

N° d'ordre : 1129

50376
1983
149

50376
1983
149

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE 3^{ème} CYCLE

EN BIOCHIMIE

par

Dimitri PERTSOUNIS



APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR LIGANDS GLYCANNIQUES IMMOBILISES A L'ISOLEMENT D'ANTICORPS ANTIGLYCANNES ET DE GLYCOSYLTRANSFERASES

Présentée le 7 décembre 1983 devant la Commission d'Examen

Président	M	J. MONTREUIL
Rapporteurs	MM	G. STRECKER A. VERBERT
Examineur	M	S. BOUQUELET

Ce travail a été réalisé sous la Direction de
Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL dans le Laboratoire de
Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques
de Lille (Laboratoire associé au C.N.R.S. n° 217 : Relation
structure-fonction des constituants membranaires).

ABREVIATIONS

Asn :	L-Asparagine
CDP :	Cytosine diphosphate
Dol :	Dolichol
EDTA :	Acide éthylène diamine tétra-acétique (sel disodique)
Fuc :	L-Fucose
Gal :	D-Galactose
GalNAc :	N-acétyl-D-galactosamine
GDP :	Guanosine diphosphate
Glc :	D-Glucose
GlcNAc :	N-acétyl-D-glucosamine
Gly :	L-Glycine
Hyl :	L-Hydroxylysine
Hyp :	L-Hydroxyproline
Le :	Lewis
Man :	D-Mannose
PBS :	Tampon Phosphate de sodium 0,01 M, 0,15 M NaCl, pH 7,4
SAB :	Sérum Albumine Bovine
SDS :	Sodium dodécylsulfate-lauryl sulfate de sodium
Ser :	L-Sérine
Thr :	L-Thréonine
UDP :	Uridine diphosphate
UMP :	Uridine monophosphate
Xyl :	D-Xylose

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

GENERALITES

BIOLOGIE MOLECULAIRE DES GLYCOCONJUGUES	p. 3
<u>I - RÔLE DES GLYCOCONJUGUÉS DE SURFACE</u>	p. 4
A - <u>LES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES EN TANT QUE DETERMINANTS ANTIGENIQUES</u>	
1) <u>ANTIGENES DE GROUPES SANGUINS</u>	p. 4
a - <u>Déterminants antigéniques portés par les glyco-lipides</u>	p. 4
b - <u>Déterminants antigéniques portés par les glyco-protéines</u>	p. 5
2) <u>ANTIGENES D'HISTOCOMPATIBILITE ET DE TRANSPLANTATION</u>	p. 7
B - <u>ROLE DU GLYCANNE AU NIVEAU DE LA CONFORMATION DES PROTEINES ET ROLE DE PROTECTION CONTRE LES ATTAQUES PROTEOLYTIQUES</u>	p. 9
C - <u>CONTROLE DE LA PERMEABILITE MEMBRANAIRE</u>	p. 9
D - <u>GLYCANNES EN TANT QUE "SIGNAUX DE RECONNAISSANCE"</u>	p. 10
<u>II - STRUCTURE DES GLYCOCONJUGUÉS DE SURFACE</u>	p. 11
A - <u>LES GLYCOPROTEINES</u>	p. 12
1) <u>LES O-GLYCOSYLPROTEINES</u>	p. 12
a - <u>Liaison glycanne-Ser (Thr)</u>	p. 12
b - <u>Liaison glycanne-hydroxylysine ou hydroxyproline</u>	p. 14
2) <u>LES N-GLYCOSYLPROTEINES</u>	p. 14

- a - Glycannes de type oligomannosidique p. 15
b - Glycannes de type N-acétyllactosaminique p. 16

BIOSYNTHESE DES GLYCOPROTEINES p. 19

I - LES PARTENAIRES DE LA RÉACTION DE GLYCOSYLATION p. 19

A - LE SUCRE DONNEUR p. 19

B - L'ACCEPTEUR p. 20

C - LES GLYCOSYLTRANSFERASES p. 20

II - BIOSYNTHESE DES N-GLYCOSYLPROTÉINES p. 22

III - BIOSYNTHESE DES O-GLYCOSYLPROTÉINES p. 27

IV - GALACTOSYLTRANSFÉRASES p. 30

A - GALACTOSYLTRANSFERASE DU LAIT p. 32

B - INTERACTION GALACTOSYLTRANSFERASE- α LACTALBUMINE p. 32

C - GALACTOSYLTRANSFERASES MEMBRANAIRES p. 33

D - GALACTOSYLTRANSFERASES SÉRIQUES p. 35

E - RELATION ACTIVITÉ GALACTOSYLTRANSFERASIQUE-CANCER ? p. 35

V - CONCLUSIONS p. 36

NEOGLYCOPROTEINES (ANTIGENES DE SYNTHESE)	p. 38
<u>I - PRÉPARATION DES NÉOGLYCOPROTÉINES</u>	p. 39
A - <u>COUPLAGE PAR UNE REACTION DE DIAZOTATION</u>	p. 40
B - <u>METHODE DE COUPLAGE AU PHENYLISOTHIOCYANATE</u>	p. 40
C - <u>COUPLAGE PAR AMIDATION</u>	p. 40
1) <u>COUPLAGE DES OLIGOSACCHARIDES POSSEDANT UN GROUPE CARBOXYLIQUE</u>	p. 40
2) <u>COUPLAGE D'UN OLIGOSACCHARIDE POSSEDANT UNE FRACTION AMINE</u>	p. 43
D - <u>COUPLAGE PAR AMIDINATION</u>	p. 43
E - <u>COUPLAGE PAR AMINATION REDUCTIVE</u>	p. 43
F - <u>COUPLAGE PAR GUANIDYLATION</u>	p. 45
G - <u>UTILISATION DE REACTIFS BIFONCTIONNELS POUR LE COUPLAGE DES OLIGOSACCHARIDES</u>	p. 45
H - <u>METHODES ENZYMATIQUES</u>	p. 45
<u>II - APPLICATION DES NÉOGLYCOPROTÉINES</u>	p. 47
A - <u>ANTIGENES DE SYNTHESE</u>	p. 47
B - <u>AUTRES APPLICATIONS</u>	p. 50

	CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE	p. 52
I -	<u>PRÉPARATION DES ADSORBANTS</u>	p. 52
A -	<u>ACTIVATION DES SUPPORTS</u>	p. 52
	1) <u>CELLULOSE</u>	p. 52
	2) <u>AGAROSE</u>	p. 53
	3) <u>POLYACRYLAMIDE</u>	p. 53
	4) <u>BILLES DE VERRE</u>	p. 53
B -	<u>LIGANDS OLIGOSACCHARIDIQUES</u>	p. 53
II -	<u>APPLICATIONS</u>	p. 55
A -	<u>PURIFICATION D'ANTICORPS ANTI-GLYCANNES</u>	p. 55
B -	<u>PURIFICATION DES GLYCOSYLTRANSFERASES</u>	p. 56
	1) <u>LIGANDS ANALOGUES D'ACCEPTEURS</u>	p. 58
	2) <u>ANALOGUES DE DONNEURS</u>	p. 59
	a - <u>Dérivés cytidine-5'-diphosphate</u>	p. 59
	b - <u>Dérivés de guanosine-5'-diphosphate</u>	p. 60
	c - <u>Dérivés uridine-5'-diphosphate</u>	p. 60
	3) <u>LIGANDS BIOSPECIFIQUES AUTRES QU'ANALOGUES DE SUBSTRAT</u>	p. 61
	4) <u>PURIFICATION DES GALACTOSYLTRANSFERASES PAR LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE</u>	p. 61
	a - <u>Sur α-lactalbumine</u>	p. 62
	b - <u>Sur uridine 5' diphosphate</u>	p. 63
	c - <u>Sur dérivés N-acétylglucosamine</u>	p. 64
	d - <u>Sur ovalbumine</u>	p. 65
	CONCLUSIONS	p. 66

TRAVAUX PERSONNELS

PREPARATION D'ANTIGENES DE SYNTHESE ET PURIFICATION D'ANTICORPS SPECIFIQUES	p. 68
<u>MATÉRIEL ET MÉTHODES</u>	p. 68
A - <u>MATERIEL</u>	p. 68
1) <u>PROTEINE PORTEUSE</u>	p. 68
2) <u>SUPPORT D'AFFINITE</u>	p. 68
3) <u>STRUCTURES OLIGOSACCHARIDIQUES</u>	p. 68
a - <u>Oligosaccharides isolés du lait</u>	p. 68
b - <u>Oligosaccharides urinaires</u>	p. 70
c - <u>Oligosaccharides commercialisés</u>	p. 70
4) REACTIFS	p. 70
B - <u>METHODES</u>	p. 70
1) <u>PREPARATION DES NEOANTIGENES</u>	p. 70
a - <u>Par amination réductive au cyanoborohydrure</u>	p. 71
b - <u>Couplage par diazotation</u>	p. 71
2) <u>METHODES D'ANALYSE DU PRODUIT COUPLE</u>	p. 73
a - <u>Purification et mise en évidence du produit couplé</u>	p. 73
b - <u>Détermination du degré de substitution</u>	p. 73
3) <u>PRODUCTION D'ANTICORPS</u>	p. 74
4) <u>PURIFICATION D'ANTICORPS ANTI-GLYCANNES PAR CHRO- MATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR ADSORBANT GLYCANNIQUE</u>	p. 74
a - <u>Préparation des adsorbants glycaniques</u>	p. 74
b - <u>Purification des anticorps</u>	p. 75
c - <u>Caractérisation des anticorps spécifiques</u>	p. 76

RÉSULTATS ET DISCUSSION	p. 76
<u>I - COUPLAGE DES GLYCANNES</u>	p. 76
A - <u>RESULTATS</u>	p. 76
1) <u>AMINATION REDUCTIVE AU CYANOBOROHYDRURE</u>	p. 76
2) <u>COUPLAGE DES DERIVES OLIGOSACCHARIDE-PHENYLTHYLAMINE <u>PAR DIAZOTATION</u></u>	p. 77
B - <u>DISCUSSION</u>	p. 81
1) <u>COUPLAGE AU CYANOBOROHYDRURE</u>	p. 81
2) <u>COUPLAGE PAR DIAZOTATION</u>	p. 82
C - <u>CONCLUSION</u>	p. 83
 <u>II - PRODUCTION ET PURIFICATION D'ANTICORPS ANTI-GLYCANNE</u>	 p. 84
A - <u>IMMUNISATION</u>	p. 84
B - <u>ELIMINATION DES ANTICORPS ANTI-SAB PAR DES REACTIONS <u>D'EPUISEMENT</u></u>	p. 85
C - <u>PURIFICATION DES ANTICORPS ANTI-GLYCANNES PAR CHROMATOGRAPHIE <u>D' AFFINITE</u></u>	p. 85
1) <u>PREPARATION DES ADSORBANTS</u>	p. 86
2) <u>PURIFICATION D'ANTICORPS ANTI-LACTO-N-TETRAOSE (LNT)</u>	p. 86
3) <u>PURIFICATION D'ANTICORPS ANTI-LACTO-N-FUCOPENTAOSE I <u>(LNF_I)</u></u>	p. 90
4) <u>PURIFICATION D'ANTICORPS DIRIGES CONTRE LA STRUCTURE <u>BIAntenNEE DE L'OLIGOSACCHARIDE GM₁ DE TYPE 1</u></u>	p. 91
D - <u>CONCLUSION</u>	p. 94
 <u>III - CONCLUSIONS</u>	 p. 95

PURIFICATION DES GALACTOSYL TRANSFERASES
PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

p. 96

MATÉRIEL ET MÉTHODES

p. 96

I - MATÉRIEL

p. 96

A - LES GLYCOSYLNUCLEOTIDES

p. 96

B - SOURCE ENZYMATIQUE

p. 96

C - SUPPORT D'AFFINITE

p. 96

D - ACCEPTEURS - CHOIX DES LIGANDS GLYCANNIQUES D'AFFINITE

p. 97

II - MÉTHODES

p. 98

A - PREPARATION DES ACCEPTEURS

p. 98

1) PREPARATION DES β -GLYCOPEPTIDES DE L'OVOMUCOÏDE

p. 98

2) PREPARATION DE GLYCOPEPTIDES BIAN TENNES, DESIALYLES
ET DEGALACTOSYLES

p. 101

3) PREPARATION DU LACTOTRIOSE ET DU GM₁ TYPE 1 DEGALAC-
TOSYLES

p. 102

B - IMMOBILISATION DES LIGANDS

p. 102

C - MESURE DE L'ACTIVITE GALACTOSYLTRANSFERASIQUE ET IDENTIFICATION
DES PRODUITS FORMES LORS DE LA REACTION DE GLYCOSYLATION

p. 103

D - PREPARATION DE LA GALACTOSYLTRANSFERASE

p. 106

1) SUR ULTROGEL AcA 44

p. 106

2) PRECIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM

p. 106

3) CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

p. 107

<u>RÉSULTATS ET DISCUSSION</u>	p. 109
A - <u>PREPARATION D'ACCEPTEURS SOLUBLES ET IMMOBILISÉS</u>	p. 109
1) <u>COMPOSITION MOLAIRE EN SUCRE DES ACCEPTEURS</u>	p. 109
2) <u>LIGANDS IMMOBILISÉS</u>	p. 109
B - <u>PREPARATION DE LA GALACTOSYLTRANSFERASE</u>	p. 111
1) <u>PAR CHROMATOGRAPHIE DE TAMISAGE MOLECULAIRE</u>	p. 111
2) <u>PREPARATION DE LA TRANSFERASE PAR PRECIPITATION <u>AU SULFATE D'AMMONIUM</u></u>	p. 111
C - <u>PURIFICATION DE LA GALACTOSYLTRANSFERASE PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE</u>	p. 115
1) <u>ALPHA-LACTALBUMINE</u>	p. 115
2) <u>B-GLYCOPEPTIDE DE L'OVOMUCOIDE</u>	p. 118
3) <u>GLYCOPEPTIDES BIAN TENNES ET DEGALACTOSYLES</u>	p. 129
4) <u>CONCLUSION</u>	p. 131
E - <u>CONCLUSIONS</u>	p. 132

CONCLUSION GENERALE

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Les glycoconjugués constituent une des plus importantes classes des composés biologiques; largement répandus dans le monde animal, végétal et au niveau des microorganismes, ils entrent en particulier dans la composition de la membrane plasmique de la cellule.

Les recherches menées ces dernières années ont démontré l'importance considérable de ces molécules -et notamment des glycoprotéines- dans des fonctions biologiques prépondérantes en tant qu'anticorps, enzymes, déterminants antigéniques, récepteurs d'hormones et de virus, rôle de protéines de transport (transferrine), rôle dans la reconnaissance cellulaire et l'adhésion, rôle dans la perméabilité membranaire (HUGHES : 1). Il existe maintenant une pathologie des glycoprotéines appelée glycoprotéinoses ou glycanoses (MONTREUIL : 2).

De nombreuses équipes de chercheurs ont focalisé leur intérêt sur le rôle que joue la copule glucidique dans ces divers phénomènes biologiques et pathologiques où sont impliqués les glycoconjugués de surface et qui nécessitent une grande spécificité moléculaire (COOK : 3).

Il apparaît ainsi que la mise au point de méthodes de plus en plus fines est nécessaire pour la meilleure connaissance de la structure et de la conformation des glycannes et pour l'établissement, d'une part des lois relatives aux séquences oligosaccharidiques (MONTREUIL : 4) et, d'autre part, des relations entre structure et activités biologiques spécifiques aux glycoprotéines qui, dirigées vers le milieu extérieur de la membrane cellulaire, constituent des "signaux de reconnaissance".

La chromatographie d'affinité est devenue une méthode de choix pour la purification des macromolécules et pour déterminer la nature des différentes interactions spécifiques de ces substances. Elle est largement utilisée pour la purification d'anticorps, d'enzymes, de coenzymes, d'inhibiteurs d'enzymes, de récepteurs d'hormones, de lectines, d'acides nucléiques mais aussi pour la détermination des interactions de différentes protéines avec des ligands de grand et de faible poids moléculaire. Etant donnée la difficulté d'isoler directement à partir

des membranes les glycoconjugués de surface, nous nous sommes proposé, dans cette même voie, de préparer des néoglycoprotéines (antigènes de synthèse) par couplage d'un motif glycanique à une protéine porteuse en vue d'obtenir des anticorps dirigés de façon spécifique contre cette copule glucidique. En effet, il est possible d'obtenir une série de dérivés qui diffèrent au niveau de leurs motifs structuraux glycaniques et l'utilisation de ces antigènes de synthèse permettra de déterminer les motifs glycaniques qui contribuent à l'immunogénéité des glycanes.

Les anticorps antiglycannes obtenus contre ces antigènes de synthèse (et purifiés par chromatographie d'affinité sur 1 adsorbant spécifique) peuvent être utilisés pour prouver la présence et la fonction des glycoconjugués de surface. Ils peuvent permettre, en outre, d'aborder l'étude de la dynamique membranaire.

D'autre part, la chromatographie d'affinité (avec l'aide d'adsorbants glycaniques) est une méthode de choix pour la purification des glycosyltransférases des liquides biologiques. En effet, des études bien précises sont nécessaires avec l'aide d'adsorbants spécifiques de façon à déterminer les relations spécificité enzymatique-substrats, mais aussi à définir l'ordre de transfert de motifs monosaccharidiques sur les différentes branches des glycanes. Dans ce contexte nous avons pris l'exemple particulier des galactosyltransférases. En effet, l'existence de plusieurs types de liaisons décrites au niveau des glycoprotéines semble indiquer que plus d'une galactosyltransférase peut contribuer à l'incorporation du galactose au niveau des accepteurs glycoprotéiniques. C'est donc leur présence et leur spécificité qui définissent les structures glycaniques.

L'exposé de nos travaux sera précédé d'un chapitre précisant, dans leurs grandes lignes, la biologie moléculaire des glycoconjugués de surface, la préparation des néoglycoprotéines, ainsi que l'utilisation de la chromatographie d'affinité pour la purification des macromolécules présentant une spécificité biologique pour les ligands glycaniques.

GENERALITES

BIOLOGIE MOLECULAIRE DES GLYCOCONJUGUES

La membrane plasmique longtemps considérée comme une frontière passive entre les milieux intra et extracellulaires est aujourd'hui au centre des recherches. Présentée comme une mosaïque fluide (SINGER et NICOLSON : 5) elle est constituée par une double couche lipidique dans laquelle sont intégrées diverses protéines.

Les glycannes fraction mineure, présents uniquement à la surface externe de la membrane plasmique, sont liés de façon covalente, d'une part aux protéines (glycoprotéines) et d'autre part, aux lipides (glycolipides). Longtemps ces glycannes ont été considérés comme des substances de réserve, des produits de stockage d'énergie et des structures de support. Mais les récentes découvertes démontrent l'importance de ces composés. En effet, BURGER et GOLBERG (6), INBAR et SACHS (7) ont démontré à l'aide de lectines, que la structure des glycoconjugués et l'architecture des membranes cellulaires sont profondément modifiées dans les cellules cancéreuses. Ainsi la présence de néoantigènes de surface pourrait constituer un facteur au niveau de l'induction du cancer.

Le fait que l'activité biologique de nombreuses glycoprotéines est diminuée ou abolie à la suite d'une modification de la partie glycanique, reconforte l'idée selon laquelle le glycanne n'est pas un accident métabolique mais peut représenter des "signaux de reconnaissance" des cellules pour des cellules ou des protéines pour les cellules. (Voir revues générales : HUGHES : 8 ; MONTREUIL : 9 ; OLDEN et al. : 10).

I - RÔLE DES GLYCOCONJUGUÉS DE SURFACE

A - LES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES EN TANT QUE DETERMINANTS ANTIGENIQUES

Un très grand nombre de réactions immunologiques fait intervenir des hétérosaccharides de surface et la partie glycanique semble jouer le rôle de déterminant antigénique et porter la spécificité antigénique. Leur structure et leurs fonctions sont modifiées dans les cellules cancéreuses et dans les cellules transformées par les virus.

1) ANTIGENES DE GROUPES SANGUINS

Les antigènes de cellules animales les plus étudiés ont été les substances à activité de groupe sanguin (KABAT : 11 ; WATKINS : 12 ; LAINE et al. : 13).

Depuis la découverte des systèmes ABO en 1900 par LANDSTEINER (14) les structures de ces antigènes n'ont été bien établies que récemment à cause de la difficulté à obtenir un matériel pur à partir des membranes cellulaires. L'activité de groupe sanguin n'est pas portée par toute la molécule d'antigène mais par la copule glucidique et surtout par les sucres immunodominants se trouvant en position terminale non réductrice (KABAT : 15 ; HAKOMORI et KOBATA : 16). Le site antigénique s'étend sur 2 à 6 oses.

a - Déterminants antigéniques portés par les glycolipides

L'isolement de glycosphingolipides purs à activité de groupe sanguin ABO à partir des membranes érythrocytaires a été très difficile, tant les quantités d'antigène étaient petites. Les techniques nouvelles (spectrométrie de masse) ont permis récemment de retrouver ces structures dans les glycolipides à activité ABO (KOSCIELAK et al. : 17 ; HAKOMORI et KOBATA : 18).

Les antigènes du système Lewis sont également de nature glycosphingolipidique (TILLEY et al. : 19), mais ces antigènes sont captés par l'hématie à partir des lipoprotéines sériques et peuvent être considérés comme des antigènes extrinsèques. Les structures des déterminants ont été étudiées au niveau des membranes des hématies et dans les tumeurs humaines (MARCUS et CASS : 20 ; CROOKSTON et TILLEY : 21 ; HAKOMORI et ANDREWS : 22).

La spécificité sérologique de ces molécules est déterminée par la nature et le type de liaison des monosaccharides se trouvant en position terminale non réductrice. Au niveau de la structure de base : Gal(β 1-3)GlcNAc (type 1) ou Gal(β 1-4)GlcNAc (type 2) viennent s'attacher les résidus de α -L-fucosyl, α -D-galactosyl et le résidu α -D-N-acétyl-galactosaminyll, pour former les déterminants A, B, H, Le^a et Le^b. Les structures de ces déterminants sont représentées dans le Tableau I.

Le groupe de SHARON (HARPAZ et al. : 25) a montré que l'hydrolyse par l' α -galactosidase de grain de café) faisait disparaître l'activité B à la surface des hématies traitées par l'enzyme. Récemment ont été données les structures probables des déterminants antigéniques de groupe sanguin Lewis c et d (GRAHAM et al. : 26).

Chez l'Homme, le système de groupe sanguin possède trois antigènes P₁, P et P_k qui sont portés par des glycolipides. C'est MARCUS (27) qui a isolé la substance P₁ à partir de l'érythrocyte humain et identifiée comme étant de nature glycosphingolipidique (Structures représentées dans le Tableau II, page 8).

b - Déterminants antigéniques portés par des glycoprotéines.

Des glycoprotéines portant des déterminants ABO de type 2 ont été isolées de la membrane d'hématie. La structure de ces déterminants a été définie à partir des glycoprotéines contenues dans les produits de sécrétion comme le lait, la salive, le suc gastrique, le liquide du kyste ovarien, et il a été démontré que ces molécules avaient des spécificités A, B, H et Lewis.

TABLEAU I : Déterminants antigéniques des groupes sanguins ABO, Lewis a, b, c, d.
(GINSBURG : 23 ; GRAHAM et al. : 24).

SPECIFICITE	STRUCTURES		SPECIFICITE
	Type 1	Type 2	
		$\begin{array}{c} \text{Gal } (\beta 1-4) \text{ GlcNac-R} \\ \\ (\alpha 1-2) \\ \text{Fuc} \end{array}$	H
A ?	$\begin{array}{c} \text{GalNac } (\alpha 1-3) \text{ Gal } (\beta 1-3) \text{ GlcNac-R} \\ \\ (\alpha 1-2) \\ \text{Fuc} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{GalNac } (\alpha 1-3) \text{ Gal } (\beta 1-4) \text{ GlcNac-R} \\ \\ (\alpha 1-2) \\ \text{Fuc} \end{array}$	A
B ?	$\begin{array}{c} \text{Gal } (\alpha 1-3) \text{ Gal } (\beta 1-3) \text{ GlcNac-R} \\ \\ (\alpha 1-2) \\ \text{Fuc} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Gal } (\alpha 1-3) \text{ Gal } (\beta 1-4) \text{ GlcNac-R} \\ \\ (\alpha 1-2) \\ \text{Fuc} \end{array}$	B
Le ^a	$\begin{array}{c} \text{Gal } (\beta 1-3) \text{ GlcNac-R} \\ \\ (\alpha 1-4) \\ \text{Fuc} \end{array}$		
Le ^b	$\begin{array}{cc} \text{Gal } (\beta 1-3) \text{ GlcNac-R} & \\ & \\ (\alpha 1-2) & (\alpha 1-4) \\ \text{Fuc} & \text{Fuc} \end{array}$		
Le ^d	$\begin{array}{c} \text{Gal } (\beta 1-3) \text{ GlcNac-R} \\ \\ (\alpha 1-2) \\ \text{Fuc} \end{array}$		
Le ^c	$\text{Gal } (\beta 1-3) \text{ GlcNac-R}$		



Les antigènes M et N constituent le deuxième système majeur de groupe sanguin et sont portés par la glycophorine (voir revue générale de WINZLER : 29). La spécificité antigénique est portée par la partie glycanique (LISOWSKA : 30 ; SPINGER et al. : 31 ; WINZLER : 32) (Voir Tableau III).

Les antigènes du système I sont également de nature glycoprotéinique et ont été retrouvés au niveau de la membrane d'hématie (EBERT et al. : 35).

2) ANTIGENES D'HISTOCOMPATIBILITE ET DE TRANSPLANTATION

Les antigènes d'histocompatibilité qui constituent chez l'Homme le système HLA sont abondants dans le système lymphoïde, sur les plaquettes et leucocytes et sont constitués d'une chaîne polypeptidique et d'une glycoprotéine (WILBRANT et al. : 36).

Tout un faisceau d'arguments plaide en faveur du rôle important de certains glycannes membranaires : la transformation des lymphocytes provoquée par des lectines qui réagissent spécifiquement avec des glucides tels que le galactose, mannose, en est un bel exemple (POGO : 37).

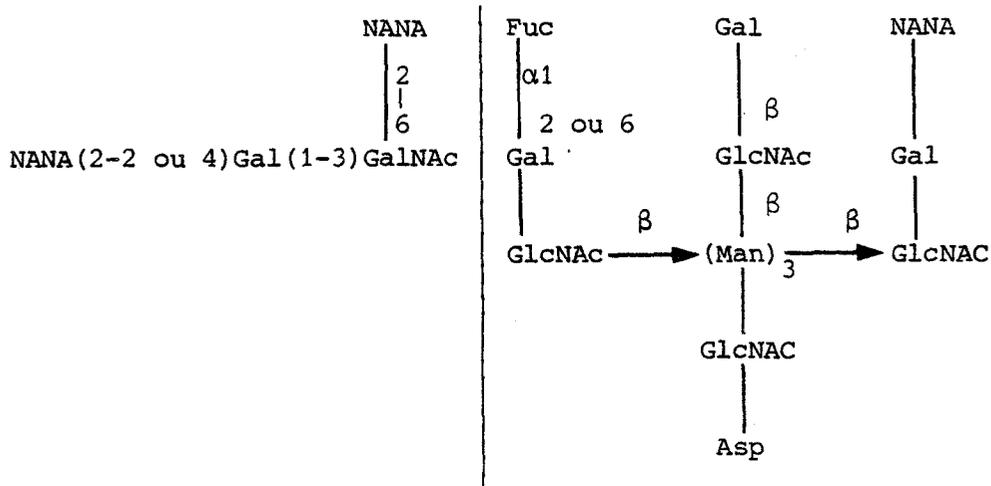
BONA et al. (38) en utilisant des glycosidases spécifiques ont apporté des indications en faveur d'un rôle direct et/ou indirect des glycannes des membranes lymphocytaires dans la réaction entre sérums antilymphocytaires et anti-tétha et membrane lymphocytaire. Il semble que l'antigène reconnu par le sérum antilymphocytaire soit une glycoprotéine dont les résidus d'acide sialique seraient impliqués dans la formation du site antigénique.

Certaines substances à activité de groupe sanguin peuvent jouer un rôle dans l'acceptation ou le rejet d'allogreffes et la spécificité de ces substances paraît être déterminée par la chaîne glucidique qui pourrait être impliquée dans des phénomènes de reconnaissance immunologique

TABLEAU II : Antigènes P, P₁ et P_k portés par des glycolipides
(MARCUS : 28).

STRUCTURES	DETERMINANTS
Gal (α1-4) Gal (β1-4) Glc-Cer	P _k
GalNAc (β1-3) Gal (α1-4) Gal (β1-4) Glc-Cer	P
Gal (α1-4) Gal (β1-4) GlcNAc (β1-3) Gal (β1-4) Glc-Cer	P ₁

TABLEAU III : Déterminants antigéniques du système M.N. isolés
par THOMAS et WINZLER (33, 34).



au niveau tissulaire. L'incompatibilité ABO provoque des rejets accélérés d'allogreffes (DAUSSET et RAPAPORT : 39).

B - ROLE DU GLYCANNE AU NIVEAU DE LA CONFORMATION DES PROTEINES ET
ROLE DE PROTECTION CONTRE LES ATTAQUES PROTEOLYTIQUES

Du point de vue physico-chimique, le glycanne contribue à l'établissement et au maintien de la conformation de la protéine qui est basée sur les interactions glycanne-glycanne et glycanne-protéine, faisant entrer en jeu des interactions ioniques ou hydrophobes.

En outre, la présence de la partie glycanne protège souvent la protéine de l'hydrolyse protéinase, plusieurs glycoprotéines voient leur résistance aux protéases diminuer après traitement à la neuraminidase.

L'emploi de la tunicamycine, un antibiotique (TAKATSUKI : 40) qui est analogue structural de l'UDP-GlcNAc et qui interdit la glycosylation des protéines, a confirmé d'une part l'action du glycanne sur la conformation des chaînes peptidiques (GIBSON et al. : 41) et d'autre part, son effet protecteur contre les attaques protéolytiques (LOH et GAINER : 42).

C - CONTROLE DE LA PERMEABILITE MEMBRANAIRE

Outre les phénomènes de perméabilité qui font appel plutôt aux canaux ou aux transports membranaires, les glycannes semblent contrôler la perméabilité membranaire à certains ions, à l'eau et à diverses substances. La structure des glycoconjugués membranaires et en particulier l'acide sialique semble réguler la perméabilité vis-à-vis des cations (ions K+) comme l'ont montré GLICK et GITHENS (43) dans les cellules leucémiques L 1210.

Le sérum de certains poissons antarctiques comme "Trematomus borchgrevinki", contient des glycoprotéines dites "antigel" qui abaissent de 1,85° C le point de congélation du sang de ces animaux. Toute modification du glycanne Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-3)Thr annule la fonction de ces glycoprotéines (VANDENHEEDE et al. : 44). Le glycanne semble interagir avec les molécules d'eau, définir leur orientation à la surface de la membrane et en conséquence contrôle les mouvements des ions et de diverses substances telles les drogues.

L'hypothèse selon laquelle il y aurait un contrôle au niveau de la sécrétion cellulaire des protéines (EYLAR : 45) est actuellement controversée (STRUCK et al. : 46).

D - GLYCANNES EN TANT QUE "SIGNAUX DE RECONNAISSANCE"

C'est à la suite des travaux remarquables du groupe d'ASHWELL (revue ASHWELL et MORELL : 47) que le concept de glycanne "signaux de reconnaissance" a été développé. Ils ont en effet démontré le rôle que joue le glycanne (au niveau de la reconnaissance intercellulaire) en tant qu'antenne au niveau des récepteurs membranaires.

La désialylation des protéines circulantes, provoquant l'apparition de résidus de galactose à l'extrémité non réductrice du glycanne, conduit à leur rapide disparition de la circulation sanguine.

Ce phénomène s'explique par le fait que

- 1°) les asialoglycoprotéines sont reconnues par des récepteurs spécifiques de l'hépatocyte et sont catabolisées par les lysosomes ;
- 2°) le signal de reconnaissance de la glycoprotéine est le résidu galactosyl démasqué par la désialylation. Le remplacement des acides sialiques manquants restaure la durée de vie normale de la glycoprotéine ;
- 3°) le récepteur présent sur les membranes hépatocytaires est une glycoprotéine et sa sialylation est nécessaire à la reconnaissance (STOCKERT et al. : 48). Le récepteur serait ainsi capable de fixer des cellules comme les hématies (JANCIK et al. : 49).

La modification des glycoconjugués de surface durant la différenciation cellulaire et la transformation néoplastique suggèrent l'importance de ces molécules dans la physiologie, le comportement de la cellule et dans les phénomènes de reconnaissance entre deux cellules aboutissant à leur adhésion. C'est ROSEMAN et ses collaborateurs (50) qui ont suggéré que l'adhésion cellulaire spécifique est régie par l'interaction de la partie glycanique des glycoconjugués de surface d'une cellule, avec les glycosyltransférases ou un facteur d'aggrégation à la surface d'une autre cellule adjacente.

En effet, des lectines membranaires et des récepteurs situés à la surface des cellules, caractérisés dans les phénomènes d'adhésion cellule-cellule (BARONDES : 51) font naître la possibilité que des interactions glycanne-lectine soient impliquées dans l'aggrégation de ces cellules.

Le traitement des cellules à la tunicamycine (qui bloque la glycosylation) affecte la morphologie et l'architecture de la surface cellulaire des fibroblastes en culture (BUTLERS : 52). De nombreuses études avec la tunicamycine suggèrent l'implication des N-glycosylprotéines au niveau de la différenciation cellulaire durant les différents stades du développement (HIEFETZ et LENNARTZ : 53).

Tous ces exemples sont en faveur du rôle joué par les glycoconjugués de surface dans les différents phénomènes cellulaires mais la nature de ces interactions ainsi que la structure et conformation de ces molécules demeurent encore indéfinies.

II - STRUCTURE DES GLYCOCONJUGUÉS DE SURFACE

Les glycoconjugués de surface sont groupés en trois classes : les glycolipides, les glycoprotéines et les protéoglycannes. La détermination de la structure de ces composés n'a été possible qu'après l'isolement des molécules et la mise au point de méthodes fines d'exploration de leur structure.

A - LES GLYCOPROTEINES

Les glycoprotéines résultent de l'association par des liaisons covalentielles de protéines avec des glycannes. L'étude structurale des glycoprotéines membranaires n'a été possible qu'avec l'utilisation de méthodes chimiques, physiques ou enzymatiques et les schémas de structures proposés se sont révélés pour une grande partie identiques à ceux trouvés pour les glycoprotéines solubles.

Selon le type de liaison covalente entre le glycanne et la protéine, on distingue deux types de glycoprotéines

- les O-glycosylprotéines où le glycanne est conjugué à un hydroxyaminoacide ;
- les N-glycosylprotéines où le glycanne est conjugué à un résidu d'asparagine par une liaison N-glycosidique.

(Voir revues générales : KORNFELD et KORNFELD : 54 ; STRECKER et MONTREUIL : 55 ; MONTREUIL : 56, 57 ; HOROWITZ et PIGMAN : 58, 59).

1) LES O-GLYCOSYLPROTEINES

Les O-glycosylprotéines présentent une grande variété de types de conjugaison. En effet, plusieurs monosaccharides (Gal, GalNac, Man, Xyl) et plusieurs amino acides (Ser, Thr, Hyl, Hyp) sont impliqués dans les points d'attache. On distingue 2 grandes classes :

- les glycoprotéines dont le glycanne est lié à la sérine ou à la thréonine (type mucine) ;
- les glycoprotéines dont le glycanne est lié à l'hydroxylysine ou à l'hydroxyproline (type collagène).

a - Liaison glycanne-Ser (Thr)

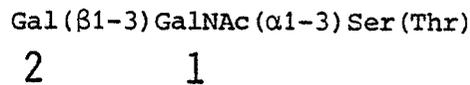
La liaison glycanne entre le N-acétyl-D-galactosamide et L-Sérine ou L-Thréonine appelée de "type mucine", est la plus fréquemment rencontrée. Le Tableau IV représente quelques exemples des glycannes type mucine.

TABLEAU IV : Exemples de glycoprotéines de type mucine

STRUCTURE DU GLYCANE LIE A LA SERINE (THR)	ORIGINE	REFERENCES
GalNac ($\alpha 1-3$) Ser	Mucine sous maxillaire de Porc	CARLSON et al. : 60
NeuAc ($\alpha 2-6$) GalNac ($\alpha 1-3$) Ser	Glande sous maxillaire de Mouton	BERTOLINI et PIGMAN : 61
Gal ($\beta 1-3$) GalNac ($\alpha 1-3$) Ser	Glycoprotéine antigène	DE VRIES : 62
NeuAc ($\alpha 2-3$) Gal ($\beta 1-3$) GalNac ($\alpha 1-3$) Ser	IgA isolée du lait de Femme	PIERCE-CRETEL et al. : 63
Fuc ($\alpha 1-2$) Gal ($\beta 1-3$) GalNac ($\alpha 1-3$) Ser	Mucine sous maxillaire de Porc (Activité de G.S. H)	DAHR et al. : 64
GalNac ($\alpha 1-3$) Gal ($\beta 1-3$) GalNac ($\alpha 1-3$) Ser $\begin{array}{c} \\ (\alpha 1-2) \\ \\ \text{Fuc} \end{array}$ $\begin{array}{c} \\ (\alpha 2-6) \\ \\ \text{NeuAc} \end{array}$	Mucine sous maxillaire de Porc (Activité A)	CARLSON et al. : 65
$ \begin{array}{c} \text{Fuc} \quad \text{Fuc} \\ \quad \\ (\alpha 1-2) \quad (\alpha 1-4) \\ \quad \\ \text{Gal} (\beta 1-3) \text{GlcNac} (\beta 1-3) \quad \text{Gal} (\beta 1-3) \text{GlcNac} (\beta 1-3) \\ \quad \quad \\ \text{Gal} (\beta 1-3) \text{GlcNac} (\beta 1-4) \quad \text{Gal} (\beta 1-3) \text{GlcNac} (\beta 1-3) \text{Gal} (\beta 1-3) \text{GlcNac} (\beta 1-3) \text{Ser} \\ \quad \quad \\ \text{Gal} (\beta 1-3) \text{GlcNac} (\beta 1-6) \quad \text{GlcNac} (\beta 1-6) \quad \text{GlcNac} (\beta 1-6) \\ \quad \quad \\ (\alpha 1-2) \quad (\alpha 1-3) \quad (\alpha 1-3) \\ \quad \quad \\ \text{Fuc} \quad \text{Fuc} \quad \text{Fuc} \\ \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{Le}^A \quad \text{Le}^B \\ \quad \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \quad \text{Le}^B \end{array} $	Mégaloglycane à activité de groupes sanguins A, B, H, Lewis a et b R = α GalNac (1-3) dans A R = α Gal (1-3) dans B R = O dans H	FEIZI et al. : 66 LLOYD et KABAT : 67



Sur le premier résidu de GalNAC viennent se greffer soit un résidu de β Gal en position C-3 soit un résidu d' α NeuAc en position C-6. Le noyau commun à de nombreux glycanes qui en dérivent par substitution est de



Sur le résidu de galactose 2 peuvent se brancher :

- 1 résidu d'acide sialique en position C-3
- 1 résidu de fucose en position C-2
- 1 résidu de N-acétylgalactosamine en position C-3.

La N-acétylgalactosamine peut aussi être substituée par des résidus N-acétyllactosaminy. (Voir revue générale de RODEN : 68).

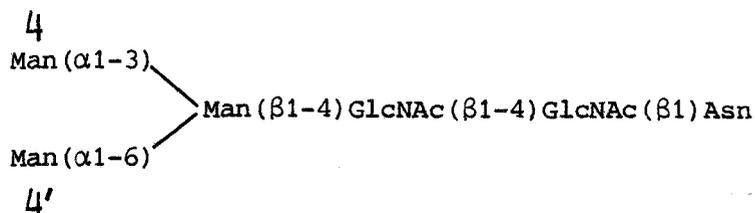
b - Liaison glycanne-hydroxyllysine ou hydroxyproline

Ce sont les glycoprotéines constitutives du collagène que l'on trouve au niveau de la membrane basale glomérulaire (BUTLER : 69). L'hydroxyllysine (OHPro) est substituée par un résidu de galactose ou par le disaccharide : Glc(α 1-2)Gal(β 1). Dans ce type de conjugaison la galactosyltransférase reconnaît la séquence peptidique : Gly-X-Xyl-Gly (MORGAN et al. : 70).

2) LES N-GLYCOSYLPROTEINES

Les glycanes sont liés N-glycosidiquement à un résidu d'Asparagine. Jusqu'à présent, seule l'association de la N-acétylglucosamine et de l'asparagine a été caractérisée. On distingue d'une part les glycanes linéaires ou N-glycanes que l'on trouve dans les protéoglycanes (RODEN : 71) et d'autre part, les glycanes ramifiés ou iso-glycanes dont les structures sont plus complexes (Nous nous limiterons à l'étude des isoglycanes).

Les glycanes branchés possèdent tous une partie interne constituée par un noyau pentasaccharidique commun :

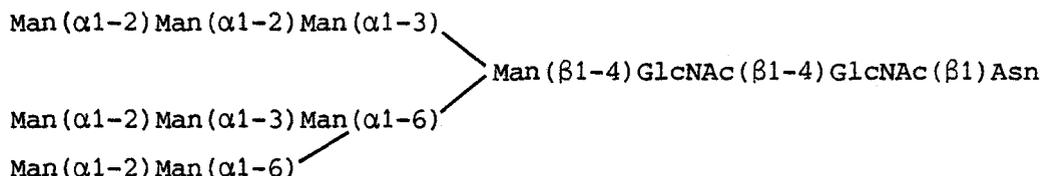


Ce noyau commun représente la partie invariable et les différentes structures glycaniques dérivent de la substitution de ce noyau par des résidus saccharidiques en position 4 et 4' et qui confèrent au glycanne sa spécificité. Ainsi on distingue deux types de glycanes :

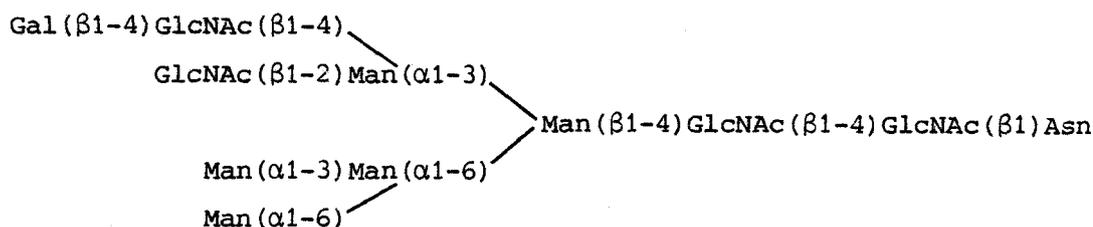
- glycanes de type oligomannosidique
- glycanes de type N-acétyllactosaminique.

a - Glycanes de type oligomannosidique

Le pentasaccharide est substitué uniquement par des résidus de mannose, dont le nombre peut varier de 3 à 9. Un tel exemple constitue le glycanne de l'unité A de la thyroglobuline de veau (ITO et al. : 72) :

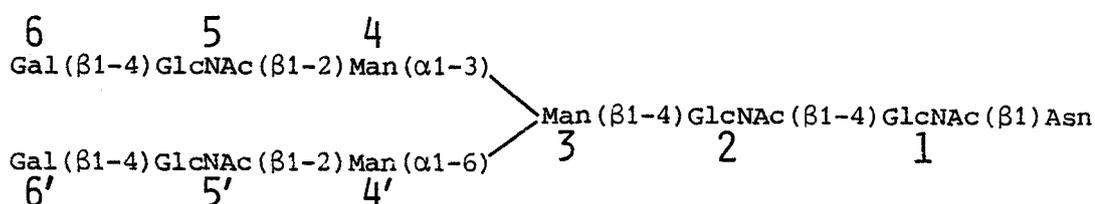


Certains glycanes contiennent des résidus de N-acétylglucosamine supplémentaires en position terminale non réductrice et constituent le type mixte décrit par KOBATA. Le glycopeptide GP-1 de l'ovalbumine de Poule en est un exemple (YAMASHITA : 73) :



b - Glycannes de type N-acétyllactosaminique

Le noyau pentasaccharidique est substitué par un nombre variable de résidus de N-acétyllactosamine (Gal(β1-4)GlcNAc), d'acide sialique et/ou de fucose. La substitution des résidus N-acétyllactosaminyl s'effectue en position 2, 4 et 6 des mannoses externes 4 et 4' pour donner des structures bi, tri, tétraantennées, sialylées, fucosylées ou non. La structure de base des glycannes biantennés de type N-acétyllactosaminique est la suivante :



La structure de quelques glycoprotéines de type N-acétyllactosaminique est donnée au Tableau V. La présence de deux types de glycannes N- et O-glycosidiques a été décrite au niveau d'une même chaîne peptidique (exemple du glycopeptide d'hépatocytes en culture : DEBRAY et MONTREUIL : 80 et de la glycophorine : WINZLER : 81).

Avant d'aborder l'étude de la biosynthèse des glycoprotéines on peut faire quelques remarques :

- Dans le cas des N-glycosylprotéines comme dans celui des O-glycosylprotéines on a une partie invariable (le noyau), mais il existe une très grande microhétérogénéité déterminée par les résidus glycosyl disposés à l'extrémité des chaînes.
- Des similitudes structurales de cette partie variable sont observées entre les glycolipides et les glycoprotéines (RAUVALA et FINNE : 82).

TABLEAU V : Exemples de structures de type N-acétyllactosaminique

	STRUCTURES	ORIGINE	REFERENCES
Biantennées	<p>NANA (α2-6) Gal (β1-4) GlcNAc (β1-2) Man (α1-3) / Man (β1-4) GlcNAc (β1-4) GlcNAc (β1) Asn</p> <p>NANA (α2-6) Gal (β1-4) GlcNAc (β1-2) Man (α1-6) / Man (β1-4) GlcNAc (β1-4) GlcNAc (β1) Asn</p> <p>NANA (α2-6) Gal (β1-4) GlcNAc (β1-2) Man (α1-3) / Man (β1-4) GlcNAc (β1-4) GlcNAc (β1) Asn</p> <p>Gal (β1-4) GlcNAc (β1-2) Man (α1-6) / Man (β1-4) GlcNAc (β1-4) GlcNAc (β1) Asn</p> <p style="margin-left: 40px;"> (α1-3) / (α1-6)</p> <p style="margin-left: 40px;">Fuc / Fuc</p> <p>NANA (α2-6) Gal (β1-4) GlcNAc (β1-2) Man (α1-3) / GlcNAc (β1-4) / Man (β1-4) GlcNAc (β1-4) GlcNAc (β1) Asn</p> <p>NANA (α2-6) Gal (β1-4) GlcNAc (β1-2) Man (α1-6) / GlcNAc (β1-4) / Man (β1-4) GlcNAc (β1-4) GlcNAc (β1) Asn</p>	<p>Sérotransferrine humaine</p> <p>Lactotransferrine humaine</p> <p>Glycopeptide d'IgG sérique humaine</p>	<p>SPIK <u>et al.</u> : 74</p> <p>SPIK <u>et al.</u> : 75</p> <p>BAENZIGER <u>et al.</u> : 76 BAENZIGER <u>et al.</u> : 77</p>
Triantennée	<p>NANA (α2-3) Gal (β1-4) GlcNAc (β1-4) / Man (β1-4) GlcNAc (β1-4) GlcNAc (β1) Asn</p> <p>NANA (α2-6) Gal (β1-4) GlcNAc (β1-2) Man (α1-3) / Man (β1-4) GlcNAc (β1-4) GlcNAc (β1) Asn</p> <p>NANA (α2-3) Gal (β1-4) GlcNAc (β1-2) Man (α1-6) / Man (β1-4) GlcNAc (β1-4) GlcNAc (β1) Asn</p>	Glycopeptide de la fétuine de Veau	NILSON <u>et al.</u> : 78
Tétraantennée	<p>Gal (β1-4) GlcNAc (β1-4) / Man (β1-4) GlcNAc (β1-4) GlcNAc (β1) Asn</p> <p>Gal (β1-4) GlcNAc (β1-2) Man (α1-3) / Man (β1-4) GlcNAc (β1-4) GlcNAc (β1) Asn</p> <p>Gal (β1-4) GlcNAc (β1-2) Man (α1-6) / Man (β1-4) GlcNAc (β1-4) GlcNAc (β1) Asn</p> <p>Gal (β1-4) GlcNAc (β1-6) / Man (β1-4) GlcNAc (β1-4) GlcNAc (β1) Asn</p>	Glycopeptide désialylée de l'orosomucoïde	FOURNET <u>et al.</u> : 79



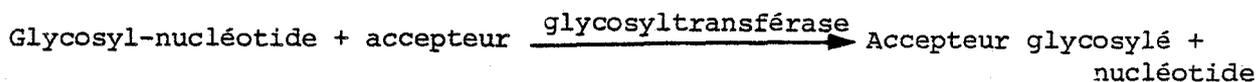
- Cette partie externe semble être impliquée dans les mécanismes de reconnaissance et ces motifs oligosaccharidiques sont synthétisés par les mêmes glycosyltransférases dans un ordre et avec un type de liaison bien défini qui détermine leurs séquences.

Ces règles de substitution observées laissent supposer l'existence de mécanismes de régulation au niveau de leur biosynthèse.

BIOSYNTHESE DES GLYCOPROTEINES

Après avoir étudié la structure et le rôle des glycoconjugués membranaires, nous nous proposons de passer en revue les schémas généraux concernant la biosynthèse des glycoprotéines.

La réaction de glycosylation des protéines se fait par l'intermédiaire d'enzymes de biosynthèse spécifiques "les glycosyltransférases" et peut être représentée selon le schéma suivant :



(voir Revues Générales SCHACHTER et ROSEMAN : 83 ; MONTREUIL : 84 ; HOROWITZ (ed) : 85).

I - LES PARTENAIRES DE LA RÉACTION DE GLYCOSYLATION

A - LE SUCRE DONNEUR

Le sucre donneur (dérivé toujours phosphorylé) est généralement un glycosyl-nucléotide. Chaque monosaccharide est porté par un nucléoside phosphate spécifique (GDP-Mannose, UDP-N-Acétyleglucosamine, UDP-Galactose, CMP-Acide sialique, GDP-Fucose). Voir Revues SCHACHTER : 86 ; STURGESS et al. : 87).

La synthèse de ces précurseurs glycanniques a été située au niveau du cytoplasme à l'exception du CMP-NeuAc qui semble se situer au niveau du noyau. C'est à ce niveau que se situe le 1er point de contrôle de la biosynthèse des glycoprotéines. Le sucre est activé par liaison à un lipide (sucre lié au dolichol-phosphate ou au rétinol-phosphate) (BEHRENS et LELOIR : 88 ; STRUCK et LENNARTZ : 89).

B - L'ACCEPTEUR

La plupart des glycosyltransférases ont été étudiées à l'aide d'accepteurs exogènes.

Des glycoprotéines incomplètes natives comme l'ovomucoïde ont constitué un excellent accepteur pour l'étude de la galactosyltransférase (MOREL et al. : 90). En outre, la dégradation partielle des glycoprotéines (α_1 -acide glycoprotéine) à l'aide de glycosidases spécifiques conduit à l'obtention d'accepteurs pour étudier les différentes glycosyltransférases.

Mais des glycopeptides et des oligosaccharides qui sont des outils plus souples sont aussi utilisés comme accepteurs. La structure de l'oligosaccharide obtenu après la réaction de glycosylation peut-être réexaminée et le type de liaison nouvellement formée peut être déterminé. La spécificité de transfert des différentes glycosyltransférases peut être ainsi définie.

C - LES GLYCOSYLTRANSFERASES

Les glycosyltransférases largement répandues dans le monde vivant, ont été décrites au niveau des bactéries, des plantes et des organismes supérieurs. Elles catalysent le transfert de monosaccharides à partir de leurs dérivés activés sur des molécules acceptrices. L'utilisation de glycosynucléotides radioactifs a permis d'étudier l'activité de ces enzymes.

Les glycosyltransférases sont spécifiques du monosaccharide qu'elles reconnaissent et de la liaison qu'elles forment (ROSEMAN : 91). Elles montrent en outre une très grande spécificité pour le résidu glycosyl situé en position terminale non réductrice de l'accepteur et pour la liaison qu'elles forment. C'est pourquoi au concept "un monosaccharide-une glycosyltransférase" on peut ajouter "une liaison-une glycosyltransférase".

Plusieurs équipes (CARLSON et al. : 92 ; PAULSON et al. : 93) ont caractérisé des sialyltransférases qui diffèrent soit au niveau de leur spécificité pour le substrat, soit au niveau de la liaison glycosidique formée entre l'acide sialique et l'accepteur.

L'obstacle majeur à leur purification réside dans le fait que la plupart de ces enzymes se trouvent liées au système membranaire des cellules et leur solubilisation nécessite l'emploi de détergents (SCHWYZER et HILL : 94 ; VERBERT et al. : 95) qui peuvent parfois influencer sur la structure, la conformation et sur l'activité.

Cependant, les glycosyltransférases des liquides biologiques qui se trouvent sous une forme soluble ont été décrites dans le sérum (SCHACHTER : 96) le liquide amniotique (NELSON et al. : 97). Leur isolement a permis d'étudier les mécanismes de la biosynthèse des glycoprotéines. La chromatographie d'affinité est largement utilisée pour purifier des enzymes. Ainsi la lactose synthétase du lait de Femme a été purifiée sur α -lactalbumine immobilisée (ANDREWS : 98).

Les glycosyltransférases sont des enzymes intégrées aux membranes cellulaires et se situent là où a lieu la réaction de glycosylation. ROTHMAN et LENARD (99) ont développé l'hypothèse émise par PALADE (100) du "membrane flow" selon laquelle le déclenchement de la glycosylation aurait lieu alors que la protéine est encore fixée sur le ribosome. La maturation et l'élongation des chaînes s'effectueraient grâce aux glycosyltransférases intracellulaires du réticulum endoplasmique lisse puis de l'appareil de Golgi. L'évagination de l'appareil de Golgi dans la membrane plasmique à l'aide de microtubules permettrait l'intégration des glycosyltransférases à la surface de la cellule (ROSEMAN : 101).

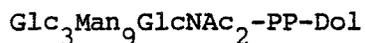
Ainsi a été envisagée l'hypothèse selon laquelle la biosynthèse et la réparation des glycoconjugués membranaires s'effectueraient grâce à des glycosyltransférases spécifiques de la membrane plasmique : les ectoglycosyltransférases (PIERCE et al. : 102 ; WEISER : 103 ; VERBERT et al. : 104 ; HOFLACK et al. : 105).

La régulation des glycosyltransférases au niveau de la synthèse d'un oligosaccharide est contrôlée par des gènes qui codent pour les différentes glycosyltransférases. C'est ROSEMAN (106) qui a émis l'hypothèse "un gène-une liaison osidique". Un tel exemple de contrôle génétique constitue le système d'antigènes de groupe sanguin ABO, Lewis.

II - BIOSYNTHESE DES N-GLYCOSYLPROTEINES

La figure 1 représente le schéma de la biosynthèse des N-glycosylprotéines qui s'effectue en plusieurs étapes :

1) La première étape constitue le cycle des dolichols. (voir Revues Générales : HEMMING : 107 ; PARODI et LELOIR : 108). Grâce aux intermédiaires lipidiques on a formation du noyau pentasaccharidique substitué par des résidus de mannose et de glucose :



Cette première étape semble s'effectuer généralement dans le réticulum endoplasmique rugueux mais on ne peut pas exclure l'existence d'enzymes transmembranaires.

2) Durant la deuxième étape l'oligosaccharide porté par un dolichol est transféré en bloc sur un résidu d'asparagine de la protéine (JAMIESON : 109) qui est situé dans le "coude β " (AUBERT et al. : 110 ; CHOU et FASMAN : 111). L'enzyme qui catalyse cette réaction est la "dolichol diphosphoryl oligosaccharide-protéine oligosaccharidyltransférase", qui semble en outre être une enzyme clef dans la régulation de la N-glycosylation (HOFLACK et al. : 112) (Etape n° 2).

3) Etape de maturation. Immédiatement après son transfert sur la protéine, l'oligosaccharide est déglucosylé par des enzymes spécifiques (GRINNA et ROBBINS : 113).

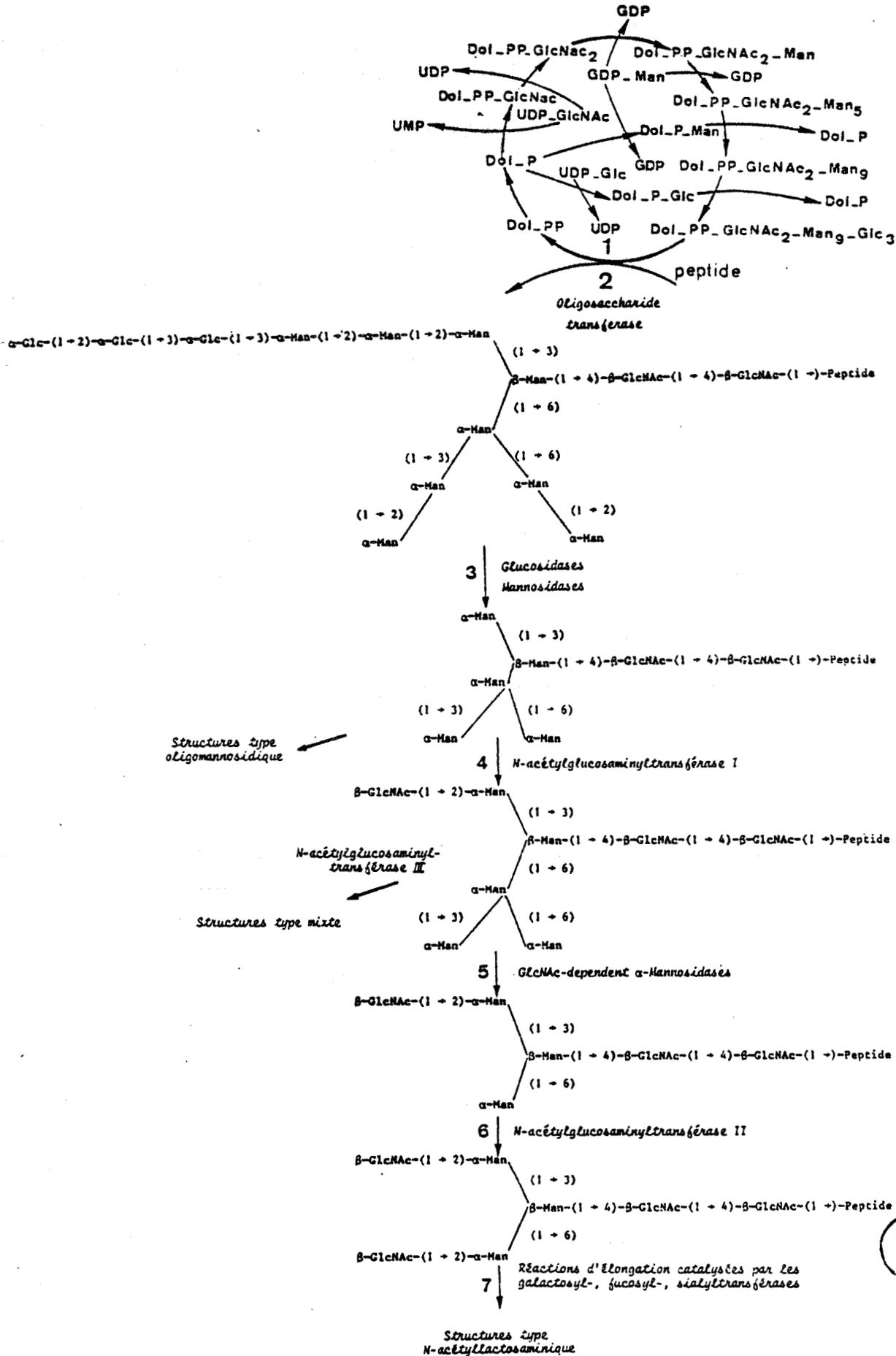


FIGURE 1 : Schéma de biosynthèse des N-glycosylprotéines

La maturation des structures oligomannosidiques donne naissance aux glycanes plus complexes de type hybride et N-acétyllactosaminiques. Il y a d'abord l'hydrolyse des résidus de α Man liés en (1-2) (LI et KORNFELD : 114) (Etape n° 3) et ensuite addition d'un résidu N-acétylglucosaminyl par la β -2-N-acétylglucosaminyltransférase I (STANLEY et al. : 115) (Etape n° 4).

Des mannosidases localisées dans l'appareil de Golgi, excisent ensuite les liaisons α -1,6 et α -1,3 des résidus mannosyl externes. L'action de ces α -mannosidases est dépendante de l'action préalable de la GlcNAc transférase I (HARPAZ et SCHACHTER : 116) (Etape n° 5).

Ensuite, la N-acétylglucosaminyltransférase II branche un résidu de N-acétylglucosamine lié en β 1-2 et amorce ainsi la synthèse de la seconde antenne (NARASIMHAW et al. : 117) (Etape n° 6). La fucosylation en position 6 par l' α -1,6 fucosyltransférase sur le résidu de GlcNAc situé au point d'attache (avec la protéine), peut avoir lieu avant ou après la réaction de la GlcNAc transférase II (HARPAZ et SCHACHTER : 118).

4) Elongation et terminaison des chaînes. En fin de maturation, des glycosyltransférases vont conférer au glycanne son originalité (Etape n° 7). Voir les structures du Tableau V page 17) (SCHACHTER : 119 ; GIBSON et al. : 120).

- Addition des résidus de galactose par une β -1,4 galactosyltransférase formant ainsi des chaînons de N-acétyllactosamine (Gal(β 1-4)GlcNAc). (Voir Revues Générales de SCHACHTER : 121, 122 ainsi que KHATRA et al. : 123). Les mécanismes de régulation de cette étape sont encore mal connus. Ils ont été étudiés par RAO et MENDICINO (124) à l'aide d'enzymes isolées de ganglions lymphatiques de porc. En utilisant des glycopeptides de la chaîne lourde d'IgG désialylés et partiellement ou totalement dégalactosylés comme accepteurs, ils ont remarqué que la présence du premier résidu β -galactosyl sur l'extrémité non réductrice du chaînon GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3) influence la vitesse de transfert du second galactose. Si le galactose est substitué par un résidu d'acide sialique, l'affinité de

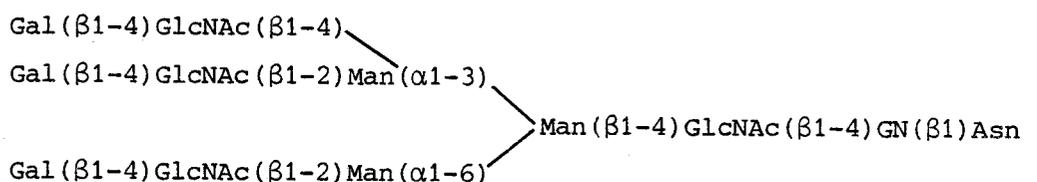
l'enzyme diminue encore et semble être stoppée. Cette activité enzymatique semble donc être régulée en partie par l'action de la sialyltransférase (voir figure 2). De même l'affinité de l'enzyme pour l'UDP-Gal se trouve influencée de façon significative par la présence d'un résidu de galactose sur l'accepteur. L'ordre de transfert des résidus galactosyl sur les 2 branches n'a pas été encore bien élucidé.

- Transfert de fucose lié en α 1-3 sur la N-acétylglucosamine externe (PAULSON et al. : 126) ou en α 1-2 sur le galactose terminal (BEYER et al. : 127).

- Les résidus sialyl se fixent sur les résidus galactosyl terminaux en position C-3 ou C-6. C'est très récemment que VAN DEN EIJNDEN et SCHIPHOST (128) ont mis en évidence une sialyltransférase qui branche l'acide sialique en position C-3, alors que l'existence de l' α -6-sialyltransférases a été démontrée depuis plusieurs années (PAULSON et al. : 129).

L'action séquentielle de ces transférases sur des substrats modèles a permis d'établir des lois de substitution. Ainsi, il a été démontré que le résidu de N-acétyllactosamine de l'asialotransferrine peut être, soit sialylé par une β -galactoside α 2-6 sialyltransférase, soit fucosylé par une β -N-acétylglucosaminide (α 1-3) fucosyltransférase et que le transfert de l'un de ces deux résidus glycosyl inhibe totalement le transfert de l'autre (BEYER et HILL : 130).

PAULSON et al. : 131 ont suggéré la sialylation préférentielle d'une branche avant les autres. Cette hypothèse a été confirmée par VAN DEN EIJNDEN et al. (132) et JOZIASSE et al. (133) qui ont examiné les structures bi et triantennées des glycopeptides de l' α ₁-glycoprotéine acide sialylées *in vitro* par la β 1-4 galactoside α 2-6 sialyltransférase. Comme pour la structure biantennée où 90 % de l'acide sialique est incorporé au niveau de la branche Man(α 1-3)Man, la branche GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3)Man du glycopeptide triantenné :



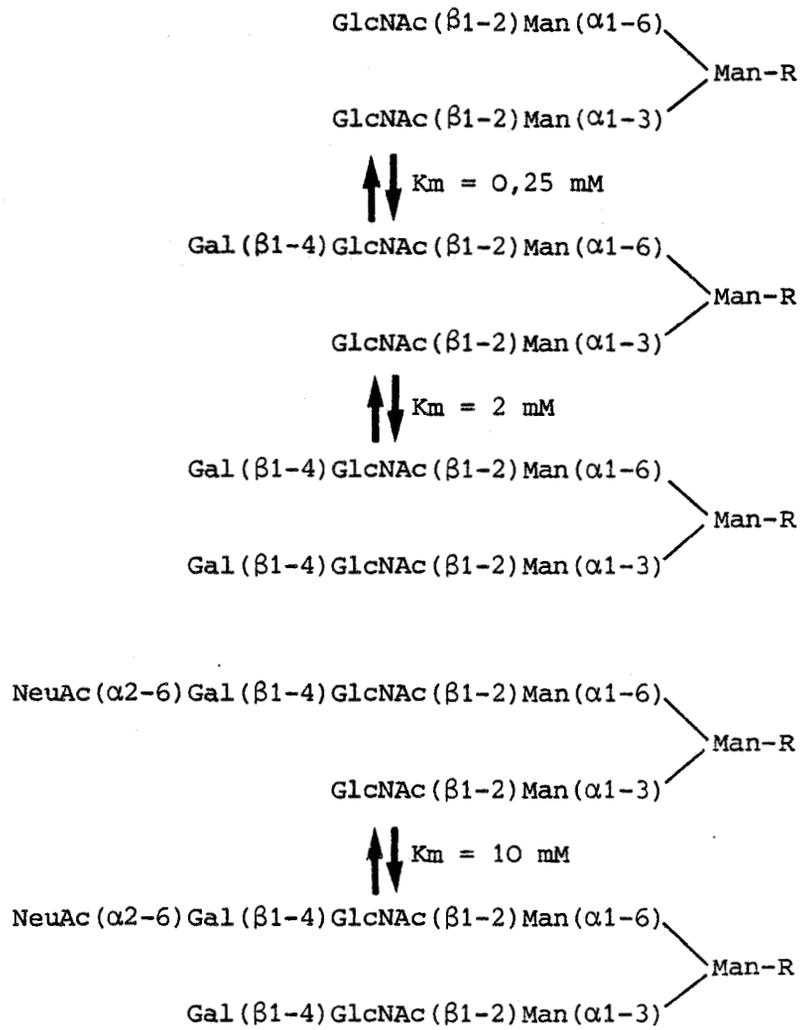


FIGURE 2

Influence de la structure glycopeptidique sur la régulation de l'activité galactosyltransférase (RAO et MENDICINO : 125).



a été préférentiellement sialylée alors que l'incorporation du 2ème acide sialique se fait sur la branche Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-6)Man avant la branche Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)Man(α 1-3)Man. Il apparaît donc que la spécificité de l'enzyme pour l'accepteur ne se limite pas au résidu terminal de galactose mais est élargie sur les résidus GlcNAc, Man et le type de leur liaison.

Cette dernière étape détermine la spécificité du glycanne par la nature et la liaison des résidus situés en position externe et qui vont jouer un rôle important en tant que "signaux de reconnaissance".

La figure 3 schématise les différentes voies de biosynthèse possibles dans la formation des parties périphériques d'une chaîne oligosaccharidique de type biantenné.

III - BIOSYNTHÈSE DES O-GLYCOSYLPROTÉINES

La plupart des travaux effectués sur la synthèse des oligosaccharides liés à la sérine (thrénine) concernent les O-glycosylprotéines de "type mucine". La figure 4 représente le schéma proposé par l'équipe de HILL (BEYER et al. : 136) sur la synthèse des glycannes des mucines isolées des glandes maxillaires de Boeuf, de Porc et de Mouton.

Contrairement aux N-glycosylprotéines les monosaccharides sont additionnés un à un par une glycosyltransférase spécifique et il ne semble pas y avoir d'intermédiaires lipidiques participant à leur biosynthèse.

- La première étape dans le processus d'assemblage du glycanne consiste à transférer la première GalNAc (à partir de l'UDP-GalNAc) sur la Sérine de la chaîne peptidique. L'action de la N-acétylgalactosaminyltransférase nécessite une chaîne peptidique intacte (HILL et al. : 137). La structure secondaire de la protéine semble jouer un rôle important.

- Ensuite on a le branchement d'un résidu d'acide sialique par une α 2-6 sialyltransférase sur la N-acétylgalactosamine avant ou après le branchement d'un résidu de galactose en position C-3 (SCHACHTER : 138 ; MONTREUIL : 139).

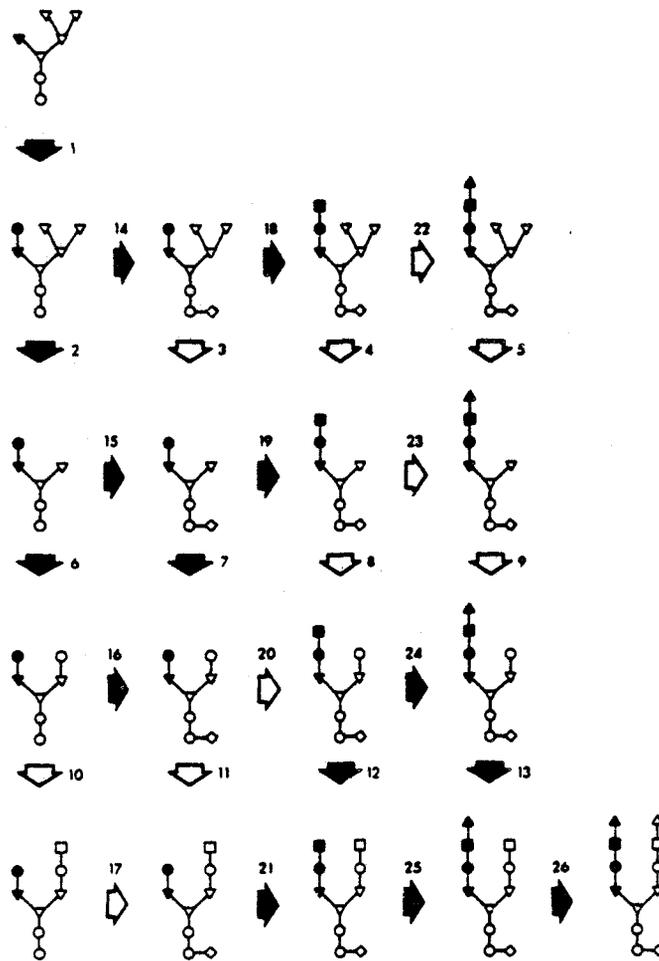


FIGURE 3 : Schéma possible de biosynthèse des structures oligosaccharidiques biantennées (étape d'élongation), (BEYER et HILL: 134).

◆ Réactions démontrées in "vitro".

Les résidus de sucre portés par la branche Man(α 1-3)-Man sont en caractères pleins

Les réactions sont catalysées par les enzymes suivantes :

- Réactions 1 : (α 1-3)mannoside(β 1-2)-N-acétylglucosaminyltransférase
- " 2 à 5 : α -mannosidase
- " 6 à 9 : (α 1-6)-mannoside(β 1-2)-N-acétylglucosaminyltransférase
- " 10 à 13 : N-acétylglucosaminide(β 1-4)-galactosyltransférase
- " 18 à 21 : N-acétylglucosaminide(α 1-6)-fucosyltransférase
- " 22 à 26 : β galactoside(α 2-6)-sialyltransférase

- N-acétylglucosamine
- ▽ Mannose
- Galactose
- ◇ Fucose
- △ Acide sialique



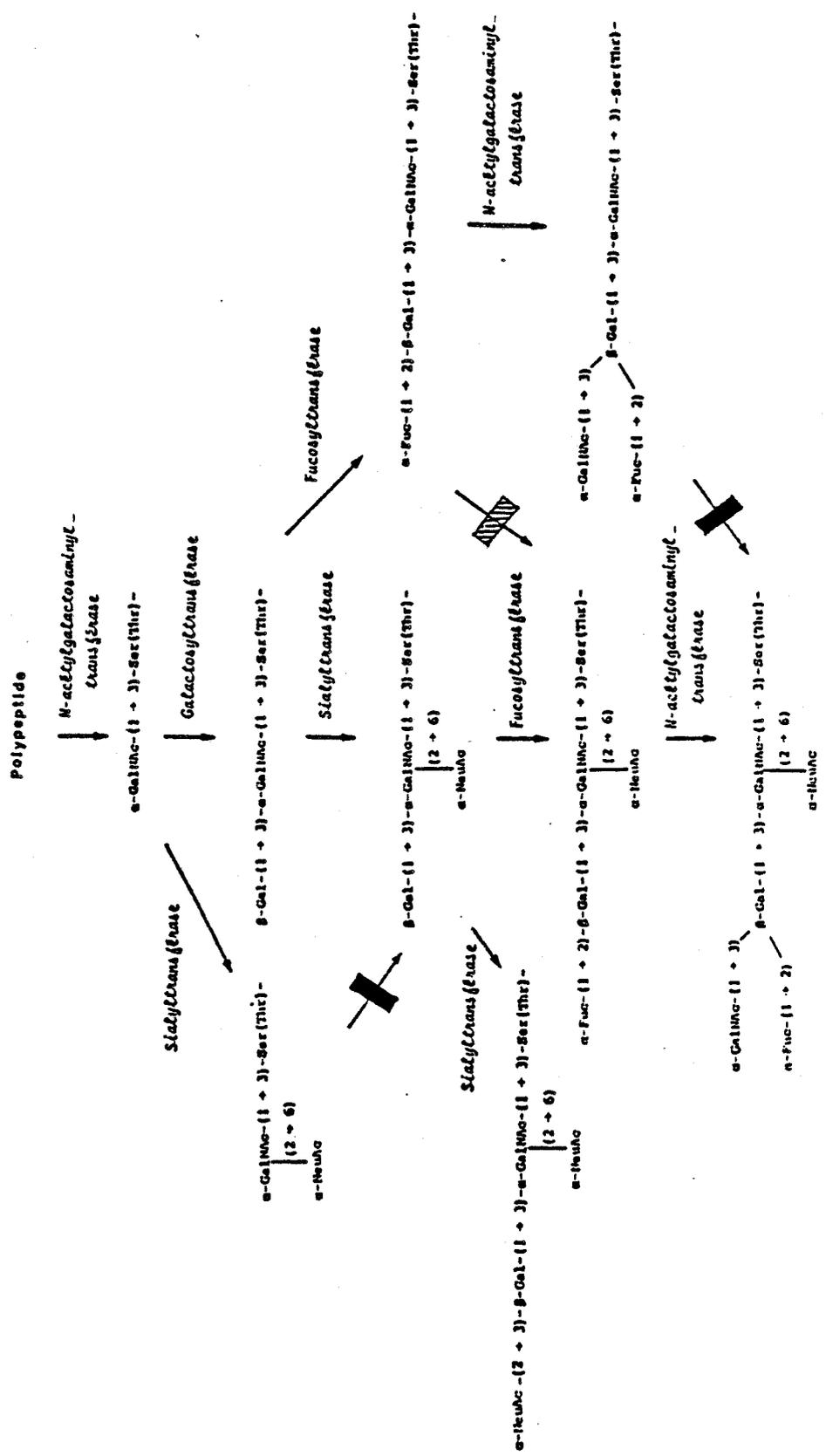


FIGURE 4 : Synthèse des glycanes des mucines isolées des glandes sous-maxillaires de Boeuf et de Mouton (BEYER et al : 135)

Réaction impossible
 Réaction lente



- Action d'une α -2 fucosyltransférase ou d'une α -3 sialyltransférase qui semblent s'exclure mutuellement sur le résidu de galactose et ensuite transfert d'un résidu de N-acétylgalactosamine terminal en position C-3 sur le galactose (BEYER et al. : 140).

Actuellement, on ne sait pas comment le système est contrôlé, simplement par la relative abondance des différentes glycosyltransférases ou si d'autres facteurs comme le donneur nucléotidésucre ou la modulation de l'activité enzymatique sont impliqués.

IV - GALACTOSYLTRANSFÉRASES

(Voir Revues Générales : BEYER et HILL : 141 ; SCHACHTER et ROSEMAN : 142 ; WEISER et al. : 143).

La biosynthèse de 3 seulement des 9 liaisons du galactose trouvées dans les séquences terminales non réductrices des glycoprotéines a été bien étudiée (voir Tableau n° VI).

TABLEAU VI : Différents types de liaison du galactose au niveau des glycoprotéines (BEYER et HILL : 144)

Galactose-N-acétylglucosamine	Galactose-Galactose	Galactose-N-acétylgalactosamine
Gal (β 1-4)GlcNAc	Gal (α 1-3)Gal	Gal (β 1-3)GalNAc
Gal (β 1-3)GlcNAc	Gal (β 1-3)Gal	Gal (β 1-6)GalNAc
Gal (β 1-6)GlcNAc	Gal (β 1-6)Gal	Gal (α 1-3)GalNAc

La séquence commune lactosaminique Gal (β 1-4)GlcNAc qui se trouve dans les glycoconjugués est formée par la N-acétylglucosaminide β 1-4 galactosyltransférase. Le résidu de galactose peut se trouver en position terminale non réductrice ou avant le résidu sialyl.

Différents tissus sont capables de transférer le galactose à partir de l'UDP-galactose sur la N-acétylglucosamine libre pour former la N-acétyllactosamine ou sur des glycoprotéines ayant un résidu β -N-acétylglucosaminide en position terminale non réductrice comme l'orosomucoïde ou la fétuine prétraités à la sialidase et la β -galactosidase.

Ces tissus contiennent l'enzyme ou les enzymes capables de catalyser la réaction suivante :



L'existence de plusieurs types de liaisons qui ont été décrites au niveau des N-glycoprotéines, semble indiquer que plus d'une galactosyltransférase contribue à l'incorporation du galactose au niveau des accepteurs glycoprotéiniques.

Des activités UDP-Gal: β -N-acétylglucosaminide galactosyltransférasiques ont été trouvées à l'intérieur de plusieurs cellules comme enzymes liées aux membranes (localisées dans l'appareil de Golgi) et sous forme soluble dans le lait, le liquide amniotique, le liquide céphalorachidien, la salive, l'urine, le colostrum et le sérum (pour références voir SCHACHTER et RODEN : 145).

BREW et al. (146) décrivent la 4'galactosyltransférase du lait qui est équivalente à la protéine A de la lactose synthétase, la protéine B étant l' α -lactalbumine qui n'a pas d'activité enzymatique. La lactose synthétase protéine A a une grande affinité pour le glucose. Ainsi elle peut synthétiser le lactose en présence d' α -lactalbumine (EBNER : 147). La protéine A du lait en absence d' α -lactalbumine transfère le galactose sur les β -N-acétylglucosaminides. Il est intéressant de noter que l'UDP-Gal β -N-acétylglucosaminide galactosyltransférasique du foie, sérum ou d'autres tissus peut former le lactose en présence d' α -lactalbumine exogène (HUDGIN et SCHACHTER : 148 ; FITZERALD et al. : 149) mais l'identité de ces deux enzymes tissulaires avec la protéine A du lait n'a pas été établie de façon définitive.

Le rôle physiologique de ces transférases dans les tissus autres que les glandes mammaires de lactation est certainement l'élongation des N-glycosylprotéines. Il est évident que le galactose ne peut être incorporé avant le résidu de GlcNAc, ainsi la GlcNAc transférase I contrôle l'addition des résidus galactosyl.

A - GALACTOSYLTRANSFERASE DU LAIT

Les galactosyltransférases d'origine humaine ou bovine, isolées à partir du lait, du colostrum et du sérum ont été purifiées soit par des méthodes conventionnelles, soit par la chromatographie d'affinité.

L'enzyme purifiée du lait de vache contient deux formes catalytiques actives majeures avec un poids moléculaire estimé entre 55.000 - 59.000 pour l'une et 42.000 - 44.000 pour l'autre forme. Ces deux formes ont le même Km pour les substrats, sont inactivées par la chaleur et sont inhibées par les réactifs sulfhydryl. Cette constatation faite par MAGEE et al. (150) suggère que la forme ayant un faible poids moléculaire pourrait dériver de la forme ayant un PM plus élevé par protéolyse (MAGEE et al. : 151). Les deux formes sont des glycoprotéines et contiennent environ 10 - 15 % de glycanes (TRAYER et HILL : 152 ; LEHMAN et al. : 153).

IVATT et ROSEMEYER (154) ont émis l'hypothèse que la galactosyltransférase pourrait se combiner avec une molécule d' α -lactalbumine, pour former un composé de poids moléculaire plus élevé (PM 60.000 \approx 43.000 + 17.000). Ces deux formes actives semblent différer par leur affinité pour l' α -lactalbumine.

B - INTERACTION GALACTOSYLTRANSFERASE- α LACTALBUMINE

L'interaction entre la galactosyltransférase du lait et l' α -lactalbumine constitue un exemple unique de modification d'activité enzymatique (SCHACHTER : 155). Cette interaction nécessite des ions

Mn^{++} de l'UDP-Gal ou une molécule acceptrice comme le glucose ou la GlcNac. Des études cinétiques ont démontré que l'ion Mn^{++} est le premier ligand à réagir avec l'enzyme suivi par l'addition de l'UDP-Gal. L'accepteur se lie par la suite pour former un complexe $Ez-Mn^{++}-UDP-Gal-accepteur$ qui se dissocie pour donner le produit et l'UDP. L'addition d' α -lactalbumine complique la cinétique et sert à baisser le K_m pour le glucose d'environ 1000 fois (EBNER : 156). Le schéma 5 indique le mécanisme d'action de la galactosyltransférase en présence ou en absence d' α -lactalbumine. Physiologiquement la synthèse du lactose se produit uniquement dans la glande mammaire au moment de la lactation quand l' α -lactalbumine est formée en réponse à un signal hormonal.

Dans certaines conditions l' α -lactalbumine inhibe le transfert sur la N-acétylglucosamine des résidus galactosyl (KITCHEN et ANDREWS (158) ; PRIELLS et al. : 159) mais semble ne pas avoir d'effet sur l'incorporation du galactose au niveau des oligomères de GlcNac et des glycoprotéines (SCHANBACHER et EBNER : 160).

C - GALACTOSYLTRANSFERASES MEMBRANAIRES

SMITH et BREW (161) en utilisant du Triton X 100, afin de solubiliser les galactosyltransférases liées aux membranes de l'appareil de Golgi (des glandes mammaires de Mouton) ont purifié l'enzyme en combinant la gel filtration et la chromatographie d'affinité. La spécificité de l'enzyme semble être similaire à celle des galactosyltransférases solubles déjà caractérisées. Mais le poids moléculaire est plus élevé et ils retrouvent deux composés (65.000 - 69.000 et 53.000 - 55.000 qui est le composé mineur). Ils ont émis l'hypothèse que les galactosyltransférases solubles sont dérivées par protéolyse des galactosyltransférases membranaires, durant le turnover membranaire dans les tissus de sécrétion.

De même FRASER et MOOKERJEA (162) ont purifié une galactosyltransférase membranaire (à partir des fractions microsomales du foie de rat) ayant un pI de 65.000 - 70.000. RAO et al. (163) ont isolé une galactosyltransférase à partir d'homogénats de nodosités lymphatiques

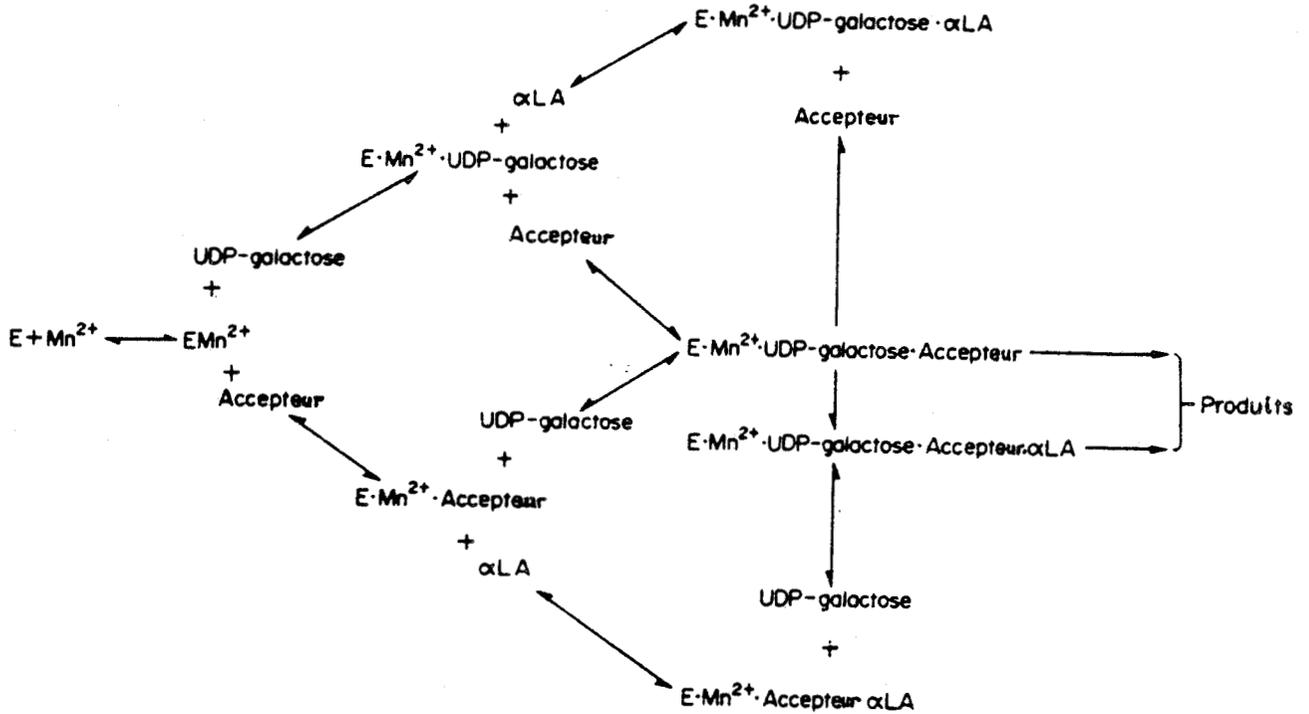


FIGURE 5 : Mécanisme cinétique de la lactose synthétase en présence ou en absence de l' α -lactalbumine (BELL et al : 157)

αLA : alpha-lactalbumine

E : lactose synthétase



du mésentère de Porc dont le pH est de 57.000. Environ 80 % de l'activité est présente dans les fractions microsomaales golgiennes.

D - GALACTOSYLTRANSFERASES SERIQUES

La purification d'activités galactosyltransférasiques a été effectuée par plusieurs chercheurs qui ont suggéré la présence de différentes entités enzymatiques distinctes, comprenant l'activité du sérum total.

NAGAI et al. (164) ont purifié à partir du plasma de groupe sanguin de type B une galactosyltransférase capable de former le déterminant B avec des substrats ayant des résidus galactosyl en position terminale.

BERGER et al. (165) ont identifié deux activités galactosyltransférasiques distinctes dans le sérum de donneurs de groupe sanguin A et O. La première, appelée galactosyltransférase A, utilise des accepteurs avec la N-acétylgalactosamine en position terminale. Le produit obtenu est le Gal(1-3)GalNAc-Protéine. La seconde activité (galactosyltransférase B) utilise des substrats avec des résidus N-acétylglucosamine en position terminale et forme des liaisons α 1-4.

La galactosyltransférase dans le sérum normal provient probablement du foie (WEISER et al. : 166).

E - RELATION ACTIVITE GALACTOSYLTRANSFERASIQUE-CANCER ?

(Voir Revue Générale de WEISER et al. : 167)

Les études de PODOLSKY et WEISER (168) ont démontré que l'activité galactosyltransférasique totale du sérum se trouve à un taux plus élevé chez les patients atteints d'un cancer en comparaison avec des sujets normaux, mais que cette augmentation n'est pas statistiquement différente de celle trouvée chez les sujets malades.

Les mêmes auteurs décrivent la présence chez 71 % des 232 patients atteints de cancer (de 14 tissus différents), d'une isoenzyme associée au cancer (galactosyltransférase Gt II) qui est absente chez les sujets sains (RITTENHOUSE et al. : 169).

Cette activité Gt II a été purifiée par chromatographie d'affinité et séparée de l'activité galactosyltransférase I (Gt I). Ces deux enzymes ont une affinité différente pour l' α -lactalbumine et leur poids moléculaire est différent (Gt I : 54.000 et Gt II : 76.000).

V - CONCLUSIONS

Les glycoconjugués, qu'ils soient de sécrétion ou destinés à être intégrés dans la membrane plasmique, doivent traverser différents compartiments avant d'atteindre leur destination respective : le milieu extracellulaire ou la surface de la cellule. Des mécanismes responsables du mouvement des composants membranaires expliquent à la fois le métabolisme des glycoconjugués qui sont continuellement renouvelés et la présence d'activités glycosyltransférasiques à la surface de la cellule. Ces glycosyltransférases semblent en effet jouer un rôle

- dans la biosynthèse et/ou la réparation des glycanes des glycoconjugués de surface.
- dans l'adhésion et la reconnaissance.

La figure 6 résume schématiquement nos connaissances actuelles sur les mouvements membranaires.

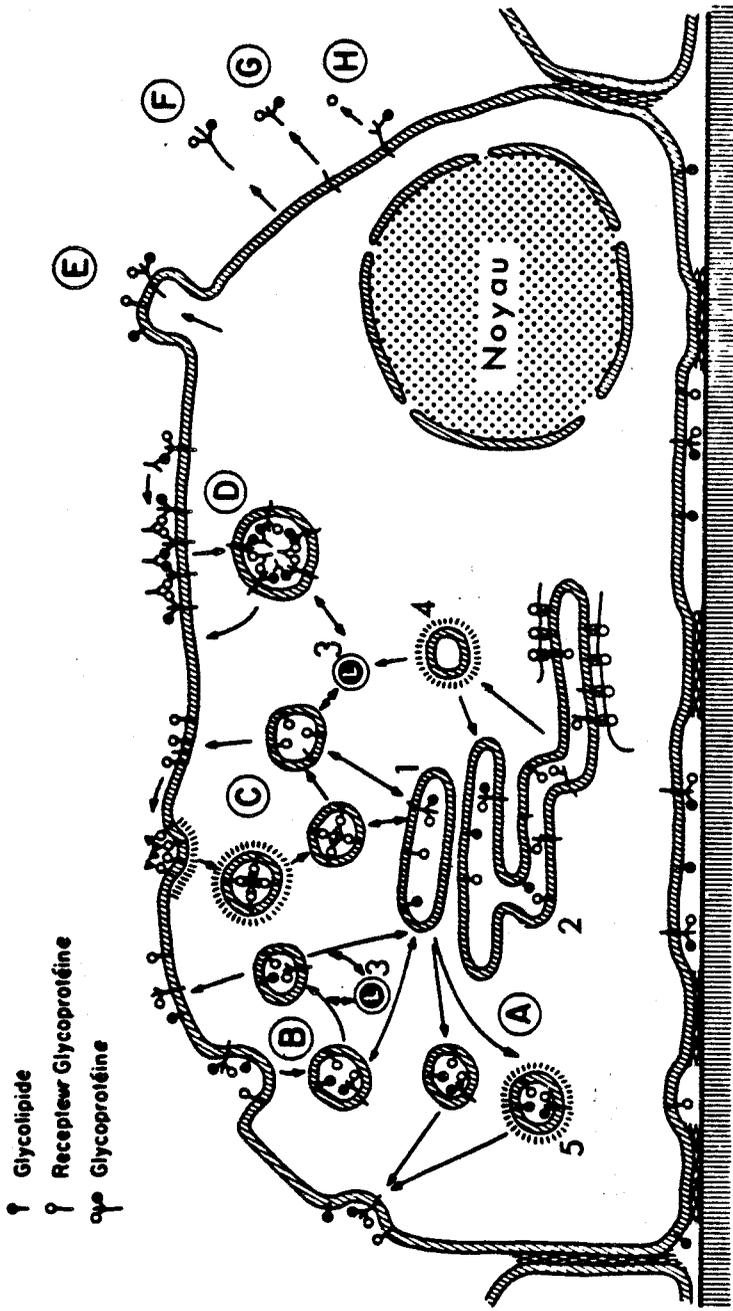


FIGURE 6 : Représentation schématique des mouvements des glycoconjugués de la membrane plasmique des cellules. (A) Biosynthèse des glycoprotéines et des glycolipides dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Fusion des vésicules golgiennes avec la membrane plasmique. (B) Internalisation d'unités membranaires (pinocytose, phagocytose). (C) Endocytose de ligands membranaires dans des vésicules "enrobées". Voie intracellulaire via les lysosomes ou l'appareil de Golgi et retour à la surface membranaire. (D) Internalisation de vésicules contenant des glycoconjugués agrégés à la surface de la cellule. (E) Evagination de la membrane plasmique. (F) Bourgeoisement de la membrane plasmique (secrétion). (G) Attaque protéolytique des glycoprotéines de surface. (H) Coupure enzymatique des résidus glycaniques terminaux.

(1) Appareil de Golgi. (2) Réticulum endoplasmique. (3) Lysosomes. (4) et (5) vésicules recouvertes d'un "manteau".

(BAUMANN et DOYLE : 170)

BIBLIOTHÈQUE

NEOGLYCOPROTEINES (ANTIGENES DE SYNTHÈSE)

La partie glycanne des glycoprotéines intervient dans plusieurs réactions biologiques et physiologiques importantes. Le rôle de cette copule glycanne a été d'abord déterminé en observant l'effet de la variation au niveau de la structure de la partie glycanne sur le comportement de la glycoprotéine.

Différentes approches ont été utilisées de façon à acquérir une série de glycoprotéines qui diffèrent exclusivement au niveau de la structure de leur partie glycanne. Plusieurs chercheurs ont isolé des glycoprotéines naturelles ayant plusieurs variants mais qui ne peuvent pas toujours être obtenues à un taux de purification satisfaisant et avec une intégrité de la partie glycanne. D'autres glycoprotéines natives sont traitées par les enzymes (glycosidases) de façon à modifier la partie glycanne par exemple l'asialoorosomucoïde obtenu après traitement de l' α_1 glycoprotéine acide par la neuraminidase.

Une autre approche est la préparation de glycoprotéines synthétiques : les "néoglycoprotéines" obtenues par conjugaison covalentielle des dérivés oligosaccharidiques (naturels ou synthétiques) avec des protéines. Ils peuvent ainsi être utilisés comme modèles pour la détermination du rôle de la copule glycanne dans des mécanismes biologiques ou biochimiques. (Voir Revues Générales récentes : STOWELL et LEE : 171 ; ERLANGER : 172 ; LEE et LEE : 173).

C'est en 1929 que GOEBEL et AVERY (174) ont préparé ce qui a été probablement la première néoglycoprotéine utilisée dans le but d'obtenir des anticorps anti-sucres.

Depuis, les néoglycoprotéines ont été utilisées souvent pour l'obtention d'anticorps afin d'examiner la nature de l'immunogénicité de chaque glycanne, comme les polysaccharides de "Streptococcus pneumoniae" (LANDSTEINER : 175).

En effet, des "antigènes de synthèse" obtenus à partir de protéines "homologues" induisent la formation d'anticorps spécifiques anti-glycannes qui, purifiés par chromatographie d'affinité ou par toute autre technique immunologique, peuvent être utilisés comme les lectines pour l'étude des structures glycaniques des surfaces membranaires.

Des oligosaccharides isolés des milieux biologiques (lait, urine) peuvent constituer des déterminants antigéniques. Ces oligosaccharides sont incapables d'induire seuls une réponse immunitaire. Par couplage sur une protéine porteuse ("carrier"), ces oligosaccharides peuvent induire la formation d'anticorps reconnaissant de façon spécifique le déterminant oligosaccharidique qui a été utilisé pour l'immunofixation.

L'avantage de cette approche est qu'il est relativement aisé d'obtenir des quantités importantes d'antigènes de synthèse dont la structure glycanique est bien définie. L'utilisation de ces néoglycoprotéines peut être étendue (outre l'étude des interactions glycanne-anticorps) à l'étude des lectines, des récepteurs hépatiques (KRANTZ et al. : 176) et des glycosyltransférases.

I - PRÉPARATION DES NÉOGLYCOPROTÉINES

Bien qu'une variété de techniques soient réalisables pour l'attachement d'oligosaccharides à des protéines, toutes ne sont pas utilisables pour travailler dans des conditions biologiques. Les conditions doivent être douces de façon à préserver la structure native de la protéine et son activité. La liaison glycanne-protéine doit être stable.

La fixation de l'haptène peut se faire soit directement (entre la fonction aldéhydique réductrice du sucre - CHO et la fonction amine de la lysine au niveau de la protéine), soit indirectement par l'intermédiaire d'un bras de condensation.

A - COUPLAGE PAR UNE REACTION DE DIAZOTATION

C'est une méthode qui utilise un bras de condensation. Le glycanne réagit avec le β -(p-aminophényl) ou (p-nitrophényl) éthylamine pour donner un dérivé phénéthylaminique qui peut se fixer à la protéine porteuse par diazotation et former un glycoconjugué immunogénique (la Figure 7 décrit le mécanisme de la réaction).

Des résidus tyrosyl, histidyl, lysyl, asparaginyll, cystéinyl, et tryptophanyl des différentes protéines réagissent avec les sels de diazonium pour la formation du complexe. La synthèse de ces dérivés procède de conditions douces avec un bon rendement et cette méthode est utilisable pour les haptènes glycaniques dont on dispose en faible quantité ou qui ont des liaisons labiles (ZOPF et al. : 177).

B - METHODE DE COUPLAGE AU PHENYLISOTHIOCYANATE

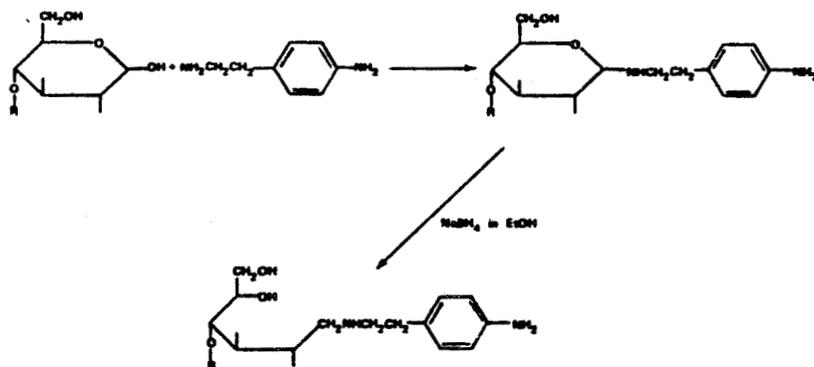
Les dérivés phénéthylamine des oligosaccharides sialylés ne peuvent être couplés par la méthode de diazotation, mais par une méthode modifiée au phénylisothiocyanate (McBROOK et al. : 178). Seuls les résidus lysyl de la protéine se condensent avec le dérivé oligosaccharidique (voir Figure 8). Il est possible de coupler par cette méthode 25 Moles d'oligosaccharide par Mole de sérum albumine bovine (SMITH et al. : 179 ; SMITH et GINSBURG : 180).

C - COUPLAGE PAR AMIDATION

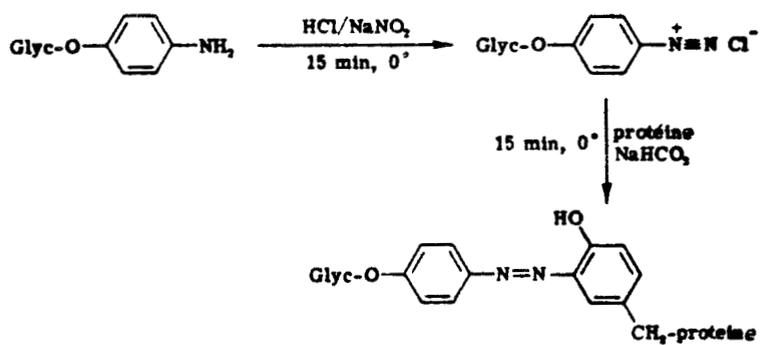
Quand les dérivés oligosaccharidiques possèdent soit une fonction amine soit une fonction carboxylique, ces fonctions peuvent se fixer à la protéine par amidation. La liaison amide formée est très stable.

1) COUPLAGE DES OLIGOSACCHARIDES POSSEDANT UN GROUPE CARBOXYLIQUE

Cette liaison est effectuée par le carbodiimide soluble à l'eau (comme indiqué à la Figure 9). Par cette méthode les oligosaccharides réducteurs sont d'abord oxydés en acides aldoniques et ensuite couplés à la



A



B

FIGURE 7 : Préparation des dérivés p-aminophényl glycosides (A) et couplage de ces derniers à la protéine par diazotation (B).



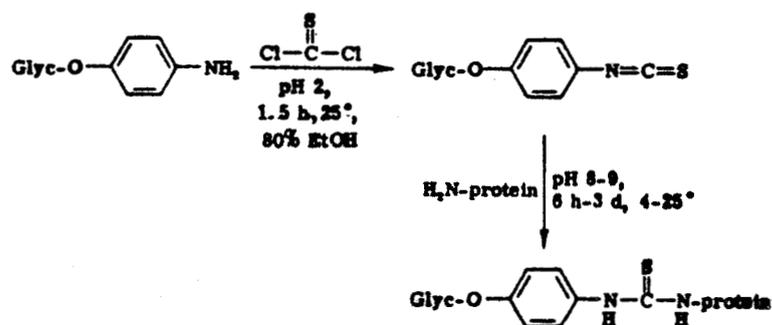


FIGURE 8 : Couplage des dérivés oligosaccharide - phénéthylamine-isocyanates à la protéine.

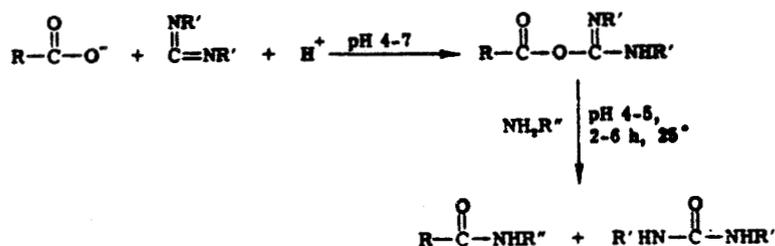


FIGURE 9 : Couplage des dérivés aldoniques à la protéine (NH₂R'') par le carbodiimide hydrosoluble (R'N=C=NR')



protéine (LONNGREN et GOLDSTEIN : 181). Une autre méthode d'amidation est la méthode à l'acylazide (LEMIEUX et al. : 182) utilisée pour des dérivés mono à tétrasaccharides.

2) COUPLAGE D'UN OLIGOSACCHARIDE POSSEDANT UNE FONCTION AMINE

Le couplage des glycosylamines aux protéines peut être effectué soit par la méthode de diazotation soit par la thiocarbamylation (MOCZAR : 183).

D - COUPLAGE PAR AMIDINATION

L'amidation des protéines n'affecte pas leur structure tertiaire et leurs propriétés biologiques sont préservées. Les imido-esters glycosides réagissent rapidement et spécifiquement avec les amines dans des conditions douces pour former les amidines (Figure 10) (STOWELL et LEE : 184).

E - COUPLAGE PAR AMINATION REDUCTIVE

Il s'agit d'une méthode très utilisée pour coupler des oligosaccharides réducteurs à des protéines (GRAY : 185).

L'anion cyanoborohydrure permet le couplage des sucres réducteurs (formation de la base de Schiff) sur des protéines en solution aqueuse dans une large zone de pH (voir mécanisme Figure 11). Le temps de la réaction est en général de plusieurs jours à cause de la faible concentration de la forme aldéhydique libre du glycanne dans la solution. Il s'agit d'une méthode facile, dans des conditions douces à un pH neutre. Le sucre réducteur est utilisé directement sans aucune modification préalable. La liaison amine secondaire formée avec la lysine est stable à l'hydrolyse acide ou basique.

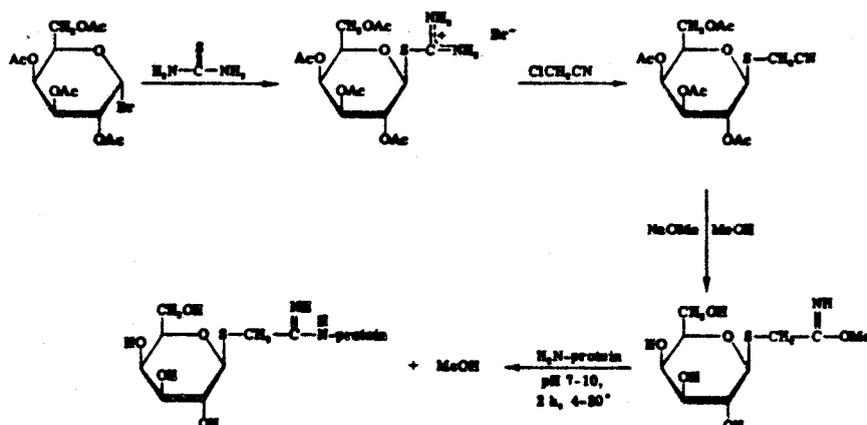


FIGURE 10 : Réaction d'amidation.

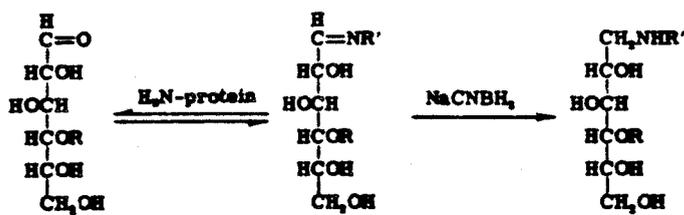
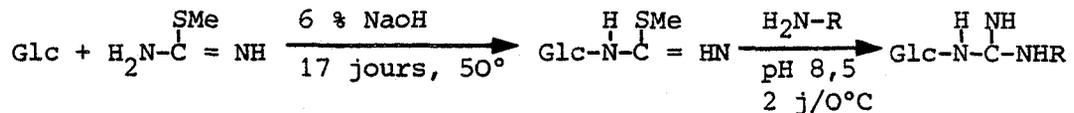


FIGURE 11 : Couplage des glycanes à la protéine par amination réductive avec le cyanoborohydrure.



F - COUPLAGE PAR GUANIDYLATION

HELFERICH et KOCHÉ (186) ont, les premiers, préparé le 1-β-D-glucopyranosyl-2-méthylpseudothiourea qui réagit avec les groupements aminés pour former un dérivé guanidine :



G - UTILISATION DE REACTIFS BIFONCTIONNELS POUR LE COUPLAGE DES OLIGOSACCHARIDES

Un des agents bifonctionnels les plus utilisés pour le couplage des oligosaccharides sur la protéine est le 2,4,6-trichloro-S-triazine. CHAUDHARI et BISHUP (187) ont couplé des mono et disaccharides à des protéines par l'intermédiaire d'un chlorure cyanurique avec une réaction à deux étapes contrôlée par la température. Durant la 1ère étape on a la réaction de l'ω-aminoalkyl glycoside qui se fixe dans des conditions très douces sur le noyau triazine. Les autres atomes de chlore ne sont pas actifs dans ces conditions. La protéine se fixe lors de la 2ème étape à 45°C (Figure 12).

Un autre réactif bifonctionnel est le 2,4-diisocyanotoluène. Il est utilisé pour le couplage des protéines mais il a été appliqué au couplage des glycopeptides sur la SAB (ROGERS et KORNFELD : 188) comme indiqué à la Figure 13).

H - METHODES ENZYMATIQUES

Des néoglycoprotéines ont été ultérieurement glycosylées à l'aide de glycosyltransférases purifiées. Ainsi le GlcNAc-AI-SAB a été converti en di ou trisaccharide par les β-D-galactosyl et α-L-fucosyltransférases (LEHRMAN et al. : 189).

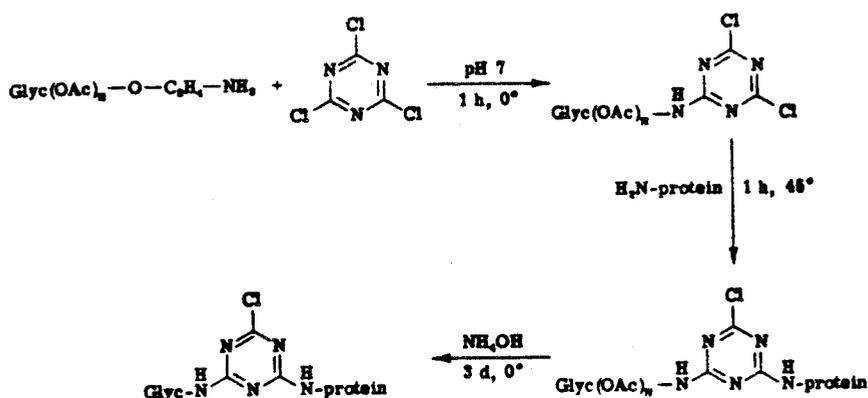


FIGURE 12 : Utilisation du 2,4,6-trichloro-S-triazine comme réactif bifonctionnel pour le couplage des oligo-saccharides à la protéine.

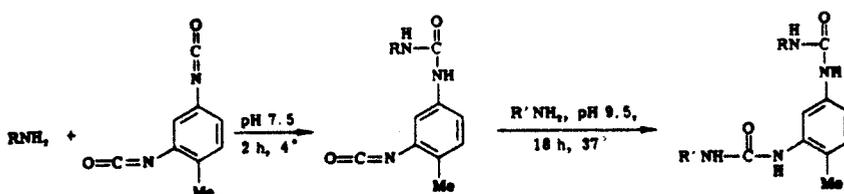


FIGURE 13 : Couplage des glycopeptides à la protéine par un agent bifonctionnel le 2,4-diisocyanotoluène.

Un grand nombre de méthodes de préparation des néoglycoprotéines existent et elles manifestent des propriétés différentes. Il faut donc choisir la technique de couplage en fonction des groupements actifs présents au niveau de l'oligosaccharide, et de sorte à ne pas modifier les propriétés physicochimiques de la protéine et de l'oligosaccharide.

Ainsi, les néoglycoprotéines peuvent être obtenues en grande quantité, quand ce n'est pas possible avec les glycoconjugués natifs. En outre, il est possible de préparer une série de dérivés qui ne diffèrent que d'une partie spécifique de la structure glycanique.

II - APPLICATION DES NÉOGLYCOPROTÉINES

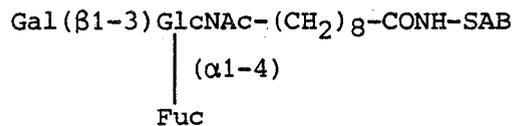
A - ANTIGENES DE SYNTHÈSE

Les néoglycoprotéines sont le plus souvent utilisées comme antigènes artificiels pour l'étude d'anticorps anti-glycannes, la formation de ces anticorps et leur spécificité. En effet, des molécules hapténiques comme les glycannes peuvent donner une réaction avec un anticorps mais, pour induire la réponse immunitaire, doivent être fixées sur une molécule porteuse appelée "carrier". De toutes les méthodes de préparation des néoglycoprotéines le couplage par diazotation a été le plus utilisé.

AVERY et GOEBEL (GOEBEL et al. : 190) en utilisant des néoglycoprotéines couplées par diazotation ont obtenu des anticorps spécifiques des motifs glycaniques. Ils ont démontré que les polysaccharides bactériens constituaient des immunodéterminants puissants.

Une classe importante d'antigènes naturels qui a été étudiée par l'utilisation des néoglycoprotéines comme modèles antigéniques est celle des antigènes de groupes sanguins. La possibilité de faire varier la structure de la partie glycanique couplée à la protéine peut être un moyen de comparer l'immunogénéité des différentes parties du glycanne.

Des antigènes de synthèse ont été préparés pour l'étude des groupes sanguins Lewis en utilisant des glycannes totalement synthétiques (LEMIEUX et al. : 191) et des structures oligosaccharidiques isolées du lait (ZOPF et al. : 192). Des anticorps ont été produits contre ces structures. LEMIEUX et al. (193) ont couplé sur la SAB des dérivés 8-carboxyoctyl-glycosides des différents di et trisaccharides qui constituent le déterminant antigénique de l'antigène de groupe sanguin Le^a :



Ces antigènes synthétiques se sont révélés être hautement immunogènes et les anticorps obtenus ont montré une grande spécificité pour le trisaccharide Le^a. En effet, ces anticorps précipitent la substance de groupe sanguin Le^a et la Le^a-glycoprotéine et, en outre, agglutinent les érythrocytes de type Le(a⁺b⁻). La spécificité de l'antisérum obtenu contre la néoglycoprotéine Le^a a été déterminée par des études d'inhibition hapténique en utilisant des oligosaccharides et des dérivés de SAB-Le^a trisaccharide. Ces anticorps interagissent avec la protéine porteuse. La liaison du résidu α -fucosyl semble être très importante dans la spécificité.

L'équipe de GINSBURG a couplé une variété d'oligosaccharides du lait (dont la structure ressemble aux déterminants antigéniques des substances de groupes sanguins) à la polylysine et à l'édestine (ZOPF et al. : 194 ; ZOPF et GINSBURG : 195).

Ainsi le lacto-N-fucopentaose II et le lacto-N-difucohexaose I ressemblent à la partie non réductrice des substances de groupe sanguin Le^a et Le^b. Ces antigènes synthétiques sont précipités par les antisérums Le^a et Le^b naturels.

Les chercheurs ont constaté que la "Ma" agglutinine précipite les antigènes synthétiques du lacto-N-néohexaose mais non ceux qui contiennent le lacto-N-tétraose ou lacto-N-fucopentaose I, II ou III. Ceci indique une spécificité pour la séquence Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)Gal. ZOPF et al. (196) ont obtenu des anticorps contre ces oligosaccharides du lait couplés par amination réductive à l'édestine et ont déterminé leur spécificité en utilisant des tests radioimmunologiques.

Des dérivés sialyl-oligosaccharide-phényéthylamine ont été couplés à la SAB par l'intermédiaire de leur bras (phényl-isothiocyanate) dans des conditions préservant les liaisons labiles des sucres (SMITH et GINSBURG : 197). La molécule de SAB a été substituée par 10 à 40 moles d'oligosaccharides. La spécificité des anticorps obtenus à partir de ces glycoprotéines synthétiques après immunisation a été déterminée :

- 1°) par comparaison des activités d'inhibition des oligosaccharides de structure voisine avec des méthodes radioimmunologiques et
- 2°) par analyse en double immunodiffusion en gel d'agarose en utilisant les produits couplés comme antigènes précipitants. Ces anticorps distinguent les isomères de position de l'acide sialique.

Récemment des antisérums spécifiques des déterminants des groupes sanguins Lewis-a, -b et -d ont été obtenus par immunisation de lapins avec des antigènes artificiels préparés par couplage des haptènes à la SAB. L'utilisation d'immunoabsorbants oligosaccharidiques appropriés a permis la purification d'anticorps spécifiques et l'élimination d'anticorps pouvant avoir une réaction croisée. Ces anticorps spécifiques ont été utilisés pour la localisation (par immunofluorescence) des antigènes Lewis au niveau des cellules épithéliales du tissu gastrique et duodéal. La spécificité de chaque anticorps a été étudiée ainsi que les réactions croisées entre les différents anticorps Lewis (LEMIEUX et al. : 198).

L'utilisation des antigènes de synthèse permet d'analyser clairement et dans les détails les parties structurales qui contribuent à l'immunogénéité des glycanes. En général, le sucre se trouvant en

position terminale non réductrice est immunodominant. Les antisérums obtenus contre des oligosaccharides sont fréquemment hautement spécifiques pour la configuration et la liaison anomérique de la partie terminale non réductrice. Ces anticorps anti glycanes montrent une grande spécificité pour la séquence glycanique, la configuration anomérique, le type des liaisons oligosaccharidiques mais aussi pour la liaison glycanne-protéine (MARTINEAU et al. : 199 ; ARAKATSU et al. : 200 ; BURGER et GOLDBERG : 201).

Les protéines porteuses sont généralement immunogéniques et les anticorps dirigés contre elles doivent être éliminés. On peut évaluer la contribution de la protéine et des antigènes synthétiques dans l'immunogénicité en fixant le glycanne sur plusieurs protéines porteuses (LEMIEUX et al. : 202).

MONSIGNY et ses collaborateurs ont utilisé une néoglyco-protéine de façon à obtenir des anticorps contre le N,N'-diacétylchitobiose (KIEDA et al. : 203). Ces anticorps agglutinent des cellules transformées et des lymphocytes de Souris mais cette réaction est renversée par l'addition de l'haptène N,N'-diacétylchitobiose.

L'utilisation des néoglycoprotéines comme antigènes présente l'avantage que les anticorps dirigés contre des glycanes spécifiques choisis par l'expérimentateur peuvent être obtenus. La préparation de fragments Fab et d'anticorps monoclonaux en est un autre exemple.

B - EN OUTRE LES NEOGLYCOPROTEINES PEUVENT ÊTRE UTILISEES

1°) Comme substrats synthétiques pour la caractérisation de la spécificité des lectines telles que la concanavine A (GOLDSTEIN et al. : 204) ou la lectine de germes de blé (PRIVAT et al. : 205).

2°) En tant que substrats pour l'étude du rôle joué par le glycanne dans l'élimination des glycoprotéines de la circulation et son

rôle dans les interactions glycoprotéines-membranes. Ces néoglycoprotéines peuvent être utilisées comme substrats accepteurs pour l'étude *in vitro* de la spécificité des glycosyltransférases.

3°) En tant que marqueurs cytochimiques.

4°) En tant qu'adsorbants pour la chromatographie d'affinité des protéines affines des structures glycaniques par exemple : lectines, immunoglobulines, glycosylhydrolases et glycosyltransférases.

Pour références voir la revue de LEE et LEE (206).

Les techniques développées pour la préparation des néoglycoprotéines ont été aussi adaptées pour la fixation des oligosaccharides directement au Sepharose, afin d'isoler, par chromatographie d'affinité, des macromolécules biologiques.

CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

La chromatographie d'affinité constitue une méthode de choix pour la purification des macromolécules et la détermination de la nature des interactions stéréo-spécifiques entre ces substances (PAZUR : 207).

Des adsorbants d'affinité ayant des ligands glycaniques ont été utilisés pour isoler et purifier des anticorps, enzymes, lectines ... Toutes ces substances montrent une spécificité pour la copule glucidique particulière. Dans la préparation d'adsorbants, il est nécessaire de fixer le ligand à la matrice par des liaisons chimiques ou physiques.

Les adsorbants glycaniques sont préparés par une réaction chimique des dérivés glycaniques avec la forme activée du support. Le support sur lequel le ligand est immobilisé, est utilisé afin d'absorber la macromolécule affine en un complexe insoluble. C'est un processus qui sépare la molécule désirée des impuretés. Ultérieurement, cette substance est éluée de l'adsorbant par dissociation du complexe avec un solvant adéquat et la substance est recueillie de la colonne, sous une forme pure. Les différentes étapes sont décrites dans la Figure 14.

I - PRÉPARATION DES ADSORBANTS

A - ACTIVATION DES SUPPORTS

Différents supports sont utilisés comme matrice afin de préparer des adsorbants d'affinité.

1) CELLULOSE

Des dérivés O-(2-aminoéthyl)cellulose et O-(carboxy-méthyl) cellulose peuvent être couplés aux glycanes par la méthode au carbodiimide (KHORANA : 208) ou par amination réductive du glycanne (BORCH *et al.* : 209). Sur ce support des adsorptions non spécifiques peuvent exister.

2) AGAROSE

L'agarose est la matrice la plus utilisée pour la chromatographie d'affinité. La préparation du support nécessite une activation préalable qui modifie les groupements fonctionnels du polymère par une réaction au Bromure de Cyanogène (AXEN et al. : 210). Pour le mécanisme de la réaction, voir la Figure 15.

L'agarose peut être activé par d'autres méthodes : au bisoxyrane (SUNDBERG et PORATH : 211), au vinylsulfonyléthyl éther (FORNSTEDT et PORATH : 212), ou au 1,1'-carbonyl-bis-imidazole (BETHELL et al. : 213).

3) POLYACRYLAMIDE

Le gel de polyacrylamide peut être préparé à partir d'acrylamide et du dérivé N,N'-méthylènebisacrylamide, par copolymérisation (INMAN : 214).

4) BILLES DE VERRE

Elles doivent être traitées avec un organosilane

B - LIGANDS OLIGOSACCHARIDIQUES

Le p-aminophénylglycoside est le dérivé le plus utilisé pour la préparation d'adsorbants ayant un ligand glycanique (Fig. 7 p. 41) mais d'autres réactions qui ont été décrites pour la préparation des néoglycoprotéines, comme l'amination réductive (Fig. 11 p. 44), peuvent être adaptées (voir la Revue Générale de PAZUR (215)).

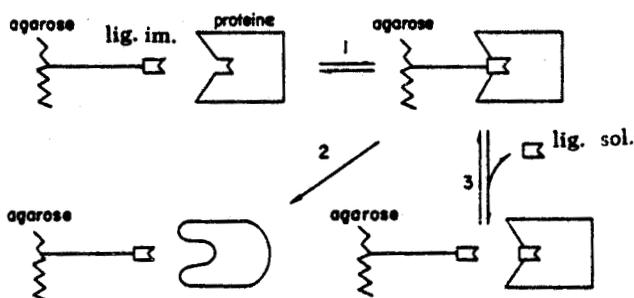


FIGURE 14 : Représentation schématique de la formation d'un complexe insoluble (1) entre la protéine et le ligand immobilisé (lig.im.), et la dissociation du complexe due à une modification de la conformation de la protéine (2) ou à l'éluion spécifique avec un ligand soluble (lig.sol.) (3).

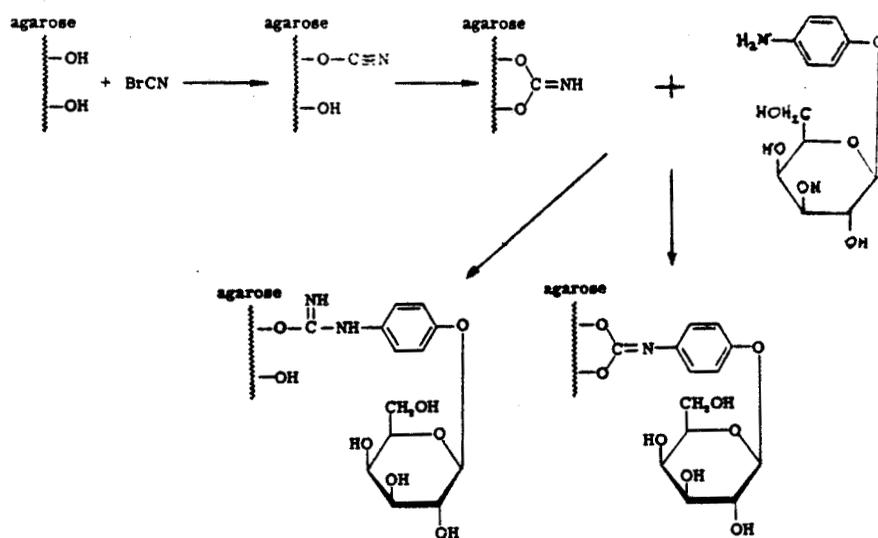


FIGURE 15 : Activation du Sépharose au Bromure de cyanogène (BrCN) et fixation d'un dérivé p-aminophényl-glycane.



II - APPLICATIONS

A - PURIFICATION D'ANTICORPS ANTI-GLYCANNES

L'isolement d'anticorps anti-glycannes par chromatographie d'affinité est fondé sur le principe que les chaînes oligosaccharidiques fonctionnent comme immunodéterminants des molécules d'antigène de synthèse et sont reconnues par ces anticorps. Ceux-ci, retenus au niveau de l'adsorbant, peuvent par la suite être élués soit par l'haptène soit par une modification de pH qui joue sur leur conformation (voir Figure 14).

Cette méthode a été utilisée initialement pour l'isolement d'anticorps anti-glycannes naturels (PAZUR et al. : 216). Des anticorps contre les dextrans ont été aussi purifiés par la chromatographie d'affinité (KABAT : 217). Des anticorps dirigés contre la fétuine (et purifiés par la même méthode) sont inhibés par l'acide sialique, le D-galactose, le 2-acétamido-2-déoxy-D-galactose et le D-mannose. En effet, ces monosaccharides (présents au niveau de la molécule de fétuine) fonctionnent comme immunodéterminants de l'antigène et stimulent la production d'anticorps antiglycannes spécifiques.

Des anticorps dirigés contre des mono ou disaccharides (portés par des néoglycoprotéines) ont été purifiés par cette méthode :

- anti-D-glucose et anti-isomaltose (PAZUR et al. : 218) ;
- anti acide D-glucuronique (PAZUR et al. : 219)
- anti chitobiose (KIEDA et al. : 220)

mais aussi des anticorps contre des oligosaccharides plus complexes :

- anti lacto-N-fucopentaose I après élution par l'haptène libre (ZOPF et al. : 221) ;
- anti sialyl-oligosaccharides (purifiés sur Sépharose-albumine de façon à éliminer les anticorps anti-albumine qui est la protéine porteuse) (SMITH et GINSBURG : 222).

LEMIEUX et al. (223) ont purifié récemment des anticorps spécifiques des déterminants Lewis a, b et d, sur des colonnes d'immuno-adsorbant correspondant. L'élution des anticorps retenus au niveau de la colonne est réalisée par un tampon contenant 1 % d'hydroxyde d'ammonium et avec un débit de 140 ml/h à 4°C. Ces anticorps spécifiques ont été utilisés pour localiser les antigènes Lewis (par immunofluorescence) au niveau des cellules épithéliales du tissu gastrique et duodéal.

Ces anticorps anti-glycannes obtenus après immunisation (chez l'animal) à l'aide d'antigènes de synthèse et purifiés par chromatographie d'affinité constituent des éléments potentiels pour l'étude des antigènes de surface. Des anticorps monoclonaux peuvent être produits facilement et la constitution d'une "banque" d'anticorps monoclonaux présenterait un outil de travail très souple.

B - PURIFICATION DES GLYCOSYLTRANSFERASES

Comme le montre le Tableau VII, un grand nombre d'activités glycosyltransférasiques ont été purifiées par chromatographie d'affinité en utilisant comme adsorbant des ligands analogues de substrats (donneurs ou accepteurs) spécifiques des enzymes, d'une part, et des lectines immobilisées reconnaissant la partie glycanne des glycosyltransférases, d'autre part (Voir Revues Générales SADLER et al. : 257 ; PAZUR (258)).

Les propriétés des glycosyltransférases reflètent les difficultés qui peuvent être rencontrées pendant leur purification. La plupart de ces enzymes sont présentes en faible quantité dans les tissus, liées aux membranes du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi, et nécessitent une solubilisation préalable avec des détergents.

Au cours de la chromatographie biospécifique, seule l'enzyme spécifique active est retenue sur l'adsorbant.

TABLEAU VII : GLYCOSYLTRANSFERASES PURIFIEES PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

GLYCOSYLTRANSFERASES	LIGANDS	REFERENCES
Glycogène synthétase	UDP hexamolamine	BARKER <u>et al.</u> : 224
Chondroïtine sulfate β -xylosyltransférase	Chondroïtine sulfate core protéine	SCHWARTZ et RODEN : 225 SCHWARTZ et DORFMAN : 226
Galactosylhydroxyllysine α 1-2 glucosyltransférase	Collagène dénaturé UDP- acide glucuronique Concanavoline A	RISTELI <u>et al.</u> : 227 ANITINEN et KIVIRIKKO : 228 MYLLYLA <u>et al.</u> : 229
Dolichyl-pyrophosphoryl-oligosaccharide : protéine oligosaccharyltransférase	α -lactalbumine	DAS et HEATH : 230
N-acétylgalactosaminyltransférase à activité de groupe sanguin A	Agarose UDP-hexanolamine	[WHITEHEAD <u>et al.</u> : 231 ; TAKASAKI et KOBATA : 232 ; NAGAI <u>et al.</u> : 233 SCHWYZER et HILL : 234
Mannoside β 1-2 N-acétylglucosaminyltransférase	Ovomucoïde UDP-hexanolamine	MEDECINO <u>et al.</u> : 235 [OPPENHEIMER et HILL : 236 HARPARZ et SCHACHTER : 237
β -Xyloside β 1-4 galactosyltransférase	Xylosyl-core protéine/ β xylosyltransférase	SCHWARTZ et RODEN : 238
Collagène hydroxyllysyl- β -galactosyltransférase	Collagène dénaturé UDP-acide galacturonique Concanavoline A	RISTELI <u>et al.</u> : 239 RISTELI : 240
N-acétylglucosamine β 1-4 galactosyltransférase	α -Lactalbumine UDP-hexanolamine Aminohexyl- β -N-acétylglucosamine Ovalbumine	TRAYER et HILL : 241 ; ANDREWS : 242 BARKER <u>et al.</u> : 243 BARKER <u>et al.</u> : 244 ; RAO <u>et al.</u> : 245 TURCO et HEATH : 246
β -Galactoside α 2-6 sialyltransférase	CDP-hexanolamine CDP-éthanolamine	PAULSON <u>et al.</u> : 247 BAUVOIS <u>et al.</u> : 248
β -Galactoside α 2-3 sialyltransférase	CDP-hexanolamine CDP-éthanolamine	SADLER <u>et al.</u> : 249 BAUVOIS <u>et al.</u> : 250
α -N-acétylgalactosaminide 2-6 sialyltransférase	CDP-hexanolamine	SADLER <u>et al.</u> : 251
Glucuronyltransférase	UDP-hexanolamine	BURCHELL : 252 ; GORSKI et KASPER : 253
N-acétylglucosaminide α 1-3 et α 1-4 fucosyltransférase	GDP-hexanolamine	PRIEELS <u>et al.</u> : 254
β -Galactoside α 1-2 fucosyltransférase	GDP-hexanolamine Concanavoline A	BEYER <u>et al.</u> : 255 CERVEN <u>et al.</u> : 256



1) LIGANDS ANALOGUES D'ACCEPTEURS

En principe, la chromatographie biospécifique des glycosyltransférases utilisant des analogues d'accepteurs comme ligands, peut avoir une très grande spécificité puisque ces molécules n'ont pas de charge électrique ce qui pourrait contribuer à des interactions non spécifiques.

Des dérivés de chondroïtine sulfate "core-protéine" ont été utilisés comme adsorbants pour la purification de la chondroïtine sulfate "core-protéine" β -xylosyltransférase en présence d'ions Mn^{++} (SCHWARTZ et RODEN : 259 ; SCHWARTZ et DORFMAN : 260).

La β -xyloside (β 1-4) galactosyltransférase du cartilage embryonnaire de Poussin a été partiellement purifiée par adsorption sur core-protéine xylosylée-Agarose (SCHWARTZ et RODEN : 261).

Des peptides de collagène dénaturés servent d'adsorbants spécifiques pour la collagène β 1-O-hydroxylysine galactosyltransférase et la galactosylhydroxylysine (α 1-2) glucosyltransférase (RISTELI et al. : 262). La N-acétylgalactosylaminyltransférase spécifique de groupe sanguin A a été purifiée sur le Sepharose 4 B qui sert de matrice biospécifique (WHITEHEAD et al. : 263).

L'ovomucoïde d'oeuf de Poule peut servir d'accepteur pour la N-acétylglucosaminyltransférase extraite du mucus trachéal de Porc. Cette transférase réalise la liaison GlcNAc (β 1-2) Man au niveau du noyau pentasaccharidique. L'enzyme a été purifiée sur ovomucoïde-agarose en présence d'ions Mn^{++} (MENDICINO et al. : 264).

L' α -lactalbumine permet la formation du lactose dans le lait ; néanmoins des fragments dénaturés d' α -lactalbumine servent d'accepteur pour l'oligosaccharidyltransférase de l'oviducte de Poule. L'enzyme est adsorbée sur α -lactalbumine-agarose en présence d'ions Mn^{++} (DAS et HEATH : 265).

Des accepteurs immobilisés tels que l'ovalbumine ou la N-acétylglucosamine ont été utilisés dans la purification de la galactosyltransférase (voir paragraphe 4 du même chapitre).

2) ANALOGUES DE DONNEURS

A l'exception de certaines enzymes qui utilisent les dolichols-phosphoglycannes, les glycosyltransférases se servent des glycosylnucléotides comme donneurs. En général, les parties glycaniques de ces glycosylnucléotides ne sont pas des ligands biospécifiques usuels. Par contre, les nucléotides ayant 1 phosphate en plus, sont des inhibiteurs potentiels de la réaction de glycosylation. Des matrices chromatographiques utilisant des analogues des donneurs de la partie nucléotidique ont été établies.

a - Dérivés cytidine-5'-diphosphate

Les dérivés CDP-héxanolamine et CDP-éthanolamine liés à l'agarose ont été utilisés comme ligands essentiellement pour la purification des sialyltransférases. Ainsi la β -galactoside(α 2-6)sialyltransférase du colostrum de Vache a été purifiée sur CDP-éthanolamine-agarose ou CDP-héxanolamine-agarose en utilisant une élution non spécifique au chlorure de sodium ou une élution spécifique avec le CDP (PAULSON et al. : 266).

La β -galactoside(α 2-3)sialyltransférase et la α -N-acétylgalactosaminide(α 2-6)sialyltransférase de la glande submaxillaire de Porc ont été solubilisées à partir des membranes des tissus avec du Triton X 100 et adsorbées sur CDP-héxanolamine-agarose. Les deux sialyltransférases ont été partiellement désorbées avec un gradient de chlorure de sodium et la β -galactoside(α 2-3)sialyltransférase a été ultérieurement purifiée par un gradient d'élution de CTP (SADLER et al. : 267).

L'activité β -galactoside(α 2-6)sialyltransférase, par contre, peut être adsorbée de façon spécifique sur CDP-éthanolamine-agarose.

Dans notre Laboratoire l'équipe de VERBERT, en combinant la chromatographie d'affinité (utilisant la cytosine diphosphoéthanolamine-Sepharose comme adsorbant) et le tamisage moléculaire sur Ultrogel Aca-34 (en présence d'albumine), a mis en évidence deux ectosialyltransférases plaquettaires portées par deux entités protéiques différentes :

- une CMPNeuAc : galactoside sialyl(α 2-3)transférase et
- une CMPNeuAc : galactoside sialyl(α 2-6)transférase (BAUVOIS et al. : 268).

b - Dérivés de guanosine 5' diphosphate

L'adsorbant guanosine 5' diphosphate (GDP) sur agarose a été utilisé dans la purification des fucosyltransférases.

La β -galactoside(α 1-2)fucosyltransférase (spécifique du déterminant H de groupe sanguin) de la glande submaxillaire de Porc a été purifiée sur GDP-héxanolamine-agarose combinée avec la gel filtration et la chromatographie échangeuse d'ions (BEYER et al. : 269). Deux activités fucosyltransférasiques du lait de femme (spécifiques de l'activité Lewis de groupe sanguin) : la N-acétylglucosaminide(α 1-4) fucosyltransférase et la N-acétylglucosaminide(α 1-3) fucosyltransférase ont été copurifiées sur GDP-héxanolamine-agarose (PRIEELS et al. : 270).

c - Dérivés uridine-5' diphosphate

Cette classe de dérivés nucléotidiques a été utilisée dans la purification des glycosyltransférases qui se servent de l'UDP-sucre comme donneur.

Ainsi l'UDP-héxanolamine a été utilisée comme adsorbant pour la purification de la N-acétylglucosaminide(β 1-4)galactosyltransférase (voir paragraphe 4), de la glycogène synthétase (BARKER et al. : 271) la glucuronyltransférase (BURCHELL : 272), la α 1-3-mannoside(β 1-2)-N-acétylglucosaminyltransférase du colostrum de Vache (HARPAZ et SCHACHTER : 273) et la fucosyl(α 1-2)galactoside(α 1-3)-N-acétylgalactosaminyltransférase de la glande sous maxillaire de Porc (SCHWYZER et HILL : 274).

OPPENHEIMER et al. (275) ont isolé du foie de porc deux activités N-acétylglucosaminyltransférasiques sur UDP-héxanolamine-Sepharose : une (α 1-3)mannoside(β 1-2)-N-acétylglucosaminyltransférase I qui est active uniquement sur la branche Man(α 1-3)Man et une seconde α -mannoside(β 1-2)-N-acétylglucosaminyltransférase II qui transfère sur la branche Man(α 1-6)Man. La présence du résidu GlcNAc sur la branche Man(α 1-3) est nécessaire à son activité.

Une colonne d'UDP-acide glucuronique couplée à l'aminophényl-agarose a permis la purification de la collagène β -galactoside(α 1-2) glucosyltransférase d'embryon de Poulet (ANTTINEN et al. : 276).

3) LIGANDS BIOSPECIFIQUES AUTRES QU'ANALOGUES DE SUBSTRAT

La chromatographie d'affinité sur lectine immobilisée qui reconnaît la partie glycanique de l'enzyme peut être d'une grande utilité dans la purification des glycosyltransférases (LOTAN et NICOLSON : 277).

Des procédés de purification basés sur l'adsorption des transférases sur concanavoline A immobilisée ont été décrits pour la collagène galactosyltransférase (RISTELI : 278), la glucosyltransférase (ANTTINEN et al. : 279), pour la sialyl et fucosyltransférase du sérum (CERVEN et al. : 280 ; SCHWARTZ et al. (281)) décrivent la purification de la β xyloside(β 1-4)galactosyltransférase sur la chondroïtine sulfate core-protéine β xylosyltransférase. Il semble y avoir formation d'un complexe spécifique entre la xylosyltransférase et la galactosyltransférase.

L'interaction entre l' α -lactalbumine et la lactose synthétase est également utilisée dans la purification de cette enzyme (voir paragraphe suivant).

4) PURIFICATION DES GALACTOSYLTRANSFERASES PAR LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

Les études cinétiques portant sur le mécanisme de la galactosyltransférase et la détection des complexes enzyme-réactants ont été clarifiées par l'utilisation de différents adsorbants en chromatographie

d'affinité dans le but de purifier cette activité enzymatique (BELL et al. : 282 ; BARKER et al. : 283).

a - Sur α -lactalbumine-agarose

L'interaction de la galactosyltransférase et de l' α -lactalbumine est un exemple de modification enzymatique qui a fait l'objet de plusieurs recherches. L'affinité de la galactosyltransférase pour ce cofacteur est utilisée ici pour sa purification. ANDREWS (284) décrit en 1970 un procédé de purification de la lactose synthétase à partir du lait de Femme. Après précipitation au sulfate d'ammonium l'enzyme subit un certain nombre d'étapes de purification (en gel filtration sur Sepharose 6B puis Biogel P-200), avant d'être déposée sur colonne d' α -lactalbumine-Sepharose en présence de N-acétylglucosamine (3 mM) dans le tampon de passage. L'enzyme n'est pas retenue en absence de GlcNAc. Ce fait indique la présence d'un complexe stable formé entre les deux protéines et l'accepteur monosaccharidique. L'élution de l'enzyme est obtenue en enlevant du tampon le GlcNAc. Les études cinétiques de l'enzyme purifiée indiquent que la présence de l' α -lactalbumine a un effet inhibiteur sur la formation de la N-acétyllactosamine.

La protéine A de la lactose synthétase a été purifiée à partir du lait de Vache par TRAYER et HILL (285) sur le même adsorbant. L'enzyme est liée de façon spécifique au niveau de l' α -lactalbumine-agarose, en présence de glucose et est éluée en absence de glucose. La fraction purifiée de l'enzyme est rapidement inactivée mais elle peut être stabilisée en présence de la sérum albumine ou de GlcNAc.

PRIEELS et al. (286) ont étudié l'hétérogénéité de la $\beta(1-4)$ D-galactosyltransférase du lait de Femme après purification par chromatographie d'affinité sur α -lactalbumine immobilisée. L'une des trois formes de l'enzyme purifiée est fortement inactivée en présence d' α -lactalbumine.

L'inhibition de l'activité enzymatique (avec des accepteurs tels que le N-acétylglucosamine ou la fétuine désialylée et dégalactosylée) par l' α -lactalbumine a été aussi constatée par FRASER et MOOKERJEA (287) qui ont purifié sur α -lactalbumine-Sépharose la galactosyltransférase membranaire isolée des fractions microsomales du foie de Rat. L'enzyme nécessite des ions Mn^{2+} et a un poids moléculaire de l'ordre de 65.000 - 70.000.

Le même adsorbant a été utilisé par BOUCHILLOUX (288) afin de purifier l'ectogalactosyltransférase isolée des fractions microsomales de la thyroïde de Porc.

b - Purification sur uridine 5' diphosphate

Les dérivés UDP-agarose ont été utilisés comme ligands pour la purification des galactosyltransférases mais un passage ultérieur de l'enzyme sur un autre adsorbant est souvent nécessaire pour obtenir des activités hautement purifiées.

La N-acétylglucosaminide ($\beta(1-4)$)galactosyltransférase du lait de Vache a été purifiée sur UDP-héxanolamine (BARKER et al. : 289). Les ions Mn^{2+} sont nécessaires pour un maximum d'adsorption. L'activité peut être éluée par l'EDTA. La purification de l'enzyme est complétée par chromatographie d'affinité sur α -lactalbumine et N-acétylglucosamine-agarose.

SMITH et BREW (290) ont combiné la gel filtration sur Biogel P-150 et la chromatographie d'affinité sur UDP-Sépharose et ensuite sur α -lactalbumine-Sépharose pour la purification de la galactosyltransférase des membranes golgiennes isolées à partir d'homogénats de glandes mammaires de Mouton.

Récemment BLANKER et al. (291) ont détecté trois activités galactosyltransférisiques au niveau du thymus de Veau : Une N-acétyllactosaminide (α 1-3) galactosyltransférase (α -galactosyltransférase), une N-acétylglucosaminidase (β 1-4) galactosyltransférase (β -galactosyltransférase) et une N-acétylgalactosaminide (β 1-3) galactosyltransférase. Ils ont réussi la purification de la β et de l' α -galactosyltransférase par chromatographie d'affinité sur UDP-Sépharose et α -lactalbumine-Sépharose (VAN HALBEEK et al. : 292).

Sur UDP-Sépharose la N-acétylgalactosaminide (β 1-3) galactosyltransférase ne se fixe pas dans les conditions décrites. Les activités α - et β -galactosyltransférases sont désorbées en présence de 2 mM d'UMP et en l'absence d'ions Mn^{2+} .

Sur α -lactalbumine-Sépharose il y a séparation des deux activités. Seule la N-acétylglucosaminide (β 1-4) galactosyltransférase est retenue au niveau de l'adsorbant en présence de N-acétylglucosamine.

Les études préliminaires de la spécificité de la N-acétylglucosaminide (β 1-4) galactosyltransférase sur une structure acceptrice biantennée révèlent une préférence de l'enzyme pour la branche Man (α 1-3) plutôt que pour la branche (α 1-6) avec un rapport de 4/1.

c - Dérivés N-acétylglucosamine

La fixation de la galactosyltransférase au niveau de la N-acétylglucosamine immobilisée est améliorée par les ions Mn^{2+} , UDP ou UMP et son affinité pour l'accepteur immobilisé est diminuée en présence de borates, urine, EDTA ou N-acétylglucosamine. La combinaison avec la chromatographie sur UDP-Agarose et/ou α -lactalbumine-Agarose permet d'obtenir la galactosyltransférase à un degré de pureté élevé, BARKER et al. (293), GERBER et al. (294), RAO et al. (295).

d - Ovalbumine

La galactosyltransférase du sérum (du foetus de veau) a été purifiée par chromatographie en colonne d'ovalbumine-agarose. L'enzyme est adsorbée en présence d'ions Mn^{2+} et d'UMP. L'élution est obtenue en l'absence de ces deux cofacteurs. Une chromatographie d'affinité complémentaire sur UDP-hexanolamine-agarose et α -lactalbumine-agarose est effectuée ultérieurement. La spécificité de l'enzyme vis-à-vis des accepteurs donne un rapport N-acétylglucosamine/ovalbumine = 3,3 (TURCO et HEATH : 296).

Toutes ces études montrent que la galactosyltransférase fixe les substrats dans la séquence : ion Mn^{2+} , UDP-Gal et N-acétylglucosaminide pour catalyser la réaction.

En outre, les galactosyltransférases purifiées montrent une certaine hétérogénéité au niveau de leur taille qui peut être le résultat d'une protéolyse. En effet, plusieurs formes ont été purifiées (BARKER et al. : 297 ; SMITH et BREW : 298). Elles diffèrent de part leur poids moléculaire mais aussi de part leur spécificité vis-à-vis de différents accepteurs. Ces formes présentent une affinité différente pour l' α -lactalbumine.

Ainsi des études bien précises sont nécessaires (avec l'aide d'adsorbants spécifiques) de façon à déterminer les relations enzyme-substrats, l'ordre de transfert des résidus de galactose sur les différentes branches des oligosaccharides, et le rôle de la glycosylation membranaire.

CONCLUSIONS

Les généralités que nous venons de présenter ont fait apparaître l'importance du rapport entre la structure et la fonction des glycoconjugués de surface : les glycannes sont des signaux de reconnaissance responsables du rôle biologique que jouent les glycoconjugués.

Compte tenu de la difficulté d'isoler les antigènes membranaires directement à partir des membranes, la préparation de néoglycoprotéines constitue une nouvelle voie. En particulier, l'application des néoglycoprotéines sur l'étude de la contribution du glycanne dans les fonctions biologiques et immunologiques des glycoconjugués est d'une très grande importance.

En outre, la chromatographie d'affinité constitue une méthode de choix pour la purification de macromolécules biologiques, telles que les anticorps ou les glycosyltransférases affines de motifs glycaniques. Contrairement aux méthodes conventionnelles cette approche permet de déterminer les interactions spécifiques entre ces substances.

TRAVAUX PERSONNELS

Dans cette partie nous exposerons successivement :

- La préparation d'antigènes de synthèse par couplage d'oligosaccharides sur une protéine porteuse. L'obtention et la purification par chromatographie d'affinité d'anticorps spécifiques dirigés contre la copule glycannique de ces néoglycoprotéines.

- La purification par chromatographie d'affinité, à l'aide d'accepteurs utilisés comme ligands, de la galactosyltransférase du lait de Femme et du sérum. Etude de la spécificité de cette activité enzymatique.

PREPARATION D'ANTIGENES DE SYNTHÈSE ET PURIFICATION D'ANTICORPS SPECIFIQUES

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A - MATERIEL

1) PROTEINE PORTEUSE

La macromolécule utilisée comme "carrier" est une protéine bien connue : la Sérum Albumine Bovine ou SAB (Sigma). Son poids moléculaire est de 68.000. Elle présente 101 groupements fonctionnels aminés (- NH₂) portés par les acides aminés suivants : 60 lysines, 18 histidines et 23 arginines.

2) SUPPORT D'AFFINITE

Le support utilisé pour la préparation des adsorbants d'affinité est le Sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Suède).

3) STRUCTURES OLIGOSACCHARIDIQUES

Les oligosaccharides utilisés pour les couplages et pour la préparation des adsorbants d'affinité ont été isolés dans notre Laboratoire à partir de milieux biologiques tels que le lait de Femme et l'urine. Ces structures sont représentées au Tableau VIII.

a - Oligosaccharides isolés du lait

La structure de ces composés glycaniques a été déterminée grâce aux travaux de KUHN (299), de MONTREUIL (300, 301) et de KOBATA et GINSBURG (302). Ces oligosaccharides ont été préparés à partir de la fraction dialysable du lait de Femme délipidé et décaséiné. Cette fraction est d'abord

TABLEAU VIII : Structures oligosaccharidiques utilisées pour la préparation des néoglycoprotéines

NOM	STRUCTURE
Lactose	Gal (β 1-4) Glc
Maltose	Glc (α 1-4) Glc
Gentiobiose	Glc (β 1-6) Glc
<i>Oligosaccharides du lait :</i>	
Lacto-N-tétraose	Gal (β 1-3) GlcNAc (β 1-3) Gal (β 1-4) Glc
Lacto-N-fucopentaose I	Fuc (α 1-2) Gal (β 1-3) GlcNAc (β 1-3) Gal (β 1-4) Glc
Lacto-N-fucopentaose II	Gal (β 1-3) GlcNAc (β 1-3) Gal (β 1-4) Glc Fuc (α 1-4)
Lacto-N-difucohexaose I	Fuc (α 1-2) Gal (β 1-3) GlcNAc (β 1-3) Gal (β 1-4) Glc Fuc (α 1-4)
<i>Oligosaccharides urinaires</i>	
Oligosaccharide de Mannosidose	Man (α 1-3) Man (β 1-4) GlcNAc
Oligosaccharide GM ₁ n° 1 de Gangliosidose	Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-2) Man (α 1-3) Man (β 1-4) GlcNAc Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-2) Man (α 1-6)
Oligosaccharide de Sialidose	
- Sialoside II	NANA (α 2-6) Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-2) Man (α 1-3) Man (β 1-4) GlcNAc
- Sialoside IX	NANA (α 2-6) Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-2) Man (α 1-3) Man (β 1-4) GlcNAc NANA (α 2-6) Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-2) Man (α 1-6)



passée à travers une colonne d'échangeur d'ions (DOWEX 1 x 4) et par la suite soumise à une chromatographie d'adsorption sur charbon célite. Le matériel adsorbé est élué par un gradient discontinu d'alcool de 1,5 % à 30 %. Les fractions lyophilisées sont préparées et purifiées par chromatographie préparative sur papier.

b - Oligosaccharides urinaires

Ce sont des structures oligosaccharidiques isolées à partir d'urines pathologiques (patients atteints de Gangliosidose, Mannosidose et de Sialidose) (Voir la revue de STRECKER et MONTREUIL : 303).

c - Oligosaccharides commercialisés

Ce sont les disaccharides lactose, maltose et gentiobiose.

4) REACTIFS

Les réactifs cyanoborohydrure et β -(-p-aminophényl)éthylamine ont été utilisés pour les réactions de couplage (Aldrich - Europe). Le bromure de cyanogène a permis l'activation de Sepharose 4B.

B - METHODES

1) PREPARATION DES NEOANTIGENES

Un certain nombre de techniques de couplage oligosaccharides-protéines sont décrites dans la littérature récente (voir p. 39). Nous en avons retenu deux : - l'amination réductive en cyanoborohydrure, qui ne nécessite aucune activation, ni transformation du glycanne.

- la diazotation des dérivés oligosaccharide-phénéthylamine qui fait intervenir un bras de condensation entre le glycanne et la protéine.

a - Par amination réductive au cyanoborohydrure

α) Principe

Il s'agit de la méthode décrite par GRAY (304). C'est une amination réductive de la forme aldéhydique libre du sucre réducteur sur la lysine (fonction ϵ -NH₂) de la sérum albumine bovine. La réduction est effectuée par l'anion cyanoborohydrure. Le mécanisme de la réaction est illustré à la figure 11 page 44.

β) Mode opératoire

1 μM de SAB, 0,3 μM d'oligosaccharide et 1,59 mM de cyanoborohydrure de sodium sont dissoutes dans 5,0 ml de tampon phosphate de potassium 0,2 M, pH 8,0 additionné d'azide de sodium. Le mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 7 jours et agité à des intervalles de temps réguliers. La solution est ensuite concentrée sous pression réduite, et déposée sur une colonne de Sephadex G-50 (100 x 2,5 cm) dans un tampon phosphate de potassium 0,1 M, pH 7,0. Les fractions contenant le produit couplé sont repérées par la méthode au phénol-sulfurique (DUBOIS et al. : 305) pour les sucres, et par mesure de la densité optique en U.V. à 280 nm pour la protéine.

Le produit du couplage est élué au volume exclu et séparé des oligosaccharides libres qui n'ont pas réagi. Les fractions contenant le produit couplé sont rassemblées, dialysées contre de l'eau distillée, concentrées et ensuite lyophilisées.

b - Couplage par diazotation

α) Principe

C'est une méthode qui utilise un bras de condensation. Le sucre réagit dans un premier temps avec le β-(-p-aminophényl)éthylamine pour former un dérivé phénéthylaminique. Ensuite, l'arylamine primaire libre peut se fixer à la protéine par diazotation et former un glycoconjugué immunogénique. Il s'agit d'une méthode colorée et son mécanisme est illustré à la figure 7 page 41.

β) Mode opératoire

1°) Préparation des dérivés phénéthylamine-oligosaccharide (ZOPF et al. : 306). 0,1 mM d'oligosaccharide est dissoute dans 0,5 ml de β-(-p-aminophényl)éthylamine (3,5 mM). Le mélange réactionnel est placé dans un pillulier fermé et agité pendant 15 heures à 37°C. Ensuite 0,5 ml d'éthanol absolu est additionné au mélange pour réduire la viscosité. Ceci est immédiatement suivi par l'addition de 1 ml d'éthanol absolu contenant 12 mg de borohydrure de sodium (préalablement placé au bain sonore pour faciliter la dissolution). Le mélange est soumis à une agitation continue pendant au moins 5 heures, dans un pillulier ouvert. Il est dilué avec 4 ml d'eau, placé dans la glace et son pH est ajusté à 5,6 par addition d'acide acétique.

Après évaporation de l'éthanol sous pression réduite, le mélange est repris par de l'eau et déposé sur une colonne de Biogel P-2 (100 x 2 cm). L'élution est effectuée par une solution d'acide acétique 1 M ajustée à pH 5 avec la pyridine. La séparation du produit de la réaction et de l'amine libre est suivie en mesurant l'adsorbance en U.V. à 280 nm. Les fractions contenant le sucre sont identifiées par la méthode au phénol sulfurique (DUBOIS et al. : 307), elles sont rassemblées et lyophilisées. Certains dérivés de mono- et disaccharides sont difficiles à séparer complètement de la phénéthylamine libre par chromatographie de gel filtration. Une meilleure séparation peut être obtenue par chromatographie d'échange d'ions sur carboxyméthylcellulose.

2°) Couplage des dérivés phénéthylamine-oligosaccharide à la protéine (ZOPF et al. : 308). 20,5 μM du dérivé phénéthylamine-oligosaccharide sont dissoutes dans 4 ml d'eau distillée et placées dans la glace avec une agitation continue. Ensuite 1,5 ml d'une solution d'HCl 0,1 N glacée sont additionnés goutte à goutte, suivis par 1,2 ml d'une solution de nitrite de sodium (à 2,0 mg/ml) préparée extemporanément. Après une incubation de 30 min, le mélange est lentement ajouté à une solution glacée (continuellement agitée) de 0,16 μM de protéine dissoute dans 12 ml d'une solution de NaOH 0,05 N. Le mélange se colore en jaune durant l'addition du sel de diazonium.

Le pH est maintenu à 11,5 par addition d'une solution de NaOH 0,1 N. L'agitation dans la glace est suivie pendant 4 heures et ensuite on dialyse le mélange réactionnel contre 4 litres de tampon Tris-glycine-HCl 0,01 M, pH 11 pendant 24 heures à + 4°C. Une deuxième dialyse est effectuée contre l'eau distillée (4 l, changés toutes les 12 heures) pendant 2 jours. Enfin on concentre sous pression réduite et le produit couplé est lyophilisé.

2) METHODES D'ANALYSE DU PRODUIT COUPLE

a - Purification et mise en évidence du produit couplé

Les produits obtenus sont purifiés généralement par chromatographie de tamisage moléculaire, sur Biogel P-2 (Biorad) pour les dérivés intermédiaires et sur Sephadex G-50 (Pharmacia) pour les produits de couplage. Une dernière purification peut être effectuée par dialyse afin d'éliminer les sels. Le produit purifié est finalement lyophilisé.

La mise en évidence du produit couplé est effectuée en chromatographie sur couche mince (HUMBEL et COLLART : 309). En effet, le conjugué oligosaccharides-protéine ne migre pas en c.c.m. mais reste au point de dépôt. On observe donc à ce point, après révélation, une coloration due aux oligosaccharides couplés à la protéine. Les sucres sont révélés par pulvérisation d'orcinol sulfurique (200 mg d'orcinol dans 100 ml d'acide sulfurique à 20 %), suivie d'un chauffage à 120°C pendant 5 min. Le solvant de migration est le :
éthanol/butanol/ac. acétique/pyridine/eau (100/10/3/10/30) ou le butanol/pyridine/eau (2/1/1).

b - Détermination du degré de substitution

Le nombre de molécules d'oligosaccharides fixées par molécule de protéine a été déterminé après dosage de la fraction glucidique contenue dans le produit de couplage. Cette fraction glycanique (ainsi que sa composition molaire) est analysée par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et trifluoroacétylation

selon la méthode de ZANETTA et al. (310). Le nombre d'oligosaccharides couplés par molécule de protéine a été déterminé par l'équation suivante :

$$\frac{X}{100} = \frac{Y \times \text{PM glycane}}{\text{PM protéine} + Y \times \text{PM glycane}}$$

X/100 = Composition centésimale en sucre du produit couplé

Y = Nombre de glycanes/molécule de protéine

PM = Poids moléculaire des produits.

3) PRODUCTION D'ANTICORPS (Voir Revue HURN et CHANTLER : 311).

Les immunsérums sont obtenus après immunisation chez le lapin avec les antigènes de synthèse. On effectue des injections intramusculaires répétées d'une solution d'antigène à une semaine d'intervalle pendant 4 semaines. Chaque injection est faite avec un mélange (v/v) d'une solution d'antigène synthétique dans l'eau physiologique et l'adjuvant complet de Freund. La quantité injectée est de l'ordre de 1 mg et augmente de façon progressive. Au bout de 4 semaines, on effectue un premier prélèvement de sang. Si la quantité d'anticorps produite est faible on effectue un deuxième cycle d'immunisation. Les antisérums prélevés sont conservés à - 20°C.

4) PURIFICATION D'ANTICORPS ANTI-GLYCANNES PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR ADSORBANT GLYCANNIQUE

Les anticorps obtenus après immunisation avec les antigènes de synthèse sont purifiés sur adsorbant d'affinité, utilisant comme ligand la copule glycanique qui a été couplée à la protéine pour la synthèse de l'antigène.

a - Préparation des adsorbants glycaniques

α) Activation de la matrice

Le Sepharose-4B est activé au bromure de cyanogène (AXEN et al. : 312).

β) Préparation des ligands glycaniques (Méthode de ZOPF et al. : 313)

Les dérivés oligosaccharides-phénéthylamine possédant une fonction active libre ($-NH_2$), capables de se lier au support activé, ont été préparés suivant le protocole décrit à la page 72 et illustré à la figure 7 page 41.

γ) Couplage au Sépharose 4B activé

Nous avons utilisé la technique de JEFFREY et al. (314), pour le couplage des dérivés oligosaccharide-phénéthylamine au Sepharose 4B, préalablement activé. Le mécanisme du couplage est illustré à la figure 15 p. 54. Pour les ligands protéiniques et glycopeptidiques la fixation sur le gel se fait directement par l'intermédiaire des acides aminés. Après fixation, les groupements fonctionnels activés et encore libres sont saturés par l'éthanolamine 1 M afin d'éviter les phénomènes d'échange d'ions et d'adsorption non spécifique.

b - Purification des anticorps

Les antisérums contenant les anticorps anti-glycannes sont préalablement concentrés par dialyse sous vide, contre un tampon phosphate de sodium (PBS) pH 7,4, contenant 0,85 % de NaCl. Une fraction aliquote de sérum concentré est déposée au sommet du support d'affinité Sepharose 4B couplé à l'oligosaccharide (10 x 1,5 cm) et préalablement équilibré dans le tampon PBS (Tampon Phosphate de sodium 0,01 M, 0,15 M NaCl, pH 7,4). Puis le support est lavé par le même tampon jusqu'au retour à la ligne de base de la densité optique mesurée en U.V. à 280 nm. Le lavage est suivi par un tampon PBS contenant du NaCl 1 M de façon à éliminer les protéines adsorbées de façon non spécifique. Les anticorps anti-glycanne retenus au niveau de l'adsorbant peuvent être élués de la façon suivante :

- Par l'haptène libre (une solution à 2 mg/ml dans le tampon PBS) : élution spécifique.

- Par un tampon glycolle/HCl 0,1 M à pH 2,8 : élution non spécifique par une modification de pH.

Les fractions absorbant en U.V. à 280 nm sont rassemblées (la solution est neutralisée dans le cas de l'élution non spécifique), concentrées par dialyse sous vide, filtrées et conservées à - 20°C.

c - Caractérisation des anticorps spécifiques

Les anticorps précipitants ont été déterminés par des réactions d'immunoprécipitation selon la technique d'OUCHTERLONY (315). Cette réaction est effectuée avec du gel Agar à 1 % dans un tampon véronal sodé à pH 8,6, que l'on coule sur des plaques de verre. Des réactions d'immunodiffusion croisées ont ainsi été réalisées entre anticorps/SAB et anticorps/antigène synthétique (SAB-glycane).

La caractérisation des anticorps anti-glycannes a été effectuée ainsi par des réactions d'hémagglutination à l'aide d'hématies de groupes sanguins connus. Ces anticorps purifiés ont été en outre utilisés pour la mise en évidence au niveau de la membrane d'hématies des déterminants antigéniques des groupes sanguins. Les hématies préalablement lavées avec du tampon PBS (0,01 M phosphate de Na, 0,15 M NaCl, pH 7,4) sont incubées avec les anticorps spécifiques. Les anticorps qui n'ont pas réagi sont éliminés par lavage au tampon PBS. Le complexe antigène membranaire-anticorps est mis en évidence à l'aide d'anticorps de souris anti-lapin fluorescents. L'ensemble fluorescent est observé entre lame et lamelle, dans une solution de glycérol, à l'objectif à immersion, au microscope à fluorescence.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I - COUPLAGE DES GLYCANNES

A - RÉSULTATS

1) AMINATION REDUCTIVE AU CYANOBOROHYDRURE

Par cette méthode le produit couplé (SAB-oligosaccharides) est séparé des oligosaccharides libres par chromatographie de tamisage

moléculaire sur Sephadex G-50. Le diagramme d'élution est représenté à la figure 16. Le premier pic (au volume d'exclusion) positif en phénol sulfurique (spécifique des sucres), et absorbant en U.V. à 280 nm, ne migre pas en chromatographie couche mince et se révèle à l'orcinol sulfurique. Il s'agit donc bien du produit couplé (voir figure 17). Le deuxième pic retardé, positif au phénol sulfurique et n'absorbant pas en U.V. à 280 nm, migre en c.c.m. au même niveau que le témoin oligosaccharidique. Il s'agit donc du sucre libre qui n'a pas réagi avec la protéine. Il n'a subi, en outre, aucune modification au cours de la réaction.

Le degré de substitution de la protéine par les différents oligosaccharides est représenté au tableau IX. La composition molaire en sucre des néoglycoprotéines (voir tableau X) est très proche de celle des oligosaccharides natifs.

2) COUPLAGE DES DERIVES OLIGOSACCHARIDE-PHENYLTHYLAMINE PAR DIAZOTATION

Cette méthode nécessite l'activation préalable du sucre.

a - Préparation des dérivés phénéthylaminiques

Les dérivés oligosaccharide-phénéthylamine, après élimination de la phénéthylamine libre (sur Biogel P-2 ou échangeur d'ions), sont caractérisés en c.c.m. (solvant : butanol/pyridine/eau : 2/1/1). En effet, le dérivé migre moins loin que le témoin oligosaccharidique. La réaction est quantitative pour la plupart des oligosaccharides.

b - Couplages à la sérum albumine bovine

Les résultats du couplage des dérivés oligosaccharidiques à la SAB sont représentés au tableau XI. La réaction est quantitative pour la protéine et les rendements sont de l'ordre de 90 %. De 5 à 26,5 molécules de sucre ont été couplées à la SAB pour les différents oligosaccharides. La composition molaire des produits couplés est semblable à celle des oligosaccharides natifs.

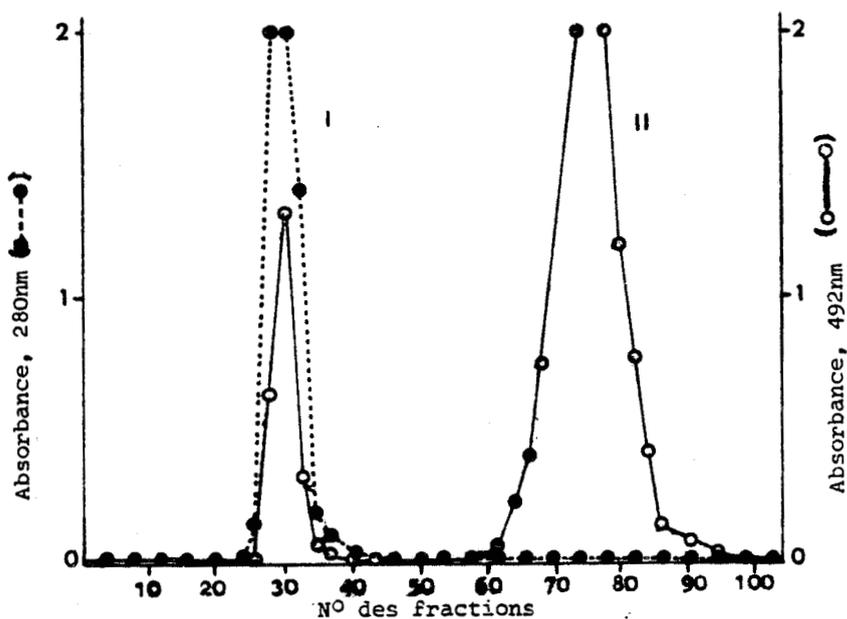


FIGURE 16 : Diagramme d' élution du conjugué SAB-oligosaccharides (ci-dessus représenté le SAB-lacto-N-fucopéntaose) sur colonne de Sephadex G-50. Le couplage a été réalisé par amination réductrice au cyanoborohydrure. (I : produit du couplage, II : oligosaccharides non couplés).

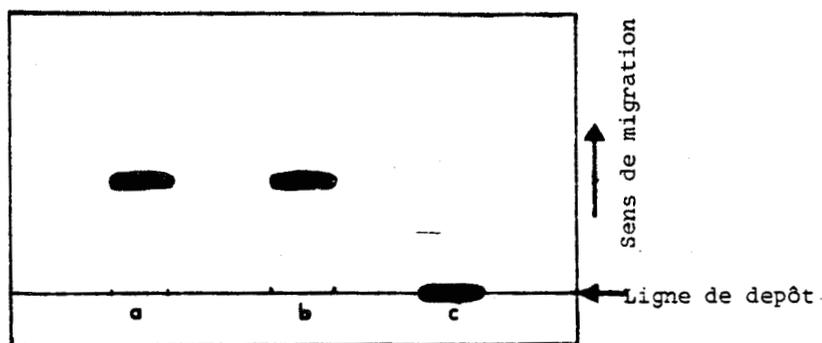


FIGURE 17 : Chromatographie en couche mince des produits couplés (c). L' oligosaccharide non couplé reste intact (b). (a : témoin oligosaccharide natif)



TABLEAU IX : Oligosaccharides couplés à la SAB par amination réductive au cyanoborohydrure. Degré de substitution des néoglycoprotéines.

MELANGE REACTIONNEL		PRODUIT COUPLE	
Oligosaccharides	Rapport molaire sucre/protéine	% de sucre dans le produit couplé	Nombre de moles de sucre/mole SAB
Lactose	292	15	33
Maltose	292	14,1	29
Gentiobiose	292	13,5	28
Lacto-N-tétraose	193	11	14
Lacto-N-fucopentaose I	245	14,5	14
Man-Man-GlcNAc	285	7,8	11

TABLEAU X : Composition molaire des oligosaccharides couplés par le cyanoborohydrure à la SAB. Comparaison avec l'oligosaccharide natif.

SUCRE	LACTO-N-TETRAOSE		LACTO-N-FUCOPENTAOSE I		MAN-MAN-GN	
	Natif	Couplé	Natif	Couplé	Natif	Couplé
GlcNAc	1,03	1,2	1,0	0,98	1,08	0,5
Glc	1,0	0,26	0,7	-	-	-
Gal	2,04	1,9	1,76	2,0	-	-
Man	-	-	-	-	2	2,0
Fuc	-	-	1,09	1,0	-	-

BUS
LELLE

TABLEAU XI : Oligosaccharides couplés par diazotation à la SAB. Le rapport molaire sucre/protéine dans le mélange réactionnel est de l'ordre de 100/1.

Oligosaccharides	% de sucre dans le produit couplé	Nombre de molécules de sucre couplées par mole de SAB
Lacto-N-fucopentaose II	25	26,5
Lacto-N-difucohexaose I	21	18
Oligosaccharide GM ₁ type 1	15,3	10
Sialoside II	16	11
Sialoside IX	12	5



B - DISCUSSION

Les deux méthodes utilisées pour la préparation des antigènes de synthèse nous ont donné des résultats satisfaisants.

1) COUPLAGE AU CYANOBOROHYDRURE

La méthode d'amination réductive par le cyanoborohydrure de sodium nous offre des conjugués où le sucre réducteur se fixe directement à la protéine sans aucune modification préalable. Il s'agit d'une méthode simple qui s'effectue dans une solution aqueuse et à un pH neutre. En effet, le sucre réducteur, après passage par la forme aldéhydique, vient se condenser à la protéine. On a donc une légère modification de la structure glycanique par cette ouverture du cycle de l'ose réducteur. C'est un inconvénient de cette méthode mais on peut cependant penser que l'ose réducteur n'a qu'une faible part ou n'entre pas dans la spécificité antigénique, qui est généralement portée par les sucres se trouvant en position terminale non réductrice.

Un autre inconvénient de cette méthode est la longueur de la réaction. En effet, une incubation (du mélange réactionnel) d'au moins 7 jours est nécessaire pour obtenir un bon couplage. Ceci est dû essentiellement à la faible concentration (dans le mélange réactionnel) de la forme aldéhydique du sucre réducteur. L'anion cyanoborohydrure catalyse l'amination réductive des sucres réducteurs, avec un haut degré de substitution sur une large zone de pH. Mais les meilleurs résultats ont été obtenus à des pH compris entre 7 et 8. C'est une méthode qui peut être utilisée pour le couplage de tous les oses réducteurs même pour la N-acétylglucosamine qui n'est pas réduite à pH 7-8 par le cyanoborohydrure. La séparation en chromatographie de tamisage moléculaire nous a fourni un conjugué qui n'est pas contaminé par l'oligosaccharide libre.

Nous avons couplé par cette méthode 11 à 33 molécules oligosaccharidiques par molécule de protéine. Si, pour les disaccharides, le taux de couplage est plus élevé que dans le cas des tri-, tétra- ou

pentasaccharides ceci peut être dû à l'encombrement stérique. Cependant, ce taux de substitution de la protéine est satisfaisant et peut nous permettre d'immuniser les lapins afin d'obtenir une réponse immunitaire. Un meilleur taux de couplage pourrait être obtenu avec du cyanoborohydrure fraîchement recristallisé.

En outre, la composition molaire des oligosaccharides couplés, très voisine de celle des oligosaccharides natifs, indique qu'il n'y a eu aucune modification pendant la réaction de couplage. L'ose réducteur, transformé en un alditol au cours de son greffage à la protéine, n'est représenté qu'à de faibles quantités dans cette composition molaire.

Enfin, la liaison amine secondaire formée au niveau des résidus de lysine est stable en milieu acide ou basique, et l'activité de la protéine est préservée.

2) COUPLAGE PAR DIAZOTATION

La présente méthode est fondée sur l'introduction des groupements arylamine au niveau de la fonction réductrice terminale de l'oligosaccharide, par réaction du sucre avec le 2-(-p-aminophényl)éthylamine. Par réduction, des N-alkylglycosides au borohydrure de sodium, on obtient une amine secondaire stable. D'autres auteurs ont utilisé, comme agent réducteur, le cyanoborohydrure de sodium qui réduit de manière sélective les N-alkylglycosides. La synthèse de tels conjugués est effectuée dans des conditions douces et elle est surtout utilisée pour des haptènes glycaniques ayant des liaisons labiles ou lorsque l'on en dispose en faible quantité.

Cette méthode nous donne des antigènes de synthèse dont le degré de substitution en sucre est très élevé. En effet, plus de 26 molécules de lacto-N-fucopentaose II ont été couplées à la sérum albumine bovine et l'antigène synthétique obtenu contient au moins 25 % de sucre. Pour des molécules glycaniques dont l'encombrement stérique est plus élevé (oligosaccharide GM₁ ou les sialosides) le taux de substitution est

abaissé, mais se situe à un niveau suffisant (plus de 12 % de sucre contenus dans l'antigène) pour l'obtention d'une réponse immunitaire.

La présence d'un bras (β -(-p-aminophényl/éthylamine) entre les produits de condensation pourrait provoquer la formation d'anticorps "anti-lien", dirigés contre la phénéthylamine. Cependant, certains auteurs pensent que le groupement phénéthylamine n'entre pas dans la spécificité de la réaction immunologique.

C - CONCLUSION

Des antigènes de synthèse ont été préparés par deux méthodes différentes. Chaque méthode présente des avantages mais aussi quelques inconvénients.

La méthode au cyanoborohydrure ne nécessite aucune activation ni modification chimique de l'ose réducteur se trouvant en position terminale. Elle est effectuée à des pH neutres (pH 7 à 8) et tous les oses réducteurs peuvent être couplés par ce procédé, même les oligomères de la N-acétylglucosamine (qui ne sont pas réduits par le cyanoborohydrure à cette zone de pH).

Le couplage des dérivés oligosaccharide-phénéthylamine par diazotation est une méthode qui fait intervenir un bras de condensation. Ce "lien" permet en outre de mieux exposer à la surface de la protéine le déterminant glycanique, et ainsi de favoriser la formation d'anticorps dirigés contre cette partie de l'antigène de synthèse. Cette méthode donne des taux de substitution supérieurs à ceux obtenus par la méthode au cyanoborohydrure. En effet, l'activation préalable du glycanne permet un couplage beaucoup plus rapide et nécessite des quantités beaucoup plus faibles de produit.

Les rapports molaires en sucre des produits couplés n'indiquent aucune modification au niveau de la composition glycanique des néoglycoprotéines.

Enfin, on a formation, par les deux méthodes, d'une liaison amine secondaire stable qui n'interfère pas avec l'activité de la molécule.

Il nous a été ainsi possible d'obtenir à partir des oligosaccharides (isolés des différents milieux biologiques) et par couplage de ces derniers sur une protéine porteuse, une série d'antigènes de synthèse qui pourront être capables d'induire une réponse immunitaire.

II - PRODUCTION ET PURIFICATION D'ANTICORPS ANTI-GLYCANNE

A - IMMUNISATION

Pour l'immunisation des lapins, nous avons utilisé les antigènes de synthèse possédant :

- d'une part, des déterminants antigéniques de groupes sanguins : lacto-N-tétraose et lacto-N-fucopentaose I, couplés à la sérum albumine bovine par amination réductive.

- et d'autre part, le glycanne (biantenné et désialylé) de Gangliosidose GM₁ de type 1 couplé à la SAB par diazotation. C'est une structure oligosaccharidique qui est très fréquemment rencontrée au niveau des N-glycosylprotéines comme la sérotransferrine (SPIK : 316) et l'orosomucoïde (FOURNET et al. : 317) désialylés.

Pour chaque antigène nous avons immunisé 2 lapins. 40 jours après le début d'immunisation nous avons obtenu un titre en anticorps satisfaisant. L'antisérum total obtenu réagit en immunoprécipitation avec l'antigène de synthèse qui a été utilisé pour l'immunisation et avec la sérum albumine bovine, porteuse de la copule glycanne (Fig. 19A).

Les anticorps anti-glycane peuvent être obtenus, soit après élimination des anticorps anti-SAB, soit par adsorption spécifique sur le ligand glycanique immobilisé par la chromatographie d'affinité.

B - ELIMINATION DES ANTICORPS ANTI-SAB PAR DES REACTIONS D'EPUISEMENT

Les anticorps anti-SAB peuvent être éliminés par des réactions d'épuisement en milieu liquide. En présence d'une quantité équivalente de SAB, ces anticorps précipitent. Plusieurs cycles d'épuisement sont nécessaires. La réaction s'effectue à 37°C pendant 2 h ou une nuit à + 4 °C.

Le surnageant est ensuite testé en immunoprécipitation contre l'antigène de synthèse avec lequel on a une réaction positive et contre la sérum albumine bovine avec laquelle on n'observe aucune réaction.

Il s'agit d'une méthode facile pour éliminer les anticorps anti "carrier" mais on risque de cette façon d'éliminer les anticorps conformationnels dirigés contre la SAB et contre le conjugué SAB-glycane.

C - PURIFICATION DES ANTICORPS ANTI-GLYCANES PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

Une méthode très élégante de purification des anticorps spécifiques est la chromatographie d'affinité sur adsorbant glycanique. Elle nous permet d'éliminer les protéines aspécifiques, puisque seuls, les anticorps reconnaissant la structure glycanique immobilisée, seront adsorbés au niveau du ligand. Par une élution appropriée on obtient des anticorps monospécifiques hautement purifiés.

1) PREPARATION DES ADSORBANTS

a - Dérivés oligosaccharide-phénéthylamine-Sépharose

Les dérivés lacto-N-tétraose-phénéthylamine et lacto-N-fucopentaose I ont été immobilisés sur le support préalablement activé. Nous avons fixé 0,7 μM de lacto-N-tétraose et 0,6 μM de lacto-N-fucopentaose I par millilitre de gel activé.

b - Immobilisation de glycopeptides biantennés

1 μMole de glycopeptides biantennés et désialylés (isolés de la fraction IV de COHN) a été couplée par millilitre de Sepharose 4B activé.

c - La sérotransferrine humaine désialylée a été immobilisée au Sepharose 4B. 3 mg de protéine ont été couplés par ml de gel. Aucune activation préalable n'est nécessaire pour la fixation des glycopeptides et de la protéine sur le support d'affinité. Ces ligands glycopeptidiques et protéiniques seront utilisés pour la purification des anticorps obtenus après immunisation avec l'antigène contenant le glycanne biantenné : GM₁ type 1.

2) PURIFICATION D'ANTICORPS ANTI LACTO-N-TETRAOSE (LNT)

Après passage de l'antisérum sur le support d'affinité substitué par le lacto-N-tétraose, la colonne est lavée par le tampon PBS contenant du NaClM, de façon à éliminer la fixation aspécifique. L'élution des anticorps retenus au niveau du ligand glycanne est effectuée soit par une modification du pH à l'aide d'un tampon glycolle/HCl pH 2,8, soit par l'haptène libre (lacto-N-tétraose), à une concentration de 2 mg/ml dans le PBS (Fig. 18). Ces diagrammes d'élution indiquent la présence d'un premier pic (pic I) correspondant aux protéines exclues et d'un second pic (pic II) représentant les anticorps retenus au niveau de l'adsorbant glycanne. Environ 80 % de l'activité anticorps anti-glycanne contenue

dans l'antisérum total est retenue lors de cette adsorption. En effet, lors d'un deuxième passage de la fraction exclue on n'obtient qu'une faible fraction d'anticorps adsorbés.

Les anticorps anti-LNT ainsi purifiés donnent une réaction d'immunoprécipitation avec le conjugué SAB-LNT mais on n'observe aucune réaction, ni avec la protéine porteuse (SAB), ni avec le conjugué SAB-LNF_I (Fig. 19). L'immunoélectrophorèse, ainsi que l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, révèlent une seule bande migrant à la position des IgG.

En effet, le premier pic d'élution représente les protéines et anticorps sériques qui ne reconnaissent pas (lors de leur passage à travers la colonne d'affinité) le ligand glycanique immobilisé. Ces substances sont donc exclues. Le lavage par une solution ayant une force ionique élevée (NaCl M), permet d'éliminer des traces de protéines, adsorbées de façon non spécifique au niveau du support.

La fraction n° II éluee par une modification de pH ou par le lacto-N-tétraose libre, représente les anticorps ayant reconnu le lacto-N-tétraose immobilisé et qui ont été adsorbés au niveau de ce ligand glycanique. En présence du tampon acide, il y a une modification de la conformation de la protéine et le complexe haptène-anticorps est dissocié. Lorsqu'on élue avec l'haptène libre (LNT) il y a une compétition entre le LNT immobilisé au niveau de la colonne et le LNT libre dans le tampon. Ce dernier, en excès, déplace la réaction et l'anticorps est élué avec l'haptène libre.

Il s'agit donc bien d'anticorps dirigés de façon spécifique contre le lacto-N-tétraose, ne reconnaissant pas la protéine porteuse (SAB) et ne donnant aucune réaction croisée avec le conjugué SAB-LNF_I qui possède en plus un résidu fucosyl branché en (α 1-2) sur le galactose terminal.

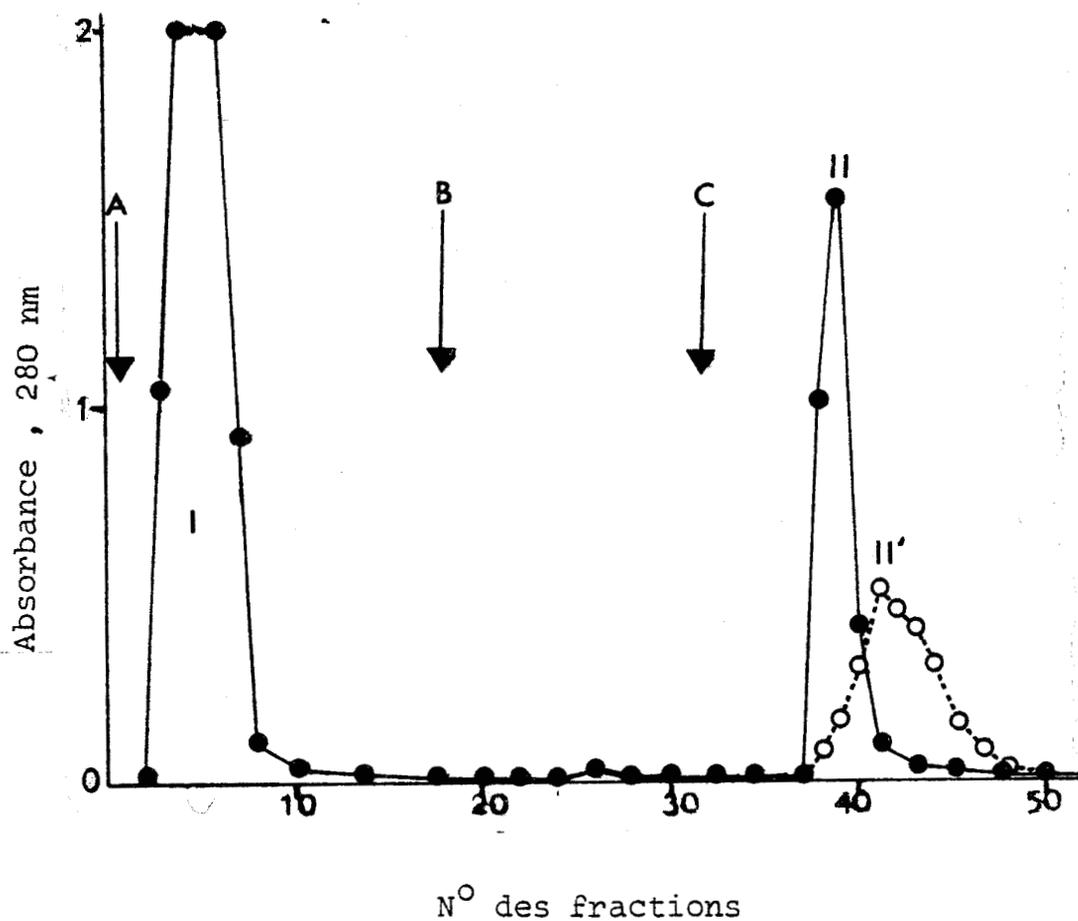


FIGURE 18 : Profil d'élution de l'antisérum sur Sepharose-lacto-N-tétraose. Après injection de l'antisérum (A) et lavage au NaCl M (B), la colonne est éluée par le tampon Glycocolle / HCl 0,1 M pH 2,8 (●—●) ou par l'haptène libre (lacto-N-tétraose à 2 mg / ml de tampon, ○---○). Les pics II et II' représentent les anticorps spécifiques du lacto-N-tétraose.

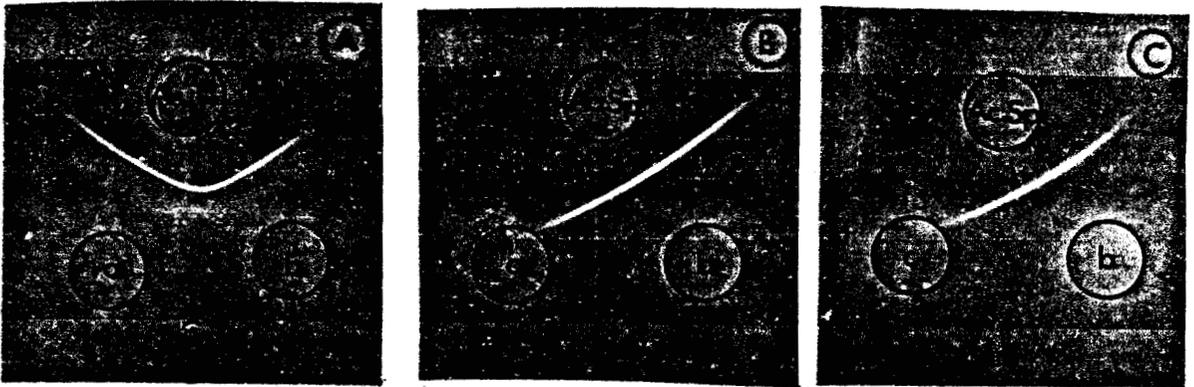


FIGURE 19 : Réactions d'immunoprécipitation de l'antisérum total (As.T.) : planche A, et des anticorps spécifiques (Ac.Sp.) purifiés sur Sepharose-lacto-N-tétraose : planches B et C, contre :
a : Sérum albumine bovine (SAB)
b : SAB-lacto-N-tétraose
c : SAB-lacto-N-fucopentaose I

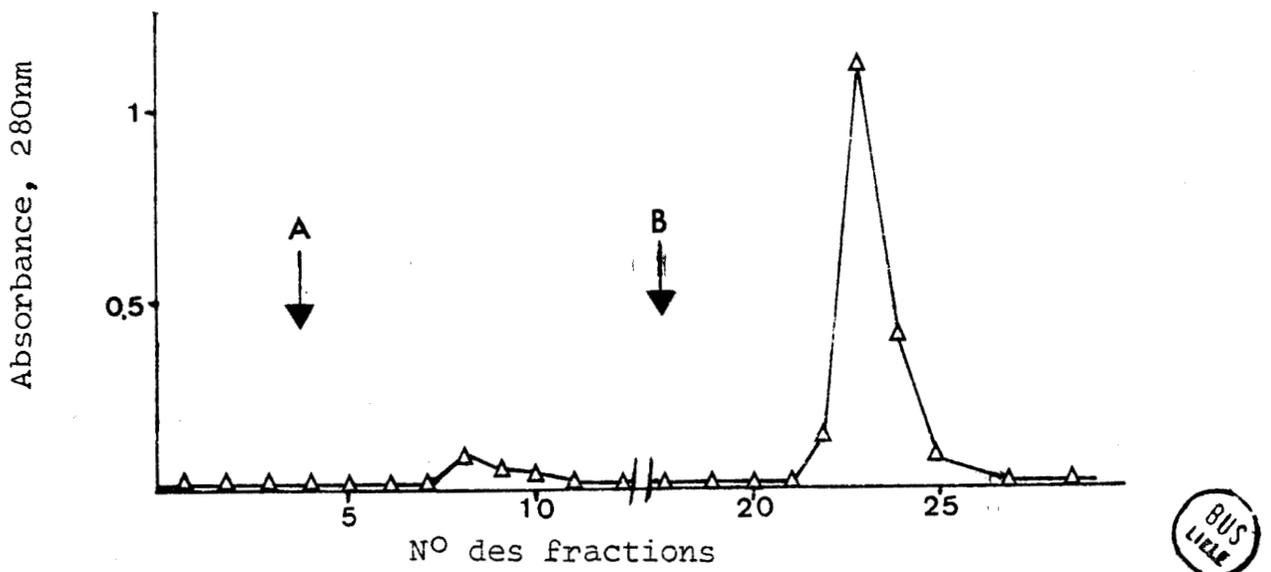


FIGURE 20 : Elution des anticorps anti-lacto-N-fucopentaose I adsorbés sur Sepharose-lacto-N-fucopentaose par une solution de PBS contenant du Fucose libre (à 2 mg/ml) (A). L'éluion est complétée par une modification de pH avec un tampon Gly / HCl 0,1M , pH 2,8 (B).

3) PURIFICATION D'ANTICORPS ANTI-LACTO-N-FUCOPENTAOSE I (LNF_I)

Des résultats identiques ont été obtenus avec les anticorps anti lacto-N-fucopentaose I, qui ont été purifiés sur une colonne de Sépharose 4B - lacto-N-fucopentaose. L'élution spécifique de ces anticorps est obtenue en ajoutant dans le tampon de lavage, du lacto-N-fucopentaose I libre à une concentration de 2 à 4 mg/ml de tampon.

En présence de fucose seul dans le tampon d'élution on n'obtient qu'une très faible fraction des anticorps anti lacto-N-fucopentaose I retenus au niveau de l'adsorbant (Fig. 20). Ceci indique que ces anticorps ne sont pas dirigés contre le résidu terminal non réducteur (fucose) mais probablement contre une plus grande partie de la copule glucidique. Les anticorps anti lacto-N-fucopentaose I sont donc spécifiques de la copule glycanique Fuc(α 1-2)Gal... qui se trouve être le déterminant antigénique H du groupe sanguin O. Il nous a donc semblé intéressant, à l'aide de ces anticorps spécifiques, de mettre en évidence ce déterminant à la surface des hématies. En effet, ces anticorps anti LNF_I agglutinent les hématies de groupe sanguin O⁺ et ne donnent pas de réaction positive avec des hématies de groupe A₁ (prises comme témoins) (Voir Tableau XII). Mis en présence d'hématies O⁺ ces anticorps reconnaissent le déterminant H (Fuc(α 1-2)Gal...) et se fixent à la surface membranaire. Ce complexe rendu fluorescent (par l'addition d'anticorps de souris anti-lapin fluorescents) est observé au microscope de fluorescence. En présence d'hématies de groupe sanguin A₁ on n'observe aucun point de fluorescence ; la réaction de reconnaissance est donc très spécifique et n'est pas le fait d'une adsorption aspécifique de ces anticorps sur les hématies.

Les anticorps anti LNF étant spécifiques de la fraction glycanique Gal(β 1-3)GlcNAc... ne donnent aucune réaction d'agglutination avec ces hématies et ne sont pas adsorbés au niveau de leur membrane.

TABLEAU XIII : Réactions d'agglutination des anticorps anti LNF et anti LNF_I avec des hématies de groupe sanguin O⁺ et A₁.

HEMATIES	ANTICORPS PURIFIES	
	Anti LNF _I	Anti LNF
Groupe O ⁺ (H)	+	-
Groupe A ₁	-	-

4) PURIFICATION D'ANTICORPS DIRIGES CONTRE LA STRUCTURE BIAN TENNEE DE L'OLIGOSACCHARIDE GM₁ DE TYPE 1

Après la mise au point des méthodes de purification des anticorps monospécifiques (appliquées aux anticorps produits contre des structures glycaniques, qui constituent des déterminants antigéniques de groupes sanguins), nous avons appliqué cette méthodologie à la purification d'anticorps qui ont été produits contre la structure de base des glycanes de type N-acétyllactosaminique.

Les antisérums obtenus après immunisation chez l'animal avec l'antigène de synthèse GM₁ type 1-SAB ont été étudiés en chromatographie d'affinité. Les glycopeptides biantennés et désialylés de la fraction IV de COHN ainsi que la sérotransferrine humaine désialylée (possédant une structure biantennée analogue à celle de l'oligosaccharide GM₁ type 1) pourraient constituer d'excellents ligands pour la purification des anticorps dirigés contre ce motif glycanique. Nous avons utilisé des structures analogues de GM₁ type 1 comme ligands d'affinité, de façon à éliminer les anticorps qui auraient pu se former contre la phénéthylamine (se trouvant dans l'antigène d'immunisation comme bras de couplage).

a - Glycopeptides biantennés et désialylés comme ligands d'affinité

Le profil chromatographique de l'élution de 20 ml d'antisérum (obtenu après immunisation avec l'antigène GM₁ type 1-SAB) déposés sur une colonne de Sepharose substitué par les glycopeptides (biantennés et

désialylés) de la fraction IV de COHN, est représenté à la figure 21. Après lavage des protéines aspécifiques, les anticorps adsorbés au niveau du ligand glycopeptidique sont élués, soit de façon non spécifique par une modification de pH, soit de façon spécifique par l'haptène libre (GM₁ type 1 à 2 mg/ml dans le tampon PBS pH 7,4).

On remarque qu'une fraction protéinique très importante est retenue au niveau du ligand. Des anticorps, donc, reconnaissant de façon spécifique l'adsorbant ont été produits chez l'animal après immunisation. Ces anticorps sont spécifiques du motif glycanique biantenné et désialylé puisque leur élution est effective par une solution contenant l'haptène libre.

Des essais d'élution de ces anticorps par le galactose (qui est le sucre terminal non réducteur dans le motif biantenné désialylé) ou le lactose, ont été effectués mais ils se sont révélés négatifs. L'élution ultérieure de la colonne par le pH acide nous a permis d'obtenir cette fraction adsorbée. Il semble donc que les anticorps anti GM₁ type 1 soient dirigés contre l'ensemble du motif glycanique ou contre des parties glycaniques constituées de plus d'un monosaccharide.

b - Sérotransferrine utilisée comme ligand d'affinité

Le même profil chromatographique est obtenu avec une colonne de Sepharose substituée par la sérotransferrine humaine désialylée (Figure 22). Les anticorps adsorbés au niveau du support sont élués par une modification de pH. Ces anticorps semblent donc être spécifiques du glycanne biantenné de la sérotransferrine immobilisée, et se fixent au niveau de l'adsorbant. Au niveau de chaque chromatographie (sur glycopeptide ou sur la sérotransferrine) les fractions éluées sont rassemblées, neutralisées et enfin concentrées par dialyse sous vide et conservées à - 20°C.

Lors de la neutralisation on remarque un certain trouble qui apparaît et qui est dû à la précipitation des anticorps spécifiques. En effet, après concentration et centrifugation on obtient un précipité assez important, qui reste insoluble aux différents tampons et pH

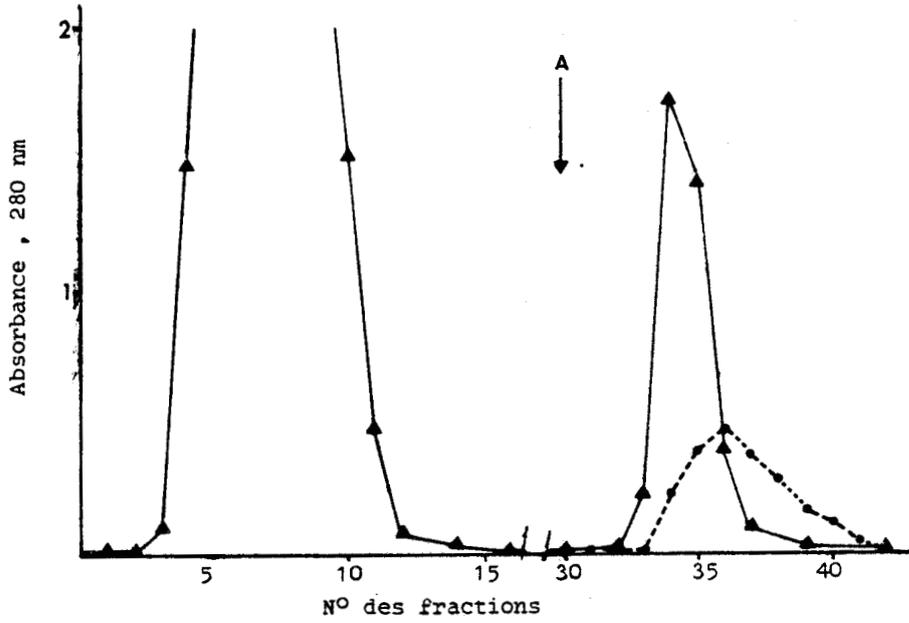


FIGURE 21 : Profil d' élution des anticorps anti-GM₁ de type 1 sur Sépharose-glycopeptides de la fraction IV de COHN (biantennés et désialylés). Les anticorps spécifiques sont désorbés par une modification de pH (▲—▲), ou par l'haptène libre GM₁ type 1, à une concentration de 2 mg / ml (•••••)(A).

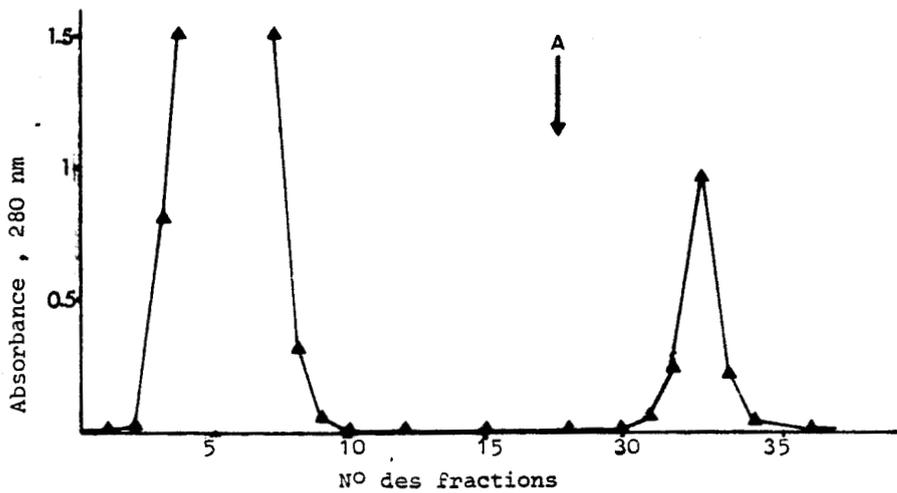


FIGURE 22 : 5 ml d'antisérum (anti-GM₁ type 1-SAB) sont déposés sur une colonne de Sepharose-sérotansferrine Humaine désialylée. Les anticorps adsorbés au niveau du ligand immobilisé sont élués par un pH acide(A).



légèrement basiques que nous avons testés. De ce fait, la concentration en anticorps dans le surnageant reste faible et les tests de spécificité difficiles.

L'étude de ces anticorps en immunoprécipitation révèle une faible réaction avec le conjugué SAB-GM₁ type 1 mais on observe une trace d'arc avec la SAB seule. Ces anticorps anti GM₁ type 1 semblent donc reconnaître le motif glycanique et réagissent avec lui. La très faible réaction observée avec la SAB semble indiquer que des anticorps conformationnels, dirigés contre la copule glucidique mais aussi contre la fraction protidique proche du glycanne couplé, ont été produits. Ces anticorps ont été éliminés par des réactions d'épuisement avec la SAB. Ces anticorps purifiés par chromatographie sur adsorbant spécifique donnent une réaction très faible en immunoprécipitation avec la sérotransferrine humaine désialylée. Ceci semble indiquer que ces anticorps anti GM₁ type 1 reconnaissent le glycanne désialylé de la transferrine et réagissent faiblement avec lui. Au cours de nos essais, nous n'avons pas pu obtenir une meilleure réaction en immunoprécipitation, la plus grande partie des anticorps spécifiques ayant précipité au cours de la purification.

D - CONCLUSION

A l'aide d'antigènes de synthèse porteurs de copules glycaniques et après immunisation, nous avons obtenu, chez l'animal, la production d'anticorps.

En utilisant comme ligand d'affinité la copule glycanique de l'antigène d'immunisation, nous avons purifié par chromatographie d'adsorption des anticorps dirigés contre ces motifs glycaniques. Les anticorps dirigés contre des déterminants antigéniques de groupe sanguin montrent une spécificité stricte reconnaissant respectivement les déterminants du lacto-N-tétraose : Gal(β1-3)GlcNAc... et du lacto-N-fucopentaose : Fuc(α1-2)Gal...

A l'aide de ces anticorps anti LNF_I nous avons mis en évidence, à la surface des hématies de groupe sanguin O⁺, les déterminants antigéniques H portés par l'extrémité terminale non réductrice Fuc(α1-2)Gal... Le complexe antigénique a été visualisé à la surface de l'hématie à l'aide d'anticorps anti lapins fluorescents.

Les anticorps préparés contre le glycanne GM₁ type 1 et purifiés par chromatographie sur un adsorbant glycopeptidique semblent être très instables. Ils donnent une réaction faible en immunoprécipitation contre la sérotransferrine désialylée. Il nous semble nécessaire d'envisager la mise au point de méthodes d'éluion dans des conditions plus douces de façon à obtenir les anticorps purifiés à l'état stable, et à effectuer les études de spécificité vis à vis de différents motifs glycaniques.

III - CONCLUSIONS

Des oligosaccharides isolés à partir du lait maternel et d'urines pathologiques ont été couplés à la sérum albumine bovine par deux méthodes, avec des taux de substitution qui varient de 5 à 33 molécules glycaniques fixées sur une molécule de SAB.

La méthode de couplage par diazotation et utilisant un bras de condensation semble nous donner de meilleurs résultats que ceux obtenus par amination réductive au cyanoborohydrure.

Les antigènes de synthèse ainsi préparés ont été utilisés pour l'immunisation. Les anticorps produits contre les structures glycaniques de ces composés ont été purifiés par chromatographie d'affinité à l'aide de ligands glycaniques correspondants.

Nous avons ainsi purifié par cette méthode des anticorps dirigés contre des déterminants antigéniques des groupes sanguins, ce qui nous a permis d'identifier à la surface des hématies les déterminants antigéniques H.

PURIFICATION DES GALACTOSYL TRANSFERASES PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - MATÉRIEL

A - LES GLYCOSYLNUCLEOTIDES

Le donneur activé UDP- $\{^{14}\text{C}\}$ Gal nous a été fourni par Radiochemical Centre, Amersham, Angleterre. Son activité spécifique est de 310 mCi/mmol.

L'UMP nous a été fourni par Sigma, comme le donneur activé UDP-Gal non radioactif.

B - SOURCE ENZYMATIQUE

Nous avons utilisé comme source enzymatique pour la galactosyltransférase soluble, d'une part le sérum humain et d'autre part le lait de Femme.

C - SUPPORT D'AFFINITE

Nous avons employé comme matrice d'affinité le Sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Suède) activé par le bromure de cyanogène.

D - ACCEPTEURS - CHOIX DES LIGANDS GLYCANNIQUES D'AFFINITE

Les structures oligosaccharidiques et glycopeptidiques qui ont été utilisées pour l'étude et la purification des galactosyltransférases, nous ont été fournies par Mlle G. SPIK (Professeur à l'USTL) et M. G. STRECKER (Maître de Recherches au C.N.R.S.).

Les différents monosaccharides (GlcNAc, Glc...) utilisés sont d'origine commerciale. L' α -lactalbumine bovine nous a été procurée par Sigma. La nature du monosaccharide se trouvant en position terminale non réductrice dans les chaînes glycaniques de ces composés, est déterminante pour le choix des accepteurs. Ainsi nous avons pris des structures ayant comme sucre terminal la N-acétylglucosamine qui est susceptible d'être substituée par un résidu de galactose.

Ces accepteurs immobilisés sur un support d'affinité vont constituer des adsorbants d'affinité pour la purification de l'activité enzymatique spécifique du motif glycanique et la preuve que les structures glycaniques sont bien le support de la spécificité de reconnaissance de l'enzyme.

En outre, la chromatographie sur adsorbant glycanique peut contribuer à déterminer, d'une part, la présence ou pas de plusieurs galactosyltransférases (spécifiques des différentes liaisons décrites au niveau des glycoprotéines), et d'autre part l'ordre de transfert des résidus galactosyl sur les différentes branches des glycannes de type N-acétyllactosaminique (BLANKEN et al. : 318). Nous avons donc dans un premier temps utilisé comme adsorbant d'affinité le cofacteur de la lactose synthétase, l' α -lactalbumine qui crée un complexe avec l'enzyme pour former le lactose en présence d'UDP-Gal. Plusieurs auteurs ont utilisé ce ligand d'affinité pour la purification de la lactose synthétase (ANDREWS : 319 ; TRAYER et HILL : 320).

La glycoprotéine du blanc d'oeuf de Poule (l'ovomucoïde) constitue un excellent accepteur pour la galactosyltransférase. En effet, il s'agit d'une glycoprotéine dont la partie glycanique représente 22,6 %

de la molécule, et est responsable de la microhétérogénéité observée (MONTREUIL : 321). Des études récentes dans notre laboratoire ont permis la préparation par H.P.L.C. de 17 fractions oligosaccharidiques obtenues par hydrazinolyse N-réacétylation et réduction de l'asialo-ovomucoïde (PAZ-PARENTE et al. : 322, 323 ; EGGE et al. : 324). Le tableau XIII représente les différentes chaînes glycaniques de l'ovomucoïde connues actuellement. La présence de résidus GlcNAc en position terminale non réductrice de ces multiples structures glycaniques, nous a incité à préparer par hydrolyse pronasique des glycopeptides (β -ovomucoïde) et à les immobiliser sur un support d'affinité, afin d'étudier la spécificité de la galactosyltransférase.

En outre, nous avons choisi un autre ligand d'affinité constitué de glycopeptides biantennés de la sérotransferrine humaine (SPIK et al. : 325) ou de la fraction IV de COHN. En effet ce glycopeptide biantenné constitue un modèle d'étude des activités enzymatiques, puisqu'il possède la structure glycanique de base commune à toutes les glycoprotéines de type N-acétyllactosaminique. Ces structures acceptrices ont été obtenues après hydrolyse pronasique des glycoprotéines, suivie de la désialylation et dégalactosylation des glycopeptides (voir Tableau XIV).

Les glycosidases nécessaires pour la préparation de ces accepteurs nous ont été fournies par Sigma (neuraminidase de *Clostridium perkingens* insolubilisée sur Sepharose 4B) et par M. S. BOUQUELET (Professeur à l'USTL) pour la β -galactosidase de la fève de Jack.

II - MÉTHODES

A - PREPARATION DES ACCEPTEURS

1) PREPARATION DES β -GLYCOPEPTIDES DE L'OVOMUCOÏDE

L'ovomucoïde a été préparé suivant la méthode de FREDERICQ et DEUTSCH (326). Les glycopeptides (β -ovomucoïde) sont obtenus par hydrolyse pronasique de l'ovomucoïde (MONSIGNY et al. : 327), suivie de plusieurs

TABLEAU XIII
CHAINES GLYCANNIQUES DE L'OVOMUCOIDE DE POULE
(YAMASHITA et al. -328-)

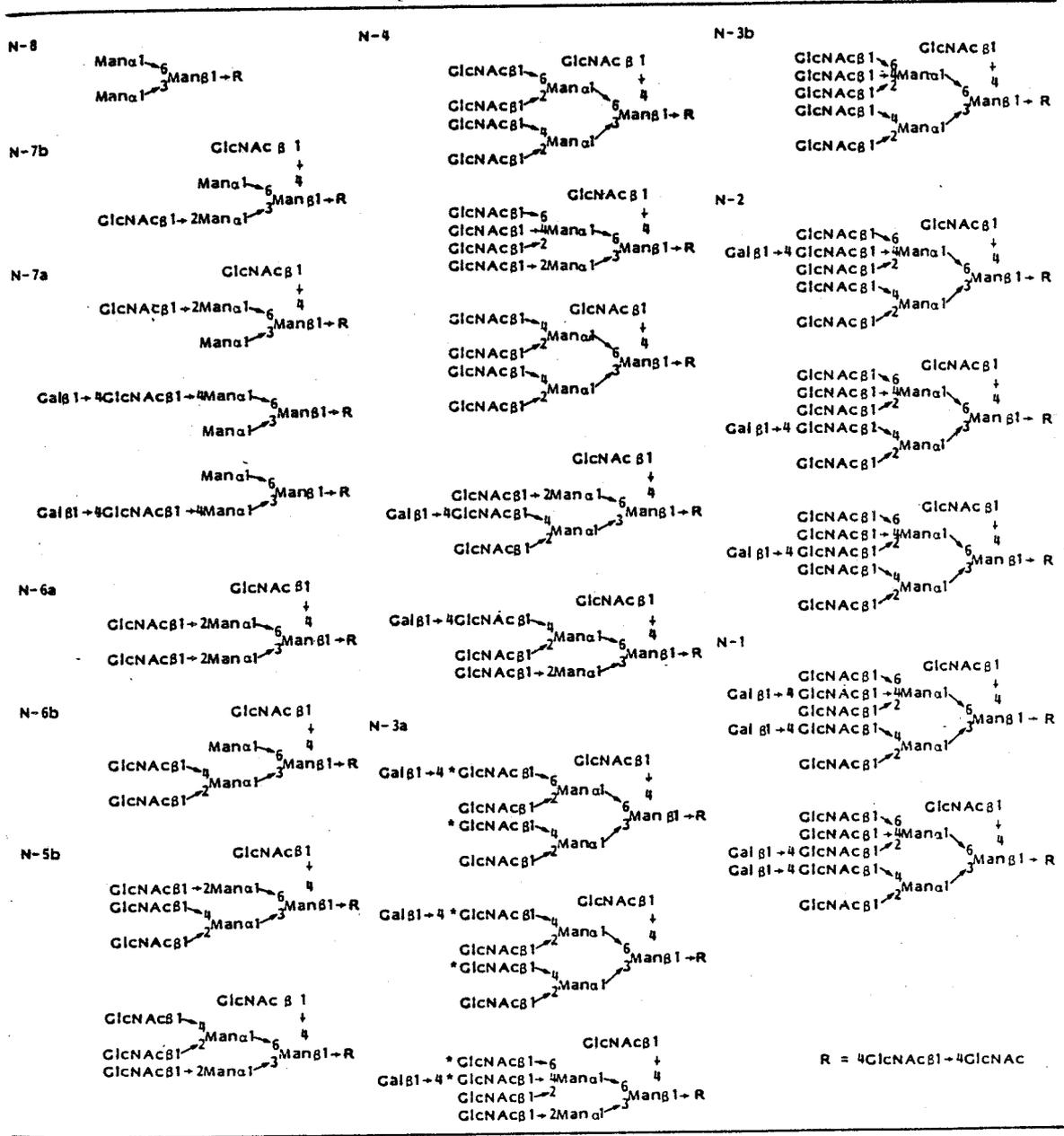


TABLEAU XIV : Structure des accepteurs oligosaccharidiques et glycopeptidiques natifs ou obtenus après désialylation et dégalactosylation

OLIGOSACCHARIDES OU GLYCOPEPTIDES	STRUCTURE
Disaccharides isolés du méconium	$\begin{array}{l} \text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal} \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{Gal} \end{array}$
Lactotriose (lacto-N-tétraose dégalactosylé)	$\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$
Oligosaccharide de Gangliosidose GM_1 type 1 dégalactosylé	$\begin{array}{l} \text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \left\{ \begin{array}{l} \\ \\ \end{array} \right. \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$
Glycopeptide biantenné de la fraction IV de COHN et de la sérot transferrine (désialylé et dégalactosylé)	$\begin{array}{l} \text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3) \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6) \end{array} \left\{ \begin{array}{l} \\ \\ \end{array} \right. \text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1)\text{Asn}$



étapes de purification. Un premier passage est effectué sur résines échangeuses d'ions de façon à éliminer l'acide trichloroacétique et les fragments peptidiques, suivi d'une chromatographie de tamisage moléculaire sur Sephadex G-25. L'étape finale est constituée par un fractionnement sur résines échangeuses d'ions (DOWEX 50 x 2 ; 200-400 mesh) pour séparer les β -glycopeptides des α et γ , à l'aide d'un gradient de formiate de pyridine. Environ 750 mg de β -ovomucoïde sont préparés à partir de 20 g d'ovomucoïde total.

Les glycopeptides sont repérés durant la purification par la réaction au phénol sulfurique de DUBOIS et al. (329). La composition molaire en monosaccharides a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et trifluoroacétylation selon le procédé de ZANETTA et al. (330).

2) PREPARATION DE GLYCOPEPTIDES BIANTENNES, DESIALYLES ET DEGALACTOSYLES

Les glycopeptides de la sérotransferrine humaine et de la fraction IV de COHN sont obtenus après hydrolyse pronasique suivie d'une purification par passage sur résines échangeuses d'ions, de désialylation et de dégalactosylation :

a - Désialylation

- Désialylation chimique : l'acide sialique est éliminé par hydrolyse acide en présence d'acide trichloroacétique (ou d'acide sulfurique) 0,1 N pendant 1 heure à 80°C. La solution est neutralisée et les glycopeptides sont purifiés sur résine échangeuse d'anions DOWEX 1 x 4 (de façon à éliminer l'acide sialique), et ensuite en chromatographie de tamisage moléculaire sur Biogel P2.

- Désialylation enzymatique par la neuraminidase de clostridium perfringens immobilisée sur Sepharose 4B. Les glycopeptides dissous dans le tampon citrate (citrate de sodium 0,1 M pH 5,1 ; 0,02 % azide de sodium), sont recyclés sur la colonne de neuraminidase pendant 48 heures à 37°C.

b - Dégalactosylation

La dégalactosylation des glycopeptides désialylés est effectuée par la β -galactosidase de la fève Jack immobilisée ou soluble dans un tampon citrate 0,1 M pH 5 ; 0,02 % azide de sodium. Les glycopeptides dégalactosylés sont obtenus après purification en chromatographie de tamisage moléculaire sur une colonne de Biogel P4. Environ 1,5 unités de galactosidase sont nécessaires pour dégalactosyler environ 20 μ mol de glycopeptides ou d'oligosaccharides.

A chaque étape de préparation, les glycopeptides sont lyophilisés et leur composition molaire en sucre est vérifiée par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et trifluoroacétylation suivant la méthode de ZANETTA (331).

3) PREPARATION DU LACTOTRIOSE ET DU GM₁ TYPE 1 DEGALACTOSYLE

Le lacto-N-tétraose (Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc) a été dégalactosylé par la β -galactosidase de la fève Jack immobilisée. Le lactotriose obtenu (GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc) a été purifié en chromatographie de tamisage moléculaire sur Biogel P2 et sa composition molaire en sucre est déterminée par la chromatographie en phase gazeuse.

Le même procédé a été utilisé pour l'obtention de l'oligosaccharide GM₁ de type 1 dégalactosylé.

B - IMMOBILISATION DES LIGANDS

L' α -lactalbumine et les glycopeptides ont été fixés au Sepharose 4B suivant la méthode décrite par CUADRE CASAS (332). Le Sepharose 4B préalablement lavé à l'eau distillée est tamponné dans une solution de carbonate de potassium 2 M avant d'être activé par le bromure de cyanogène fraîchement préparé (50 mg de BrCN/ml de gel à activer). L'activation est effectuée à + 4°C avec une agitation

continue pendant 2 minutes. Le gel est ensuite lavé par de l'eau distillée sur verre fritté, et remis en suspension dans une solution de bicarbonate de sodium 0,5 M dans laquelle sont dissous les glycopeptides à coupler. Le ligand et le Sepharose sont mélangés et l'agitation est poursuivie pendant 24 h à + 4°C. Afin d'éviter les phénomènes d'échange d'ions, les groupements fonctionnels activés et encore libres sont bloqués par le glyocolle 1 M, ou l'éthanolamine 1 M. Le Sepharose substitué est lavé successivement par une solution de bicarbonate de sodium 0,1 M, du NaCl M et de l'eau distillée avant d'être équilibré dans le tampon de chromatographie. L' α -lactalbumine et les glycopeptides qui n'ont pas été fixés sur le support sont récupérés et purifiés par chromatographie de tamisage moléculaire ou dialyse pour l' α -lactalbumine. Par déduction on détermine ainsi la quantité de ligand fixé sur le Sepharose 4B.

C - MESURE DE L'ACTIVITE GALACTOSYLTRANSFERASIQUE ET IDENTIFICATION DES PRODUITS FORMES LORS DE LA REACTION DE GLYCOSYLATION

1) CONDITIONS OPTIMALES D'INCUBATION

L'incubation standard est réalisée dans les conditions suivantes pour un volume final de 50 μ l :

- 30 μ l de tampon cacodylate 30mM pH 7,4 contenant du $MnCl_2$ 30mM et l'accepteur (100 à 300 μ g).
- 5 μ l de précurseur UDP- $\{^{14}C\}$ Gal 0,5 μ M (10.000 c.p.m.)
- 15 μ l de solution enzymatique à doser.

Les préparations sont incubées à 37°C pendant 60 minutes. Un minimum d'incubation de 30 min est suffisant mais un transfert maximal est obtenu à 60 minutes. Le tampon cacodylate est préféré au tampon Tris, il nous donne en effet des résultats meilleurs à une concentration de 30 mM avec un maximum d'activité dans une zone de pH de 7 à 8. La concentration en accepteur dépend du nombre de résidus N-acétylglucosamine non substitués. Nous obtenons une vitesse maximale de fonctionnement de l'enzyme

avec une concentration en UDP-Gal de 0,5 μ M et des concentrations en accepteur de 100 μ g pour le β -ovomucoïde et le ganglioside GM₁ n° 1, et de 200 μ g pour l'ovomucoïde et les glycopeptides désialylés et dégalactosylés. Les ions Mn²⁺ sont essentiels pour le fonctionnement de l'enzyme.

2) DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE LIEE AUX ACCEPTEURS MACROMOLECULAIRES

La réaction de transfert est arrêtée par addition de 0,5 ml d'acide phosphotungstique à 5 % en HCl 2 M, suivant la technique décrite par CACAN et al. (333). Le matériel acido-précipitable est recueilli sur filtre en fibre de verre (Whatman GFC) et lavé abondamment par de l'acide trichloroacétique 5 % en H₂O, par de l'eau et enfin par de l'éthanol absolu.

La radioactivité retenue sur le filtre est déterminée en scintillation liquide dans un mélange scintillant à base de xylène (Lipoluma, Lumac, France).

3) IDENTIFICATION DES PRODUITS RADIOACTIFS EN CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Cette méthode est utilisée pour suivre la glycosylation d'accepteurs micromoléculaires comme les oligosaccharides et les glycopeptides. Dans le cas d'accepteurs macromoléculaires, elle permet de connaître le taux de dégradation du précurseur glycosylnucléotidique (UDP-¹⁴C}Gal). Après incubation, la réaction est arrêtée dans la glace, les échantillons sont déposés sur des feuilles de papier Whatman 3 et soumis à une chromatographie descendante dans le système solvant A ou B. Après séchage, le chromatogramme est découpé en bandes de 1 x 5 cm et la radioactivité est déterminée en scintillation liquide.

Dans tous les cas, un témoin oligosaccharidique est déposé puis, après chromatographie, ce témoin est révélé à l'oxalate d'aniline (spécifique des sucres), permettant ainsi de situer la migration du produit formé lors de la réaction de glycosylation.

Les systèmes solvants utilisés sont les suivants :

- Système solvant A : (FISHER et al. : 334)
Pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/eau (5/5/1/3 en volume)
Temps de migration : 14 heures
- Système solvant B :
Butanol/acide acétique/eau (2/1/1 en volume)
Temps de migration : 63 heures.

Dans le cas des oligosaccharides l'incubat additionné de 0,5 ml d'eau froide est appliqué sur une colonne de DOWEX 1 x 8 préparée dans une pipette Pasteur. Les tubes d'essais sont lavés par 0,5 ml d'eau distillée froide, transférée sur la colonne qui est finalement éluée par 1 ml d'eau distillée. Les éluats sont concentrés et chromatographiés comme décrit précédemment.

4) CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

C'est une méthode simple qui nous permet de suivre la glycosylation de micromolécules dont on dispose en faible quantité. Le solvant de migration est le : éthanol/butanol/acide acétique/pyridine/eau (100/10/3/10/30) ou le butanol/pyridine/eau (2/1/1). Les sucres peuvent être révélés par l'orcinol sulfurique.

5) TECHNIQUE DE METHYLATION

Les produits de la glycosylation peuvent être étudiés dans un second temps par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse. Par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et trifluoroacétylation on peut déterminer la composition molaire en monosaccharides du produit nouvellement formé.

L'identification de la liaison formée par l'addition du galactosé au niveau de l'accepteur est effectuée en spectrométrie de masse. La méthylation est réalisée selon la méthode d'HAKOMORI (335). Les

dérivés méthylés sont ensuite méthanolysés et peracétylés. Leur analyse est effectuée en chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse selon le protocole décrit par FOURNET et al. (336).

Après réduction (par le BD_4Na) et méthylation, les échantillons sont extraits par le chloroforme, et chromatographiés sur colonne de Silica-Gel. Les produits méthylés sont élués par le mélange chloroforme/méthanol (9 : 1 en volume).

D - PREPARATION DE LA GALACTOSYLTRANSFERASE

Nous avons employé différentes méthodes conventionnelles (comme la chromatographie de tamisage moléculaire ou la précipitation au sulfate d'ammonium), et la chromatographie d'affinité pour la préparation de l'activité enzymatique. Pour le lait de Femme, la première étape de préparation de l'enzyme est constituée par la délipidation et l'élimination de la caséine.

1) SUR ULTROGEL ACA 44

Le sérum humain préalablement concentré 5 fois (cellule Amicon UM 10 par dialyse sous pression) et le lait de Femme délipidé et décaséiné (lactosérum) sont chromatographiés sur une colonne de tamisage moléculaire Ultrogel ACA 44. La colonne est préalablement équilibrée dans le tampon Tris 20 mM pH 7,4, NaCl M, MgCl_2 10 mM et 1 mM de β -mercapto-éthanol.

2) PRECIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM

Il s'agit du procédé de fractionnement du lait maternel, mis au point par MONTREUIL et al. (337) et modifié par DESCAMPS (338). Le lactosérum obtenu après délipidation et élimination de la caséine subit une série de précipitations au sulfate d'ammonium. Les précipités P_1 et P_2 sont obtenus à 33 % de saturation en sulfate d'ammonium et respectivement aux pH 7 et 4,6. A 50 % de saturation, on obtient les fractions P_3 (pH 7)

et P₄ (pH 4,6). A 75 % de saturation et au pH 7 et 4,6 on a respectivement les précipités P₅ et P₆. Le fractionnement est terminé par une précipitation à 100 % en sulfate d'ammonium et à des pH 7 (fraction P₇) et 4,6 (fraction P₈). Les précipités sont redissous dans une solution de NaCl 0,15 M, dialysés et lyophilisés.

3) CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

La purification finale de la galactosyltransférase est effectuée par la chromatographie d'affinité sur des colonnes de Sepharose 4B conjugué à l' α -lactalbumine, au glycopeptide β de l'ovomucoïde et aux glycopeptides biantennés désialylés et dégalactosylés. Toutes les étapes chromatographiques sont effectuées à + 4°C.

a - Purification sur Sepharose- α -lactalbumine selon ANDREWS (339)

La lactose synthétase s'associe spécifiquement avec l' α -lactalbumine et est retardée au niveau de l'adsorbant d'affinité. Nous avons utilisé une colonne de 2 x 25 cm préalablement équilibrée au tampon de lavage. Le sérum humain (50 ml) est concentré 5 fois dans une cellule d'ultrafiltration, avec une membrane Diaflo UM 30 (Amicon Corporation), et tamponné dans la solution de la chromatographie avant d'être déposé au support d'affinité. La fraction P₂ du lait de Femme (200 mg) est reprise par 2 ml de tampon de lavage avant d'être déposée sur la colonne. La colonne est ensuite rincée par le tampon de lavage suivant :

Tampon Tris 30 mM, pH 7,4 contenant du $MnCl_2$ 10 mM, de la N-acétylglucosamine 20 mM et de β -mercaptoéthanol 1 mM.

Les fractions (5 ml) sont collectées et le lavage chromatographique est poursuivi jusqu'au retour de la densité optique mesurée à l'U.V. à 280 nm, à la ligne de base. Ceci indiquant que l'essentiel des protéines contaminantes ont été éliminées de la colonne. L'élution de l'activité enzymatique adsorbée est obtenue par le même tampon mais en absence de la N-acétylglucosamine. L'activité enzymatique est mesurée comme décrit précédemment en mesurant le nombre de c.p.m. d'UDP-¹⁴C}Gal transférés sur l'ovomucoïde à une concentration de 300 μ g/test. L'ovomucoïde est précipité suivant la méthode à l'acide phosphotungstique.

b - Purification de la galactosyltransférase sur Sepharose-accepteur spécifique

Nous avons utilisé comme ligands spécifiques, d'une part le β -glycopeptide de l'ovomucoïde de Poule, et d'autre part les glycopeptides biantennés (désialylés et dégalactosylés) de la fraction IV de COHN et de la sérotransferrine humaine.

Les colonnes d'affinité sont équilibrées dans le tampon Tris/HCl 30 mM, pH 7,4 contenant 25 mM de $MnCl_2$ et 1 mM d'uridine monophosphate (UMP).

Le sérum (concentré et dialysé contre le tampon de colonne) ou la fraction P₂ du lait de Femme (reprise par le même tampon) est déposé sur la colonne d'affinité (1,5 x 7 cm). Le support est ensuite rincé par le tampon de lavage pour éliminer les protéines inertes et non affines, et la galactosyltransférase est éluée par le tampon Tris/HCl 30 mM pH 7,4, en absence d'ions Mn^{2+} et d'UMP. Cette élution peut être effectuée de façon plus rapide en présence de 25 mM d'EDTA. L'élution est suivie en mesurant la densité optique à 280 nm pour les protéines inertes. L'activité enzymatique est mesurée en utilisant l'accepteur glycopeptidique correspondant. L'identification des produits radioactifs est effectuée par chromatographie sur papier.

Les fractions actives sont rassemblées, concentrées par ultrafiltration avec des membranes Diaflo PM 10, dialysées contre le tampon Tris/HCl 30 mM contenant des ions Mn^{2+} et conservées enfin à - 20°C. Il est préférable d'ajouter, dans les préparations enzymatiques purifiées, de la sérum albumine bovine (1 mg/ml) de façon à préserver l'activité de la galactosyltransférase, en créant un environnement protéinique.

Les colonnes d'affinité peuvent être utilisées plusieurs fois pour la purification de l'enzyme. Après chaque utilisation le support d'affinité est lavé par du tampon Tris/HCl 0,1 M pH 8,5 contenant du NaCl M, et ensuite équilibré dans le tampon de chromatographie additionné d'azide de sodium à 0,02 % pour conservation des adsorbants.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

A - PREPARATION D'ACCEPTEURS SOLUBLES ET IMMOBILISES

1) COMPOSITION MOLAIRE EN SUCRE DES ACCEPTEURS

La composition molaire des différents accepteurs oligosaccharidiques, glycoprotéiniques natifs ou préparés après désialylation et dégalactosylation est indiquée au Tableau XV. Ces désialylation et dégalactosylation efficaces nous ont permis de disposer de composés possédant des résidus N-acétylglucosaminiques non substitués pouvant ainsi constituer d'excellents accepteurs pour la galactosyltransférase.

2) LIGANDS IMMOBILISES

En vue d'appliquer la chromatographie d'affinité à la purification de la galactosyltransférase, nous avons synthétisé des ligands qui constituent des substrats spécifiques (accepteurs) ou des cofacteurs comme l' α -lactalbumine. Chaque ligand a été couplé au Sepharose activé au BrCN par l'intermédiaire de la fonction amine libre de son acide aminé.

Le procédé de couplage utilisé nous a donné des adsorbants possédant de 1,5 à 5 mg de ligand immobilisé par ml de gel activé. Généralement, 60 à 70 % du ligand additionné initialement est couplé au Sepharose 4B. Les résultats de ces couplages sont représentés au Tableau XIV. La capacité de l'adsorbant est fonction, d'une part, de la quantité de ligand immobilisé, et d'autre part, de l'affinité de la transférase pour ce dernier.

TABLEAU XV

COMPOSITION MOLLAIRE EN MONOSACCHARIDES DES ACCEPTEURS OLIGO-SACCHARIDIQUES ET GLYCOPEPTIDIQUES APRES DEGALACTOSYLATION.

ACCEPTEURS	Gal	Man	GlcNAc	NeuAc	Glc
β -ovomucoïde	1,0	5,0	10	-	-
Lactotriose	1,0	-	1,0	-	0,95
Oligosaccharide GM ₁ type 1	-	3,0	3,0	-	-
Glycopeptides de la					
- sérotransferrine	0,01	3,0	3,9	-	-
- F IV de COHN	0,05	3,0	3,85	-	-

TABLEAU XVI

CONCENTRATION DES LIGANTS IMMOBILISES SUR LE SEPHAROSE

LIGAND	Concentration en mg/ml de gel
α -lactalbumine	4 à 5
β -ovomucoïde	3,5
Glycopeptides de la sérotransferrine ou de la F IV de COHN	1,5 à 2



B - PREPARATION DE LA GALACTOSYLTRANSFERASE

1) PAR CHROMATOGRAPHIE DE TAMISAGE MOLECULAIRE

Une première étape de purification de l'enzyme a été réalisée en chromatographie de tamisage moléculaire sur une colonne d'Ultrogel ACA 44 équilibrée dans un tampon Tris/HCl 20 mM pH 7,4, NaCl M, MgCl₂ 10 mM et 1 mM en β-mercaptoéthanol. Les profils d'éluion de la galactosyltransférase du lactosérum et du sérum humain sont représentés à la Figure 23.

La chromatographie de tamisage moléculaire ne semble pas pouvoir séparer de façon satisfaisante la fraction active de la fraction inerte. Dans le cas du sérum, l'activité enzymatique est éluée avec les protéines inertes. Cette méthode nous permet néanmoins d'éliminer une majeure partie des protéines contaminantes, et d'obtenir une fraction enzymatique purifiée environ 10 fois pour le lait de Femme (la délipidation et l'élimination de la caséine constituant une 1ère étape de préparation).

Les fractions actives (du sérum ou du lactosérum) ont été rassemblées et rechromatographiées ultérieurement en affinité sur l'adsorbant α-lactalbumine-Sepharose (voir Figure 26). L'enzyme adsorbée sur le ligand d'affinité a été séparée des protéines inertes. Ainsi la chromatographie de tamisage moléculaire sur ACA 44 peut constituer une première étape de purification de la galactosyltransférase (essentiellement pour le lactosérum), l'étape finale étant la chromatographie d'affinité.

2) PREPARATION DE LA TRANSFERASE PAR PRECIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM

a - Fractionnement du lactosérum

Le lait de Femme préalablement délipidé et décaséiné a été fractionné à différents taux de saturation en sulfate d'ammonium et à des pH différents. Après dialyse de chaque fraction pour éliminer le sulfate d'ammonium, nous avons testé l'activité enzymatique présente. Elle se trouve essentiellement dans la fraction P₂ (au 1/3 de saturation à pH 4,6).

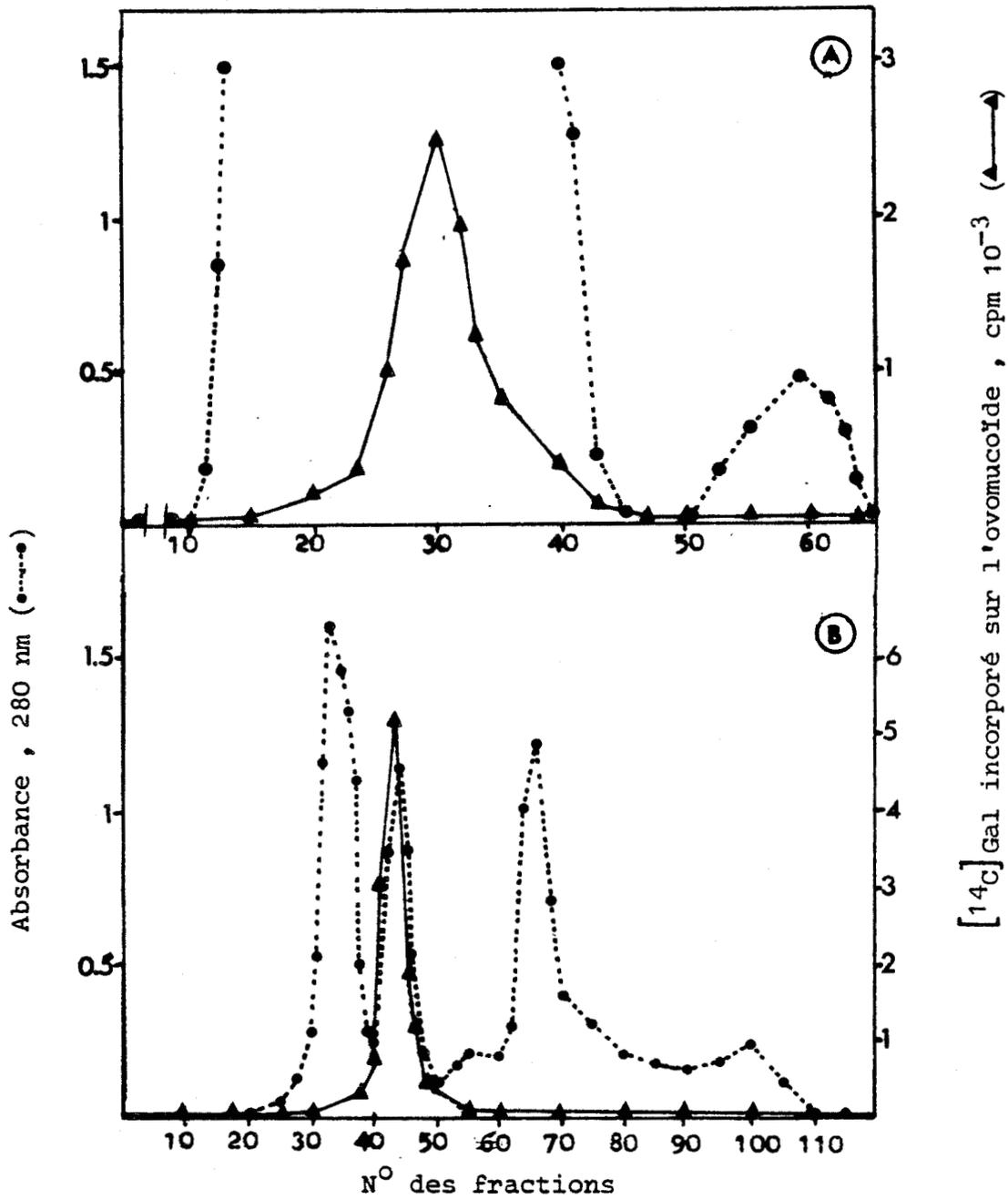


FIGURE 23 : Chromatographie de tamisage moléculaire sur ACA₄₄ du sérum Humain (A) et du lactosérum de Femme (B). L'élution est réalisée dans un tampon Tris / HCl 20 mM pH 7,4 NaCl M, MgCl₂ 10 mM.



L'enzyme est probablement complexée avec une autre protéine abondante dans cette fraction : l' α -lactalbumine. Nous obtenons ainsi une fraction très riche en activité galactosyltransférase mais un passage éventuel (en chromatographie de tamisage moléculaire) sur une colonne de Sephadex G-75 peut nous permettre d'éliminer une partie des protéines inertes encore présentes et surtout l' α -lactalbumine (Figure 24).

Le fractionnement au sulfate d'ammonium constitue une étape importante de purification puisque nous obtenons, avec un bon rendement, une fraction enzymatique enrichie et qui va constituer notre source enzymatique pour la purification en chromatographie d'affinité.

b - Fractionnement du sérum humain

Environ 250 ml de sérum humain ont été fractionnés au sulfate d'ammonium. Les activités spécifiques pour chaque fraction sont indiquées au Tableau XVII.

On remarque que l'activité enzymatique ne se trouve pas dans une fraction homogène mais elle est répartie surtout dans les trois premières fractions. L'activité galactosyltransférase est purifiée au maximum 2 fois par ce fractionnement (cas de la fraction P₁ et P₃). On peut toutefois remarquer une différence d'affinité entre les différents accepteurs utilisés. Le résultat montre que l'enzyme a une plus grande affinité pour les accepteurs biantennés que pour le β -glycopeptide de l'ovomucoïde ou qu'il s'agit de différents enzymes. Au niveau des fractions P₄ et P₅, cette affinité semble être inversée au profit du β -ovomucoïde. Il serait donc intéressant de pouvoir ultérieurement vérifier l'affinité de ces fractions pour des accepteurs glycaniques bien définis afin de déterminer la possibilité d'existence de galactosyltransférases spécifiques.

L'activité spécifique de chaque fraction est calculée à partir de l'équation suivante (exprimée en unités par ml) :

$$\text{Activité spécifique} = \frac{N^b \text{ de } \mu\text{Ci précurseur}^* \times \text{cpm transférés}}{\text{cpm précurseur}^* \text{ de départ}} \times N^b \text{ nM produit départ} \times \frac{1}{t} \times \frac{10^3}{\{C\}}$$

t = temps d'incubation

{C} = concentration en protéines (en mg/ml)

TABLEAU XVII

ACTIVITE SPECIFIQUE DES FRACTIONS OBTENUES APRES PRECIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM DU SERUM HUMAIN. EXPRIMEE EN UNITES PAR MG DE PROTEINES $\times 10^{-4}$.

FRACTION ENZYMATIQUE	ACCEPTEURS DEGALACTOSYLES			
	β -ovomucoide	Glycopeptides transferrine	GM ₁ type 1	Rapport act.sp. β -ovo/transfer.
Sérum total	1,55	2,7	2,3	0,57
P ₁	2,3	5,25	5,1	0,44
P ₂	1,9	2,15	2,25	0,88
P ₃	1,9	4,26	4,6	0,44
P ₄	0,7	0,21	0,25	3,1
P ₅	2,4	0,54	0,8	4,4



C - PURIFICATION DE LA GALACTOSYLTRANSFERASE PAR CHROMATOGRAPHIE
D'AFFINITE

Nous avons utilisé la chromatographie d'affinité pour la purification de la galactosyltransférase à l'aide, d'une part du cofacteur (α -lactalbumine) de la lactose synthétase, et d'autre part des ligands glycopeptidiques.

1) ALPHA-LACTALBUMINE

La chromatographie d'affinité utilisant l'interaction biospécifique entre la lactose synthétase et son cofacteur, l' α -lactalbumine, a été souvent décrite pour la purification de cette transférase (TRAYER et HILL : 340 ; ANDREWS : 341). La fraction enzymatique à purifier est déposée sur une colonne de Sepharose substitué par l' α -lactalbumine.

La figure 25 représente le profil chromatographique de la purification de la galactosyltransférase du sérum humain, sur une colonne de Sepharose- α -lactalbumine. Le même diagramme d'élution est obtenu avec la galactosyltransférase de la fraction P₂ du lait de Femme sur ce même adsorbant ou de la fraction active purifiée sur Ultrogel Aca 44 (Figure 26).

Quand la préparation enzymatique est appliquée sur la colonne d'affinité en présence de la N-acétylglucosamine à pH neutre, les protéines inertes sont exclues de la colonne et la galactosyltransférase est adsorbée totalement sur la colonne. Lorsque la N-acétylglucosamine est enlevée du tampon de lavage, l'activité enzymatique est éluee et aucun pic protéique n'est observé en U.V. à 280 nm. L'activité spécifique est mesurée en suivant le taux d'incorporation de l'UDP-¹⁴C Gal sur l'ovomucoïde.

Quand la fraction enzymatique de départ est appliquée sur le support d'affinité à pH neutre et en absence de N-acétylglucosamine, l'activité enzymatique n'est pas adsorbée. Pour que l'adsorption de la galactosyltransférase soit effective, il faut nécessairement, dans le tampon de lavage, la présence de l'accepteur. La N-acétylglucosamine peut être substituée par le glucose.

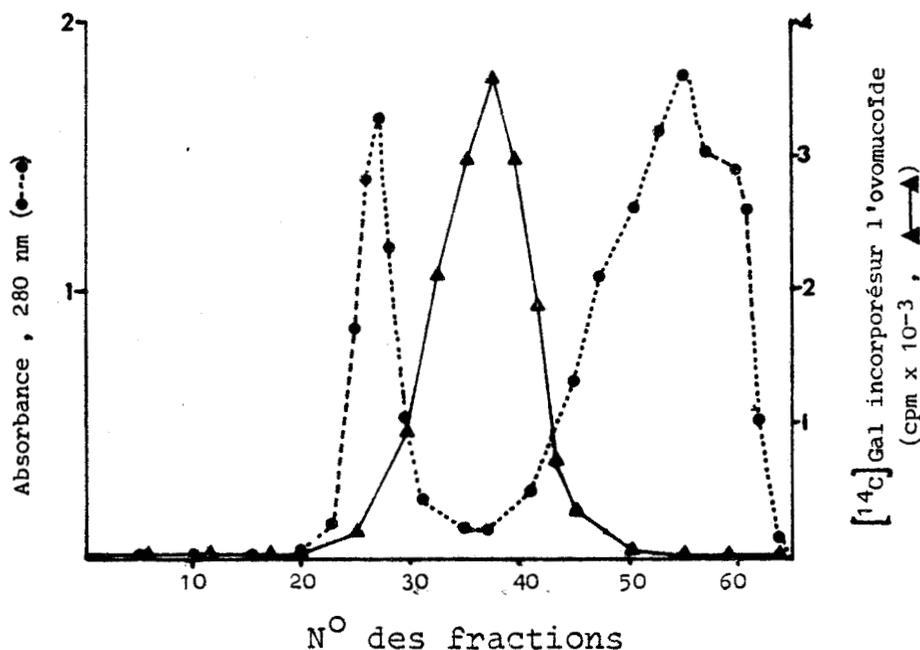


FIGURE 24 : Chromatographie de tamisage moléculaire de la fraction P₂ du lactosérum de Femme sur Sephadex G-75.

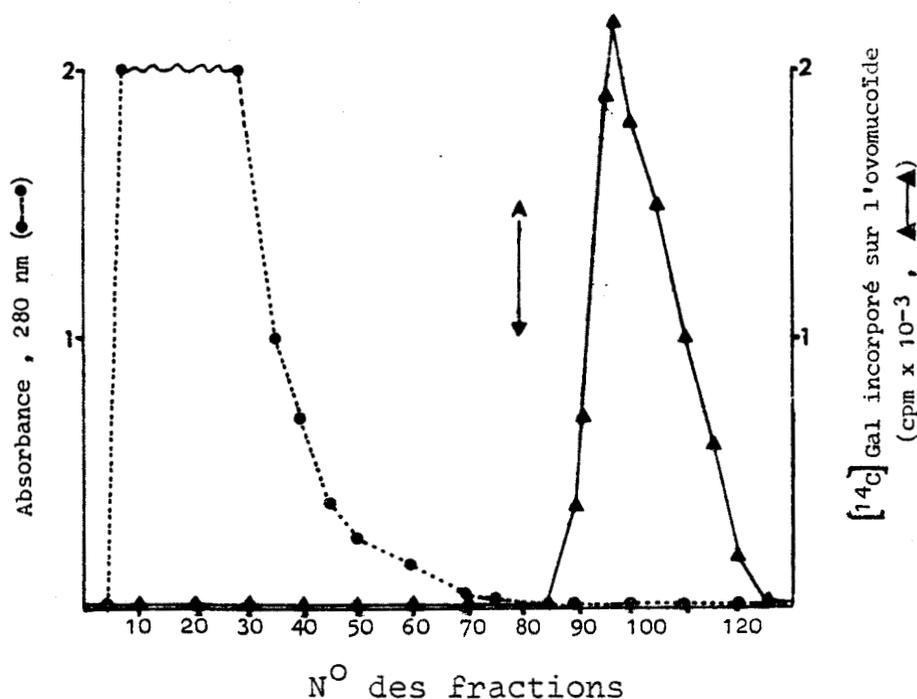


FIGURE 25 : Profil d'élution du sérum Humain sur Sepharose- α -lactalbumine dans un tampon Tris contenant de la N-acétylglucosamine. La fraction active est obtenue en enlevant la N-acétylglucosamine du tampon (A).



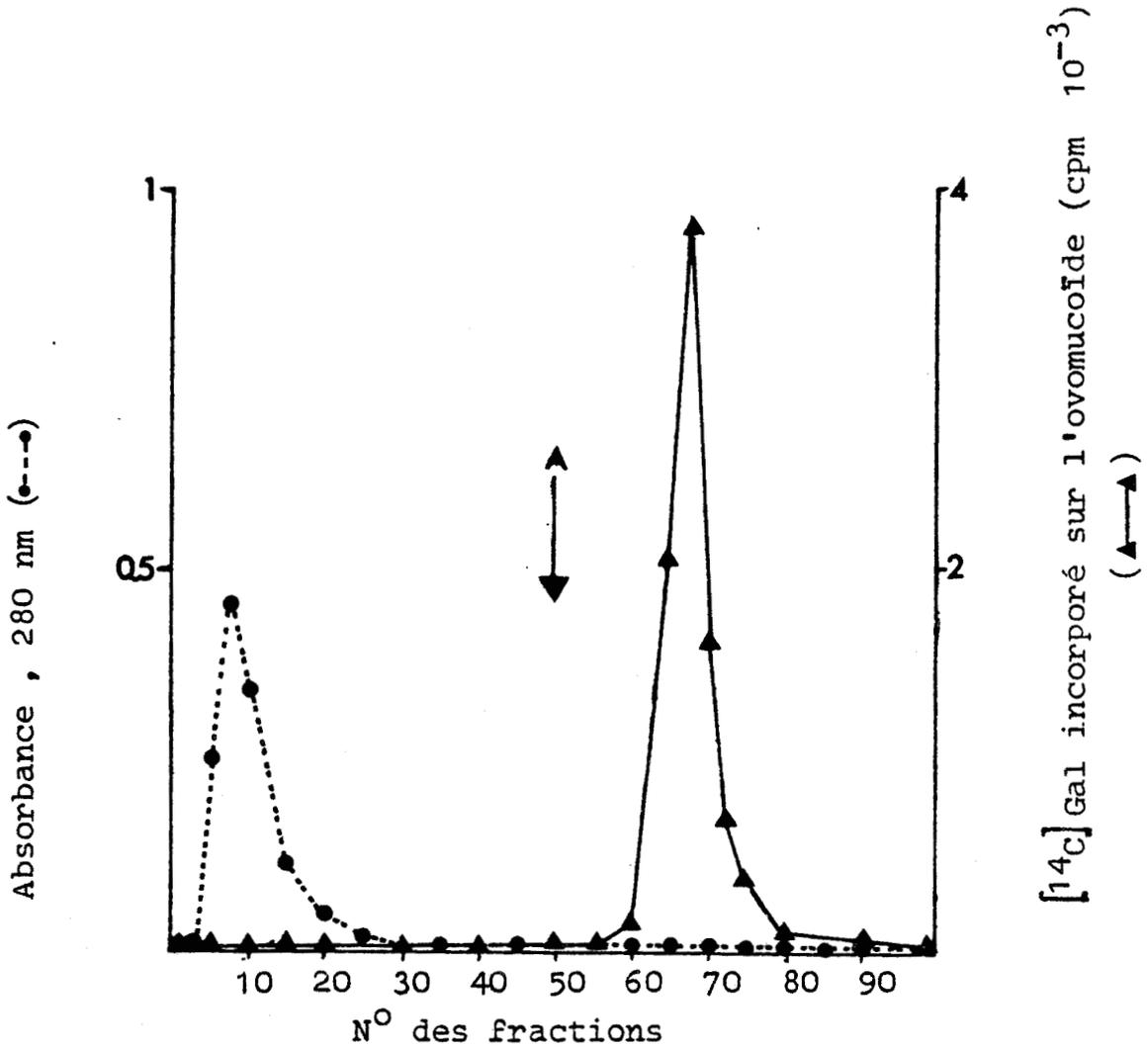


FIGURE 26 : Profil d'élution de la fraction active du lait de Femme (préalablement purifiée sur ACA₄₄, voir la figure 23B) sur colonne d'affinité Sépharose- α -lactalbumine. L'élution de l'enzyme est effective en absence de la N-acétylglucosamine (A).



Ainsi, l'observation faite en chromatographie d'affinité que la galactosyltransférase se fixe sur le conjugué α -lactalbumine-Sepharose 4B, est une évidence directe du fait qu'un complexe stable est formé entre les deux protéines. Ce complexe n'est effectivement stabilisé qu'en présence d'un accepteur (GlcNAc). L'absence du monosaccharide dans le tampon d'élution est suffisante pour diminuer l'affinité de l'enzyme pour l' α -lactalbumine immobilisée et obtenir ainsi son élution.

Les ions Mn^{++} et l'UMP créent un retard d'élution de l'enzyme mais ne semblent pas être nécessaires pour son adsorption. Par cette adsorption spécifique sur α -lactalbumine on obtient une fraction enzymatique séparée des protéines inertes. Cependant, en électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec SDS, on remarque la présence d' α -lactalbumine qui peut être éliminée par une 2ème chromatographie d'affinité sur le même ligand ou un autre.

2) β -GLYCOPEPTIDE DE L'OVOMUCOÏDE

L'ovomucoïde de l'oeuf de Poule contient une variété d'oligosaccharides branchés ayant en majorité des résidus N-acétylglucosaminiques en position terminale non réductrice, et sert d'accepteur pour les activités N-acétylglucosaminide (β 1-4) galactosyltransférasiques. Nous nous sommes ainsi attaché à l'aide des β -glycopeptides (obtenus après hydrolyse pronasique de cette glycoprotéine) immobilisés, de purifier l'activité galactosyltransférasique affine de ce type de substrats glycaniques et de définir sa spécificité vis-à-vis de différents accepteurs.

a - Purification de la galactosyltransférase sérique

Ni le fractionnement au sulfate d'ammonium, ni la chromatographie de tamisage moléculaire sur Ultrogel AcA 44 ne nous ont permis d'obtenir à partir du sérum une fraction enzymatique enrichie. Nous avons donc utilisé comme matériel de départ le sérum total concentré.

La Figure 27A représente le profil chromatographique de la purification de la galactosyltransférase sérique sur Sepharose- β -ovomucoïde. L'activité enzymatique est totalement adsorbée au niveau de la colonne d'affinité alors que la totalité des protéines inertes est exclue. La colonne est abondamment rincée sans que l'activité enzymatique ne se détache. Les études préliminaires effectuées nous indiquent que l'ion Mn^{++} est absolument nécessaire ainsi que l'UMP pour l'adsorption effective de la galactosyltransférase. Des résultats identiques sont obtenus quand l'UMP est remplacé par l'UDP, par contre les ions Mn^{++} ne peuvent être remplacés par les ions Mg^{++} .

Ceci indique la formation de complexes entre l'enzyme, l'accepteur spécifique et le donneur. Ces complexes ne sont stabilisés qu'en présence d'ions Mn^{++} nécessairement. L'élution de la galactosyltransférase adsorbée est obtenue en enlevant du tampon de lavage les ions Mn^{++} et l'UMP. La présence d'EDTA dans le tampon favorise cette élution.

Il est donc possible à l'aide d'adsorbants constitués de ligands glycaniques (β -ovomucoïde) et en une seule étape, la chromatographie d'affinité, d'obtenir la purification de la galactosyltransférase sérique. En outre, il s'agit d'une méthode beaucoup plus spécifique (puisque'on utilise comme ligand d'affinité un accepteur) que l'adsorbant α -lactalbumine ou l'UDP-hexanolamine utilisés par différents auteurs (SMITH et BREW : 342).

b - Galactosyltransférase du lait de Femme

La préparation enzymatique (P_2) obtenue après fractionnement du lait de Femme au sulfate d'ammonium, est déposée sur le support d'affinité préalablement équilibré dans le tampon contenant des ions Mn^{++} et de l'UMP. L'élution de l'enzyme adsorbée est effective en absence d'ions Mn^{++} et d'UMP dans le tampon d'élution.

Le profil chromatographique obtenu est représenté à la Figure 27B. Le matériel inerte absorbant en U.V. à 280 nm est totalement

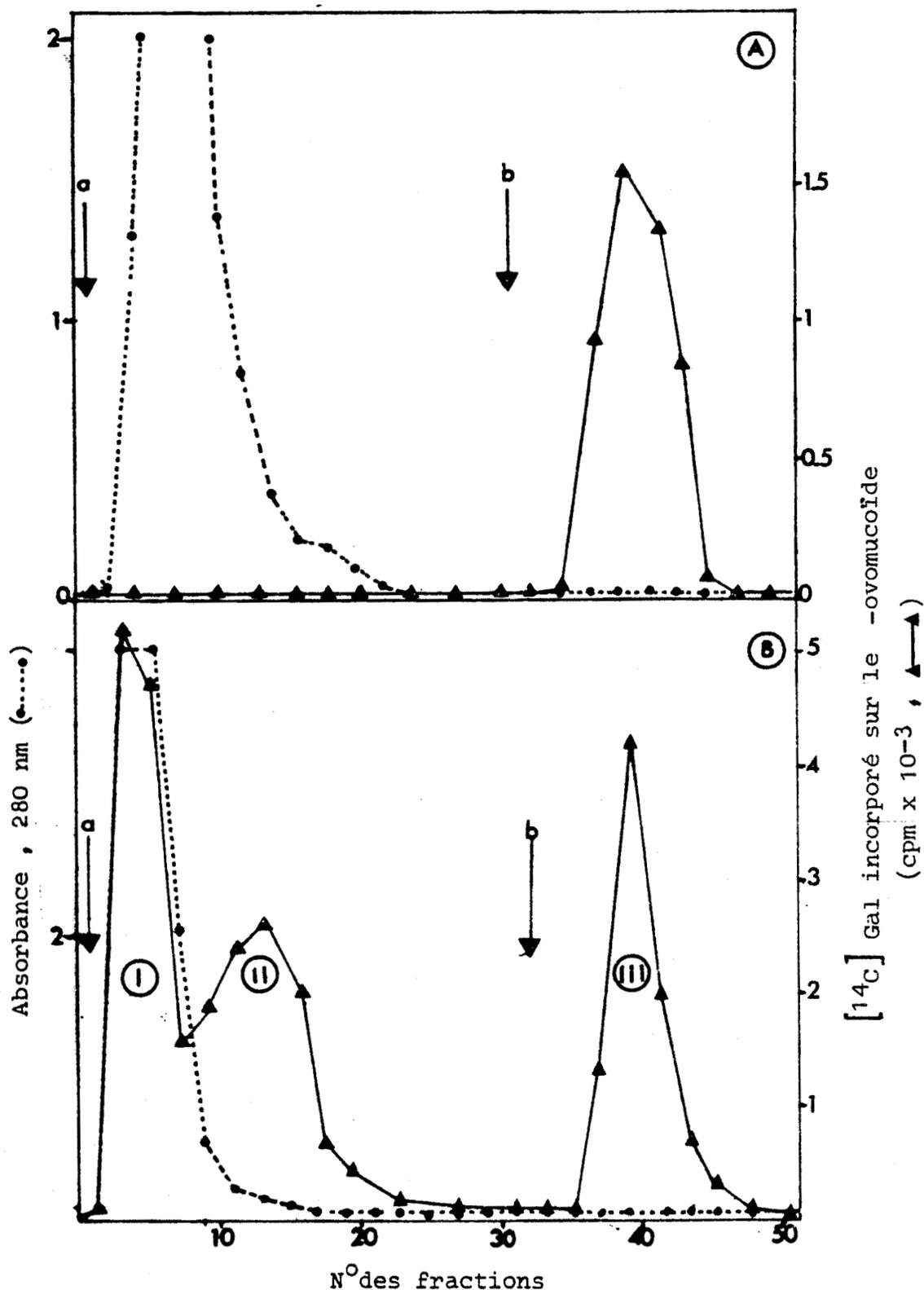


FIGURE 27: Profil d'élution du sérum Humain (A) et de la fraction P₂ du lait de Femme (B) sur une colonne d'affinité Sepharose- β -ovomucoïde, préalablement équilibrée dans un tampon Tris / HCl 30 mM pH 7,4, MnCl₂ 25 mM et UMP 1 mM.
 a : Injection, b : Elution en absence d' UMP et d' ions Mn²⁺

BUS
LILLE

éliminé de la colonne pendant le lavage. L'activité galactosyltransférasique ne semble pas être homogène comme dans le cas du sérum. En effet, on observe trois fractions actives :

- une première fraction F_I exclue
 - une deuxième fraction F_{II} légèrement retardée
 - et une fraction F_{III} qui est adsorbée puisque son élution n'est obtenue qu'en absence d'ions Mn^{++} et de l'UMP.
- Cette dernière fraction reconnaît de façon spécifique l'accepteur immobilisé et se fixe au niveau de ce ligand d'affinité.

Ces trois fractions actives sont concentrées et ensuite rechromatographiées sur la même colonne d'affinité. Les profils d'élution obtenus sont représentés à la figure 28 A, B et C. Le comportement de ces trois fractions est le suivant :

- La fraction F_I active exclue lors du 1er passage est à nouveau éluee au volume d'exclusion de la colonne avec les protéines inertes. Cette activité galactosyltransférasique semble avoir une faible affinité pour le β -ovomucoïde immobilisé (diagramme A de la Figure 28).
- La majeure partie de la fraction F_{II} (légèrement retardée lors du 1er passage) est cette fois retenue au niveau de l'adsorbant. Seule une faible activité enzymatique (ayant les mêmes propriétés que la fraction F_I) semble ne pas avoir d'affinité pour le ligand et est exclue (diagramme B, Figure 28).

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide indique que c'est dans cette fraction (et dans la F_I) que se trouve le cofacteur de la lactose synthétase, l' α -lactalbumine. Il semble donc qu'il y ait compétition entre l'accepteur immobilisé et l' α -lactalbumine qui se trouve à une concentration assez importante dans la solution d'injection. Lors de l'utilisation de colonnes d'affinité plus grandes, ce 2ème pic tend à disparaître, la compétition étant en faveur de l'adsorbant.

En outre, le même profil d'élution (présence d'un pic légèrement retardé et d'une fraction adsorbée) est obtenu pour la galactosyltransférase sérique chromatographiée, lorsqu'on ajoute

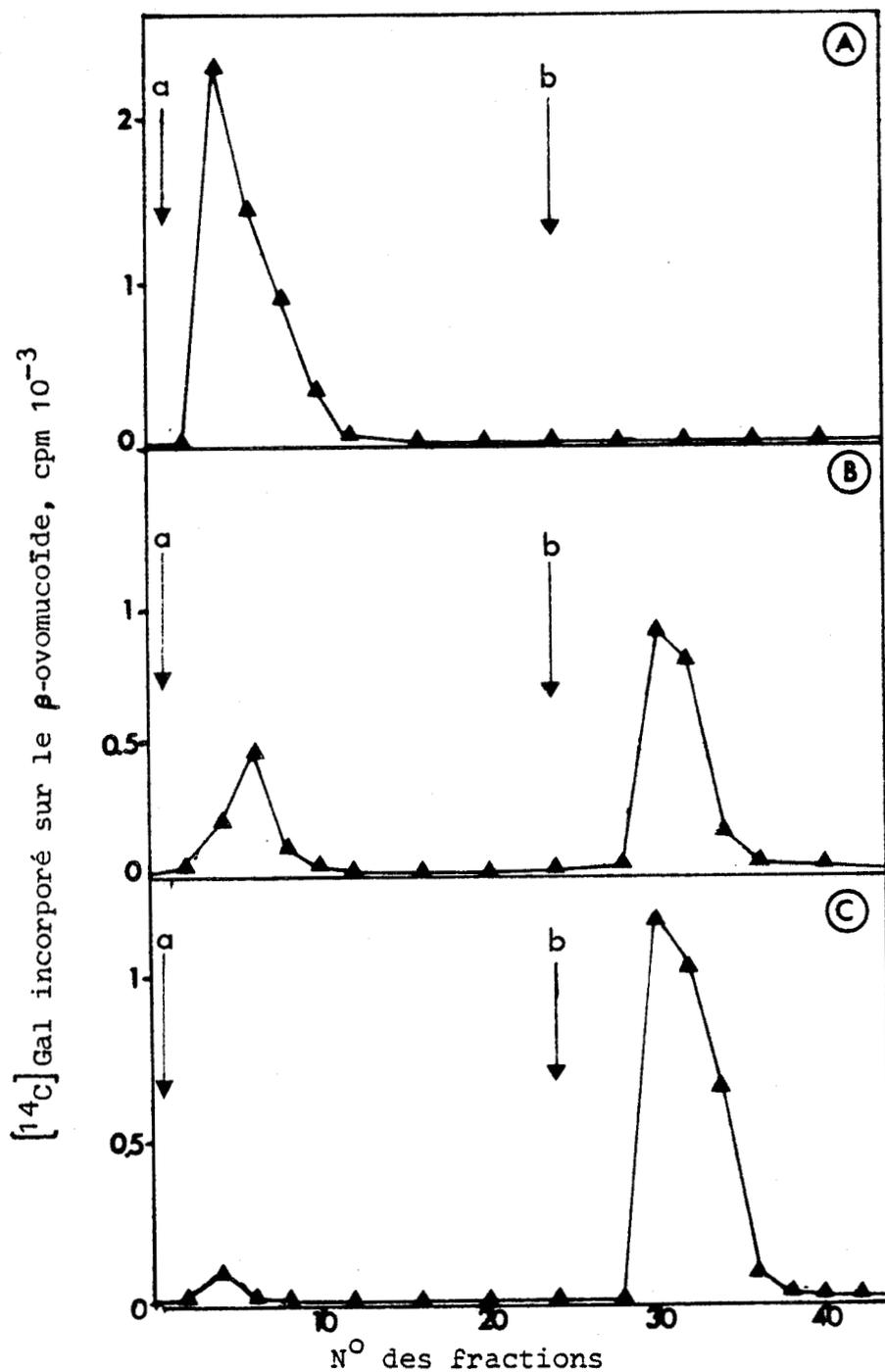


FIGURE 28 : Profil d'élution sur Sepharose- β -ovomucoïde des trois fractions actives obtenues lors d'un premier passage de la fraction P₂ du lait de Femme sur la même colonne d'affinité (voir figure 27B).
a : Injection , b : Elution en absence d'UMP et de Mn²⁺
Injection de la fraction non retenue (A), légèrement retardée (B) et retenue (C) sur Sepharose- β -ovomucoïde.



dans le sérum de l' α -lactalbumine. Une partie de l'enzyme forme un complexe avec l' α -lactalbumine et n'est pas adsorbée mais seulement retardée (Figure 29).

- La fraction III active lors de son 2ème passage sur la même colonne est à nouveau totalement adsorbée (diagramme C, figure 28). Cette fraction adsorbée représente donc l'activité galactosyltransférasique spécifique des motifs glycaniques du β -ovomucoïde immobilisé. En réaction d'immunoprécipitation contre un antisérum anti lactosérum total on observe un seul arc de précipitation. Aucune réaction n'est observée avec des antisérums spécifiques comme l'anti IgA. En électrophorèse sur gel de polyacrylamide, il ne semble pas y avoir de protéines contaminantes. Cette fraction chromatographiée sur une colonne de Sepharose- α -lactalbumine est totalement retenue.

On est donc en présence de deux fractions galactosyltransférasiques ayant une affinité différente pour le β -ovomucoïde immobilisé dans des conditions décrites de chromatographie. Toutes deux cependant transfèrent des résidus de galactose sur le β -ovomucoïde soluble.

Nous avons ainsi essayé de définir la spécificité de ces deux fractions enzymatiques à l'aide d'accepteurs oligosaccharidiques. L'identification des produits formés est effectuée en chromatographie sur papier. Le donneur activé UDP- $\{^{14}\text{C}\}$ Gal, qui n'a pas réagi, a été éliminé sur une colonne de DOWEX 50 x 8). Les chromatogrammes obtenus sont représentés aux figures 30 et 31. Le tableau XVIII indique le taux de transfert pour chaque accepteur oligosaccharidique.

La N-acétylglucosamine constitue un excellent accepteur pour les deux fractions enzymatiques. Cependant on peut noter un taux de transfert légèrement supérieur pour la fraction retenue sur la colonne. Ceci pourrait être expliqué soit par une affinité plus faible de la fraction exclue pour le GlcNAc soit par l'inhibition due à l' α -lactalbumine présente dans cette fraction (Figure 30A).

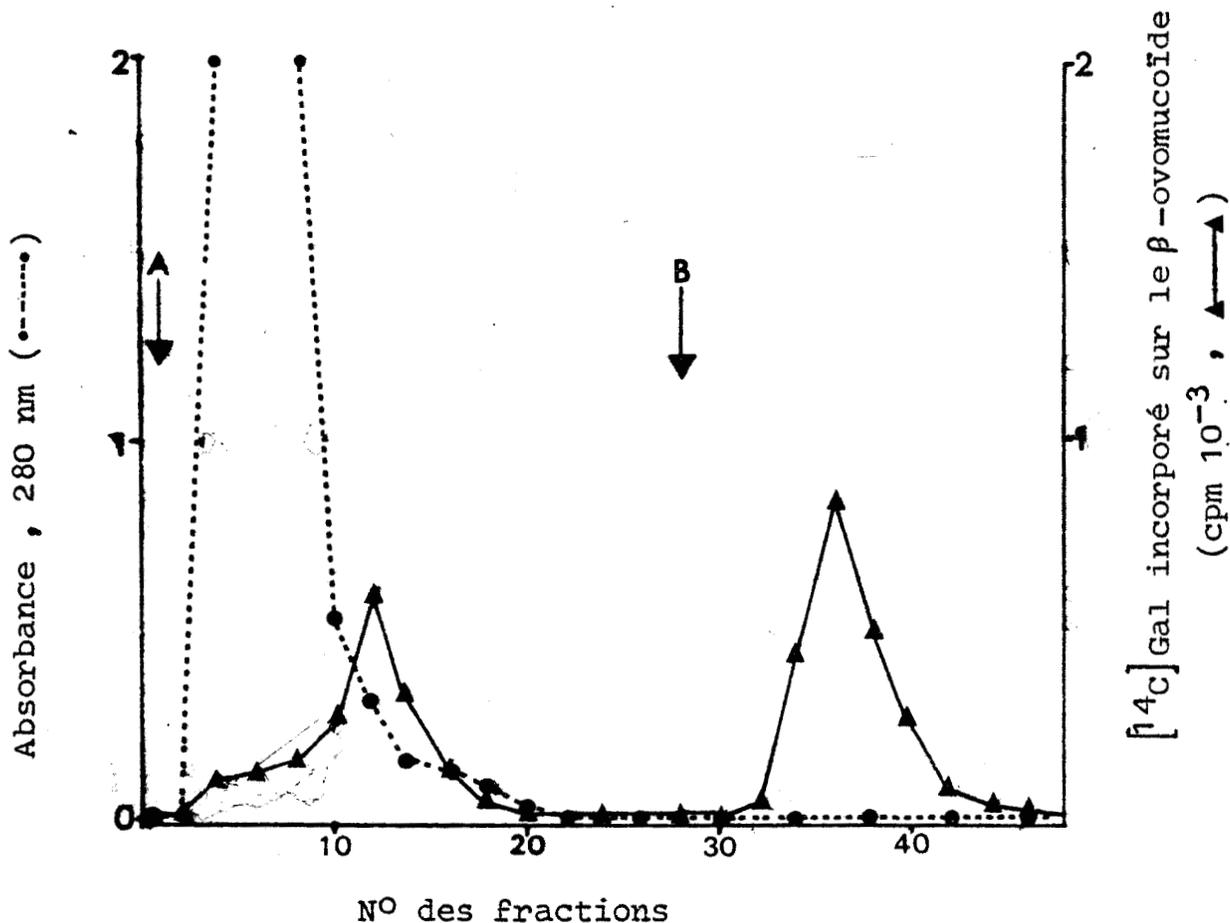


FIGURE 29 : Profil d'élution du sérum Humain (en présence d' α -lactalbumine) sur une colonne d'affinité Sepharose- β -ovomucoïde. On obtient une fraction active légèrement retardée, qui semble former un complexe avec l' α -lactalbumine ajoutée dans le sérum et qui est éluee avec les protéines inertes.

A : Injection

B : Elution de la fraction adsorbée en absence d'ions Mn^{2+} et d'UMP



En ce qui concerne le glucose utilisé ici comme accepteur en présence d' α -lactalbumine, seule la fraction exclue forme le lactose. La fraction spécifique retenue sur l'adsorbant glycanique ne transfère pas les résidus galactosyl sur le glucose (Figure 30B). Il s'agit donc d'une forme d'activité galactosyltransférase différente de la lactose-synthétase.

Les deux fractions enzymatiques utilisent aussi des accepteurs dégalactosylés comme l'oligosaccharide GM₁ de type 1 ou le glycopeptide de la sérotransferrine obtenu après action de la galactosidase.

Nous avons en outre utilisé comme accepteurs les disaccharides GlcNAc(β 1-3)Gal et GlcNAc(β 1-4)Gal, ayant un résidu GlcNAc non substitué mais qui est lié au galactose réducteur, par des liaisons différentes. On remarque un taux de transfert plus faible de la fraction exclue sur le GlcNAc lié en (β 1-4). La fraction purifiée peut, en outre, transférer 1 résidu de galactose sur le lactotriose GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc pour former le tétrasaccharide suivant : Gal \rightarrow GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc. Le produit néoformé est purifié sur une colonne de Bio gel P₂ pour éliminer le lactotriose, la fraction enzymatique et l'UDP-Gal. Nous avons obtenu environ 1 mg de produit de transfert. Sa composition molaire a été déterminée en chromatographie en phase gazeuse (2 Gal, 1 GlcNAc, 1 Glc). Après réduction et méthylation du produit de galactosylation le type de liaison formée a été déterminé en spectrométrie de masse. Le galactose a été branché en position (β 1-4) sur la N-acétylglucosamine du lactotriose (Figure 32).

c - Conclusions

En utilisant comme adsorbant d'affinité le β -ovomucoïde nous avons purifié la galactosyltransférase sérique qui est totalement retenue sur le ligand glycopeptidique. En ce qui concerne la galactosyltransférase du lait de Femme, une seule fraction a été adsorbée au niveau du β -ovomucoïde immobilisé. Cette fraction purifiée ne transfère pas sur le glucose en présence d' α -lactalbumine, elle est donc différente de la lactose synthétase. La liaison qu'elle forme est une (β 1-4) sur les accepteurs N-acétylglucosaminiques.

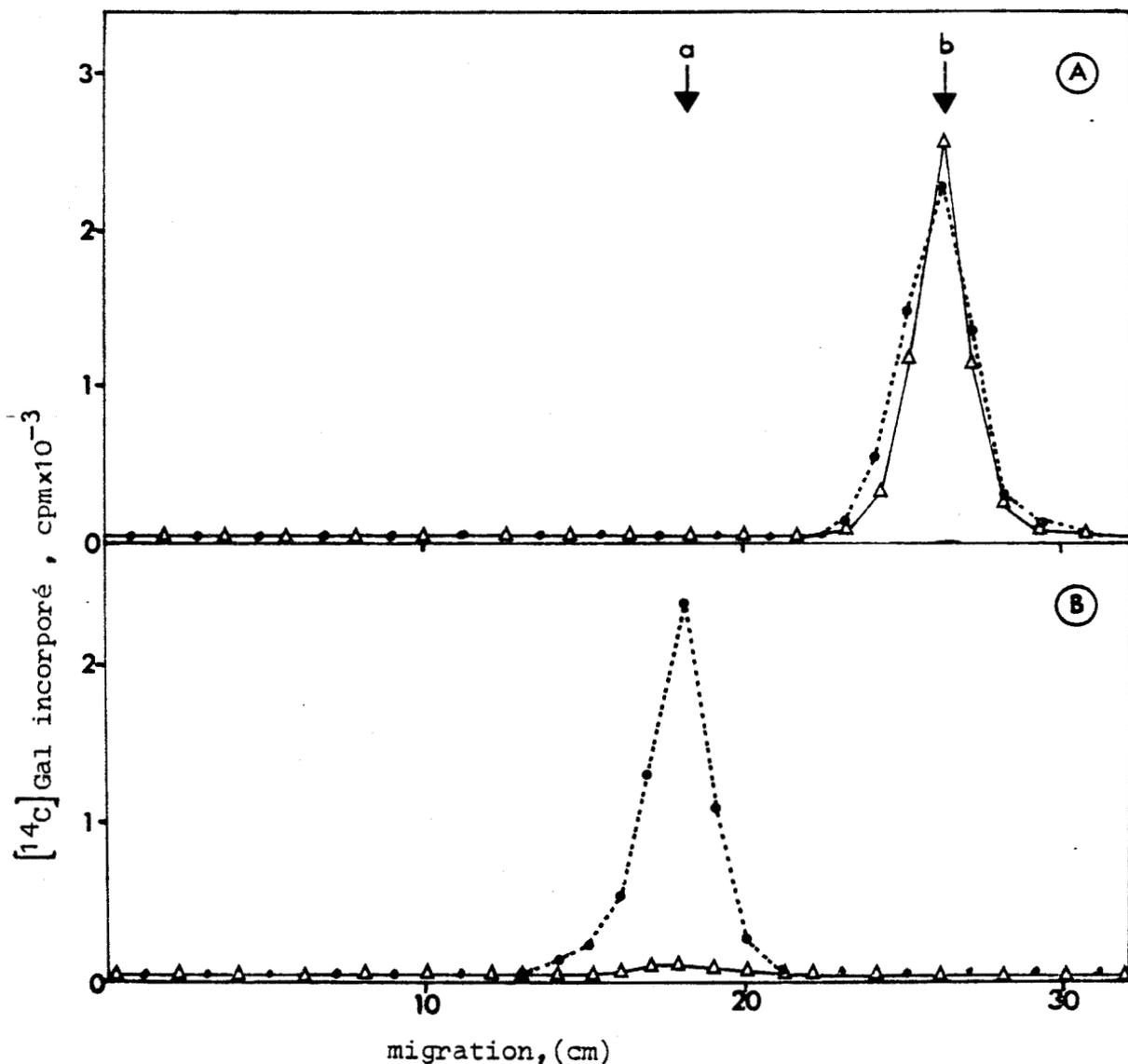


FIGURE 30 : Diagrammes chromatographiques obtenus lors de la galactosylation de la N-acétylglucosamine (A) et du glucose en présence d' α -lactalbumine (B) par la fraction active non retenue (●-...-●) et la fraction active retenue (Δ -...- Δ) au niveau de l'adsorbant β -ovomucoïde (voir figure 28 B).

a : migration du lactose

b : " de la N-acétyllactosamine

Les incubats sont passés à travers une colonne de DOWEX 50x8 (pour éliminer le précurseur non transféré) avant d' être chromatographiés dans le solvant 5/5/1/3.

BUS
VILLE

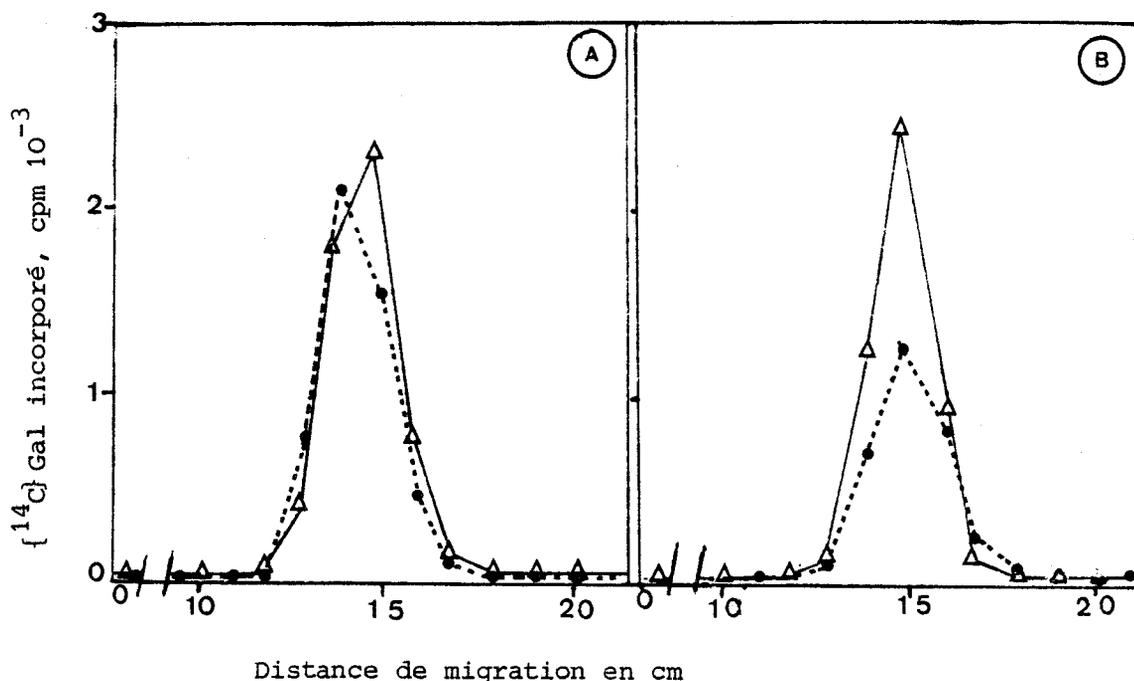


FIGURE 31 : Profils chromatographiques obtenus lors de la galactosylation des disaccharides GlcNAc(β1-3)Gal (A) et GlcNAc(β1-4)Gal (B) par la galactosyltransférase du lait de Femme purifiée par chromatographie d'affinité sur Sepharose-β-ovomucoïde. L'UDP-¹⁴C Gal non transféré est éliminé par passage sur DOWEX 50 x 8. Les incubats sont chromatographiés dans le solvant 5/5/1/3.

-● : Fraction enzymatique exclue (F_I) sur Sepharose-β-ovomucoïde
- ▲——▲ : Fraction enzymatique retenue (F_{III}) sur Sepharose-β-ovomucoïde

TABLEAU XVIII : Taux de transfert (en cpm de ¹⁴C Gal transférés) des deux activités enzymatiques du lait (obtenues lors du passage sur Sepharose-β-ovomucoïde) vis-à-vis de différents accepteurs oligosaccharidiques.

ACCEPTEURS	FRACTION EXCLUE	FRACTION RETENUE SUR β-OVOMUCOÏDE
Glucose	5 300	< 250
N-acétylglucosamine	5 000	5 500
GlcNAc (β1-3)Gal	5 150	5 450
GlcNAc (β1-4)Gal	3 200	5 000

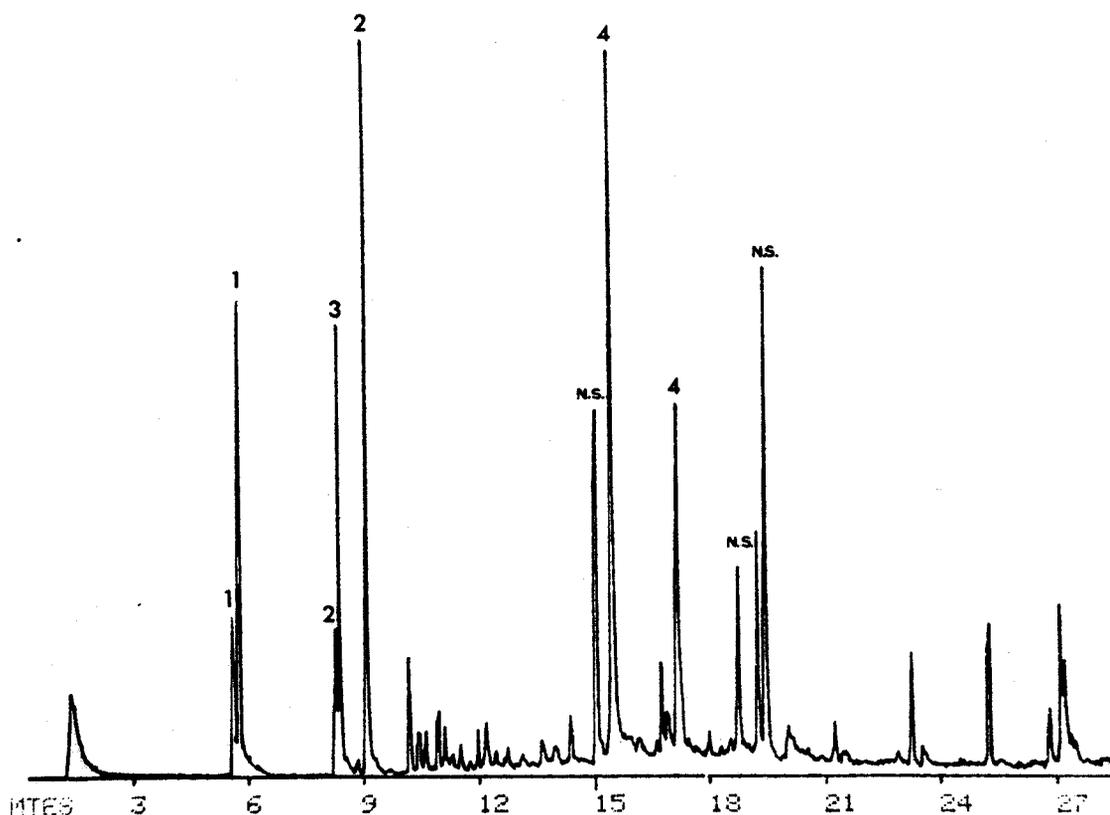


FIGURE 32 : Diagramme de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse du lacto-N-tétraose :

$\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$.

Il a été obtenu après galactosylation du lactotriose :

$\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$, par la galactosyltransférase

purifiée sur le β -glycopeptide de l'ovomucoïde immobilisé.

1 : 2,3,4,6-Me₄-Gal

2 : 2,4,6-Me₃-Gal

3 : Glcitol

4 : 3,6-Me₂-GlcNAc(Me)

NS : non sucre



3) GLYCOPEPTIDES BIANTENNES ET DEGALACTOSYLES

Les glycopeptides biantennés (désialylés et dégalactosylés) de la fraction IV de COHN et de la sérotransferrine ont été utilisés comme ligands d'affinité pour la purification et l'étude de la spécificité de la galactosyltransférase.

a - Galactosyltransférase sérique

Les conditions chromatographiques sont identiques à celles du β -ovomucoïde-Sepharose. La totalité de l'activité galactosyltransférase présente dans le sérum, est adsorbée sur le glycopeptide immobilisé en présence d'ions Mn^{++} et UMP. La galactosyltransférase reconnaît donc de façon spécifique les GlcNAC se trouvant en position terminale non réductrice du glycopeptide biantenné immobilisé.

b - Galactosyltransférase du lait de Femme

Le profil chromatographique représenté à la Figure 33 est analogue à celui obtenu avec le β -ovomucoïde comme ligand. L'élution de la fraction adsorbée semble plus difficile en absence de tout chélateur, traduisant probablement une affinité de l'enzyme adsorbée plus grande pour le glycopeptide biantenné immobilisé.

La fraction intermédiaire active est aussi présente et due à l'interaction de l'enzyme avec l' α -lactalbumine. La fraction enzymatique éluée avec les protéines inertes présente une affinité plus faible pour l'accepteur glycanique immobilisé et est exclue de la colonne. Mais le fait que cette galactosyltransférase transfère des résidus galactosyl sur des accepteurs de type N-acétylglucosaminidasiques, semble indiquer que le glycanne immobilisé se trouve en compétition avec l' α -lactalbumine présente dans la fraction du lait injectée sur la colonne. L'enzyme présente donc une affinité plus grande pour l' α -lactalbumine que pour l'accepteur glycanique immobilisé, et elle est éluée avec l' α -lactalbumine de la fraction inerte.

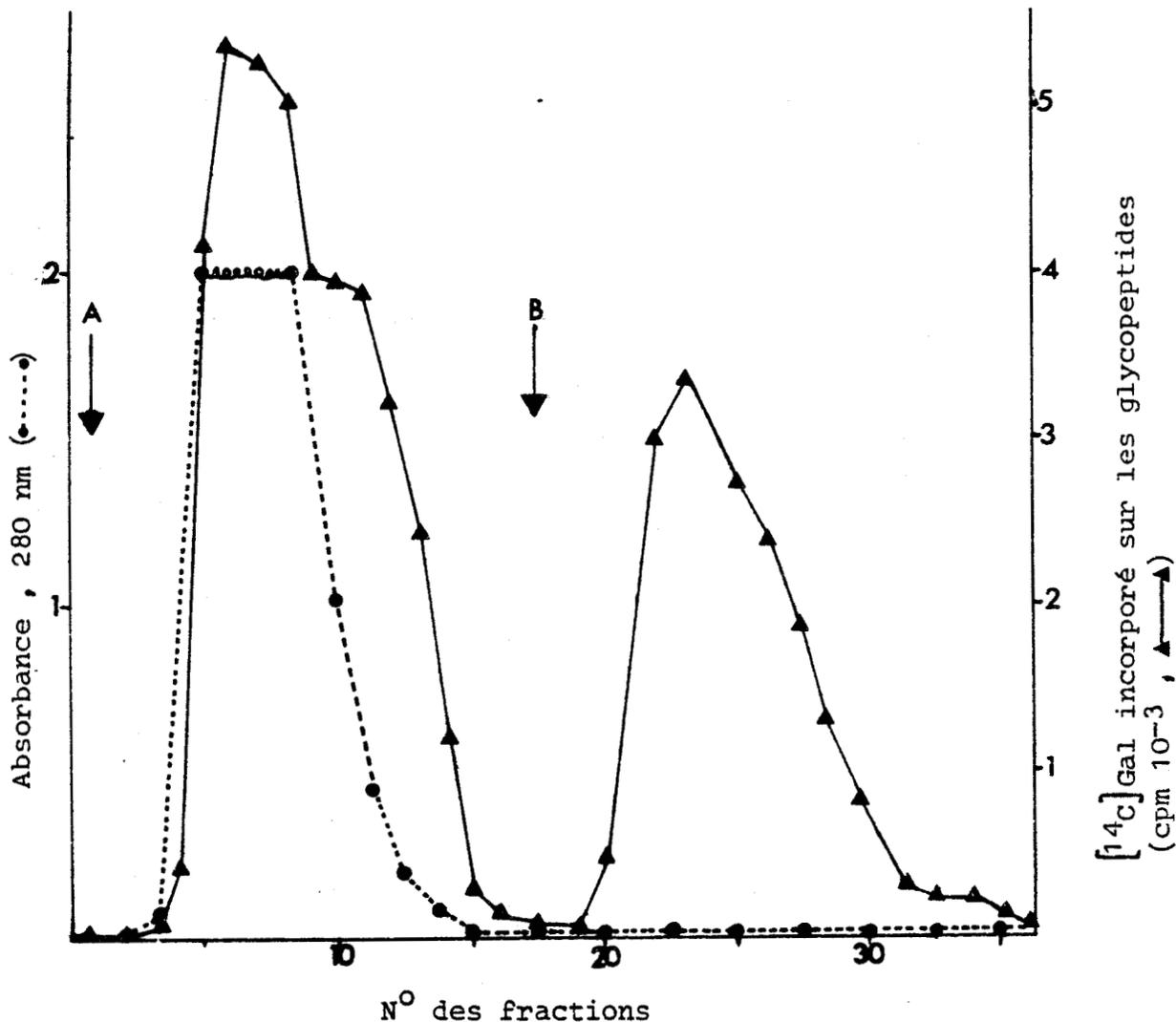


FIGURE 33 : Profil d'élution de la fraction P₂ du lait de Femme sur une colonne de Sépharose-glycopeptides biantennés de la fraction IV de COHN (désialylés et dégalactosylés), équilibrée dans le tampon Tris / HCl 30mM pH 7,4 MnCl₂ et UMP 1 mM.

A : Injection suivie de lavage par le tampon d'équilibration.

B : Elution de la galactosyltransférase adsorbée par le tampon Tris / HCl en absence d'ions Mn²⁺ et d' UMP.

BUS
LILIF

La fraction adsorbée sur le ligand glycopeptidique immobilisé présente une grande affinité pour les accepteurs N-acétylglucosaminidasi-ques mais elle est incapable de transférer des résidus galactosyl sur le glucose en présence d' α -lactalbumine. Il s'agit donc d'une forme enzymatique différente de la lactose synthétase. Généralement, on retrouve les mêmes propriétés pour les fractions enzymatiques adsorbées sur ligands glycopeptidiques de type ovomucoïde ou de type sérotransferrine.

Cette hétérogénéité de la galactosyltransférase du lait de Femme a été aussi mise en évidence par PRIEELS et al. (343). En effet, il a purifié par chromatographie d'affinité sur α -lactalbumine deux formes enzymatiques qui possèdent des poids moléculaires différents et présentent des affinités différentes pour l' α -lactalbumine et la N-acétylglucosamine. Leur capacité à former la N-acétyllactosamine en présence d' α -lactalbumine se trouve modifiée.

4) CONCLUSION

Dans ce chapitre nous montrons que la galactosyltransférase peut être purifiée par chromatographie d'adsorption à l'aide de ligands spécifiques. Ceci a un très grand intérêt puisque les propriétés des adsorbants reflètent l'ordre de fixation comme les interactions et la spécificité des différents substrats avec l'enzyme.

L' α -lactalbumine (en présence de laquelle la galactosyltransférase forme le lactose) est capable d'adsorber la galactosyltransférase du lait ou du sérum, mais uniquement en présence de l'accepteur du galactose (GlcNAc, Glc). Cette adsorption est favorisée par la présence d'ions Mn^{++} . Il y a donc formation d'un complexe entre la galactosyltransférase et l' α -lactalbumine, stabilisé par l'accepteur.

En outre, des accepteurs glycopeptidiques immobilisés ont été utilisés pour la purification d'enzymes spécifiques mais aussi pour étudier la spécificité des substrats. Ainsi la galactosyltransférase spécifique du motif glycanique adsorbé ne peut se fixer au support

d'affinité qu'en présence d'ions Mn^{++} et d'un analogue du donneur (UMP). L'absence dans le tampon de passage d'ions Mn^{++} et d'UMP entraîne l'élution de l'enzyme. La présence d' α -lactalbumine dans la solution induit la formation de nouveaux complexes, et inhibe la fixation de l'enzyme sur l'accepteur N-acétylglucosaminide. Ceci peut être expliqué par un changement d'affinité de l'enzyme pour l'accepteur ou pour l' α -lactalbumine. Contrairement à la chromatographie sur α -lactalbumine où la totalité de l'activité enzymatique est purifiée par adsorption, avec les glycopeptides biantennés immobilisés nous avons purifié une fraction active homogène ne transférant pas sur le glucose. La liaison formée par cette activité galactosyltransférase sur des accepteurs N-acétylglucosaminidiques est une liaison (β 1-4).

E - CONCLUSIONS

La chromatographie de tamisage moléculaire et le fractionnement au sulfate d'ammonium peuvent constituer une étape préliminaire de purification pour la galactosyltransférase du lait avant la purification finale en affinité. Dans le cas du sérum humain aucune de ces méthodes conventionnelles ne nous a donné de résultats satisfaisants.

De toutes les méthodes de purification que nous avons donc mises en oeuvre, seule la chromatographie d'affinité permet d'obtenir en une seule étape la galactosyltransférase à un haut degré de pureté (comme cela a été vérifié par des réactions d'immuno-précipitation et à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide). Cette méthode permet en outre de définir les interactions spécifiques de l'enzyme avec les différents substrats.

La galactosyltransférase sérique a été purifiée sur les accepteurs glycaniques immobilisés comme sur l' α -lactalbumine utilisée comme ligand d'affinité. La fraction active obtenue semble être homogène.

L' α -lactalbumine immobilisée sur le Sepharose permet d'obtenir par adsorption spécifique l'activité galactosyltransférase du lait de Femme. En effet, la transférase est totalement retenue sur cet adsorbant.

Par contre, l'utilisation de ligands glycopeptidiques (comme le β -ovomucoïde ou les glycopeptides biantennés et dégalactosylés de la sérotransferrine) pour la purification de la galactosyltransférase du lait maternel nous a permis de constater une certaine hétérogénéité de cette enzyme. En effet, nous avons mis en évidence deux formes de galactosyltransférases. La première forme active présente une affinité plus faible pour les accepteurs glycaniques immobilisés (affinité diminuée probablement par l' α -lactalbumine présente dans cette fraction) et est exclue de la colonne d'adsorbant.

L'autre forme active, spécifique de ligands glycopeptidiques immobilisés, a une grande affinité pour l'adsorbant glycanique et semble être différente de la lactose synthétase. Il s'agit d'une N-acétylglucosaminidyl (1-4) galactosyltransférase ne transférant pas, à la différence de la lactose-synthétase, les résidus de galactose sur le glucose.

CONCLUSION GENERALE

L'étude des glycoconjugués de surface a mis en lumière le rôle important que jouent les groupements glycaniques. Dans cet esprit, nous nous sommes plus particulièrement attaché à explorer deux des propriétés des chaînes glycaniques : d'une part, celle de déterminants antigéniques et, d'autre part, celle de signaux de reconnaissance dans les phénomènes de glycosylation.

Les recherches que nous avons menées dans ce sens nous ont permis de dégager les points suivants :

1 - Les glycannes peuvent être porteurs de spécificités antigéniques et sont immunogènes lorsqu'ils sont arborés par une protéine. Ainsi, des oligosaccharides isolés de milieux biologiques comme le lait ou l'urine ont été couplés par des méthodes de synthèse à une protéine porteuse. Les néoglycoprotéines ainsi préparées sont immunogéniques et nous ont permis d'induire une réponse immunitaire spécifique.

2 - Par chromatographie d'affinité et à l'aide du ligand glycanique (utilisé pour la préparation de l'antigène de synthèse), nous avons préparé et purifié des anticorps polyclonaux, dirigés de manière spécifique contre la copule glycanique. Cette spécificité antigénique est étroite : aucune réaction croisée d'immunoprécipitation n'a été observée avec des structures glycaniques voisines.

3 - Outre les anticorps dirigés contre les antigènes de groupes sanguins qui nous ont permis de mettre en évidence le déterminant H à la surface des hématies, nous avons obtenu des anticorps dirigés contre la structure biantennée désialylée commune à tous les glycannes de type N-acétyllactosaminique.

Nous disposons, ainsi, à présent, de techniques qui nous permettent d'obtenir des anticorps anti-glycannes monospécifiques. A l'aide de tels outils, mais aussi par le biais d'anticorps monoclonaux, il nous sera possible d'étudier la contribution des glycannes aux

différentes fonctions des glycoconjugués et d'explorer la dynamique membranaire des cellules normales et cancéreuses. En outre, l'utilisation des antigènes de synthèse permettra de déterminer clairement, les motifs glycaniques qui contribuent à l'immunogénicité des glycanes.

4 - Dans la même voie, nous avons utilisé la chromatographie d'affinité sur des ligands glycaniques immobilisés, dans la purification de l'activité galactosyltransférase. Cette méthode a conduit à la purification de la galactosyltransférase sérique interagissant spécifiquement avec les accepteurs glycaniques immobilisés (des résultats similaires avaient été obtenus préalablement avec l' α -lactalbumine immobilisée).

A l'aide d'accepteurs glycopeptidiques immobilisés (β -glycopeptide de l'ovomucoïde et glycopeptide désialylé et dégalactosylé de la sérotransferrine), nous avons de la même manière purifié une forme active de galactosyltransférase à partir du lait maternel. Cette transférase présente une grande affinité pour les motifs glycaniques N-acétylglucosaminidiques, et est responsable de la formation de la liaison Gal(β 1-4)GlcNAc. Ce dernier résultat a pu être démontré par des études de méthylation menées après une réaction de transfert sur l'accepteur trisaccharidique GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc. Cette activité galactosyltransférase semble être différente de l'activité lactose synthétasique, puisque, en présence d' α -lactalbumine, elle est incapable de transférer les résidus galactosyl sur le glucose.

Ainsi, la chromatographie sur adsorbant glycanique peut-elle contribuer à déterminer, d'une part, la présence de plusieurs galactosyltransférases spécifiques des différentes liaisons décrites au niveau des glycoprotéines, et, d'autre part, l'ordre de transfert des résidus galactosyl sur les différentes branches des glycanes de type N-acétyllactosaminiques. Des études plus précises deviennent nécessaires, qui seront menées à l'aide d'adsorbants glycaniques spécifiques de manière à déterminer les relations de spécificité enzymatique-substrat, mais aussi à évaluer le rôle de la glycosylation des protéines membranaires sur le métabolisme et sur la vie sociale des cellules.

BIBLIOGRAPHIE

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
ANDREWS, P.	98	22
FEBS-Lett., 9 (1970) 297-300	242	58
	284	63
	319	97
	339	107
	341	115
ANTTINEN, H., KIVIRIKKO, K.I.	228	58
Biochim. Biophys. Acta 429 (1967) 750		
ANTTINEN, H., MYLLYLÄ, R., KIVIRIKKO, K.I.	276	62
Biochem. J., 175 (1978) 737	279	62
ARAKATSU, Y., ASHWELL, G., KABAT, E.A.	200	51
J. Immunol. 97 (1966) 858- 866		
ASHWELL, G., MORELL, A.	47	11
1978, in Glycoconjugates, Vol. II, HOROWITZ M. et PIGMAN W. (Eds), Academic Press, New-York, London, 231-234		
AUBERT, J.P., BISERTE, G., LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H.	110	23
Arch. Biochem. Biophys. 175 (1976) 410-418		
AXEN, R., PORATH, J., ERNBACK, S.	210	54
Nature 214 (1967) 1302-1304	312	74
BAENZIGER, J., KORNFELD, S.	77	18
J. Biol. Chem. 249 (1974) 7260-7269 et 7270-7281		
BAENZIGER, J., KORNFELD, S., KOCHWA, S.	76	18
J. Biol. Chem. 249 (1974) 1889-1896 et 1897-1903		
BARKER, R., OLSEN, K.W., SHAPER, J.H., HILL, R.L.	224	58
J. Biol. Chem. 247 (1972) 7135-7147	243	58
	244	58
	271	61
	283	63
	289	64
	293	65
	297	66
BARONDES, S.H.	51	12
1980, in Cell Adhesion and Motility, CURTIS, A.S.G. and PITTS, J.D. (Eds), Cambridge Univ. Press, Cambridge, 309-328		
BAUMANN, H., DOYLE, D.	170	38
1982, in The Glycoconjugates Vol. IV, HOROWITZ, M.I. (Ed.), Acad. Press, New-York, 105-153		

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
BAUVOIS, B., CACAN, R., FOURNET, B., CAEN, J., MONTREUIL, J., VERBERT, A. Eur. J. Biochem. 121 (1982) 567-572	248 250 268	58 58 61
BEHRENS, N.H., LELOIR, L.F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66 (1970) 153-159	88	20
BELL, J.E., BEYER, T.A., HILL, R.L. J. Biol. Chem. 251 (1976) 3003-3013	157 282	35 63
BERGER, E.G., KOZDROWSKI, I., WEISER, M.M., VAN DEN EIJDEN, D.H., SCHIPHORST, W.E.C.M. Eur. J. Biochem. 90 (1978) 213	165	36
BERTOLINI, M., PIGMAN, W. Carbohydr. Res. 14 (1970) 53-60	61	14
BETHELL, G.S., AYERS, J.S., HANCOCK, W.S., HEARN, M.T.W. J. Biol. Chem. 254 (1979) 2572-2574	213	54
BEYER, T.A., HILL, R.L. 1982, in The Glycoconjugates Vol. III, HOROWITZ, M.I. (Ed.), Academic Press, New-York, London, 25-45	130 134 141 144	26 29 31 31
BEYER, T.A., PRIEELS, J.P., HILL, R.L. 1979, in Glycoconjugate Research, Proceedings of the IVth International Symposium on Glycoconjugates, Vol. II, GREGORY, J.D. et JEANLOZ, R.W. (Eds), Academic Press, New-York, 641-643	127	26
BEYER, T.A., REARICK, J.I., PAULSON, J.C., PRIEELS, J.P., SADLER, J.E., HILL, R.L. J. Biol. Chem. 254 (1979) 12531-12541	135 136 140	30 28 31
BEYER, T.A., SADLER, J.E., HILL, R.L. J. Biol. Chem. 255 (1980) 5364	255 269	58 61
BLANKEN, W.M., HOOGHWINKEL, G.J.M., VAN DEN EIJDEN, D.H. 1983, in Proceeding of the 7th International Symposium on Glycoconjugates, Lund-Ronneby, Sweden, CHESTER, M.A., HEINEGARD, D., LUNDBLADS, A., SVENSSON, S. (Eds) 757-758	291 318	65 97
BONA, C., ANTEUNIS, A., ROBINEAUX, R., HALPERN, B. Chim. Exp. Immunol. 12 (1972) 377	38	8
BORCH, R.F., BERNSTEIN, M.D., DURST, H.D. J. Am. Chem. Soc. 93 (1971) 2897-2904	209	53
BOUCHILLOUX, S. Bioch. Biophys. Acta 569 (1979) 135-144	288	64

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
BREW, K., VANAMAN, T.C., HILL, R.L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59 (1968) 491-497	146	32
BURCHELL, B. FEBS-Lett. 78 (1977) 101	252 272	58 61
BURGER, M.M., GOLDBERG, A.R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57 (1967) 359-366	6 201	4 51
BUTLER, W.T. 1978, in The Glycoconjugates, Vol. II, HOROWITZ M., PIGMAN, W. (Eds), Academic Press, New-York, 79-85	69	15
BUTLERS, T.D., DEVALIA, V., APLIN, J.D., HUGHES, R.C. J. Cell. Sci., 44, (1980) 33-58	52	12
CACAN, R., VERBERT, A., MONTREUIL, J. FEBS-Lett. 63 (1976) 102-106	333	104
CARLSON, D.M., Mc GUIRE, E.J., JOURDIAN, G.W., ROSEMAN, S. J. Biol. Chem. 248 (1973) 5763-5773	60 65 92	14 14 22
CERVEN, E., RONQUIST, G., RIMSTEN, A., GUNNAR, A. Upsala J. Med. Sci. 86 (1981) 237-247	256 280	58 62
CHAUDHARI, A.S., BISHOP, C.T. Can. J. Chem. 50 (1972) 1987-1991	187	46
CHOU, P.Y., FASMAN, G.D. J. Mol. Biol. 115 (1977) 135-175	111	23
COOK, G.M.W. Biol. Rev. 43 (1968) 363-391	3	1
CROOKSTON, M.C., TILLEY, A. 1977, in Human Blood Groups, 5th Int. Conv. Immunol. Buffalo, KARGER (Ed.) 246	21	6
CUATRECASAS, P., J. Biol. Chem. 245 (1970) 3059-3065	332	102
DAHR, W., UHLENBRUCK, G., BIRD, G.W.G. Vox Sang. 28 (1975) 133-148	64	14
DAS, R.C., HEATH, E.C. Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 39 (1980) 1672	230 265	58 59
DAUSSET, J. RAPAPORT, F.T. Nature, 209 (1966) 209	39	10

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
DEBRAY, H., MONTREUIL, J. Biochimie 60 (1978) 697-704	80	17
DESCAMPS, J. (1974) Thèse d'Etat, Lille n° 294	338	106
DE VRIES, A.L., VANDENHEEDE, J., FEENEY, R.E. J. Biol. Chem. 246 (1971) 305-308	62	14
DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. Anal. Chem. 28 (1956) 350	305 307 329	71 72 101
EBERT, W., ROELCKE, D., WEICKER, H. Eur. J. Biochem. 53 (1975) 505-515	35	8
EBNER, K.E. 1973, in The Enzymes, Vol. 9, 3 rd ed., BOYER, P.D., (Ed.), Academic Press, New-York, 363-377	147 156	32 34
EGGE, H., PETER-KATALINIC, J., PAZ-PARENTE, J., STRECKER, G., MONTREUIL, J., FOURNET, B. FEBS-Lett. 156 (1983) 357-362	324	98
ERLANGER, B.F. 1980, Methods in Enzymology, Vol. 70, VAN VUNAKIS (Ed), Academic Press, New-York, 85-104	172	39
EYLAR, H. Theoret. Biol. 10 (1965) 89-112	45	11
FEIZI, T., KABAT, E.A., VICARI, G., ANDERSON, B., MARSH, W.L. J. Immunol. 106 (1971) 1578-1592	66	14
FISHER, F.G., NEBEL, G.G., Z. Physiol. Chem. 302 (1955) 10-18	334	105
FITZGERALD, D.K., Mc KENZIE, L., EBNER, K.E. Biochim. Biophys. Acta 235 (1971) 235-425	149	32
FORNSTEDT, N., PORATH, J. FEBS-Lett. 57 (1975) 187-191	212	54
FOURNET, B., STRECKER, G., LEROY, Y., MONTREUIL, J. Anal. Biochem. 116 (1981) 489-502	336	106

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
FOURNET, B., STRECKER, G., MONTREUIL, J.,	79	18
DORLAND, L., HAVERKAMP, J., Vliegenthart, J.F.G.,	317	84
SCHMID, H., BINETTE, J.P. Biochemistry 17 (1978) 5206-5214		
FRASER, I.H., MOOKERJEA, S.	162	34
Biochem. J. 164 (1977) 541-547	287	64
FREDERICQ, E., DEUTSH, H.F.	326	98
J. Biol. Chem. 181 (1949) 499		
GERBER, A.C., KOZDROWSKI, I., WYSS, S.R., BERGER, E.G.	294	65
Eur. J. Biochem. 93 (1979) 453-460		
GIBSON, R., KORNFELD, S., SCHLESINGER, S.	120	25
Trends Biochem. Sci. 5 (1980) 290-293		
GIBSON, R., KORNFELD, S., SCHLESINGER, S.	41	10
J. Biol. Chem. 256 (1981) 452-462		
GINSBURG, V.	23	7
Adv. Enz. 36 (1972) 131-140		
GLICK, J.L., GITHENS, S.	43	10
Nature 208 (1965) 88		
GOEBEL, W.F., AVERY, O.T.	174	39
J. Exp. Med. 50 (1929) 521-531 et 533-550		
GOEBEL, W.F., BABERS, F.H., AVERY, O.T.	190	48
J. Exp. Med. 60 (1934) 85-94		
GOLDSTEIN, I.J., MURPHY, L.A., EBISU, S.	204	51
Pure Appl. chem. 49 (1977) 1095-1103		
GORSKI, J.P., KASPER, C.B.	253	58
J. Biol. Chem. 252 (1977) 1336		
GRAHAM, H.A., HARSH, H.F., DAVIES, D.M.	24	7
1977, in 5th Int. Conv. Immunol. Buffalo,	26	6
KARGER, N.V., (Ed.), Basel, 257		
GRAY, G.	185	44
Arch. Biochem. Biophys. 163 (1974) 426-428	304	71
GRINNA, L.S., ROBBINS, P.W.	113	23
J. Biol. Chem. 254 (1979) 8814-8818		
HAKOMORI, S.I.	335	105
J. Biochem. 55 (1964) 205		

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
HAKIMORI, S.I., ANDREWS, H.D. Biochim. Biophys. Acta 202 (1970) 225-228	22	6
HAKOMORI, S.I., KOBATA, A. 1974, in The Antigens, Vol. 2, SELA, M. (Ed.), Academic Press, New-York, 79-140	16 18	5 5
HARPAZ, N., FLOWERS, H.M., SHARON, N. 1975, Arch. Biochem. Biophys. 170 (1975) 676-683	25	6
HARPAZ, N., SCHACHTER, H. J. Biol. Chem. 255 (1980) 4885-4893 et 4894-4902	116 118 237 273	25 25 58 61
HELFERICH, B., KOSCHE, W. Ber. 59 (1926) 69-79	186	46
HEMMING, F.W. Biochem. Soc. Trans. 5 (1977) 1223-1231 et 1682-1687	107	23
HIEFETZ, A., LENNARZ, WJ. J. Biol. Chem. 254 (1979) 6119- 6127	53	12
HILL, H.D.J., SCHWYZER, M., STEINMAN, H.M. HILL, R.L. J. Biol. Chem. 252 (1977) 3799-3805	137	28
HOF Lack, B., CACAN, R., VERBERT, A., Eur. J. Biochem. 88 (1978) 1-6	105	22
HOF Lack, B., CACAN, R., VERBERT, A. Eur. J. Biochem. 117 (1981) 285-290	112	23
HOROWITZ, H., PIGMAN, W.(Eds) 1977, The Glycoconjugates, Vol. I, Acad. Press, New-York	58	13
HOROWITZ, H., PIGMAN, W. (Eds) 1978, The Glycoconjugates, Vol.II, Acad. Press, New-York	59	13
HOROWITZ, M.I. (Ed.) 1982, The Glycoconjugates, Vol.III, Acad. Press, New-York	85	20
HUDGIN, R.C., SCHACHTER, H. Can. J. Biochem. 49 (1971) 838	148	32
HUGHES, R.C. 1976, in Membrane Glycoproteins. A review of structure and function, HUGHES, R.C.(Ed.), Butterworth, London	1 8	1 4

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
HUMBEL, R., COLLART, M. Clin. Chim. Acta 60 (1975) 143-147	309	73
HURN, B.A.L., CHANTLER, S.M. 1980, in Methods in Enzymology, Vol. 70, VAN VUNAKIS, H., (Ed.), Academic Press, New-York, 104-141	311	74
INBAR, M., SACHS, L. Nature 223 (1969) 710-712	7	4
INMAN, J.K. 1974, in Methods in Enzymology, Vol. 34 B, Academic Press, New-York, 30-58	214	54
ITOS, S., YAMASHITA, K., SPIRO, R.G., KOBATA, A. J. Biochem. (Tokyo) 81 (1977) 1621-1631	72	16
IVATT, R.J., ROSEMEYER, M.A. Eur. J. Biochem. 64 (1976) 233	154	33
JAMIESON, J.C. Can. J. Biochem. 55 (1977) 408-414	109	23
JANCIK, J.M., SCHAUER, R., ANDRES, K.H., Von DURING, M. Cell. Tiss. Res. 186 (1978) 209-226	49	11
JEFFREY, A.M., ZOPF, D.A., GINSBURG, V. Bioch. Biophys. Res. Comm. 62 (1975) 608-613	314	75
JOZIASSE, D.H., SCHIPHORST, W.E.C.M., VAN DEN EIJNDEN, D.H., VAN HALBEEK, H., Vliegenthart, J.F.G. 1983, in Proceeding of the 7th International Symposium on Glycoconjugates, Lund Ronneby, Sweden, CHESTER, M.A., HEINEGARD, D., LUNDBLAD, A., SVENSSON, S., (Eds) 7737-738	133	26
KABAT, E. A. J. Am. Chem. Soc. 76 (1954) 3709-3713	217	56
KABAT, E.A. 1956, Blood Group Substances. Their Chemistry and Immunochemistry. Academic Press, New-York	11	5
KABAT, E.A. 1970, Blood and tissues Antigens, AMINOFF, D. (Ed.) Academic Press, New York, 187	15	5
KHATRA, B.S., HERNIS, D.G., BREW, K. Eur. J. Biochem. 44 (1974) 537-560	123	25

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
KHORANA, H.G. Chem. Ind. (London) (1955) 1087-1088	208	53
KIEDA, C.M.T., DELMOTTE, F.M., MONSIGNY, M.L.P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 168-172	203 220	51 56
KITCHEN, B.J., ANDREWS, P. FEBS-Lett. 26 (1972) 333-335	158	34
KOBATA, A., GINSBURG, V. J. Biol. Chem. 244 (1969) 5496	302	68
KORNFELD, R., KORNFELD, S. 1980, in Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, LENNARZ, W.J. (Ed.), Academic Press, New-York, 1-34	54	13
KOSCIELAK, J., PIASEK, A., GORNIK, H., GARDAS, A., GREGOR, A. Eur. J. Biochem. 37 (1973) 214-225	17	5
KRANTZ, M.J., HOLTZMAN, N.A., STOWELL, C.P., LEE, Y.C. Biochemistry 15 (1976) 3963-3968	176	40
KUHN, R. Bul. Soc. Chem. Biol. 40 (1958) 297	299	68
LAINE, R.A., STELLNER, K., HAKOMORI, S.I. Met. Membrane Biol. 2 (1974) 205-244	13	5
LANDSTEINER, K. Bioch. Z. 119 (1921) 294	14	5
LANDSTEINER, K. 1962, in The Specificity of Serological reactions, Dover Publications, Inc., New-York, 174-177	175	39
LEE, Y.C., LEE, R.T. 1982, in The Glycoconjugates, Vol. IV, HOROWITZ, M.I. (Ed.), Academic Press, New-York, 57-83	173 206	39 52
LEHMAN, E.D., HUDSON, B.G., EBNER, K.E. FEBS-Lett. 54 (1975) 65	153	33
LEHRMAN, M.A., IMBER, M.J., PIZZO, S.V., HILL, R.L. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 39 (1980) 1968	189	46
LEMIEUX, R.U., BAKER, D.A., BUNDLE, D.R. Can. J. Biochem. 55 (1977) 507-512	182 191 202	44 49 51

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
LEMIEUX, R.U., BAKER, D.A., WEINSTEIN, W.M., SWITZER, C.M. Biochemistry 20 (1981) 199-205	198 223	50 57
LEMIEUX, R.U., BUNDLE, D.R., BAKER, D.A. J. Am. Chem. Soc. 97 (1975) 4076-4083	193	49
LI, E., KORNFELD, S. J. Biol. Chem. 254 (1979) 1600-1605	114	25
LISOWSKA, E. Eur. J. Biochem. 10 (1969) 574	30	8
LLOYD, K.O., KABAT, E.A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61 (1968) 1470-1477	67	14
LOH, Y.P., GAINER, H. FEBS-Lett. 96 (1978) 269-272	42	10
LONNGREN, J., GOLDSTEIN, I.J. 1978 in Methods in Enzymology, Vol 50, GINSBURG, V., (Ed.) Academic Press, New-York, 160-161	181	44
LOTAN, R., NICOLSON, G.L. Bioch. Biophys. Acta 559 (1979) 329	277	62
MAGEE, S.C., GEREN, C.R., EBNER, K.E. Biochim. Biophys. Acta 420 (1976) 187	151	33
MAGEE, S.C., MAWAC, R., EBNER, K.E. Biochemistry 13 (1974) 99	150	33
MARCUS, D.M. Transfusion 11 (1971) 16	27 28	6 9
MARCUS, D.M., CASS, L.E. Science 164 (1969) 553-555	20	6
MARTINEAU, R.S., ALLEN, P.Z., GOLDSTEIN, I.J., IYER, R.N. Immunochemistry 8 (1971) 705-718	199	51
Mc BROOM, C.R., SAMANEN, C.H., GOLDSTEIN, I.J. 1972, in Methods in Enzymology 28 (1972) 212-219	178	41
MENDICINO, J., CHANDRASEKARAN, E.V., ANUMULA, K.R., DAVILA, M. Biochemistry 20 (1981) 967	235 264	58 59
MOCZAR, E., VASS, G. Carbohydr. Res. 50 (1976) 133-141	183	44

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
MONSIGNY, M., CHOSSON, A., MONTREUIL, J. Bull. Soc. Chim. Biol. 50 (1968) 857-874	327	98
MONTREUIL, J. 3 ^{ème} Coll. Hôp. St Jean, Bruges, (1955) 209	301	68
MONTREUIL, J. Bull. Soc. Chim. Biol. 42 (1960) 1399	300	68
MONTREUIL, J. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 37 (1980) 157-223	2 57 321	1 13 98
MONTREUIL, J. 1982, in Comprehensive Biochemistry, Vol. 19B	4 9	1 4
NEUBERGER, A., VAN DEENEN, L.L.M. (Eds), Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New-York	56 84 139	13 20 28
MONTREUIL, J., CHOSSON, A., HAVEZ, R., MULLET, S. C. R. Soc. Biol. 154 (1960) 732	337	106
MOREL, E., ACHY-SACHOT, N., SPIK, G., MONTREUIL, J. FEBS-Lett. 69 (1976) 171-174	90	21
MORGAN, P.H., JACOBES, H.G., SEGREST, J.P., CUNNINGHAM, L.N. J. Biol. Chem. 245 (1970) 5042-5048	70	15
MYLLYLA, R., ANTTINEN, H., RISTELI, L., KIVIRIKKO, K.I. Biochim. Biophys. Acta 480 (1977) 113	229	58
NAGAI, M., DAVE, V., KAPLAN, B.E., YOSHIDA, A. J. Biol. Chem. 253 (1978) 377	233	58
NAGAI, M., DAVE, V., MUERSCH, H., YOSHIDA, A. J. Biol. Chem. 253 (1978) 380	164	36
NARASIMHAN, S., STANLEY, P., SCHACHTER, H. J. Biol. Chem. 252 (1977) 3926-3933	117	25
NELSON, J.D., JATO-RODRIGUEZ, J.J., MOOKERJEA, S. Can. J. Biochem. 52 (1974) 42-50	97	22
NILSON, B., NORDEN, N.E., SVENSSON, S. J. Biol. Chem. 254 (1979) 4545-4553	78	18
OLDEN, K., PARENT, J.B., WHITE, S.L. Biochim. Biophys. Acta 650 (1982) 209-232	10	4

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
OPPENHEIMER, C.L., ECKHARDT, A.E., HILL, R.L. J. Biol. Chem. 256 (1981) 11477-11482	275	62
OPPENHEIMER, C.L., HILL, R.L. J. Biol. Chem. 256 (1981) 799	236	58
OUCHTERLONY, O. Progr. Allergy 6 (1962) 30	315	76
PALADE, G.E. 1959, in Subcellular Particles, ed. Hayashi, Ronald, New-York, 64	100	22
PARODI, A.J., LELOIR, L.F. Biochim. Biophys. Acta 559 (1979) 1-37	108	23
PAULSON, J.C. BERANEK, W.E., HILL, R.L. J. Biol. Chem. 252 (1977) 2356-2362	247 266	58 60
PAULSON, J.C., PRIEELS, J.P., GLASGOW, L.R., HILL, R.L. J. Biol. Chem. 253 (1978) 5617-5624	126 129 131	26 26 26
PAULSON, J.C., REARICK, J.I., HILL, R.L. J. Biol. Chem. 252 (1977) 2363-2371	93	22
PAZ-PARENTE, J., STRECKER, G., LEROY, Y., MONTREUIL, J., FOURNET, B. J. Chromatogr. 249 (1982) 199-204	322	98
PAZ-PARENTE, J., STRECKER, G., LEROY, Y., MONTREUIL, J., FOURNET, B., VAN HALBEEK, H., DORLAND, L., VLIEGENTHART, J.F.G. FEBS-Lett. 152 (1983) 145-152	323	98
PAZUR, J.H. 1981, in Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., Vol 39, TIPSON, R.S., HORTON, D. (Eds), Academic Press, New-York, 405-447	207 215 258	53 54 57
PAZUR, J.H., ANDERSON, J.S., KARAKAWA, W.W. J. Biol. Chem. 246 (1971) 1793-1798	216	56
PAZUR, J.H., DREHER, K.L., KUBRICK, R.L. Fed. Proc. 39 (1980) 1633	219	56
PAZUR, J.H., TOMINAGA, Y., DREHER, K.L., FORSBERG, L.S., ROMANIC, B.M. J. Carbohydr. Nucleos. Nucleot. 5 (1978) 1-14	218	56

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
PIERCE-CRETEIL, A., PAMBLANCO, M., STRECKER, G., MONTREUIL, J., SPIK, G. Eur. J. Biochem. 114 (1981) 169-178	63	14
PIERCE, M., TURLEY, E.A., ROTH, S. Intern. Rev. Cyt. 65 (1980) 1-44	102	22
PODOLSKY, D.K., WEISER, M.M. Biochem. Biophys. Res. Commun. 65 (1975) 545	168	36
POGO, B.G.T. J. Cell. Biol. 40 (1969) 571	37	8
PRIEELS, J.P., MAES, E., DOLMANS, M., LEONIS, J. Eur. J. Biochem. 60 (1975) 525-531	159 286 343	34 64 130
PRIEELS, J.P., MONNOM, D., DOLMANS, M., BEYER, T.A., HILL, R.L. J. Biol. Chem. 256 (1981) 10456-10463	254 270	58 61
PRIVAT, J.P., DELMOTTE, F.M., MONSIGNY, M.L.P. FEBS-Lett. 46 (1974) 224-228	205	51
RAO, A.K., GARVER, F., MENDICINO, J. Biochemistry 15 (1976) 5001-5009	163 245 295	3 58 65
RAO, A.K., MENDICINO, J. Biochemistry 17 (1978) 5632-5638	124 125	25 27
RAVVALA, H., FINNE, J. FEBS-Lett. 97 (1979) 1-8	82	17
RISTELI, L. Biochem. J. 169 (1978) 189	240 278	58 62
RISTELI, L., MYLLYLÄ, R., KIVIRIKKO, K.I. Eur. J. Biochem. 67 (1976) 197	227 239 262	58 58 59
RITTENHOUSE, H., SCHENCK, J., TOMITA, J., HIRATA, A., WEISER, M.M., ALBINI, B., WILSON, J.R. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 40 (1981) 1675	169	36
RODEN, L. 1980, in Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, LENNARTZ, W. J. (Ed.) Plenum Press, New-York 267-371	68 71	15 15
ROGERS, J.C., KORNFELD, S. Biochem. Biophys. Res. Commun. 45 (1971) 622-629	188	46

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
ROSEMAN, S.	50	12
Chem. Phys. Lip. 5 (1970) 270-297	91	21
	101	22
	106	23
ROTHMAN, J.E., LENARD, J.	99	22
Science 195 (1977) 743-753		
SADLER, J.E., BEYER, T.A., HILL, R.L.	257	57
J. Chromatogr. 215 (1981) 181-194		
SADLER, J.E., REARICK, J.I., HILL, R.L.	251	58
J. Biol. Chem. 254 (1979) 5934		
SADLER, J.E., REARICK, J.I., PAULSON, J.C., HILL, R.L.	249	58
J. Biol. Chem. 254 (1979) 4434	267	60
SCHACHTER, H.	96	22
Adv. Cytopharmacol. 2 (1974) 207-218		
SCHACHTER, H.	86	20
1978, in The Glycoconjugates, Vol. II, HOROWITZ, M.,	121	25
PIGMAN, W. (Eds), Academic Press, New-York, 87-181	138	28
SCHACHTER, H.	119	25
1981, in Lysosomes and Lysosomal Storage Diseases,		
CALLAHAN, W., LOWDEN, J.A. (Eds), Raven Press,		
New-York, 73-93		
SCHACHTER, H., RODEN, L.	145	32
1973, in Metabolic Conjugation and Metabolic		
Hydrolysis, FISHMAN, W.H. (Ed.), Vol. 3, Academic		
Press, New-York, 1-149		
SCHACHTER, H., ROSEMAN, S.	83	20
1980, in The Biochemistry of Glycoproteins and	122	25
Proteoglycans, LENNARTZ, W.J. (Ed.), Plenum Presse,	142	31
New-York, 85-160	155	33
SCHANBACHER, F.L., EBNER, K.E.	160	34
J. Biol. Chem. 245 (1970) 5057-5061		
SCHWARTZ, N.B., DORFMAN, A.	226	58
Arch. Biochem. Biophys. 171 (1975) 136	260	59
SCHWARTZ, N.B., RODEN, L.	225	58
Carbohydr. Res. 37 (1974) 167	259	59
	261	59

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
SCHWARTZ, N.B., RODEN, L. J. Biol. Chem. 250 (1975) 5200	238	58
SCHWARTZ, N.B., RODEN, L., DORFMAN, A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 56 (1974) 717	281	62
SCHWYSER, M., HILL, R.L. J. Biol. Chem. 252 (1977) 2338-2345	94 234 274	22 58 61
SINGER, S.J., NICOLSON, G.L. Science 175 (1972) 720-731	5	4
SMITH, C.A., BREW, K. J. Biol. Chem. 252 (1977) 7294-7299	161 290 298 342	34 64 66 119
SMITH, D.F., GINSBURG, V. J. Biol. Chem. 255 (1980) 55-59	180 197 222	41 50 56
SMITH, D.F., ZOPF, D.A., GINSBURG, V. 1978, in Methods in Enzymology, Vol. 50, GINSBURG, V., Academic Press, New-York, 169-171	179	41
SPIK, G., BAYARD, S., FOURNET, B., STRECKER, G., BOUQUELET, S., MONTREUIL, J. FEBS-Lett. 50 (1974) 296-299	74 316 325	18 84 98
SPIK, G., STRECKER, G., FOURNET, B., BOUQUELET, S., MONTREUIL, J., DORLAND, L., VAN HALBEEK, H., VLIEGENTHART, J.F.G. Eur. J. Biochem. 121 (1982) 413-419	75	18
SPINGER, G.F., TEGTMEYER, H., HUPRIKAR, S.V Vox Sang. 22 (1972) 325-343	31	8
STANLEY, P., NARASIMHAN, S., SIMINOVITCH, L., SCHACHTER, H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 3323-3327	115	25
STOCKERT, R.J., MORELL, A., SCHEINBERG, I.H. Science 197 (1977) 667-668	48	11
STOWELL, C.P., LEE, Y.C. 1980, in Adv. Carb. Chem. Biochem., Vol. 37, TIPSON, R.S., HORTON, D. (Eds) Academic Press, New-York, London, 225-283	171	39
STOWELL, C.P., LEE, Y.C. Biochemistry 19 (1980) 4899-4904	184	44

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
STRECKER, G., MONTREUIL, J. Biochimie 61 (1979) 1199-1245	55 303	13 70
STRUCK, D.K., LENNARTZ, W.J. 1980, The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, Plenum Press, New-York, LENNARTZ, W.J. (Ed) 35-83	89	20
STRUCK, D.K., SIUTA, P.B., LANE, M.D., LENNARTZ, W.J. J. Biol. Chem. 253 (1978) 5332-5337	46	11
STURGESS, J., MOSCARELLO, M., SCHACHTER, H. 1978, in Current Topics in Membranes and Transport, Vol. 11, BRONNER, F., KLEINZELLER, A (Eds), Academic Press, New-York, London, 15-105	87	20
SUNDBERG, L., PORATH, J. J. Chromatogr. 90 (1974) 87-98	211	54
TAKASAKI, S., KOBATA, A. J. Biol. Chem. 251 (1976) 3610	232	58
TAKATSUKI, A., ARIMA, K., TAMURA, G. J. Antibiotics 24 (1971) 215-223	40	10
THOMAS, D.B., WINZLER, R.J. J. Biol. Chem. 244 (1969) 5943-5946	33	9
THOMAS, D.B., WINZLER, R.J. Biochem. J. 124 (1971) 55-59	34	9
TILLEY, C., CROOKSTON, M.C., BROWN, B.C., WHERRETT, J.R. Vox Sang. (Basel), 28 (1975) 25	19	6
TRAYER, I.P., HILL, R.L. J. Biol. Chem. 246 (1971) 6666	152 241 285 320 340	33 58 63 97 115
TURCO, S.J., HEATH, E.C. Arch. Biochem. Biophys. 176 (1976) 352-357	246 296	58 66
VAN DEN EIJNDEN, D.H., JOZIASSE, D.H., DORLAND, L., VAN HALBEEK, H., Vliegenthart, J.F.G., SCHMID, K. Biochem. Biophys. Res. Commun. 92 (1980) 839-845	132	26
VAN DEN EIJNDEN, D.H., SCHIPHOST, W.E.C.M. J. Biol. Chem. 256 (1981) 3159-3162	128	26

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
VANDENHEEDE, J.R., AHMED, A.I., FEENEY, J. J. Biol. Chem. 247 (1972) 7885-7889	44	11
VAN HALBEEK, H., Vliegenthart, J.F.G., Winterwerp, H., Blanken, W.M., Van den Eijnden, D.H. Biochem. Biophys. Res. Commun. 110 (1983) 124-131	292	65
VERBERT, A., CACAN, R., DEBEIRE, Ph., MONTREUIL, J. FEBS-Lett. 74 (1977) 234-238	104	22
VERBERT, A., CACAN, R., MONTREUIL, J. Eur. J. Biochem. 70 (1976) 49-53	95	22
WATKINS, W.M. B.B.A. 5 (1972) 462-515	12	5
WEISER, M.M. J. Biol. Chem. 248 (1973) 2542-2548	103	22
WEISER, M., KLOHS, W., PODOLSKY, D., WILSON, J. 1982, in The Glycoconjugates, Vol. IV, HOROWITZ, M.I., Academic Press, New-York, 301-329	143 166 167	31 36 36
WHITEHEAD, J.S., BELLE, A., KIM, Y.S. J. Biol. Chem. 249 (1974) 3442	231 263	58 59
WILBRANT, R., TUNG, K.S.K., DEODHAR, S.D., NAKAMOTO, S., KOLFF, W.J. Am. J. Clin. Pathol. 51 (1969) 15-23	36	8
WINZLER, R.J. 1970, in Blood in Tissue Antigens, AMINOFF, D. (Ed.) Academic Press, New-York, London, 117-126	29 32 81	8 8 17
YAMASHITA, K., TACHIBANA, Y., KOBATA, A. J. Biol. Chem. 253 (1978) 3862-3869	73	16
YAMASHITA, T., KAMERLING, J.P., KOBATA, A. 1983, in Proceeding of the 7th International Symposium on Glycoconjugates, Lund-Ronneby, Sweden CHESTER, M.A., HEINEGARD, O., LUNDBLAD, A., SVENSSON, S., (Eds) 166-167	328	99
ZANETTA, J.P., BRENHENRIDGE, W.C., VINCENDON, G. J. Chromatogr. 69 (1972) 291-304	310 330 331	74 101 102

	<u>Réf.</u>	<u>Page</u>
ZOPF, D.A., GINSBURG, V. Arch. Biochem. Biophys. 167 (1975) 345-350	195	49
ZOPF, D.A., GINSBURG, A., GINSBURG, V. J. Immunol. 115 (1975) 1525-1529	192	49
ZOPF, D.A., SMITH, D.F., DRZENIEK; Z., TSAI, C.M., GINSBURG, V. 1978, in Methods in Enzymology, Vol. 50, GINSBURG, V. (Ed.) Academic Press, New-York, 171-175	221 306 313	55 72 75
ZOPF, D.A, TSAI, C.M., GINSBURG, V. 1978, in Methods in Enzymology, Vol. 50, GINSBURG, V., (Ed.) Academic Press, New-York, 163-169	177 308	41 72
ZOPF, D.A., TSAI, C.M., GINSBURG, V. Arch. Biochem. Biophys. 185 (1978) 61-71	194 196	49 50



RESUME

La chromatographie d'affinité est une méthode de choix pour isoler des protéides purs et pour déterminer la nature de leurs interactions avec des ligands spécifiques. Dans ce contexte, l'emploi de ligands glycaniques insolubilisés, pour préparer des anticorps mono-spécifiques et des enzymes (glycosyltransférases), s'est révélé beaucoup plus approprié que les méthodes conventionnellement utilisées.

Les oligosaccharides isolés du lait ou de l'urine possèdent des séquences glycaniques comparables à celles des glycoconjugués de surface. Les néoglycoprotéines (antigènes de synthèse) préparées par couplage de ces oligosaccharides à des protéines constituent des immunogènes actifs et induisent, chez l'animal, la formation d'anticorps polyclonaux dirigés contre le glycone lui-même, mais aussi contre la protéine support (sérumalbumine) et contre le bras de couplage. Ces anticorps anti-glycane ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur les glycanes eux-mêmes immobilisés sur un support insoluble. Une méthode a donc été mise au point qui permettra d'explorer les structures glucidiques des membranes cellulaires et qui pourra être améliorée par l'emploi d'anticorps monoclonaux.

Dans une seconde série d'expériences, la démonstration a été apportée que les glycanes immobilisés pouvaient être d'excellents substrats pour isoler les glycosyltransférases. Ainsi, les galactosyltransférases sériques ont été fractionnées sur des ligands glycopeptidiques possédant des résidus de N-acétylglucosamine en position externe. Les mêmes ligands, utilisés pour purifier les galactosyltransférases du lait maternel, ont permis d'isoler deux N-acétylglucosaminidase- β -1,4-galactosyltransférases ayant des affinités différentes, l'une pour la N-acétylglucosamine et l'autre pour le glucose.

Mots clés : chromatographie d'affinité ; glycoconjugués ; galactosyltransférase ; néoglycoprotéines (antigènes de synthèse) ; anticorps anti-glycanes spécifiques.