12	8
II T 1D	3	11
II T 2A	1	-
II T 2B	8	-
II T 2C	12	-
II T 2D	28	-
II T 3C	4	-
II T 3D	3	-
Rendement par g. d'IgG1	10 mg	10 mg



B.- COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES.

1.- Composition centésimale en glucides.

Nous avons rassemblé dans le tableau XXX (p.171) les compositions centésimales en glucides des différents glycopeptides. La seule différence importante réside dans la variation du taux des acides sialiques.

2.- Composition molaire.

a - en glucides : les valeurs (tableau XXXIp.172) sont calculées en prenant comme référence 3 résidus de mannose par molécule de glycopeptide. Notre choix est basé sur la valeur de la masse moléculaire que nous avons déterminée précédemment (Tableau XXIV,p.153 etXXV p.155). Nous obtenons les mêmes résultats avec les trois techniques de dosage utilisées.

b - en acides aminés :

Nous avons rapporté dans le tableau XXXII (p.173) les compositions molaires en acides aminés des différents glycopeptides en prenant l'acide aspartique comme référence.

3.- Discussion - Conclusion.

a - Le nombre de résidus de N - acétyl - glucosamine dosé à l'auto - analyseur des amino - acides est toujours compris entre trois et quatre (tableau XXXII,p.173). La chromatographie en phase gazeuse des dérivés trifluoro - acétate de la N - acétyl - glucosamine après méthanolyse es

T A B L E A U X X X .

Composition centésimale des glycopeptides isolés
des IgG1 hydrolysées par la chymotrypsine.

Glycopeptides	Oses neutres	Osamines	Acides sialiques
IC 1A	33,3	24,3	11,6
IC 1B	33,6	25,7	5,8
IC 1C	26,9	20,2	9,7
IC 1D	27,4	21,5	2,2
IC 2B	42,4	33,6	2,0
II C 1A	35,3	24,9	14,2
II C 1B	38,1	25,4	Traces



T A B L E A U XXXI.

Composition molaire en glucides des Glycopeptides obtenus
après hydrolyse des IG U₁ par la chymotrypsine.

	IC 1A			IC 1B			IC 1C			IC 1D			IC 2A			IC 2B			II C1A			IIC1B			IIC2B					
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Gal	2,4	2,3	2,2	2	2,1	2,2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1,8	2	2	2,4	1,9	2,4	1,7						
Man (*)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3						
Fuo	0,5	0,5	0,45	0,5	0,48	0,88	0,82	0,9	0,88	0,76	0,97	0,99	0,48	0,29	0,33	0,32	0,75	0,44	0,44	0,92	0,3									
Glc NAO	-	-	3,7	-	-	3,7	3,9			-	-	3,3	3,5	-	3,4	-	-	3,2	-	-	3,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ANAN	-	-	1	-	-	0,85	0,92			-	-	0	0,99	-	0	-	-	1,1	-	-	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(*) - pris comme référence

(a) - par chromatographie quantitative sur papier

(b) - par " " en phase gazeuse des dérivés triméthylsilylés

(c) - par " " " " " trifluoroacétate
après méthanolyse. (méthanolyse - HCl 0,5 N - 24 h.)

(d) - par chromatographie en phase gazeuse des dérivés trifluoroacétate
après méthanolyse. (méthanolyse - HCl 1,5 N - 48 h.)



T A B L E A U XXXII.

Composition molaire en acides aminés des glycopeptides isolés
des hydrolysats chymotrypsiques des Ig G₁

	IC 1A	IC 1B	IC 1C	IC 1D	IC 2B	IIC1A	IIC1B	IIC2B
Asp (*)	1	1	1	1	1	1	1	1
Thr	0,86	0,88	2,05	1,95	0,95	0,96	0,94	0,96
Ser	1,22	1,24	1,38	1,2	1,19	0,98	0,97	0,90
Glu	0,23	0,32	2,5	2,37	-	-	-	0,33
Pro	-	-	0,92	0,93	-	-	-	-
Gly	0,17	-	0,16	0,17	-	-	-	-
Ala	0,15	-	0,16	0,17				
Tyr	0,78	0,86	0,98	0,85	1,06	0,87	0,77	0,82
Phe	-	-	0,98	0,88	-	-	-	-
Lys	-	-	0,91	0,93	-	-	-	-
Arg	-	-	0,88	0,98				
GlcN	3,86	3,97	3,8	3,5	3,5	4,3	4	3,8

* Référence.



en accord avec ce résultat. Mais quand la méthanolyse est réalisée dans des conditions plus drastiques (méthanol - HCl 1,5 - 48 h.) le nombre de résidus de N - acétyl - glucosamine tend vers quatre (Tableau XXXI p. 172). Ce problème concernant le nombre de résidus de N - acétyl - glucosamine par molécule de glycopeptide sera discutée lors de l'étude de la structure glucidique (p.205).

b - Bien que l'on se trouve devant un nombre assez important de glycopeptides, il est néanmoins très simple de les grouper en familles homogènes. Ces glycopeptides varient soit par leur fraction peptidique soit par leur fraction glucidique.

- Variation de la fraction peptidique : Nous avons deux groupes de glycopeptides qui diffèrent par leur composition en amino-acides ; ceux qui possèdent une chaîne peptidique courte (IC 1A, IC 1B, IC 2B, IIC 1A, IIC 1B et IIC 2B) sont du type (A - B) ; ceux qui contiennent une chaîne peptidique longue (IC 1C, IC 1D) sont du type (C - D). Les glycopeptides obtenus à partir d'IgG1 ayant été soumis à la rupture II sont du type (A - B) et ceux obtenus d'IgG1 après la rupture I sont des deux types (A - B) et (C - D). Nous sommes donc en présence de deux groupes de glycopeptides de par leur composition peptidique.

- Variation de la fraction glucidique : Les fractions glucidiques diffèrent par leurs teneurs en fucose et en acides sialiques. La variation du taux de fucose est en relation avec la chaîne peptidique. Les glycopeptide à chaîne peptidique longue possèdent un résidu de fucose et ceux à chaîne peptidique courte environ 0,5 résidu. Par contre, le nombre d'acide sialique est indépendant de la composition de la chaîne peptidique. Les glycopeptides possèdent tantôt un résidu d'acide sialique type (A - C) tantôt aucun, type (B - D).

En associant les variations des fractions peptidiques et glucidiques, il apparaît quatre groupes de glycopeptides A, B, C et D. L'hypothèse que nous avons émise lors de l'isolement des glycopeptides (p. 165) à savoir que les glycopeptides du type (A - B) sont plus accessibles à l'hydrolyse peut s'expliquer par le déficit en fucose.

- c - Tandis que dans la composition peptidique de ceux du type (A - B) un seul acide aminé aromatique est présent (Tyr), on en compte deux (Phe et Tyr) dans ceux du type (C - D). Ce fait est incompatible avec la spécificité de la chymotrypsine. Il faut donc admettre qu'il y ait une difficulté à rompre la liaison peptidique au niveau de la phénylalanine.

Pour déterminer la séquence peptidique au voisinage du point d'attache seuls deux groupes de glycopeptides retiendront notre attention : les types (A - B) et (C - D). Par contre, pour connaître la structure glucidique les quatre types A, B, C, et D seront étudiés séparément.

C - COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES TRYPSIQUES.

Nous avons rassemblé dans le tableau XXXIII (p.176) les compositions molaires en monosaccharides et en acides aminés des glycopeptides tryptiques majeurs : II T 1C et II T 2D.

Les deux glycopeptides diffèrent par la présence ou non d'un résidu d'acide sialique. Par contre, ils possèdent la même composition peptidique.

III - DETERMINATION DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE.

A - DETERMINATION DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE DES GLYCOPEPTIDES PRONASIQUES.

- 1 - Détermination des acides aminés N et C terminaux.

T A B L E A U XXXIII.

Compositions molaires en monosaccharides et en acides aminés des glycopeptides tryptiques des Ig G₁

	II T 1C	II T 2D
Gal (*)	2	2
Man	3,2	3,23
Fuc	0,52	0,4
GlcNAc	3,4	3,3
ANAN	1,02	0
Asp (**)	1	1
Thr	0,84	0,93
Ser	0,92	0,94
Glu	2,42	2,75
Tyr	0,68	0,63
Phe	0,74	0,6
Arg	0,7	0,7
GlcN	4,1	4

(*) - pris comme référence pour les monosaccharides-dosage par chromatographie en phase gazeuse des dérivés trifluoroacétate après méthanolyse (méthanol - HCl 1,5 N - 48 h.

(**) - pris comme référence pour les acides aminés.



a- L'acide-amino N - terminal.

Par la méthode de dinitrophénylation, on obtient deux phases. Elles sont évaporées à siccité. La phase organique est soumise à une chromatographie bidimensionnelle. Dans un premier temps, la substance est chromatographiée dans le système solvant de BISERTE et OSTÉUX (24) modifiée par LEVY (151) / toluène / pyridine / 2 - chloro- éthanol / ammoniacque 0,8 N (10 : 3 : 6 : 6)/. La deuxième migration est effectuée dans un tampon phosphate de sodium 1,5 M à pH 6 (BISERTE et al.) (22). On obtient une seule tache majeure correspondant au DNP - aspartique. Nous n'avons pas effectué une nouvelle chromatographie dans le tampon phosphate 2,5 M à pH 6 pour fractionner le DNP - glutamique et le DNP - aspartique : l'acide glutamique étant absent de la fraction glycopeptidique (Tableau XXIII, p. 152)

La dégradation récurrente d'EDMAN fournit le même résultat : l'acide aspartique est en position N - terminale. Les résultats rassemblés dans le tableau XXXIV (p. 178) sont significatifs. On constate une perte très importante de l'acide aspartique.

b- L'acide-amino C - terminal.

L'hydrazinolyse fournit deux fractions. Seule la fraction I (voir p. 93) a retenu notre attention vu que le carboxyl (C) de l'acide aspartique était engagé dans la liaison protéine - glycanne. L'analyse directe de celle-ci démontre la position C - terminale de la thréonine. On remarque également la présence d'une quantité mineure de sérine. L'analyse après hydrolyse de cette fraction I (obtenue à partir d'une autre expérience) révèle la présence de l'acide aspartique. On en déduit donc l'existence d'une fraction de résidu d'asparagine C - terminale dans la fraction glycopeptidique III. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XXXV (p. 179)

T A B L E A U XXXIV.

Compositions comparées de la fraction glycopeptidique III
native et après la réaction d'EDMAN.

Constituants	Fraction glycopeptidique III	
	native	après la réaction d'EDMAN
Asp	1,98	0,35
Ser	1,74	1,35
Thr	1,21	1,14
GlcN (*)	8	8

(*) - pris comme référence



T A B L E A U XXXV.

Composition de la fraction I obtenue après hydrazinolyse
de la fraction glycopeptidique III

(Constituants	: Fraction	: Fraction I non	: Fraction I hydrolysée
:	: glycopeptidique:	: hydrolysée (avec	: (sans correction)
:	:	: correction)(*)	:
:	:	:	:
Asp	: 1,15	: 0	: -
Ser	: 1,01	: 0,28	: -
Thr	: 1	: 1	: -
n-Leu(**)	: 1	: 1	: -
Asp	: 1,24	: -	: 0,13
Ser	: 1,2	: -	: 0,2
Thr	: 0,9	: -	: 0,6
n-Leu(**)	: 1	: -	: 1
:	:	:	:
:	:	:	:
:	:	:	:

(*) - Nous avons tenu compte de la destruction en réalisant deux expériences : la première avec la n-Leu comme témoin interne, la seconde, avec en plus, les autres acides aminés présents dans la fraction glycopeptidique III.

(**) - pris comme témoin interne.



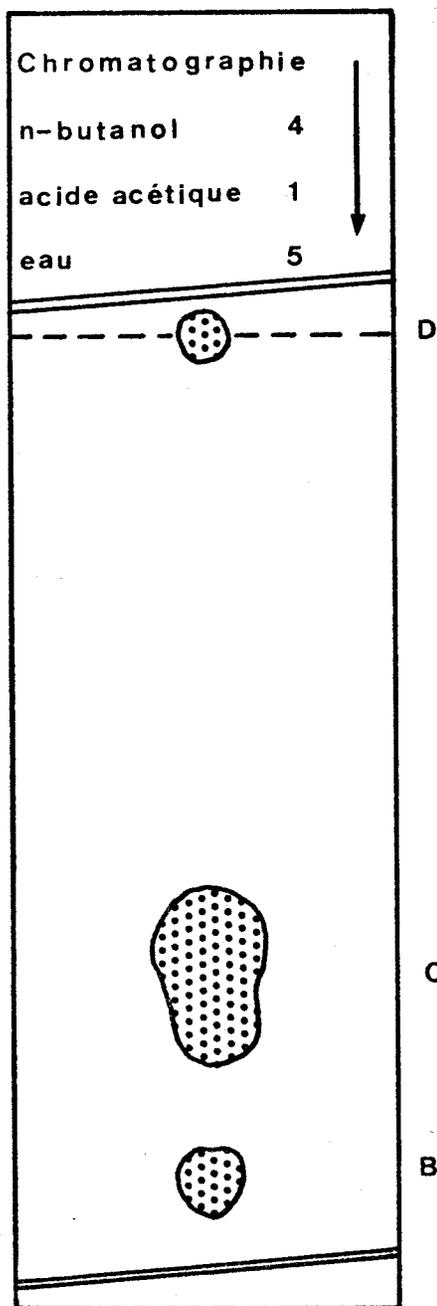
c- Conclusion :

Nous avons déterminé que, seul, l'acide aspartique se trouve en position N - terminale. La fraction glycopeptidique III obtenue de diverses hydrolyses pronasiques possède sensiblement la même composition. On remarque toujours une décroissance quant au taux des acides aminés dans l'ordre suivant : acide aspartique, sérine et thréonine. En outre, nous avons prouvé que la thréonine et en quantité beaucoup plus faible, l'asparagine et la sérine se trouvaient en position C - terminale. Sachant que l'asparagine est impliquée dans le point-d'attache protéine - glycanne (p.159), ces résultats permettent de suggérer les séquences suivantes :

Asn ; Asn - Ser ; Asn - Ser - Thr.

2 - Détermination de la séquence peptidique.

Après la réaction d'EDMAN, nous avons extrait par l'eau les produits modifiés (fraction A). Une analyse directe à l'auto-analyseur des acides aminés après une hydrolyse acide indique, comme nous venons de le montrer, que l'acide aspartique est l'acide amino-terminal (Fig.43, p.181). Cette fraction A a été chromatographiée sur du papier Whatman n°1 dans le système solvant de PARTRIDGE (216) pendant 36 heures. On sépare ainsi trois composés (fractions B - C - D) (Fig. 43, p.181). L'un d'entre eux (D) ne migre pas et lui seul est révélabile par le réactif de CHARBULIEZ et al. (50) caractéristique des PTH - amino - acide - dérivés. Son isolement révèle qu'il s'agit du PTH aspartique - glycanne dérivé (D). Son analyse après hydrolyse acide montre que la fraction peptidique est presque inexistante comparé à la fraction glycopeptidique III par rapport au taux de la glucosamine (Fig. 43, p. 181). Toute la fraction peptidique de la fraction glycopeptidique III se trouve donc rassemblée dans les fractions B et C. La fraction C fut analysée après une hydrolyse



	Glycopeptidique III	Fractions			
		A	D	B	C
Asp	1,98	0,35	0,23	-	-
Ser	1,74	1,35	0,27	+	1,28
Thr	1,21	1,14	0,24	+	1 (*)
Glu	0,08	-	+	+	-
Gly	0,07	-	+	+	-
Ala	0,07	-	-	+	-
GlcN	8(*)	8(*)	8(*)	-	-

(*) pris comme référence.



Figure 43.

Chromatographie de la fraction A et analyse des produits obtenus.

acide. Elle ne contient que de la sérine et de la thréonine dans le rapport 1,28/1. La fraction B, sans hydrolyse préalable, fut étudiée par électrochromatographie. Elle renferme de l'acide glutamique, de la thréonine, de la sérine, de l'alanine et du glyco-colle. Mais cette fraction représente une quantité très mineure et ces amino-acides sont présents à l'état de traces. Certains peuvent provenir de l'élution du papier, car ils furent isolés par chromatographie préparative. Seule, la fraction C a retenu notre attention. Après une nouvelle réaction d'EDMAN, toute la sérine disparaît, seule, la thréonine est décelable.

Ces résultats sont en faveur de la séquence peptidique suivante : Asn - Ser - Thr.

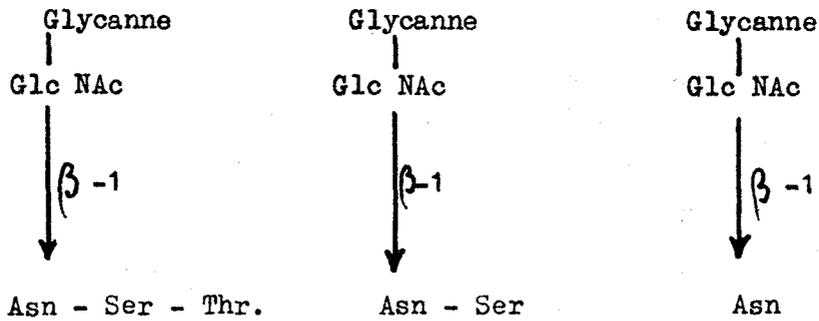
Nous avons repris l'étude de la fraction C car son analyse aurait dû donner un rapport sérine/thréonine égal à 1/1 et non 1,28/1. Une chromatographie dans le système - solvant de PARTRIDGE (216) de cette fraction C avant et après hydrolyse acide révèle que cette fraction C contient un dipeptide (Ser, Thr) et de la sérine, et que ce dipeptide et la sérine possèdent des migrations chromatographiques presque identiques. Comme de la sérine libre est libérée après la réaction d'EDMAN, nous sommes en présence des deux séquences suivantes : Asn - Ser et Asn - Ser - Thr.

3 - Conclusion.

La détermination des amino-acides N et C terminaux et l'étude des produits obtenus après deux cycles de la réaction d'EDMAN démontrent qu'il existe un mélange de glycopeptides possédant les séquences peptidiques suivantes : Asn; Asn -Ser; Asn-Ser-Thr.

.../

En associant ce résultat à celui obtenu lors de la recherche de la nature de la liaison protéine - glycanne dans la fraction glycopeptidique III nous démontrons sans ambiguïté les structures partielles suivantes :



Néanmoins, il est encore impossible d'affirmer qu'il n'existe qu'une seule séquence peptidique. En effet, dans la molécule d'IgG₁ initiale, il peut exister d'autres amino-acides liés à l'asparagine, à la sérine ou à la thréonine qui soient hydrolysés plus facilement par la pronase.

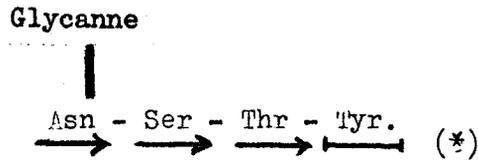
B - DETERMINATION DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE DES GLYCOPEPTIDES CHYMO-
TRYPSIQUES.

1.- Détermination de la séquence peptidique des glycopeptides du
type (A - B).

Les glycopeptides de ce type (IC 1A, IC 1B, IC 2B, II C 1A, II C 1B, et II C 2 B) possèdent une composition peptidique simple : Asx, Ser, Thr, Tyr dans le rapport 1. D'après la spécificité d'hydrolyse de la chymotrypsine la tyrosine se trouve en position C - terminale. En tenant compte des résultats obtenus précédemment la séquence peptidique de ces glycopeptides est la suivante :

.../

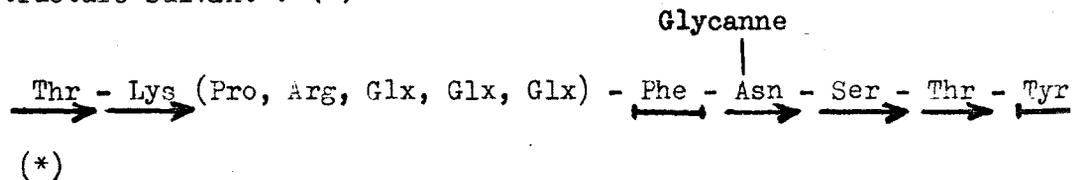




2.- Détermination de la séquence peptidique des glycopeptides du type (C - D).

Ces glycopeptides (IC 1 C ; IC 1 D et IC 2 D) possèdent deux résidus d'acides aminés aromatiques (Phe et Tyr). Pour vérifier s'il existait un empêchement stérique à l'hydrolyse enzymatique, nous les avons soumis de nouveau à l'action de la chymotrypsine pendant 24 h. Après une électrophorèse préparative sur papier à pH 3,9 /MICHL (179)/ nous avons isolé un glycopeptide possédant une composition en amino-acides identique à celle de ceux du type (A - B), c'est-à-dire : Asp, Ser, Thr et Tyr.

Ces mêmes glycopeptides ont été soumis à deux cycles de la dégradation récurrente d'EDMAN. Les acides aminés non modifiés ont été dosés après hydrolyse acide à l'auto-analyseur BECKMAN (Tableau XXXVI, p. 185). On voit disparaître successivement une thréonine puis une lysine. La perte en lysine, dès le premier cycle, provient de la formation du PTH - Lys sur ϵ - N H₂. Ces deux résultats nous permettent de choisir le schéma de structure suivant : (*)



La présence d'un résidu d'arginine nous a permis d'utiliser la trypsine pour obtenir des peptides plus courts.

(*) - → : déterminé par la dégradation récurrente d'EDMAN
 ─── : déduit de la spécificité enzymatique.

T A B L E A U XXXVI.

Composition en amino-acides et en glucosamine
du glycopeptide IC 1D après deux cycles de la
dégradation récurrente d'EDMAN.

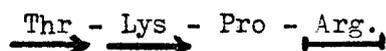
Constituant	IC 1D natif	IC 1D après le 1er cycle	IC 1D après le 2ème cycle
Asp (*)	1	1	1
Ser	1,02	0,9	1,08
Thr	2,25	1,4	1,29
Glu	2,83	2,6	2,77
Pro	1	1	1
Tyr	0,71	0,75	0,77
Phe	1,01	0,97	0,83
Lys	0,89	0,5	0,3
Arg	0,96	0,88	0,88
Glc N	4,3	4,2	4,1

(*) - pris comme référence.

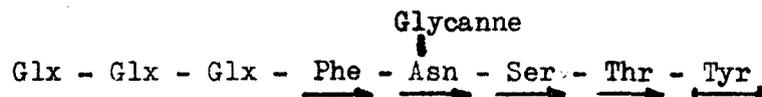


Après l'hydrolyse trypsique (4 ml d'eau contenant 10 mg de IC 1D et 160 µg de trypsine, ajustés à pH 8,5 - hydrolyse pendant 18 h.) les constituants furent séparés par une électrophorèse préparative sur papier M N 261 à pH 3,9/(MICHL (179)).

On a obtenu six fractions numérotées de 1 (la plus cathodique) à 6 (la plus anodique). Les compositions en acides aminés sont rassemblées dans le tableau XXXVII (p.187). La fraction n°6 était récupérée en quantité trop faible pour être étudiée. Les rendements de chaque fraction ont été calculés par rapport à l'arginine pour les trois premières et pour les deux suivantes par rapport à l'acide aspartique pris comme référence en admettant une hydrolyse trypsique complète. La trypsine scinde le glycopeptide IC 1D en deux parties, l'une uniquement peptidique (fractions n°1, 2 et 3) et l'autre glycopeptidique (fractions n°4 et 5). En prenant en considération les résultats précédents (p. 184) ainsi que la spécificité de rupture enzymatique la fraction n°2 majeure possède la séquence peptidique suivante. (*)



Par déduction, l'enchaînement des amino - acides de la fraction glycopeptidique est la suivante :



La position des trois résidus de Glx sera confirmée lors de l'étude des glycopeptides tryptiques.

.../

(*) - $\xrightarrow{\quad}$: déterminé par la dégradation récurrente d'EDMAN
 $\xrightarrow{\quad}$: déduit de la spécificité enzymatique.

T A B L E A U XXXVII.

Composition en amino-acides et en glucosamine des
peptides et glycopeptides fractionnés par
électrophorèse sur papier à partir d'un
hydrolysats tryptique du glycopeptide IC1D

Fractions	1	2	3	4	5
Constituants					
Asp	-	-	-	1 (*)	1 (*)
Ser	-	-	-	1,5	0,9
Thr	0,48	0,82	2	0,96	0,88
Glu	-	-	-	1,5	2,65
Pro	1	1	1	N.D.	-
Tyr	-	-	-	0,61	0,79
Phe	-	-	-	0,60	0,76
Lys	0,88	0,85	1,0	0,43	-
Arg	1 (*)	1 (*)	1 (*)	0,29	-
GlcN	-	-	-	3,5	4,3
Rendement en %	27	46	26	15	85

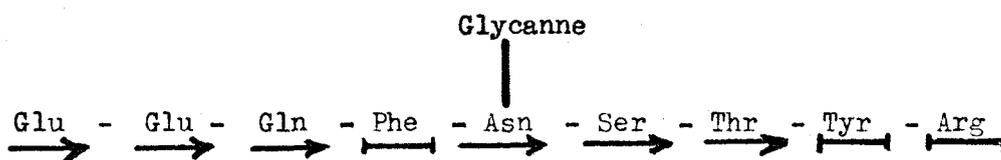
(*) - pris comme référence



C - DETERMINATION DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE DES GLYCOPEPTIDES TRYPSIQUES.

Nous avons soumis ces glycopeptides (II T1C et II T2D) à la dégradation récurrente d'EDMAN. Après chaque cycle, nous avons successivement identifié les PTH - amino- acides suivants : Glu, Glu et Gln.

Vu la spécificité de la trypsine , ce résultat associé à ceux obtenus précédemment (p. 186), nous pouvons conclure que les glycopeptides tryptiques possèdent la structure peptidique suivante :



IV.- DISCUSSION - CONCLUSION.

A partir des glycopeptides isolés des hydrolysats pronasiques, chymotrypsiques et tryptiques, nous avons déterminé la séquence peptidique au voisinage du point-d'attache protéine-glycane. Celle-ci est en accord et complète celle déterminée par NOLAN et SMITH (209) (Tableau XXXVIII, p.189)

La similitude des séquences peptidiques au voisinage de la liaison protéine - glycane dans des IgG de différentes origines (TableauXXXIX, p.190) pose immédiatement la question du rôle de la chaîne peptidique dans la biosynthèse du glycane Nous retrouvons la présence du triplet : Asn - X - Thr (ou Ser) rencontré dans différentes glycoprotéines répertoriées par HUNT et DAYHOFF (121). Il serait le code de reconnaissance pour le branchement de la première N - acétyl - glucosamine. En outre, on

T A B L E A U XXXVIII.

Séquence peptidique au voisinage du point d'attache
protéine-glycane dans les IgG₁ du
colostrum de Vache.

NOLAN et SMITH (209)

Glycane
|

Lys - Pro - Arg - Glu - Glu - Gln - Phe - Asx

Résultats personnels :

Glycane
|
GlcNAc
|

Thr - Lys - Pro - Arg - Glu - Glu - Gln - Phe - Asn Ser - Thr - Tyr - Arg



T A B L E A U XXXIX.

Séquences peptidiques comparées au voisinage
du point d'attache protéine-glycane dans des
Ig G d'origine différente.

Lapin (APPELA et al.) (5) et (HILL et al.) (112)

Glycane
|

Pro - Pro - Leu - Arg - Glu - Gln - Gln - Phe - Asx - Ser - Thr-Ileu - Arg

Eu humaines (RUTISHAUSER et al.) (235)

Glycane
|

Thr - Lys - Pro - Arg - Glu - Gln - Gln - Tyr - Asx - Ser - Thr - Tyr - Arg

Sérum de Vache (DUQUESNE et al.) (68)

Glycane
|

Asn - Ser - Thr.

Sérum de Vache (HOWELL et al.) (119)

Glycane
|

Glx - Glx - Glx - Phe - Asx - Ser - Thr - Tyr - Arg

Colostrum de Vache (Résultats personnels)

Glycane
|

Thr - Lys - Pro - Arg - Glu - Glu - Gln - Phe - Asn - Ser - Thr - Tyr - Arg

Sérums de babouin, de singe, de porc, de chien et de chat (HOWELL et al.)(119)

Glycane
|

(Glx, Glx, Glx, Phe, Asx, Ser, Thr, Tyr) - Arg.

constate que la fraction peptidique constante des chaînes H dans les IgG conserve cette homogénéité au cours de l'évolution. Le glycanne posséderait-il une telle importance qu'il entraînerait, par finalité, une chaîne peptidique constante .

(ETUDE DE LA STRUCTURE DES FRACTIONS
 GLYCANNIQUES DES IgG₁ DU COLOSTRUM
 DE VACHE.)

Les glycanes des Ig G₁ constituent une faible fraction de la molécule, environ 3 %. Dans un premier temps, il fallait obtenir une fraction très enrichie en monosaccharides. Les glycopeptides représentent donc les substrats de départ de choix pour aborder cette étude. Nous avons choisi les glycopeptides chymotrypsique A, B, C et D car leurs compositions en monosaccharides sont légèrement différentes quant aux pourcentages du fucose et des acides sialiques.

En outre, il semblait y avoir une relation directe entre le taux de fucose et la présence d'un résidu de phénylalanine dans la chaîne peptidique. Nous savons déjà que ce résidu d'acide aminé se trouve près de l'asparagine du point-d'attache protéine - glycanne : ceci serait suffisant pour expliquer l'action incomplète de la chymotrypsine due à un empêchement stérique. Mais la présence éventuelle du fucose près de ce résidu de phénylalanine pourrait augmenter cet encombrement stérique dû au glycanne. En choisissant ces glycopeptides chymotrypsiques, nous pensions pouvoir expliquer la raison pour laquelle la chymotrypsine était inhibée dans son action hydrolytique.

Il nous fallait résoudre trois problèmes, à savoir, déterminer :

- l'enchaînement des monosaccharides ,
- les types de liaison (1→2; 1→3 ; 1→4; 1→6),
- et les anoméries, α ou β , des liaisons.

.../

Pour aborder les deux premiers, nous avons considéré que les fractions glycaniques pouvaient être divisées en trois parties :

- l'extrémité reliée à la chaîne peptidique,
- le centre de l'édifice moléculaire,
- et les extrémités externes.

C'est pourquoi, nous avons utilisé les trois techniques suivantes :

- la méthylation directe des glycopeptides qui nous renseigne sur la position externe ou interne des monosaccharides et sur leur degré de substitution.
- l'oxydation périodique qui permet d'isoler la fraction glycanique proche du point-d'attache protéine-glycane (*).
- l'hydrazinolyse suivie d'une diazotation qui fournit des fragments terminés par un résidu de chitose venant de la modification de la glucosamine.

Après l'oxydation périodique et l'hydrazinolyse-diazotation nous avons analysé les produits obtenus après méthylation des différents fragments pour déterminer les types de liaisons.

Pour localiser avec précision le résidu éventuel de fucose, dans certaines expériences, nous avons d'abord rompu la liaison protéine-glycane par la soude en milieu réducteur avant de réaliser une hydrazinolyse - diazotation. L'anomérisation des liaisons a été déterminée par l'action d'enzymes spécifiques soit sur les glycopeptides natifs soit sur certains de leurs fragments que nous avons isolés.

En outre, le point de branchement du résidu d'acide N-acétylneuraminique présent dans les glycopeptides acides a été précisé grâce à l'analyse des produits obtenus après la méthylation des glycopeptides partiellement hydrolysés par des glycosidases spécifiques. .../

(*) - Cette technique serait sans intérêt si les monosaccharides près du point-d'attache possédaient des fonctions " α -glycol" libres.

I.- COMPOSITION EN MONOSACCHARINES DES GLYCOPEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES :

A - B - C - D.

Les compositions molaires en monosaccharides des quatre types de glycopeptides ont été rapportées dans le tableau XXXI(p. 172)

II.- METHYLATION DIRECTE DES GLYCOPEPTIDES.

Les résultats de la méthylation (p. 98) des glycopeptides IC 1A ; IC 1B ; IC 1C ; IC 1D ; IC 2A et IC 2B sont résumés dans le tableau XL (p. 195).

Le seul dérivé du fucose présent sur les diagrammes de la chromatographie en phase gazeuse était le 2,3,4 - tri - O - méthyl - L - fucoside.

Les deux dérivés du galactose sont le 2,3,4,6 - tétra - O - méthyl et le 2,3,4 - tri - O - méthyl - D - galactoside. Leur rapport molaire a été calculé par rapport aux 2 résidus de galactose présents dans les glycopeptides natifs.

Les deux dérivés majeurs du mannose sont le 2, 4 - di - O - méthyl et le 3, 4, 6 - tri - O - méthyl - D mannoside. Les dérivés 3, 4 di - O - méthyl et 3, 6 - di - O - méthyl - D - mannoside proviennent d'une méthylation incomplète du 3, 4, 6 - tri - O - méthyl - D - mannoside. En effet, en prenant comme base de calcul 1 résidu de 2, 4 - di - O - méthyl - D - mannoside on retrouve les 3 résidus de mannose présents dans les glycopeptides.

Les rapports molaires des dérivés de la glucosamine différemment méthylés sont calculés par rapport aux 4 résidus présents dans les glycopeptides natifs. Les dérivés 3, 6 - di - O - méthyl et 3 - mono - O-méthyl représentent presque la totalité des 4 résidus.

.../

T A B L E A U XL.

RAPPORTS DES SURFACES DE PICS CORRESPONDANT AUX ETHERS
METHYLIQUES DES MONOSACCHARIDES NEUTRES ET DES METHYL-OSAMINES
LIBRES PAR HYDROLYSE ACIDE DES SIALO ET ASIALO-GLYCOPEPTIDES PERMETHYLES

D.S Ig 0₁.

Ethers méthyliques	2,3,4 - Fuc	2,4 - Man	3,4,6 - Man	3,4 Man	3,6 - Man	2,3,4 -Gal	2,3,4,6-Gal	3,6 - GlcN	3 - GlcN	3,4,6-GlcN
Glycopeptides	a	b	b	b	b	c	c	d	d	d
IC 1A	+	1	1,6	0,17	0,20	1,66	0,34	3,29	0,62	0,09
IC 1B	+	1	1,96	0,14	0,03	0,51	1,49	3,23	0,59	0,17
IC 1C	+	1	1,64	0,15	0,12	1,44	0,55	3,13	0,64	0,22
IC 1D	+	1	1,32	0,22	0,10	1,18	0,82	3,01	0,68	0,30
IC 2A	+	1	1,79	0,14	0,12	1,4	0,6	3,2	0,63	0,16
IC 2B	+	1	1,49	0,12	0,11	0,4	1,59	3,3	0,44	0,25

a : seul dérivé du fucose présent.

b : les dérivés du mannose sont rapportés à un résidu de 2,4 - di - O - méthyl - D - mannoside.

c : la proportion des deux dérivés du galactose est calculée de telle sorte que la somme des résidus soit égale à 2.

d : la proportion des dérivés de la glucosamine est calculée de telle sorte que la somme des résidus soit égale à 4.



Conclusion :

A la lumière de ces résultats, nous pouvons faire les remarques suivantes :

- le fucose se trouve toujours en position externe.
- les sialo-glycopeptides possèdent 1 seul des deux résidus du galactose en position externe, et les asialo-glycopeptides les 2. Ceci nous amène à brancher le résidu de l'acide N - acétyl - neuraminique sur un résidu de galactose.
- tous les glycopeptides possèdent 2 résidus de mannose mono-substitués en C₂ et 1 résidu bi-substitué en C₃ et C₆. Ces trois résidus se trouvent donc en position interne dans l'édifice glycanique.
- l'un des quatre résidus de la glucosamine est bi-substitué en C₄ et C₆. Les autres sont mono-substitués en C₄. La faible quantité du dérivé triméthylé pourrait s'expliquer par une hydrolyse très partielle des glycopeptides lors de la méthylation. Les résidus de N - acétyl - glucosamine ne se trouvent donc pas à la périphérie des glycannes.
- les dérivés de l'acide N - acétyl - neuraminique n'ont pas été analysés car ils sont détruits après la méthylation par l'hydrolyse acide.

Dès maintenant, nous pouvons poser en hypothèse que tous les glycopeptides possèdent la même structure car nous obtenons toujours les mêmes dérivés méthylés.

III.- OXYDATION PERIODIQUE DES GLYCOPEPTIDES.

L'oxydation a été réalisée selon le protocole décrit page 101. Après celle-ci, nous avons isolé la fraction glycopeptidique non modifiée (FGOP). Cette dernière fut soumise à une analyse de ses constituants. Le dosage, après hydrolyse chlorhydrique à l'auto-analyseur des acides aminés (p. 78) nous donne le rapport existant

entre l'acide aspartique et la glucosamine. Une analyse des monosaccharides selon la technique de ZANETTA et al. (288) nous renseigne sur la nature des oses résistants à l'oxydation periodique et sur leur rapport molaire. En associant ces deux résultats rassemblés dans le tableau XLI (p. 198), nous avons pu donner la composition molaire de cette fraction glycopeptidique (Asp : 1 ; GlcN : 2 ; Man :1)

Celle-ci fut soumise à une méthylation totale selon le procédé décrit page 98. Les éthers méthyliques furent analysés en chromatographie en phase gazeuse (p. 100). Le seul dérivé de la glucosamine est la 3,6 - di - O - méthyl. A côté du 2,3,4,6 - tétra - O - méthyl - D - mannoside, dérivé majeur du mannose, nous avons constaté la présence du 3,4,6 - tri- O - méthyl - D - mannoside. Ce dernier dérivé provient d'une méthylation incomplète.

Conclusion :

Seul un résidu de mannose a résisté à l'oxydation periodique. Ce résultat est en parfait accord avec ceux obtenus lors de la méthylation totale des glycopeptides natifs (p.196). En outre, ce résidu se trouve en position externe, car nous avons mis en évidence le 2,3,4,6 - tétra - O - méthyl - D - mannose dans les produits de la méthylation de la fraction glycannique résistant à l'oxydation periodique. (FGOP).

Nous avons démontré précédemment (p. 159) que l'un des quatre résidus de N - acétyl - glucosamine contenus dans les glycopeptides natifs est lié à l'asparagine. Après méthylation, la FGOP ne contient que le dérivé 3,6 - di - O - méthyl - glucosamine. D'après ces résultats, nous pouvons déduire la structure suivante :



Dès lors, nous savons que les deux autres résidus de

T A B L E A U XLI.

Composition molaire de la fraction glycopeptidique
non modifiée (FGOP) après oxydation des glycopeptides
chymotrypsiques des Ig G₁.

Constituants	1ère expérience	2ème expérience
Asp (*)	1	1
Glc N	2,25	2,18
Man	0,89	0,95

(*) - pris comme référence égal à l'unité
(les autres acides aminés n'ont pas été dosés).



glucosamine contenus dans les glycopeptides natifs ne sont pas branchés à ce mannose. En outre, comme dans les asialo-glycopeptides, les deux molécules de galactose se trouvent en position externe, les deux autres résidus de mannose doivent être reliés au mannose de la FGOP.

IV.- HYDRAZINOLYSE ET DIAZOTATION.

L'hydrazinolyse suivie d'une diazotation (p. 103) a été réalisée sur les sialo et asialo-glycopeptides IC 1A et IC 1D. Nous avons choisi le IC 1D pour son taux élevé en fucose.

A - LES OLIGOSACCHARIDES NEUTRES ISOLÉS DES GLYCOPEPTIDES IC 1A ET IC 1D.

1.- Fractionnement et composition des oligosaccharides neutres.

SUS
INDÉ

Les oligosaccharides neutres terminés par le 2,5 - anhydro - D - mannose ont été séparés par chromatographie sur papier. Nous avons obtenu 4 fractions majeures (Fig. 44 ,p. 200) : les composés I, II, III et V, révélés par le réactif à l'urée chlorhydrique de DEDONDER (60) et présents dans les diazotats des deux glycopeptides IC 1A et IC 1D, et trois fractions mineures (Fig. 44 ,p. 200) : les composés IV, VI, et VII faiblement révélés par le réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (217).

Les différents composés ont été isolés par chromatographie préparative sur papier et réduits par le borohydrure de potassium. Ils ont été méthanolysés et analysés en chromatographie en phase gazeuse selon le protocole de ZANETTA et al. (288). Les résultats sont reportés dans le tableau XLII (p.201)

a - discussion :

Le composé I contient de la N - acétyl - glucosamine : il représente la fraction glycanique qui a été incomplètement modifiée par l'hydrazinolyse - diazotation.

.../

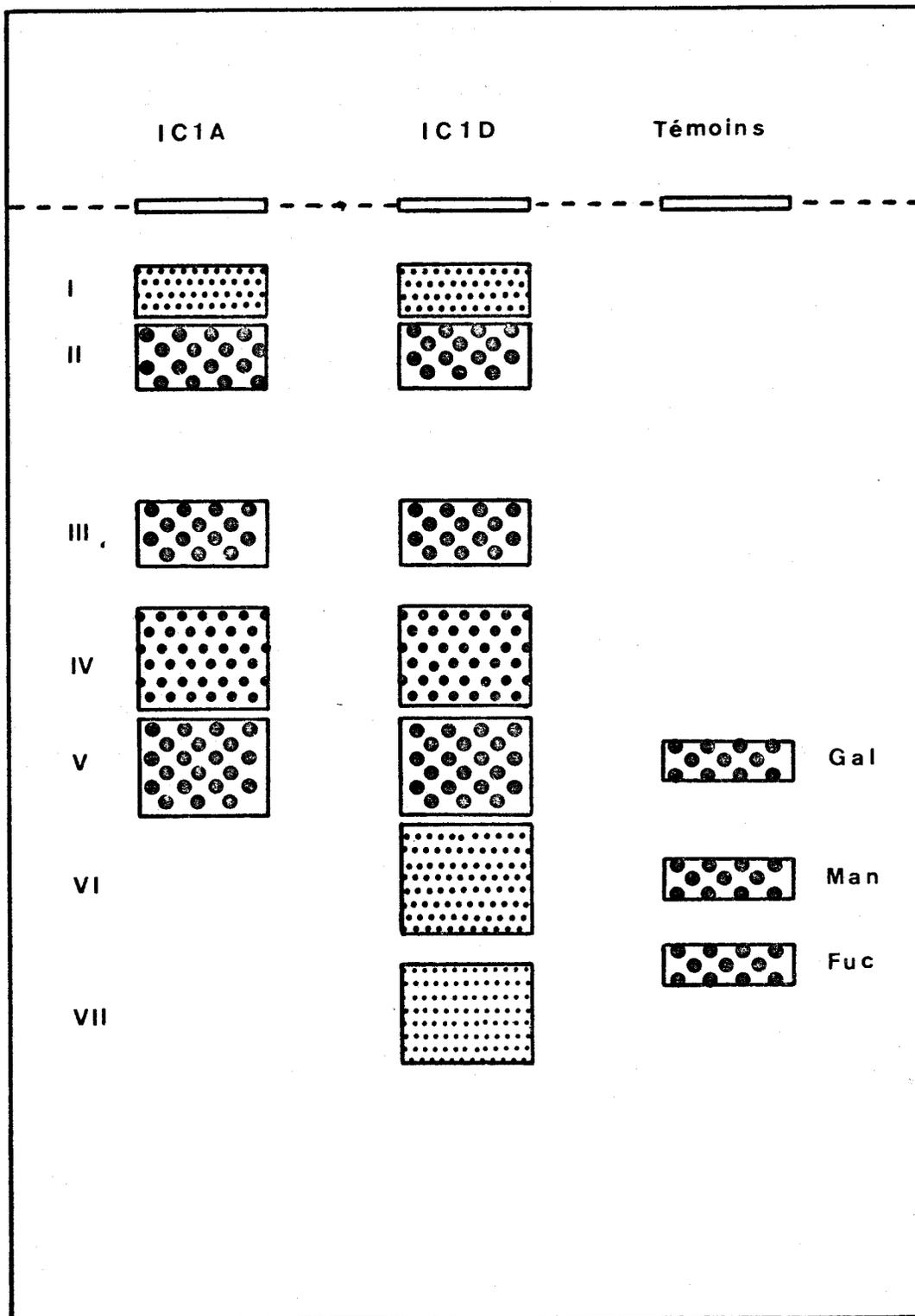


Figure 44.

Schéma de la séparation chromatographique de la fraction neutre des diazotats des glycopeptides IC 1A et IC 1D (papier Whatman n° 3 ; système solvant : acétate d'éthyle, pyridine, acide acétique, eau, 5 : 5 : 1 : 3)



T A B L E A U XLII.

Composition des composés isolés de la fraction
neutre des diazotats des glycopeptides IC 1A et IC 1D

	: 2,5 -anhydro- : <u>D</u> -mannitol : (*)	: Mannose	: Galactose	: Fucose	: N - acétyl : glucosamine
Glycopeptide	:	:	:	:	:
IC 1A	:	:	:	:	:
Composés : I	: +	: +	: +	: +	: +
II	: 1	: 2,7	: 0,5	: -	: -
III	: 1	: traces	: 1	: -	: -
IV	: 1	: -	: 0,73	: 0,71	: -
V	: +	: +	: +	: -	: -
Glycopeptide	:	:	:	:	:
IC 1D	:	:	:	:	:
Composés : I	: +	: +	: +	: +	: +
II	: 1	: 3,2	: 0,7	: -	: -
IIp	: 1	: 3	: 0,1	: -	: -
III	: 1	: traces	: 1	: -	: -
IV	: 1	: 0,50	: 1,45	: 1,29	: -
IV b	: 0,50	: 0,50	: -	: 1	: -
IV c	: 0,69	: -	: 0,50	: 1	: -
V	: +	: +	: +	: -	: -
VI	: +	: +	: +	: +	: -
VII	: -	: -	: -	: +	: -

(*) - Nous remercions vivement le Docteur BAYARD de nous avoir

fourni le témoin 2,5- anhydro - D - mannitol.



Le composé II renferme 3 résidus de mannose pour 1 de 2,5 - anhydro - D - mannitol. Pour nous assurer de ce rapport molaire, nous avons chromatographié sur une colonne de Sephadex G 15 (1,5 x 100cm stabilisée dans l'eau les composés II de IC 1A et IC 1D (Fig. 45 ,p. 203). Nous avons récupéré une fraction II p (purifiée) représentant environ 80 % du composé II. Celle-ci était constituée de 3 résidus de mannose et 0,1 de galactose pour 1 de 2,5 - anhydro-D - mannitol.

Le composé III ne renferme que du galactose et du 2,5 - anhydro - D - mannitol dans le rapport 1 : 1.

Le composé V contient du 2,5 - anhydro - D - mannitol, mais aussi en plus petite quantité deux substances qui possèdent des temps de rétention en chromatographie en phase gazeuse égaux à ceux du mannose et du galactose. Or celles-ci ne peuvent être constituées de ces deux monosaccharides pour deux raisons :

- si leurs migrations chromatographiques sur papier correspondent à peu près à celles du mannose et du galactose, nous aurions dû voir apparaître du mannitol et du galactitol puisque les fractions sont réduites avant d'être analysées en chromatographie en phase gazeuse.
- il reste la possibilité de l'existence de deux disaccharides et d'un trisaccharide composés de : galactose - 2,5 - anhydro - D - mannose; mannose - 2,5 - anhydro - D - mannose ; galactose - mannose - 2,5 - anhydro - D - mannose. Mais de tels composés posséderaient une migration chromatographique sur papier plus faible que le 2,5 - anhydro - D - mannose.

En outre, on ne retrouve pas les rapports normaux existant entre les différents isomères du mannose ou du galactose quand ils sont analysés en chromatographie en phase gazeuse. La seule hypothèse valable est d'admettre qu'un résidu de N - acétyl - glucosamine particulier puisse se transformer en 2,5 - anhydro - D - mannose et en d'autres composés dont la nature pourrait être déterminé en spectographie de masse.

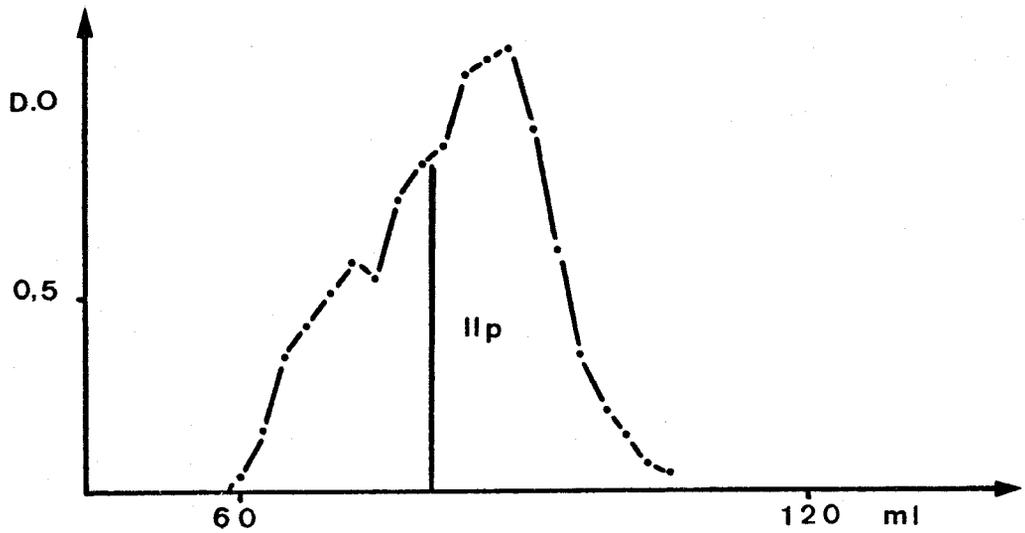


Figure 45.

Chromatographie sur une colonne (1,5 x 100 cm) de Sephadex G 15 du composé II isolé de la fraction neutre des diazotats des glycopeptides IC 1A et IC 1D - Repérage au réactif de DUBOIS et al. (67)

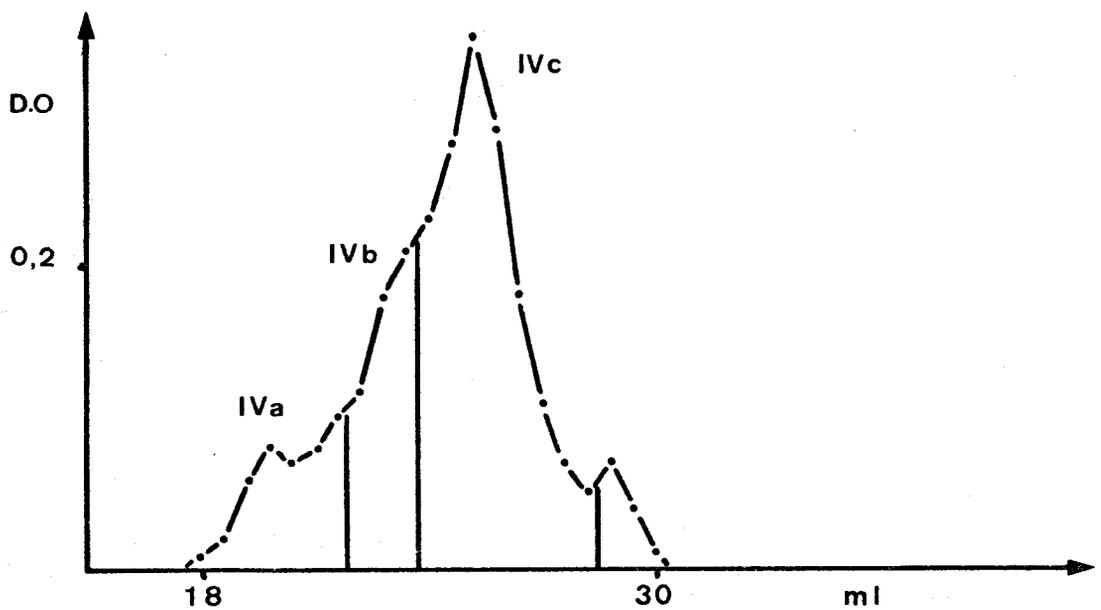


Figure 46.

Chromatographie sur une colonne (0,7 x 80 cm) de Biogel P₂ (200 - 400 mesh) du composé IV isolé de la fraction neutre des diazotats du glycopeptide IC 1D - Repérage au réactif de DUBOIS et al. (67)



Les composés mineurs IV, VI et VII contiennent tous du fucose. Seul le composé VII n'est constitué que de fucose, mais celui-ci ne se révèle fortement au réactif à l'oxalate d'aniline qu'après hydrolyse acide, c'est-à-dire après libération de sa fonction réductrice. Nous n'avons pu faire une analyse approfondie du composé VI vu sa quantité trop faible.

Le composé IV possède une migration chromatographique sur papier d'un disaccharide mais il est constitué de galactose, mannose, fucose et de 2,5 - anhydro - D - mannitol. Nous l'avons fractionné sur une colonne (0,7 x 80 cm) de Bio-gel P₂ (200 - 400 mesh) stabilisée dans l'eau (Fig. 46 , p. 203). Nous avons récupéré trois fractions : IV a, IV b et IV c. Seules les fractions IV b et IV c ont pu être analysées car elles représentent environ 90 % du composé IV natif. Dans les deux, nous avons retrouvé le fucose et le 2,5 - anhydro D - mannose. La fraction IV b contenait en plus une substance possédant le temps de rétention du mannose et la fraction IV c, une autre possédant celui du galactose. Ces deux substances ressemblent aux **constituants** que nous n' avons pu identifier avec certitude dans le composé V. Le composé IV contiendrait donc le disaccharide : fucose - 2,5 - anhydro - D - mannitol.

b - conclusion :

Nous avons démontré la présence dans les glycopeptides d'IgG₁ d'un tétrasaccharide composé de mannose et de N - acétyl - glucosamine dans le rapport 3/1 et d'un disaccharide constitué de galactose et de N - acétyl - glucosamine. Les divers résultats sont en faveur d'un branchement du fucose sur un résidu de N - acétyl - glucosamine.

2.- Détermination des rapports molaires des oligo et monosaccharides présents dans les éluats neutres des diazotats des glycopeptides.

Les rapports molaires des différents fragments glucidiques

ont été déterminés par le comptage de la radioactivité portée par le résidu de 2,5 - anhydro - D - mannitol présent dans chaque oligosaccharide après réduction par le borohydrure tritié et séparation chromatographique sur papier (p.104). Les diagrammes obtenus sont rassemblés dans la figure 47 (p.206) et les résultats du comptage des différentes fractions obtenues dans le tableau XLIII (p.207).

Discussion - Conclusion :

Les rapports molaires des composés II et III démontrent qu'il existe dans les glycopeptides natifs 2 chaînes disaccharidiques (Gal → GlcNAc) pour un seul tétrasaccharidique (Man₃ → GlcNAc). Les proportions entre les composés V et II, obtenus à partir du glycopeptide IC 1A confirment l'existence de deux résidus de N - acétyl - glucosamine en tandem au niveau de la liaison protéine-glycane, démontrée précédemment par les résultats de l'oxydation périodique. Le faible rendement du composé V et l'apparition du composé VII dans le cas du glycopeptide IC 1D riche en fucose sont en faveur du branchement du résidu de fucose sur la N - acétyl - glucosamine impliquée dans la liaison protéine-glycane. Nous expliquons la présence du composé V par le fait que la liaison fucosyl est connue pour être très labile. Elle serait partiellement rompue lors des réactions d'hydrazinolyse - diazotation.

3.- Méthylation des composés II et III.

Après réduction par le borohydrure de potassium, les oligosaccharides ont été perméthylés. L'hydrolysat du composé II méthylé contenait le 2,4 - di - O - méthyl - D - mannose, le 2,3,4,6 - tétra - O - méthyl - D - mannose et le 1,3,6 - tri - O - méthyl - 2,5 - anhydro - D - mannitol, et celui du composé III, le 2,3,4,6 - tétra - O - méthyl - D - galactose et le 1,3,6 - tri - O - méthyl - 2,5 - anhydro - D - mannitol.

conclusion :

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus après la

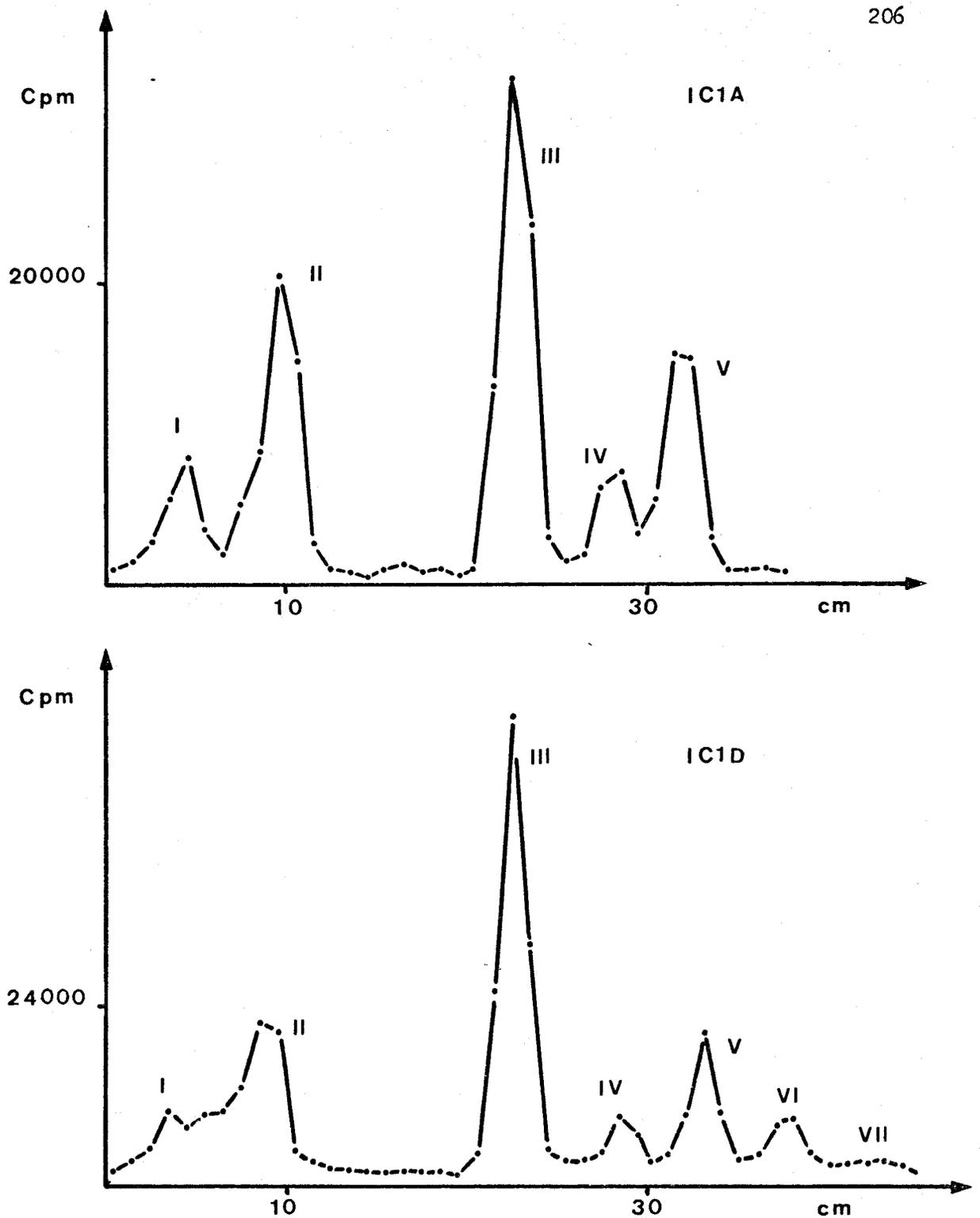


Figure 47.



Diagrammes du comptage de la radioactivité des oligosaccharides réduits des diazotats des glycopeptides chymotrypsiques (IC 1A et IC 1 D) après séparation chromatographique sur papier dans le système solvant : pyridine, acétate d'éthyle, acide acétique, eau - (5 : 5 : 1 : 3).

T A B L E A U XLIII.

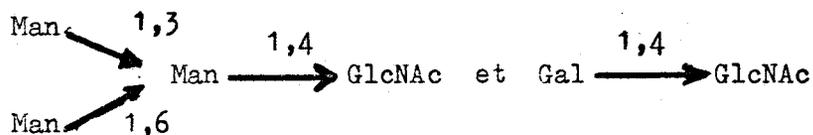
Rapports molaires des constituants de la fraction
neutre des diazotats des glycopeptides IC 1A et IC 1D.

Composés	Composition	Glycopeptides	
		IC 1A	IC 1D
I	mélange de monosaccharides	0,36	0,33
II	(Man) ₃ ; (2,5 - anhydro - <u>D</u> - mannitol) ₁	1 (*)	1 (*)
III	(Gal) ₁ ; (2,5 - anhydro - <u>D</u> - mannitol) ₁	1,48	1,8
IV	Fuc ; 2,5 - anhydro - <u>D</u> - mannitol	0,30	0,27
V	2,5 - anhydro - <u>D</u> - mannitol	0,76	0,56
VI	-	-	0,26
VII	Fuc.	-	traces

(*) - pris comme référence égal à 1.



méthylation totale des glycopeptides natifs et démontrent la structure du tétrasaccharide et des deux disaccharides identiques existants dans les glycanes natifs, à savoir :



Comme les résidus de N - acétyl-glucosamine ne sont pas substitués en C6 le fucose est donc branché en C6 sur le 4ème résidu de N - acétyl-glucosamine situé au niveau du point-d'attache avec la protéine.

4.- Détermination du branchement du fucose dans le glycopeptide IC 1D.

Pour démontrer, sans ambiguïté, le branchement du fucose sur la N - acétyl - glucosamine impliquée dans la liaison protéine-glycane, nous avons rompue celle-ci par la soude en milieu réducteur (p. 106). Après hydrazinolyse et diazotation le glucosaminitol est transformé en 2 - désoxy - D - glucose et les autres résidus de glucosamine en 2,5 - anhydro - D - mannose. Nous avons réduit au borohydrure tritié les produits obtenus avant de les séparer par chromatographie sur papier. Le diagramme du comptage de la radioactivité est reporté dans la figure 48 (p. 209). Le composé II correspond au tétrasaccharide : (Man)₃ - 2,5 - anhydro - D - mannitol, le composé III, au disaccharide : Gal - 2,5 - anhydro - D - mannitol. Le composé IV contient du fucose, du 2,5 - anhydro - D - mannitol et le 2 - désoxy - glucitol dans les rapports : 1 : 0,47 : 0,49.

Discussion - Conclusion :

Cette expérimentation permet d'affirmer que le fucose est bien branché sur la N - acétyl - glucosamine participant à la liaison protéine - glycane selon le schéma suivant :

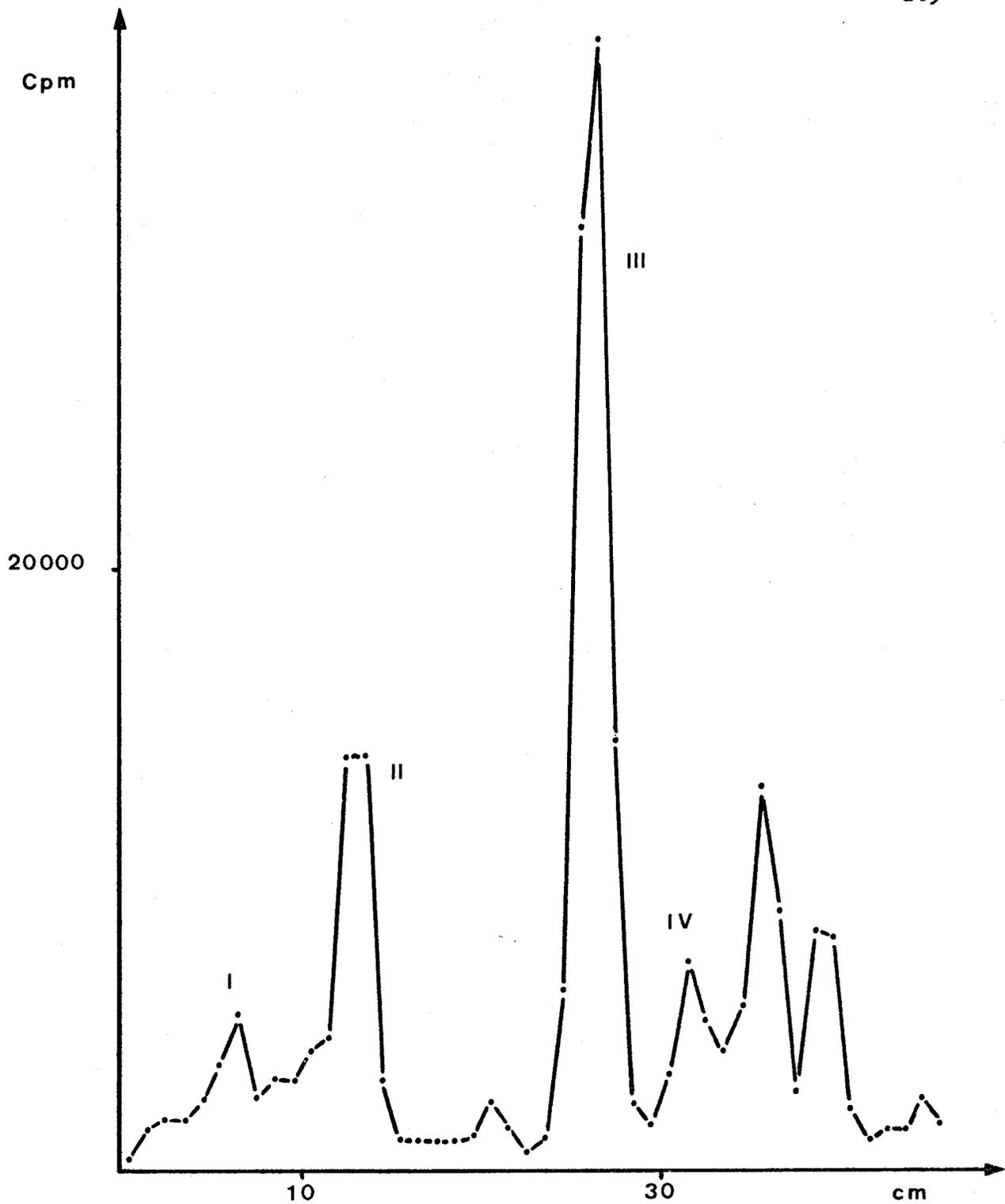
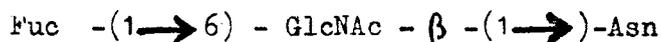


Figure 48.



Diagramme de la mesure de la radioactivité des oligosaccharides réduits du diazotate du glycopeptide IC 1D préalablement soumis à l'action de la soude en milieu réducteur. Séparation chromatographique sur papier Whatman n°3 dans le système solvant : pyridine, acétate d'éthyle, acide acétique, eau. (5 : 5 : 1 : 3).



De ce fait, les divers composés inconnus présents dans les diazotats des glycopeptides IC 1A et IC 1D (non soumis à l'action de la soude en milieu réducteur) proviennent bien d'une dégradation partielle de cette N - acétyl - glucosamine.

B - LES OLIGOSACCHARIDES ACIDES ISOLES DU GLYCOPEPTIDE IC 1A.

1.- Fractionnement et composition.

Après l'action du nitrite de sodium la fraction acide des diazotats reste fixée sur la colonne de Dowex 1 x 4 lors du dessalage (p.104). Nous avons élué cet échangeur d'ions par une solution d'acide formique à 2%. Les quatre fractions collectées ont été repérées par le réactif à la diphenylamine de NIAZI et STATE (204) modifié par WERNER et ODIN (283). Le diagramme du fractionnement est reporté dans la figure 49(p.211). Nous avons rassemblé la composition de ces fractions dans le tableau XLIV (p.212). Le premier composé (I) élué contient de la N - acétyl - glucosamine et un taux élevé en mannose : il représente la fraction incomplètement modifiée par hydrozinyolyse - diazotation. Les trois autres sont constitués de galactose, de 2,5 - anhydro - D - mannose et d'acide N - acétyl neuraminique natif ou modifié. En comparant les temps de rétention en chromatographie en phase gazeuse de l'acide N - acétyl - neuraminique et de ses dérivés avec ceux de la N - acétyl - glucosamine, de la glucosamine et du glucose, déterminés par ZANETTA et al. (288), nous avons conclu que les dérivés de l'acide N - acétyl - neuraminique étaient l'acide neuraminique lui-même et l'acide dérivant de celui-ci après désamination nitreuse.

Ce raisonnement est en accord avec l'ordre d'élution des fractions II, III, IV de la colonne d'échangeur d'anions et avec leur migration électrophorétique à pH 3,9 / MICHL (179) // : le composé II possède celle d'une substance neutre et les composés III et IV celle

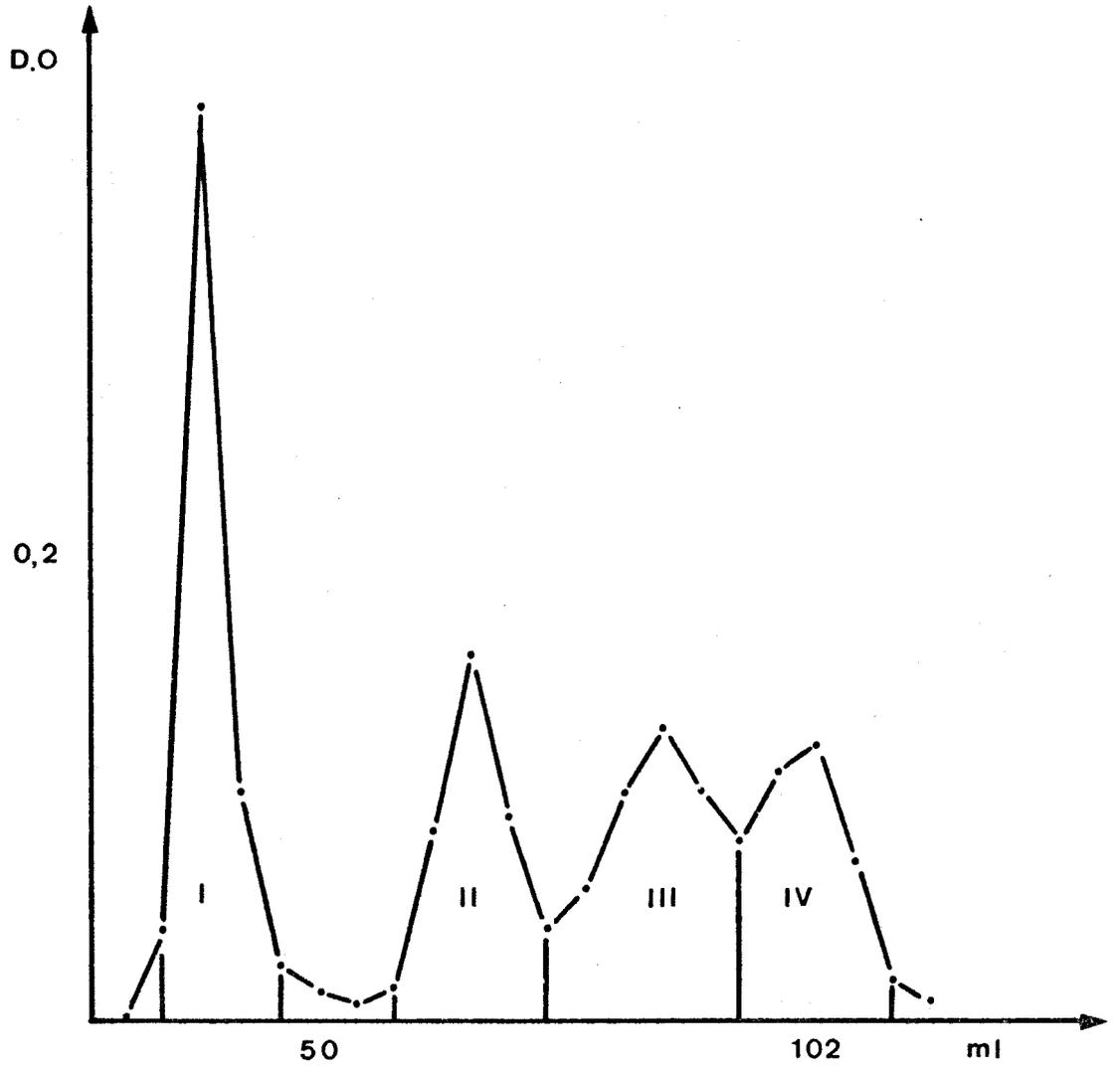


Figure 49.

Diagramme d'élution de la colonne de Dowex 1 x 4 (200 - 400 mesh) par une solution d'acide formique à 2 %. Repérage par le réactif de WERNER et ODIN. (283)



T A B L E A U XLIV.

Composition des oligosaccharides acides isolés
des diazotats du glycopeptide IC 1A.

Composés	I	II	III	IV
Acide neuraminique	+	+++++	+	-
Acide N-acétyl neuraminique	+	+	+++++	+
Acide neuraminique désaminé par NaNO_2	+	-	+	+++++
Galactose	1,25	1	1,18	0,92
Mannose	3 (a)	+	+	-
2,5 -anhydro - <u>D</u> -mannitol	0,88	1 (a)	1 (a)	1 (a)
N - acétyl - glucosamine	0,48	-	-	-

(a) - pris comme référence.

de l'acide N - acétyl - neuraminique.

2.- Méthylations.

Les composés II et IV ont été méthylés selon le procédé décrit page 98. Leurs hydrolysats chlorhydriques contenaient le 1,3,6 - tri - O - méthyl - 2,5 - anhydro - D - mannitol, le 2,3,4 - tri - O - méthyl - D - galactose et le 2, 3, 4, 6 - tétra - O - méthyl - D - galactose.

Conclusion :

Les fractions II, III et IV dérivent d'un seul et même trisaccharide natif constitué d'acide N - acétyl - neuraminique, de galactose et de N - acétyl - glucosamine.

Les résultats de la méthylation confirment l'enchaînement présumé (p. 196) suivant : ANAN -(2→6)- Gal -(1→4)- GlcNAC. La présence du tétra - méthyl - D - galactose est logique compte tenu de la fragilité de la liaison "sialyl".

V.- DETERMINATION DE L'ANOMERIE DES LIAISONS.

Nous avons déterminé les anoméries de cinq types de liaison : ANAN -(2→6)- Gal ; Gal -(1→4)- GlcNAC ; Man - (1→3)- Man ; Man - (1→6) - Man et Glc NAC - (1→2) - Man.

A - ACTION DE LA NEURAMINIDASE DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS.

L'hydrolyse enzymatique a été effectuée sur le glycopeptide IC 1C selon le protocole décrit page 108. Les produits de la réaction ont été fractionnés sur une colonne de Bio-gel P₂ (200 - 400 mesh). La première fraction éluée était repérée par le réactif de DUBOIS et al. (67) et contenait le glycopeptide sans acide sialique. La seconde donnait des réactions négatives avec le réactif précédent et positive avec le réactif de NIAZI et STATE (204). L'obtention d'un

glycopeptide dépourvu d'acide sialique après action de la neuraminidase de Clostridium perfringens démontre l'existence d'une liaison d'anométrie " α ".

B - ACTION DE LA β - D - GALACTOSIDASE DE FEVE JACK.

La détermination de l'anométrie " α " ou " β " a été réalisée par la β - D - galactosidase de Fève Jack sur la disaccharide :

Gal - (1 \rightarrow 4) - 2,5 - anhydro - D - mannitol, obtenu à partir des diazotats des glycopeptides IC 1A et IC 1D. Après 20 h. d'hydrolyse, les produits ont été dessalés sur échangeurs d'ions (p.108). La fraction neutre a été chromatographiée sur papier dans le système solvant pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5 : 5 : 1 : 3). Le chromatogramme a été révélé par le réactif de PARTRIDGE (217) à l'oxalate d'aniline. Environ 80 % du galactose présent dans le disaccharide ont été libérés par l'enzyme. L'anométrie de la liaison est donc du type " β ".

C - ACTION DE L' α -D-MANNOSIDASE DE "BROMELAIN".

L' α -D - mannosidase de la "Bromelain" (p.109) a libéré environ 1,5 μ M de mannose à partir de 1 μ M du tétrasaccharide :
(Man)₃ \rightarrow 2,5 - anhydro - D - mannitol. Les deux liaisons, Man -(1 \rightarrow 3) - man et Man -(1 \rightarrow 6) - Man, possèdent de ce fait la même anométrie " α ".

D - ACTION DE LA β - D - GLUCOSAMINIDASE DE FEVE JACK.

Les résidus de galactose du glycopeptide I C 1 B ont été détachés par action de la β - D - galactosidase de Fève Jack. Le glycopeptide modifié, purifié par chromatographie sur Bio-gel P₂, a été soumis à l'action de la β - D - glucosaminidase (p.109). Le nouveau glycopeptide a été isolé par chromatographie sur Bio-gel P₂. Son analyse montre que le nombre de résidus de glucosamine libérés est fonction du taux d'hydrolyse du galactose lors de l'action de la β -D - galactosidase. Ce résultat démontre que les liaisons des deux résidus externes de glucosamine branchés sur le noyau trimannosidique possèdent l'anométrie " β ".

VI.- DETERMINATION DU POINT DE BRANCHEMENT DE L'ACIDE N - ACÉTYL - NEURAMINIQUE DANS LE GLYCOPEPTIDE IC 1A.

La présence d'un seul dérivé d'acide N - acétyl - neuraminique posait le problème de savoir s'il était indifféremment branché sur l'un ou l'autre des deux résidus de galactose. Pour le résoudre, nous avons fait agir successivement la β - D - galactosidase et la β - D - glucosaminidase de Fève Jack et l' α - D - mannosidase de "Bromelain" sur le glycopeptide IC 1A. Ce glycopeptide modifié était purifié par chromatographie sur Bio-gel P₄ et P₂, puis méthylié. Le nouveau dérivé méthylié du mannose qui est apparu est le 2, 3, 4 - tri - O - méthyl - D - mannoside. Ceci implique que le résidu d'acide N - acétyl - neuraminique est branché sur le bras lié au mannose central par une liaison (1 \longrightarrow 6) (Fig. 50, p.216)

VII.- CONCLUSIONS.

D'après les résultats obtenus en appliquant les quatre techniques suivantes : la méthylation, l'oxydation périodique, l'hydrazinolyse - diazotation et les hydrolyses enzymatiques, nous pouvons en déduire la structure des glycanes des Ig G1 du colostrum de vache qui répond au schéma de la figure 50 (p.216).

Cette structure est identique à celle des glycanes de l'IgE (BAENZIGER et al. (10)) et des IgG humaines (KORNFELD et al. (136)).

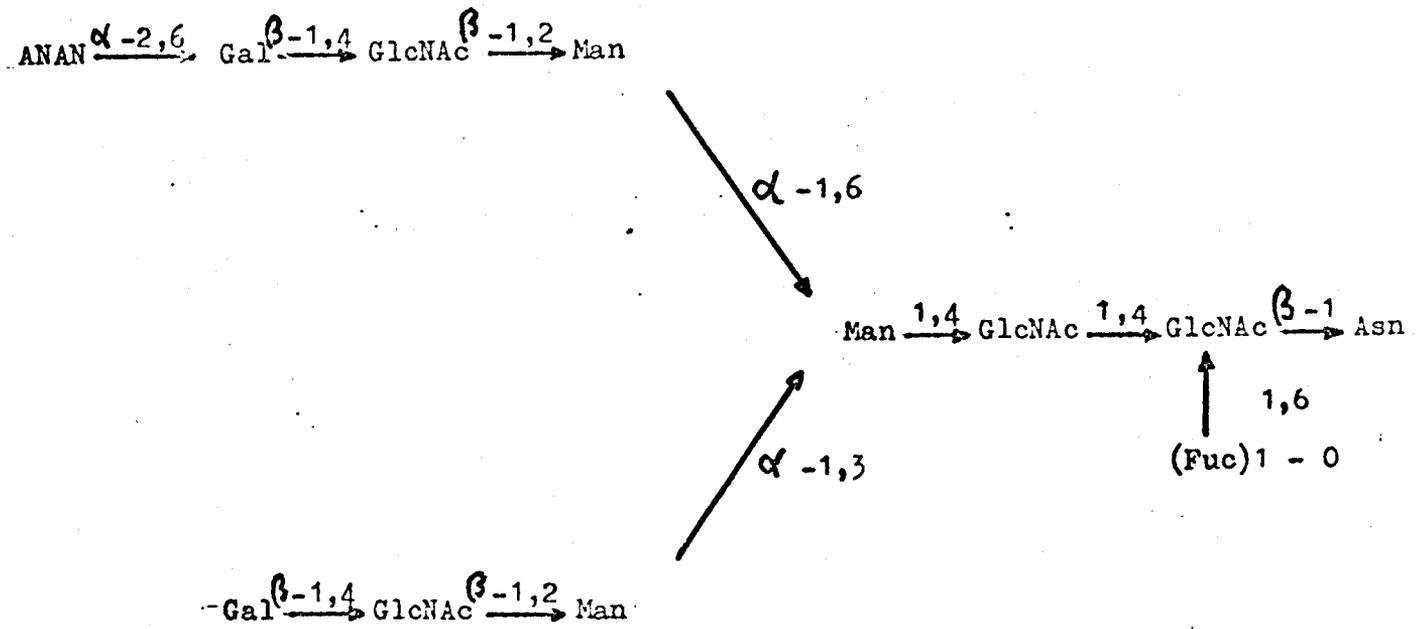


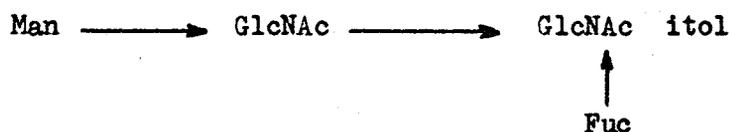
Figure 50.

Schéma de la structure des glycanes des
IgG du colostrum de Vache.

Nous retrouvons le noyau mannotriosique dont un résidu de D - mannose, substitué en 5 et 6 constitue le point de ramification du glycanne. Cet oligosaccharide est commun à l'ovomucoïde, la fétuine, l'orosomucoïde, la séro- et la lactotransferrine humaines (BAYARD)(14) et aux Ig M (HICKMAN et al. (111)). Cette analogie de structure entre les glycannes de diverses glycoprotéines fut posée en hypothèse, dès 1962, par MONTREUIL et al. (186).

L'encombrement stérique dû au résidu de fucose branché sur la N - acétyl - glucosamine liée à l'asparagine explique l'hydrolyse incomplète des glycopeptides par la chymotrypsine.

La position de ce résidu de fucose est identique à celle démontrée par KOIDE et MURAMATSU (134) dans les IgG sérique de Vache et par BAENZIGER et al.(10) dans les IgE humaines. Les premiers ont isolé le glycopeptide Fuc → GlcNac → peptide grâce à l'utilisation d'une endo - N - acétyl - glucosaminidase et les seconds l'oligosaccharide



par l'emploi d'exo-glycosidases et par l'action de la soude en milieu réducteur. Ces derniers n'ont pas isolé le disaccharide Fuc → GlcNac natif ou modifié. L'obtention de 0,5 résidu de N - acétyl - glucosaminitol après oxydation périodique leur permet d'en déduire le branchement du fucose.

Par contre, le lieu de branchement du résidu d'acide N - acétyl - neuraminique est différent de celui déterminé par BAENZIGER et al. (10) dans les glycannes des IgE. Notre résultat est en accord avec les travaux récents de TAI et al. (272) sur les glycannes partiellement galactosidés des IgG sériques de Vache.

CHAPITRE II.

:
:
:
: LA LACTOTRANSFERRINE . :
:
:

Les études que nous avons entreprises sur la lactotransferrine du lait de Vache (ou "Red protein" de GROVES) (98) avaient pour but de résoudre trois problèmes :

- 1 - son isolement rapide,
- 2 - l'isolement et le fractionnement de ses glycopeptides pour les comparer à ceux de la lactotransferrine du lait de Femme,
- 3 - vérifier son degré de résistance aux enzymes protéolytiques du tractus digestif du Nourrisson comparée à celle de la lactotransferrine humaine (étudiée par MAZURIER - DEHAINE) (173).

Ces trois directions de recherche correspondent à un objectif bien précis : substituer dans l'alimentation du Nourrisson la lactotransferrine du lait de Femme par celle du lait de Vache.

Ce chapitre sera donc divisé en trois parties répondant aux trois thèmes de recherche que nous nous étions fixés.

 :
 : ISOLEMENT ET PROPRIETES PHYSICO - CHIMIQUES :
 :
 : DE LA :
 :
 : LACTOTRANSFERRINE DE VACHE. :
 :
 :-----

A priori, vouloir mettre au point un nouveau procédé d'isolement de cette glycoprotéine apparaissait inutile vu que plusieurs méthodes existaient déjà (p.62,63,64 et 65)(GROVES)(99); (SEUCHET - DERECHIN) (269); (ORAM et REITER) (212). Mais ces techniques de préparation étaient inapplicables à une production industrielle.

L'étude du précipité P₂ obtenu par le fractionnement au rivanol (p. 134) du colostrum de Vache nous incita à mettre au point une nouvelle méthode basée sur cette chromatographie d'échange de cations (S E - Sephadex C - 50). Les seuls problèmes qui nous restaient à résoudre étaient :

- d'éviter l'étape du fractionnement au rivanol,
- de rechercher le substrat de départ et les conditions opératoires qui nous permettraient d'obtenir les meilleurs rendements,
- d'appliquer notre technique à l'échelle industrielle sur un substrat issu des fromageries.

I - PROCEDE D'ISOLEMENT.

A - PROCEDE GENERAL.

Pour éviter l'étape du fractionnement au rivanol, nous avons pris comme substrat de départ le lactoserum préparé selon la technique décrite page 113.

Dans une première série d'expériences, nous avons stabilisé les colonnes de S E - Sephadex C - 50 /ou S P - Sephadex C - 50 (*)/ dans le tampon utilisé lors du fractionnement des IgG1 (p. 125).

Très rapidement, nous nous sommes aperçus que la plupart des protéides du lactoserum hormis la lactotransferrine et la lactoperoxydase étaient éluées de l'échangeur de cations pour une concentration d'acétate de sodium égale à 0,22 M (pH 5,5). Notre mise au point fut facilitée par la connaissance du pHi de ces deux glycoprotéines. GROVES (98) donne une valeur de 8 pour la lactotransferrine et POLISH et SHMUKLER (225) de 9,6

.../

(*) - La firme Pharmacia ayant remplacé sa production de S E - Sephadex par la S P - Sephadex.

pour la lactoperoxydase. Comme la plupart des protéides possèdent un pHi inférieur à 6, nous avons amené la concentration du lactoserum à 0,22 M en acétate de sodium sans ajuster le pH qui se trouvait alors égal à environ 6,4. Notre procédé (Fig.51 ; p.222) consiste à chromatographier du lactoserum ainsi préparé jusqu'à ce que la colonne de S E - Sephadex G - 50 soit saturée en lactotransferrine. Ensuite, nous éluons l'échangeur d'ions avec une solution d'acétate de sodium 0,265 M. La lactoperoxydase se retrouve dans l'éluat. Puis, par le passage d'une solution molaire d'acétate de sodium, nous recueillons la lactotransferrine. Comme nous avons chromatographié une quantité importante de lactoserum (parfois légèrement trouble) nous chromatographions de nouveau cette solution de lactotransferrine impure sur une colonne de S E - Sephadex C - 50 dans les mêmes conditions. Mais, l'éluat est réalisé par un gradient discontinu en acétate de sodium de molarité et de pH croissants. Nous obtenons alors une préparation de lactotransferrine, élue pour une concentration de 0,5 M, pure en électrophorèse sur bande d'acétate de cellulose et en gélose ainsi qu'en immunoélectrophorèse.

B - RECHERCHE DES CONDITIONS EXPERIMENTALES POUR OBTENIR UN RENDEMENT OPTIMAL.

1.- Modification de l'étape de "décaséination".

Pour chromatographier sur une colonne d'échangeur d'ions une grande quantité de solution, il faut que celle-ci soit limpide pour éviter un colmatage. Aussi, nous avons remarqué que la précipitation de la caséine était parfaite, lorsqu'après avoir ajusté le pH d'un lait délipidé à 4,6 (HCl 4 N) nous le soumettions à une dialyse de trois jours contre de l'eau distillée, renouvelée chaque jour. Et comme les micelles de caséine sont maintenues en suspension en partie par les ions calcium, pour accentuer la précipitation, nous avons poursuivi la dialyse pendant 5 jours. Grâce à cette modification, nous avons

Lactosérum, amené à une concentration de 0,22 M en acétate de sodium, chromatographié sur une colonne de S E - Sephadex C - 50 stabilisée dans la même solution (0,22 M en acétate de sodium). La colonne est lavée avec une solution d'acétate de sodium 0,265 M.

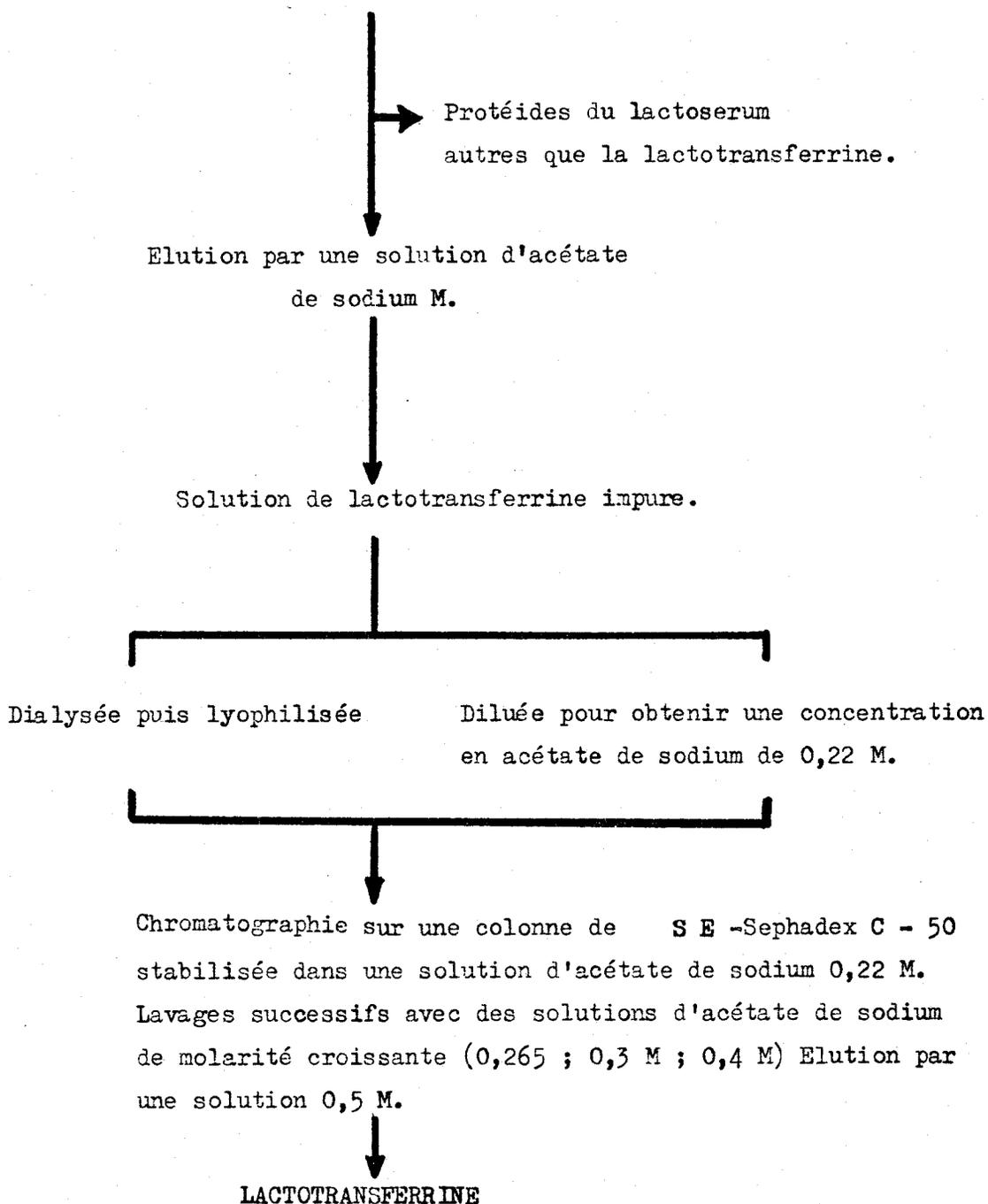


Figure 51.

Isolement de la lactotransferrine du lait de Vache
(Procédé général)

doublé le rendement en lactotransferrine. Par la dialyse, nous extrayons une partie de la lactotransferrine contenue dans la fraction caséinique d'où GROVES (98) l'avait extraite pour la première fois.

2.- Influence de la saturation en fer de la lactotransferrine.

La lactotransferrine obtenue par notre procédé est partiellement saturée en fer. Mais nous avons remarqué qu'il y avait un gradient de coloration (rouge) décroissant de la partie supérieure vers la partie inférieure de nos colonnes de S E - Sephadex C - 50.

La lactotransferrine saturée en fer possédait une affinité plus grande pour l'échangeur de cations. De ce fait, nous avons ajouter de 4 à 10 ml de la solution de chlorure ferrique de AZARI et BAUGH (9) par litre de lactoserum. Notre rendement en lactotransferrine a été augmenté de 20 %.

3.- Choix du substrat de départ.

D'après la cinétique de lactation (p.69), le taux de lactotransferrine varie très fortement suivant que l'on traite le colostrum, le lait stabilisé ou la sécrétion sèche.

Nous avons donc choisi comme substrat de départ, du colostrum et du lait de Vache en fin de lactation. Dans le colostrum des premiers jours après le vêlage, nous avons constaté que le taux de lactotransferrine diminuait très rapidement et devenait égal à celui d'un lait stabilisé dès le 5ème jour. Le premier jour, nous en avons extrait 300 mg/l, le second, 100 mg/l et 50 mg/l le troisième et le quatrième jour.

Par contre, nous avons pu isoler des quantités comprises entre 200 et 500 mg par litre à partir d'un lait d'une Vache en fin de lactation. Ce résultat confirme les expériences de SMITH et al. (249) (p.69). Les meilleurs rendements étaient obtenus avec des Vaches qui ne fournissaient que 2 à 4 litres de lait par jour.

C - ISOLEMENT DE LA LACTOTRANSFERRINE A PARTIR D'UN LACTOSERUM DE FROMAGERIE.

Le lactosérum que nous avons traité nous a été fourni par la fromagerie STENVAL (*). Le seul traitement physique subi par le lait était un chauffage à 75° C pendant 30 secondes. Le lactosérum récupéré après essorage du fromage qui contenait les eaux de lavage (1500 l d'eau pour 6000 l de lait au départ) était de nouveau délipidé à l'usine. Ensuite, après l'avoir additionné d'acétate de sodium (0,22 M), il était chromatographié directement sur une colonne de S E - Sephadex C - 50. Nous appliquons ensuite le protocole général décrit précédemment. (Fig. 51 p. 222)

La présence de particules de caséine en suspension dans le lactosérum nous a posé un problème de clarification. Nous avons essayé plusieurs systèmes de filtration (**). Mais les filtres se colmataient très rapidement. Lorsque nous réussissions à obtenir un lactosérum limpide, nous ne récupérions pratiquement plus de lactotransferrine. La seule technique qui nous ait donné satisfaction se résume en une filtration rapide sur papier Whatman n°3. Le lactosérum obtenu était encore très trouble mais cela ne gênait en rien la chromatographie pourvu que la colonne de S E - Sephadex soit montée avec de la laine de verre et ne contienne pas de papier filtre (pour maintenir l'échangeur d'ions).

Pour 50 l. de lactosérum, nous avons utilisé :

- 6 filtres de papier Whatman n°3 (0,37 m²),
- environ 2 kg d'acétate de sodium,

.../

(*) - Nous remercions chaleureusement Monsieur JANOSKY et ses collaborateurs (plus particulièrement Monsieur PROUVOST) de nous avoir fourni ce lactosérum avec tant de gentillesse.

(**) - Nous remercions vivement Monsieur BOLDIN de nous avoir documenté sur différents systèmes de filtration.

- une colonne de 15 x 20 cm de S E - Sephadex C - 50 (récupérable).

Nous avons récupéré, après une nouvelle chromatographie sur S E - Sephadex C - 50 (Fig.51 p. 222), 572 mg de lactotransferrine pure en électrophorèse sur bande d'acétate de cellulose et en gélose et en immunoélectrophorèse, soit un rendement de 11,5 mg par litre de lactosérum. Ce taux de récupération peut être augmenté de 7 mg par litre par un recyclage du lactosérum sur une nouvelle colonne de S E - Sephadex C - 50. Ce rendement est augmenté de 20 % si l'on se réfère à un lactosérum non dilué par les eaux de lavage. En définitive, nous pouvons extraire 23 mg de lactotransferrine pure à partir d'un litre de lactosérum non dilué. En outre, la rentabilité de la méthode peut être augmentée par le fait que notre colonne de S E - Sephadex C - 50 était loin d'être saturée et qu'elle n'était nullement colmatée. Bien entendu, nous pourrions obtenir un rendement plus élevé en saturant la lactotransferrine en fer, mais nous savons (p.70) qu'elle perdrait son pouvoir bactériostatique.

II - PROPRIÉTÉS PHYSICO - CHIMIQUES.

Les propriétés physiques et chimiques de la lactotransferrine de Vache ont été bien étudiées par GROVES (98) ; SZUCHET - DERECHIN et JOHNSON (270) ; CASTELLINO et al. (45) et dernièrement par BROWN et PARRY (31). Ces derniers auteurs démontrent d'une part, que le tryptophane n'intervient pas directement dans la liaison protéine-fer alors que cette liaison est probable avec les résidus de tyrosine, et d'autre part, que les atomes de fer stabilisent la conformation de la molécule de la lactotransferrine native.

En conséquence, notre étude des propriétés physico-chimiques n'a eu comme objectif que de déterminer le degré de pureté de nos préparations et surtout de définir avec précision un substrat

de départ pour entreprendre des études structurales.

A - PROPRIETES PHYSIQUES.

1.- Masse moléculaire.

La masse moléculaire oscille entre 95000 et 76000 suivant la méthode utilisée. Nos résultats se rapprochent de ceux de CASTELLINO et al. (45) mais s'éloignent de ceux de GROVES (98) et de SZUCHET - DERECHIN et JOHNSON (270) (Tableau XLV)(p. 227).

2.- Le point isoélectrique. (Fig.52 ; p.228)

Nous avons recherché le pHi par électro-focalisation (p. 80). Les valeurs que nous avons déduites de la courbe des pH varient entre 8, 5 et 5, 9. Ce résultat est en désaccord avec la valeur de 8 déterminée par GROVES (98). Mais, dans notre cas particulier, la technique que nous avons employée est critiquable. Par immuno-électrophorèse, nous avons pu constater que la migration électrophorétique de la lactotransferrine variait avec son degré de pureté. Ainsi, dans le lactosérum, sa migration est beaucoup plus anodique (à pH 8,2) que pure en solution. Elle possède une très grande affinité pour les substances acides. Or, dans la technique d'électro-focalisation, le pH est établi par des substances amphotères dont certaines possèdent obligatoirement un caractère acide. De ce fait, en se combinant à ces substances, la lactotransferrine acquiert un pHi plus acide.

B - PROPRIETES CHIMIQUES.

1.- Composition en glucides:(Tableau XLVI ; p.229)

Le pourcentage d'oses neutres que nous avons déterminé

TABLEAU XLV.
Propriétés physiques des lactotransférines du
Lait Humain et du Lait de Vache.

	Lactotransferrine de Vache				Lactotransferrine humaine.			
	a.	b.	c.	d.	e.	f.	g.	h.
Constante de sédimenta- tion $S^{20} \times 10^{15}$	5,55	5,75	-	-	4,8 & 5,1	5,55	4,95	5,55
Constante de diffusion	5,75	5,65	-	-	4,6	-	5,6	-
Viscosité intrinsèque	-	-	-	-	-	-	-	4
Volume spécifique partiel	-	-	0,722	-	-	0,735	-	-
- calculé	-	-	-	-	-	0,732	-	-
- mesuré	0,725	0,736	-	-	-	0,715	-	-
Point isoélectrique	7,8	-	-	8,51 6,61 5,9	-	5,5	6,9	-
Masse moléculaire suivant différentes méthodes ($\times 10^{-5}$)	86,1	-	-	81	100	75 & 98	80	-
- la teneur en fer	86,1	-	-	-	-	-	-	-
- constantes de sédi- mentation et de diffusion	86,1	93	-	-	95	-	75	-
- équilibre de sédi- mentation	-	-	-	77,1	-	-	-	76,7
- chromatogramme de filtration	-	-	-	77	-	76	-	-
- électrophorèse en gel de polyacrylamide	-	-	-	76	-	-	-	-
- viscosité et coef- ficient de sédimen- tation	-	-	-	76 & 78	-	-	-	78,1
$1 \times \lambda = 280$	15,1	14,6	14,5	14,4 - 14,7	-	-	14,6	-
$1 \text{ cm } \lambda = 465$	0,55	0,42	0,55	0,49	0,5	0,57	0,547	-

(a) - GROVES (98) (e) - MONTEVILLI, et al., (191)

(b) - SZUCHEK - DERECHIN et JOHNSON (271) (f) - SPIK (260)

(c) - CASTELLINO et al., (45) (g) - MASSON (164)



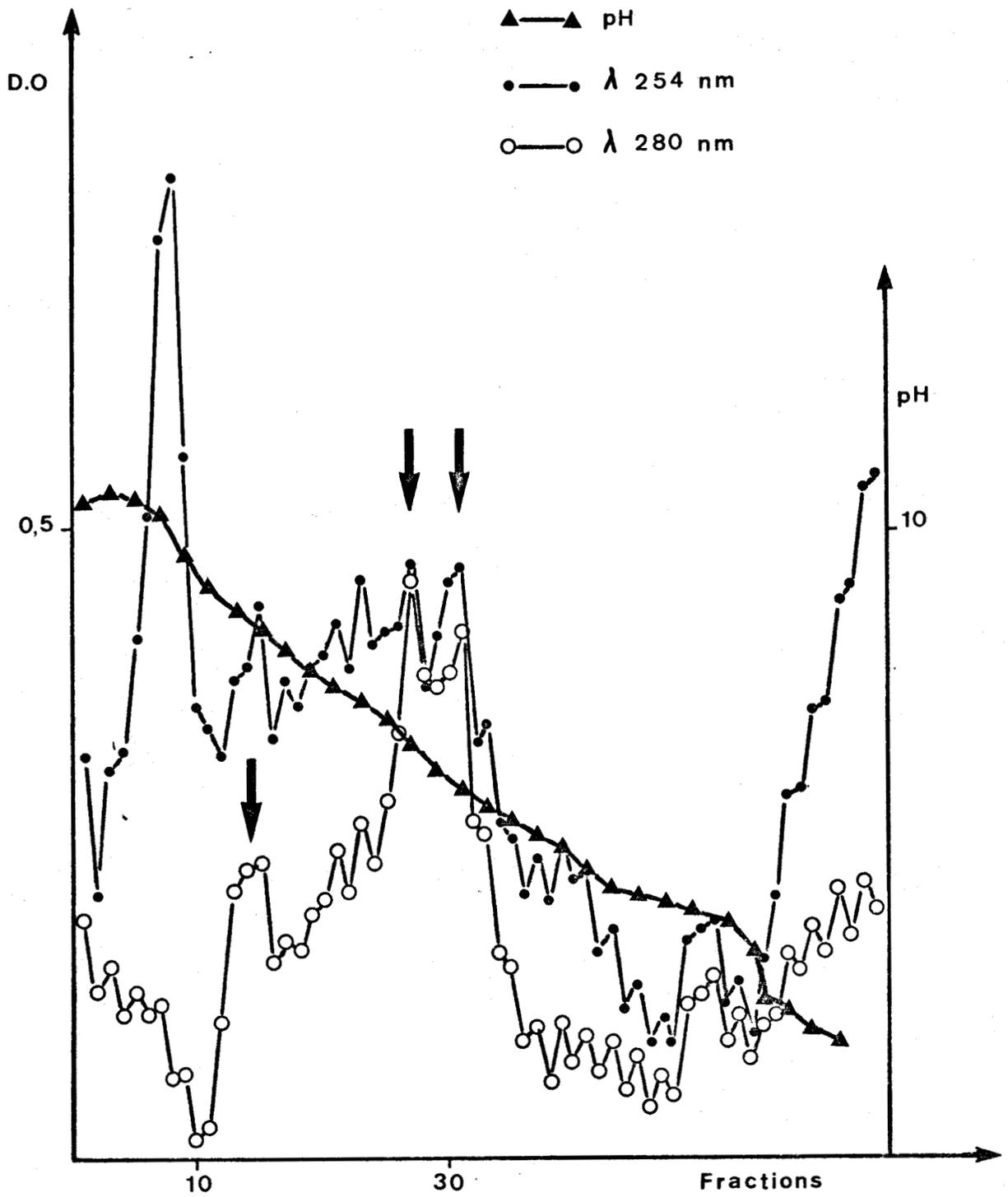


Figure 52.

Diagramme d'électro-focalisation de la lactotransferrine
de Vache.



T A B L E A U XLVI.

Compositions centésimale et molaire en glucides des
lactotransferrines du lait Humain et du lait de Vache.

Composition centésimale	lactotransferrine de vache.				lactotransferrine humaine.		
	a.	b.	c.	d.	f.	g.	h.
- Oses neutres	4,73	5,6	5,6	5,37	3,9	3,11	3,11
- Osamines	2,28	-	2,7	2,75	2,4	2,43	2
- Acides sialiques	0,3	-	0,6	0,66	0,87	1,22	1,22
Composition molaire							
- D - Man	-	15-16	24(e)	24 (e)	7	5	5
- D - Gal	-	5-6	1,15	1,46	10	5	6
- L - Fuc	0	0	0,4	0,33	5	4	3
- D - GlcN	-	10-11	6,75	7,2	13	10	8
- D - GalN	-	0	1,15	1,5	-	-	-
- ANAN	-	1	0,66	1,12	3	3	3

(a) GROVES (98)

(b) CASTELLINO et al. (45)

(c) Résultats personnels (à partir de lait frais) (pour une masse moléculaire de 77 000)

(d) Résultats personnels (à partir de lactosérum de fromagerie) (pour une masse moléculaire de 77 000)

(e) pris comme référence.

(f) MONTREUIL et al. (191) et MONTREUIL et al. (184) pour une masse moléculaire de 90 000.

(g) SPIK (259) pour une masse moléculaire de 76 000.

(h) DEBRAY - VANDERSYPPE (59)

BUS
LILLE

est identique à celui donné par CASTELLINO et al. (45). Par contre, la composition molaire des oses neutres rapportées par CASTELLINO et al. (45) ne concorde pas avec celle que nous trouvons. Cet auteur précise qu'il y a 5 à 6 résidus de galactose par molécule. Or, par deux techniques différentes (p. 76) nous n'en avons mis en évidence qu'un seul résidu. Nous ne nous expliquons pas ce désaccord, mais nous devons néanmoins signaler que l'étape de désaturation est importante. En effet, quand nous désaturons la lactotransferrine par la méthode classique décrite par SPIK (259) nos préparations contenaient 6 à 7 résidus de glucose par molécule. Le glucose est éliminé quand nous désaturons la lactotransferrine par chromatographie sur une colonne de Bio-gel P 150 stabilisée dans l'acide formique 0,1 N (\approx pH 2,4)

La présence de la galactosamine, dans nos diagrammes de dosage des oses, selon la technique de ZANETTA et al. (288) nous a intrigué. Aussi, nous l'avons recherché en appliquant trois méthodes :

- procédé de GARDELL et al. (84) (p.77) basé sur la mise en évidence du lyxose après désamination par la ninhydrine.
- procédé de GARDELL (83) (p.77) dans lequel la glucosamine et la galactosamine sont séparées par chromatographie (Fig. 53 p.231) sur une colonne d'échangeur d'ions.
- dosage à l'auto-analyseur des amino-acides des glycopeptides (p. 78).

Les trois techniques nous ont donné un résultat positif et par la deuxième, nous avons obtenu un rapport GlcN/GalN égal à 6,4.

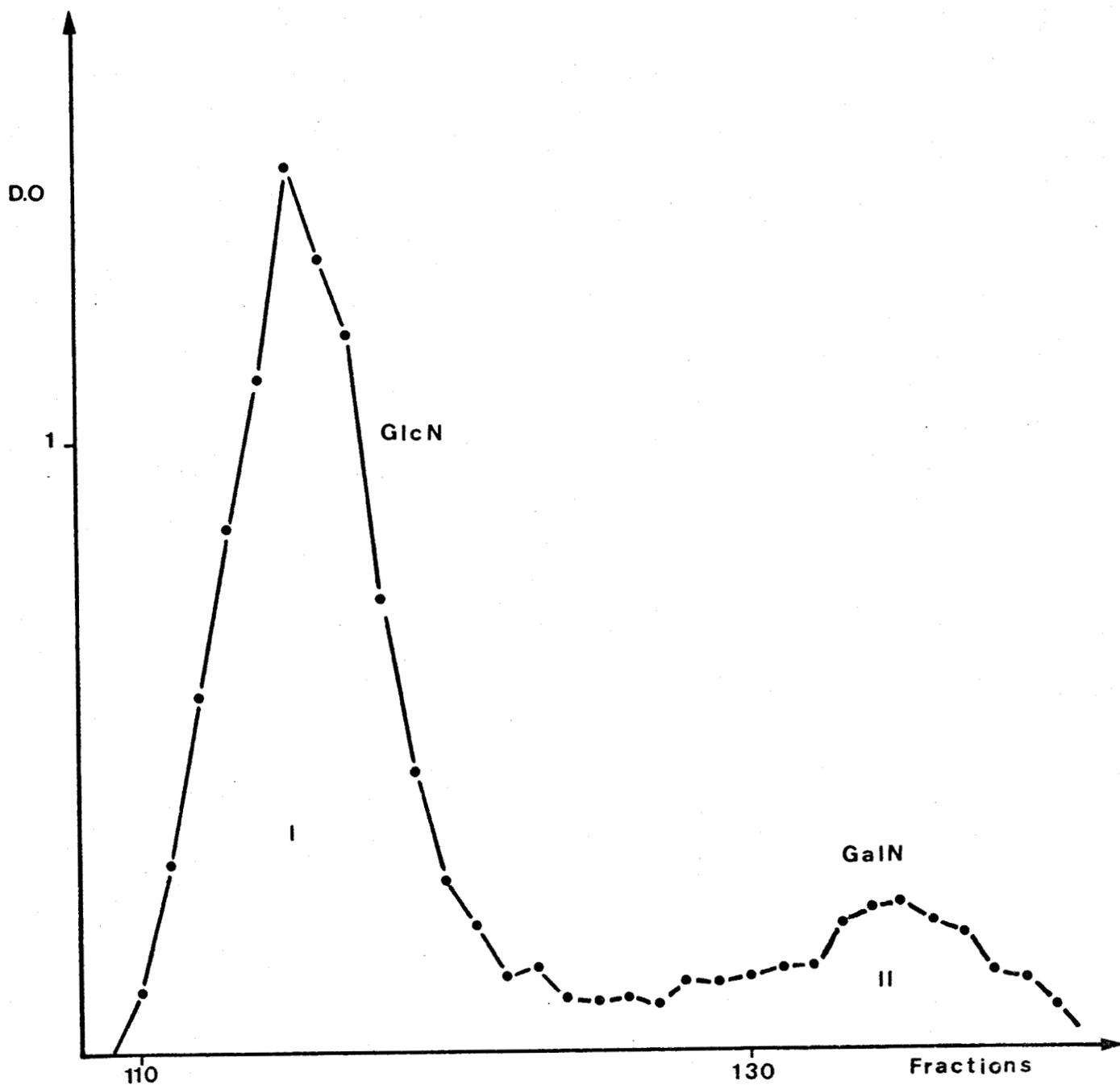


Figure 53.



Chromatographie d'un hydrolysate (HCl 4 N) de 100 mg de lactotransferrine sur une colonne (0,5 x 70 cm) de Dowex 50 x 8 (200 - 400 mesh) - Débit 2 ml/h - Fraction de 0,92 ml.

2.- Les acides aminés N et C - terminaux.

L'acide aminé N - terminal fut déterminé par deux méthodes : celle d'EDMAN et celle de GRAY et HARTLEY (p. 95,9). Dans chaque cas, nous n'avons retrouvé en accord avec CASTELLINO et al. (45) que l'alanine.

L'acide aminé C - terminal fut isolé par la méthode à l'hydrazine d'AKABORI et al. (2) (p. 93) à la seule différence que les hydrazides étaient extraits par la benzaldéhyde selon la technique de NIU et FRAENKEL - CONRAT (208). A l'auto-analyseur des amino-acides, nous avons dosé 0,9 résidu de thréonine et 0,4 résidu de valine. Ce résultat est à considérer avec circonspection car la méthode utilisée est très délicate. D'ailleurs, la répétition de l'expérience nous a toujours fourni des résultats ininterprétables.

3.- Dosage des amino-acides.

Dans la détermination du nombre de résidus d'acides aminés, nous avons tenu compte de la destruction (Thr, Ser) et de l'hydrolyse incomplète de certains acides aminés (Ileu, Leu, Val). Nos résultats ont été rassemblés dans le tableau XLVII (p. 233) en comparaison avec ceux de BLANC et al. (27); GORDON et al. (89) et CASTELLINO et al. (45).

III.- FRACTIONNEMENT DE LA LACTOPROTEININE.

Le profil d'éluion à 254 nm (λ) lors de la deuxième chromatographie sur S E - Sephadex C - 50 (Fig. 51 ; p. 222) ne donne pas un pic symétrique. Cette hétérogénéité a été signalée par GROVES et al. (100) qui la mirent en évidence par électrophorèse en gel de polyacrylamide à pH 9. Nous avons donc entrepris de tenter de résoudre ce problème.

A - FRACTIONNEMENT SUR D E A E - SEPHADEX A - 50.

Après plusieurs essais, nous avons choisi de stabili-

T A B L E A U XLVII.

Composition en acides aminés (exprimée en nombre de résidus d'acides aminés pour 10 000 g de glycoprotéide) des lactotransferrines des laits de Femme et de Vache.

Acides aminés	lactotransferrine de vache.				lactotransferrine humaine	
	a.	b.	c.	d.	e.	f.
Asp	8,5	7,4	9,2	8,8	9,2	8
Glu	9,3	7,7	9,4	9,3	10	7,5
Arg	4,9	-	4,1	4,5	6	4,9
His	1,4	1,2	1,2	1,35	1,4	1,1
Lys	7,5	5,7	5,4	6,6	6,4	5,2
Ala	8,3	7,4	7,6	8,8	8,2	6,2
Cys SH	4,3	4,2	3,6	4	3,6	4
Gly	6,3	5,6	5,5	6,4	7,5	6,4
Ileu	1,8	1,9	2,1	1,6	2,3	1,8
Leu	8	7,2	7,9	8,8	7,5	6,3
M et	0,37	0,58	0,52	0,4	0,68	0,39
Phe	3,8	3	3,2	3,4	4,2	3,2
Pro	4,4	3,7	4	3,9	4,8	3,8
Ser	5,5	4,6	5,8	7,2	5,9	5
Thr	4,4	3,9	5	4,9	4	3,8
Trp	1,9	1,7	1,1	2	0,11	0,75
Tyr	3,5	2,3	2,4	2,6	3,2	2,3
Val	5,1	5,1	5,5	5,7	5,7	4,4

(a) - BLANC et al. (27)(b) - GORDON et al. (89)(c) - CASTELLINO et al. (45)

(d) - Résultats personnels.

(e) - BLANC et al. (27)

(f) - SPIK (259).

BUS
LITE

ser les colonnes (5 x 20 cm) de D E A E - Sephadex A - 50 dans un tampon (Tris - HCl - 0,01 M) à pH 9,3 pendant 3 jours, ce qui correspond au passage d'environ 18 litres de tampon. Ensuite, nous injectons l'échantillon dont nous avons, au préalable, ajusté le pH à 9,3 et que nous avons **dialysé** pendant 3 jours contre le tampon de stabilisation. Puis, nous éluons les colonnes par des tampons (Tris - HCl - 0,015 M) de pH décroissant : 9,3 ; 9,15 ; 8,75 et 8,35. Nous avons reporté deux profils d'éluion dans la figure 54 (p.235)

B - DOSAGES DES GLUCIDES.

Nous avons dosé les glucides dans les deux fractions majeures I et II (Fig. 54; p.235) (Tableau XLVIII; p. 236) On constate que ces deux composés se différencient par leur taux d'acides sialiques et d'osamines. Cette variation se traduit également au niveau de la composition molaire. La fraction I est dépourvue de galactose, de fucose et d'acides sialiques.

IV - CONCLUSIONS.

Nous avons mis au point un procédé de préparation rapide de la lactotransferrine du lait de Vache. Et, en modifiant les différentes étapes, nous avons doublé le rendement habituel.

Les tentatives de fractionnement de cette glycoprotéine nous conduisent à penser qu'une première hétérogénéité existe au niveau des groupements glycaniques. Ceci expliquerait les résultats de dosage de GROVES (98) (Tableau XLVI ; p.229) qui isole la lactotransferrine par chromatographie sur D E A E - Cellulose.

Notre méthode, appliquée à un lactosérum de fromagerie, fournit une préparation de lactotransferrine qui possède la même composition (Tableau XLVI; p.229) que celle isolée d'un lait frais.

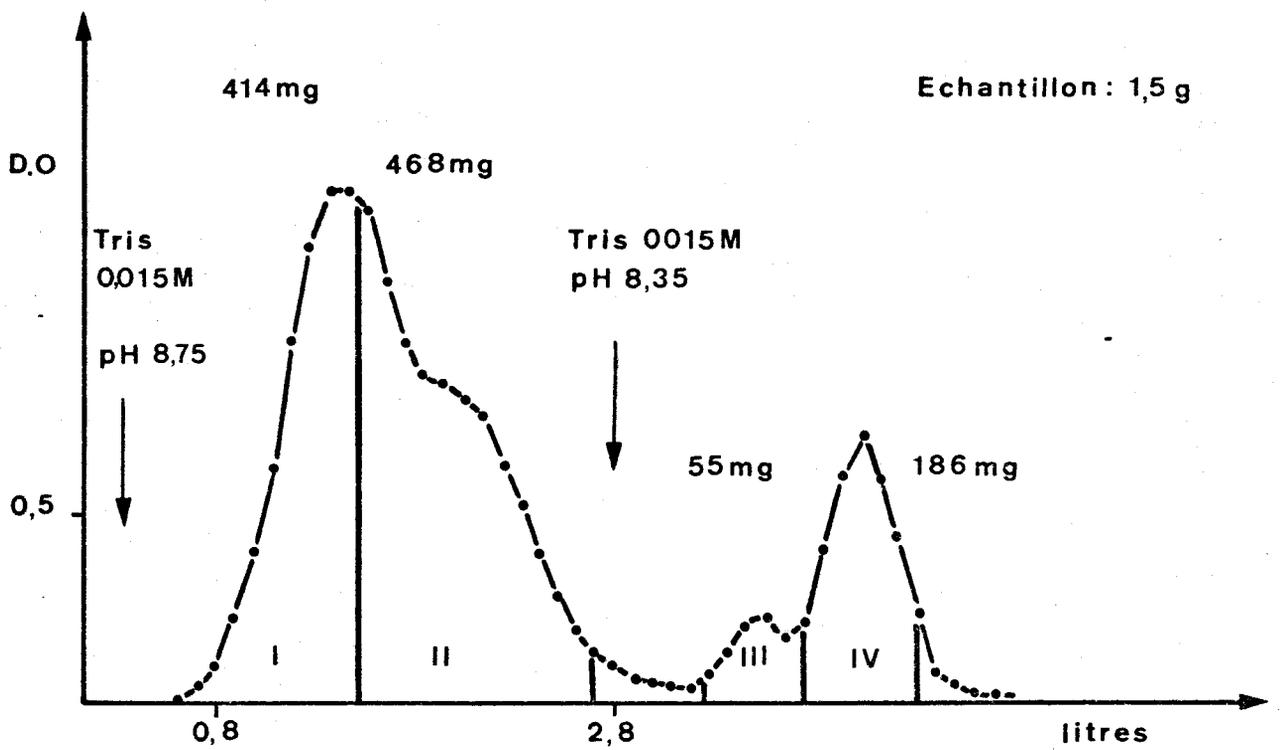
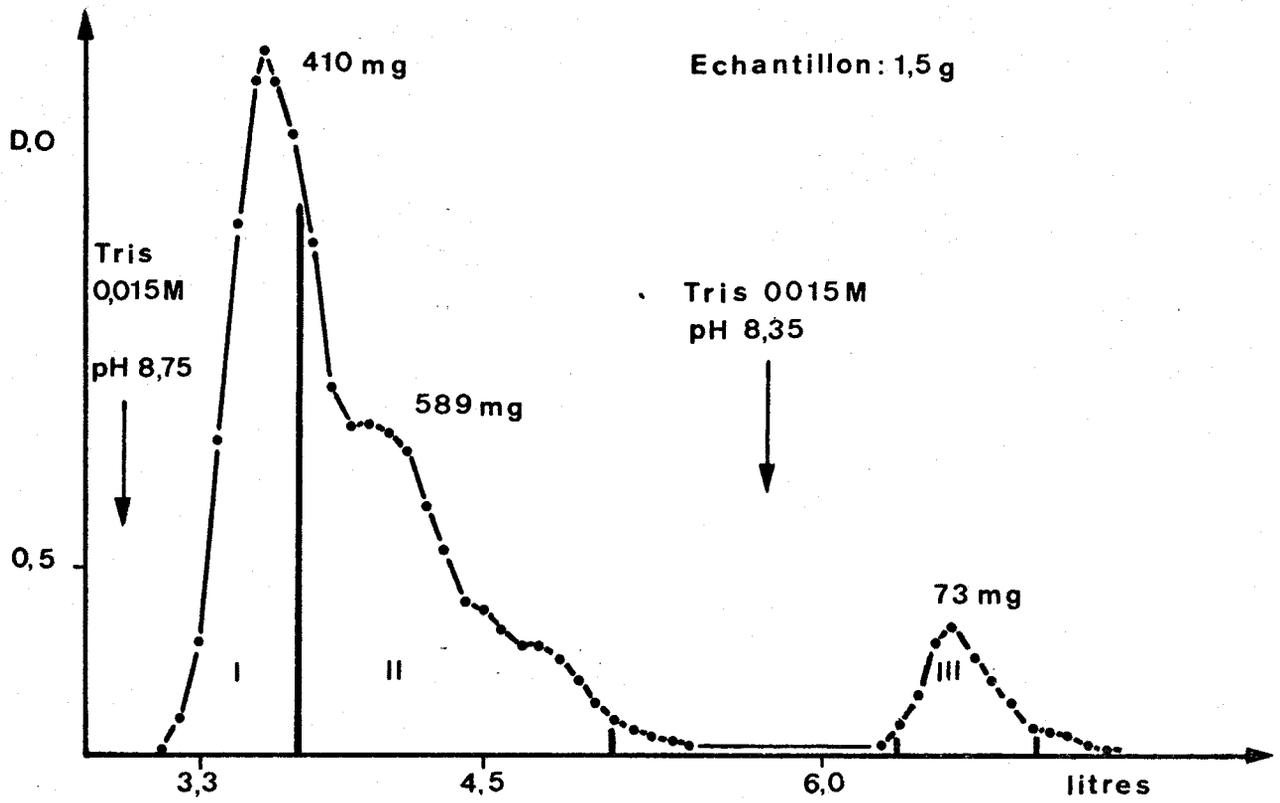


Figure 54.

Chromatographie sur D E A E - Sephadex de la lactotransferrine de Vache.

TABLEAU XLVIII.

Composition en glucides des deux fractions majeures
(FI et FII) (Fig. 54 ; p. 235) obtenues après chroma-
tographie de la lactotransferrine sur D E A E-Sephadex A - 50

Composition centésimale	Lactotransferrine native.	Fraction I.	Fraction II.
Oses neutres	5,6	5,4	5,5
Osamines	2,7	2,37	2,75
Acides sialiques	0,6	0,22	0,74
Composition molaire			
Man (*)	24	24	24
Gal	1,15	traces	1,7
Fuc	N.D.	traces	0,38
GlcNAc	6,75	5,98	7,44
GalNAc	1,15	0,99	1,41
ANAN	0,66	0	0,96

(*) - pris comme référence

N.D. - non dosé.



Nous pourrions, peut-être, rentabiliser notre technique, en ajustant simplement le pH des lactosérums à 6,4 sans ajouter d'acétate de sodium et en supprimant la filtration par une centrifugation en continu .

Enfin, notre procédé a été appliqué avec succès à l'isolement de la lactotransferrine humaine (LEGER) (147); (DEBRAY - VANDERSYPPE) (59).

 :
 : LES GLYCOPEPTIDES DE LA :
 : LACTOTRANSFERRINE :
 : DE VACHE. :
 :

Cette recherche visait trois objectifs, à savoir, déterminer :

- 1 - le nombre de groupements glycaniques par molécule,
- 2 - la structure peptidique à leur voisinage,
- 3 - leur structure glucidique.

L'étude de la structure glycanique n'a pas encore été abordée jusqu'à présent.

Comme dans le cas des IgG₁, pour résoudre les deux premiers problèmes, nous avons isolé des glycopeptides. Pour cela, nous avons utilisé trois enzymes : la pronase, la chymotrypsine et la trypsine. La première devait nous renseigner sur la nature de l'acide aminé impliqué dans la liaison protéine-glycane et les deux autres, nous permettre d'étudier la séquence peptidique près de ce point d'attache.

I - GLYCOPEPTIDES PRONASIQUEES.

A - ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES.

La lactotransferrine était, dans un premier temps, désaturée par chromatographie sur Bio-gel P 150 (p. 230). Après quatre hydrolyses par la pronase, les glycopeptides étaient purifiés selon la méthode schématisée dans la figure 37 (p. 149). Nous appellerons glycopeptides P, le mélange des glycopeptides récupérés après la chromatographie sur Sephadex G - 25 (fine)

B - FRACTIONNEMENT.

Ces glycopeptides P ont été fractionnés, d'une part, par électrophorèse préparative sur papier à pH 2,4 (acide acétique N) et d'autre part, par chromatographie, sur Sephadex G - 50 (fine). Dans le premier cas, nous avons isolés 9 fractions (P₁ à P₉) (Fig. 55 p. 239), dans le second, 3 fractions (P_a à P_c) (Fig. 56 p. 239).

C - COMPOSITION ET SEQUENCE PEPTIDIQUE.

Nous avons rassemblé dans le tableau XII (p. 240), les compositions en acides aminés des fractions P₁ à P₉. Nous avons pris l'acide aspartique comme référence et nous pouvons en conclure que la majorité des glycanes sont reliés à la protéine par cet acide aminé.

En analysant les dosages des glucides des fractions P_b et P_c (Tableau L p. 241), nous constatons que nous ne retrouvons pas les rapports molaires déterminés dans la molécule native. Nous avons isolé par ce procédé un type de glycopeptide particulier plus accessible à l'hydrolyse enzymatique. Ce fait sera confirmé, lors de l'étude des glycopeptides chymotrypsiques (p. 242)

Nous avons soumis le glycopeptide P_c à la dégradation

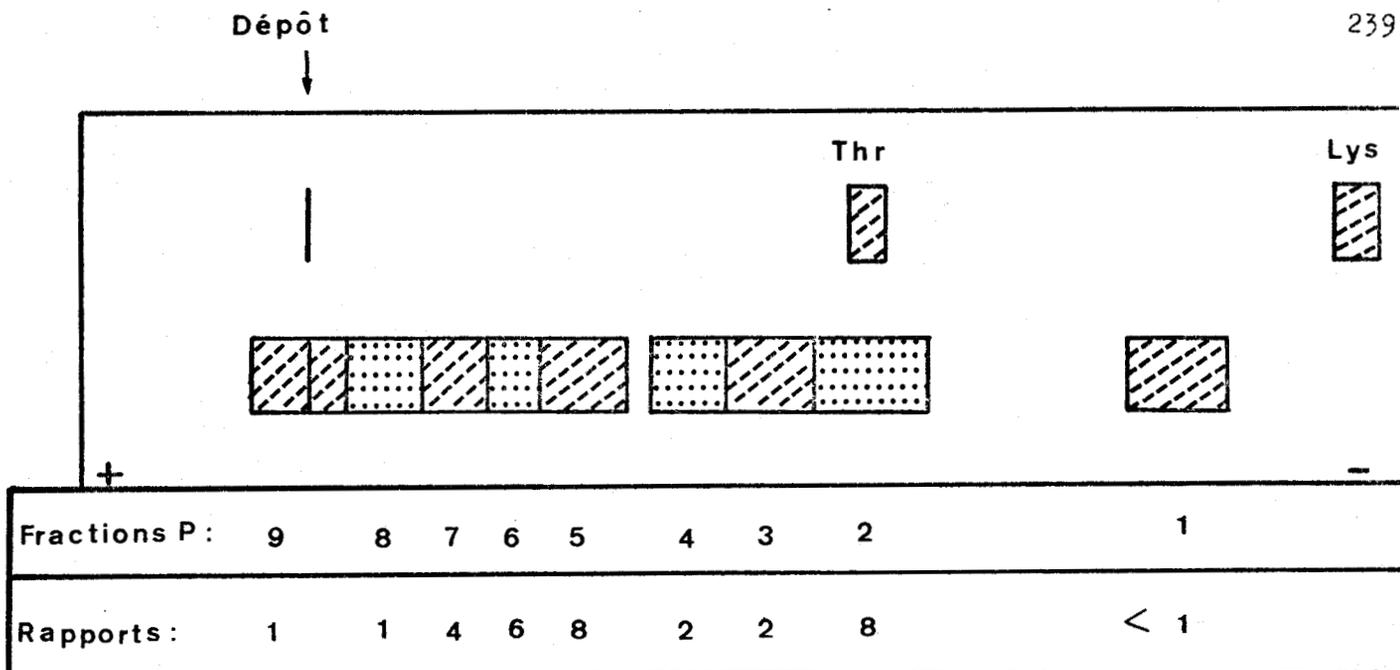


Figure 55.

Electrophorèse préparative des glycopeptides P
sur papier à pH 2,4 (acide acétique N)

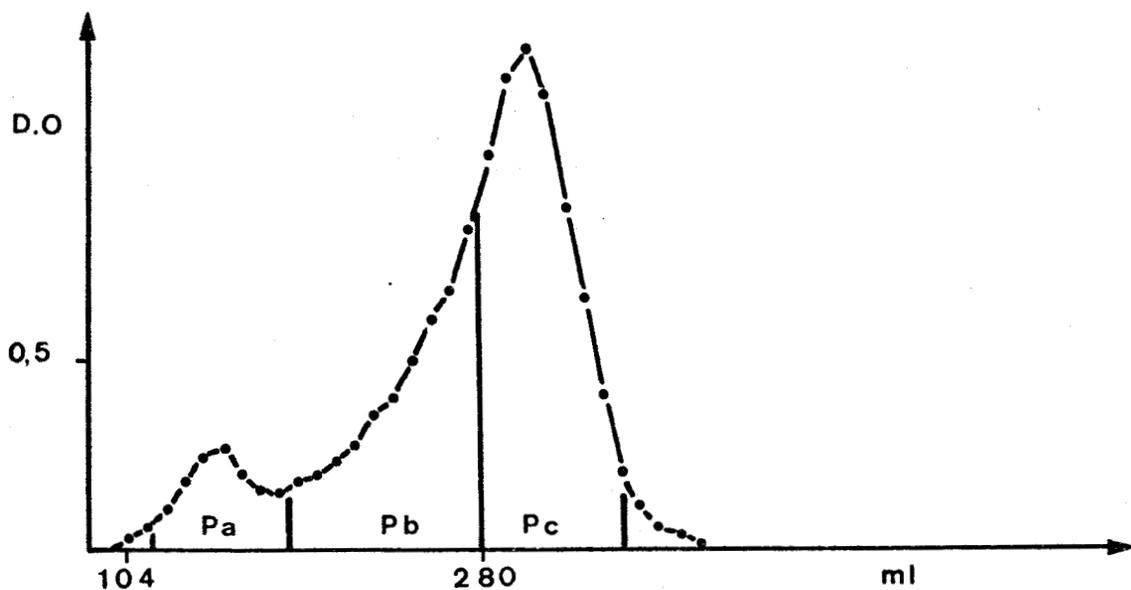
BUS
LILLE

Figure 56.

Fractionnement des glycopeptides P sur une colonne
(2 x 120 cm) ds Sephadex G - 50 (fine). Repérage par
la méthode de DUBOIS et al. (67)

T A B L E A U X I L

Composition des glycopeptides P isolés par
électrophorèse sur papier (Fig. 55 ; p. 239)

	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇	P ₈	P ₉
Asp (*)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Thr	0,44	-	-	-	-	-	-	-	-
Ser	0,20	-	-	-	-	-	-	-	-
Glu	0,30	0,72	0,54	0,22	0,87	0,58	0,50	0,94	0,86
Gly	0,21	-	-	-	-	-	-	-	-
GlcN	0,70	2,78	3,2	3,39	3,48	4,3	3,47	3,89	4,91
GalN	-	0,48	0,52	1,13	0,83	1,16	0,93	0,90	0,81

(*) - pris comme référence.



T A B L E A U L

Composition des glycopeptides P isolés par
chromatographie sur Sephadex G - 50

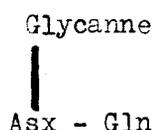
Composition en acides aminés	P _a	P _b	P _c
Asp (*)	1	1	1
Thr	0,34	0,17	0,14
Ser	0,25	-	-
Glu	0,71	0,69	0,45
Gly	0,32	-	-
Ala	0,26	-	-
GlcN	5,4	3,5	3,34
GalN	4,16	0,73	0,59
Composition en glucides.	N.D.		
Fuc	-	0,34	0,31
Gal	-	1,32	1,64
Man	-	4,27	5
GlcNAc (**)	-	3,5	3,34
GalNAc	-	0,81	1,09
ANAN	-	0,3	0,15

(*) et (**) pris comme référence ; N.D. : non dosé.

BNS
LKE

récurrente d'EDMAN. Nous avons dosé après hydrolyse acide, les acides aminés non modifiés et identifier les PTH - acides aminés formés (Tableau LI ,p.243)

Vu les résultats, la séquence des deux acides aminés est la suivante :



II - GLYCOPEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES.

Avant d'hydrolyser la lactotransferrine par les enzymes (p. 89) nous avons d'abord désaturé (p.230) la glycoprotéine et rompu les ponts disulfures selon le protocole décrit page 88. Les groupements thiols sont alors bloqués par l'éthylène -imine.

A - ISOLEMENT ET COMPOSITION DES GLYCOPEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES.

Nous avons schématisé dans la figure 57 (p.244) le protocole expérimental que nous avons suivi. A partir de 2,5 g de lactotransferrine native, nous avons isolé par électrophorèse en veine liquide (Fig. 58 p.245) trois fractions C I (8,4 mg) ; C II (22,4 mg) et C III (25,2 mg).

Les compositions de ces glycopeptides sont rapportées dans le tableau LIII (p.246). Nous avons réalisé des hydrolyses de 24 et 80 h, car la composition faisait apparaître une forte proportion d'acides aminés hydrophobes (Ileu,Leu,Val). D'après nos résultats, l'isoleucine et la valine font véritablement partie intégrante des glycopeptides contrairement à la leucine.

Nous avons, en outre, constaté que, seul, le glycopeptide C III contenait un acide aminé aromatique et que les glyco-

T A B L E A U L I

Analyse des acides aminés non modifiés de la fraction P_c
soumis à 2 cycles de la dégradation récurrente d'EDMAN et
identification des PTH - acides aminés formés.

	P _c natif.	P _c après le 1er cycle	P _c après le 2ème cycle
Asp	1	0,45	0,33
Thr	0,14	0,15	0,15
Glu	0,45	0,62	0,36
GlcN (*)	3,34	3,34	3,34
PTH - acide aminé	-	aucun	Gln (**)

(*) - pris comme référence.

(**) - en quantité très faible mais nettement identifiable.

LACTOTRANSFERRINE (2,5 g)

- désaturée par chromatographie sur Bio-gel P 150
- groupements thiols bloqués par l'éthylène-imine.
- hydrolyse par la chymotrypsine pendant 24 h.

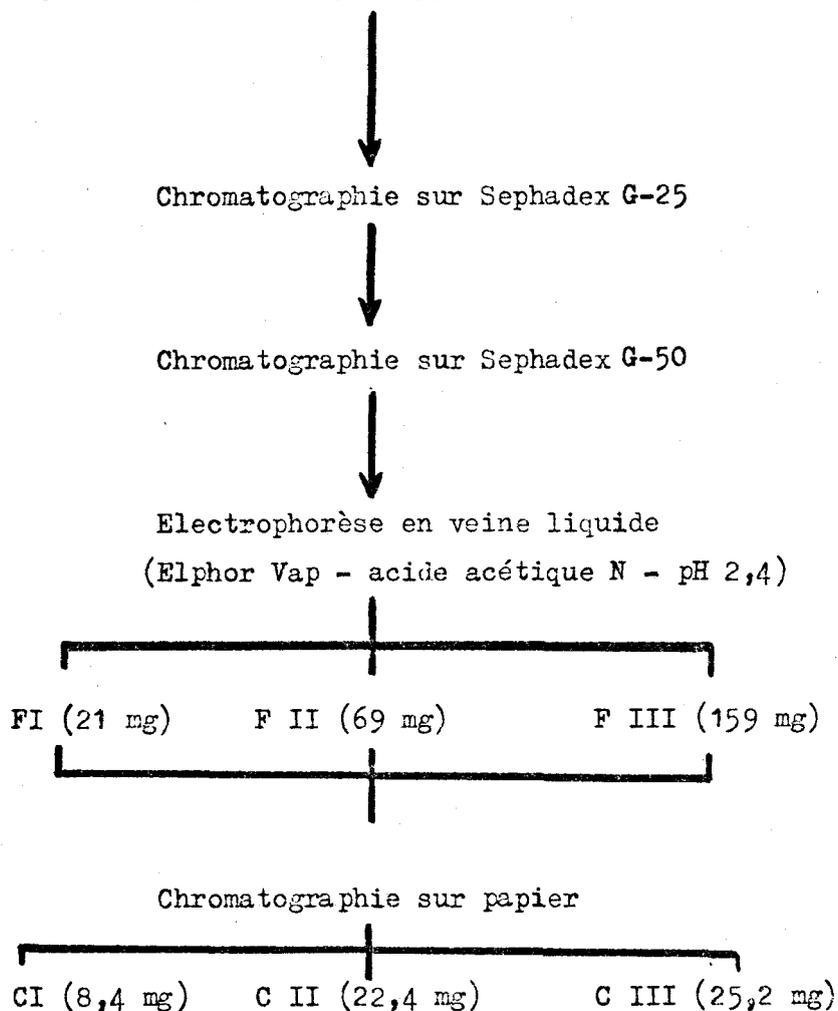


Figure 57.

Schéma d'isolement des glycopeptides
chymotrypsiques de la lactotransferrine de Vache.

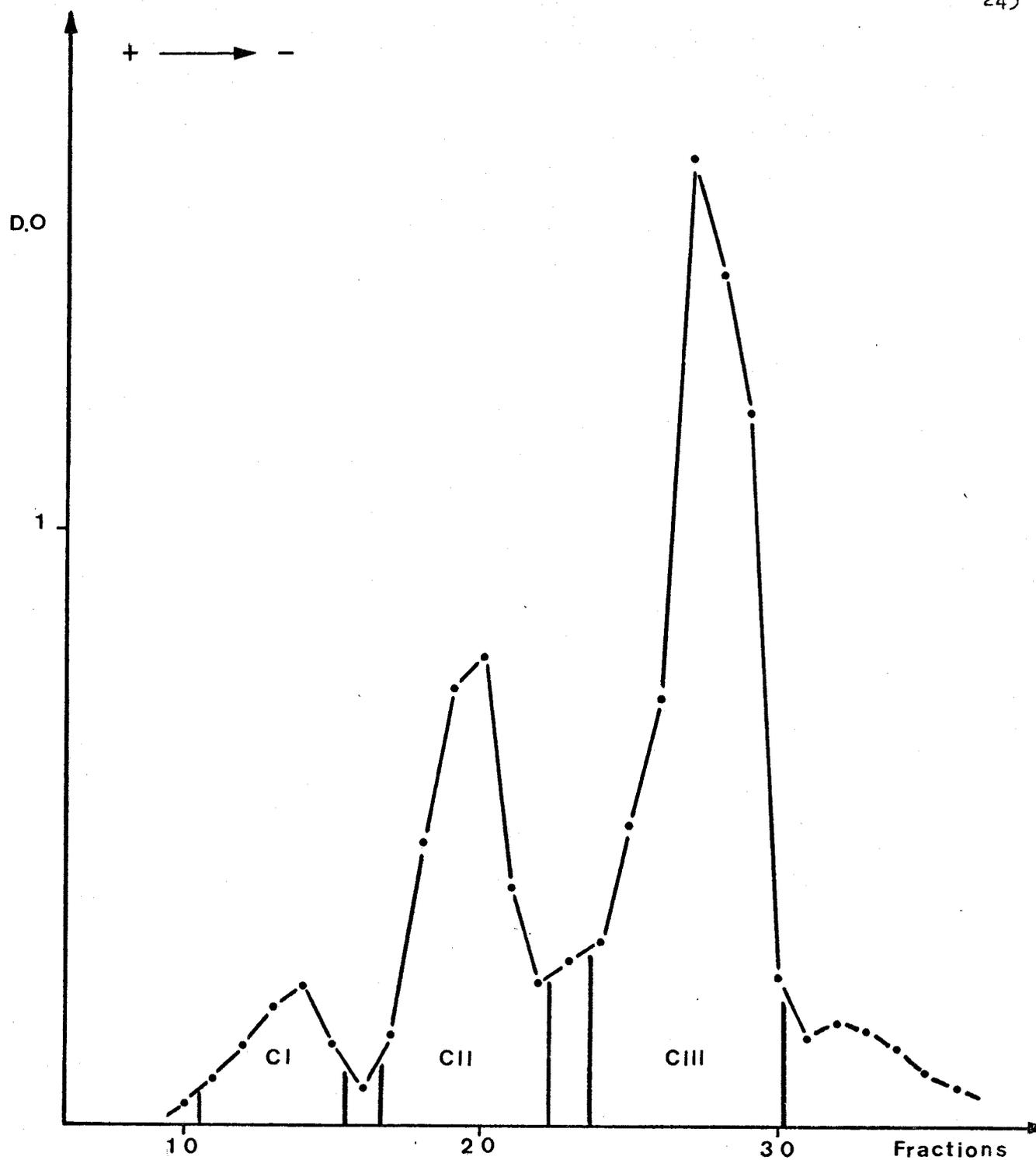


Figure 58.

Fractionnement des glycopeptides chymotrypsiques
 par électrophorèse en veine liquide à pH 2,4
 (acide acétique N)



T A B L E A U L I I

Composition des glycopeptides chymotrypsiques
de la lactotransferrine de Vache.

Glycopeptides	C I			C II		C III	
	Hydrolyse	24 h.	24 h.	80 h.	24 h.	80 h.	
Asp (*)		1	1	1	1	1	
Thr		0,81	0,72	0,76	0,18	0,22	
Ser		0,93	1,01	1	0,57	0,55	
Glu		1,07	1,32	1,36	0,30	0,35	
Gly		0,75	0,71	0,72	0,21	0,22	
Val		0,46	0,55	0,64	0,16	0,23	
Ileu		0,1	traces	0,14	traces	traces	
Leu		traces	traces	traces	traces	traces	
Lys		-	-	-	0,17	0,20	
Arg		-	-	-	0,38	0,36	
Trp (**)		-	-	-	Présent	-	
GlcN		3,79	2,40	2,45	1,44	1,45	
GalN		0,45	0,23	0,23	0,11	0,12	
Gal		0,89	0,86		0,20		
Man		3,9	7,5		8,65		
GlcNAc (*)		3,79	2,40		1,44		
GalNAc		0,51	0,29		0,23		
ANAN		0,32	0,36		0,07		

(*) - pris comme référence.

(**) - mise en évidence par hydrolyse par l'acide paratoluène sulfonique

peptides C I et C II possédaient la même composition en acides aminés.

La composition molaire en glucides est en accord avec celle de la glycoprotéine native. Nous retrouvons le taux élevé de mannose.

B - FRACTIONNEMENT ET STRUCTURE PEPTIDIQUE DES GLYCOPEPTIDES C II ET C III.

1.- Fractionnement et composition.

Nous avons fractionné les glycopeptides C II et C III sur une colonne (1 x 110 cm) de Bio-gel P₆ stabilisée dans une solution de chlorure de sodium (0,14 M.) Dans les deux cas, nous avons obtenu deux sous-fractions : C IIA, C IIB et C IIIA C IIIB (Fig. 59 p. 249). Celles-ci furent ensuite dessalées par chromatographie sur une colonne (1 x 110 cm) de Bio-gel P₂.

Nous avons déterminé leur composition et les résultats sont rassemblés dans le tableau LIII (p.249). Le sous-fractionnement de C II ne fait apparaître aucune différence quant à la composition des acides aminés, seule la composition en glucides varie dans de larges proportions. La galactosamine a totalement disparue de la sous-fraction C II B. A partir de la fraction C III nous isolons un glycopeptide C IIIB polymannosidique. Là aussi, la galactosamine est absente.

2.- Structure peptidique.

Les résultats que nous avons obtenu sont encore fragmentaires. Notre étude a porté sur les glycopeptides C IIB (Tableau LIV p.250) et C IIIB (Tableau LV p.251). Nous avons, à la fois, identifié les PTH - amino-acides dérivés et dosés les amino-acides non modifiés après la réaction d'EDMAN. En outre, nous avons fait agir la carboxypeptidase A

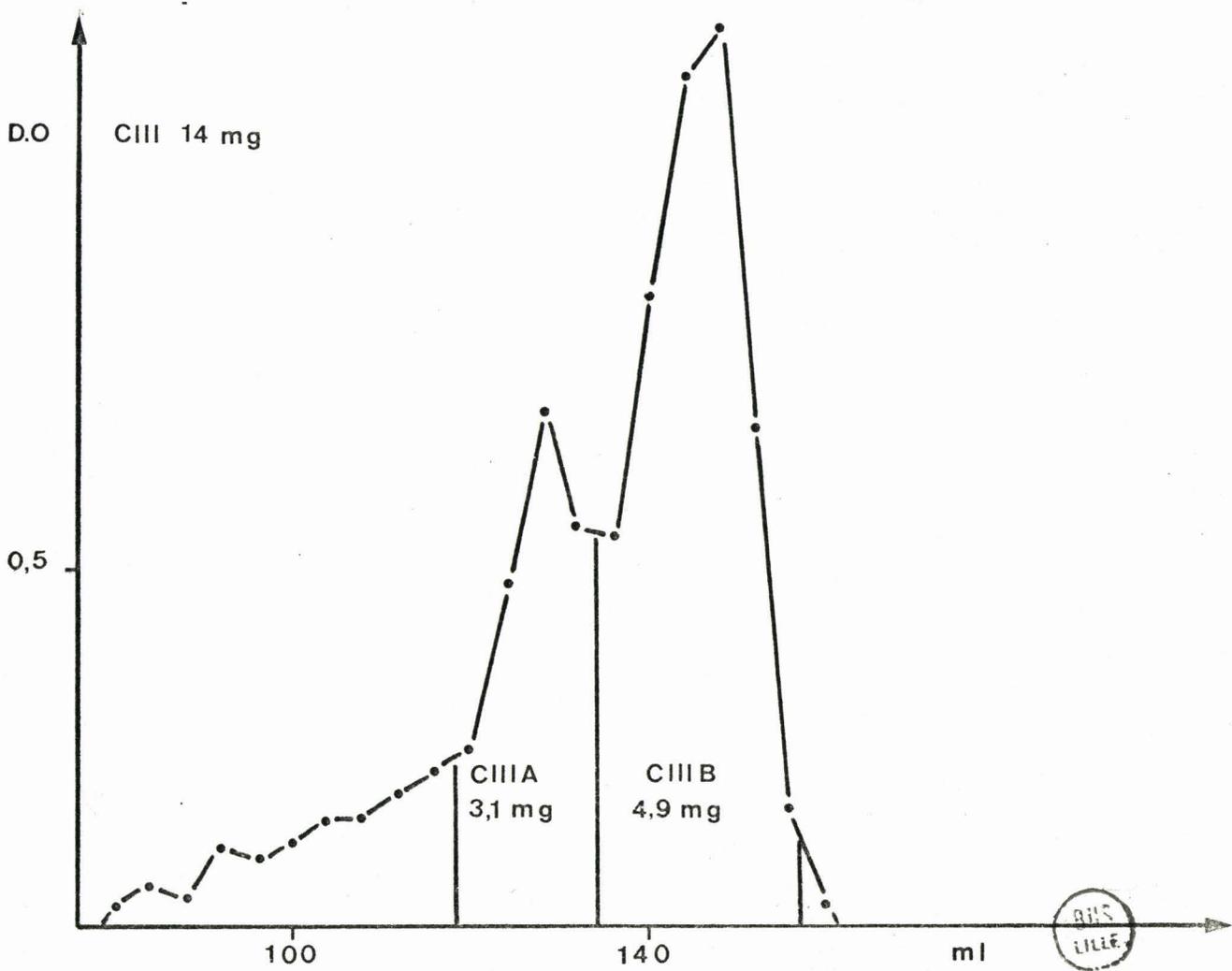
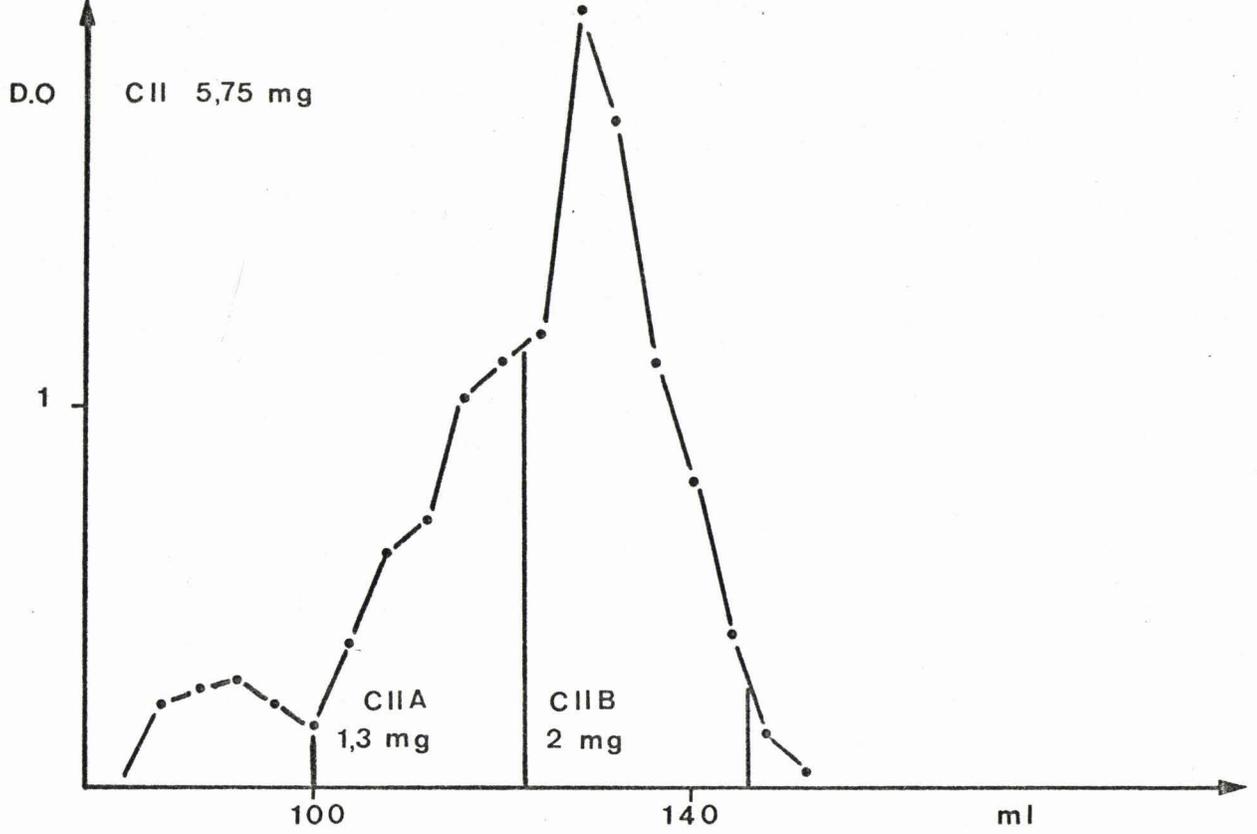


Figure 59.

Fractionnement des glycopeptides C II et C III
sur Bio-gel P₆ - Repérage au réactif de DUBOIS
et al. (67)

T A B L E A U L I I I

Composition du glycopeptide T₁ et des glycopeptides
isolés par fractionnement des glycopeptides C II et C III.

Glycopeptides	C II A	C II B	C III A	C III B	T ₁
Asp (*)	1	1	1	2	2
Thr	0,83	0,68	0,26	-	-
Ser	1,03	0,99	0,69	0,84	1,04
Glu	1,18	1,18	0,64	-	-
Gly	0,79	0,62	0,47	-	-
Val	0,5	0,60	0,26	-	-
Ileu	0,14	0,04	traces	-	-
Leu	-	-	-	-	1,02
Lys	0,13	-	0,29	-	-
Arg	0,10	-	0,21	0,69	0,8
Trp	-	-	-	Présent	0
Glc N	2,78	1,64	1,76	2,16	2,2
Gal N	0,42	0	0,18	0	0
Man	5,55	9,85	9,3	20	18
Gal	1,23	0	traces	0	0
GlcNAc (*)	2,78	1,64	1,76	2,16	2,2
GalNAc	0,64	0	traces	0	0
ANAN	0,65	0	traces	0	0

(*) - pris comme référence.

BUS
LILLE

T A B L E A U L I V

Dosage des acides aminés non modifiés après la
réaction d'EDMAN et identification des PTH - acides
aminés formés à partir du glycopeptide C II B.

Cycles de dégradation	0	1er	2ème	3ème	4ème	5ème	6ème	7ème
Asp	1	0,97	0,92	0,60	0,57	0,48	0,51	0,52
Thr	0,72	0,83	0,85	0,71	0,71	0,53	0,51	0,51
Ser	1,01	0,76	0,76	0,69	0,52	0,47	0,48	0,41
Glu	1,32	1,47	1,28	0,81	0,67	0,58	0,50	0,47
Gly	0,71	0,74	0,71	0,69	0,66	0,49	0,38	0,37
Val	0,55	0,79	0,57	0,46	0,47	0,40	0,43	0,44
Ileu	-	trace	-	-	-	-	-	-
Glc N (*)	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
PTH - dérivés (**)	-	Ileu	Val (Gln)	Gln	(Gln) (Ala) (Val) (Gly)	Gly	(Gly) (Gln)	Rien

(*) - pris comme référence.

(**) — : PTH - dérivé majeur.

() : en quantité très faible.

BUS
LILLE

T A B L E A U L V .

Dosage des acides aminés non modifiés après la réaction d'EDMAN et identification des PTH - acides aminés formés à partir du glycopeptide C III B.

Cycles de dégradation	0	1ère	2ème	3ème	4ème
Asp	1,85	0,82	0,67	0,49	0,51
Ser	0,77	0,91	0,97	0,71	0,72
Arg	0,63	0,80	0,83	0,72	0,69
Trp	présent	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Glc N (*)	2	2	2	2	2
PTH - dérivé (**)	-	Rien	(Asn)	Rien	Rien

(*) - pris comme référence.

N.D. - non dosé (position C - terminale)

(**) - () mise en évidence mais en quantité très faible.

355
LILLE

(p. 93) sur le glycopeptide C IIB. Les seuls acides aminés libérés sont dans l'ordre d'apparition la thréonine et la valine. Après 5 h. d'hydrolyse enzymatique, seule la thréonine peut être dosée, ce n'est qu'après 24 h qu'apparaît la valine. On obtient alors un rapport Thr/Val égal à 2,85. La position C - terminale de la thréonine confirme le résultat obtenu sur la lactotransferrine native (p. 232).

III - GLYCOPEPTIDES TRYPSIQUES.

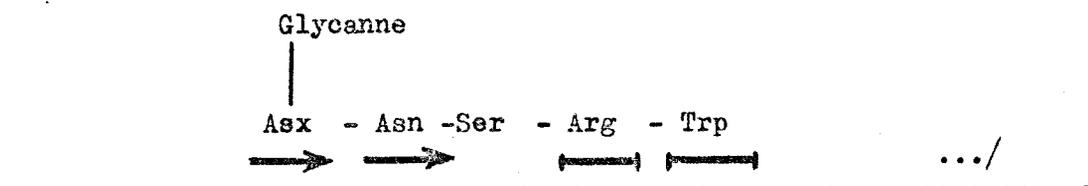
Pour isoler et fractionner les glycopeptides trypsiques, nous avons suivi le protocole expérimental utilisé précédemment lors de l'isolement des glycopeptides chymotrypsiques.

Nous obtenons deux types de glycopeptides : l'un (T₁) possède un acide aminé basique dans sa séquence peptidique, et l'autre (T₂) en est dépourvu. Ce résultat confirme bien que l'un des glycanes se trouve en position C - terminale. Nous n'avons étudié que le premier glycopeptide car sa composition en acides aminés et en glucides était simple et facilement interprétable. (Tableau LIII ; p. 249).

L'application de la dégradation récurrente d'EDMAN nous indique que la leucine se trouve en position N - terminale.

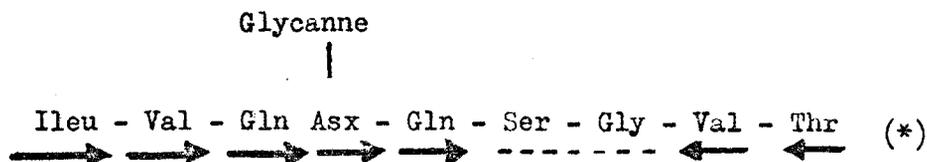
IV - CONCLUSIONS.

Dès à présent, au niveau des liaisons protéine -glycane, nous pouvons, à partir des hydrolysats pronasiques, chymotrypsiques et trypsiques, ébaucher les schémas de structure peptidique suivants : (*)



(*) - \longleftarrow : spécificité enzymatique.

\longrightarrow : dégradation récurrente d'EDMAN.

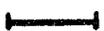


Nous obtenons de ce fait un glycopeptide qui se trouve être dans la partie C - terminale de la glycoprotéine. Et vu les dosages des acides aminés, il apparaît que la variance dans les glycannes se situe au niveau de ce groupement glycanique en position C - terminale. En outre, la présence ou l'absence de la galactosamine semble aussi être liée à la variation de composition de ce glycane C - terminal.

En associant nos différents résultats, nous pouvons donner un schéma général de structure de la lactotransferrine. (Fig. 60 ,p.254).

:-----:
: RESISTANCE DE LA LACTOTRANSFERRINE DE VACHE :
: AUX ENZYMES DIGESTIVES DU NOURRISSON. :
:-----:

Dans notre revue générale (p. 69), nous avons démontré que l'activité biologique (in vitro) de la lactotransferrine du lait de Vache était comparable à celle du lait de Femme. Le seul problème résidait dans le comportement de la lactotransferrine de Vache vis-à-vis des enzymes protéolytiques du tractus intestinal du Nourrisson. Nous avons donc supplémenté l'alimentation artificielle du Nourrisson avec de la lactotransferrine du lait de Vache. Des études antérieures, réalisées par MAZURIER - DEHAINE, (173) avaient

- : :/
- (*) -  : spécificité enzymatique
 : dégradation récurrente d'EDMAN
 : carboxypeptidase .
 - - - - : déduit en se référant au code de branchement de la 1ère glcNAc (p.188) et en constatant la libération incomplète du glycolle lors des hydrolyses acides

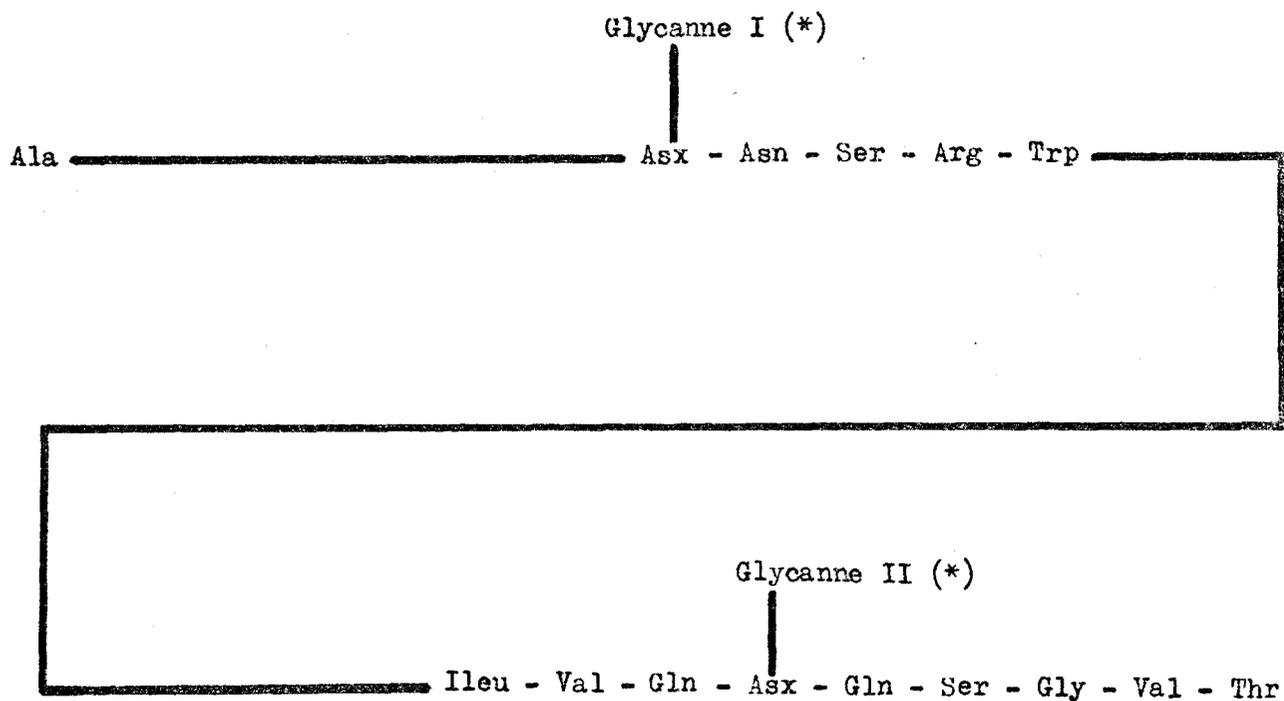


Figure 60.

Schéma général de structure de la
lactotransferrine de Vache.

(*) Glycane I : de composition constante.
Glycane II : de composition variable.



démontré que les selles des Nourrissons alimentés au lait de Vache ayant subi des traitements industriels ne contenaient pas de lactotransferrine.

I - TRAITEMENT DES SELLES ET DOSAGE DE LA LACTOTRANSFERRINE REJETEE.

L'expérimentation a été réalisée sur deux Nourrissons : l'un, âgé de 2 mois et demi et l'autre de 3 semaines. Pendant trois jours consécutifs, nous avons supplémenté l'alimentation artificielle en lactotransferrine de Vache à raison de 1 g par jour dans le premier cas et de 0,8 g par jour dans le second. Nous avons récupéré les selles pendant 7 jours (2 jours avant et 2 jours après l'expérimentation).

Le traitement des selles a été décrit par MAZURIER - DEHAINE (173). Il se résume en une mise en suspension dans 20 fois leur poids d'eau, suivie d'une agitation à 4° C et d'une filtration sur papier Whatman n°3. Ensuite, le filtrat est dialysé pendant 3 jours à 4° C puis lyophilisé.

Nous avons effectué nos dosages par immunodiffusion radiale selon la méthode de MANCINI (163). Les résultats démontrent (Tableau LVI; p. 256) qu'une fraction importante de la lactotransferrine est rejetée dans les selles.

II - ETUDES CHROMATOGRAPHIQUE ET ELECTROPHORETICQUE DE LA LACTOTRANSFERRINE REJETEE.

Nous avons chromatographié les selles sur une colonne (2 x 120 cm) de Sepharose 6 B, stabilisée dans un tampon à pH 8 (Tris - HCl 0,1 M - NaCl 0,5 M) (Fig. 61 ; p. 257). La lactotransferrine rejetée dans les selles possède un volume d'élution plus élevé que la lactotransferrine native. D'après le principe du tamisage moléculaire, cette lactotransferrine possède une masse moléculaire plus faible.

En outre, nous avons chromatographié les selles sur une

T A B L E A U LVI.

Concentration de la solution lors du dosage.	Jours de prélèvement.	Récupération de la lactotransferrine en poids (mg)	en % = $\frac{\text{rejetée}}{\text{ingérée}}$
Cas N° 1 (1 g/ jour)			
20 p.100	J ₁	-	-
20 p.100	J ₂	-	-
1 p.1000	J ₃	190	19
0,5 p.1000	J ₄	364	36,4
1 p.1000	J ₅	121	12
20 p.100	J ₆	-	-
20 p.100	J ₇	-	-
Cas N° II (0,8 g/ jour)			
20 p.100	J ₁	-	-
20 p.100	J ₂	-	-
2.p.1000	J ₃	34,2	4,3
2.p.1000	J ₄	182,9	22,86
2.p.1000	J ₅	25,6	3,2
20 p.100	J ₆	-	-
20 p.100	J ₇	-	-

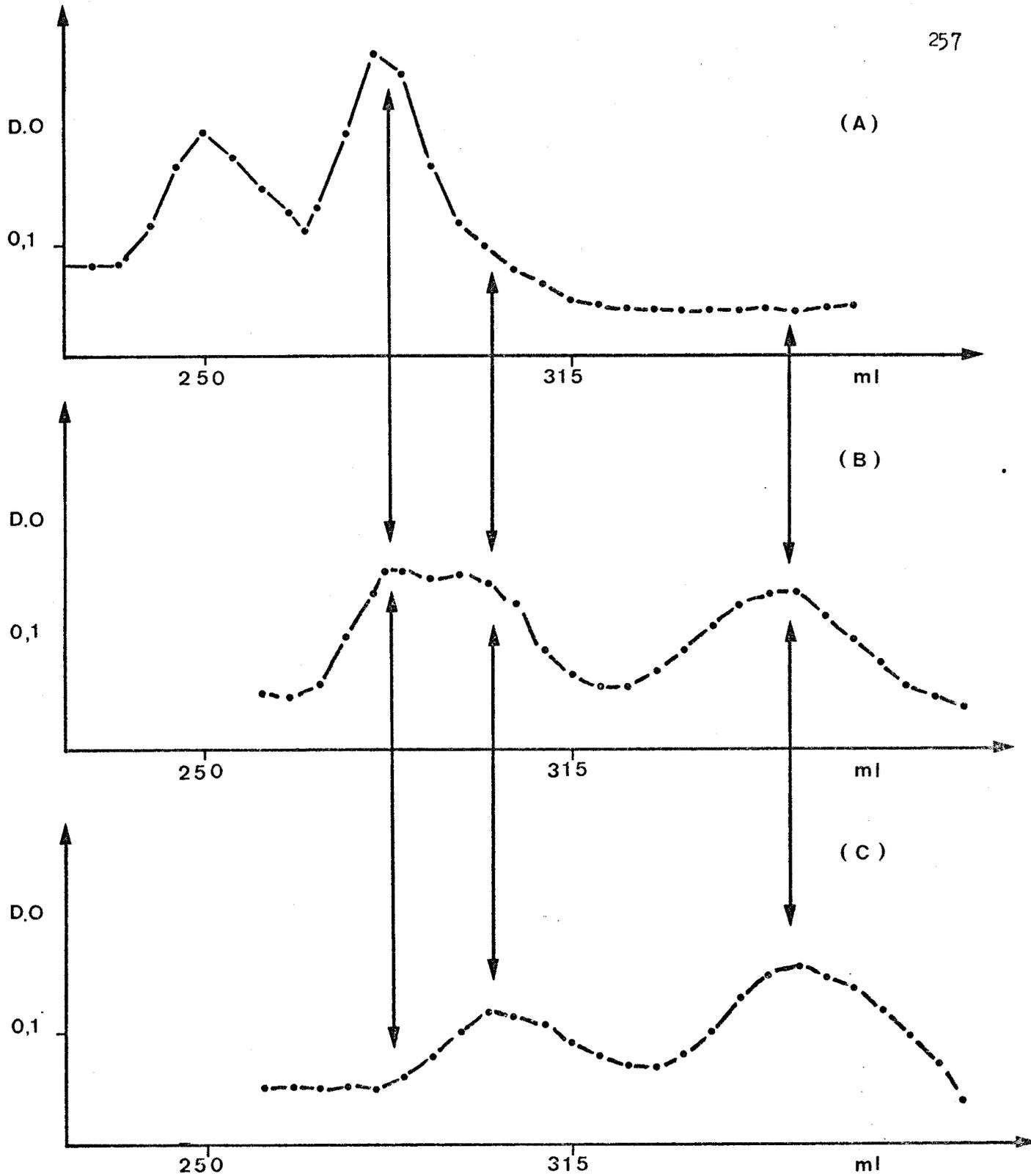


Figure 61.

Chromatographie sur colonne (2 x 120 cm) de
 Sepharose 6 B stabilisée dans un tampon à pH 8
 (Tris - HCl ; 0,1 M ; NaCl : 0,5 M)

- A : mélange IgG₁ (10 mg) + lactotransferrine native (10 mg)
 B : mélange selles (10 mg) + lactotransferrine native (5 mg)
 C : selles (10 mg de J₄)



colonne de S E - Sephadex C - 50 dans les conditions décrites précédemment (p. 222). Aucune substance contenue dans les selles n'est fixée sur l'échangeur d'ions. Ce comportement chromatographique est en accord avec la migration électrophorétique sur bande d'acétate de cellulose (Fig. 62 p.259)

III - CONCLUSION.

Nous avons démontré que la lactotransferrine de Vache n'était qu'en partie hydrolysée par les enzymes protéolytiques du Nourrisson.

Comme la masse moléculaire et le pHi de cette lactotransferrine modifiée sont plus faibles, le résultat de notre dosage est critiquable. Car notre gamme étalon de référence est réalisée avec des solutions de concentration croissantes de lactotransferrine native. Néanmoins, l'hydrolyse de la lactotransferrine rejetée n'est que partielle vu qu'elle précipite encore avec les anticorps. En outre, MAZURIER - DEHAINE (173) a démontré que la lactotransferrine humaine était également altérée par les enzymes digestives du Nourrisson. D'ailleurs, le taux de récupération de la lactotransferrine humaine modifiée est beaucoup plus faible (2 à 4 %) que celui de la lactotransferrine de Vache. Cette différence est d'ailleurs confirmée par les hydrolyses pronasiques in vitro. SPIK (259) a isolé, par cette hydrolyse, les deux glycopeptides de la lactotransferrine humaine alors que, nous-mêmes, n'avons pu obtenir que le glycopeptide en position C - terminale sur la glycoprotéine.

Nous pouvons donc admettre que la lactotransferrine de Vache puisse jouer un rôle bactériostatique dans le tractus intestinal du Nourrisson avant d'être complètement dégradée.

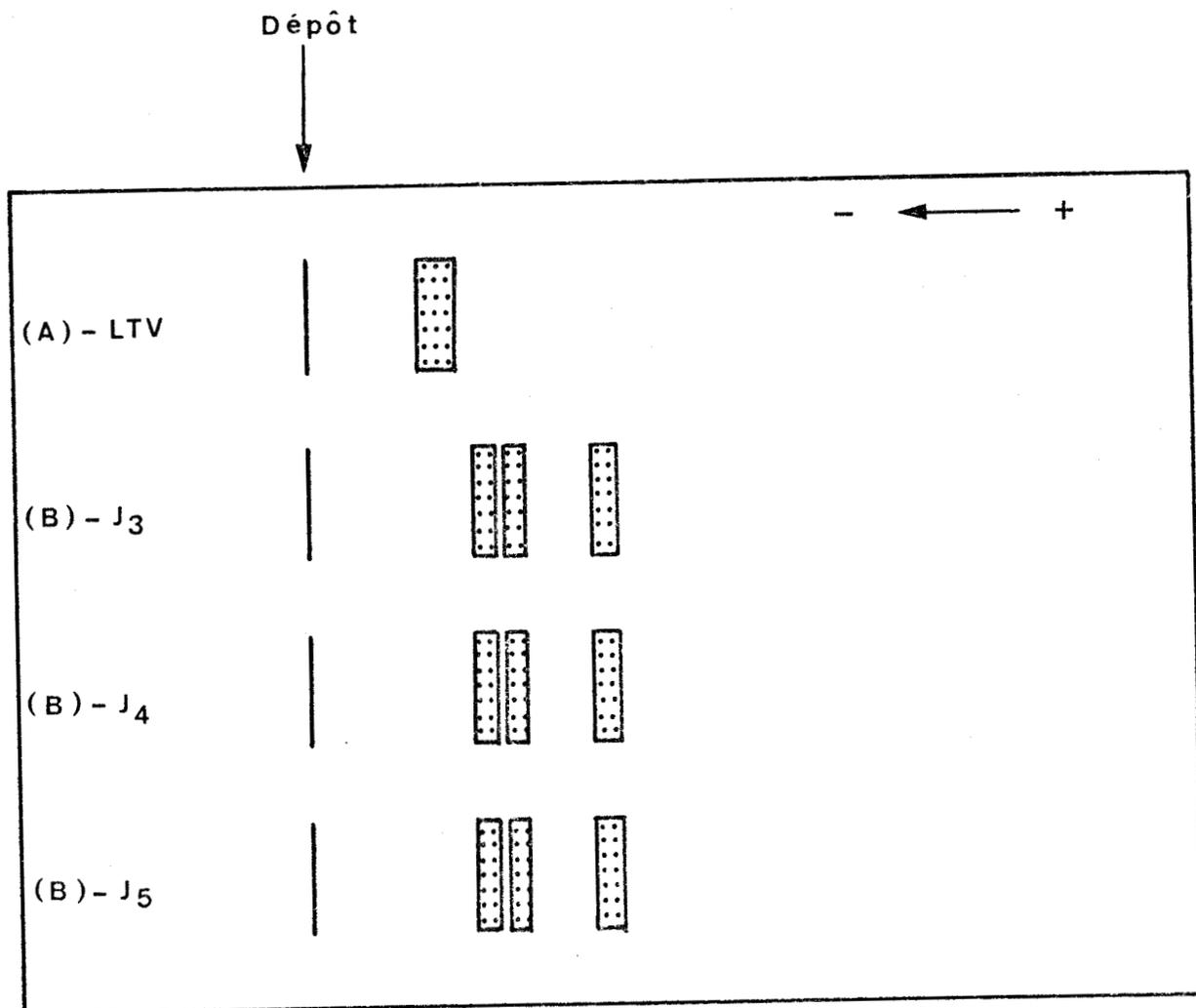


Figure 62.

Schéma des électrophorèses sur bandes d'acétate de cellulose de la lactotransferrine native (A) et de la lactotransferrine rejetée dans les selles (B).

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

La maternisation du lait de Vache réclame, dans un premier temps, une connaissance parfaite de la composition des laits de Vache et de Femme et des activités biologiques portées par les diverses substances contenues dans ces deux laits. Celle-ci est loin d'être acquise, aussi avons-nous limité notre étude à un seul thème de recherche : l'immunité et plus précisément la défense locale de l'intestin du Nourrisson.

Dans notre revue générale, nous avons démontré que les anticorps et les lactotransferrines des deux laits possédaient des activités complémentaires dans cette protection de l'intestin. C'est pourquoi nous avons entrepris simultanément l'étude de ces deux groupes de substances du lait de Vache comparativement à celles du lait de Femme étudiées au Laboratoire par G. SPIK.

Les résultats que nous avons obtenus se résument de la façon suivante :

I.- LES IMMUNOGLOBULINES.

A.- ISOLEMENT ET FRACTIONNEMENT.

1.- Nous avons comparé deux méthodes d'isolement des globulines immunes du colostrum de Vache.

a - le procédé de relargage par le sulfate d'ammonium.

b - le procédé de fractionnement par le rivanol.

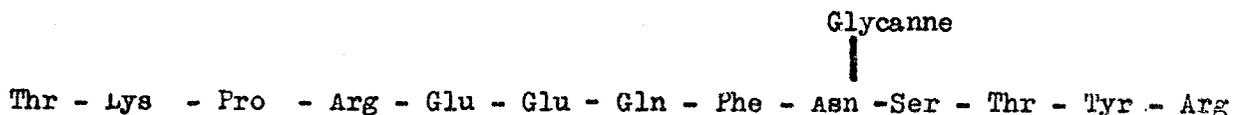
Le premier permet d'isoler des globulines IgG avec un rendement plus élevé et dans un état de pureté plus satisfaisant.

.../

- 2.- L'étude des précipités P₁ et P₄ (obtenus par des concentrations en sulfate d'ammonium respectivement au tiers et à demi saturation) riches en globulines IgG démontre que le colostrum renferme 97 % de globulines IgG rapides (IgG₁) et moins de 3 % de globulines IgG lentes (IgG₂).
- 3.- La chromatographie sur SE - Sephadex permet de fractionner les globulines IgG₁ en deux groupes bien distincts dont chacun reste toutefois très hétérogène.
- 4.- L'absence de glucides sur les chaînes L des IgG₁ nous permet d'affirmer que seules les chaînes H possèdent des groupements glycaniques.

B.- ETUDE STRUCTURALE.

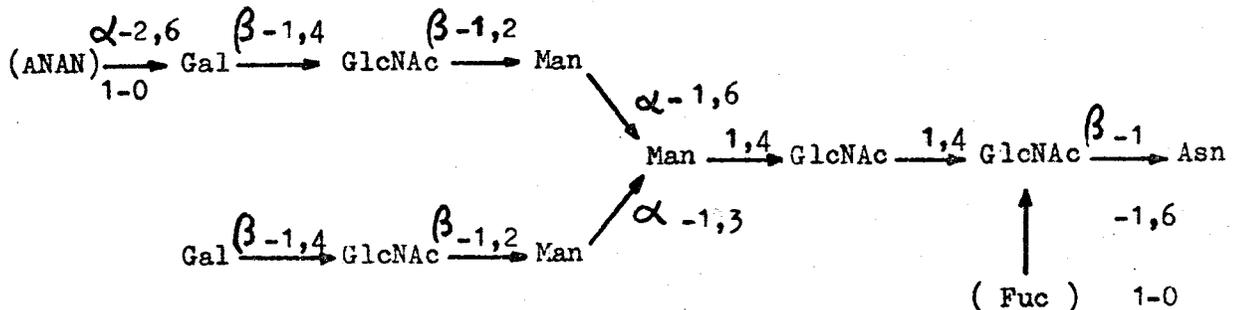
- 1.- La masse moléculaire des glycopeptides correspond à la moitié de la fraction glycanique de la molécule des globulines IgG₁. Cette constatation implique l'existence de deux unités glycaniques.
- 2.- L'étude de la nature du point d'attache protéine-glycane dans les globulines IgG₁ du précipité P₁ (sulfate d'ammonium) permet d'affirmer que la liaison est du type 1 - N - (β -aspartyl) - 1, 2 - didésoxy - 2 - acétamido - glucosylaminique.
- 3.- La séquence peptidique que nous avons déterminée au niveau du point d'attache protéine - glycane est la suivante :



Nos résultats sont en accord avec les séquences partielles publiées par NOLAN et SMITH (209).

En comparant cette séquence peptidique avec celle des IgG Eu (RUTISHAUSER et al.) (235) dont la structure peptidique complète a été déterminée et avec la composition en amino-acides des glycopeptides isolés d'IgG de babouin, de singe, de porc, de chien. et de chat (HOWELL et al.) (119), nous sommes en droit d'affirmer qu'il existe une très grande similitude entre les glycopeptides d'origines différentes. Et nous pouvons conclure que les groupements glycaniques dans les IgG₁ du colostrum de Vache sont en position intracaténaire comme dans les IgG Eu.

4.- Grâce à l'application de procédés tels que la méthylation, l'oxydation périodique, l'hydrazinolyse - diazotation et les hydrolyses enzymatiques, nous avons pu déterminer la structure des groupements glycaniques.



La présence du motif central pentasaccharidique (trimannosido - di - N - acétyl chitobiose) lié à l'asparagine semble se généraliser à plusieurs glycoprotéines. Nous ne citerons, comme exemple, que les glycannes de l'IgE (BAENZIGER et al.) (10), des IgG humaines (KORNFELD et al.) (136) et des IgG sériques de Vache (TAI et al.) (272).(*)

Cette analogie de structure entre les glycannes de diverses origines confirme l'hypothèse de MONTREUIL et al. (186),

-----.../
 (*) - Ce travail n'a pas été cité dans notre chapitre consacré aux généralités, car il a été publié après notre rédaction.

émise dès 1962.

La connaissance de cette structure nous permet de comprendre l'action incomplète de la chymotrypsine due à la présence du fucose sur le résidu de N - acétyl glucosamine impliqué dans la liaison protéine - glycanne.

II.- LA LACTOTRANSFERRINE.

A.- ISOLEMENT.

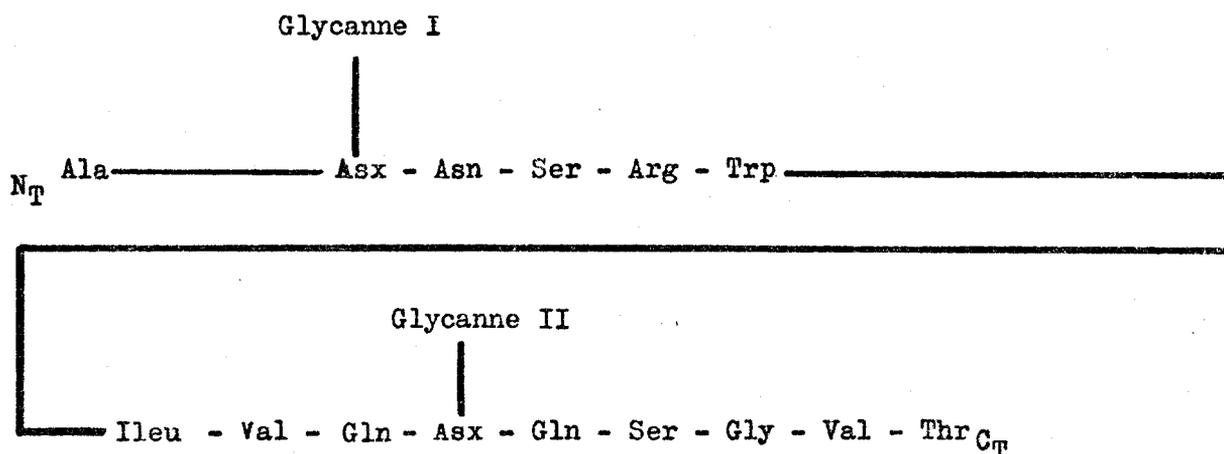
- 1.- Nous avons amélioré le rendement de la préparation de la lactotransferrine par la mise au point d'un procédé original rapide.
- 2.- Ce procédé a été appliqué avec succès à l'isolement de la lactotransferrine à partir d'un lactosérum de laiterie.
- 3.- Notre méthode permet également de préparer rapidement la lactotransferrine humaine.
- 4.- Une première approche de fractionnement de la lactotransferrine de Vache nous permet de prouver que les différentes fractions obtenues varient en partie par leur portion glucidique.

B.- ETUDE STRUCTURALE.

- 1.- L'isolement des glycopeptides nous a permis de démontrer qu'il y avait deux groupements glycaniques par molécule de lactotransferrine.
- 2.- L'étude de leur séquence peptidique et de leur composition glucidique démontre que l'un des deux groupements glycaniques

.../

se trouve être en position C - terminale suivant le schéma ci-dessous :



3.- Nous suggérons, grâce à des fractionnements des glycopeptides, que la variance des lactotransferrines serait portée par le glycane II.

4.- En considérant la composition polymannosidique du glycane I nous sommes tentés de rapprocher la lactotransferrine des thyroglobulines humaine et de veau (ARIMA et SPIRO) (6) et de la taka - amylase A (YAMAGUCHI et al.) (286).

Mais bien que les deux glycanes possèdent des compositions assez différentes, nous ne pouvons exclure la présence du noyau central pentasaccharidique ($\text{Man}_3 - \text{GlcNAc}_2$). Au contraire, la présence des deux seuls résidus de N - acétyl - glucosamine dans le glycane I polymannosidique est en faveur de cette hypothèse.

Seule une étude structurale ultérieure pourra confirmer les travaux de BEHRENS et al. (16). Nous devrions mettre en

évidence des répétitions de chaînons dimannosidiques.

Ainsi, si la biosynthèse des glycanes des IgG₁ est réalisée suivant le schéma général, à savoir, branchement d'une fraction des résidus de N - acétyl - glucosamine et de tous les résidus de mannose dans le réticulum endoplasmique rugueux puis fixation des autres résidus de N - acétyl - glucosamine, de galactose, de fucose et des acides sialiques dans le réticulum endoplasmique lisse et dans l'appareil de Golgi, celle du glycanne I de la lactotransferrine pose quelques problèmes. On pourrait expliquer la composition polymannosidique de ce glycanne I par sa localisation possible dans la fraction N - terminale de la lactotransferrine. Sinon, il faudrait admettre une biosynthèse de glycanes à mannose en dehors du réticulum endoplasmique rugueux. Mais l'hypothèse la plus séduisante serait d'admettre un codage par le glycanne. La fraction polymannosidique biosynthétisée dans le réticulum endoplasmique rugueux inhiberait ultérieurement le branchement d'autres monosaccharides.

5.- La comparaison des structures peptidiques des glycopeptides isolés de différentes transferrines a conduit GRAHAM et WILLIAMS (93) à distinguer deux types (A et B) de glycopeptides dont l'un (type A) aurait un acide aminé basique à droite de l'asparagine du point-d'attache protéine-glycanne. Mais, d'après ces mêmes auteurs, dans la transferrine de boeuf, cet acide aminé basique est remplacé par de la sérine. Notre séquence est une combinaison de toutes ces données. Nous avons isolé un glycopeptide (type A) qui possède bien un acide aminé basique près de la liaison protéine-glycanne mais pas immédiatement après l'asparagine. Par contre, le glycopeptide (type B) de la lactotransferrine de Vache ressemble au glycopeptide (type B) isolé de la transferrine humaine par CHARET et al. (47). Il possède comme ce dernier une position C - terminale dans la glycoprotéine.

.../

C - ETUDE BIOLOGIQUE.

La supplémentation de l'alimentation du Nourrisson par la lactotransferrine de Vache a démontré que celle-ci n'était que partiellement dégradée par les enzymes du tractus intestinal du Nouveau-né. En outre, cette dégradation est moins profonde que celle subie par la lactotransferrine humaine (MAZURIER - DEHAINE) (173). Ce phénomène est d'ailleurs confirmé, in vitro, puisque nous n'avons isolé, par hydrolyse pronasique, que le glycopeptide C - terminal de la lactotransferrine de Vache alors que SPIK (259) a obtenu, dans les mêmes conditions, les deux glycannes de la lactotransferrine humaine.

--oooOooo--

En conclusion, bien que les anticorps (IgG1) du lait de Vache soient différents de ceux (IgA) du lait de Femme, ils peuvent néanmoins jouer un rôle identique. D'après les expériences de BULLEN et al. (32) et de REITER et al. (232) leurs effets inhibiteurs sur la prolifération de certains germes pathogènes sont semblables. En outre, ZINKERNAGEL et al. (289) ont démontré que les IgG du colostrum de Vache résistaient en partie (20 %) aux enzymes digestives du Nourrisson. L'immunisation passive au niveau de l'intestin du Nourrisson peut donc être apportée par de tels anticorps puisque la paroi intestinale est imperméable à ces glycoprotéines contrairement à ce qui se passe chez le Veau (BLANC)(25) chez qui les anticorps d'origine humaine peuvent traverser la paroi intestinale pendant les premiers jours après le vélage.

Cette défense locale au niveau du tractus intestinal peut être renforcée par l'apport de lactotransferrine de Vache qui possède, comme la lactotransferrine humaine, une activité bactériostatique et qui ne se retrouve dans les selles des Nourrissons que partiellement dégradée.

Cette supplémentation en anticorps et en lactotransferrine est rendue possible par la méthode de fractionnement du colostrum de

MONTREUIL et al. (185) et par notre procédé original de préparation de la lactotransferrine de Vache. Les anticorps pourraient d'ailleurs provenir d'une autre origine car d'après BULLEN et al. (32) l'association d'immunisérum de cheval et de lactotransferrine humaine possède le même effet bactériostatique sur la prolifération de E.Coli. En outre, la lactotransferrine de Vache pourrait être une source de fer pour le Nourrisson.

B I B L I O G R A P H I E

---ooOoo---

- 1 ADAM-CHOSSON A. - Thèse Doct. ès Sci., Lille, France, 1964 (p. 92)
- 2 AKABORI S., OHNO K. et NARITA K. - Bull.Chem.Soc.Japan, 1952, 25, 214
(p.93, 103, 232)
- 3 ANDREWS P. - in GLICK D., Methods of Biochemical Analyses, 1970,
18, 1. (p.82)
- 4 ANTONY N. - Thèse Doct. ès Sci., Lille, France, 1965 (p.15, 29, 30, 36,
39, 79, 111, 113, 114, 148, 154)
- 5 APPELLA E., CHERSI A., MAGE R.G. et DUBISKI S. - Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A.
1971, 68, 1341 (p.190)
- 6 ARIMA T., et SPIRO R.G. - J.Biol.Chem., 1972, 247, 1836 (p.264)
- 7 ARLOING, CORNEWIN et THOMAS - C.R. Acad. Sci., 1882, 94, 1396 (p.42)
- 8 ASKONAS B.A. et WILLIAMSON A.R. - Biochem. J., 1968, 109, 637 (p.142)
- 9 AZARI P. et BAUGH R.F. - Arch. Biochem. Biophys., 1967, 118, 293 (p.223)
- 10 BAENZIGER J., KORNFELD S. et KOCHWA S. - J. Biol. Chem., 1974, 249, 1897
(p.215, 217, 262)
- 11 BAIN J.A. et DEUTSCH H.F. - Arch. Biochem., 1948, 16, 221 (p.26)
- 12 BALFOUR W.E. et COMLINE R.S. - J. Physiol., 1961, 160, 234 (p.46, 49)
- 13 BANDO T. et MATSUSHIMA Y. - Bull. Chem. Soc., Japan, 1973, 46, 593 (p.107)

- 14 BAYARD B. - Thèse Doct. ès Sci., Lille, France, 1974 (p.103,217)
- 15 BAYARD B. et MONTREUIL J. - in J. MONTREUIL, Actes du Colloque International n°221 du Centre National de la Recherche Scientifique sur les glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq, 20-27 Juin 1973, Ed. C.N.R.S., Paris, 1974, 1, 209 (p.103)
- 16 BEHRENS N.H., CARMINATTI H., STANELONI R.J. et LELOIR L.F.- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1973, 70, 3390 (p.264)
- 17 BELCHER R., NUTTEN A.J. et SAMBROOK C.M.- Analyst, 1954, 79, 201 (p.76)
- 18 BENCZ W.L. et SCHMID K. - Biochem. J., 1946, 40, 628 (p.78)
- 19 BEZKOROVAINY A. et DOHERTY D.G. - Arch. Biochem. Biophys, 1962, 96, 491 (p.81)
- 20 BISERTE G., BRETON A. et FONTAINE G. - Arch.Franc. Péd., 1955, 12, 20 (p.15)
- 21 BISERTE G., HAVEZ R. et CUVELIER R., Exp. Ann. Biochim. Med., Masson éd., Paris, 1963, 24, 85 (p.19, 69)
- 22 BISERTE G., HOLLEMAN J.W., HOLLEMAN-DEHOVE J. et SAUTIERE P. - J.Chromatog. 1959, 2, 225 (p.94, 177)
- 23 BISERTE G. et MASSE L. - C.R. Soc. Biol., 1948, 142, 664 (p.15)
- 24 BISERTE G. et OSTEUX R. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1951, 33, 50 (p.177)
- 25 BLANC B. - Thèse Doct. ès Sci., Lausanne, Suisse, 1962 (p.266)
- 26 BLANC B. - in PEETERS H., Protides of the biological Fluids, Elsevier, Amsterdam, 1966, 14, 125 (p.70)
- 27 BLANC B., BUJARD E. et MAURON J. - Experientia, 1963, 19, 299 (p.232, 233)
- 28 BLANC B. et ISLIKER H.- Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 929 (p.60)

- 29 BRAMBELL F.W.R. - in NEUBERGER A. and TATUM E.L., Frontiers of Biology, North-Holland, 1970, 18, 269 (p.7)
- 30 BRIDGMANN W.B.-- J. Ann. Chem. Soc., 1946, 68, 657 (p.50)
- 31 BROWN E.M. et PARRY R.M.Jr - Biochemistry, 1974, 13, 4560 (p.225)
- 32 BULLEN T.J., ROGERS H.J. et LEIGH L.- Brit. Med. J., 1972, 1, 69
(p.70, 71, 266, 267)
- 33 BURCKHARDT A.E. - Dtsch. Arch. Klin. Med., 1879, 24, 506 (p.42)
- 34 BUTLER J.E. - J. Dairy Sci., 1969, 52, 1895 (p.38)
- 35 BUTLER J.E. - Biochim. Biophys. Acta, 1971, 251, 435 (p.37)
- 36 BUTLER J.E., CHARLOTTE F. et MAXWELL C.F. - J. Dairy Sci., 1972, 55, 151
(p.30, 31, 32, 33, 35)
- 37 BUTLER J.E. et MAXWELL C.F. - J. Dairy Sci., 1972, 55, 151 (p.135)
- 38 BUTLER J.E., MAXWELL C.F., PIERCE C.S., HYLTON M.B., ASOFSKY R. et KIDDY C.A. - J. Immunol., 1972, 109, 38 (p.52)
- 39 CACAN R. - Thèse Doct. 3ème cycle, Lille, France, 1974 (p.83)
- 40 CAMPBELL B. et PETERSEN W.E. - Dairy Sci. Abst., 1963, 25, 345 (p.3, 40, 42)
- 41 CAMPBELL B., PORTER R.M. et PETERSEN W.E. - Nature, 1950, 166, 913 (p.41)
- 42 CAMPBELL B., SARWAR M. et PETERSEN W.E. - Science, 1957, 125, 932 (p.40, 57)
- 43 CANTARUTTI F. - Acta paediatr. Latena, 1954, 7, 198 (p.40)
- 44 CAROLL E.J. - J. Dairy Sci., 1961, 44, 2194 (p.30)

- 45 CASTELLINO F.J., FISH W.W., et MANN K.G. - J. Biol. Chem., 1970, 245,
4269 (p.83, 225, 226, 227,
229, 230, 232, 233).
- 46 CHANDAN R.C., PARRY R.M. Jr. et SHAHANI K.M. - J. Dairy Sci., 1968, 51,
606 (p.72)
- 47 CHARET P., MONSIGNY M., SPIK G. et MONTREUIL J. - C.R. Acad. Sci., 1969,
D 269, 1019(p.265)
- 48 CHARET P., TETAERT D., HAN K.K. et MONTREUIL J.- C.R. Acad. Sci., 1973,
D 276, 1629 (p.78)
- 49 CHAUVEAU A. - C.R. Acad. Sci., 1880, 91, 148 (p.42)
- 50 CHERBULIEZ E., BAEHLER B. et RABINOWITZ P. - Helv. Chim. Acta, 1964, 47,
1350 (p.156, 180)
- 51 CHEVENKA C. - Anal. Biochem., 1970, 34, 24 (p.83)
- 52 COHN E.J. et EDSALL J.T. - Proteins, aminoacids and peptides as ions
and dipolar ions, Reinhold, New-York, 1943 (p.8)
- 53 COHEN S. et MILSTEIN C. - in DIXON F.J. and KUNKEL H.G., Advances
in Immunology, Acad. Press., New-York, 1967, 1,
(p.146)
- 54 COHEN S. et PORTER R.R.- Biochem. J. 1964, 90, 278 (p.79)
- 55 COHN E.J., STRONG L.E., HUGUES W.L.Jr., MULFORD D.J., ASHWORTH J.N., MELI
M. et TAYLOR H.L. - J. Am. Chem. Soc., 1946, 68, 459 (p.26)
- 56 COMLINE R.S., ROBERTS H.E. et TITCHEN D.A. - Nature, 1951, 167, 561 (p.4)
- 57 COUNITCHANSKY Y., BERTHILLIER G. et GOT R. - Clin. Chim. Acta, 1969, 26
223 (p.51)
- 58 CROWTHER C. et RAISTRICK H. - Biochem. J. - 1916, 10, 434 (p.14, 25)
- 59 DEBRAY - VANDERSYPPE R. - Thèse Doct. 3ème cycle, Lille, France, 1975
(p. 229, 237)

- 60 DEDONDER R. - Bull. Soc. Chim. , France, 1952, 19, 874. (p.106, 199)
- 61 DE LA LLOSA P., TERTRIN C. et JUTISZ M.- Experientia, 1964, 20, 204
(p.93)
- 62 DESCAMPS J.- Thèse Doct. ès Sci. , Lille, France, 1974 (p.22, 51, 60, 61)
- 63 DESCAMPS J., MONSIGNY M. et MONTREUIL J. - C.R. Acad. Sci., 1968, 266,
1775 (p.22)
- 64 DEUTSCH H.E. - J. Biol. Chem. , 1947, 169, 437 (p.14, 15)
- 65 DEUTSCH H.E. et SMITH V.R. - Am. J. Physiol., 1957, 191, 271 (p. 46)
- 66 DI SANT'AGNESE P.A. - Pediatrics, 1949, 3, 181, (p.55)
- 67 DUBOIS M., GILLES K., HAMILTON J.K., REBERS P.A. et SMITH F. - Anal.
Chem., 1956, 28, 350, (p. 90, 91, 102, 103, 107, 108, 142,
145, 163, 164, 167, 203, 213, 239, 248).
- 68 DUQUESNE N., MONSIGNY M. et MONTREUIL J. - C.R. Acad. Sc. Paris, 1965,
261, 1430 (p. 114, 190)
- 69 EDELMAN G.M., GALL W.E., WAXDALL M.J. et KONIGSBERG W.H. - Biochemistry,
1968, 7, 1950 (p. 85)
- 70 EDELMAN G.M. et POULIK M.D. - J. exp. Med. , 1961, 113, 861 (p. 79)
- 71 EDMAN P. et BEGG G. - Eur. J. Biochem., 1967, 1, 80 (p.97)
- 72 EHRLICH P. - Z. Hyg. Infekt. Kr., 1892, 12, 18 (p. 43)
- 73 ELIAS H.G. - Méthodes de l'ultracentrifugation analytique, Beckman,
instruments International S.A., éd., 1964 (p. 81)
- 74 ELSON L.A. et MORGAN W.T.J.- Biochem, J., 1933, 27, 1824 (p.76)
- 75 ENGEL H. et SCHLAG H. - Milchwirtschaft. Forsch., 1925, 2, 1 (p.14)

- 76 FAHEY J.L., COY Mc. P.F. et GOULIAN M. - J. Clin. Invest.,- 1958, 37,
272 (p.84)
- 77 FAHEY J.L. et HORBETT A.P. - J. Biol. Chem., 1954, 234, 2645 (p. 128)
- 78 FAMULEWER L.W. - J. Infect. Disc. , 1912, 10, 332 (p. 43)
- 79 FLEISCHMAN J.B., PAIN R.H. et PORTER R.R. - Arch. Biochem. Biophys.,
1962, suppl.1, 174 (p. 85, 139, 142, 145)
- 80 FONTAINE G. - Thèse Méd. Lille, France, 1954 (p. 15)
- 81 FOURNET B. - Thèse Doct. ès Sci., Lille, 1973 (p. 77, 78, 98, 99, 101)
- 82 GALL N.E., CUNNINGHAM B.A., WAXDAL M.J., KONIGSBERG W.H. et EDELMAN G.M.-
Biochemistry, 1968, 7 - 1973 (p. 86, 88)
- 83 GARDELL S. - Acta Chem. Scand., 1953, 7, 207, (p. 77, 230)
- 84 GARDELL S., HEJKENSJOLD F. et ROCHNORLUND A. - Acta Chem. Scand., 1950,
4, 970 (p. 77, 230)
- 85 GELOTTE B., FLODIN P. et KILLANDER J. - Arch. Biochem., Biophys. suppl.,
1962, 1, 319 (p. 84)
- 86 GHUYSEN J.M., TIPPER D.J., BIRGE C.H. et STROMINGER J.L. - Biochemistry,
1965, 4, 2245 (p.82, 151)
- 87 GOLDSTEIN I.J. , HAY G.W., LEWIS B.A. et SMITH F. - Abstr. Div. Carb.
Chem. Ann. Chem. Soc., 135 th Meeting, BOSTON
1959, 3 D (p. 101)
- 88 GONZAGA A.J., WARREN R.J. et ROBBINS F.C. - Pediatrics, 1963, 32, 1039
(p. 54, 57)
- 89 GORDON W.G., GROVES M.L. et BASCH J.J. - Biochemistry, 1963, 2, 817
(p. 232, 233)
- 90 GORDON A., KEIL B. et SEBESTA K. - Nature, 1949, 164, 498. (p. 79)

- 91 GOT R. - Clin. Chim. Acta., 1965, 11, 432, (p. 60)
- 92 GOT R. - Ann. Nutr. Alim. , 1971, 25, 291. (p. 71)
- 93 GRAHAM I. et WILLIAMS J. - Biochem. J., 1975, 145, 263 (p. 265)
- 94 GRANT J.A. , SANDERS B. et HOOD L. - Biochemistry, 1971, 10, 3123
(p. 86, 139, 142, 143)
- 95 GRAY W.R. et HARLEY B.S. - Biochem. J., 1963, 89, 59 et 379 (p. 94)
- 96 GRIMMONPREZ L. - Thèse Doct. ès Sci., Lille, France, 1972 (p. 82, 151)
- 97 GRONWALL A. - Nature, 1947, 159, 376 (p. 14)
- 98 GROVES M.L. - J. Amer. Chem. Soc. , 1960, 82, 3345 (p. 60, 219, 220, 223,
225, 226, 227, 229, 234).
- 99 GROVES M.L. - Biochim. Biophys. Acta., 1965, 100, 154 (p. 60, 62, 63, 119,
132, 219).
- 100 GROVES M.L., PETERSON R.F. et KIDDY C.A. - Nature, 1965, 207, 1007 (p.232)
- 101 GYÖRGY P. - C.R. 3ème Congrès Intern. Nutrit., Amsterdam, 1964, 203 (p.1,
- 102 HAKOMORI S.I. - J. Biochem. , 1964, 55, 205 (p.98)
- 103 HALPERN M.S. et KOSHLAND M.E. - Nature, 1970, 228, 1276 (p. 19)
- 104 HAMMARSTEN O. - Z. Physiol. Chem. , 1883, 7, 227 (p. 25)
- 105 HAN K.K., PLANCHON B., DAUTREVAUX M. et BISERTE G. - Ann. Pharmaceutiques
Fr., 1973, 31, 539 (p. 96, 97)
- 106 HANSEN R.G. et PHILLIPS P.H. - J. Biol. Chem., 1947, 171, 223 (p. 9, 44,
48, 50)
- 107 HANSON L.A. - Immunological studies of human milk with special reference
to the immune globulines, Gothenburg, 1961 (p. 15, 17)

- 108 HANSSON U.B. - Acta Chem. Scand., 1968, 22, 483 et 490 (p. 121)
- 109 HARTLEY R.S. - Biochem J. , 1970, 119, 805, (p. 94)
- 110 HEYNDRIKX G.U. et DE VLEESCHAUWER A. - Experientia, 1952, 8, 317(p. 15)
- 111 HICKMAN S., KORNFELD R., OSTERLAND C.K. et KORNFELD S. - J. Biol. Chem., 1972, 247, 2156 (p. 217)
- 112 HILL R.L., DELANEY R., FELLOWS R.E. et LEBOVITZ H.E.- Proc. Nat. Acad. Sci., 1966, 56, 1762 (p. 190)
- 113 HILPERT H. et ENKELMANN D. - Milchwissenschaft, 1963, 18, 109 (p. 29)
- 114 HOEGYES A. - Ann. Inst. Pasteur, 1889, 3, 429 (p. 42)
- 115 HOGG D. Mc C. et JAGO G.R. - Biochem J., 1970, 117, 779 (p. 71)
- 116 HOREJSI J. et SMETANA R. - Acta Med. Scand., 1956, 155, 65 (p. 29)
- 117 HORTON D., PHILIPS K.D. et DEFAYE J. - Carbohydr. Res. , 1972, 21, 417, (p. 104)
- 118 HOWE P.E. - J. Exp. Med., 1924, 39, 313 (p.44)
- 119 HOWELL J.W., HOOD L. et SANDERS B.G. - J. Mol. Biol., 1967, 30, 555 (p. 190, 262)
- 120 HUFELAND C.W. - III Aufl. Wien, Ann., 1799, 19 (cité dans NEUMANN; Dtsch med. Wschr., 1895, 21, 841) (p. 42)
- 121 HUNT L.T. et DAYHOFF M.O. - Biochem. Biophys. Res. Comm., 1970, 39, 757 (p. 188)
- 122 HYTTEN F.E. - Brit. Med. J. , 1954, 175, 249 (p. 15)
- 123 JAMESON E., ALVAREZ-TOTADO C. et SORTOR H.H. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1942, 51, 163 (p.44, 47)

- 124 JOHANSSON B. - Acta Chem. Scand. , 1960, 14, 510 (p.60)
- 125 JOHANSSON B.- Acta Chem. Scand., 1969, 23, 683 (p. 60)
- 126 KEMPE C.H. et BENENSON A.S. - J. Pediatr., 1953, 42, 525 (p. 55)
- 127 KENYON A.J., ANDERSON R.K. et JENNESS R. - J. Dairy Sci., 1959, 42, 133
(p. 29, 111)
- 128 KICKHÖFEN B., HAMMER D.K. et SCHEEL D. - Hoppe Seylers Physiol. Chem.,
1968, 349, 1755 (p.35, 36, 39, 137)
- 129 KIERMEIER F. et KAYSER C. - Z. Lebensm. Unters. Forsch., 1960, 112, 481
(p. 71)
- 130 KITASATO S. - Z. Hyg. Infekt., Kr., 1890, 8 , 55 (p.42)
- 131 KLEMPERER F. - Arch. sep. Path. Pharmak., 1893, 31, 356 (p. 43)
- 132 KOBAYASHI K.- Immunochemistry 1971, 8 , 785 (p. 23)
- 133 KOBUS W. - D.E.S., Lille, France, 1961 (p.15, 16)
- 134 KOIDE N. et MURAMATSU T. - J. Biol. Chem., 1974, 249, 4897 (p. 217)
- 135 KONISBERG W. et HILL R.J. - J. Biol. Chem. , 1962, 237, 2547 (p. 95)
- 136 KORNFELD R. , KELLER J., BAENZIGER J. et KORNFELD S. - J. Biol. Chem.,
1971, 246, 3259 (p. 215, 262)
- 137 KUHN R. , BAER H.H. et GAUHE A. - Chem. Ber., 1956, 89, 2519 (p. 98)
- 138 KUMAR S. et MIKOLAJCIK E.M. - J. Dairy Sci., 1973, 56, 255 (p. 38)
- 139 KUSAMA K. - J. Biochem., 1957, 44, 375 (p.93)
- 140 LASKOWSKI M. Jr. et LASKOWSKI M. - J. Biol. Chem., 1951, 190, 653
(p. 49, 73)

- 141 LARSON B.L. et KENDALL K.A. - J. Dairy Sci., 1957, 40, 377 (p. 15)
- 142 LARSON B.L., ROLLERI G.D. et KENDALL K.A. - J. Dairy Sci., 1956, 39,
204. (p. 15)
- 143 LAURELL C.B. - Anal. Biochem., 1966, 15, 45 (p. 66)
- 144 LEE C.S. et LASCELLES A.K. - Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1969, 47,
613 (p. 52)
- 145 LEE Y.C. et SCOCCA J.R. - J. Biol. Chem. , 1972, 247, 5753 (p. 106)
- 146 LEECE J.G. - J. Physiol., 1966, 184, 594 (p. 42)
- 147 LEGER D. - Thèse Doct. 3ème cycle, Lille, France, 1974 (p. 237)
- 148 LEGER D., SPIK G., VERBERT A., DUPIRE C. et MONTREUIL J. - XIème
journées Biochimiques latines Salamanque,
24-27 Avril 1973, C 66(p. 227)
- 149 LENNOX E.S. et COHN M. - in BOYER P.D., Annual review of Biochemistry
Annual Reviews, 1967, 36, I, 365 (p. 146)
- 150 LEPINE P. - Triangle, 1965, VI., 146, Sandoz Ed. (p.57)
- 151 LEVY A.L. - Nature , 1954, 174, 126 (p. 177)
- 152 LI Y.T. et LEE Y.C. - J. Biol. Chem., 1972, 247, 3677 (p. 109)
- 153 LI S.C. et LI Y.T. - J. Biol. Chem. , 1970, 245, 5153 (p. 108, 109)
- 154 LIGHT A. et GREENBERG J. - J. Biol. Chem. , 1965, 240, 258 (p. 95)
- 155 LINDERSTRØM - LANG K.- C.R. Trav. Lab. Carlsberg, 1929, 17, n°9 (p. 113)
- 156 LISOWSKI J., JANUSZ M., TYRAN B., MORAWIECKI A., GOYAB S. et BIAŁKOWSKA A.
Immunochemistry, 1975, 12, 167. (p. 36, 39, 41)

- 157 LITTLE R.B. et ORCUTT M.L. - J. Exp. Med., 1922, 35, 161 (p. 44)
- 158 LIU T.Y. et CHANG Y.H. - J. Biol. Chem., 1971, 246, 2842 (p. 78, 246)
- 159 LOISILLIER F., GOT R., BURTIN P. et GRABAR P. - in PEETERS H.
Protides of the Biological fluids, Elsevier,
Amsterdam, 1966, 14, 133 (p. 69)
- 160 MACH J.P. - Nature, 1970, 228, 1278 (p. 25)
- 161 MACH J.P., PAHUD J.J. et ISLIKER H. - Nature, 1969, 223, 952 (p. 22, 25,
38, 52)
- 162 MACKENZIE D.D.S. et LASCELLES A.K. - Aust.J. exp. Biol. Med. Sci., 1968,
46, 285 (p. 42)
- 163 MANCINI G., CARBONARA A.O. et HEREMANS J.F. - Immunochemistry, 1965, 2,
235 (p. 255)
- 164 MASSON P. - in "LA LACTOFERRINE," Arsacia , Bruxelles, Belgique, 1970
(p. 69, 227)
- 165 MASSON P.L., CARBONARA A.O. et HEREMANS J.F. - Biochim. Biophys. Acta,
1965, 107, 485 (p. 69)
- 166 MASSON J.N., DALLING T. et GORDON W.S. - J. Path. Bact., 1930, 33, 783
(p. 44)
- 167 MASSON P.L. et HEREMANS J.F. - in PEETERS H., Protides of the Biological
Fluids, Elsevier , Amsterdam, 1966, 14, 115 (p. 60, 69, 70)
- 168 MASSON P.L. et HEREMANS J.F. - Comp. Biochem Physiol., 1971, 39 B, 119
(p. 66)
- 169 MASSON P.L. , HEREMANS J.F. et DIVE C.H. - Clin. Chim. Acta, 1966, 14,
735 (p. 69)
- 170 MASSON P.L., HEREMANS J.F. et FRIGNOT J. - Biochim. Biophys. Acta, 1965
111, 466 (p. 69)
- 171 MATSUSHIMA Y. et FUJII N. - Bull. Chem. Soc., Japan, 1957, 30, 48 (p. 103)

- 172 MAZURIER J., SPIK G. et MONTREUIL J. - F.E.B.S. Letters, 1974, 48, 262
(p. 66)
- 173 MAZURIER - DEHAINE - Thèse Doct. 3ème cycle, Lille, France, 1973 (p. 219,
253, 255, 258, 266)
- 174 Mc MEEKIN T.L. - J. Milk and Food Technol., 1952, 15, 57 (p. 15)
- 175 MESTECKY J. , KULHAVY R. et KRAUS F.W. - Fed. Proc. , 1971, 30, 1527 (p. 2)
- 176 MESTECKY J., ZIKAN J. et BUTLER W.T. - Science, 1971, 171, 1163 (p. 19)
- 177 MESTECKY J., ZIKAN J., BUTLER W.T. et KULHAVY R. - Immunochemistry, 1972,
9, 883 (p. 24)
- 178 MHATRE N.S. , LEEDER J.C. et WOGAN G.N. - J. Dairy Sci. , 1962, 45, 717
(p. 30)
- 179 MICHL H. - Monatsch, Chem. , 1951, 82, 489 (p. 91, 92, 100, 105, 156, 184,
186, 210)
- 180 MIHAESCO C. - Path. Biol., 1967, 15, 835 (p. 146)
- 181 MONSIGNY M. - Symposium Compagnie Technicon, Paris, 1965 (p. 35)
- 182 MONSIGNY M. - Thèse Doct. ès Sci., Lille, France, 1968 (p. 78, 87, 94, 156)
- 183 MONTGOMERY R. et WU Y.C. - J. Biol. Chem., 1963, 238, 3547 (p. 90)
- 184 MONTREUIL J. , BISERTE G. , MULLET S. , SPIK G. et LEROY N. - C.R. Acad.
Sci. , 1961, 252, 4065 (p. 135, 229)
- 185 MONTREUIL J., CHOSSON A., HAVEZ R. et MULLET S. - C.R. Soc. Biol., 1960,
154, 732 (p. 15, 19, 21, 111, 267)
- 186 MONTREUIL J. , CHOSSON A. et SPIK G. - C.R. Acad. Sci., 1962, 255, 3493
(p. 217, 262)
- 187 MONTREUIL J. et MULLET S. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1960, 42, 368 (p. 15)

- 188 MONTREUIL J. et MULLET S. - C.R. Acad. Sci., 1960, 250, 1376 (p. 60, 66)
- 189 MONTREUIL J. et SPIK G. - Microdosage des glucides, Monographie n°1, Lille, 1963 (p. 76)
- 190 MONTREUIL J. , SPIK G., DUMAISNIL J. et MONSIGNY M. - Bull. Soc. Chim. 1965, 239 (p. 76, 138)
- 191 MONTREUIL J., TONNELAT J. et MULLET S. - Biochim. Biophys. Acta, 1960, 45, 413 (p. 60, 61, 70, 227, 229)
- 192 MORRIS I.G. - Proc. Roy. Soc., 1963, B.157, 160 (p. 50)
- 193 MORRISSON M. et ALLEN P.Z.- Science, 1970, 152, 1627 (p. 69)
- 194 MORRISSON M., ALLEN P.Z., BRIGHT J. et JAYASINGHE W. - Arch. Biochem. Biophys., 1965, 111 126 (p. 71)
- 195 MOSSMAN H., BARTSCH K., RUDE E., KICKHÖFEN B. et HAMMER D.K. - Eur. J. Immun., 1973, 3, 239 (p. 41)
- 196 MUKKUR T.K.S. et FROESE A. - Immunochemistry, 1971, 8, 257 (p. 38)
- 197 MURALT G.von, GUGLER E. et ROULET D.L.A. - in PEETERS H. , Protides of the biological fluids 8 th colloquium, 1960, Elsevier, Amsterdam 1961, 8, 166 (p.15)
- 198 MURALT G.von, GUGLER E. et ROULET D.L.A. - in GRABAR P. and BURTIN P. Immunophoretic analysis, Elsevier, Amsterdam, 1964, 261 (p. 17)
- 199 MURPHY F.A. - Ph. D. Thesis University of California, Davis, 1964, University microfilms, Inc, Ann Arbor, Michigan, U.S.A. (p.121, 128)
- 200 MURPHY F.A., AALUND O., OSEBOLD J.W. et CARROLL E.J. - Arch. Biochem. Biophys., 1964, 108, 230 (p. 30, 34, 41, 84)
- 201 NAGASAWA T. , KIYOSAWA I. et KUWAHARA K.- J. Dairy Sci., 1972, 55, 1651 (p. 66, 68)
- 202 NARDUCCI U. et PALAZZETTI P. - Minerva ginec., 1955, 7, 427 (p. 15)

- 203 NEVILLE D.M. - J. Biol. Chem. , 1971, 246, 6328 (p. 83)
- 204 NIAZI S. et STATE D.- Cancer Research, 1948, 8, 653 (p. 108, 210, 213)
- 205 NICOL L., GIRARD O., CORVAZIER R., CHEYROUX M., RECLAR P. et SIZARET Ph.
Rev. Immunol. (Paris), 1960, 24, 16 (p. 10)
- 206 NIEDERMEIER N., KIRKLAND T., ACTON R.T. et BENNETT J.C. - Biochim.
Biophys. Acta, 1971, 237, 442 (p. 139, 140, 145)
- 207 NIEDERMEIER W., TOMANA M. et MESTECKY J. - Biochim. Biophys. Acta,
1972, 257, 527 (p. 23)
- 208 NIU C.I. et FRAENKEL-CONRAT J. - Ann. Chem. Soc., 1955, 77, 5882 (p.232)
- 209 NOLAN C. et SMITH E.L. - J. Biol. Chem., 1962, 237, 453 (p. 35, 36, 188,
261)
- 210 NORDBRING F.- Acta Soc. Med. Upsaliensis, 1957, 62, 113 (p. 15)
- 211 ORAM J.D. et REITER B.- Biochem. J., 1966, 100, 373 (p. 71)
- 212 ORAM J.D. et REITER B.- Biochim. Biophys. Acta, 1968, 170, 351 (p. 60, 65,
69, 70, 219)
- 213 ORCUTT M.L. et HOWE P.E. - J. Exp. Med., 1922, 36, 291 (p. 44)
- 214 OUCHTERLONY O. - Acta Pathol. Microbiol. Scand., 1949, 26, 507 (p. 79, 128
135)
- 215 PARK J.T. et JOHNSON M.J. - P. Biol. Chem., 1949, 181, 149 (p. 92)
- 216 PARTRIDGE S.M. - Biochem.J. , 1948, 42, 238 (p. 90, 92, 156, 161, 180, 182)
- 217 PARTRIDGE S.M. - Biochem. Soc. Symp., 3, 52, Cambridge University Press,
London, 1949 (p. 100, 106, 199, 214)
- 218 PAUPE J. et MEYER B. - Path. Biol., 1960, 17, 87 et 191 (p. 8, 12, 13, 17,
18, 51, 54, 55, 56)

- 219 PAYNE L.C. et MARSA C.L. - Federation Proc., 1962, 21, 909 (p. 46)
- 220 PERY P. - Path. Biol., 1969, 17, 77 (p. 146)
- 221 PETERMAN M.L. - J. Am. Chem. Soc., 1946, 68, 106 (p. 50)
- 222 PIERCE A.E. et SMITH N.W. - J. Physiol., 1967, 190, 1 (p. 42)
- 223 PIERCE A.E. et SMITH N.W. - J. Physiol., 1967, 190, 19 (p. 42)
- 224 PIEZ K.A. et MORRIS L. - Anal. Biochem., 1960, 1, 187 (p. 78)
- 225 POLIS B.D. et SHMUKLER H.W. - J. Biol. Chem., 1953, 201, 475 (p. 71, 220)
- 226 PORTER P. - Immunology, 1972, 23, 225 (p. 46)
- 227 PORTER R.R. - Biochem. J., 1950, 46, 479 (p. 50)
- 228 PORTER R.R. - Nature, 1958, 182, 670 (p. 50)
- 229 PORTER P. et NOAKES D.E. - Biochim. Biophys. Acta, 1970, 214, 107
(p. 25, 37, 52)
- 230 RATNER B., JACKSON H.C. et GRUEHL H.L. - J. Immunol., 1927, 14, 275
(p. 8, 43)
- 231 REES R.J.W. et CARBUTT E.W. - Immunology, 1961, 4, 88 (p. 55)
- 232 REITER B., BROCK J.H. et STEEL E.D. - Immunology, 1975, 28, 83
(p. 70, 72, 266)
- 233 RIMINGTON C. - Biochem J., 1931, 25, 1062 (p. 76)
- 234 ROBINSON J.C. et PIERCE J.E. - Arch. Biochem. Biophys., 1964, 106, 348
(p. 108)
- 235 RUTISHAUSER U., CUNNINGHAM B.A., BENNETT C., KONIGSBERG W.H. et
EDELMAN G.M. - Biochemistry, 1970, 9, 3171 (p. 190, 262)

- 236 SABIN A.B., MICHAELIS B.H., KRUGMAN S., EIGER M.E., BERMAN P.H. et WARREN J. - Pediatrics, 1963, 31, 623 (p. 52)
- 237 SAGER C.A. - Mschr. Kinderheilk, 1959, 107, 402 (p. 15)
- 238 SANDFORD P.A. et CONRAD H.E. - Biochemistry, 1966, 5, 1508 (p.99)
- 239 SANGER F. - Biochem. J. , 1945, 39, 507 (p. 94)
- 240 SCHADE A.L. et CAROLINE L. - Science, 1944, 100, 14 (p. 70)
- 241 SCHNEIDER L. et SZATHMARY J. - Z. Immun. Forsch., 1938, 94, 438 (p. 8, 43)
- 242 SCHULTZE H.E. et HEREMANS J.F. - in SCHULTZE H.E. et HEREMANS J.F., Molecular biology of human proteins, Elsevier , Amsterdam, 1966, 1, 518 (p. 11, 12, 13)
- 243 SCHULTZE K.E. et MULLER F. - Milchwissenschaft, 1954, 9, 375 (p.15)
- 244 SEBELIEN J. - Z. physiol. Chem., 1885, 9, 445 (p. 25)
- 245 SHAPIRO A.L., VINUELA E. et MAIZEL J.V. - Biochem. Biophys. Res. Comm., 1967, 28, 815 (p. 83)
- 246 SHIM B.S., KANG Y.S., KIM W.J., CHO S.H. et LEE D.B. - Nature, 1969, 222, 787 (p. 51)
- 247 SMITH E.L. - J. Biol. Chem., 1946, 164, 345 (p. 14, 25, 26, 27, 30, 36, 111)
- 248 SMITH E.L. - J. Biol. Chem., 1946, 165, 665 (p. 14, 26, 28, 30)
- 249 SMITH K.L., CONRAD H.R. et PORTER R.M. - J. Dairy Sci., 1971, 54, 1427 (p. 69, 72, 223)
- 250 SMITH E.L., GREENE R.D. et BARTNER E. - J. Biol. Chem., 1946, 164, 359 (p. 36)
- 251 SMITH T. et LITTLE R.B. - J. Exp. Med., 1922, 36, 181 (p.44)

- 252 SMITH T. et LITTLE R.B. - J. Exp. Med., 1923, 37, 671 (p. 44)
- 253 SMITH T. et LITTLE R.B. - J. Exp. Med., 1924, 39, 303 (p. 44, 46)
- 254 SMITHIES O. - Biochim. J., 1955, 61, 629 (p. 79)
- 255 SMYTH D.G. - in HIRS C.H.W., Methods in Enzymology, (Academic Press, New-York and London, 1967, volume XI, 220 et 224 (p.89)
- 256 SOKOLOVSKY M., SADEHT et PATCHORNIK A. - J. Amer. Chem. Soc., 1964, 86, 1212 (p. 92)
- 257 SØRENSEN M. et SØRENSEN S.P.L. - C.R. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Chim. 1939, 23, 55 (p.60)
- 258 SPACKMAN D.H., STEIN W.A. et MOORE S. - Anal. Chem., 1958, 30, 1190 (p.78)
- 259 SPIK G.- Thèse Doct. ès Sci., Lille, France, 1968 (p. 84, 87, 229, 230, 233, 258, 266)
- 260 SPIK G. - Ann. Nutr. Alim., 1971, 25, 81 (p. 60, 70, 227)
- 261 SPIK G., MONSIGNY M. et MONTREUIL J. - C.R. Acad. Sci., 1965, 260, 4282 (p. 87)
- 262 SPIK G., VANDERSYPPE R., FOURNET B., CHARET P., BOUQUELET S., STRECKER G. et MONTREUIL J. - in J. MONTREUIL - Actes du colloque international n° 211 du C.N.R.S. sur les glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq 21-27 Juin 1973, Ed., C.N.R.S., Paris, 1974, 483 (p. 66, 67)
- 263 SPIK G., VANDERSYPPE R., MONTREUIL J., TETAERT D. et HAN K.K. - F.E.B.S., Letters, 1974, 38, 213 (p. 67)
- 264 SQUIRE P.G., DELIN S. et PORATH J. - Biochim. Biophys. Acta, 1964, 89, 409 (p. 81)
- 265 STANWORTH D.R. et PARDOE G.I. - in WEIR D.M., Handbook of Experimental Immunology, Acad. Press , 1967, 135-328 (p.146)
- 266 VON STECK F.T. - Schweiz. Arch. Tierheil, 1962, 104, 593 (p. 46)

- 267 SVEHAG S.E. et BLOTH B.- Science, 1970, 168, 847 (p. 19)
- 268 SWEELEY C.C., BENTLEY R., MAKITA M. et WELLS W.W. - J. Amer. Chem. Soc., 1963, 85, 2497 (p. 76, 101, 138)
- 269 SZUCHET - DERECHIN S. et JOHNSON P. - Europ. Polymer J., 1965, 1, 271 (p.60, 64, 219)
- 270 SZUCHET - DERECHIN et JOHNSON P. - Europ. Polymer J., 1965, 1, 283 (p. 225, 226)
- 271 SZUCHET - DERECHIN S. et JOHNSON P. - Europ. Polymer J., 1966, 2, 29 (p. 227)
- 272 TAI T., ITO S., YAMASHITA K., MURAMATSU T. et KOBATA A. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 65, n°3, 968 (p.217, 262)
- 273 TILLMANS J. et PHILIPPI K. - Biochem Z., 1929, 215, 36 (p. 76)
- 274 TOMASI T.B. et BIENENSTOCK J. - Secretory Immunoglobulins, Adv. Immunol. 1968, 9, 1 (p.19, 20, 23, 53)
- 275 VAERMAN J.P. - in Studies on IgA Immunoglobulins in Man and Animals, Sintal - Louvain, Louvain, Belgique, 1970 (p. 52)
- 276 VAHLQUIST B. - Adv. Pediat., 1958, 10, 305 (p. 45)
- 277 VAN ORDEN H.O. et CARPENTER F.H. - Biochem. Biophys. Res. Comm., 1964 14, 399 (p. 91)
- 278 VESTERBERG O. et SVENSSON H. - Acta Chem. Scand., 1966, 20, 820 (p. 80)
- 279 WAITE R. et WHITE J.C.D. - J. Dairy Res., 1956, 23, 65 (p. 15)
- 280 WARNER R.C. et POLIS E. - J. Amer. Chem. Soc., 1945, 67, 529 (p. 73)
- 281 WARREN R.J., LEPOW M.L., BARTSCH G.E. et ROBBINS F.C. - Pediatrics, 1964, 34, 4 (p. 52)

- 282 WASSERMANN A. - Z. Hyg. Infekt. Kr, 1894, 18, 235. (p. 25)
- 283 WERNER I. et ODIN L. - Acta Soc. Med. Upsaliensis , 1952, 57, 230
(p. 76, 108, 210, 211)
- 284 WITTY R., BROWN P. et SMITH M.W. - Experientia, 1969, 25, 310 (p. 42)
- 285 WORK T.S., CAMPBELL P.N. et ASKONAS B.A. - Symposium sur la biogénèse
des protéines, II° Congrès international de Biochimie, Paris
1952 (p. 40)
- 286 YAMAGUCHI H., IKENAKA T. et MATSUSHIMA Y. - J. Biochem., 1971, 70,
587 (p. 264)
- 287 YAMASHINA I. et MAKINO M. - J. Biochem., 1962, 51, 359 (p. 87)
- 288 ZANETTA J.P., BRECKENRIDGE W.C. et VINCENDON G. - J. Chromatog., 1972,
69, 291 (p. 78, 197, 199, 210, 230)
- 289 ZINKERNAGEL R.M., HILPERT H. et GERBER H. - Experientia, 1972, 28,
741 (p. 58, 266)

