Nº d'ordre : 62

50376 1986 257

50576

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

par

Bernadette CODDEVILLE



ETUDE COMPARATIVE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES GLYCANNES DE TRANSFERRINES (SERO -, LACTO -, OVO - TRANSFERRINES) DE DIVERSES **ESPECES ANIMALES.** LES GLYCANNES SONT-ILS DES MARQUEURS **DE L'EVOLUTION ?**

Présentée le 12 Décembre 1986 devant la Commission d'Examen

J.

Η.

G.

G.

Β.

Président : Rapporteur : Rapporteur Rapporteur : Examinateur : Examinateur :

MONTREUIL J.F.G. VLIEGENTHART EGGE STRECKER SPIK FOURNET

Ces travaux ont été réalisés dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I (Laboratoire associé au C. N. R. S. n° 217, Directeur : Professeur Jean Montreuil), Sous la direction du Professeur Geneviève Spik. A mes parents,

avec toute ma tendresse, pour leur soutien et leur confiance.

Que ce travail soit pour eux un témoignage de ma profonde reconnaissance.

A toute ma famille.

A Monsieur le Professeur J. Montreuil, Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein du Cg et permis de concrétiser le travail de plusieurs années. En temps qu'étudiante, j'ai pu bénéficier de la qualité de votre enseignement ; Plus tard au laboratoire, l'étendue de vos connaissances, votre compétence scientifique mais aussi votre rigueur m'ont profondément marquée. Je tiens ici à vous exprimer ma respectueuse gratitude.

A Geneviéve,

Depuis mon arrivée au laboratoire, vous m'avez guidée dans mes recherches avec efficacité et compétence. Je vous suis sincèrement reconnaissante pour la réelle confiance que vous m'avez toujours témoignée et pour les précieux conseils que vous m'avez donnés pour la réalisation de cette thèse.

A Monsieur le Professeur J.F.G. Vliegenthard Vous avez largement contribué aux résultats obtenus par les analyses de RMN réalisées et les précieux conseils prodigués. Malgré les multiples tâches qui vous accaparent, vous me faites l'honneur de juger ce travail. Veuillez accepter mes plus vifs remerciements.

A Monsieur le Professeur H. Egge Je vous remercie vivement pour l'efficacité et la rapidité avec lesquelles vous avez réalisé les analyses de F.A.B. ; et je suis très honorée que vous ayez bien voulu accepter de juger ce travail. A Monsieur G. Strecker, Directeur de recherches au CNRS Gérard, j'ai toujours trouvé auprès de toi une grande disponibilité et un profond enthousiasme à faire partager ton expérience dans le domaine des structures des glycannes. Je profite de l'occasion qui m'est donnée pour te remercier pour l'aide et les précieux conseils que tu m'as prodigués ; et je suis heureuse que tu aies accepté de juger cette thèse.

A Monsieur le Professeur B. Fournet Je suis honorée de votre présence dans ce jury et je voudrais vous exprimer mes plus vifs remerciements pour l'intêret que vous voulez bien porter à ce travail. Je remercie également ;

- Jean Michel pour toutes les analyses de RMN réalisées.
 Tu as largement contribué aux résultats que j'ai
 obtenus.
- Anne et Yves pour leur précieuse collaboration technique.
- Annick, Florence, Jean-Pierre, Didier et Mazu pour leur acceuil au "103" et pour les nombreux conseils qu'ils m'ont apportés. Merci pour votre amitié.
- Bruno, Didier, Dominique, Yves et Weili pour l'ambiance chaleureuse et amicale du "103".

- Jo Celen pour son dévouement et son aide.

Que ce mémoire soit pour moi l'occasion d'exprimer à tous mes camarades de laboratoire ma reconnaissance et mon amitié.



sommaire

INTRODUCTION

GENERALITES

Pages

ETUDES STRUCTURALES ET CONFORMATIONNELLES DES TRANSFERRINES

I	-	MISE	E EN EVIDENCE ET ISOLEMENT DES TRANSFERRINES	-	3
II	-	STRU	JCTURE DE LA CHAINE PEPTIDIQUE DES TRANSFERRINES	-	5
		A -	<u>Structure primaire de la chaîne peptidique des ovotransferrines</u>		5
			1) Ovotransferrine de Poule 2) Ovotransferrines de différents oiseaux		
		в –	<u>Structure primaire de la chaîne peptidique des</u> <u>sérotransferrines</u>	-	5
			 <u>Sérotransferrine humaine</u> <u>Sérotransferrines de diverses origines</u> a) Caractérisation b) Etude de la structure primaire de la protéine 		
		C -	c) Polymorphisme génétique de la chaîne peptidique <u>Structure primaire de la chaîne peptidique des</u> lactotransferrines	-	7
			 Lactotransferrine humaine Lactotransferrine de Vache Lactotransferrines d'origines diverses a) Caractérisation 		
		D -	Etude comparée de la structure primaire de la proteine de différentes transferrines	<u>e</u> - 1	_ 4
III	-	CONE	FORMATION GENERALE DES DIFFERENTES TRANSFERRINES	- 1	.9
IV	-	LES	SITES DE FIXATION DU FER	- 1	9

- V STRUCTURE ET CONFORMATION DES GLYCANNES DE TRANSFERRINES 24
 - A Localisation et nombre de glycannes sur les chaînes 24 peptidiques des transferrines
 - 1) Ovotransferrine de Poule
 - 2) <u>Sérotransferrine humaine</u>
 - 3) Lactotransferrines
 - a) Lactotransferrine humaine
 - b) Lactotransferrine de Vache

B - Structure des glycannes de différentes transferrines - 29

- 1) <u>Structure du glycanne de l'ovotransferrine de Poule</u>
- 2) <u>Structure des glycannes des sérotransferrines</u>
 - a) Sérotransferrine humaine
 - b) Sérotransferrines d'origines diverses
 - α <u>Structure des glycannes</u>
 - β <u>Hétérogénéité de la structure des glycannes</u>
- 3) <u>Structure des glycannes des lactotransferrines</u>
 - a) Lactotransferrine humaine
 - b) Lactotransferrine de Vache
- C Conformation des glycannes

ROLES BIOLOGIQUES

I - INTRODUCTION

- 40

- 40

- 36

- II ACTIVITESBIOLOGIQUES DE LA SERCTRANSFERRINE
 - <u>Rôle de la sérotransferrine dans la biosynthèse</u> <u>de l'hémoglobine</u>
 - 2) <u>Rôle de la sérotransferrine dans l'absorption intes-</u> tinale
 - 3) <u>Rôle de la sérotransferrine dans la mise en réserve</u> <u>du fer dans l'hépatocyte</u>
 - 4) <u>Activité bactériostatique</u>
 - 5) <u>Conclusion</u>

· Pages

- 42

III - ACTIVITES BIOLOGIQUES DE LA LACTOTRANSFERRINE

- 1) <u>Rôle de la lactotransferrine dans le stockage du fer</u> dans le foie
- 2) <u>Rôle de la lactotransferrine dans la nutrition en fer</u> du nourrisson et dans l'absorption intestinale
- 3) <u>Rôle de la lactotransferrine dans les mécanismes de</u> <u>défense anti-infectieuse</u>
 - a) Rôle dans l'immunité cellulaire
 - b) Rôle dans l'immunité humorale
- 4) Conclusion

CONCLUSION

TRAVAUX PERSONNELS

INFLUENCE DE LA PROTEINE SUR LA GLYCOSYLATION DES TRANSFERRINES

Etude comparative de la structure des glycannes de la sérotransferrine et de l'ovotransferrine de Poule

I -	INTRODUCTION		48
II -	PREPARATION DE LA SEROTRANSFERRINE DE POULE	-	48
III -	PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES	-	49
	1) Hydrolyse pronasique		

2) Fractionnement des glycopeptides

IV - ETUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES

- 1) <u>Détermination de la composition molaire en</u> <u>monosaccharides</u>
- 2) Méthylation
- 3) Résonance magnétique nucléaire
- 4) Conclusion
- Etude de la structure des glycannes des différents variants de la sérotransferrine de Cheval.

I°	-	IN	TRODUCTION	-	64
II	-	PRI	EPARATION DE LA SEROTRANSFERRINE DE CHEVAL	-	64
III	-	.PRI	EPARATION DES GLYCOPEPTIDES	-	65 [.]
		1)	Hydrolyse pronasique		
IV	-	ET	UDE DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES	-	68
		1)	Détermination de la composition molaire en		
			monosaccharides		
		2)	Identification de l'acide N-acétyl neuraminique des	-	
			glycannes de la sérotransferrine de Cheval		
		3)	Méthylation		
		4)	Résonance magnétique nucléaire		
		5)	Conclusion		
		6)	Discussion		

VARIATIONS DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES DES TRANSFERRINES EN FONCTION DE L'ESPECE ANIMALE

Etude comparée de la structure des glycannes des ovotransferrines de Poule et de Dinde

Pages

- 85

- I INTRODUCTION 82
- II ETUDE DE LA GLYCOPROTEINE DE L'OVOTRANSFERRINE DE DINDE - 82 III - PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES - 84
 - 1) Hydrolyse des glycopeptides
 - 2) Fractionnement des glycopeptides

IV - ETUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES

- 1) <u>Détermination de la composition molaire en</u> monosaccharides
- 2) Méthylation des glycopeptides
- 3) Résonance magnétique nucléaire
- 4) Conclusion

Etude comparée de la structure des glycannes des sérotransferrines humaine , de Mouton, de Boeuf et de Rat

I - INTRODUCTION

- 95

II - ORIGINE DES DIFFERENTES SEROTRANSFERRINES - 95

Pages

- 100

- 1) Sérotransferrine de Mouton
- 2) Sérotransferrine de Boeuf
- 3) <u>Sérotransferrine de Rat</u>

III - PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES

- 1) Hydrolyse pronasique
- IV ETUDE DE LA STRUCTURE GLYCANNIQUE 100
 - 1) <u>Détermination de la composition molaire en</u> monosaccharides
 - 2) Méthylation
 - a) Sérotransferrine de Mouton
 - b) Sérotransferrine de Boeuf
 - c) Sérotransferrine de Rat
 - 3) Résonance magnétique nucléaire
 - 4) Conclusion
 - a) Structure du glycanne de la sérotransferrine de Mouton-
 - b) Structure du glycanne de la sérotransferrine de Boeuf
 - c) Structure des variants glycanniques de la sérotransferrine de Rat
 - d) Discussion

Etude comparée de la structure des glycannes de la lactotransferrine des laits de Vache et de Chèvre

> CARACTERISATION ET FRACTIONNEMENT DES GLYCOPEPTIDES DE LA LACTOTRANSFERRINE DES LAITS DE VACHE ET DE CHEVRE

> > Pages

- I PREPARATION ET ETUDE DE DIFFERENTS ECHANTILLONS DE 114 LACTOTRANSFERRINES DE VACHE EN FONCTION DE LA LACTATION
 - A) Variations du taux de lactotransferrine dans le 114
 lactosérum en fonction de la lactation
 - B) Variations de la composition en glucides des lactotransferrines de Vache en fonction de la lactation - 120
 - 1) Composition centésimale
 - 2) Composition molaire
 - C) <u>Etude comparée de la composition en glucides de la</u> <u>lactotransferrine du lait de Vache avec celles des</u> <u>lactotransferrines isolées des laits de Chèvre et</u> - 120 <u>de Femme</u>
- II PREPARATION ET ANALYSE DES GLYCOPEPTIDES TOTAUX DES LACTOTRANSFERRINES DES LAITS DE VACHE ET DE CHEVRE - 123
- III FRACTIONNEMENT ET CARACTERISATION DES GLYCOPEPTIDESISOLES DES DIFFERENTES LACTOTRANSFERRINES- 125
 - A) Fractionnement et caractérisation des glycopeptides,
 isolés des lactotransferrines de Chèvre 125
 l) Fractionnement sur colonne de ConA-Sepharose 125

Pages

	2)	Etude de la composition glucidique des différente	5
		fractions -	125
	۲)	Chromatographie en couche mince des différentes	
	57	fractions après action de l'endoglycosidase H	125
			220
в)	Fra	actionnement et caractérisation des glycopeptides	
	de	différentes préparations de lactotransferrine de -	120
	Vac	che	
	• •		
	1)	Fractionnement des glycopeptides sur colonne de	1 2 0
			129
	2)	Etude de la composition glucidique des fractions	
		<u>A a D separées sur colonne de ConA-Sépharose</u> -	129
	3)	Etude de la fraction A isolée à partir de la	
		lactotransferrine du lait stabilisé	131
	4)	Etude des fractions B isolées du lait stabilisé	
		et des colostrums	131
		a) Nouvelle chromatographie sur ConA-Sepharose	
	5)	<u>Etude des fractions C isolées du lait stabilisé</u>	
		et des colostrums	132
		a) Nouvelle chromatographie sur ConA-Sepharose	
	6)	Etude des fractions D isolées à partir des diffé-	
		rentes préparations de lactotransferrines _	133
		a) Libération des oligomannosides	
		b) Séparation des oligomannosides par chromatograp	bhie
		liquide en haute pression (HPLC).	
		c) Etude de la composition glucidique des différer	nts
		oligomannosides	
	7)	Conclusion _	138

STRUCTURE DES GLYCANNES DES LACTOTRANSFERRINES DES LAITS DE CHEVRE ET DE VACHE

.

I -	STI	RUCTURE DES GLYCANNES DE LA LACTOTRANSFERRINE DE		142
	Сні	EVRE		
	A)	Méthylation des fractions A, B, C, D séparées sur		
		colonne de ConA-Sepharose	-	142
	B)	Résonance magnétique nucléaire	-	144
	C)	Structures proposées	-	149
TT -	STI	RUCTURE DES GLYCANNES DE LA LACTOTRANSFERRINE DE	_	119
	VAG	CHE		147
	• •			
	A /	Etude de la fraction A	-	149
		1) <u>Méthylation</u>	-	149
	B)	Etude des glycannes de la fraction B	-	151
		1) Méthylation		151
		2) Résonance magnétique nucléaire	-	153
		3) <u>Structure</u>	-	155
	C)	Etude des glycannes des fractions C	-	155
		1) Localisation du résidu de N-acétyl galactosami	ne	155
		a) Hydrolyses enzymatiques		
		α) Recherche de N-acétyl galactosamine situ	ée	
		du côté de la chaîne peptidique		
		β) Recherche de N-acétyl galactosamine situ	ée	

du côté externe

Pages

- 185

1	2)	Méthylation		162
	3)	Spectrométrie de masse en mode d'ionisation par	•	
		bombardement d'atomes accélérés (F.A.B.n.s.)	•	164
	4)	Résonance magnétique nucléaire	-	167
	5)	Structures	-	172
D)	Eti	ude des gl ycannes des fractions D	-	172
	1)	Méthylation	-	168
		a) Etude de la structure de l'oligosaccharide	1	
		b) Etude de la structure de l'oligosaccharide	2	
		c) Etude de la structure de l'oligosaccharide	3	
		d) Etude de la structure de l'oligosaccharide	4	
	2)	Résonance magnétique nucléaire	-	176
	3)	Structures	-	180
	4)	Conclusion	-	182

III - DISCUSSION

CONCLUSION GENERALE

BIBLIOGRAPHIE

APPENDICE TECHNIQUE

sommaire appendice technique

				Рa	ges
I	_	PREF	PARATION DES LACTOTRANSFERRINES	-	211
		A -	Préparation des lactosérums		
			l - Provenance des laits 2 - Délipidation et décaséination		
		в -	Fractionnement des lactosérums		
		с -	Préparation de lactotransferrines réduites et alkylées		
II	-	PREF	PARATION DES SEROTRANSFERRINES	<u> </u>	212
		A –	Préparation de la sérotransferrine de Poulet		
		в –	Préparation de la sérotransferrine de Mouton		
		с –	Préparation de la sérotransferrine de Rat		
		D -	Préparation de la sérotransferrine de Boeuf		
		E –	Préparation de la sérotransferrine de Cheval		
III	-	PREI	PARATION DE L'OVOTRANSFERRINE DE DINDE	-	215
IV		DESA	ATURATION EN FER DES TRANSFERRINES	-	215
		A -	Désaturation en fer des lactotransferrines		
		в –	Désaturation en fer des sérotransferrines		
V		ANAI	LYSE ELECTROPHORETIQUE ET IMMUNOELECTROPHORETIQUE	-	216
		A –	Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de S D S		

- B Etude immunoélectrophorétique
 - 1 Immunodiffusion radiale
 - 2 Immunoélectrophorèse mono et bidimensionnelle

- 217

VI - PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES A PARTIR DES TRANSFERRINES - 216

VII - HYDROLYSES ENZYMATIQUES DES GLYCOPEPTIDES

- A <u>Hydrolyse</u> par l'endo N-Acétyl β D glucosaminidase de Basidiomycés
- $B \frac{Hydrolyse \text{ par l'endo N-acétyl} \beta D}{glucosaminidase H}$
- c Hydrolyse par la neuraminidase
- D Hydrolyse par la β-D galactosidase

VIII - PREPARATION D'OLIGOSACCHARIDES PAR HYDROLYSE ALCALINE - 220

- IX FRACTIONNEMENT DESEGUYCOPROTEINES, DES GLYCOPEPTIDES 220 ET DES OLIGOSACCHARIDES
 - A <u>Chromatographie d'affinité sur colonne de Concana-</u> valine A - <u>Sepharose 4 B (Con A) des glycoprotéines</u> et des glycopeptides
 - B <u>Chromatographie liquide en haute pression (HPLC)</u> des glycopeptides et des oligosaccharides
 - C Séparation sur colonne Amino AS-5A
- X ETUDE DE LA STRUCTURE PEPTIDIQUE

XI - ETUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES

- A Détermination de la composition centésimale
- B <u>Détermination de la composition molaire en</u> <u>monosaccharides</u>
 - 1- Chromatographie en phase gazeuse sur colonne remplie OV 210
 - 2- Chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire OV 201
- C <u>Analyse des monosaccharides sous forme de polyols</u> <u>acétates</u>
- D Identification des acides sialiques
- E Microméthylation
- F Résonance magnétique nucléaire

- 221

- 222

INTRODUCTION

- 1 -

Ces dernières années de nombreuses études ont été réalisées sur la structure primaire et le métabolisme des glycoprotéines des transferrines, en particulier.

Les transferrines appartiennent à une classe de protéines fixant réversiblement deux ions ferriques et dans laquelle la sérotransferrine et la lactotransferrine humaines auxquelles s'ajoute l'ovotransferrine de Poule, sont les mieux connues.

Ces transferrines possédent des activités biologiques différentes et reconnaissent des récepteurs membranaires spécifiques : réticulocytes pour les sérotransferrines, entérocytes et macrophages pour les lactotransferrines, cellules embryonnaires pour les ovotransferrines. Afin de prévoir la nature des déterminants glycanniques et/ou protéiques responsables de la spécificité de reconnaissance membranaire, une étude comparée de la structure des chaînes polypeptidiques et glycanniques a été entreprise.

Les résultats obtenus ont révélé, d'une part, que les séquences peptidiques des trois transferrines présentaient 49 à 59 % d'homologies alors que leurs glycannes manifestaient des différences très marquées. D'autre part, il a été démontré que les glycannes des sérotransferrines ne possédaient aucun rôle dans les mécanismes de reconnaissance des réticulocytes, au contraire ceux de la lactotransferrine humaine pourraient intervenir dans la reconnaissance des récepteurs de la bordure en brosse de l'intestin de Souris et du macrophage alvéolaire humain. Dans le travail que nous avons entrepris, nous avons étendu l'étude comparative de la structure des glycannes des ovo, séro-et lactotransferrines tout en essayant de préciser l'influence de différents facteurs sur la glycosylation tels que :

- La structure de la protéine
- Le site de biosynthèse
- L'influence des conditions physiologiques
- L'influence des variations phylogénétiques

L'influence de la structure de la protéine sur la glycosylation

a été réalisée en comparant d'une part la structure du glycanne présent dans l'ovotransferrine de Poule et dans la sérotransferrine de Poule dont la protéine posséde la même structure mais dont la synthèse est réalisée dans des sites cellulaires différents. D'autre part, nous avons déterminé le nombre de glycannes et la structure des glycannes présents dans trois variants de là sérotransferrine de Cheval.

L'influence des conditions physiologiques sur la glycosylation et en particulier les variations de la structure des glycannes de la lactotransferrine en fonction de la lactation a été réalisée en déterminant la structure des glycannes de la lactotransferrine de Vache isolée soit à partir de la secrétion séche, soit du colostrum, soit du lait mature.

Enfin, les variations de la structure des glycannes des transferrines en fonction de l'espèce animale ont été précisées en effectuant l'étude comparée

- des ovotransferrines de Poule et de Dinde,
- des sérotransferrines de Mouton, de Boeuf, de Rat et de l'Homme.
- des lactotransferrines du lait de la Vache, de Chévre et de Femme.

Cette étude comparative avait pour but de répondre à une question posée dans la littérature : << Les glycannes sont-ils des marqueurs de l'évolution ? >>.

Les transferrines représentent à cet égard un modèle de choix pour ce genre d'exploration. L'ensemble de l'étude comparative des structures glycanniques des différentes transferrines est décrit dans notre présent mémoire.

- 2 -

GENERALITES

ETUDES STRUCTURALES ET CONFORMATIONNELLES DES TRANSFERRINES

I - MISE EN EVIDENCE ET ISOLEMENT DES TRANSFERRINES

Les transferrines sont une famille de glycoprotéines homologues présentes dans les liquides biologiques des vertébrés et de quelques invertébrés véhiculant 0,1 % du fer total de l'organisme, elles assurent la répartition du métal entre les formes actives comme l'hémoglobine, la myoglobine, les cytochromes et les protéines fer-soufre d'une part, et les formes de réserve, comme la ferritine et l'hémosidérine d'autre part.

Le groupe des transferrines de Vertébrés comprend les sérotransferrines (STF), les lactotransferrines (LTF) et les ovotransferrines (OTF) qui sont les mieux connues actuellement.

- LES SEROTRANSFERRINES sont présentes dans le sang. En 1927, Barkan, puis en 1933, Starkenstein et Harwalid avaient remarqué que le fer était fixé par une protéine. Mais ce n'est qu'en 1946 que Schade et Caroline, puis Laurell en 1947 et 1952 établissent l'existence d'un transporteur protéique spécifique du fer.

Depuis la sérotransferrine Humaine a été largement étudiée. Le nombre de procédés de purification de la sérotransferrine est très important. Une méthode couramment utilisée consiste à précipiter le sérum par une solution de rivanol à 0,4 %, selon les techniques de Kistler <u>et al</u>., en 1960, Nagler <u>et al</u>., en 1962 et Roop et Putman en 1967. Cette technique est suivie de chromatographies sur colonnes d'échange d'ions.

- LES LACTOTRANSFERRINES (ou lactoferrines) se trouvent dans le lait des mammiféres et d'une manière générale dans les secrétions. La lactotransferrine Humaine a été isolée à partir du lait de Femme dès 1960 par Montreuil et Coll.,

La présence d'une protéine rouge dans le lait de Vache a été signalée pour la première fois par Sørensen et Sørensen en 1939. En 1943, Théorell et Akeson remarquent également cette protéine sans pouvoir l'identifier. Pollis et Shmukler en 1953, précisent qu'elle contient du fer, des glucides et une proportion élevée en tryptophane. Ce n'est qu'en 1960 que Groves réussit à isoler et purifier la lactotransferrine.

Puis en 1962, Gordon et Ziegler mettent au point un autre procédé de préparation. Néanmoins, les différentes méthodes de fractionnement utilisées par Szuchet, Derechin et Johnson en 1965, par Oram et Reiter en 1968 et Castellino <u>et al</u>., en 1970 restent complexes d'autant que le lait renferme peu de lactotransferrine et que les préparations sont hétérogènes.

En 1977, Chéron <u>et al</u>., utilise un procédé original d'isolement de cette glycoprotéine. Au Laboratoire, une méthode dérivée de celle mise au point par Chéron en 1977 est également utilisée pour la préparation de la lactotransferrine Humaine.

- LES OVOTRANSFERRINES (ou Conalbumines) sont présentes dans le blanc d'oeuf des Oiseaux. Mise en évidence en 1899 par Osborne, son rôle de fixation du fer n'a été démontré qu'en 1944 par Schade et Caroline.

Les ovotransferrines sont préparés à partir du blanc d'oeuf précipité au sulfate d'ammonuim selon les méthodes mises au point par Warner et Weber en 1951 et Rhodes et al., en 1958.

Récemment des transporteurs du fer analoques aux transferrines ont été mis en évidence chez des Invertébrés, en particulier chez un <u>Arthropode</u> (Cancer magister) par Huebers <u>et al.</u>en 1982 et chez un <u>Protochordé</u> (Pyura stolonifera) par Martin et al., en 1983.

De nombreuses revues générales ont été consacrées aux transferrines : (Bezkorovainy et Zschocke en 1974, Aisen et Brown en 1975 et 1977; Lane en 1976, Hershko en 1977, Mazurier en 1980, Aisen et Litowsky en 1980 et Gorinsky en 1982) et sur la base de nos connaissances actuelles, nous nous proposons de faire le point sur les propriétés physico-chimiques et biologiques des transferrines en nous attachant plus particulièrement à l'étude de la structure des glycannes de ces différentes transferrines.

- 4 -

II - STRUCTURE DE LA CHAINE PEPTIDIQUE DES TRANSFERRINES

- A <u>Structure primaire de la chaîne peptidique des</u> ovotransferrines
 - 1) Ovotransferrine de Poule

La structure primaire de la chaîne peptidique de l'ovotransferrine de Poule (OTF) est connue grâce aux travaux de Jeltsh et Chambon en 1982. Ces auteurs ont déterminé la séquence nucléotidique codant pour l'ovotransferrine alors que Williams <u>et al</u>., en 1982 ont déterminé la séquence peptidique compléte par l'application de méthodes classiques. La chaîne peptidique renferme 686 acides aminés et un glycanne unique, ce qui lui confére une masse moléculaire de 77770 daltons.

2) Ovotransferrines de différents oiseaux

En ce qui concerne les ovotransferrines d'origines diverses, elles ont simplement été caractérisées dans certains blancs d'oeufs.Feeney <u>et al</u>., en 1960, ont déterminé le pourcentage d'ovotransferrineprésent dans le blanc d'oeuf d'Oie, de Faisan, de Dinde et de Pigeon. Graham et Williams en 1975, ont isolé et caractérisé l'ovotransferrine du blanc d'oeuf de Canard.

B - <u>Structure primaire de la chaine peptidique des</u> <u>sérotransferrines</u>

1) Sérotransferrine Humaine

La structure primaire de la chaîne peptidique de la sérotransferrine Humaine (hSTF) a été entièrement déterminée par Mac Gillivray <u>et al</u>., en 1982 et 1983. D'après les résultats de ces auteurs, la sérotransferrine est constituée d'une seule chaîne protéique comportant 679 acides aminés et possédant une masse moléculaire, incluant les deux glycannes, de 79650 daltons.

2) Sérotransferrines de diverses origines

a) Caractérisation

Des sérotransferrines ont été caractérisées dans le sérum de divers animaux.

Sérotransferrines de Mammiféres

Les sérotransferrines de mammiféres qui ont été caracté risées sont celles :

- 5 -

- du Boeuf par Hudson <u>et al</u>., en 1973, Brock <u>et al</u>., en 1976 et 1978, Hatton et al., en 1974 et 1978.
- du Cheval par Stratil et Glasnak en 1981.
- du Mouton par Spooner et al., en 1975, Guerin et al., en 1976.
- du Porc par Stratil et Kubek en 1974.
- du Babouin par Bezkorovainy et Grohlich en 1974.
- du Chien par Hatton et al., en 1978.
- du *Lapin* par Léger <u>et al</u>., en 1978.
- des Marsupiaux par Morgan en 1985 (résultats non publiés).
- du Rat par Kanda et al., en 1983.
- de la Souris par Sawatzki et al., en 1983.

Sérotransferrines d'Oiseaux

Les sérotransferrines d'oiseaux actuellement caractérisées sont celles :

- de la Poule par Grahan et Williams en 1975, Spik <u>et al</u>., en 1981 (résultats non publiés).
- de la Tourterelle par Palmour et Sutton en 1971.
- de la Colombe par Frelinger en 1973.

Sérotransferrines de Batraciens

Seule la sérotransferrine de Grenouille a été caractérisée par Palmour et Sutton en 1971.

Sérotransferrines de Poissons

Stratil <u>et al</u>., en 1983 ont caractérisé les sérotransferrines de *Poissons* qui appartiennent à la famille des "Cyprinidae".

Sérotransferrines d'Arthropodes

En 1982, Huebers <u>et al</u>., ont isolé du sang d'un Arthropode (Cancer magister) une protéine de masse moléculaire 150 000 \pm 10 000 daltons fixant deux atomes de fer. En 1983, Martin <u>et al</u>., ont réussi, à purifier une protéine ayant une masse moléculaire de 40 000 et fixant un atome de fer chez un *Protochordé* (Pyura stolonifera). Ces deux protéines bien que différentes des transferrines de vertébrés possédent des critères suffisants pour que le nom de transferrine leur soit donné.

b) Etude de la structure primaire de la protéine

Ces différentes transferrines caractérisées dans le sérum de nombreuses espéces animales ont été trés peu étudiées. L'étude de la structure primaire de la protéine n'a pas été réalisée ; seules sont parfois connues leur masse moléculaire, leur mobilité électrophorétique, leur capacité de fixation du fer ou leur composition en acides aminés.

La masse moléculaire a été déterminée par de nombreux auteurs et les résultats obtenus sont compris entre 41 000 et 96 000 daltons selon les méthodes utilisées (constante de sédimentation, gel filtration ou électrophorèse en gel de polyacrylamide).

Cependant nous constatons selon les valeurs données dans le tableau I(p. 8) que les masses moléculaires des transferrines provenant d'espéces animales différentes restent assez semblables.

Les compositions en acides aminés des différentes sérotransferrines étudiées présentent de nombreuses analogiescomme le montre le tableau II(p. 9).

c) <u>Polymorphisme génétique de la chaîne protéique des</u> sérotransferrines

La présence de variants génétiques a été observée dans les sérotransferrines de nombreux animaux domestiques. C'est le cas de la sérotransferrine de Boeuf où des variations génétiques trés complexes ont été trouvées par Richardson <u>et al</u>., en 1973 Hatton <u>et al</u>., en 1977. Maeda <u>et al</u>., en 1980 qui ont isolé quatre variants de la sérotransferrine bovine. Maeda <u>et al</u>., en 1980, ont suggéré néanmoins que l'hétérogénéité serait due en partie à une scission de la chaîne polypeptidique car les composants génétiques possédent une mobilité électrophorétique plus grande.

En 1983, Stratil <u>et al</u>., ont montré qu'il existait un polymorphisme important dans la transferrine d'un poisson. En effet, six à treize variants génétiques trés hétérogènes sont détectés selon les espéces de Barbeau étudiées.

C - <u>Structure primaire de la chaîne peptidique des</u> lactotransferrines

1) Lactotransferrine Humaine

Les travaux réalisés par notre laboratoire en collaboration avec celui du Professeur P. Jollés ont abouti en 1985 à la détermination de la séquence compléte de la lacto-

TABLEAU I

•

Masses moléculaires de transferrines de diverses origines

ORIGINE	MASSE MOLECULAIRE	REFERENCES						
Sérotransferrines								
Lapin	76000 - 79500	Palmour et Sutton 1971						
Boeuf	77300	Hudson <u>et al</u> ., 1973 Hudson <u>et al</u> ., 1973						
Mouton	77000 - 77500	Guérin <u>et al</u> ., 1976						
Porc	76400	Hudson <u>et al</u> ., 1973						
Cheval	70000 - 80500	Hudson <u>et al</u> ., 1973 Bell <u>et al</u> ., 1981						
Babouin	77000	Berzkorovainy et Groh-						
Rat	66000 - 83000	Van Eigk <u>et al.</u> , 1972 Schreiber et al., 1979						
Souris	77500	Sawatzki <u>et al</u> ., 1983						
Tourterelle	85000 - 96000	Palmour et Sutton 1971						
Calombe	80000	Frelingen 1973						
Grenouille	72000 - 81000	Palmour et Sutton 1971						
Tortue	93700	Palmour et Sutton 1971						
Poissons	61000 - 87000	Stratil <u>et al</u> ., 1983 Bobak et al., en 1984						
Cyclostone	41000 - 45500	Palmour et Sutton 1971						
Protochordé (Pyura stolonifera)	40000	Martin <u>et al</u> ., 1983						
Arthropode (Cancer magister)	140000 - 160000	Huebers <u>et al</u> ., 1982						

- 8 -

TABLEAU II

Compositions molaires en acides aminés des

sérotransferrines de diverses origines

Acides	Origines des sérotransferrines													
Aminés	Babouin (a)	Boeuf (b)	Cheval (b)	Grenouil_ (c) le	Lapin (d)	Porc (b)	Tortue (ç)							
Asp (D)	78	74	73	68	70	78	79							
Thr (T)	29	44	32	37	20	25	53							
Ser (S)	42	49	39	39	34	35	65							
Glu (E)	. 61	63	60	65	61	59	80							
Pro (P)	31	35	42	37	33	36	33							
Gly (G)	45	45	42	48	45	35	64							
Ala (A)	59	49	50	55	51	48	60							
Cys (C)	38	34	33	25	32	33	17							
Val (v) .	38	44	44	37	42	41	56							
Met (M)	9	7	4	8	6	5	8							
Ile (I)	12	17	16	29	15	17	30							
Leu (L)	60	45	54	50	58	53	60							
Tyr (Y)	20	20	21	20	29	16	24							
Phe (F)		-	-	-		-	-							
Trp (W)	-	10	9	5	10	9	3.0							
Lys (K)	53	52	44	72	52	41	59							
His (H)	19	15	14	16	16	12	15							
Arg (R)	25	24	23	20	24	23	28							
	666	652	620	652	616	589	• 772							

a) Bezkorovainy et Grohlich en 1974
b) Hudson <u>et al</u>., en 1973
c) Palmour et Sutton en 1971

d) Baker et al., en 1968

transferrine humaine (hLTF) ; elle renferme 703 aminés, la présence de deux glycannes fucosylés lui conférant une masse moléculaire de 81442 daltons.

2) Lactotransferrine de Vache

Les études réalisées n'ont permis que d'acquérir des résultats partiels sur la structure de la chaîne peptidique Gordon et al., en 1962, Groves en 1960, Castellino et al., en 1970, Chéron en 1975 ont tous identifié un résidu d'alanine en position N-Terminale. En 1984, au Laboratoire nous avons également retrouvé en appliquant la méthode d'Edman, un résidu d'alanine en position N-Terminale. En 1985, l'équipe de Sautière à Lille a déterminé la séquence N-Terminale par identification des P.T.H. acides aminés et séparation en chromatographie liquide en haute pression. Les résultats obtenus sont présentés dans la Fig. l(p. ll). Cette analyse a également permis de localiser un résidu de proline en position 14. La nature de l'acide aminé C-Terminal reste mal définie puisque Mazurier en 1972 a montré la présence de deux acides aminés dans les proportions suivantes 0,9 résidu de thréonine et 0,4 résidu de valine. La présence d'un résidu de thréonine dans la séquence peptidique d'un glycopeptide isolé par Chéron en 1975 d'un hydrolysat trypsique confirmerait l'hypothèse de la thréonine en position C-Terminale. D'autre part, les résultats obtenus par Maliet et Plantey en 1977 après hydrolyse par la carboxypeptidase A de la lactotransferrine désaturée, sont en désaccord avec cette hypothèse Ces auteurs ont libéré de la leucine et de la phénylalanine.

Un dosage des différents résidus d'acides aminés a également été réalisé au Laboratoire de Sautière en 1985 sur un autoanalyseur BECKMAN. Le tableau III (p.12), nous donne la composition molaire en acides aminés de la lactotransferrine Bovine déterminée par Castellino <u>et al</u>., en 1970, Chéron en 1975, Maliet et Plantey en 1977, Sautière en 1985, et comparée à celle de la lactotransferrine humaine déterminée par Metz - Boutique <u>et al</u>., en 1984.

3) Lactotransferrines d'origines diverses

a) <u>Caractérisation</u>

Les lactotransferrines de divers mammifères ont été beaucoup moins étudiéesque les sérotransferrines.

- 10 -

LTH : G R R R R S V - Q W C A Y S Q P E A T K C F Q W Q R N M R K

LTB	:	A	Р	R	К	N	V	-	R	W																				
				c	ou	οι	ı	. .																						
					Н	М																								
LTJ	:	A	Ρ	R	К	s	V	-	R	W	С	т	I	S	Ρ	A	Е	A	A	к	С	A	К	F	Q	R	N	М	к	K
STF	:	v	P	D	K	т	V		R	W	с	A	V	S	E	Н	E	A	т	К	с	Q	S	F	R	D	Н	М	K	S
OTF	:	A	Р	Ρ	к	s	v	Ι	R	W	С	т	I	s	S	Р	Е	Е	K	к	С	N	N	L	R	D	L	т	Q	Q

Figure 1

Comparaison des séquences N-Terminales des lactotransferrines Humaines (LTH) (Metz-Boutique et al., en 1984), de Vache (LTB) Sautière en 1985 (communications personnelles), de Jument (LTJ) (Jollés <u>et al.</u>, en 1984) de la sérotransferrine Humaine (STH) (MacGillivray et al., en 1982 et1983) de l'ovotransferrine de Poule (OTF) (Jeltsch et Chambon en 1982).

Κ

TABLEAU III

Composition en acides aminés de la lactotransferrine

	T.							
Nature des	Lacto	transferr	Humaine					
acides aminés	a	b	с	d	e			
Asp (D)	69	59,4	62	71	71			
Thr (T)	36	30,3	35	39	31			
Ser (S)	39	40,2	45	45	50			
Glu (R)	74	62,5	65	73	70			
Pro (P)	37	28,3	27	31	35			
Gly (G)	49	41	45	43	56			
Ala (A)	66	56,3	62	59	63			
Cys (C)	26	30,3	28	28	32			
Val (V)	45	32,8	40	43	49			
Met (M)	6	3,1	4	4	6			
Ile (I)	18	11,6	15	17	16			
Leu (L)	68	55,4	62	61	61			
Tyr (Y)	26	17,7	18	19	20			
Phe (F)	29	23,2	24	25	31			
Lys (K)	58	47,6	47	42	46			
His (H)	10	8,2	٩.	10	9			
Arg (R)	38	31,2	32	32	46			
Trp (W)	-	-	14	9	11			

de Vache et de la lactotransferrine Humaine

a) Sautière en 1985

b) Maliet et Plantey en 1977

- c) Chéron en 1975
- d)Castellino <u>et al</u>., en 1970
- e) Metz Boutigue et al., en 1981

Masson et Heremans en 1971 ont identifié cette glycoprotéine dans le lait de diverses espéces animales telles que la Truie, la Jument, le Cobaye par électrophorèse sur acétate de cellulose et par des techniques immunologiques.

Cette glycoprotéine a également été mise en évidence dans les laits de Chévre (Oram et Reiter en 1968), de Souris (Kinkade et al., en 1976, Sawatzki <u>et al</u>., en 1983).

Selon les travaux de Masson et Heremans en 1971, les lactosérums de Lapine, de Ratte et de Chienne semblent dépourvus de lactotransferrine.Baker <u>et al</u>., en 1968 ont confirmé ce résultat pour le lait de Lapine. En effet, ils ont caractérisé dans ce lait, une glycoprotéine correspondant à de la sérotransferrine désialylée.

> b) <u>Etude de la structure primaire de la protéine</u> des lactotransferrines

Les lactotransferrines d'origines diverses étant beaucoup moins étudiées, peu de résultats sont connus concernant la chaîne peptidique.

Selon Kinkade <u>et al</u>., en 1976, la masse moléculaire de la lactotransferrine de Souris oscille entre 75000 et 78000 daltons Jollés <u>et al</u>., en 1984 attribue à la lactotransferrine de Jument une masse moléculaire de 81000 daltons.

Peu de différences, également séparent la composition en acides aminés des lactotransferrines de divers animaux. (Masson en 1970, Kinkade <u>et al</u>., en 1976). En 1970, Masson a montré que la lactotransferrine de Cobaye était beaucoup plus riche en résidus d'arginine.Jollés <u>et al</u>., en 1984 ont isclé la lactotransferrine de Jument. Ils ont étudié sa composition en acides aminés et la séquence N-Terminale, ils ont ainsi déterminé les 28 premiers acides aminés. La comparaison de cette séquence N-Terminale avec les séquences correspondantes de la lactotransferrine et de la sérotransferrine Humaine et de l'ovotransferrine de Poule montre qu'une homologie plus importante existe avec l'ovotransferrine de Poule (Fig. l; p. 11). D - Etude comparée de la structure primaire de la protéine de différentes transferrines

Comme nous le montrent les chapitres précédents, les transfèrrines les mieux connues sont la sérotransferrine et la lactotransferrine Humain**es**ainsi que l'ovotransferrine de Poule. Leurs structures primaires complétes sont données à la Fig. 2 (p. 15).

Ainsi que nous pouvons le constater dans cette figure les transferrines possédent de nombreuses homologies, STF - LTF : 59 % d'homologie, LFT - OTF : 49 % d'homologie. Ces trois transferrines possédent également des homologies internes : 35 % pour la lactotransferrine Humaine, 41 % pour la sérotransferrine Humaine, et 33 % pour l'ovotransferrine de Poule.

L'existence de ces homologies internes dans la chaîne peptidique a permis de mettre en évidence la présence de deux lobes possédant chacun un site de fixation du métal. Ces observations confirmées par les travaux de Mac Gillivray <u>et al</u>., en 1977, en 1982 et 1983, Metz Boutique <u>et al</u>., en 1978, 1981, 1982 et 1984, Mazurier <u>et al</u>., en 1983, Williams <u>et al</u>., en 1982 ont entrainé l'hypothèse de la duplication d'un gène ancestral codant pour les transferrines.

C'est ainsi que Mac Gillivray <u>et al</u>., en 1977 ont observé que la sérotransferrine humaine pouvait être partagée en quatre régions structurales. La glycoprotéine serait donc le descendant d'une protéine ancestrale quatre fois plus petite que la molécule actuelle. Toutefois, Metz-Boutigue <u>et al</u>., en 1981 émettaient l'hypothèse de l'explication d'un gène ancestral codant pour les transferrines. Cette hypothèse a été avancée sur la base d'homologies internes de séquences retrouvées à un pourcentage trés faible cependant, dans trois zones de chaque moitié N et C-Terminale des transferrines.

En conséquence de l'hypothèse de l'hexaplication, Mazurier <u>et al</u>., en 1983 montrent que la lactotransferrine Humaine serait constituée de six domaines répartis trois par trois dans les parties N-Terminales (ND l à ND 3) et C-Terminales (CD l à CD 3) de la molécule. Les six domaines seraient formés de 110[±] 10 acides aminés, ils présentent plusieurs homologies structurales 70 % entre les domaines ND 4 et CD l et les domaines ND 3 et

	• •
LTF STF STF	I K NO S P I O C TO A I A C X # (A) D A Y K K A S Y L O C TA A A A K CAOA Y O L A Y L O C TA A A A K CAOA Y O L A Y L O C TA A A A K CAOA Y O L A Y L O C TA A A A K CAOA Y S A S T T C O C TA L Y A K O C A A K CAOA Y S A S T T C O C TA L Y A K O C A A K CAOA Y S A S T T C O C TA L Y A K O C A A K
	1 High King King <t< th=""></t<>
	TY TAY A TY VIE KIG G S F O L H E L O G L E S C H TIG L F T A G W H Y F I E G Y Y A Y A Y Y K KID S G F O M H O L R G K K S C H T G L G R S A G W H I F I E Y Y A Y A Y Y K KID S G F O M H O L O G K K S C H T G L G R S A G W H I F I E Y Y A Y A Y Y K KIG T E F T Y H O L O G K K S C H T A Y O R T A G W H I F I K Y T A Y A Y Y K KIG T E F T Y H O L O G K K S C H T A Y O R T A G W H I F I K Y T A Y A Y Y K KIG T E F T Y H O L O G K K S C H T A Y O R T A G W H I F I K Y T A Y A Y Y K KIG T E F T Y H O L O G K K S C H T A Y O R T A G W H I F H G Y T A Y A Y K K S A S O L T Y O H L K G K K S C H T A Y O R T A G W H I F H G Y F A Y A Y A Y K K S A S O L T Y O H L K G K K K S C H T A Y G R T A G W H I F H K Y F A Y A Y K R K S O L T W O H L K G K K K S C H T A Y G R T A G W H I F H K Y F A Y A Y K R K S O L T W O H L K G K K K S C H T A Y G R T A G W H I F H K Y F A Y A Y K R K S O L T W O H L K G K K K S C H T A Y G R T A G W H I F H K Y F A Y A Y K R K S O L T W O H L K G K K K S C H T A Y G R T A G W H I F H K Y F A Y A Y K R K S O L T W O H L K G K K K S C H T A Y G R T A G W H I F H K Y F A Y A Y K R K S O L T W O H L K G K K K S C H T A Y G R T A G W H I F H K Y F A Y A Y K R K S O L T W O H L K G K K K S C H T A Y G R T A G W H I F H K Y F A Y A Y K R K K S O L T W O H L K G K K K S C H T A Y G R T A G W H I F H K S C H T A Y G R T A G W H I F H K S C H T A Y G R T A G W H I F H K S C H T A Y G K T A K Y K S C H T A Y G R T A G W H I F H K S C H T A Y G K T A K Y K K S C H T A Y G R T A G W H I F H K S C H T A Y G R T A G W H I F H K S C H T A Y G K T A K Y K K S C H T A Y G K T A K Y K K S C H T A Y G K T A K Y K K S C H T A Y G K T A K Y K K K S C H T A Y G K Y K Y K K S C H T A Y G K Y K Y K K K S C H T A Y G K Y K Y K Y K K K S C H T A Y G K Y K Y K Y K Y K Y K Y K Y K Y K K Y Y K Y K Y K Y K Y K Y K Y Y Y Y K Y K Y K Y Y Y Y K Y Y Y Y
	$\begin{bmatrix} \mathbf{v} & \mathbf{A} & \mathbf{F} \\ \mathbf{v} & \mathbf{F} & \mathbf{v} & \mathbf{F} \\ \mathbf{v} & \mathbf{F} & \mathbf{v} \\ \mathbf{v} \\ \mathbf{v} & \mathbf{v} \\ \mathbf{v} $
	$\begin{bmatrix} z & y & z \\ z & z & z \\ z & z & z \\ z & z & z$
	P 2 1,0 3 G L(T L G 5 G H) F T A 1 0 R L H K S E T E Y A P 2 1,0 3 G L(T L G 5 G H) F T A 1 0 R L H K S E T E Y A P 2 N 0 A E H F L G T C T Y Y T A 1 R R L H G G T C F E A F T S L H 0 S 0 L T L G F C Y Y S A 1 0 S H H E 0 0 L T F S F G X T T Y C K T L G F 0 Y Y X A 1 T K L X C S T S F L L E A C E F L R Z 0 R N T Y C K T L G E C Y Y Y S A 1 0 K H H K C S T S S L L C A C T F R R F G X T T Y C K T L G E C Y Y Y T S A L X K Y G K L X K C S T S S L L C A C T F R R F

Figure 2

Comparaison des structures primaires de la lactotransferrine Humaine (LTF - Metz Boutique <u>et al</u>., en 1984), de la sérotransferrine Humaine(STF - Mac Gillivray <u>et al</u>., en 1983) et de l'ovotransferrine de Poule (OTF - Jeltsch et Chambon en 1982).

- 15 -

CD 3. La Fig. 3 p. 17 rend compte de la position des six domaines sur un modèle de la chaîne peptidique en deux dimensions dit "modèle en ficelle" inspiré de celui proposé par Williams et al., en 1982.

Des ponts disulfures jouent un rôle important dans la conformation de la protéine, la connaissance de leur position sur la chaîne peptidique des transferrines est primordiale.

Ainsi qu'il est montré dans la Fig. 4 (p. 18), l'ovotransferrine de Poule posséde 30 résidus de demi-cystines, 12 d'entre eux sont situés dans la moitié N-Terminale et 18 dans la moitié C-Terminale ; la position de 12 ponts disulfures a été précisée (Elleman et Williams en 1978). Dans la sérotransferrine humaine qui contient 38 résidus de demi-cystine 16 sont situés dans la moitié N-Terminale et 22 dans la moitié C-Terminale ; 6 ponts disulfures sur 19 ont pu être localisés (Mac Gillivray <u>et al</u>., en 1983). La lactotransferrine Humaine posséde 32 résidus de demi-cystine, 12 sont situés dans la moitié N-Terminale et 20 dans la moitié C-Terminale.

De plus, les ponts disulfures de ces transferrines sont dans des positions homologues sur les chaînes peptidiques. En terme d'évolution et selon Williams en 1982, les parties N et C-Terminales sont homologues et proviennent d'une protéine ancestrale commune qui s'est modifiée au cours du temps. Toutes les transferrines actuelles seraient issues d'un même gène. Le domaine N-Terminal de l'ovotransferrine aurait une structure voisine du précurseur de ces transferrines. La masse moléculaire aurait été de 40 000 ; il aurait possédé six ponts disulfures et un seul site de fixation du métal.

Metz Boutigue <u>et al</u>., en 1981 et Mazurier <u>et al</u>., en 1983 en postulant l'existence de six domaines suggérent la possibilité d'une hexaplication du même gène ancestral. Dans ce cas, la protéine ancestrale aurait 1/6 de la taille de la transferrine actuelle.

En ce qui concerne les trois transferrines les mieux connues la comparaison de leur structure primaire compléte (Fig. 2,p. 15) montre l'existence de nombreuses homologies dans les ponts disulfures des moitiés N et C-Terminales. Cependant, l'ovotransferrine de Poule est la plus simple des glycoprotéines alors que la lactotransferrine Humaine semble la plus complexe.

- 16 -




III - CONFORMATION GENERALE DES DIFFERENTES TRANSFERRINES

Tous les auteurs sont d'accord pour définir les transferrines comme des éllipsoïdes de révolution. Pour la sérotransferrine Humaine, les mesures effectuées par diffusion de neutrons montrent que l'éllipsoïde posséde des demi-axes de 46,6 et 15,8 A°. Son volume étant de 144 ($\stackrel{+}{-}$ 45) x 10 ³ A° 3 (Martel <u>et al</u>., en 1980).

- +

Des études cristallographiques ont été entreprises sur la sérotransferrine de Lapin par Al-Hilal <u>et al</u>., en 1976 et Gorinsky <u>et al</u>., en 1979, sur celle de Porc par Magdoff <u>et al</u>., en 1970, ainsi que sur la lactotransferrine Humaine par Baker <u>et al</u>., en 1977. Ces données sont résumées dans le tableau IV(p. 20).Gorinsky <u>et al</u>., en 1979 ont proposé un modèle moléculaire de la sérotransferrine de Lapin résultant de l'analyse par diffraction aux rayonsX des cristaux. La sérotransferrine de dimension 95 x 60 x 50 A° est constituée de deux lobes égaux creusés d'une cavité ouverte sur l'axe de symétrie formant entre eux un angle de 30°. Ces lobes correspondent sans doute aux deux lobes de la protéine (Fig. 5;p. 21).

Les travaux cristallographiques d'Abola <u>et al</u>., en 1983 sur l'ovotransferrine de Poule montrent que la molécule est constituée de deux parties repliées d'une manière indépendante ayant des tailles similaires bien que l'une d'entre elle (A) apparaît être plus globulaire que l'autre (B).

Ces deux régions possédent des dimensions approximatives de 56 A° x 40 A° pour A et 60 A° x 36 A° pour B. Dans la partie B il existe une rainure profonde ressemblant à une frontière entre deux régions égales de cette partie d'où la question de l'existence de sous-domaines dans l'ovotransferrine et dans les transferrines en général.

IV - LES SITES DE FIXATION DU FER DES TRANSFERRINES

Pour une étude plus approfondie, nous renvoyons aux revues générales de Chasteen en 1977, Aisen et Brown en 1975, et aux deux ouvrages édités par Crichton en 1975 et par Brown en 1976.

Toutes les transferrines fixent réversiblement deux atomes de fer en développant une coloration rose saumon (Laurell en 1947). Le premier schéma du site de fixation du fer a été donné

TABLEAU IV

Paramétres cristallographiques des transferrines

<u>saturées en fer</u>

	Lactotransferrine humaine (a)	Sérotransferrine de porc <u>(</u> b)	Sérotransferrine de lapin (c)
Température de cristallisation	4° C	4° C	5° C
Système de cristallisation	orthorombique	orthorombique	tétragonal
Pourcentage d'eau	42 p 100	-	68 p 100
Masse moléculaire	85000	-	-
Dimension des	a) 155,5	87,1	126,9
axes	b) 97,3	88,3	126,9
	,c) 55,5	114,0	145,2

a) Baker <u>et al</u>., 1977

b) Magdoff <u>et al</u>., 1970

c) Al Hilal <u>et al</u>., 1976



- 20 -



Figure 5

Conformation de la molécule de sérotransferrine de Lapin, d'après les études réalisées par diffraction des rayons X avec une résolution de 6 A° par Gorinsky <u>et al</u>., en 1979.



par Feeney <u>et al</u>., en 1966. La fixation d'un ion métallique nécessite celle simultanée d'un ion bicarbonate ou carbonate lié électrostatiquement au fer et à un acide aminé chargé positivement : Arg, Lys ou His. Des méthodes optiques et chimiques ainsi que des études de fluorescence ont démontré la participation de deux à trois résidus de tyrosine, d'un à deux résidus d'histidine et d'une molécule d'eau liée directement au fer.

Les travaux réalisés par Legrand <u>et al</u>., en 1985 ont permis de proposer un modèle tridimensionnel de la cage de fixation du fer, commun à la sérotransferrine et à la lactotransferrine Humaine et à l'ovotransferrine de Poule (Fig. 6;p. 23). Ce modèle général qui a permis de localiser les acides aminés a été proposé sur la base de trois principes :

 1) En considérant la séquence primaire totale des acides aminés de la lactotransferrine Humaine, il apparaît que seulement 77 acides aminés sont localisés dans des régions conservées.
Parmi ces résidus, 57 % d'entre eux sont retrouvés dans 8 ensembles présentés à la Fig. 7(p. 23).

Les résidus de tyrosine et d'histidine intervenant comme ligands du fer sont localisés dans les ensembles conservés 1, 2, 4 et 3, 7. Les résidus d'arginine intervenant comme ligand de l'anion sont présents dans les ensembles conservés 3, 6 et 7.

Comme il est montré dans la Fig. 7 outre les acides aminés conservés, il y a douze demi-cystinesqui correspc dent aux ponts disulfures l à 6 localisés dans les lobes N et C-Terminaux (Williams et al., en 1982).

2) La structure secondaire des 36 segments peptidiques renfermant les acides aminés conservés a été déterminée en utilisant les paramétres conformationnels établis par Garnier <u>et al</u>., en 1978. Les résultats obtenus montrent qu'il y a une concordance parfaite entre l'homologie des structures primaires et secondaires de tous les ensembles impliqués excepté l'ensemble d'acides aminés l.

3) Legrand <u>et al</u>., en 1984 ont isolé du lobe N-Terminal de la lactotransferrine Humaine, un glycopeptide de 18 kDa fixant encore un atome de fer. Ce glycopeptide renferment les ensembles d'acides aminés 2, 4, 6 et 7 ainsi que les 2 tyrosines et les 2 histidines représentés sur le modèle de la Fig. 6(p. 23).

ENSEMBLE 2



Figure 6

Proposition de la conformation de la " cage du fer " des transferrines.X peut être une molécule d'eau ou le résidu de tyrosine impliqué dans le ligand l



Figure 7

Position des acides aminés conservés présents dans 8 régions homologues des lobes N et C- Terminaux de la sérotransferrine et de la lactotransferrine Humaines et de l'ovotransferrine de Poule (Legrand <u>et al</u>., en 1985).

- 23 -

En conclusion, chaque site de fixation du fer des transferrines comporte au moins 3 tyrosines, 2 histidines et 3 arginines localisées dans des régions conservées de la chaîne peptidique.

V - STRUCTURE ET CONFORMATION DES GLYCANNES DES TRANSFERRINES

A - Localisation et nombre de glycannes sur les chaines peptidiques des transferrines

Les glycannes des transferrines sont fixés par une liaison N-glycosidique sur la chaîne peptidique au niveau des séquences codes Asn -X-Thr/Ser.

Cependant la présence de ces séquences n'entraîne pas forcément la glycosylation de la protéine (Tableau V;p. 25).

1) Ovotransferrine de Poule

L'ovotransferrine de Poule ne renferme qu'un seul glycanne localisé sur la fraction peptidique aspartyl - lysine de la chaîne protéique (Spik <u>et al</u>., en 1979). Trois séquences codes apparaissent dans la moitié C-Terminale. Une seule est glycosylée.

2) <u>Sérotransferrine Humaine</u>

Les deux glycannes de la sérotransferrine Humaine sont localisés sur les fractions peptidiques séryl - aspartique et aspartyl - lysine de la chaîne protéine (Spik <u>et al</u>., en 1968 et Spik et Montreuil en 1969). Seules deux séquences codes ont été mises en évidence, dans la sérotransferrine Humaine. Elles sont toutes deux glycosylées et sont situées au niveau des domaines CD1 et CD3 (Mac Gillivray <u>et al</u>., en 1983, Mazurier <u>et al</u>., en 1983). Regoeczi <u>et al</u>., en 1979 ont après désialylation, caractérisé trois types d'asialotransferrine isolés par chromatographie d'échange d'ions et chromatographie d'affinité sur une colonne de lectine hépatique de Lapin :

- le type l contient deux glycannes biantennés.
- les types 2 et 3 contiennent un glycanne biantenné et un glycanne triantenné.

Deux théoriess'opposent pour la position de ces glycannes sur la chaîne peptidique. Celle de Bayard et Kerckaert en 1980 et 1981 et Kerckaert et Bayard en 1982 selon laquelle les glycoprotéines ne peuvent porter que des structures glycanniques

- 24 -

TABLEAU V

Séquences Asn-X-Ser (Thr) et séquences homologues dans les trois transferrines : la lactotransferrine, la sérotransferrine et l'ovotransferrine du blanc d'oeuf de Poule.

REGION	N-TERMINALE	OVOTRANSFERRINE	LACTOTRANSFERRINE	SEROTRANSFERRINE
	1	Asp-Ala-Ø	non séquencé	Asp-Ala-Ø
	2	Glu-His-Thr	non séquencé	Gly-Ser-Lys
	3	Ala-Ile-Glu	Asn-Trp-Thr	Ø
	4	Asp-Thr-Lys	Asp-Lys-Ser	Asp-Lys-Ser
	5	Ø	non séquencé	Pro-Glu-Ala
	5	Ø	non séquencé	Pro-Glu-Ala

REGION C-TERMINALE	OVOTRANSFERRINE	LACTOTRANSFERRINE	SEROTRANSFERRINE
1	Asp-Thr-Ser	<u>Asn-Ala-Ser</u>	Asp-Lys-Ser
2	Asp-Glu-Ser	Asn-Tyr-Ø	Asn-Lys-Ser
3	Asn-Arg-Thr	Asn-Gln-Thr	Asn-Lys-Ile
4	Asn-Gly-Ser	Asn-Gly-Ser	Asn-Val-Thr
5	Asn-Pro-Ser	Ser-Thr-Ser	Ser-Thr-Ser

Les séquences codes conservées sont soulignées, les Asn glycosylées sont encadrées.



identiques sur une même chaîne peptidique. La sérotransferrine Humaine dans ce cas, ne pourrait porter que deux glycannes biantennés ou deux glycannes triantennés sur la même chaîne peptidique.

Et celle de Hatton <u>et al</u>., en 1979 et de Spik en 1982, selon laquelle la sérotransferrine Humaine pourrait porter deux glycannes biantennés ou deux glycannes triantennés sur la même chaîne peptidique mais également un glycanne biantenné et un glycanne triantenné. Les résultats de März <u>et al</u>., en 1982 et de Spik en 1982 confirment cette deuxième théorie.

La Fig. 8(p. 27) représente les différentes localisations des structures glycanniques de la sérotransferrine Humaine selon les hypothèses énoncées précédemment.

3) Lactotransferrines

a) Lactotransferrine Humaine

La présence de deux glycannes situés à deux endroits différents de la chaîne peptidique a été mise en évidence par Spik, Vandersyppe <u>et al</u>., en 1974 et confirmée par les travaux de Metz Boutique <u>et al</u>., en 1980. Ces deux glycannes sont localisés sur les fractions peptidiques Asn- Trp-Thr et Asn-Gln-Thr. Quatre séquences codes apparaissent ; l'une dans la moitié N-Terminale est glycosylée et sur les trois autres localisées dans la région C-Terminale une seule est glycosylée (Metz Boutique et al., en 1980, Mazurier <u>et al</u>., en 1983).

b) Lactotransferrine de Vache

La structure de la chaîne peptidique de la lactotransferrine de Vache n'étant pas déterminée, il est difficile de localiser les glycannes sur cette chaîne. Cependant les travaux réalisés par Chéron en 1975 ont permis d'apporter quelques précisions. Par hydrolyse pronasique, trypsique et chymotrypsique, il a isolé deux glycopeptides. A partir de ces hydrolysats, il a pu déterminerles séquences peptidiques au voisinage des glycannes (Fig. 9 p. 28). Un des glycopeptides isolé se trouve dans la partie C-Terminale. La séquence code Asn-Gln-Ser est retrouvée au point d'attache du glycanne. En associant les différents résultats Chéron a proposé un schéma de position des deux glycopeptides sur la chaîne peptidique de la lactotransferrine de Vache. (Fig. 10.p. 28).

-26-



Localisation des structures glycanniques de la sérotransferrine Humaine selon :

A : Bayard et Kerckaert en 1980 et 1981 Kerckaert et Bayard en 1982

B : Hatton et al., en 1979 ; Spik en 1982

C : März et al., en 1982

- 27 -

Glycanne I Asx - Asn - Ser - Arg - Trp Glycanne II Ileu - Val - Gln - Asx - Gln - Ser - Gly - Val - Thr Figure 9 Structure peptidique proposée des deux glycopeptides de la lactotransferrine de Vache selon Chéron en 1975. Glycanne I (*) Asx - Asn - Ser - Arg - Trp -

- 28 -

Glycanne II (*) Ileu - Val - Gln - Asx - Gln - Ser - Gly - Val - Thr Figure 10 Position des glycopeptides sur la chaîne peptidique de la lactotransferrine de Vache selon Chéron en 1975 * Glycanne I de composition constante * Glycanne II de composition variable

Ala-

B - <u>Structure des glycannes de différentes transferrines</u>1) <u>Structure du glycanne de l'ovotransferrine de Poule</u>

La structure glycannique de cette glycoprotéine différe des autres transferrines par la composition molaire en oses et le nombre de glycanne. Les premiers travaux sur les glycopeptides d'ovotransferrine ont été effectués par Williams en 1968 et Graham et Williams en 1975. Mais la structure glycannique n'a été établie qu'en 1979 par Spik <u>et al</u>., et confirmée par la résonance magnétique nucléaire à 360 MHz par Dorland <u>et al</u>., la même année (voir Fig.19p.62) On remarque l'absence de résidu de galactose et d'acide N-acétyl neuraminique et la présence de résidus supplémentaires de N-acétyl glucosamine branchés sur les résidus de mannose.

2) Structure des glycannes des sérotransferrines

a) <u>Sérotransferrine</u> Humaine

La nature glycoprotéinique de la sérotransferrine Humaine a été reconnue par Schultze et al., en 1958.

La détermination de la structure des glycannes de la sérotransferrine Humaine a été essentiellement réalisée au Laboratoire et représente historiquement la première définition de structures glycanniques de type N-acétyllactosamique. La séquence primaire des glycannes a été entreprise en 1962 par Montreuil <u>et al</u>., et par Montreuil <u>et al</u>., en 1965. Des résultats partiels ont été obtenus par Spik <u>et a</u>l., en 1965, et Spik, en 1968. La structure primaire complète du glycanne biantenné a été définitivement établie en 1973. Elle fut confirmée en 1977 par résonance magnétique nucléaire à 360 MHz par Dorland <u>et al</u>., en 1977. Cette structure est représentée dans la Fig. 34 p. 109 dans le chapitre des résultats personnels.

Dès 1975, Montreuil et Spik avaient en outre montré l'existence d'une structure triantennée. Ce résultat fut confirmé par Debruyne en 1983 puis par Spik <u>et al</u>., en 1985. La présence d'un glycanne tétraantenné a été envisagée par März <u>et al</u>., en 1982. Les structures des glycannes triantennés et tétraantennés sont représentées dans les Fig.36 et 37 p. 112.

α) Structure des glycannes

Peu de travaux ont été réalisés sur les sérotransferrines autre que la sérotransferrine Humaine.

Seule la structure glycannique de la sérotransferrine de Lapin a été déterminée par Léger <u>et al</u>., en 1978. Elle est identique au glycanne biantenné de la sérotransferrine Humaine (Fig. 34, p. 109). La différence entre ces deux transferrines provient néanmoins du fait que la transferrine de Lapin ne posséde qu'un seul glycanne. En ce qui concerne les autres transferrines seule la composition molaire en monosaccharides et le nombre de glycannes ont été définis. Le pourcentage en monosaccharides de la plupart de ces transferrines est voisin (Tableau VI, p. 31).

Une structure N-acétyllactosaminique biantennée a également été mise en évidence dans les sérotransferrines de Mouton et de Poule (Spik <u>et al</u>, en 1981, résultats non publiés). Sur la base de la composition molaire en oses, Hatton <u>et al</u>., en 1974 et en 1978, ont également proposé cette structure pour les sérotransferrines de Chien, de Boeuf et de Porc ; mais les sérotransferrines de Boeuf et de Porc possédent en plus du fucose. Des différences ont été trouvées concernant le nombre de glycannes dans ces sérotransferrines d'espèces variées. Alors que la transferrine Humaine posséde deux glycannes, les transferrines de Boeuf, de Porc et de Poule n'en possédent qu'un seul (Hatton <u>et al</u>., en 1974 et en 1978, Graham et Williams en 1975).

β) Hétérogénéité de la structure des glycannes

Comme nous l'avons décrit dans un chapître précédent, une partie du polymorphisme génétique est due à la chaîne peptidique ; mais selon Stratil et Spooner en 1971, une autre partie de ce polymorphisme serait imputable à des variations du degré de glycosylation de la protéine et à la présence ou non de résidus d'acide sialique sur les glycannes. Deux variants génétiques ont été caractérisés dans la sérotransferrine de Mouton (Spooner <u>et al</u>., en 1975, Guérin <u>et al</u>., en 1976). Ces auteurs ont montré que cette hétérogénéité était due à la différence du nombre de résidus d'acide sialique sur le glycanne. En effet après désialylation de ces deux variants S (lent) et F (rapide) la sérotransferrine Ovine ne présente plus qu'une bande en électrophorèse en gel de polyacrylamide.

TABLEAU VI

Composition centésimale en glucides de quelques transferrines de diverses origines

Transferrines	Composition Centésimale			Total	Nombre de glycannes	Références	
	Oses neutres	Osamines	Acide Sialique				
Homme	2,37	1,99	1,46	5,82	2	Spik et al., 1968	
Lapin	1,2	1,2	0,8	3,2	1	Léger et al., 1978	
Boeuf	1,34	0,9	0,6	2,84	1	Hatton <u>et al</u> ., 1974	
Porc	1,4	0,89	0,58	2,87	1	Hatton <u>et al</u> ., 1974	
Chien	1,15	1,12	0,6	2,87	1	Hatton <u>et a</u> l., 1974	
Rat	1,58	1,22	0,43	3,23	- \	an Eijk <u>et al</u> .,1972	
Poisson	2,16	1,12	0,7	3,9		/an Eijk <u>et al</u> .,1972	

Après désialylation des variants glycanniques des sérotransferrines de Boeuf et de Cheval, deux bandes sont toujours observées en électrophorèse en gel de polycrylamide Maeda <u>et al</u>., en 1980 ont donc suggéré que l'acide sialique n'était qu'en partie responsable de l'hétérogénéité, la chaîne polypeptidique intèrvenait également.

Dans la sérotransferrine de Cheval, dix variants génétiques sont connus (Stratil et Glasnak en 1981). Deux de ces variants D et R ont été isolés et partiellement caractérisés par Chung et Mc Kenzie en 1985. Ces variants ne possédent pas le même nombre de résidus d'acide sialique.

3) Structure des glycannes des lactotransferrines

a) Lactotransferrine Humaine

La nature glycoprotéinique de la lactotransferrine Humaine a été démontrée par Montreuil et Mullet en 1960, puis Montreuil <u>et al</u>., en 1960. La détermination de la structure glycannique a été plus complexe car les glycannes présentent une grande microhétérogénéité liée à l'existence de résidus de fucose en nombre variable. Les structures glycanniques représentées dans la Fig.60 (p.184)dans le chapître des travaux personnels, ont été établiespar Spik et Mazurier en 1977, Spik <u>et al</u>., en 1979 et Spik <u>et al</u>., en 1982. On constate qu'un à deux résidus de L-fucose branchés en $\alpha - 1,6$ ou en $\alpha - 1,3$ sont présents sur une structure N-acétyllactosaminique identique au glycanne biantenné de la sérotransferrine Humaine. En 1982, Matsumoto <u>et al</u>., ont également isolé des glycannes de type poly N-acétyllactosaminique plus ou moins fucosylés. Les différentes structures sont données par comparaison dans la Fig. 62 (p. 184).

b) Lactotransferrine de Vache

La composition en glucides, le nombre et la nature des groupements glycanniques ont été essentiellement déterminés au Laboratoire par Chéron en 1975 et 1977, Maliet et Plantey en 1977. Le tableau VII (p. 33) résume les compositions centésimale et molaire en glucides de la lactotransferrine de Vache selon différents auteurs. Le pourcentage d'oses neutres obtenu par Chéron en 1975 est identique'à celui donné par

TABLEAU VII Composition centésimale et molaire en glucides de la lactotransferrine de Vache

Composition centésimale	a	b	с	d
Oses neutres	4,73	5,60	5,60	5,60
Osamines	2,28		2,70	2,98
Acides sialiques	0,13	-	0,60	0,75
Compostion molaire				, ,
Mannose	-	15-16	24,4	24
Galactose	-	5-6	2	8
Fucose	0	0	0,4	0,6
N-acétylglucosamine	-	10-11	8,3)
N-acétylgalactosamine	-	0	1,2) 10,5^
Acide N-acétylneuraminique	-	1	0,7	0,8

- a) Groves en 1960
- b) Castellino et al., en 1970
- c) Chéron en 1975
- d) Maliet et Plantey en 1977



* Rapport N-acétyl glucosamine/N-acétyl galactosamine déterminé par la méthode de Gardell en 1953, après

six heures d'hydrolyse par l'acide chlornydrique 4 N \cdot

Castellino et al., en 1970. Mais les compositions molaires sont différentes en particulier selon Castellino et al., en 1970 il existe de cinq à six résidus de galactose alors que Chéron en 1975 n'a pu en identifierqu'un seul. Dans tous les cas, le nombre de résidus de mannose est élevé, il atteint une valeur de 24 pour Chéron en 1975. Mais les travaux plus récents de Maliet et PLantey en 1977, puis de Chéron en 1977, ont montré que ces résultats étaient erronnés. La lactotransferrine Bovine renferme au maximum neuf résidus de mannose. D'autre part, Chéron en 1975, puis Maliet et Plantey en 1977 ont mis en évidence de la N-acétyl galactosamine. C'est l'étude des glycopeptides réalisée par Chéron qui a apporté le plus de renseignements sur la structure glucidique de la lactotransferrine de Vache Des hydrolyses pronasique, chymotrypsique et trypsique ont permis de montrer l'existence de deux groupements glycanniques liés N-glycosidiquement à la protéine ainsi que l'existence d'au moins trois types de structure glycannique (Fig. 11, p. 35).

- Le premier posséderait un résidu de N-acétyl galactosamine et trois résidus de N-acétyl glucosamine (Glycanne I)
- Le deuxième serait de type oligomannosidique (Glycanne II et III). Il contiendrait de trois à neuf résidus de mannose pour deux résidus de N-acétyl glucosamine. Dans ce groupe, certains glycannes seraient liés à une chaîne peptidique qui renferme un résidu d'arginine alors que d'autres glycannes seraient liés à une chaîne peptidique qui renferme un résidu de lysine en C-terminal après hydrolyse trypsique.
- Enfin le dernier de type N-acétyllactosaminique (Glycanne IV) posséderait une structure très hétérogène selon le nombre de résidus d'acide N-acétylneuraminique, de galactose et de N-acétyl glucosamine.

Le Glycopeptide contenant un résidu de N-acétyl galactosamine a été soumis à l'action de la soude 0,1 M en milieu réducteur (Borohydrure de potassium 1 M) pendant quarante huit heures afin de savoir si ce glypeptide contenait deux glycannes l'un lié par une liaison N-glycosidique alcalistable et l'autre par une liaison O-glycosidique alcalilabile. Après la ß élimination



Schéma de la disposition de différents types de structure glycannique sur la chaîne peptidique de la lactotransferrine de Vache (Chéron en 1975, Maliet et PLantey en 1977).

- 35 -

B.

aucune trace de N-acétylgalactosaminitol n'a pu être mise en évidence, éliminant ainsi la possibilité d'une liaison O-glycosidique de la N-acétyl galactosamine. Le groupement glycannique se trouvant du côté N-terminal de la chaîne peptidique serait de type oligomannosidique · En effet la chaîne peptidique se forme de l'extrémité N vers l'extrémité C-terminale et le précurseur des structures glycanniques est un polymannoside. Le groupement de type N-acétyllactosaminique serait situé du côté C-terminal et aurait une composition variable.

C - Conformation des glycannes

Les études concernant la conformation des glycannes sont récentes ; jusqu'ici elles pouvaient être considérées comme spéculatives car seuls les modèles moléculaires étaient employés pour créer la vision d'une image spatiale des glycannes.

En 1975, Montreuil donnait la première image du glycanne biantenné de la sérotransferrine Humaine. En tenant compte des ponts hydrogènes pouvant exister dans la molécule, une conformation en Y fut retenue. Puis des études par diffraction des rayons X ont permis d'adopter une conformation en T (Montreuil <u>et al</u>., en 1978, Montreuil en 1980). Ces études de modèles moléculaires ont également permis de définir quelques paramétres

- Le noyau pentasaccharidique du mannotriosido-di-N-acétyl chitobiose invariable est compact. Le trisaccharide Man (β 1-4) Glc NAc (β 1-4) Glc NAc (β 1-N) Asn conjugué au résidu d'asparagine est disposé dans un plan et stabilisé par au moins deux liaisons hydrogènes.
- Les antennes constituées par l'enchaînement sialyl. Nacétyllactosaminique s'enroulent en hélice dans l'espace.
- Le résidu de mannose 4 peut se disposer de deux manières par rapport au plan défini par le trisaccharide cité précédemment et donner ainsi une conformation en Y ou en T. Les données cristallographiques obtenues par Warin <u>et al</u>., en 1979 laissent supposer que le modèle T serait le modèle correspondant le mieux à la réalité.

Une conformation en "oiseau" fut suggérée par Montreuil

- 36 -

en 1980, 1982 et 1983. Cette configuration est obtenue par une large rotation autour du résidu de mannose lié en 1,6. D'après des études sur ordinateur réalisées par Perez et Warin (résultats non publiés), cette conformation est énergiquement la plus favorable.

Ces trois formes en Y, T et "oiseau" sont interconvertibles en solution et ne doivent pas être considérées comme fixes ou rigides (Douy <u>et al</u>., en 1980) comme l'ont démontré Davoust <u>et al</u>., en 1981 et Michel en 1981 par E. P. R. des glycannes de la transferrine préalablement substitués par des marqueurs de Spin.

Le rôle fondamental du noyau mannotriosidique dans la conformation des glycannes a été mis en évidence par Brisson et Carver en 1983. Grâce à l'utilisation de la résonance magnétique nucléaire, ils ont montré que le trisaccharide avait deux conformations idéales : l'une linéaire donnant l'image structurale en "oiseau" et l'autre repliée conduisant à une conformation en "aile brisée" dans laquelle l'antenne liée en α - l,6 est rabattue le long du résidu di-N-acétyl chitobiose.

Ces différentes conformations possibles du glycanne biantenné de la sérotransferrine Humaine sont représentées dans la Fig. 12 (p. 38).

Dans le cas des structures glycanniques de la lactotransferrine Humaine et particulièrement des structures monosialylées fucosylées, on obtient un modèle molèculaire plus compact probablement du à l'existence d'intéractions hydrophobes entre les groupements méthyles des résidus de fucose branchés en

 α - 1,3 et en α - 1,6 ainsi qu'avec les groupements méthyles des groupes acétamido des N-acétyl glucosamines (Fig. 13,p. 39).

La structure générale des transferrines étant précisée, ceci nous permet d'aborder le chapître concernant l'activité biologique des transferrines.

- 37 -



Conformation en Y



Conformation en T





Conformation en biseau "brocken wing"

Conformation en diseau



Figure 12

Modèles moléculaires compacts du glycanne biantenné de la sérotransferrine Humaine selon Montreuil <u>et al</u>., en 1978. Montreuil en 1980, 1982 et 1983, Brisson et Carver en 1983.



Figure 13

Conformation du glycanne difucosylé de la lactotransferrine Humaine selon Montreuil en 1984 (La flèche indique la confluence des quatre groupes méthyles).



ROLES BIOLOGIQUES DES TRANSFERRINES

I - INTRODUCTION

Le fer est un des oligoéléments les plus indispensables de l'organisme. Il est directement impliqué dans les mécanismes d'oxydo-réduction des chaînons respiratoires et constitue "le maillon-clef" de la production d'énergie de la cellule. Par sa présence dans l'hémoglobine, il participe également au transport de l'oxygène dans l'organisme. L'importance de la répartition du fer dans l'organisme humain entraîne une régulation de son transport entre les formes de réserve et les formes actives ; ce transport est réalisé par les transferrines. Alors que la sérotransferrine constitue la protéine sérique responsable de l'acheminement du fer vers les tissus utilisateurs, la lactotransferrine intervient plus spécifiquement dans les cas de l'absorption intestinale du fer et dans les mécanismes de défense anti-infectieuse.

II - ACTIVITES BIOLOGIQUES DES SEROTRANSFERRINES

Les sérotransferrines sont une plaque tournante du métabolisme du fer. Elles sont le principal transporteur de ce métal vers différents organes donc vers différents types de cellules ; cela implique l'existence de récepteurs spécifiques de la sérotransferrine situés à la surface des cellules où s'effectue le transport du fer.

<u>Rôle des sérotransferrines dans la biosynthèse</u> de l'hémoglobine

Les cellules hématopoïétiques de la moëlle osseuse permettent par différenciations successives, la formation de l'érythroblaste, du réticulocyte, puis de l'hématie. Il existe au cours de cette différenciation, une variation du nombre de récepteurs de la sérotransferrine, liée à la régulation du transfert du fer (Van Bockxmeer et Morgan en 1979, Iacopetta <u>et al</u>., en 1982, Pan <u>et al</u>., en 1983). Les études d'incorporation du fer effectuées sur le réticulocyte précurseur immédiat de l'hématie montre que celui-ci, est capable de fixer le fer alors que l'hématie a perdu cette capacité. Le mécanisme d'incorporation du fer dans l'hémoglobine de l'érythroblaste et du réticulocyte a été mis en évidence par Walsh <u>et al</u>., en 1949. La participation de la sérotransferrine a été révélée par Jandl et Katz en 1963.

La revue de Aisen en 1983 résume les nombreuses études faites à ce propos.

2) <u>Rôle des sérotransferrines dans l'absorption intestinale</u> <u>du fer</u>

Le fer contenu dans les aliments est absorbé par l'intestin (Turnbull en 1974), puis stocké dans l'entérocyte sous forme de ferritine avant d'être livré à la sérotransferrine (Helbock et Saltman en 1967). Un tel mécanisme suggére l'existence de deux récepteurs : l'un pour l'absorption du fer dans l'entérocyte, - l'autre permettant le passage du fer dans le plasma. L'existence de deux récepteurs de la sérotransferrine n'a pas encore été miseen évidence.

3) Rôle des sérotransferrines dans la mise en réserve du fer dans l'hépatocyte

Les sérotransferrines sont principalement synthétisées dans le foie, organe où se situe également la réserve la plus importante du fer.

La sérotransferrine livre son fer uniquement aux cellules parenchymateuses du foie.

Une fixation spécifique du fer aux hépatocytes a également été mise en évidence et résumée dans les revues de Harford et Ashwell en 1981, et Aisen en 1983.

4) Activité bactériostatique des sérotransferrines

En cas d'infection, l'organisme réagit en diminuant la quantité de fer de transport et en augmentant la quantité de fer de stockage. Ainsi, il peut se produire une baisse de 15 à 20 % de la concentration en sérotransferrine. L'activité de la sérotransferrine mise en évidence in vitro par Schade et Caroline en 1946 et Schade en 1961, s'exerce vis à vis de différentes bactéries.

5) Conclusion

Ce résumé rapide de l'importance biologique des sérotransferrines nous montre que cette protéine joue un rôle primordial dans le métabolisme du fer. Elles permettent au fer de circuler dans l'organisme et de réguler ainsi selon les besoins l'équilibre entre la forme active et la forme de réserve du fer. Elles interviennent également dans la lutte contre l'infection bactérienne.

III - ACTIVITES BIOLOGIQUES DES LACTOTRANSFERRINES

Les lactotransferrines jouent un rôle important dans les mécanismes de défense cellulaire et humorale.

Rôle de la lactotransferrine Humaine dans le stockage du fer dans le foie

L'implication de la lactotransferrine dans le stockage du fer est encore mal connue.Prieels <u>et al</u>., en 1978, mettent en évidence l'existence d'un récepteur hépatique chez le Rat et la Souris, responsable de l'élimination du sang de glycoprotéines portant un groupement fucose α 1---> 3 N-acétyl glucosamine. La lactotransferrine serait éliminéeà 90 % de la circulation sanguine par ce récepteur et serait retrouvée dans l'hépatocyte. En 1984, Retegui <u>et al</u>., confirment l'existence d'un récepteur de la lactotransferrine dans le foie de la Souris mais ces auteurs infirment sa spécifité au fucose α 1---> 3 N-acétyl glucosamine et le situent dans le système réticulo-endothélial. L'importance du mécanisme reste encore mal expliquée.

2) <u>Rôle de la lactotransferrine Humaine dans la nutrition</u> en fer du nourrisson et dans l'absorption intestinale

La lactotransferrine Humaine fut longtemps considérée comme la principale source du fer du nourrisson. Elle est présente à raison de l à 2 g/l dans le lait de Femme et renferme 0,3% du fer soit 0,8 mg/l (Blanc en 1964) quantité suffisante uniquement pour les besoins du nourrisson de moins de 6 mois nourri au lait maternel.

Chez l'adulte, le fer apporté par l'alimentation est libéré dans l'estomac sous l'effet du pH et sous l'action de la pepsine Chez le nourrisson comme le pH de l'estomac est voisin de 4 et la protéolyse faible, la lactotransferrine n'est pas désaturée (Spik en 1971).

Les travaux de Spik <u>et al</u>., en 1982 ont montré que la lactotransferrine non hydrolysée est retrouvée dans les selles des nourrissons. Cette coprolactotransferrine a gardé outre son activité anti-infectieuse, la capacité de fixer le fer. La grande stabilité du complexe fer-lactotransferrine pose le problème de la libération du fer dans l'intestin. Selon Spik en 1971, la lactotransferrine céderait son fer à des chèlateurs avec l'intermédiaire possible de la transferrine.

La nature exacte de la molécule impliquée dans l'absorption du fer est mal connue. En 1979, Cox <u>et al</u>., ont mis en évidence un récepteur membranaire au niveau des entérocytes reconnaissant aussi bien la lactotransferrine Humaine que la lactotransferrine de Vache. Ce récepteur a également été caractérisé dans les villosités intestinales de Lapin par Mazurier <u>et al</u>., en 1984.

Rôle des lactotransferrines dans les mécanismes de défense anti-infectieuse

Une étude approfondie du rôle de la lactotransferrine dans les mécanismes de défense antibactérienne a été faite dans les revues générales de Reiter <u>et al</u>., en 1975 et Spik et Montreuil en 1983. Deux rôles des lactotransferrines sont à considérer dans les mécanismes de défense anti-infectieuse :

- rôle dans l'immunité à médiation cellulaire
- rôle dans l'immunité humorale

a) Rôle dans l'immunité cellulaire

La lactotransferrine Humaine joue un rôle dans l'activité bactéricide des leucocytes polymorphonucléaires. Leffell et Spitznagel en 1972 ont montré qu'en cas d'agression microbienne, les granules de ces leucocytes humains étaient dégranulés et libéraient de l'apolactotransferrine dans le phagolysosome et le milieu extracellulaire.

- 43 -

La lactotransferrine exerce une activité bactéricide par ferriprivation intravacuolaire et par production de radicaux hydroxyles libres oxydants et bactéricides et ceci grâce au fer ferrique Fe ⁺⁺⁺ qu'elle apporte.

La lactotransferrine Humaine régule également la migration des cellules immunocompétentes au lieu d'inflammation.

Les leucocytes polynucléaires sont les premières cellules à parvenir au site inflammatoire(De Sousa en 1978) ; elles synthétisent de la lactotransferrine qui va attirer les macrophages et les lymphocytes par l'intermédiaire de récepteurs membranaires (Van Snick et Masson en 1976) Moroz <u>et al</u>., en 1977) De plus, les macrophages attirent les lymphocytes par la synthèse de ferritine et de sérotransferrine.

Donc lors d'une infection, la sidérémie baisse brutalement, l'absorption intestinale du fer diminue (Beresford <u>et al.</u>, en 1971) au profit d'une augmentation du fer de réserve dans le foie et les macrophages. L'ensemble de ces phénomènes a pour but de diminuer par ferriprivation la croissance des bactéries lesquelles libérent des sidérophores qui vont entrer en compétition avec les protéines ferri-fixatrices de l'hôte.

La fig. 14(p. 45)propose, un schéma du mécanisme de l'hyposidérémie inflammatoire. Hashizume <u>et al</u>., en 1983 ont également montré que la lactotransferrine Humaine aussi bien que la lactotransferrine Bovine constitue un facteur de croissance essentiel pour les lignées de lymphocytes B et T. Cependant la lactotransferrine augmente la cytotoxicité des monocytes vis à vis de certaines lignées cellulaires (Horwitz et al., en 1984).

b) Rôle dans l'immunité humorale

En 1961, Blanc et Isliker posaient en hypothèse que la lactotransferrine Bovine possédait une activité bactériostatique et antitoxique. Cette hypothèse est confirmée pour la lactotransferrine Humaine en 1966 par Blanc, puis Masson et Heremans qui démontrent en effet que la lactotransferrine Humaine posséde une activité bactériostatique in vitro pour <u>Staphylococcus</u> <u>Aureus et Staphylococcus Albus</u> et pour <u>Pseudomonas Aeruginosa</u> Les expériences conduites sur les lactotransferrines de Vache mais également de Chévre par Oram et Reiter en 1968 montrent

- 44 -



45 ---- que celles-ci possédent une activité bactériostatique sur <u>Bacillus stéarothermophilus</u> et <u>Bacillus subtilis</u> pourvu qu'elles ne soient que partiellement saturées en fer. L'addition de sels ferreux au milieu d'incubation supprime l'inhibition de croissance bactérienne par les lactotransferrines. Ces auteurs démontrent que l'activité bactérienne de la lactotransferrine est accrue par CO⁺⁺, Mn⁺⁺, Ni⁺⁺, Cu⁺⁺.

Cette activité réside en un mécanisme de ferriprivation (Schade et Caroline en 1944 et Feeney en 1951) ou la lactotransferrine joue un rôle compétitifavec les sidérophores bactériens pour la capture du fer. Arnold <u>et al</u>., en 1982 démontrent également que l'apolactotransferrine dissoute dans l'eau distillée a un effet bactéricide direct sur un grand nombre de microorganismes incluant Gram (+), Gram (-), aérobies, anaérobies, et des levures. La lactotransferrine est présente dans la plupart des milieux de sécrétion ainsi que le lysozyme et les immunoglobulines. Ces trois constituantsagissent en synergie lors d'une attaque microbienne (Spik et Montreuil en 1983). En effet, le lysozyme associe son activité lytique vis à vis des Gram (+) à l'action bactériostatique de la lactotransferrine. La mise en évidence d'un complexe formé par la lactotransferrine et le lysozyme a été réalisée par Jorieux et Jorieux et al., en 1983.

De nombreux auteurs ont également montré que l'activité bactériostatique des lactotransferrines Humaine et Bovine augmentait en présence d'immunoglobulines SIGA ou IgG spécifiques des bactéries (Bullen <u>et al</u>., en 1972, Rogers en 1976, Rogers et Singe et Spik <u>et al</u>., en 1978). Il faut noter que cette synergie d'action n'est effective que sur des bactéries pathogènes et non sur des bactéries commensales (Stephens <u>et al</u>., en 1980).

- 46 -

Les rôles biologiques de la lactotransferrine sont multiples. Elle joue un rôle indispensable dans des mécanismes de régulation vitaux que sont l'absorption intestinale du fer et son stockage par le foie. Son importance est indiscutable pour tous les mécanismes immunitaires mis en jeu lors d'une agression bactérienne ; d'une part, par son action ferriprivatrice, et d'autre part par sa reconnaissance cellulaire entraînant la "calvacade" des cellules immunocompétentes.

Comme nous avons pu le constater au cours des chapitres précédents, la sérotransferrine et la lactotransferrine Humaines et l'ovotransferrine de Poule sont des glycoprotéines très étudiées du point de vue structural et du point de vue biologique. La structure primaire de leurs chaînes peptidiques est maintenant bien établie, bien que peu d'informationssoientconnues sur la structure secondaire et tertiaire, il apparaît que toutes les transferrines sont constituées d'une seule chaîne peptidique organisée en deux lobes compacts et indépendants renfermant chacun un site de fixation du fer et correspondant aux moitiés N et C-Terminales de la molécule (Fig. 3;p.17). Les études de conformation des transferrines sont encore très fragmentaires, l'analyse par diffraction X de la sérotransferrine de Lapin a été réalisée et a permis de constater la nature bilobaire de la protéine (Gorinsky et al., en 1979).

Sur la chaîne peptidique sont conjugués un ou plusieurs groupements glycanniques plus ou moins complexes selon le type de transferrine . La structuredes glycannes de ces trois transferrines étant maintenant bien définie, nous nous sommes intéressés à l'hétérogénéité glycannique d'autres transferrines.

Nous avons donc entrepris une étude comparative de la structure glycannique des transferrines de diverses origines en essayant de mettre en évidence les différents facteurs intervenant lors de la glycosylation de ces protéines afin de préciser si les glycannes représentent ou non des marqueurs de l'évolution.

TRAVAUX PERSONNELS

INFLUENCE DE LA PROTEINE SUR LA GLYCOSYLATION DES TRANSFERRINES :

Etude comparative de la structure des glycannes de la sérotransferrine et de l'ovotransferrine de Poule

Etude de la structure des glycannes des différents variants de la sérotransferrine de Cheval.

VARIATIONS DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES DES TRANSFERRINES EN FONCTION DE L'ESPECE ANIMALE :

Etude comparée de la structure des glycannes

- des ovotransferrines de Poule et de Dinde
- des sérotransferrines humaine, de Mouton, de Boeuf ct de Rat
- des lactotransferrines du lait de Vache de Chévre et du lait de Femme.

INFLUENCE DE LA PROTEINE SUR LA GLYCOSYLATION

DES TRANSFERRINES:

Etude comparative de la structure des glycannes de la sérotransferrine et de l'ovotransferrine de Poule

Etude de la structure des glycannes des différents variants de la sérotransferrine de Cheval.

Etude comparative de la structure des glycannes de la sérotransferrine et de l'ovotransferrine de Poule

I - INTRODUCTION

En 1962, Williams montre que les compositions en amino-acides de la sérotransferrine et de l'ovotransferrine de Poule sont très voisines. En 1978, Thibodeau et al., déterminent les séquences peptidiques N-Terminales de ces deux transferrines et montrent qu'elles sont semblables. Les évidences structurales suggèrent que ces protéines possédent le même gène précurseur. En 1982, les travaux de Jeltsch et Chambon permettent de déterminer la séquence nucléotidique codant pour l'ovotransferrine mais également pour la sérotransferrine de Poule. Williams et al., en 1982 montrent que la séquence peptidique complète de ces deux glycoprotéines est identique. Il était intéressant, compte-tenu du fait que les deux protéines possédent la même structure peptidique mais sont synthétisées l'une dans le foie et l'autre dans l'oviducte, de comparer les structures glycanniques de l'ovotransferrine et de la sérotransferrine de Poule.

La structure glycannique de l'ovotransferrine de Poule a été établie en 1979 par Spik <u>et al</u>., et confirmée en résonance magnétique nucléaire à 360 MHz par Dorland <u>et al</u>., la même année (Fig. 19;p.62). Nous allons décrire uniquement le résultat de nos recherches sur la structure glycannique de la sérotransferrine de Poule.

II - PREPARATION DE LA SEROTRANSFERRINE DE POULE

La sérotransferrine de Poule a été préparée au Laboratoire selon le protocole décrit p.213*

* Nous remercions J.P. Decottignies pour la préparation de cette transferrine.

- 48 -

La pureté de la protéine est controlée par électrophorèse en gel de polyacrylamide suivant les conditions décrites p.216. L'électrophorèse réalisée en présence de témoins de masse moléculaire connue permet d'attribuer à la sérotransferrine de Poule une masse moléculaire voisine de 80000 daltons (Fig. 15;p. 50). Les compositions centésimale et molaire en glucides de la sérotransferrine de Poule comparées à celles de l'ovotransferrine de Poule sont résumées dans le tableau VIII (p. 51). Sur la base des compositions en oses, nous pouvons en déduire que la sérotransferrine de Poule ne posséde qu'un seul glycanne comme l'ovotransferrine. Elle renferme en outre du galactose et de l'acide N-acétyl neuraminique.

III - PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES

1) Hydrolyse pronasique

Trois g de sérotransferrine de Poule sont hydrolysés par la pronase selon le procédé décrit p.216. La composition en acides aminés des glycopeptides est déterminée à l'autoanalyseur Beckman ; Pour un résidu d'Asp, on a identifié 0,3 résidu de Ser et Glu, 0,2 résidu de Thr, 0,6 résidu de Gly, 0,25 résidu d'Ala et 4,3 résidus de Glc NH₂. Les glycopeptides pronasiques sont séparés par chromatographie d'affinité sur colonne de ConA-Sépharose 4B.

2) Fractionnement des glycopeptides

Vingt cinq mg du mélange de glycopeptides sont chromatographiés sur colonne de ConA-Sepharose 4B suivant le protocole décrit à la p. 220.

On obtient deux fractions A et B

-la fraction A : 21 %, non retenue par la lectine est éluée par le tampon de départ ne renfermant pas d' α -méthyl-D-glucoside.



Figure 15

Electrophorèse en gel de polyacrylamide de la sérotransferrine (3) et de l'ovotransferrine (2) de Poule et de l'ovotransferrine de Dinde (1).

TABLEAU VIII

Compositionscentésimale et molaire en monosaccharides de la sérotransferrine de Poule et de l'ovotransferrine de Poule

Monosaccharides	Composition centésimale		
	Sérotransferrine	Ovotransferrine	
Oses neutres	1,15	0,85	
Hexosamines	1,10	1,78	
Acide N-acétyl neuraminique	0,60	0	
	2,00 %	2,03 %	
	Composition molaire		
	Sérotransferrine	Ovotransferrine	
Fuc	0,30	0	
Gal	2,60	0	
Man *	3	3	
GlcNAC	4,30	5,60	
NeuAc	1,70	0	

Les compositions sont déterminées par dosage colorimètrique et chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse selon les protocoles décrits p. 12.

* Les rapports molaires ont été calculés sur la base de trois résidus de mannose.

+ Spik et al., en 1979 et Dorland et al., en 1979.
La fraction B : 79 %, retenue est éluée par le tampon de départ renfermant de l'α - D - méthyl glucopyranoside 15mM.
 Après déssalage sur colonne de BioGel P₂ la fraction B donne deux sous fractions Bl et B2.
 La composition molaire des monosaccharides présents dans ces deux fractions est donnée dans le tableau IX (p.53).

IV - ETUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES

Détermination de la composition molaire en monosaccharides

Le tableau IX(p.53) rassemble les compositions molaires en glucides des glycopeptides totaux de la sérotransferrine et de l'ovotransferrine de Poule ainsi que celle des fractions glycopeptidiques de la sérotransferrine de Poule obtenues sur colonne de Con A-Sépharose. L'analyse de ce tableau nous montre qu'il existe une grande différence dans la composition molaire en glucides des glycopeptides de la sérotransferrine et celle de l'ovotransferrine de Poule. On observe la présence d'un peu de fucose, de 2,5 résidus de galactose ainsi que de 2 résidus d'acide N-acétylneuraminique dans la sérotransferrine de Poule, alors que ces 3 monosaccharides sont absents dans l'ovotransferrine de Poule. Cependant l'ovotransferrine posséde un résidu supplèmentaire de N-acétyl glucosamine.

En ce qui concerne, les compositions molaires en monosaccharides des fractions glycopeptidiques de la sérotransferrine de Poule obtenues sur colonne de ConA-Sépharose les différences majeures se situent au niveau des résidus de galactose et de N-acétyl glucosamine. La fraction A posséde un peu plus de galactose et un résidu de N-acétyl glucosamine supplémentaire.

Les fractions Bl et B2 ont des rapports molaires voisins, cependant la fraction Bl renferme un résidu

TABLEAU IX

Composition molaire en glucides des glycopeptides de la sérotransferrine et de l'ovotransferrine de Poule

Monosaccharides	Rapports molaires des glycopeptides totaux			
	Sérotransfe	rrine	Ovotransferrine	
Fuc	0,24		0	
Gal	2,50		0	
Man *	3		3	
Glc NAC	4,60		5,80	
Neu Ac	1,90		0	
Monosaccharides	Rapports molaires des fractions glycopeptidiques obtenues sur colonne de Concanavaline			
		Sérotrans	ferrine	
	A	Bl	B2	
Fuc	0	0	0,30	
Gal	2,60	2,10	1,90	
Man *	3	3	3	
Glc NAc	4,50	3,70	3,20	
Neu Ac	1,20	1,50	0,38	

* Les rapports molaires ont été calculés sur la base de trois résidus de mannose.

.

LILLS!

d'acide N-acétyl neuraminique supplémentaire.

2) Méthylation

Chacune des fractions glycopeptidiques a été méthylée et analysée en spectrométrie de masse. Les rapports molaires obtenus sont donnés dans le tableau X(p. 55).

a) Etude de la fraction A

On retrouve de nombreux dérivés méthylés en proportion variable notamment 0,40 et 0,30 résidu de (3,4) Me₂ - Man et de (3,6) Me₂ - Man. La présence de ces deux dérivés laisse supposer l'existence de glycannes triantennés. Cette fraction est disialylée. On retrouve de l'acide N-acétyl neuraminique lié en α -2,6 et en α -2,3.

b) Etude de la fraction Bl

Cette fraction posséde les dérivés méthylés classiques d'une structure biantennée. Le rapport molaire de la (3,6) Me₂ -GlcNAc Me est un peu faible. Cette fraction est disialylée. On ne retrouve pas de dérivés perméthyl galactose.

c) Etude de la fraction B2

La fraction B2 renferme également les dérivés méthylés d'une structure biantennée. Cependant on retrouve un résidu de (2, 3, 4, 6)Me₄-Gal et un seul résidu de (4, 7, 8, 9) Me₄-NeuAc ce qui est en faveur d'une structure monosialylée. L'acide N-acétyl neuraminique est lié en α -2,6. On retrouve également du (2, 3, 4) Me₃-Fuc.

3) Résonance magnétique nucléaire

Les fractions A, Bl et B2 ont été analysées en résonance magnétique nucléaire. Le tableau XI(p. 57) donne les valeurs des déplacements chimiques des différents groupements présents dans les monosaccharides constituants les glycopeptides des fractions Bl et B2. Le

TABLEAU X

Identification et détermination des rapports molaires des dérivés méthylés de monosaccharides des glycopeptides de la sérotransferrine de Poule isolés sur colonne de ConA - Sepharose

Dérivés méthylés	Rapports mola	ires des éther des fractions	s méthyliques
	A	Bl	B ₂
(2,3,4) Me ₃ - Fuc	0	0	0,20
(2,3,4,6) Me ₄ - Gal	1,20	0,2	0,90
(2,3,4) Me ₃ - Gal	0,60	1,60	1,20
(2,4,6) Me ₃ - Gal	0,80	0,2	0
(2,4) Me ₂ - Man *	1	1	1
(3,4) Me ₂ -Man	0,40	0	0
(3,6) Me ₂ - Man	0,30	0	0
(3,4,6) Me ₃ - Man	1,60	2,10	1,80
(3,6) Me ₂ - GlcNAcMe	4,30	2,70	3,50
(4,7,8,9) Me ₄ -NeuAc	1,90	1,30	0,80

* Les rapports molaires ont été calculés sur la base d'un résidu de (2,4) Me₂-Man.



matériel glycopeptidique étant insuffisant pour la fraction A, sa structure n'a pas pu être déterminée par résonance magnétique nucléaire. Les figures 16(p.58) et 17(p.59)donnent les spectres de résonance magnétique nucléaire à 400 MHz des fractions Bl et B2.

Composé B1 :

L'analyse du spectre démontre la présence d'une structure biantennée de type N-acétyllactosaminique. En effet, les déplacements chimiques des protons H₂ des mannoses $\frac{3}{2}$, $\frac{4}{2}$ et $\frac{4}{2}$ (respectivement 4.253 ppm, 4.195 ppm et 4.118 ppm) sont en faveur de cette structure. De plus, les valeurs de 1.716 ppm (H-3ax) et de 2.671 ppm (H-3éq) nous montre que le composé B₁ est sialylé ; l'acide N-acétyl neuraminique est lié en α -2, 6 sur les galactoses $\frac{6}{2}$ et $\frac{6}{2}$ qui résonnent à 4.443 ppm et 4.446 ppm respectivement. Cependant il existe une légère hétérogénéité due à la présence d'une faible proportion (25%) de Gal $\frac{6}{2}$ non substitué comme le prouvent les déplacements chimiques suivants : H-1 Man $\frac{4}{2}$ (4.928 ppm), H1-Gal $\frac{6}{2}$ (4.472 ppm), H-1 GlcNAc $\frac{5}{2}$ (4.581 ppm), CH3 de l'acétamido de GlcNAc $\frac{5}{2}$ (2.047 ppm).

En définitive, le spectre, de très bonne qualité, nous permet de dire que la fraction B_1 est composée des glycopeptides présentés à la Fig. 18 (p. 61).

Composé B2 :

L'interprétation du spectre montre une grande analogie avec celui obtenu pour un glycopeptide de type biantenné monosialylé. L'acide N-acétyl neuraminique est lié en α -2, 6 sur le galactose <u>6</u> (H-lMan<u>4</u> : 5.134 ppm). Cependant, il existe 35 % de structure asialo (H-lMan<u>4</u> : 5.119 ppm). Ces deux structures se compliquent par la présence d'un résidu de fucose sur la N-acétyl glucosamine du point d'attache (environ 25 %). Cette substitution par le fucose est prouvée par l'influence qu'il réalise sur la glucosamine <u>2</u> (2.096 ppm) et également par les déplacements chimiques de ses protons représentatifs (CH3 Fuc : 1.205 ppm et H-l Fuc : 4.874 ppm). En conclusion, la fraction B2 est composée des glycopeptides présentés à la Fig. 18 (p. 62).

TABLEAU XI

		glycop Frac	eptides isolés de la ction B _l	sérotransferrine c F	raction B ₂
		0- ii-0-		O H O A Sn	H-O-QASn
		0-∎-●◆			(b) ••• •
		75%	25%	× 5,49	<u>35% y</u>
H-1 -	GlCNAC 1 (a	5,044	(a) $\begin{cases} 5.044 \\ 5.069 \end{cases}$	$(a) \begin{cases} 5.074 \\ 5.080 \end{cases}$	(a) $\begin{cases} 5.074 \\ 5.080 \end{cases}$
	GleNAC 2	4.414	4,614	(4.614	(4,614
				(n.d.(c)	n.d.(c)
	Man 3	4.773	4.773	4.768	4.768
	Man 4	5.132	5,132	5,134	5.119
	Man 4'	4.947	4,928	4,929	4.929
	GICNAC 5	4.603	4,603	4,603	4.581
	GICNAC 5'	4.603	4,581	4.581	4.58]
	Gal 6	4.443	4.443	4.445	4.465
	Gal 6'	4.446	4.472	4.472	4.472
	Gui o				
H-2 -	Man 3	4.253	4.253	4.250	4.250
	Man 4	4.195	4.195	4.192	4.188
	Man 4'	4.118	4.118	4.110	4.110
H-3a	α NeuAc(α 2-	-6)1.716	1.716	1.717	-
H-3e	NeuAc ($\alpha 2$ -	-6)2.671	2.671	2.670	-
8-1 -	α Fuc(1-6)	**	-	4.874	4.874
H-5 -	α Fuc(1-6)	-	-	n.d.(c)	n.d.(c)
СНЗ -	α Fuc(1-6)	-	-	1.205	1.205
NAC -	GlcNAc 1	2.007	2.007	2.007	2.007
		2.013	2.013	2.009	2.009
_	GICNAC 2	2.082	2.080	2,080	2.080
A Rent				2.096	2.096
* 100 6.4.2	GICNAC 5	2,069	2.069	2.069	2.051
and the state of t	GICNAC 5'	2.065	2.047	2.047	2.047
	α NeuAc (2-6	6) 2.030	2.030	2.030	

Glissements chimiques des protons représentatifs de la structure primaire des

a) hétérogénéité due à la partie peptidique b) x + y = 25 % (il y a 25 % de structures fucosylées) c) n.d. : non déterminé.

Pour les explications concernant la nature des déplacements chimiques, se reporter aux revues générales de Vliegenthart <u>et al</u>., en 1981 et 1983.

57



Spectre de résonance magnétique nucléaire à 400 MHz de la fraction glycopeptidique B₁ de la sérotransferrine de Poule obtenue sur colonne de ConA-Sépharose. Conditions de mesures: ${}^{2}H_{2}O$; 27° C; $\rho^{2}H = 7$

1 58



59 _ ----

lègende de la Fig. 16.

4) <u>Conclusion</u>

Les structures données à la Fig. 18(p.61 et 62) des fractions isolées par chromatographie d'affinité correspondent aux structures du glycanne présent dans la sérotransferrine de Poule.

Le composé A

Sa structure n'a pas été déterminée. L'analyse après méthylation en spectromètrie de masse met en évidence la présence de structures triantennées. De plus cette fraction est non retenue sur colonne de ConA-Sépharose. Une nouvelle préparation de sérotransferrine de Poule et un isolement en plus grande quantité de cette fraction permettra à l'avenir de déterminer sa structure.

Le composé B 1

posséde une structure majeure biantennée disialylée semblable au glycanne de la sérotransferrine Humaine. On retrouve également 25 % de structure biantennée monosialylée.

Le composé B 2

posséde une structure majeure biantennée monosialylée mais renfermant du fucose lié au résidu de N-acétyl glucosamine du point d'attache. L'acide sialique est

NeuAc (
$$\alpha 2-6$$
) Gal ($\beta 1-4$) GlcNAc ($\beta 1-2$) Man ($\alpha 1-3$)
Man ($\beta 1-4$) GlcNAc ($\beta 1-4$) GlcNAc ($\beta 1$) Asn
NeuAc ($\alpha 2-6$) Gal ($\beta 1-4$) GlcNAc ($\beta 1-6$)
NeuAc ($\alpha 2-3$) Gal ($\beta 1-4$) GlcNAc ($\beta 1-4$)
NeuAc ($\alpha 2-6$) Gal ($\beta 1-4$) GlcNAc ($\beta 1-4$)
Man ($\beta 1-4$) GlcNAc ($\beta 1-4$) GlcNAc ($\beta 1-4$)
Man ($\beta 1-4$) GlcNAc ($\beta 1-4$) GlcNAc ($\beta 1$) Asn
NeuAc ($\alpha 2-6$) Gal ($\beta 1-4$) GlcNAc ($\beta 1-2$) Man ($\alpha 1-3$)
Man ($\beta 1-4$) GlcNAc ($\beta 1-4$) GlcNAc ($\beta 1$) Asn
NeuAc ($\alpha 2-6$) Gal ($\beta 1-4$) GlcNAc ($\beta 1-2$) Man ($\alpha 1-6$)

Structure du composé A



Structure du composé B₁

FIGURE 18

Structures du glycanne de la sérotransferrine de Poule

- 61 -



FIGURE 18

Structures du glycanne de la sérotransferrine de Poule



FIGURE 19

Structure du glycanne de l'ovotransferrine de Poule selon Spik <u>et al</u>., en 1979 et Dorland et al., en 1979

- 62 -

porté par la branche Man (α 1-3). Il renferme aussi une structure non sialylée plus ou moins fucosylée.

En résumé, les deux structures déterminées présentes dans la sérotransferrine de Poule sont de type N-acétyllactosaminique, biantennées, disialylées, fucosylées ou non fucosylées. Au cours de la préparation l'acide N-acétyl neuraminique a été plus ou moins détruit ce qui explique la présence de structures asialo et monosialylées.

Par comparaison, la Fig. 19(p.62) représente la structure du glycanne de l'ovotransferrine de Poule. On constate que celui-ci est différent ; il est dépourvu de résidu de galactose, de résidu d'acide N-acétyl neuraminique et est riche en résidus de N-acétyl glucosamine notamment il renferme une osamine intercalaire. Le glycanne de la sérotransferrine de Poule est plus hétérogène.

Bien que possédant le même gène et la même structure protéique, on constate que l'ovotransferrine de Poule et la sérotransferrine de Poule ne possédent pas les mêmes structures glycanniques. Cela s'explique fort probablement par le fait que dans l'oviducte, l'activité des glycosyltransférases est différente de celles présentes dans le foie. Donc le site de biosynthèse étant différent, la glycosylation des transferrines est différente. La structure du glycanne dépend dans cet exemple choisi de l'équipement en glycosyltransférases de la cellule responsable de la biosynthèse de la glycoprotéine. I - INTRODUCTION

Les résultats obtenus sur le nombre, la localisation et la structure des glycannes de la sérotransferrine Humaine nous ont amené à étudier ces différents paramètres dans une autre sérotransferrine en l'occurence dans la sérotransferrine de Cheval.

La discussion qui en découlera nous permettra de comparer les résultats obtenus avec ceux de la sérotransferrine Humaine. En 1981, Stratil et Glasnak ont caractérisé dix variants génétiques dans la sérotransferrine de Cheval. Chung et Mc Kenzie en 1985, ont étudié et isolé deux de ces variants appelés D et R. Ils ont démontré que la seule différence du nombre de résidus d'acide N-acétyl neuraminique (2 pour D et 4 pour R) ne suffisait pas à expliquer les différences importantes dans la mobilitéélectrophorétique entre ces deux variants transferriniques. Dans les chapitres suivants, nous allons donc plus particulièrement étudier le nombre et la structure des glycannes de quelques variants génétiques de la sérotransferrine de Cheval et poser le problème du rôle de la chaîne peptidique sur la nature de ces glycannes.

II - PREPARATION DE LA SEROTRANSFERRINE DE CHEVAL

La sérotransferrine de Cheval est préparée à partir du sérum précipité au sulfate d'ammonium. Elle nous a été donnée par le Docteur A. Stratil de l'Institut de physiologie et de Génétique Animales de Libèchov (Tchécoslovaquie).*

* Nous remercions le Docteur Stratil pour la préparation de la sérotransferrine de Cheval. Trois variants génétiques A, B, C préparés selon le protocole décrit p.214 ont été étudiés.

La pureté et la masse moléculaire de ces variants sont déterminées par électrophorése en gel de polyacrylamide (Fig. 20.p. 66). L'électrophorése nous permet de constater les grandes différences de mobilité électrophorétique qui existent entre ces différents variants. Les masses moléculaires attribuées sont voisines de 80000 daltons. Cependant les variants A et B possédent des masses moléculaires plus élevées que celle de C (environ 1000 daltons pour A et 4000 daltons pour B).

Le tableau XII (p.67) résume les compositions centésimale et molaire en monosaccharides obtenues lors de l'analyse des différents variants. On constate que le composé B ne renferme que 2,80 % d'oses totaux alors que les variants A et C renferment respectivement 5,20 % et 4,90 % d'oses totaux ce qui nous laisse supposer la présence de deux glycannes dans ces deux composés et d'un seul glycanne dans le variant B.

Les compositions molaires en monosaccharides des trois variants sont très voisines

III - PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES

1) Hydrolyse pronasique

Les quantités de l'ordre de 80 à 100 mg de sérotransferrine de Cheval sont soumises à une hydrolyse pronasique selon le procédé décrit p. ²¹⁶, Les glycopeptides obtenus sont purifiés sur colonne de BioGel P₂, analysés en chromatographie en phase gazeuse puis méthylés.

Les tableaux XIII (p.67) et XIV(p.72) résument les résultats obtenus.



Tf native C A B

Figure 20

Electrophorèse en gel de polyacrylamide des variants A,B,C,de la sérotransferrine de Cheval.(Stratil et al.,en 1984.)



TABLEAU XII

Compositions centésimale et molaire en monosaccharides des variants de la sérotransferrine de Cheval

Monosaccharides	Composition cer	ntésimale en os	es des variants
	А	В	с
Oses neutres Hexosamines Acide N-acétyl neuraminique	2 1,96 1,13	1,13 0,99 0,71	1,90 1,67 1,29
TOTAL	5,19 %	2,83 %	4,88 %
Nombre de glycannes	2	1	2
	Composition m	nolaire en oses	des vari ants
an a	А	В	С
Gal Man* GlcNAc NeuAc	2,10 3 3,60 1,60	2,30 3 3,80 1,90	2,20 3 3,60 2

TABLEAU XIII

Composition molaire en monosaccharides des glycopeptides des variants de la sérotransferrine de Cheval

Monosaccharides	Composition molaire en oses des glycopeptides des variants		
	A	В	С
Gal Man* GlcNAc NeuAc	2,10 3 3,90 1,80	2,20 3 3,85 2	1,97 3 4,20 1,50

* Les rapports molaires ont été calculés sur la base de trois résidus de mannose.

IV - ETUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES

1) <u>Détermination de la composition molaire en</u> <u>monosaccharides</u>

Le tableau XIII(p.67)rassemble les compositions molaires en glucides des glycopeptides des trois variants de la sérotransferrine de Cheval.

Les rapports molaires obtenus pour les trois variants sont très voisins. Ces composés renferment 2 résidus de galactose, 3 résidus de mannose, 4 résidus de N-acétyl glucosamine et 2 résidus d'acide N-acétyl neuraminique.

<u>Identification de l'acide N-acétyl neuraminique</u> <u>des glycannes de la sérotransferrine de Cheval</u> par spectrométrie de masse.

Nous nous sommes interressés à la nature de l'acide N-acétyl neuraminique des variants de la sérotransferrine de Cheval à cause de la caractérisation d'acide N-acétyl, O-acétyl neuraminique dans des glycoprotéines sériques de Cheval. Les acides N-acétyl neuraminiquesdes trois glycoprotéines sont hydrolysés et analysés en spectrométrie de masse selon les protocoles décrits p. 224. La figure 21(p.69) donne les masses moléculaires m/e des fragments des acides N-acétyl neuraminiques triméthyl-silylés présents dans les trois variants de la sérotransferrine de Cheval.

- 69 -





	N 454		D Debt
4 12 21	92 62 81 97	0 16-56 15 43 32-1	21 12 6 12 6 21 2
		8 JUEIJ	БV
den (r	029 009 	000 - 0000 - 0000 - 000 - 000 - 000 - 000 - 000 - 000 - 000 - 000 - 000 - 000	ري دي. مريد المريد المريد المريد المريد الم
	70101	<u></u>	0017. 278622
·	00 281		De estitet ande
	00 002	<u>_</u>	10. 2912rs - +0(-)
·	00 921	V	1X (CS16) - 2000
	00°85F	<u> </u>	IN #2822 #800
	101925	<u>\</u>	1x 055+61 +200
	(5) (+Z9	\sim	19. 8838+1



Figure 21

Mise en évidence des masses moléculaires m/e des acides N-acétyl neuraminiques de variants de la sérotransferrine de Cheval par spectromètrie de masse.

<u>Le variant A</u>

renferme 2 types d'acide N-acétyl neuraminique. Le premier pic, majeur possède toutes les masses m/e caractéristiques de l'acide N-acétyl neuraminique classique silylé puis fragmenté, c'est-à-dire des m/e de : 624, 536, 458, 356, 300, 147. Le spectre obtenu est identique à ceux obtenus pour les variants B et C.

Un deuxième pic obtenu lors de la recherche des acides sialiques du variant A, posséde des masses m/e qui sont de 518, 506, 356. L'addition d'un groupement acétyl en position 4, 7 ou 9 sur la molécule d'acide N-acétyl neuraminique entraîne le blocage de cette fonction lors de la silylation. De ce fait les masses moléculaires m/e de l'acide N-acétyl, O-acétyl neuraminique sont plus faibles de 30 par rapport à celles de l'acide N-acétyl neuraminique. Cette différence de masse représente la différence de masse entre un dérivé O-triméthyl silylé et un dérivé O-acétylé. Les masses m/e caractéristiques de l'acide N-acétyl, 4 - O-acétyl neuraminique doivent être de 594, 518, 506 et 356. Elles sont effectivement retrouvées pour l'un des pics d'acide sialique du variant A.

Un troisième petit pic intermédiaire est également retrouvé. Il posséde des masses m/e de 356 et 506. Il semble donc correspondre à de l'acide N-acétyl, 4 -0-acétyl neuraminique bien que toutes les masses caractéristiques ne soient pas présentes. Il peut s'agir d'un effet d'anomérisation sur l'acide N-acétyl, 4 - 0-acétyl neuraminique.

Les variants B et C

possédent les masses m/e caractéristiques de l'acide N-acétyl neuraminique classique. Aucun autre pic n'apparait sur le spectre total lors de la recherche des acides sialiques.

3) Méthylation

Le tableau XIV(p.72)résume les rapports molaires des dérivés méthylés obtenus.

Les rapports molaires sont très homogènes. L'existence du dérivé (2,3,4) Me_3 -Gal nous indique que les deux résidus d'acide N-acétyl neuraminique sont liés en α -2,6. La présence d'un résidu d'acide 4 - O-acétyl neuraminique ne peut être observé lors d'une méthylation. En effet le groupement acétyl est coupé au cours de la méthylation.

Les résultats obtenus sont en faveur de structures biantennéesdisialyléespour les trois variants de la sérotransferrine de Cheval.

4) Résonance magnétique nucléaire

Les trois variants A,B,C ont été analysés en résonance magnétique nucléaire à 400 MHz. Le tableau XV (p.73)donne les valeurs des déplacements chimiques des différents groupements présents dans les monosaccharides

TABLEAU XIV

Identification et détermination des rapports molaires des dérivés méthylés des monosaccharides des glycopeptides de la sérotransferrine de Cheval

Dérivés méthylés	Rapports molaires des variants			
	А	В	С	
(2, 3, 4)Me3-Gal	2,09	1,90	1,90	
(3, 4, 6)Me3-Man	2,08	2,09	1,70	
(2, 4)Me2-Man*	1	1	1	
(3, 6)Me2-GlcNAcMe	2,60	2,90	2,50	
(4 , 7, 8, 9)Me4-NeuAcMe	2,10	1,60	1,85	

* Les rapports molaires ont été calculés sur la base d'un résidu de 2,4 Me2-Man.

TABLEAU XV

Glissements chimiques des protons représentatifs de la structure primaire des glycopeptides ou oligosaccharides alditols isolés de la sérotransferrine de Cheval.

	Variant	Α	Variant C	Vari	ant B	
	0		0- -0i	0-#-••Asn	0	
	0-∎-● ♦ 50%	0 50%	0	0 32%	34% I	0-1-0 34%
H-lGlcNAc l	(5.055	(5:055		5 082	5.082	5.082
	(a) } 5.060	(a) 5.060				
	15.072	5.072				
GlcNAc 2	4.617	4.617	4.641	4.617	4.617	4.617
Man 3	4.776	4.776	4.782	4.775	4.775	4.775
Man 4	5.134	5.134	5.134	5.133	5.133	5.133
Man 4'	4.944	4.944	4.948	4.944	4.944	4.944
GlcNAc 5	4.605	4.603	4.603	4.607	4.607	4.604
GlcNAc 5'	4.603	4.605	4.603	4.607	4.604	4.607
Gal 6	4.442	-	4.443	4.442	4.442	-
Gal 6'	-	4.446	4.443	4.446	-	4.446
Gal 6*		4.439	-	-	_	-
Gal 6'*	4.442	-	-	-	4.442	4.439
H-2Man 3	4.256	4.256	4.258	4.255	4.255	4.255
Man 4	4.196	4.196	4.196	4.197	4.197	4.197
Man 4'	4.118	4.118	4.118	4.116	4.116	4.116
H-3aNeuAc/NeuAc'	1.717	1.717	1.716	1.718	1.718	1.718
NeuAc*	1.850	1.850	- .	-	1.850	1.850
H-3eNeuAc/NeuAc'	2.674	2.674	2.671	2.675	2.675	2.675
NeuAc*	2.674	2.674	-	-	2.675	2.675
4-OAc-NeuAc*	2.077	2.077		-	2.077	2.077
NACGlCNAC 1	(=) (2.005)	(2.005)	2.056	2.007	2.007	2.007
	(2.007	(2.007		•		
GlcNAc 2	2.081	2.081	2.082	2.082	2.082	2.082
GleNAc 5	2.069	2.109	2.070	2.070	2.070	2.109
GlcNAc 5'	2.103	2.065	2.064	2.066	2.103	2.066
NeuAc/NeuAc	2.030	2.030	2.030	2.030	2.030	2.030
NeuAc *	1.964	1.964	-	-	1.964	1.964
				1		
			(a			

a) hétérogénéité due à la partie peptidique

Pour les explications concernant la nature des déplacements chimiques, se reporter aux revues générales de Vliegenthart <u>et al</u>., en 1981 et 1983.

·73-

constituants les glycopeptides des composés A et B et les oligosaccharides réduits du composé C. En effet, le composé C, a été analysé en résonance magnétique nucléaire sous forme d'oligosaccharides obtenus par hydrolyse alcaline car il s'est avéré lors d'une première analyse que la chaîne peptidique interférait beaucoup et entraînait une relaxation trop rapide du spectre. Les fig.22 (p.75) et 23 (p.76) donnent les spectres de résonance magnétique à 400 MHz des composés A et C.

Variant A

L'interprétation du spectre est en faveur d'une structure biantennée de type N-acétyllactosaminique comme le montre le groupe des protons H₂ des mannoses $\frac{3}{2}$, $\frac{4}{2}$ et $\frac{4}{2}$ ' (4.256 ppm, 4.196 ppm et 4.118 ppm respectivement). De plus cette structure est disialylée comme le prouvent les déplacements chimiques des protons anomériques des mannoses $\frac{4}{2}$ et $\frac{4}{2}$ ' (5.134 ppm et 4.944 ppm) et ceux des galactoses $\frac{6}{2}$ et $\frac{6}{2}$ ' (4.44 ppm). La sialylation est de deux types, on retrouve :

- de l'acide N-acétyl neuraminique lié en α- 2,6 classique
 (H-3ax : 1.717 ppm, H-3éq : 2.674 ppm et CH3 de l'acétamido : 2.030 ppm)
- et un acide sialique peu courant qui est de l'acide N-acétyl, 4-0-acétyl neuraminique substituant les galactoses <u>6</u> et <u>6</u>' en α - 2,6 (Haverkamp <u>et al</u>., en 1982).

Ce fait est démontré par le groupe des données suivantes (H-3ax : 1.850 ppm, H-3éq : 2.674 ppm, CH3 du 4-0-acétyl : 2.077 ppm et CH3 de l'acétamido : 1.964 ppm). Cette substitution par un résidu d'acide N-acétyl, 4-0-acétyl neuraminique en α -2,6 n'affecte pas les galactoses <u>6</u> et <u>6</u>' (4.439 ppm et 4.442 ppm) mais elle est très visible sur la résonance des groupements acétamido des osamines <u>5</u> et <u>5</u>' (2.109 ppm et 2.103 ppm). L'intégration des raies de certains protons H-3ax et H-3éq et CH3 des N-acétyl permet de conclure que les deux types d'acides N-acétyl neuraminiques sont dans un rapport l : l. En définitive, nous pouvons attribuer 4 structures possibles. La lère hypothèse de



BU

- 75 -



structure est donnée dans la Fig. 24(p. 78); la 2ème hypothèse consiste en un mélange dans le même rapport d'une structure biantennée sialylée classique et d'une structure biantennée portant 2 acides N-acétyl 4-0-acétyl neuraminiques. Pour l'instant nous ne pouvons pas encore lever cette ambiguité. De plus, nous sommes en présence de structures nouvelles non décrites dans la littérature.

Variant B

L'analyse de ce composé montre une grande analogie structurale avec le composé A. En effet de nombreux déplacements chimiques sont semblables et on retrouve également le groupe des données représentatives de l'acide N-acétyl, 4-0-acétyl neuraminique lié en α -2,6. Cependant les proportions entre les 2 types d'acides sialiques ont varié ; l'intégration de différentes raies montre un rapport NeuAc (α -2,6)/Neu 4,5 Ac2 (α -2,6) égal à 2 pour 1. Nous pouvons conclure que le variant B est composé des différents glycopeptides présentés à la Fig. 24(p. 78), mais peut également être composé de 66 % de glycopeptides ayant une structure biantennée sialylée et de 33 % de glycopeptides ayant une structure biantennée portant 2 acides N-acétyl, 4-0-acétyl neuraminiques. Comme dans le cas précédent, nous ne pouvons pas choisir.

Variant C

Le spectre de très bonne qualité démontre qu'il s'agit d'une structure biantennée de type N-acétyllactosaminique. Les déplacements des protons anomériques et des protons H2 des mannoses $\frac{3}{2}$, $\frac{4}{2}$ et $\frac{4}{2}$ ' sont significatifs. De plus, cette structure est disialylée en α -2,6 sur les galactoses $\frac{6}{2}$ et $\frac{6}{2}$ ' (4.443 ppm). Sans ambiguité, nous pouvons conclure que le composé C posséde la structure donnée à la Fig. 24 (p. 78).

- 77 -



Structure du variant transferrinique C

FIGURE 24

Structures des glycannes des variants de la sérotransferrine de Cheval

5) <u>Conclusion</u>

La fig.24(p.78) représente la structure des glycannes de trois variants A, B, et C isolés de la sérotransferrine de Cheval.

Dans les trois cas, on retrouve des glycannes de structure biantennée disialylée. Cependant les différences se situent au niveau du nombre de glycanne et de la nature de l'acide sialique.

Le variant A

renferme deux glycannes : l'un ayant une structure biantennée disialylée possédant un acide N-acétyl,4-O-acétyl neuraminique porté par la branche Man(αl-3), l'autre glycanne possédant la même structure mais l'acide N-acétyl, 4-O-acétyl neuraminique est porté par la branche Man(αl-6) Ces deux structures sont présentes en proportion équi-

valente.

Le variant B

renferme un seul glycanne mais l'hétérogènéité glycannique est plus grande. On retrouve en effet les deux structures précédentes mais également une structure biantennée disialylée semblable au glycanne de la sérotransferrine Humaine. Ces trois structures sont présentes en proportion équivalente. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence par spectrométrie de masse l'acide N-acétyl, 4-0-acétyl neuraminique.

Le variant C

renferme deux glycannes possédant une structure identique biantennée disialylée classique. Les résultats obtenus nous conduisent à la conclusion que sur une seule chaîne polypeptidique, un ou deux glycannes peuvent être fixés.

6) Discussion

En ce qui concerne, la sérotransferrine de Cheval, les travaux réalisés par Chung et Mc Kenzie en 1985, ont permis de montrer des modifications au niveau de la chaîne peptidique de deux variants D et R. En effet, l'étude des cartes peptidiques trypsique et chymotrypsique de ces deux composés indique une différence d'un peptide dans chaque carte peptidique. Deux acides aminés sont modifiés dans le variant R par rapport au variant D : deux résidus de glycocolle remplacent les résidus d'acide aspartique et glutamique dans le variant R.

A l'heure actuelle, dix variants génétiques ont été caractérisés dans la sérotransferrine de Cheval (Glasnak et Jarolimova en 1980).

Les travaux réalisés par Stratil et Glasnak en 1981 n'ont pas permis de définir nettement l'origine de l'hétérogénéité des variants de la sérotransferrine de Cheval. Ils ont montré que dans certaines espèces , l'acide sialique était responsable de l'hétérogénéité alors que dans d'autres l'hétérogénéité était indépendante de l'acide sialique. En 1984, Stratil <u>et al</u>., reprennent ces travaux afin d'élucider l'hétérogénéité des variants A et B. Outre le fait que le variant A posséde 2 glycannes et le variant B l seul glycanne, ils ont montré que le variant A renfermait 29 résidus d'acides aminés supplémentaires mais que les 2 variants possédaient la même séquence peptidique N-terminale. Cependant, selon ces auteurs, ces différences ne sont pas suffisantes pour en déduire que la nature de la chaîne peptidique joue un rôle dans la glycosylation de la sérotransferrine de Cheval.

La présence de variants glycanniques n'a pas seulement été mise en évidence dans la sérotransferrine de Cheval. En effet, à l'heure actuelle, deux théories s'affrontent pour positionner les deux types de structures glycanniques de la sérotransferrine Humaine sur la chaîne peptidique. La connaissance de la structure complète de la chaîne peptidique de la sérotransferrine Humaine a permis de localiser avec précision les deux glycannes sur les résidus d'asparagine 413 et 611 (Mac Gillivray et al., en 1983). Cependant se pose le problème de la répartition des glycannes sur la chaîne peptidique 85 % des glycannes ont une structure biantennée, les 15 % restant ont une structure triantennée. Selon Bayard et Kerckaert en 1980 et 1981 et Kerckaert et Bayard en 1982. les glycoprotéines ne peuvent porter que des structures glycanniques identiques sur une même chaîne pepticique. Selon Hatton et al., en 1979 et Spik en 1982, la sérotransferrine Humaine pourrait porter deux glycannes biantennés ou deux glycannes triantennés sur la même chaîne peptidique mais également un glycanne biantenné et un glycanne triantenné.

Dans ce cas précis, la chaîne peptidique étant parfaitement connue, nous sommes en présence uniquement de variants glycanniques situés sur une même chaîne peptidique. En ce qui concerne la sérotransferrine de Cheval la connaissance de la structure complète de la chaîne peptidique des variants permettra de préciser l'influence de celle-ci sur le nombre, la localisation et la structure des glycannes des variants de la sérotransferrine de Cheval. VARIATIONS DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES DES TRANSFERRINES EN FONCTION DE L'ESPECE ANIMALE :

Etude comparée de la structure des glycannes

- des ovotransferrines de Poule et de Dinde
- des sérotransferrines humaine, de Mouton, de Boeuf et de Rat^{*}
- des lactotransferrines du lait de Vache de Chévre et du lait de Femme.
- * Les sérotransferrines de Poule et de Cheval ont été étudiées dans le chapitre précédent.

Etude comparée de la structure des glycannes de l'ovotransferrine de Dinde et de Poule

I - INTRODUCTION

Nous avons réalisé une étude comparative de la structure des glycannes des ovotransferrines de Poule et de Dinde isolées des blancs d'oeufs. Ces deux oiseaux appartiennent à la famille des Gallinacées ; ces espèces animales étant très proches,il nous a semblé intéressant de comparer leurs structures glycanniques.

En 1979, Spik <u>et al</u>., et Dorland <u>et al</u>., ont établi la structure du glycanne de l'ovotransferrine de Poule (Fig. 28; p. 93). Cette structure a été comparée à celle de l'ovotransferrine de Dinde que nous allons décrire.

II - ETUDE DE LA GLYCOPROTEINE DE L'OVOTRANSFERRINE DE DINDE

L'ovotransferrine de Dinde est commercialisée par la firme SIGMA (Chemical Company St Louis, U.S,A.)sous le nom de Conalbumine. La pureté du produit commercial a été controlée par électrophorèse en gel de polyacrylamide (Fig. 15;p.50). L'électrophorèse réalisée en présence de témoins de masse nous permet d'attribuer une masse moléculaire voisine de 80000 daltons pour l'ovotransferrine de Dinde.

Les compositions centésimale et molaire en glucides de l'ovotransferrine de Dinde sont données dans le tableau XVI(p.83) en comparaison avec celles obtenues pour l'ovotransferrine de Poule.

On constate que l'ovotransferrine de Dinde est dépourvue d'acide N-acétyl neuraminique tout comme

TABLEAU XVI

Composition centésimale et molaire en monosaccharides des ovotransferrines de Dinde et de Poule.

Monosaccharides	Composition centésimale des ovotransferrines		
	Dinde	Poule	
Oses neutres	1,80	0,85	
Hexosamines	1,90	1,78	
Acide N-acétyl neuraminique	0	0	
TOTAL	3,70 %	2,63 %	
Monosaccharides	Composition molaire des ovotransferrines		
	Dinde	Poule	
Gal	1,4	0	
Man *	3,0	3,0	
GlcNAc	4,5	5,6	

TABLEAU XVII

Composition molaire en monosaccharides des glycopeptides des ovotransferrines de Dinde et de Poule

Monosaccharides	Rapports molaires en oses des glyco- peptides des ovotransferrines de			
	Dir Glycopeptides totaux	Poule Glycopeptides totaux		
Gal	1,70	2,20	0,98	0
Man *	3	3	3	3
GlcNAC	4,70	5,20	4,40	5,80

* Les rapports molaires ont été calculés sur la base de trois résidus de mannose.



l'ovotransferrine de Poule.

Cependant, elle renferme deux résidus de galactose et posséde 5 résidus de N-acétyl glucosamine soit l résidu de moins par rapport à l'ovotransferrine de Poule.

III - PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES

1) Hydrolyse pronasique

Deux g. d'ovotransferrine de Dinde sont soumis à une hydrolyse pronasique selon le protocole décrit p. 216. Les glycopeptides obtenus sont purifiés sur colonne de BioGel P2, analysés en chromatographie en phase gazeuse puis méthylés.

Les tableaux XVII et XVIII(p.83 et 87)rassemblent les rapports molaires obtenus.

2) Fractionnement des glycopeptides

Les résultats obtenus par méthylation du mélange des glycopeptides montrent que la structure n'est pas homogène et que le mélange des glycopeptides est complexe , ce qui nous a amené à le fractionner sur colonne de ConA-Sépharose.

Trente quatre mg de glycopeptides de l'ovotransferrine de Dinde sont séparés sur colonne de Con A-Sepharose 4 B selon le protocole décrit p. 220 . La chromatographie d'affinité nous a permis d'obtenir 2 fractions :

- Une fraction A

(70 %) majeure, retardée sur la colonne, est éluée par le tampon de départ ne renfermant pas d' α -D-méthyl glucoside.

- Une fraction B

(30 %) retenue sur la colonne est éluée par le tampon renfermant de l' α - D - méthyl-glucopyrannoside 15mM.

L'étude de la composition molaire des monosaccharides de ces différentes fractions a conduit aux résultats donnés dans le tableau XVII(p. 83).

IV - ETUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES

1) <u>Détermination de la composition molaire en</u> monosaccharides

Le tableau XVII(p. 83) représente les compositions molaires en glucides des glycopeptides totaux des ovotransferrines de Dinde et de Poule. La grande différence entre les glycopeptides de deux espèces animales se situent au niveau du galactose. L'ovotransferrine de Poule en est dépourvue alors que l'ovotransferrine de Dinde en posséde deux résidus.

Les compositions molaires des fractions obtenues après séparation par chromatographie d'affinité sont données dans le même tableau.

- La fraction A

majeure renferme 2 résidus de galactose et 5 résidus de N-acétyl glucosamine.

- La fraction B

posséde un résidu de galactose pour 4,4 résidus de N-acétyl glucosamine. Il s'agit d'une structure qui paraît moins complète que la structure A.

2) Méthylation des glycopeptides

Les glycopeptides totaux de l'ovotransferrine de Dinde ont été méthylés. Le tableau XVIII(p. 87) nous donne les rapports molaires obtenus. Nous retrouvons de nombreux dérivés méthylés en particulier tous les dérivés du mannose. La présence en quantité néanmoins faible de dérivés di Me-Man indique l'existence probable de structures tri et tétraantennées.

D'autre part, la présence de dérivé 2 Me₁ - Man est en faveur de l'existence d'une N-acétyl glucosamine intercalaire. Les valeurs incomplètes de résidus méthylés des différents monosaccharides indiquent une grande hétérogénéité structurale.

Le tableau résume également les rapports molaires des dérivés méthylés des fractions A et B obtenues sur colonne de Con A-Sépharose.

Dans la fraction A, la présence de 2 résidus de (2, 3, 4, 6) Me4-Gal, de 2 résidus de (3, 4, 6) Me3-Man et d'un résidu de 2Mel-Man est en faveur d'une structure biantennée digalactosylée possédant un résidu de N-acétyl glucosamine intercalaire.

Cependant la présence de 0,13 et 0,15 résidu de (3, 6)Me2 - Man et (3, 4)Me2 - Man laisse supposer la présence de structures mineures triantennées.

Dans la fraction B, les rapports molaires des dérivés méthylés obtenus sont en faveur de l'existence d'une structure identique à celle présente dans la fraction A mais monogalactosylée. Cependant la présence de 0,3 résidu de (2,4) Me2- Man permet d'envisager l'existence d'une structure biantennée ne possédant pas d'osamine intercalaire.
TABLEAU XVIII

Identification et détermination des rapports molaires des dérivés méthylés des monosaccharides des glycopeptides de l'ovotransferrine de Dinde

Dérivés méthylés	Rapports molaires				
	Glycopeptides Frac totaux glycope * A+		tions tidiques B+		
(2, 3, 4, 6)Me ₄ -Gal	2	2,04	0,62		
(3, 4, 6)Me ₃ -Man	1,60	2	2		
(3, 6)Me ₂ -Man	+	0,13	0		
$(3, 4) Me_2 - Man$	+	0,15	0		
(2, 4) Me ₂ -Man	0,580	0	0,30		
2 Me _l -Man	1,10	0,96	0,67		
(3, 4, 6)Me ₃ -GlcNAcMe	1,40	0,52	0,65		
(3, 6)Me ₂ -GlcNAcMe	2,98	3,40	3,68		

- * Les rapports molaires ont été calculés sur la base de deux résidus de (2, 3, 4,6)Me₄-Gal.
- + Les rapports molaires ont été calculés sur la base de deux dérivés de (3, 4, 6)Me₃-Man.

-87-

3) Résonance magnétique nucléaire

- 88 -

Les fractions A et B ont été analysées en résonance magnétique nucléaire à 400 MHz.

Le tableau XIX(p.89) nous donne les valeurs des déplacements chimiques obtenues pour ces composés. Les Fig. 25 (p. 90) et 26(p. 91) donnent les spectres de résonance magnétique nucléaire à 400 MHz des fractions A et B.

Fraction A

L'analyse du spectre montre la présence de structures biantennées de type N-acétyllactosaminique avec une N-acétyl glucosamine intercalaire (Cache et al., en 1986). Cette osamine est caractérisée par l'influence qu'elle exerce sur le proton anomérique du mannose <u>3</u> (4.700 ppm et 4.707 ppm) qui résonne à champ fort et sur son proton H-2 (4.718 ppm) dont la résonance se place entre celles des mannoses 4 et 4' De plus, elle posséde des protons représentatifs (H-1 : 4.477 ppm et CH3 de l'acétamido : 2.066 ppm). On constate également l'existence de 2 mannoses <u>4</u>' différents (5.010 ppm et 4.997 ppm) due à la présence ou non de galactose. Ceci est aussi confirmé par l'osamine 5' dont le proton anomérique est à 4.577 ppm lorsqu'elle est substituée et à 4.546 ppm lorsqu'elle est en position terminale. La fraction A renferme en mélange les deux structures données à la Fig. 27(p. 93) (AI et AII).

Composé B

L'interprétation du spectre montre la présence d'une structure biantennée monosialylée mineure représentant 28 % du mélange. Les structures majeures sont non sialylées avec branches incomplétes et N-acétyl glucosamine intercalaire

TABLEAU XIX

Glissements chimiques des protons représentatifs de la structure primaire des

glycopeptides isolés d	e l'ovotransferrine	de Dinde
------------------------	---------------------	----------

			Fr	action A	Fraction B			
		1	••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	35%	30%	42%		●Asn %
H ₁	GlcNAc	1	(a) $\begin{cases} 5.063 \\ 5.087 \end{cases}$	(a) (5.063 (5.087	$(a) \begin{cases} 5.057 \\ 5.070 \end{cases}$	(a) $\begin{cases} 5.057 \\ 5.070 \end{cases}$	$(a) \begin{pmatrix} 5.057 \\ 5.070 \end{pmatrix}$	
	GlcNAC	2	A.613	4.613	4.614	4.614	4.614	
	Man 3		4.686	4.694	4.687	4.696	4.766	
	Man 4		5.056	5.056	5.057	5.057	5.120	(5.134)
	Man 4'		5.010	4.997	5.011	5.000	4.928	
	GlcNAc	5	4.576	4.576	4.553	4.575	4.602	
	GlcNAc	5'	4.576	4.545	4.582	4.546	4.582	
	Gal 6		4.469	4.469	-	4.472	4.445	
	Gal 6'		4.478	-	4.477	-	4.470	
	GlcNAc	9	4.463	4.463	4.465	4.465	-	
Н	Man 3		4.175	4.175	4.173	4.173	4.251	
2	Man 4		4.256	4.256	4.256	4.256	4.195	
	Man 4'		4.143	4.143	4.145	4.145	4.105	
NAC	-GlcNAc	1	(2.005	(2.005	(2.009	(2.009	(2.009	
			(2.013	(2.013	(a) 2.013	(a) (2.013	(2.013	
	GlcNAc	2	2.082	2.079	2.082	2.077	2.078	
	GlcNAc	5	2.054	2.056	2.056	2.059	2.070	
	GlcNAc	5'	2.040	2.049	2.040	2.048	2.047	
	GlcNAc	9	2.063	2.063	2.067	2.067	-	

a) Hétérogénéité due à la partie peptidique.



Pour les explications concernant la nature des déplacements chimiques, se reporter aux revues générales de Vliegenthart <u>et al</u>., en 1981 et 1983.

68





On retrouve les déplacements chimiques de la fraction AII qui représente 42 % de la fraction B et également de son isomère agalactosylé sur l'antenne en α - 1,3 (30 %); ceci est démontré par les déplacements des mannoses $\frac{3}{2}$, $\frac{4}{2}$ et $\frac{4}{2}$ et de l'osamine $\frac{5}{2}$ (H-1 GlcNAc $\frac{5}{2}$: 4.582 ppm, H-1 GlcNAc $\frac{5}{2}$: 4.575 ppm). La fraction B est composée en grande partie des glycopeptides dont les structures sont données à la Fig. 27(p. 93).

4) Conclusion

Les structures des différents glycannes de l'ovotransferrine de Dinde sont données dans la Fig. 27(p. 93)-

- La fraction glycopeptidique A

posséde une structure majeure biantennée non sialylée digalactosylée ayant un résidu de N-acétyl glucosamine intercalaire. Les 35 % restant possédent la même structure mais monogalactosylée sur la branche Man (αl-3). Aucune structure triantennée n'a été mise en évidence.

- La fraction glycopeptidique B

posséde en proportion égale la même structure monogalactosylée que la fraction A et cette structure est monogalactosylée sur la branche Man (α 1-6). Une structure biantennée classique très faiblement sialylée a également été mise en évidence.



Structure du composé B

FIGURE 27

Structures du glycanne de l'ovotransferrine de Dinde.



FIGURE 28

Structure du glycanne de l'ovotransferrine de Poule selon Spik <u>et al</u>., 1979 et DORLAND <u>et al</u>., en 1979

- 93 -

La différence essentielle avec le glycanne de l'ovotransferrine de Poule (Fig. 28;p. 93) réside en l'absence de résidu de galactose dans l'ovotransferrine de Poule. D'autre part, l'ovotransferrine de Dinde ne renferme pas de structure triantennée alors que le glycanne de l'ovotransferrine de Poule posséde une structure triantennée. Dans les deux glycoprotéines on retrouve le résidu de N-acétyl glucosamine intercalaire.

Tout récemment, Risley et Van Etten en 1986, ont donné la structure d'un glycanne situé sur le premier domaine de l'ovomucoide de Dinde qui est une des autres glycoprotéines majeures du blanc d'oeuf, 61 % du glycopeptide posséde une structure de type tétraantenné galactosylé avec une N-acétyl glucosamine intercalaire,23 % posséde une structure de type triantenné galactosylé avec une N-acétyl glucosamine intercalaire et 16 % posséde une structure de type triantenné avec une glucosamine intercalaire mais ne possédant que 2 résidus de galactose. Ces structures présentent donc de nombreux points communs avec les glycannes de l'ovotransferrine de Dinde. L'étude comparée des ovotransferrines de Dinde et de Poule nous montre que l'ovotransferrine de Dinde posséde un glycanne plus complet que celui de l'ovotransferrine de Poule car elle posséde du galactose.

La structure glycannique des ovotransferrines nous apparaît donc spécifique de l'espèce animale considérée et dépendante de l'activité des glycosyltransférases présentes dans l'oviducte.

- 94 -

Etude comparée de la structure des glycannes des sérotransferrines

I - INTRODUCTION

Dans ce chapitre nous présentons une étude comparative de la structure des glycannes de quelques sérotransferrines de diverses espèces animales avec celle de la sérotransferrine Humaine déterminée précédemment (Spik <u>et al</u>., en 1974). En 1978, au Laboratoire, la structure glycannique de la sérotransferrine de Lapin a déjà été déterminée par Léger <u>et al</u>., ; elle est identique à celle du glycanne biantenné de la sérotransferrine Humaine (Fig. 34;p. 109). Les sérotransferrines qui ont été analysées sont celles du Boeuf, du Mouton et du Rat.

II - ORIGINE DES DIFFERENTES SEROTRANSFERRINES

La sérotransferrine de Boeuf*nous a été fournie par le Professeur J.H. Brock de l'Institut de Biochimie de Nutrition à Zaragoza (Espagne) et la sérotransferrine de Mouton* par le Professeur G. Guérin de l'Institut National de la Recherche Agronomique à Jouy enJosas. La préparation de ces transferrines est résumée dans l'appendice technique p. 213.

Le variant A de la sérotransferrine de Rat a été préparé au Laboratoire selon le protocole décrit p.214 .

Les variants purifiés B et C de la sérotransferrine de Rat*nous ont été fournis par le Docteur E. Regoeczi

 Nous remercions les Professeurs Brock, Guérin et Regoeczi qui nous ont permis d'effectuer l'étude comparative des différentes structures glycanniques. du Département de Pathologie de l'Université d'Hamilton (Ontario, Canada). La préparation de ces variants est donnée dans l'appendice technique p.214.

La pureté et la masse moléculaire des sérotransferrines ont été déterminées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de témoins de masses moléculaires différentes (Fig. 29;p. 97). L'électrophorèse permet d'attribuer des masses moléculaires voisines de 80000 daltons pour les sérotransferrines de Boeuf, de Mouton, et de Rat (Variant A). Les masses moléculaires des variants B et C de la sérotransferrine de Rat sont légèrement plus élevées.

Les compositions centésimale et molaire des différentes sérotransferrines sont données dans le tableau XX (p. 98) en comparaison avec ceux de la sérotransferrine Humaine.

Les compositions centésimales obtenues pour les différentes sérotransferrines nous laissent supposer qu'elle ne renferme qu'un seul glycanne contrairement à la sérotransferrine Humaine qui posséde deux glycannes.

1) Sérotransferrine de Mouton

La sérotransferrine de Mouton posséde des monosaccharides qui se trouvent dans des rapports molaires voisins à ceux présents dans les glycannes de la sérotransferrine Humaine.

2) Sérotransferrine de Boeuf

La sérotransferrine de Boeuf renferme un taux plus faible en galactose et en acide N-acétyl neuraminique que les autres transferrines.

- 97 -

- l : Sérotransferrine Humaine
- 2 : Sérotransferrine de Mouton
- 3 : Sérotransferrine de Boeuf
- 4 : Sérotransferrine de Rat : Variants A, B, C

TABLEAU XX

Compositions centésimale et molaire en monosaccharides de sérotransferrines d'espèces animales différentes

Monosaccharides	Composition centésimale en oses des sérotransferrines					
	Homme +	Mouton	Boeuf	Rat A	: Varia B	nts C
Oses neutres	2,37	0,90	1,10	1,25	1,04	0,97
Hexosamines	1,99	0,88	1,29	1	0,91	1
Acide N-acétyl neuraminique	1,46	0,39	0,52	0,82	0,94	0,67
TOTAL	5,82 %	2,17 %	2,91 %	3,07 %	2,89 %	2,64 %
Nombre de glycannes	2	l	l	1	1	l
	Composi	tion molai	re en oses	des séro	otransfe	errines
Fuc	0	0	. 0	0,20	0	0,30
Gal	2,30	2,40	1,21	2,30	2,30	2,10
Man *	3	3	3	3	3	3
GlcNAc	4,80	4,34	3,99	3,80	3,80	4,10
NeuAc	2,40	1,74	1,14	2,20	2,83	2,50

TABLEAU XXI

Composition molaire en monosaccharides des glycopeptides des

sérotransferrines d'espèces animales différentes

(BU) IIILE				, arrore	in coo	
	Composition molaire en oses des glycopeptides des sérotransferrines					
	Homme	Mouton	Boeuf	Rat A	: Varia B	nts C
Fuc	0	0	0,10	0,20	0	0,40
Gal	2,40	2,50	1,88	2,10	2,30	2,30
Man *	3	3	3	3	3	3
GlcNAc	4,70	4,50	3,40	3,50	4,10	4,20
NeuAc	2,40	2	1,52	1,60	2,60	2,70

* Les rapports molaires ont été calculés sur la base de trois résidus de mannose.

+ Selon Spik et al., en 1968

3) Sérotransferrine de Rat

Les variants A et C renferment des traces de fucose ; les variants B et C possédent un taux plus élevé en acide N-acétyl neuraminique. Il faut rappeler que le variant A obtenu sur DEAE-Séphadex (Pic I) correspond au composé majeur et représente 61,83 % de la sérotransferrine de Rat. Le pic II DEAE-Séphadex chromatographié sur colonne de Con A-Sépharose permet d'obtenir le variant B qui est non retenu sur Con A-Sépharose et qui représente 25,56 % et le variant C qui est retardé sur Con A -Sépharose et qui représente 4,61 % du poids total des glycoprotéines. Un pic III est également élué de la colonne de DEAE-Séphadex, il représente 8,3 % et réagit contre le sérum anti-hémopexine ce qui pose la question de la pureté de ce matériel de départ. L'étude de ce pic n'a pas été poursuivie.

Le comportement des variants transferriniques B et C sur colonne de lectine nous permet d'envisager une structure glycannique différente de celle du glycanne biantenné classique. En effet, la Con A reconnait spécifiquement dans les glycannes des glycoprotéines des structures internes tel le disaccharide Glc NAc (1-2)Man (Debray <u>et al</u>., en 1981). La non reconnaissance des variants B et C par la lectine signifie qu'il y a une modification de la structure au voisinage du chaînon trimannosidique. Les taux de galactose et de N-acétyl glucosamine étant sensiblement constants dans les trois variants, cela exclut le fait que les variants B et C possédent des glycannes de structure triantennée.

- 99 -

III - PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES

1) Hydrolyse pronasique

Des quantités de l'ordre de 60 à 100 mg de sérotransferrine d'origines diverses sont soumises à une hydrolyse pronasique selon le procédé décrit p.216 . Les glycopeptides obtenus sont purifiés sur colonne de Bio Gel P2, analysés en chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse, puis méthylés. Les tableaux XXI et XXII (p. 98) et (p.102) rassemblent les rapports molaires obtenus.

IV - ETUDE DE LA STRUCTURE GLYCANNIQUE

1) <u>Détermination de la composition molaire en</u> monosaccharides

Le tableau XXI(p. 98) rassemble les compositions molaires en oses des glycopeptides totaux des sérotransferrines étudiées. Dans tous les glycopeptides, on retrouve les mêmes monosaccharides, excepté le fucose retrouvé dans les transferrines de Boeuf et de Rat mais à des taux faibles. Les valeurs obtenues pour les résidus de galactose et de N-acétyl glucosamine sont voisines, en général plus faibles que celles de la sérotransferrine Humaine ce qui laisse supposer que l'on est en présence de glycannes de structures biantennées.

Cependant, pour les composés B et C de la sérotransferrine de Rat, la présence d'un résidu d'acide N-acétyl neuraminique supplémentaire, est en contradiction avec la structure classique d'un glycanne biantenné.

- 100 -

2) <u>Méthylation</u>

Les glycopeptides des sérotransferrines ont été méthylés et analysés en spectrométrie de masse. Le tableau XXII(p.102)rassemble les rapports molaires des dérivés méthylés obtenus

a) Sérotransferrine de Mouton

Les rapports molaires des dérivés méthylés de la sérotransferrine de Mouton sont très homogènes. On retrouve 1,50 résidus de (2, 3, 4)Me3-Gal et 1,60 résidus de (4, 7, 8, 9) Me4 -NeuAc ce qui laisse supposer que le glycanne est disialylé. La présence de 1,60 résidus de (3, 4, 6) Me3 -Man est en faveur d'une structure biantennée.

b) Sérotransferrine de Boeuf

La présence de (2, 3, 4, 6)Me4 -Gal et de (2, 3, 4) Me3 -Gal, de un dérivé de (4, 7, 8, 9)Me4-NeuAc, et de 1,60 dérivés de(3, 4, 6) Me3 -Man est en faveur d'une structure biantennée monosialylée.

c) Sérotransferrine de Rat

- Variant A

Les rapports molaires des dérivés méthylés du variant A de la sérotransferrine de Rat sont très voisins de ceux obtenus pour la sérotransferrine de Mouton et sont en faveur d'une structure biantennée disialylée. On retrouve cependant un peu de fucose.

- Variant B

Dans le variant B, d'autres dérivés méthylés sont présents notamment du (2, 4, 6)Me3 -Gal et du 4Me-GlcNAc Me. Cela signifie que le variant B posséde au

TABLEAU XXII

Identification et détermination des rapports molaires des dérivés méthylés des monosaccharides des glycopeptides des sérotransferrines.

Dérivés méthylés	Rapports molaires des sérotransferrines				
	Mouton	Boeuf	Rat A	: Varia B	ants C
(2, 3, 4)Me ₃ -Fuc	0	0	présent	0	0,20
(2, 3, 4, 6)Me ₄ -Gal	0	0,90	0	0	présent
(2, 3, 4)Me ₃ -Gal	1,50	0,80	1,50	1,10	0
(2, 4, 6)Me ₃ -Gal	0	0	0	1,14	1,86
(3, 4, 6)Me ₃ -Man	1,60	1,60	1,80	2	1,50
(2, 4)Me ₂ -Man *	1	1	1	1	1
(4, 6)Me ₂ -GlcNAcMe	0	0	0	0	0,65
(3, 6)Me ₂ -GlcNAcMe	2,70	2,90	2,60	2,60	1,60
4 Me-GlcNAcMe	0	0	0	0,37	0,64
(4, 7, 8, 9)Me ₄ -NeuAc	1,60	0,80	1,80	2,75	2,60

* Les rapports molaires ont été calculés sur la base d'un résidu de (2,4)Me₂-Man.



moins un des acides sialiques lié en α -2, 3 sur le galactose, qu'un résidu de N-acétyl glucosamine est substitué en 6 et que l'un des 2 galactoses se trouve lié en β -1,3 sur ce résidu de N-acétyl glucosamine.

- Variant C

Le variant C renferme en plus du (2, 3, 4)Me3 -Fuc et de la (4,6)Me2 -GlcNAcMe indiquant la présence de galactose lié en β -1,3 sur un résidu de N-acétyl glucosamine non substitué. On retrouve également un peu de (2, 3, 4, 6)Me4 -Gal ce qui indique la présence de résidus de galactose non sialylés.

3) Résonance magnétique nucléaire

Les différents glycopeptides des sérotransferrines ont été analysés en résonance magnétique à 400 MHz et 500 MHz. Le tableau XXIII(p.104)nous donne les valeurs des déplacements chimiques présents dans les monosaccharides constituants les glycopeptides des composés A, B, C de la sérotransferrine de Rat uniquement. Les glycannes des sérotransferrines de Mouton et de Boeuf analysés à 500MHz à Utrech par l'équipe du Professeur Vliegenthart possédent des structures semblables à celles déterminées précédemment. De ce fait, nous n'avons pas fait figurer les valeurs des déplacements chimiques ni les spectres dans ce mémoire. Les Fig. 30(p.105) et 31(p. 106) donnent les spectres de résonance magnétique nucléaire des variants B et C de la sérotransferrine de Rat.

- Variant A

L'interprétation des déplacements chimiques des protons les plus représentatifs est en accord avec celle d'une structure biantennée disialylée en α - 2,6. Une légère hétérogénéité est due à la présence de fucose lié sur l'osamine du point d'attache (CH3 du Fuc : 1.205 ppm),

TABLEAU XX111

.

Glissements chimiques des protons représentatifs de la structure primaire des glycopeptides isolés de la sérotransferrine de Rat.

	Variant A	Variant B	Variant C
	0- B-0-		
	0.20	0.25	0.15
H-1 GlCNAC-1	(b) n.d.	5.070	5.080
GlcNAC-2	4.617 (4.682)	4.616	4.614
Man-3	(b) n.d.	4.773	4.778
Man-4	5.130	5.118	5.110
Man-4'	4.946	4.943	4.921
GlcNAc-5	4.604	4.585	.4.585
GlcNAc-5'	4.604	4.600	4.603
⁴ Gal-6	4.442	-	- 1
³ Gal-6 [*]		4.507	4.507
4Gal-6'	4.444	4.444	
³ Gal-6'	-	-	4.526
H-2 Man-3	4.253	4.248	4.248
Man-4	4.196	4.205	4.211
Man-4'	4.112	4.114	4.118
H-3 6NeuAc	1.718	1.718	1.713
6NeuAc	1.718	1.718	-
3NeuAc	-	1.786	1.785
3NeuAc'	-	-	1.787
H-3 6NeuAc	2.670	2.730	2.680
6Neulc'	2.670	2.675	-
3NeuAc		2.761	2.758
3NeuAc'	~	-	2.758
$H-1 \alpha Fuc(16)$	n.d.	4.872	4.872
CH3 α Fuc(16)	1.205	1.203	1.205
NAC GlCNAC-1	$(a) \int 2.008$	(a) (2.009	2.006
	(2.011	2.013	2.009
GICNAC-2	2.080 (2.093)	2.081 (2.095)	2.078 (2.093)
GICNAC-5	2.069	2.040	2.039
GICNAC-5'	2.066	2.066	2.043
·bNeuAc/NeuAc'	2.030	2.030	2.030
JNeuAc	2.030	2.035	2.035
3NeuAc'	-	-	2.030

a) Hétérogénéité due à la partie protéique b) n.d. : non déterminé c) Les signaux peuvent être intervertis
 Pour les explications concernant la nature des déplacements chimiques, se reporter aux revues générales
 de Vliegenthart et al., en 1981 et 1983.

.

104



-105-



106 -_

(CH3 de GlcNAc : 2.093 ppm). En conclusion, nous pouvons attribuer la structure donnée à la Fig. 15(p. 110), structure rencontrée dans un grand nombre de protéines.

- Variant B

Le spectre obtenu révéle toutes les caractéristiques d'un glycopeptide de type biantenné possédant le noyau trimannosyl N-N'-diacétylchitobiose substitué par des N-acétyl glucosamines liéesen β - 1,2 sur les mannoses <u>4</u> et <u>4</u>'.

L'antenne en α - 1,6 est une unité N-acétyllactosamine portant un acide sialique lié en α - 2,6 sur le galactose <u>6</u>' (NeuAc, H-3ax : 1.718 ppm et H-3éq : 2.675 ppm ; Gal <u>6</u>', H-1 : 4.444 ppm ; GlcNAc <u>5</u>', H-1 : 4.600 ppm et NAc : 2.066ppm Man H-1 : 4.943 ppm)

Le groupe de données suivantes : Gal $\underline{6}$: 4.507 ppm, GlcNAc $\underline{5}$: 4.585 ppm et CH3 de l'acétamido : 2.044 ppm est en accord avec les paramètres obtenus lors de l'analyse RMN à 500 MHz du glycopeptide isolé de l'hémopexine de Rat (Bernard <u>et al</u>., en 1984). Cependant, nous remarquons que l'échantillon est plus hétérogéne et ceci est du à la présence de 25 % de structure fucosylée sur l'osamine du point d'attache et également à la présence d'une structure disialylée classique. Le composé majeur du variant A est donné dans la Fig. 35(p. 110).

- Variant C

Le spectre obtenu montre une grande analogie avec celui obtenu pour le variant B en particulier au niveau de l'antenne liée en α - 1,3.

Par contre, l'antenne liée en α - 1,6 n'est pas classique. Le proton anomérique du mannose <u>4</u>' est à 4.921 ppm ce qui correspond soit à une branche désialylée soit à une branche substituée par de l'acide N-acétyl neuraminique lié en α - 2,3. Cette 2ème hypothèse est confirmée par l'e H-1 Gal <u>6</u>' de 4.526 ppm mais cette valeur n'est pas en accord avec celle de la littérature. En réalité cette résonance provient effectivement d'un galactose substitué en α - 2,3 par de l'acide sialique mais ce galactose est lié en β -1,3 sur la N-acétyl gluccsamine <u>5</u>' (H-1 : 4.603 ppm et NAc : 2.043 ppm).

Ce raisonnement est appuyé par les résultats de méthylation qui mettent en évidence du (4,6)Me₂-GlcNAcMe. Nous pouvons conclure que le variant C posséde la structure donnée dans la Fig. 35(p.110), structure qui n'a pas encore été décrite dans la littérature.

Le spectre montre néanmoins la présence de fucose (15 %) lié en α - 1,6 sur la glucosamine du point d'attache. Nous ne pouvons pas dire dans l'état actuel si cette structure fucosylée est contaminante ou non.

4) Conclusion

a) <u>Structure des glycannes de la sérotransferrine</u> <u>de Mouton</u>

La fig. 32(p.109) représente la structure de glycanne de la sérotransferrine de Mouton.

Il posséde une structure biantennée disialylée identique au glycanne de la sérotransferrine Humaine (Fig. 34; p. 109).

b) <u>Structure du gl</u>/canne de la sérotransferrine <u>de Boeuf</u>

La Fig. 33(p.109) montre que le glycanne de la sérotransferrine Bovine posséde une structure biantennée monosialylée ; l'acide N-acétyl neuraminique étant situé sur la branche comportant du mannose lié en α -1,3.

c) <u>Structure des variants glycanniques de la</u> <u>sérotransferrine de Rat</u>

Les structures des glycannes des variants A, B, C de la sérotransferrine de Rat sont présentées dans la Fig. 35 (p. 110).

NeuAc (
$$\alpha$$
2-6) Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-2) Man (α 1-3)
Man (β 1-4) GlcNAc (β 1-4) GlcNAc (β 1) Asn

NeuAc (α 2-6) Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-2) Man (α 1-6)

FIGURE 32

Structure du glycanne de la sérotransferrine de Mouton

NeuAc($\alpha 2-6$)Gal($\beta 1-4$)GlcNAc($\beta 1-2$)Man($\alpha 1-3$)

Man (β_{1-4}) GlcNAc (β_{1-4}) GlcNAc (β_{1}) Asn

 $Gal(\beta 1-4) GlcNAc(\beta 1-2) Man(\alpha 1-6)$



Structure du glycanne de la sérotransferrine de Boeuf

NeuAc ($\alpha 2-6$) Gal ($\beta 1-4$) GlcNAc ($\beta 1-2$) Man ($\alpha 1-3$)

 $Man(\beta 1-4)$ GlcNAc($\beta 1-4$) GlcNAc($\beta 1$) Asn

NeuAc ($\alpha 2$ -6) Gal ($\beta 1$ -4) GlcNAc ($\beta 1$ -2) Man ($\alpha 1$ -6)

FIGURE 34

Structure du glycanne de la sérotransferrine Humaine (Spik <u>et al</u>., en 1974 et 1975)





Structure du variant transferrinique C

FIGURE 35

Structures des glycannes de trois variants de la sérotransferrine de Rat

- 110 -

- Le variant A

majeur posséde un glycanne de structure biantennée classique disialylée identique au glycanne de la sérotransferrine Humaine et Ovine mais il renferme en plus 0,2 résidu de fucose lié à l'osamine du point d'attache.

- Le. variant B

posséde une structure particulière identique au glycopeptide de l'hémopexine de Rat (Bernard <u>et al</u>., en 1984). Il s'agit d'une structure biantennée trisialylée, l'acide sialique supplémentaire étant lié en α -2,6 sur la N-acétyl glucosamine 5. L'antenne supérieure porte un acide N-acétyl neuraminique lié en α -2,3 sur le galactose. Le 3ème acide sialique est lié en α -2,6 sur le galactose. Cependant par rapport à l'hémopexine 0,25 résidu de fucose est retrouvé.

- Le variant C

posséde une structure voisine du variant A. La différence se situe au niveau de la liaison de l'acide N-acétyl neuraminique de la branche Man (α 1-6). Il est lié en α -2,3 alors que sur le variant A, il est lié en α -2,6 sur un résidu de galactose substituant l'osamine 5 en β -1,3. Des traces de fucose sont également retrouvées.

d) Discussion

L'étude comparative de structures glycanniques de sérotransferrines d'espèces animales différentes indique que quelque soit leur origine, on retrouve toujours un glycanne de structure biantenné classique mono ou disialylé, majeur, qui représente de 60 à 100 % de la sérotransferrine totale. Cependant, chez la plupart des animaux, il existe sur la glycoprotéine un glycanne possédant une structure différente.



FIGURE 36

Structures du glycanne triantenné de la sérotransferrine Humaine (Spik et al., en 1974 et en 1985)

 $Gal (\beta 1-4) GlcNAc (\beta 1-4)$ $Gal (\beta 1-4) GlcNAc (\beta 1-2) Man (\alpha 1-3)$ $Man (\beta 1-4) GlcNAc (\beta 1-4) GlcNAc (\beta 1-4) GlcNAc (\beta 1) Asn$ $Gal (\beta 1-4) GlcNAc (\beta 1-2) Man (\alpha 1-6)$ $(Gal (\beta 1-4)) GlcNAc (\beta 1-6)$

FIGURE 37

Structure du glycanne tétraantenné de l'asialosérotransferrine Humaine (März <u>et al</u>., en 1982). La parenthèse indique que cette branche peut-être incomplète.

- 112 -

La sérotransferrine Humaine (Fig. 36 et 37 p. 112) et la sérotransferrine de Poule (Fig. 18 p. 61) présentent en plus des glycannes de structures biantennées, des glycannes de structures triantennées et parfois tétraantennées, et également des structures biantennées renfermant du fucose. La sérotransferrine de Rat posséde des glycannes ayant un acide N-acétyl neuraminique supplémentaire et parfois du fucose (Fig. 35; p. 110). La sérotransferrine de Cheval posséde des glycannes ayant un résidu d'acide N-acétyl 4-0-acétyl neuraminique (Fig. 24; p. 78).

Ces résultats semblent indiquer qu'une partie des glycannes est effectivement spécifique de chaque espéce animale et que ces glycannes pourraient être des marqueurs de l'évolution.

De nombreux tissus sont capables de synthètiser la transferrine mais la plus grande partie de la transferrine plasmatique est produite par le foie. Or il existe des structures glycanniques différentes pour une sérotransferrine donnée ; se pose donc la question de savoir si ces glycoprotéines sont synthètisées par différents types d'hépatocytes ou s'il existe d'autres cellules que les hépatocytes qui synthètisent de la transferrine que l'on retrouve dans le sang. Etude comparée de la structure des glycannes de la lactotransferrine des laits de Vache et de Chèvre

> CARACTERISATION ET FRACTIONNEMENT DES GLYCOPEPTIDES DE LA LACTOTRANSFERRINE DES LAITS DE VACHE ET DE CHEVRE

Jusqu'à présent, seules les structures des glycannes de la lactotransferrine Humaine ont été établies (Spik <u>et al</u>., en 1982, Matsumoto <u>et al</u>., en 1982). Au Laboratoire, nous avons entrepris une étude comparative de structures glycanniques de la lactotransferrine Humaine avec celles des lactotransferrines de Vache et de Chèvre. En outre, nous avons réalisé une étude des variations de la struture des glycannes de la lactotransferrine de Vache en fonction de la lactation en étudiant la lactotransferrine isolée de trois types différents de secrétions : la secrétion sèche, le colostrum et le lait mature.

I - PREPARATION ET ETUDE DE DIFFERENTS ECHANTILLONS DE LACTOTRANSFERRINES DE VACHE EN FONCTION DE LA LACTATION

A - Variations du taux de lactotransferrine dans le lactosérum en fonction de la lactation

La lactotransferrine présente dans les différents types de secrétion est préparée selon le procédé décrit p.211. Nous avons isolé en triple exemplaires la lactotransferrine à partir de 15 à 20 l des trois différents types de secrétion. Nos études ont été réalisées sur des quantités de lactotransferrine variant de 0,8 à 2,4 g selon le type de secrétion. La pureté des lactotransferrines

est vérifiée par électrophorèse en gel de polyacrylamide. La Fig. 38 p.116 nous indique que les lactotransferrines sont pures et possédent des masses moléculaires voisines. La lactotransferrine isolée du lait de Chévre semble cependant avoir une masse moléculaire plus élevée. La comparaison des taux moyens de lactotransferrine dans les lactosérums de Vache et de Chévre, (Tableau XXIV; p.117) nous révéle que ces protéines existent à l'état de traces dans ces lactosérums (quelques mg) alors que des quantités de l'ordre de 2g existent dans le lactosérum humain. Des variations apparaissent en fonction de la lactation ainsi un taux de lactotransferrine 3 fois plus élevé que dans le lait a été mis en évidence dans la secrétion sèche. A cet égard, nous devons signaler que des résultats analogues ont été décrits dans la littérature. Ainsi en 1970, Smith et al., ont montré une modification de la concentration en lactotransferrine en fonction des différents stades de lactation. En outre, ils ont montré que la quantité totale présente dans la secrétion d'une mamelle était constante. En 1971, ils ont dosé la lactotransferrine dans la secrétion sèche provenant de différentes Vaches ; ils ont trouvé des valeurs allant jusqu'à 3g de lactotransferrine par mamelle. D'autre part lors de l'analyse électrophorétique des protéines du lactosérum à pH 8,9, 30 à 40 % des protéines possédaient une mobilité électrophoretique de type "X-globuline", elles ont été identifiées à de la lactotransferrine. Ce résultat suggère que la variation de la mobilité électrophorétique de la lactotransferrine serait due à la formation d'un complexe entre la lactotransferrine et d'autres constituants du lactosérum. Signalons que Welty et al., en 1975

- 115 -



2345

Figure 38

Electrophorèse en gel de polyacrylamide des différentes préparations de lactotransferrines.

1 : Lactotransferrine isolée du lait de Femme.

1

114

2 : - de la secrétion sèche
3 : Lactotransferrine de Vache isolée - du colostrum
4 : - du lait stabilisé
5 : Lactotransferrine isolée du lait de Chèvre.

TABLEAU XXIV

Taux moyen de lactotransferrine présent dans les lactosérums de différentes espèces.

	Secrétion sèche de Vache	Colostrum de Vache lère 6ème		Lait de Vache stabilisé	Lait de Chèvre	Lait de Femme
Taux moyen de lactotransferrine mg/l	160	80	60	50	30	2000

The s

- 117 -

- 118 -

ont étudié les variations de la concentration de la lactotransferrine dans le cas de quinze vaches non lactantes pendant la période sèche et ont constaté que le taux de toutes les protéines présentes dans ces secrétions variait énormément selon le stade fonctionnel de la glande mammaire ainsi la concentration moyenne avant l'arrêt de la lactation normale était de 250 mg par litre de lait. Puis, elle augmentait chez tous les animaux linéairement au cours de la période de non lactation pour atteindre une valeur de 20 g par litre de lait de secrétion sèche au bout de 24 jours. Un taux record de 118 g par litre constituant une solution à 11,8 p. cent en protéines était obtenu chez une des Vaches au bout de 30 jours de non lactation. Cette valeur paraît excessive mais il faut savoir qu'il existe une variation considérable de la concentration en lactotransferrine d'un animal à l'autre ; de plus la période sèche peut durer de 30 à 200 jours selon la Vache.

Ensuite cette concentration décroît réquièrement jusqu'au vélage (Fig. 39; p. 119). Selon Smith <u>et al</u>., en 1970, la variation du taux de la lactotransferrine au cours de la lactation semble être due à un effet de dilution vu que la quantité totale excrétée reste dans l'ensemble assez constante. Il est donc normal que ce taux soit très élevé dans la secrétion sèche, un peu moins important dans le colostrum et faible dans le lait. Bien que nous ayons observé comme dans la littérature des variations de concentration entre les différents types de secrétion, les valeurs dosées n'atteignent jamais dans les 3 lots de secrétion sèche, des taux en lactotransferrine aussi élevés.



Figure 39

Variations de la concentration de lactotransferrine chez la Vache en fonction de la lactation selon Welty <u>et al</u>, en 1975.

B - <u>Variations de la composition en glucides des</u> <u>lactotransferrines de Vache en fonction de</u> <u>la lactation</u>

1) Composition centésimale

Les compositions centésimales de la lactotransferrine de Vache en fonction de la lactation sont données dans le tableau XXV(p. 121). On remarque que la lactotransferrine de Vache renferme un taux élevé en glucides totaux. Ce taux décroît au cours de la lactation.

2) Composition molaire

De grandes variations apparaissent dans les compositions molaires en monosaccharides (Tableau XXV; p.121). Les taux de fucose, de galactose et d'acide N-acétyl neuraminique sont très faibles dans les trois types de secrétion; par contre on note la présence de la N-acétyl galactosamine dans le colostrum et dans le lait. Excepté dans le lait, le taux de mannose est élevé dans les autres secrétions ce taux décroît au cours de la lactation.

C - <u>Etude comparée de la composition en glucides de</u> <u>la lactotransferrine du lait de Vache avec celle</u> <u>des lactotransferrines isolées des laits de</u> <u>Chèvre et de Femme</u>

Les compositions centésimale et molaire sont résumées dans le tableau XXVI (p. 122).

Comparées à la lactotransferrine humaine qui renferme deux glycannes et 6,40 p. cent d'oses totaux, les lacto-

TABLEAU XXV

Composition centésimale et molaire en glucides des lactotransferrines de Vache isolées à différents stades de lactation.

Monosaccharides	Composition centésimale des lactotransferrines de Vache isolées à partir de				
	Secrétion sèche	Colos lère traite	strum 6ème traite	Lait	
Oses neutres	8,30	7,60	6,50	5,50	
Osamines	4,60	4,50	4,30	5,10	
Acide sialique	0	0,25	0,60	0,55	
TOTAL	12,90	12,35	11,40	11,15	
	Composition molaire en glucides des lactotransferrines de Vache				
Fuc	0	0,20.	0,10	0 ·	
Gal	0,34	0,60	0,30	0,40	
Man	4,90	3,50	3,90	3	
GalNAc	0	0	0,20	0,40	
GlcNAc *	2	2	2	2	
NeuAc	0,10	0,10	0,20	0,20	

* Les rapports molaires ont été calculés sur la base de deux résidus de N-acétyl glucosamine.

TABLEAU XXVI

Compositions centésimale et molaire en glucides des lactotransferrines isolées des laits de Vache, de Chèvre et de Femme.

Monosaccharides	Composition centésimale des lactotransferrines des laits de				
	Vache*	Femme +			
Oses neutres	5,50	6,80	3,11		
Osamines	5,10	3,60	2,10		
Acide sialique	0,55	0,60	1,22		
TOTAL	11,15	11 '	6,43		
	Composition molaire en glucides des lactotransferrines				
Fuc	0	0	1,40		
Gal	0,40	0,46	2,30		
Man	3	4,64	3		
GalNAc	0,40	0,20	0		
GleNAc	2	2	4,40		
NeuAc	0,20	0,24	1,50		



* Les rapports molaires ont été calculés sur la base de deux résidus de N-acétyl glucosamine.

+ Les rapports molaires ont été calculés sur la base de trois résidus de mannose.
transferrines des laits de Vache et de Chèvre renferment nettement plus de glucides. La composition en glucides de la lactotransferrine de Chèvre de ll % est très semblable à celle de la lactotransferrine de Vache. Le nombre de glycannes n'est pas connu.

Les taux de fucose, de galactose et d'acide N-acétyl neuraminique des lactotransferrines de Vache et de Chèvre sont faibles comparés à ceux de la lactotransferrine Humaine; inversement, le taux de mannose est plus élevé dans ces deux lactotransferrines, et on note la présence de 0,2 à 0,4 résidu de N-acétyl galactosamine.

II - PREPARATION ET ANALYSE DES GLYCOPEPTIDES TOTAUX DES LACTOTRANSFERRINES DES LAITS DE VACHE ET DE CHEVRE

Les lactotransferrines de Vache et de Chèvre sont soumises à une hydrolyse pronasique selon le procédé décrit p.216 . Les quantités de glycopeptides obtenues après purification sur colonne de BioGel P2 varient de 60 à 180 mg.

L'analyse en chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse des glycopeptides nous donne les rapports molaires en glucides décrits dans le tableau XXVII(p. 124).

Les compositions molaires obtenues sont voisines de celles des glycoprotéines natives. Il faut cependant noter un taux élevé de résidus de mannose dans les différentes préparations de lactotransferrines de Vache et de Chèvre. On n'obtient jamais un résidu de N-acétyl galactosamine, de galactose et de fucose ce qui laisse penser que les structures sont très hétérogènes et incomplétes.

TABLEAU XXVII

Composition molaire en glucides des glycopeptides des lactotransferrines de Vache et de Chèvre comparée à celle de la lactotransferrine Humaine.

Monosaccharides	Composition molaire des glycopeptides des lactotransferrines							
	Secrétion sèche de Vache*	Colostrum de Vache* lère 6ème traite traite		Lait de Vache *	Lait de Chèvre *	Lait de Femme +		
Fuc	0	0,20	0,10	0,20	0,20	1,25		
Gal	0,32	0,50	0,30	0,55	0,56	2,40		
Man	5,80	. 3, 70	3,90	3,20	5	3		
GalNAc	0,28	0, 20	0,30	0,34	0,30	0		
GlcNAc	2	2	2	2	2	4,20		
NeuAc	0	0,20	0,20	0,20	0,30	1,46		



 Les rapports molaires ont été calculés sur la base de deux résidus de N-acétyl glucosamine.

+ Les rapports molaires ont été calculés sur la base de trois résidus de mannose.

- 124 -

III - FRACTIONNEMENT ET CARACTERISATION DES GLYCOPEPTIDES ISOLES DES DIFFERENTES LACTOTRANSFERRINES

A - Fractionnement et caractérisation des glycopeptides isolés de lactotransferrine de Chèvre

1) Fractionnement sur Colonne de ConA - Sepharose

Les glycopeptides de la lactotransferrine de Chèvre sont fractionnés sur colonne de ConA - Sepharose selon le protocole décrit à la p.220 . Cette chromatographie a permis d'obtenir quatre fractions. Les élutions s'effectuent par le tampon sans α - D - méthyl glucoside (fraction A) puis par le tampon renfermant successivement 10mM (fraction B), 20mM (fraction C) et 200mM (fraction D) d' α - D - méthyl glucoside. Le rendement des différentes fractions est donné dans le tableau XXVIII(p. 126). On remarque qu'une faible partie seulement des glycopeptides n'est pas retenue sur colonne de ConA - Sepharose alors que la moitié de ces glycopeptides est très fortement retenue.

2) <u>Etude de la composition glucidique des</u> <u>différentes fractions</u>

L'étude de la composition molaire des monosaccharides déterminée par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse a conduit aux résultats donnés dans le tableau XXVIII(p. 126).

TABLEAU XXVIII

Composition molaire en glucides des glycopeptides de la lactotransferrine de Chèvre, chromatographiés sur colonne de concanavaline A

	Lait stabilisé					
Monosaccharides	C	omposition	molaire des	fractions		
	A *	в	* C	+ D	+	
Fuc	0,2	0 0	0	0		
Gal	2,3	1,	30 0,	20 0		
Man	3	3	3,	40 5,	60	
GalNAC	0,2	0 0	0	0		
GlcNAc	5,4	10 2,	50 2	2		
NeuAc	0,5	io 0,	50 0,	10 0		
Pourcentage des fractions	5	25	20	50		

- * Les rapports molaires ont été calculés sur la base de trois résidus de mannose
- + Les rapports molaires ont été calculés sur la base de deux résidus de N-acétyl glucosamine.
- A : fraction non retenue sur la colonne.
- B : fraction éluée par le tampon renfermant 10mM de α D méthyl glucoside.
- C : fraction éluée par le tampon renfermant 20mM de α D méthyl glucoside.
- D : fraction éluée par le tampon renfermant 200mM de α D méthyl glucoside.

- La fraction A

non retenue des glycopeptides de la lactotransferrine de Chèvre est riche en résidus de galactose et de N-acétyl glucosamine. Elle renferme 0,20 résidu de N-acétyl galactosamine, très peu d'acide N-acétyl neuraminique et de fucose.

- La fraction B

renferme 1,30 résidus de galactose,pas de N-acétyl galactosamine. Elle posséde de l'acide N-acétyl neuraminique et représente le quart des glycopeptides totaux.

- La fraction C

est de type oligomannosidique légèrement contaminée par des glycannes de type N-acétyllactosaminique.

- La fraction D

est de type oligomannosidique et renferme 5,6 résidus de mannose. Elle est la plus importante.

3) Chromatographie en couche mince des différentes

fractions après action de l'endoglycosidase H

Les fractions isolées du lait de Chèvre sont hydrolysées par l'endoglycosidase H selon le protocole décrit p. 219 . Après déssalage, elles sont chromatographiées sur plaque de silicagel dans le système solvant : n Butanol/acide acétique/eau (2 : l : l, V/V). La Fig.40 (p.128) montre que la fraction A est de type N-acétyllactosaminique, que la fraction B contient à la fois des glycannes



Figure 40

Chromatographie sur couche mince des oligosaccharides de la lactotransferrine du lait de Chèvre isolés sur colonne de ConA - Sépharose.

T : Témoin renfermant de 2 à 9 résidus et de 6 à 8 résidus de mannose.

de type N-acétyllactosaminique et des glycannes de type mannosidique lourds, que les fractions C et D sont de type mannosidique renfermant de 9 à 4 résidus de mannose pour la fraction C et de 7 à 9 résidus de mannose pour la fraction D.

B - Fractionnement et caractérisation des glycopeptides de différentes préparations de lactotransferrine de Vache

Fractionnement des glycopeptides sur colonne de ConA - Sepharose

Les glycopeptides des différentes préparations de lactotransferrine de Vache sont fractionnés sur colonne de ConA - Sepharose de la même manière que ceux de la lactotransferrine de Chèvre. Le rendement des différentes fractions est donné dans le tableau XXIX (p. 130). Seuls les glycopeptides du lait stabilisé donnent une fraction non retenue sur colonne de ConA -Sepharose. Cette fraction est néanmoins très faible (3 %). Les fractions B faiblement retenues sont équivalentes dans les lactotransferrines isolées à différents stades de lactation. Le pourcentage des fractions C est variable. Majeure dans le lait, cette fraction est faible dans les autres secrétions. La fraction D du lait ne représente que 55 %, elle est nettement plus importante dans les colostrums et prédominante dans la secrétion sèche.

> 2) Etude de la composition glucidique des fractions A à D séparées sur colonne de ConA -Sépharose

Le tableau XXIX(p.130) montre que les rapports



TABLEAU XXIV

Composition molaire en glucides des fractions glycopeptidiques de différentes préparations de lactotransferrine de Vache après chromatographie sur colonne de ConA - Sepharose.

•		L	ait		Colostrum lère et 6ème			e trai	te	e Secrétion sèche		
Monosaccharides		Composition molaire des fractions										
	Ao	В*	C*	D+	B* C*	D+	B*	C*	D+	B*	C +	D+
Fuc	0	1	0,70	0	1,20 0,70	0	1,20	0,80	0	0	0	0
Gal	2	2,50	1,40	0,5	2,60 1,40	0	3	1,60	0	0,60	0,50	0
Man	0,50	3	3	3,20	3 3	4	3	3	4,20	3	4,40	7,20
GalNAc	1	0,30	0,70	0	0,30 0,90	0	0,60	0,90	0	0,40	0	0
GlcNAc	1,30	3,80	3,30	2	4 3,50	2	4,30	3,20	2	2,70	2	2
NeuAc	1,80	0,50	0,60	0	0,80 0,30	0	0,50	0,40	0	0	0	0
Pourcentage des fractions	3	10	32	55	10,80 7,20	82	11,50	8,20	80,30	5,60	7,10	87,30

o Les rapports molaires ont été calculés sur la base de deux résidus de galactose

* Les rapports molaires ont été calculés sur la base de trois résidus de mannose.

+ Les rapports molaires ont été calculés sur la base de deux résidus de N-acétyl glucosamine.

A : omM α -D-méthyl glucoside B : 10mM α -D-méthyl glucoside C : 20mM α -D-méthyl glucoside

D : 200mM α -D-méthyl glucoside

molaires des glucides de chaque fraction isolée à partir des lactotransferrines des différents types de secrétion présentent des variations très importantes.

3) Etude de la fraction A isolée à partir de la lactotransferrine du lait stabilisé

Cette fraction non retenue sur colonne de ConA - Sepharose ne représente que 3 % du mélange total des glycopeptides et ne se retrouve que dans le lait stabilisé. Le calcul de sa composition molaire basée sur 2 résidus de galactose nous a montré qu'elle ne renferme presque pas de mannose mais était riche en N-acétyl galactosamine et en acide N-acétyl neuraminique. Elle renferme également du glucose. Une hydrolyse alcaline en milieu réducteur (NaOH 0,1N BH₄ K 1M à 37° 48 h.) ne modifie pas sa composition molaire ce qui indique que la fraction A ne renferme pas de glycannes liés 0-glycosidiquement.

<u>Etude des fractions B isolées du lait stabi-</u> lisé et des colostrums

a) Nouvelle chromatographie sur ConA-Sépharose

Les fractions B du lait et des colostrums représentant 10 % des glycopeptides totaux sont éluées par l' α - D - méthyl glucoside 10 mM.

Leurs compositions molaires sont relativement constantes ce qui nous a amené à étudier uniquement la fraction B isolée du lait. Elle renferme un résidu de fucose, 2,5 résidus de galactose, très peu de N-acétyl galactosamine et peu d'acide N-acétyl neuraminique.

La fraction B de la secrétion sèche bien qu'ayant une composition molaire différente des autres fractions B n'a pas été étudiée, les quantités obtenues étant faibles. En outre Maliet et Plantey en 1977 ont isolé un glycopeptide de composition molaire très proche (Fig. 50; p. 156).

La fraction B isolée du lait est rechromatographiée sur colonne de ConA - Sepharose afin d'éliminer les contaminants oligomannosidiques restants. La fraction B_1 est éluée par l' α - D - méthyl glucoside lOmM.

5) Etude des fractions C isolées du lait stabilisé et des colostrums

a) Nouvelle chromatographie sur ConA-Sepharose

Par chromatographie sur colonne de ConA -Sepharose une fraction plus fortement retenue est éluée par le tampon renfermant de l' α - D - méthyl glucoside 20 mM. Seules les fractions C du lait et des colostrums sont étudiées dans ce chapitre. En effet, la fraction C de la secrétion sèche étant essentiellement de type oligomannosidique, elle est étudiée avec les fractions D isolées des différentes secrétions. Les fractions C du lait et des colostrums ont des rapports molaires en monosaccharides très voisins ce qui nous a amené à étudier en détail la fraction C isolée du lait ; la quantité obtenue étant plus importante. Cette fraction renferme un taux de N-acétyl galactosamine plus élevé que les fractions B et un taux de galactose plus faible. Elle renferme également 0,6 résidu d'acide N-acétyl neuraminique. La fraction C du lait est rechromatographiée sur colonne de ConA -Sepharose afin d'éliminer les contaminants oligomannosidiques. La fraction C_lobtenue est éluée de la colonne par le tampon renfermant de l' α - D - méthyl glucopyrannoside 15mM.

6) Etude des fractions D isolées à partir des différentes préparations de lactotransferrines

Les fractions D des différents types de secrétion fortement retenues sur la colonne de ConA-Sepharose sont éluées par l' α - D - méthyl glucoside 200mM.

Elles sont toutesde type mannosidique. La fraction D du lait renferme un taux de mannose peu élevé. Elle représente 55 % des glycopeptides totaux ce qui est faible comparé au pourcentage de la fraction D des autres secrétions. Les fractions D des colostrums sont de structure voisine à celle du lait mais elles existent en quantité plus importante (80 %). Elles ont une composition voisine de la fraction C de la secrétion sèche. Cette fraction C sera donc fractionnée en même temps que les fractions D. La fraction D de la secrétion sèche renferme le taux de mannose le plus élevé. Elle est également la plus importante (87%).

Les oligomannosides présents dans les fractions D ont été libérés par hydrolyse enzymatique et séparés par HPLC et par couche mince.

a) Libération des oligomannosides

a) Action de l'endoglycosidase H et chromatographie en couche mince des oligomannosides des différentes lactotransferrines

Les fractions D de la lactotransferrine Bovine isolées à différents stades de lactation sont hydrolysées par une endoglycosidase H selon le protocole décrit à la p.219. Après déssalage, elles sont chromatographiées sur plaque de silicagel. La migration s'effectue dans le système solvant décrit par Tsai <u>et al</u>., en 1984. Après sèchage, le chromatographe est révélé par pulvérisation d'orcinol sulfurique (Fig. 41, p.135).

Cette figure confirme que la secrétion sèche renferme des oligomannosides lourds à savoir 8 et 9 résidus de mannose donc un peu plus lourds que la valeur de 7 trouvée en méthanolyse. On constate peu de différence entre les deux colostrums étudiés. Le lait contient essentiellement des glycannes oligomannosidiques renfermant de 3 à 6 résidus de mannose.

En conclusion, la secrétion sèche posséde un taux de glycannes mannosidiques beaucoup plus important que dans les autres secrétions. Ce taux de glycannes immatures diminue un peu dans le colostrum et très nettement dans le lait. On arrive dans ce cas à un rapport de l : l entre les glycannes de type N-acétyl lactosaminique et les glycannes de type mannosidique.

β) Action de l'endo-N-acétvl- β - D glucosaminidase

Nous avons mélangé les 4 fractions D des différentes secrétions ainsi que la fraction C de la secrétion sèche afin d'hydrolyser l'ensemble des glycopeptides mannosidiques. L'hydrolyse est réalisée par l'endo-N-acétyl - β - D glucosaminidase de Basidiomycète insolubilisé selon le protocole décrit p.217 . Une cinétique d'hydrolyse nous a permis de déterminer que 4 jours de



Figure 41

Chromatographie sur couche mince des oligomannosides de la lactotransferrine de Vache à différents stades de lactation.

- T : Témoins renfermant de 4 à 9 résidus de mannose et 7 à 9 résidus de mannose.
- 1 : Oligomannosides de secrétion sèche
- 2 : Oligomannosides de colostrum lère traite
- 3 : Oligomannosides de colostrum 6ème traite
- 4 : Oligomannosides de lait stabilisé.

recyclage sur la colonne à température ambiante étaient nécessaires pour hydrolyser les glycopeptides mannosidiques de la lactotransferrine de vache.

La chromatographie sur couche mince en solvant : n butanol/acide acétique/eau (2 : l : l, V/V) d'un aliquote de l'hydrolysat nous permet d'observer la présence de 5 taches.

Ces constituants possédent une vitesse de migration voisine de celle des oligosaccharides témoins renfermant de 4 à 9 résidus de mannose.

b) <u>Séparation des oligomannosides par chromato-</u> graphie liquide en haute pression (HPLC)

Après hydrolyse, le mélange d'oligosaccharides est réduit par le borohydrure de potassium. Les oligosaccharides réduits sont chromatographiés en haute pression sur colonne Amino AS-5A. Nous injectons des quantités de l'ordre du mg. La résolution se fait par un gradient acétonitrile/H₂O selon le protocole décrit à la p.221.

Dix µl du témoin contenant en mélange des glycannes de 4 à 9 résidus de mannose sont injectés préalablement afin d'étalonner l'appareil et d'identifier les pics obtenus avec ceux des oligosaccharides de la lactotransferrine de Vache. La chromatographie en haute pression des oligomannosides de la lactotransferrine de Vache permet de séparer 6 pics majeurs (Fig. 42.p. 137).

Dix µl de chacun des pics ainsi que des témoins oligomannosidiques sont déposés en chromatographie en couche mince en solvant : n butanol/acide acétique/eau (2 : l : l, V/V). Ces oligomannosides se sont révélés être homogènes en couche mince (Fig. 43:p. 137).



Figure 42 Séparation des oligomannosides de la lactotransferrine de Vache en chromatographie liquide en haute pression sur Amino AS - 5A



Figure 43

Chromatographie sur couche mince des oligomannosides de la lactotransferrine de Vache séparés par chromatographie en haute pression

T : Témoins renfermant de 7 à 9 résidus et de 2 à 4 résidus de mannose.

c) <u>Etude de la composition glucidique des diffé</u>rents oligomannosides

Ces fractions sont analysées en chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse. Les résultats donnés dans le tableau XXX (p.139) montrent la présence de glycannes de 4 à 9 résidus de mannose. Cependant nous n'observons pas un nombre entier de résidus de mannose ce qui laisse supposer que ces fractions ne sont pas homogènes.

7) Conclusion

La Fig. 44 (p.140) résume le schéma de fractionnement utilisé pour l'étude des glycopeptides des lactotransferrines de Vache isolés à différents stades de lactation.

Le tableau XXXI (p.141) résume les variations de la composition en glycannes de la lactotransferrine de Vache en fonction de la lactation comparées aux compositions glycanniques des lactotransferrines des laits de Chèvre et de Femme.

Les glycannes de type oligomannosidique décroissent en fonction de la lactation. On arrive a un rapport égal entre les glycannes de type oligomannosidique et les glycannes de type N-acétyllactosaminique dans la lactotransferrine du lait de Vache. Ce résultat est retrouvé pour le lait de Chèvre. Le lait Humain est totalement dépourvu de structures glycanniques de type oligomannosidique. Chaque fraction isolée a été méthylée et analysée en résonance magnétique nucléaire. Ces résultats font l'objet du chapitre suivant.

TABLEAU XXX

Composition molaire en monosaccharides des oligomannosides de lactotransterrine de Vache séparés par HPLC

Monosaccharides	(Composit:	ion mola:	ire d es :	fraction	S
	1	2	3	4	5	6
Man	3,60	5,30	5,70	6,40	7,80	8,50
GlcNAc ^{itol} *	1	1	1	1	` 1	l
GlcNAc Man	0,55	0,38	0,35	0,31	0,26	0,23

* Les rapports molaires ont été calculés sur la base d'un résidu de N-acétyl glucosaminitol.

- 139 -



Schéma de fractionnement des glycopeptides des différentes lactotransferrines de Vache

TABLEAU XXXI

Variations de la composition en glycannes en fonction de la lactation dans la lactotransferrine de Vache comparées aux compositions en glycannes de la lactotransferrine des laits de Chèvre et de Femme

Glycannes	Secrétion sèche	Colos de Va	strum Ache	Lait de	Lait de	Lait	
	de Vache	lère traite	6ème traite	Vache	Chèvre	Aumain	
Type N-acétyllac- tosaminique %	6	18	20	.45	50	100	
Type oligomanno- sidique %	94	82	80	55	50 .	0	

STRUCTURE DES GLYCANNES DES LACTOTRANSFERRINES DES LAITS DE CHEVRE ET DE VACHE

I - STRUCTURE DES GLYCANNES DE LA LACTOTRANSFERRINE DE CHEVRE

A - <u>Méthylation des fractions A, B, C, D séparées</u> sur colonne de ConA - Sepharose

Les fractions ont été méthylées selon le protocole décrit p.224 . D'après les rapports molaires donnés dans le tableau XXXII(p. 143), les structures glycanniques qui ont été proposées sont les suivantes :

- La fraction A

est de type N-acétyllactosaminique biantennée plus cu moins sialylée, légèrement fucosylée.

- La fraction B

est de type N-acétyllactosaminique. Cependant, elle renferme un peu de perméthyl mannose et est souillée par des oligomannosides.

- La fraction C

est de type oligomannosidique. Elle doit renfermer un mélange de glycannes oligomannosidiques.

- La fraction D

est également de type oligomannosidique mais avec un nombre de résidus de mannose supérieur.

B - Résonance magnétique nucléaire

Les composés A, B, C, D ont été analysés en résonance magnétique nucléaire à 400 MHz. Le tableau XXXIII(p.145) donne les valeurs des déplacements chimiques présents dans les monosaccharides constituant les glycopeptides de la lactotransferrine de Chèvre. Les Fig. 45 (p.146), 46 (p.147) et 47 (p. 148) donnent les spectres de résonance magnétique nucléaire à 400 MHz des fractions A, C et D.

TABLEAU XXXII

Identification et détermination des rapports molaires des dérivés méthylés des monosaccharides des glycopeptides de la lactotransferrine de Chèvre séparés sur colonne de ConA - Sépharose.

Dérivés méthylés	Rapports molaires					
	A *	B *	C *	D +		
(2, 3, 4)Me ₃ -Fuc	0,30	. 0	0	0		
(2, 3, 4)Me ₃ -Gal	1,13	0,70	0	0		
(2, 3, 4, 6)Me ₃ -Gal	0,80	0,35	0	0		
(2, 4)Me,-Man	1	1	1	2		
(3, 4, 6)Me ₃ -Man	. 2	1,80	1,55	3,50		
(2, 3, 4)Me ₃ -Man	0	0,30	0,93	0,30		
(2, 3, 4, 6)Me ₄ -Man	0	0,80	2,50	3,40		
(3, 6)Me ₂ -GlcNAcMe	3,20	2,50	1,84	1,80		
(4, 7, 8, 9)Me ₄ -NeuAcMe	0,44	0,47	0	0		

- * Les rapports ont été calculés sur la base d'un résidu de (2,4)Me₂-Man.
- + Les rapports ont été calculés sur la base de deux résidus de (2,4)Me₂-Man.

- 143 -

- Fractions A et B

L'interprétation des spectres est facile et est en faveur de structures biantennées de type N-acétyllactosaminique plus ou moins sialylées et fucosylées.

Les valeurs des déplacements chimiques des protons les plus représentatifs nous montre qu'il s'agit de structures classiques dont l'argumentation ne nécessite pas d'être développée. La fraction A est constituée d'un glycopeptide biantenné sialylé et plus ou moins fucosylé alors que le glycopeptide de la fraction B posséde cette même structure mais non fucosylée et non sialylée sur le galactose $\underline{6}$ ' Ces structures sont données à la Fig. 48 (p. 150).

Fraction C

Cette fraction est de type oligomannosidique puisque l'on ne voit pas les résonances des groupements acétamido de N-acétyl glucosamines 1 et 2 mais elle est très hétérogéne puisque l'on met en évidence tous les isomères possibles de Man 4 à Man 9. L'interprétation du spectre (Fig. 46 p. 147) est en faveur d'un oligomannoside possédant quatre résidus de mannose. Nous mettons en évidence le noyau trimannosido -N-N' diacétyl-chitobiose. Il existe également un mannose 3 monosubstitué par un mannose 4' (H-1Man3 = 4.769 ppm). La valeur H-1Man 4' = 4.869 ppm est caractéristique d'un mannose substitué, ici par un mannose B (H-1 = 4.906 ppm); mais la valeur H-1 = 5.093 ppmpeut-être également attribuée à un doublet du proton anomérique d'un mannose A confirmé par H-2 = 4.063 ppm. En conclusion, les 2 produits majeurs de la fraction C possédent les structures données à la Fig. 48(p. 150).

Nous pouvons caractérisé la même structure sans Man $\frac{4}{2}$ et (H-lMan $\frac{3}{2}$ = 4.769 ppm) et tous les isomères possibles jusqu'à Mang Glc NAc₂Asn (H-l ManA = 5.398 ppm, H-l ManB = 5.140 ppm, H-l ManC = 5.300 ppm). On retrouve également les différents mannoses D1, D2 et D3 en position terminale non réductrice.

* n.d. : non déterminé lel * 2.065 ppm pour Man_g GlCNAC₂ Asn If) Le spectre présenté à la Fig. 15 p. 116 est celui de l'oligosaccharide alditol. Lal hétérogénéité due à la partae peptidaque (b) sans ou avec fucose

lel non substitué ou substitué entre parenthèses Idi la valeur ne peut étre précisée davantage à cause de la complexité du mélange

- 145--

- 1

1.

Glissements chimiques des protons représentatifs de la

TABLEAU XXXIII





Fraction C : structure majeure



Figure 46

Spectre de résonance magnétique nucléaire à 400 MHz de la fraction glycopeptidique C de la lactotransferrine de Chèvre obtenue sur colonne de ConA-Sépharose. Le spectre est réalisé dans les conditions de mesure données dans la légende de la Fig. 45.



-148-

Fraction D

Les glycopeptides composants la fraction D sont de type oligomannosidique mais comparés à la fraction C, ils sont de taille plus importante. Le dépouillement du spectre (Fig. 47;p.148) permet de reconnaitre immédiatement le noyau trimannosido - N, N' di-acétyl chitobiose substitué par plusieurs résidus de mannose. La présence des mannoses A, B, C substitués démontre sans ambiguité la structure Mang GlcNAc2Asn. Par contre l'existence des mannoses A et C terminaux (H-1 = 5.088 ppm, H-1 = 5.057ppm respectivement) mais jamais de mannose B terminal (H-1 4.90 ppm) prouve que la plus petite structure présente est Man₇GlcNAc₂Asn. En conclusion, nous pouvons dire que la fraction D est composée de quatre glycopeptides dont les structures sont résumées dans la Fig. 48 (p. 150).

C - Commentaires

Les structures des différents glycannes présents dans la lactotransferrine de Chèvre sont données à la Fig. 48 (p. 150).

- La fraction A

est de type N-acétyllactosaminique et posséde une structure biantennée plus ou moins fucosylée, et sialylée sur les 2 branches. On ne retrouve pas de structures renfermant de la N-acétyl galactosamine.

- <u>La fraction B</u>

est également de type N-acétyllactosaminique mais non fucosylée monosialylée. Elle est contaminée par des structures oligomannosidiques.

- La fraction C

est de type oligomannosidique. Le glycanne majeur renferme 4 résidus de mannose et correspond à un produit du catabolisme des glycannes. La Fig. 40 (p. 128) montre cependant que cette fraction contient d'autres oligomannosides plus lourds.





NeuAc ($\alpha 2-6$) Gal ($\beta 1-4$) GlcNAc ($\beta 1-2$) Man ($\alpha 1-3$) Man ($\beta 1-4$) GlcNAc ($\beta 1-4$) GlcNAc ($\beta 1-4$) GlcNAc ($\beta 1$) Asn Gal ($\beta 1-4$) GlcNAc ($\beta 1-2$) Man ($\alpha 1-6$)









Fraction D

FIGURE 48

Structures des glycannes de la lactotransferrine de Chèvre isolés par chromatographie sur colonne de ConA - Sépharose.

- La fraction D

est également de type oligomannosidique. Elle renferme essentiellement des glycannes à 7,8 et 9 résidus de mannose.

II - STRUCTURE DES GLYCANNES DE LA LACTOTRANSFERRINE DE VACHE

A - Etude de la fraction A

1) <u>Méthylation</u>

La fraction A ne se retrouve que dans le lait de Vache. Elle est non retenue sur Colonne de ConA -Sepharose . Pour faciliter l'étude de sa structure, la partie peptidique est hydrolysée selon le protocole mis au point par Lee et Scocca décrit p.220. Elle est ensuite méthylée. Les rapports molaires obtenus sont présentés dans le tableau XXXIV(p. 152). La méthylation indique que cette fraction est très hétérogène. On retrouve de nombreux dérivés méthylés notamment du galactose et du glucose. Cette méthylation ne permet pas cependant de déduire la structure de cette fraction très complexe. De plus, les quantités obtenues sont très faibles et n'ont pas permis de déterminer la structure par résonance magnétique nucléaire. A l'avenir, nous allons essayer de réisoler cette fraction afin de préciser sa structure.

B - Etude des glycannes de la fraction B

1) Méthylation

La fraction B_1 des glycopeptides de la lactotransferrine du lait est obtenue par un 2ème fractionnement sur colonne de ConA - Sepharose. Elle est éluée par l' α - D méthyl glucoside 15mM. Cette fraction a été méthylée et analysée en spectrométrie de masse. Les rapports molaires obtenus sont présentés dans le tableau XXXIV (p. 152). Le glycanne posséde l résidu de fucose lié en α - 1,6 donc au point d'attache. On retrouve un type de dérivés tri Me - Gal ce qui signifie que le résidu d'acide N-acétyl neuraminique est branché en α - 2,6.

TABLEAU XXXIV

Identification et détermination des rapports molaires des dérivés méthylés des monosaccharides des fractions A₁et B₁

Dérivés méthylés	Rapports molaires		
	A ₁ +	^B 1 *	
(2, 3, 4)Me ₃ - Fuc	0,10	0,90	
(2, 3, 4, 6)Me ₄ -Gal	1	0,65	
$(2, 3, 4, 6) Me_4 - Glc$	0,40	0	
(2, 3, 4)Me ₃ -Gal	0,43	0,86	
(2, 4, 6)Me ₃ -Gal	0,25	0	
(3, 4, 6)Me ₃ -Man	0,25	1,60	
(2, 4)Me ₂ -Man	0,25	1	
(2, 4)Me ₂ -Gal	0,36	0	
(3,4) Me ₂ -Glc	0,5	0	
(2,6) Me ₂ -Gal	0,20	0	
(4,6) Me ₂ -Glc	0,10	· 0	
(3, 6)Me ₂ -GlcNAcMe	0,80	3,10	
(4, 7, 8, 9)Me ₄ -NeuAcMe	0,96	1,10	



+ Les rapports molaires ont été calculés sur la base de un résidu de (2, 3, 4, 6)Me₄-Gal.

Les rapports molaires ont été calculés sur la base de un dérivé de (2,4)Me₂-Man.

2) Résonance magnétique nucléaire

Le tableau XXXV (p.154) donne les valeurs des déplacements chimiques présents dans les monosaccharides constituant cette fraction B₁.

Fraction B1

Précisons immédiatement que la fraction B₁ est souillée par la fraction C₁ et sera discutée dans le chapître suivant. L'interprétation du spectre est assez difficile à cause de la complexité du mélange et de la présence d'une partie peptidique importante qui perturbe les signaux Cependant, l'analyse est en faveur d'une structure de type N-acétyllactosaminique biantennée, plus ou moins sialylée et fucosylée. En effet, on retrouve le groupe des paramètres caractéristiques du noyau trimannosido - N,N'-diacétyl chitobiose. (H-2 = 4.250 ppm, H-2 = 4.192 et H-2 = 4.110 ppmpour les mannoses $\frac{3}{4}$, $\frac{4}{4}$ et $\frac{4}{4}$ respectivement). Le noyau est substitué par deux résidus de N-acétyl lactosamine liés en β- 1,2 sur les mannoses 4 et 4'. L'antenne liée sur le mannose 4 est substituée par un résidu d'acide N-acétyl neuraminique lié en α - 2,6 sur le galactose (H-lMan4 = 5.135 ppm, H-1GlcNAc 5 = 4.606 ppm et H-1 Gal6 = 4.445 ppm). L'antenne portée par le mannose $\underline{4}$ ' est de type asialo (H-1 Man4' = 4.928 ppm, H-1GlcNAc 5' = 4.581 pp et H-1 Gal6' = 4.472 ppm). Cette structure est compliquée par le fait qu'elle est plus ou moins fucosylée en α - 1,6 sur la N-acétyl glucosamine du point d'attache (H-1 = 4.878 ppm et CH3 = 1.210 ppm). L'influence de cette substitution est surtout visible pour la GlcNAc 2 (H-1 = 4.682 ppm et NAc = 2.095 ppm en présence de fucose H-1 = 4.616 ppm et NAc = 2.080 ppm en l'absence de fucose). L'intégration des signaux relatifs aux groupements acétamido deGlcNAc 2 permet de préciser qu'il y a 40 % de structures fucosylées. En conclusion, le glycopeptide composant la fraction Bl posséde la structure donnée à la Fig. 49 (p. 155).

TABLEAU XXXV

Glissements chimiques à 400 MHz des protons représentatifs de la structure primaire de la fraction B_l isolée de la lactotransferrine de Vache

		O-B-O-Asn	O
		60%	► ••• _{40%} d
H-l	GlcNAc - 1 $Glc NAc-2$ $Man - 3$ $Man - 4$ $Man - 4'$ $GlcNAc - 5$ $GlcNAc - 5'$ $Gal - 6$ $Gal - 6'$	<pre>(a) 5.070-5.095-5.120 4.616 4.767 5.135 4.928 4.606 4.581 4.445 4.472</pre>	(a) 5.070-5.095-5.120 4.682 4.767 5.135 4.928 4.606 4.581 4.445 4.472
H-2	Man - 3 Man - 4 Man - 4'	4.250 4.195 4.110	4.250 4.195 4.110
H-3ax	NeuAc (α -2,6)	1.717	1.717
H-3éq	NeuAc (α-2,6)	2.668	2.668
H-l	Fuc (α-1,6)	#3	4.878
СНЗ	Fuc $(\alpha - 1, 6)$		1.210
NAC	GlcNAc - 1 GlcNAc - 2 GlcNAc - 5 GlcNAc - 5' NeuAc (α -2,6)	(a) 2.005-2.007-2.014 2.080 2.069 2.047 2.030	(a) 2.005-2.007-2.014 2.095 2.069 2.047 2.030

Fraction B₁

BUN(a) Hétérogénéité due à la partie peptidique.

. .

3) Structure

La Fig. 49(p.156)donne la structure de la fraction B_1 de la lactotransferrine de Vache. Elle posséde une structure biantennée fucosylée possédant un acide N-acétyl neuraminique sur la branche liée en α 1,6. Maliet et Plantey en 1977 ont également analysé des dérivés méthylés des glycopeptides trypsiques de type N-acétyllactosaminique. Deux structures ont été proposées. Une structure classique biantennée renfermant zéro à un résidu d'acide N-acétyl neuraminique et une structure incomplète possédant une antenne sialylée ou non (Fig. 50; p. 156).

C - Etude des glycannes de la fraction C,

Seule cette fraction renferme de la N-acétyl galactosamine et le problème qui s'est posé a été de définir la position de la N-acétyl galactosamine dans le glycanne.

1) Localisation du résidu de N-acétyl galactosamine

La fraction C_1 est obtenue par rechromatographie de la fraction C sur la colonne de ConA - Sepharose. Elle est éluée par l' α - D-méthyl glucoside 15mM. Cette fraction renferme 0,7 résidu de N-acétyl galactosamine. Elle posséde moins de galactose que la fraction B_1 . Afin de positionner le résidu de N-acétyl galactosamine, différentes hydrolyses enzymatiques ont été réalisées avant d'étudier la structure par méthylation et résonance magnétique nucléaire.

a) Hydrolyses enzymatiques

La Fig. 51 (p. 157)schématise les différentes étapes suivies pour localiser le résidu de N-acétyl galactosamine.

NeuAc($\alpha 2-6$) Gal($\beta 1-4$) GlcNAc($\beta 1-2$) Man($\alpha 1-3$), Man $(\beta_{1}-4)$ GlcNAc $(\beta_{1}-4)$ GlcNAc (β_{1}) Asn $(Fuc(\alpha 1-6))$ 0.40 $Gal(\beta 1-4) GlcNAc(\beta 1-2) Man(\alpha 1-6)^{\prime}$

FIGURE 49

Structure de la fraction B₁ N-acétyllactosaminique isolée de la lactotransferrine de Vache.



(3) (NeuAc (α 2-6)) Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-2) Man (α 1-6)

FIGURE 50

Structures des glycopeptides de type N-acétyllactosaminique selon Maliet et Plantey en 1977.





Schèma de fractionnement de la fraction C N-acétyllactosaminique de la lactotransferrine de Vache.

α)Recherche de N-acétyl galactosamine située du côté de la chaîne peptidique

Dans un premier temps, nous avons cherché si le résidu de N-acétyl galactosamine était situé près de la chaîne peptidique.

Cette fraction C₁ est désialylée par action d'une neuraminidase soluble en tampon acétate de sodium 0,1M pH6 pendant une nuit à 37° C. Elle est ensuite purifiée sur colonne de Dowex 1 x 2. La désialylation est vérifiée par méthanolyse et analyse en phase gazeuse. (Tableau; XXXVI p. 161).

La chaîne peptidique du glycopeptide a été N-acétylée avec de l'anhydride acétique C¹⁴. Après dessalage, le produit marqué est hydrolysé par l'endo-N-acétyl $-\beta - D$ - glucosaminidase en tampon citrate-phosphate pendant 20 h. à 37°. Par purification sur colonne de BioGel P₂, deux pics sont obtenus :

- Le premier pic (I) au volume d'exclusion de la colonne ayant donc une masse moléculaire plus importante est très faiblement marqué. Il est repéré par dépôt sur plaque de silicagel et révèlé à l'orcinol sulfurique.

- Le deuxième pic retardé (II) ayant une masse moléculaire plus faible est fortement marqué. Il est repéré par comptage de la radioactivité. L'analyse de ces deux pics indique que le premier pic contient 90 % d'oligosaccharides et 10 % de glycopeptides marqués non hydrclysés. Le deuxième pic correspond à la partie peptidique à laquelle est rattaché le résidu d'osamine n : l.

Identification de l'osamine n : 1

Ce pic fortement marqué est chromatographié sur feuille de papier Watman 3 en présence d'un témoin Asn - GlcNAc en solvant pyridine/acétate d'éthyle/acide acétique/H2O, (5 : 5 : 1 : 3, V/V), une nuit à température ambiante. Par comparaison de migration, on constate qu'il
migre un peu moins haut que le témoin. Afin d'analyser son contenu, on le soumet à une hydrolyse par HCl 4 N, 4 h. à 105° C. Après neutralisation sous exicateur de soude, l'hydrolysat est repris par 100 µl de méthanol, déposé sur plaque de silicagel et chromatographié en solvant : n butanol/éthanol/eau/acide acétique/pyridine, (10 : 100 : 30 : 3 : 10, V/V) en présence de témoins d'acides aminés différents, de galactosamine et de glucosamine. Par révélation à la ninhydrine, on constate la présence dans ce deuxième pic de résidus de sérine d'acide aspartique et de glucosamine (Fig. 52;p.160).

Le résidu d'osamine lié au point d'attache est donc de la N-acétyl glucosamine.

Identification de l'osamine n : 2

Le pic obtenu à l'exclusion de la colonne et non marqué est réduit par le borohydrure de potassium afin de stabiliser le résidu d'osamine terminal. Après déssalage sur colonne de BioGel P₂, il est méthanolysé et analysé en phase gazeuse (Tableau XXXVI; p. 161). Après réduction, on constate l'apparition de N-acétyl glucosaminitol ; le taux de N-acétyl galactosamine reste voisin de celui du produit de départ.

De cette série d'expériences on peut conclure que le résidu de N-acétyl galactosamine ne correspond pas aux résidus d'osamine n : l et 2 situésdu côté de la chaîne peptidique. Sa localisation externe reste donc à prouver.



Figure 52

Chromatographie en couche mince du pic II obtenu après hydrolyses enzymatique et chimique.

TABLEAU XXXVI

Composition molaire en glucides des glycopeptides N-acétyllactosaminiques de la fraction C₁ non hydrolysés et hydrolysés par l'endo-N-acétyl β - D glucosaminidase

Monosaccharides	Composition molaire de la					
	Fraction C _l de départ	Fraction C _l désialylée	Pic I obtenu par hydrolyse enzymatique			
Fuc	0,70	0,50	0,40			
Gal	1,40	0,90	1,10			
Man*	3	3	3			
GalNAc	0,70	0,95	0,80			
GlcNAC	3,30	2,90	1,10			
GlcNAc itol	0	0	0,80			
NeuAc	0,60	0	0			

TABLEAU XXXVII

Composition molaire en glucides des dérivés polyols péracétates de la fraction C₁ désialylée, dégalactosylée.

Monosaccharides	Composition molaire
Fuc	0,1
Gal	0,2
Man*	3
GalNAc	0,8
GlcNAC	2,6

* Les rapports molaires ont été calculés sur la base de trois résidus de mannose.

B) Recherche de N-acétyl galactosamine située en position n : 5 ou 5'

Le résidu de N-acétyl galactosamine étant probablement situé du côté externe, on peut penser qu'il substitue un résidu de N-acétyl glucosamine ou de galactose par rapport à une structure biantennée classique. Pour une meilleure mise en évidence des deux sortes d'osamines, le résidu de galactose présent dans la fraction C_1 est hydrolysé.

Une autre partie de la fraction N-acétyllactosaminique C₁ désialylée, est dégalactosylée par l'action de β galactosidase de Jack Bean en tampon phosphate/citrate 0,2M/0,1M pendant 48 h. à 37° C. L'absence de galactose est vérifiée par méthanolyse puis une analyse des monosaccharides sous forme de polyols peracétates est réalisée qui permet une meilleure séparation des osamines.

Les compositions molaires sont données dans le tableau XXXVII(p. 161). On constate qu'il reste 0,2 résidu de galactose.

2) Méthylation

Les dérivés méthylés de la fraction C_1 sont analysés en spectromètrie de masse. Le diagramme des dérivés méthylés est donné dans la Fig. 53 (p. 163). Le tableau XXXVIII p. 163 présente les rapports molaires des différents dérivés méthylés. La présence de 0,4 résidu de (2, 3, 4)Me3 - Fuc indique qu'un résidu de fucose est lié en α = 1,6 sur le résidu de N-acétyl glucosamine n : 1.

Les rapports molaires des dérivés (2, 3, 4, 6)Me4 -Gal et (2, 3, 4)Me3-Gal et (4, 7, 8, 9)Me4 - NeuAc Me indiquent que nous sommes en présence d'un glycanne



Figure 53

Séparation des dérivés méthylés des monosaccharides présents dans la fraction C_l par chromatographie gazeuse. L'identification des dérivés est donnée dans le tableau

ci-dessous

TABLEAU XXXVIII

Identification et détermination des rapports molaires des dérivés métnylés des monosaccharides de la fraction N-acétyllactosaminique C₁

Dérivés méthylés	Rapports molaires
pic 1 (2,3,4)Me ₃ -Fuc	0,40
pic 2 (2,3,4,6)Me ₄ -Gal	0,90
pic 3 (3,4,6)Me ₃ -Man	1,98
pic 4 (2,3,4)Me ₃ -Gal	0,77
pic 5 (3,4,6)Me ₃ -GalNAcMe	0,81
pic 6 (2,4)Me ₂ -Man*	1
pic 7 (3,6)Me ₂ -GlcNAcMe	3,15
pic 8 (4,7,8,9)Me ₄ -NeuAcMe	0,82 (B U U41 ₄

* Les rapports molaires ont été calculés sur la base d'un résidu de (2,4)Me₂-Man.

- 163 -

monosialylé à 80 p. cent. Il est bien de type biantenné car nous avons un résidu de (2, 4)Me2 - Man et deux résidus de (3, 4, 6)Me3 - Man. La présence de 2, 15 résidus de (3, 6)Me2 - GlcNAcMe pour 0,8 résidu de (3, 4, 6)Me3-GalNAcMe nous permet d'affirmer qu'un résidu de N-acétyl galactosamine se trouve en position externe et laisse supposer que le résidu remplace soit un résidu de N-acétyl glucosamine, soit qu'il est lié à un résidu de N-acétyl glucosamine et remplace dans ce cas un résidu de galactose. La méthylation seule ne nous permet pas de positionner le résidu de N-acétyl galactosamine.

3) <u>Spectrométrie de masse en mode d'ionisation par</u> bombardement d'atomes accélérés (F.A.B.n.s.)

Une partie de la fraction C₁ méthylée mais non méthanolysée est analysée en F.A.B.* Cette technique d'ionisation par bombardement d'atomes accélérés permet la caractérisation en masse et en séquence d'oligo et de glycopeptides. Elle consiste à soumettre la molécule à analyser à un bombardement d'électrons d'énergie 70-100ev et ceci en phase gazeuse et sous vide. L'ionisation de la molécule en radicaux moléculaires permet la formation de fragments d'ions significatifs de la structure selon l'équation suivante :

$$AB + e ---> AB^+ + 2e$$

 $A^+ + B^+ = B^+ + A^+$

Les ions moléculaires protonés ou cationisés sont généralement détectés en balayage d'ions positifs alors que l'anion moléculaire déprotoné constitue l'espèce usuellement détectée en mode négatif. Le mélange est séparé par analyseur de masse pour donner un spectre des ions m/e (rapport masse/charge).

 * Nous remercions le Professeur H. Egge de l'Institut de Physiologie et de Chimie de l'Université de Bönn (Allemagne). La Fig. 54(p. 166) donne le spectre F.A.B. de l'oligosaccharide alditol C₁. On observe de nombreux ions pseudomoléculaires M + Na⁺ correspondants aux antennes suivantes numérotées de l à 5

1) NeuAc - Hex-HexNAc (m/e825-->793) 2) Hex-HexNAc (m/e464-->432) 3) Hex - Hex-HexNAc (m/e 668) Man₃GlcNAc GlcNAc-ol 4) NeuAc -HexNac-HexNac (m/e 866) GlcNAc-ol 5) HexNAc-HexNAc (m/e 505 A-fragment

Ces antennes sont liées au core Man₃-GlcNAc-GlcNAc-ol qui renferme ou non un résidu de fucose. Une évaluation des différentes espèces moléculaires présentes dans la fraction C₁ peut être faite à partir d'ions moléculaires M+Na⁺. Le tableau ci-dessous résume les structures retrouvées.

Type de l'antenne	Va M+Na ⁺ avec Fuc	leurs m/e M+Na ⁺ sans Fuc	A-fragment
1+2	2446	2620	2131
1+3 .	2650	2824	2335
2+4	•	2661	
1+4		3022	
1+1	2807	2981	
1+5		2661	

Les ions aux valeurs m/e 2446 et 2620 sont les plus intenses.

En résumé, on constate que la fraction C_1 est très hétérogène. Lors de la méthylation, nous n'avons pas mis en évidence la présence de $(3, 4)Me_3$ -GalNAcMe c'est-à-dire d'une osamine substituée par un résidu d'acide N-acétyl neuraminique, ni la présence de dérivés tri Me-Gal différents du (2, 3, 4) Me₃- Gal laissant supposer la substitution d'un résidu de galactose par un autre résidu de galactose. L'analyse en résonance magnétique nucléaire permettra





de compléter et de confirmer les résultats obtenus en méthylation et en F.A.B.

4) Résonance magnétique nucléaire

La fraction C_1 a été analysée en résonance magnétique nucléaire à 400MHz. Le tableau XXXIX(p.168)donne la valeur des déplacements chimiques des monosaccharides présents dans les oligosaccharides réduits de cette fraction C_1 . L'analyse a été réalisée sur les oligosaccharides obtenus par hydrolyse alcaline afin d'éliminer l'interférence due aux peptides. La Fig. 55(p.169) donne le spectre de résonance magnétique nucléaire à 400MHz du composé C_1 sialylé et désialylé.

Fraction Cl

A cause de problèmes de relaxation trop rapide, la fraction Cl a été analysée sous forme d'oligosaccharides alditols. L'interprétation du spectre met immédiatement en évidence l'existence du noyau trimannosido - N, N' diacétyl chitobiose démontrée par les glissements H-2 des mannoses 3, 4 et 4' (H-2 = 4.254 ppm, H-2 = 4.191 ppm et H-2 = 4.111 ppm respectivement). Ces déplacements sont aussi en faveur de structures de type N-acétyllactosaminique, biantennées mais l'originalité des structures provient de la mise en évidence de trois types différents d'antennes ce qui malheureusement complique énormément le dépouillement du spectre Cette complexité est de plus accrue par la présence de fucose lié en α - 1,6 sur la N-acétyl glucosamine $\underline{1}$ (H-1 Fuc = 4.896 ppm, CH3 = 1.221 ppm). Nous pouvons quantifier que le mélange global renferme environ 35 à 40 % de structures fucosylées.

La première antenne est de type classique avec un résidu de N-acétyllactosamine lié en β - 1,2 sur les mannoses $\frac{4}{2}$ et $\frac{4}{2}$ ', substitué ou non par de l'acide N-acétyl neuraminique lié en α -2,6 sur les galactoses $\frac{6}{2}$ et $\frac{6}{2}$ ', ceci est démontré par les résonances spécifiques des protons anomériques des

TABLEAU XXXIX

Glissements chimiques des protons représentatifs de la structure primaire de la fraction C_1 isolée de la lactotransferrine de Vache

	A state of the	Fraction C _l sialylée			ée	Fraction C _l désialylée				
		0- 6/6 ⁵ 5/5		ଷ≁⊡⊕ 6/65/5	(a)	₩ ⊕ 6/6′5/5°	⊘-⊕- 6/6'5/5'	⊡- ⊪-€ 6/65/5		(a)
н1	GlcNAc-2 Man - 3 Man - 4 Man - 4'				4.641 (4.714) 4.777 5.136 4.928		• • • • • • • • • • • • • • • • • • •		4.639 (n. 4.774 5.120 4.926	d.)
NAC H-2	GlcNAc-lol GlcNAc-2 Man - 3 Man - 4 Man - 4'				2.056 2.080 (2.088-2.092 4.254 4.191 4.111			:	2.056 2.080 (2.088- 4.250 4.190 4.112	2.092
H-1 CH3	Fuc (α-1,6) Fuc (α-1,6)				(4.896) (b) 1.224 1.221				(4.896) (b) ^{1.224} 1.220	- 16
Н-1	GlcNAc-5 ou 5' GalNAc-6 ou 6' Gal-6 ou 6' Gal (α -1,3)	4.605 - 4.445	4.602 4.498 -	4.581 - 4.542 5.144		4.581 - 4.467-4.	4.581 4.514 471 - -	4.581 - 4.543 5.145		α ι
H-4 H-4 H-5 H-3ax H-3'éq NAc	Gal-6 ou 6' Gal (α -1,3) Gal (α -1,3) NeuAc (α -2,6) NeuAc (α -2,6) GlcNAc-5 ou 5 GalNAc-6 ou6' NeuAc (α -2,6)	- - 1.717 2.669 2.070 -	- 1.717 2.669 2.070 2.070 2.030	4.182 4.020 4.205 - - 2.066 -	· · ·	- - - 2.052-2.	- - - 047 2.047 2.0	4.182 4.020 4.206 - - 2.0 -		
	NeuAc $(\alpha - 2, 6)$	2.030	2.030	-		-		-		

(a) \diamond = GalNAc (β -1,4) ; $\boldsymbol{\boxtimes}$ = Gal (α -1,3)

- (b) en améliorant la résolution par la transformation de Lorentz-Gauss, on observe un dédoublement du doublet
- n.d. = non déterminé.



différents monosaccharides constitutifs : H-lMan $\frac{4}{2}$ = 5.136 ppm, H-l GlcNAc $\frac{5}{2}$ = 4.605 ppm et H-l Gal $\frac{6}{2}$ = 4.445 ppm quand l'antenne est sialylée et H-l Man $\frac{4}{2}$ = 4.928 ppm, H-l GlcNAc $\frac{5}{2}$ = 4.581 ppm, H-l Gal $\frac{6}{2}$ = 4.471 ppm quand la branche est asialo. Les autres valeurs viennent confirmer que les structures l et 5 données à la Fig. 56 (p. 173) sont présentes dans la fraction C₁.

Nous mettons également en évidence une très faible proportion de cette structure sialylée en α - 2,6 sur la galactose <u>6</u>' (B-1 Man <u>4</u>' = 4.946 ppm).

Le deuxième type d'antenne est déjà beaucoup plus original mais a déjà été mis en évidence dans le thymus de veau (Van Halbeek et al., en 1983). Il s'agit d'un résidu de N-acétyllactosamine substitué par un résidu de galactose lié en α - 1,3 sur le galactose en position terminale non réductrice. Ce galactose supplémentaire est démontré par les déplacements chimiques suivants (H-1 = 5.145 ppm, H-4 = 4.020 ppm et H-5 = 4.206 ppm). Il donne le même effet que celui introduit par la substitution par un résidu de NeuAc α -2,3 puisque le proton anomérique du galactose porteur est déplacé à champ faible (H-1Gal 6 ou 6' = 4.543 ppm). Cette substitution a peu d'effet sur la N-acétyl glucosamine 5 ou 5' (H-1 identique à 4.581 ppm mais NAc = 2.066 ppm, le groupement acétamido et déplacé à champ faible) et elle ne perturbe aucunement le mannose 4 ou 4' (H-1 = 5.123 ppm ou H-1 = 4.928 ppm respectivement). La structure 2 présentée à la Fig. 56(p. 173)renferme l'antenne décrite précédemment.

Enfin le dernier type d'antenne est démontré comme étant un chaînon renfermant de la N-acétyl galactosamine à la place de galactose déjà mis en évidence dans la partie glycannique d'une hormone hypophysaire de Vache (Green <u>et al</u>., en 1985), mais très peu de paramètres RMN du proton y sont donnés. En regardant le spectre de la fraction Cl, nous avions des doublets de protons anomériques dont les valeurs n'étaient pas dans la littérature et que nous ne pouvions pas attribuer. L'analyse en RMN à 400 MHz de cette même fraction désialylée par une neuraminidase nous a

- 170 -

apporté de nombreux renseignements(voir comparaison des deux spectres donnés à la Fig. 55,p. 169).

Le doublet à 4.498 ppm est passé à 4.514 ppm et nous l'attribuons au proton anomérique de la N-acétyl galactosamine ; la sialylation par un résidu d'acide N-acétyl neuraminique en α - 2,6 a un effet de blindage puisque

 $\Delta S = -0,016$ ppm. Un autre proton représentatif de la galactosamine est son groupement acétamido, mais vu la complexité du mélange, nous émettons quelques réserves (NAC = 2.070 ppm lorsqu'elle est substituée et NAC = 2.047ppm lorsqu'elle est en position terminale non réductrice). De plus, ce type de branche a peu d'effet sur les mannoses $\frac{4}{2}$ ou $\frac{4}{2}$ ' puisque nous ne trouvons pas de valeurs différentes pour les protons anomériques et H-2, aussi bien dans les structures sialylées que asialo. En conclusion, le troisième type d'antenne est présent dans les structures 3, 4, 6 données dans la Fig. 56 (p. 173). Ces différents résultats sont en accord avec ceux obtenus par le Professeur H. Egge qui a analysé la fraction C₁ en F.A.B. et a mis en évidence ces trois types d'antennes.

En conclusion, la fraction C_1 est un mélange très complexe de glycopeptides plus ou moins sialylés en α -2,6 et fucosylés au point d'attache.

Ils possédent tous le noyau trimannosido – N, N'diacétyl chitobiose mais l'hétérogénéité provient de la substitution des mannoses $\frac{4}{2}$ et $\frac{4}{2}$ ' par l'un ou l'autre des types d'antennes décrits précédemment.

De nombreuses combinaisons scnt possibles (9 au total avec les antennes sialylées), mais personnellement nous pensons que l'antenne portée par le mannose $\frac{4}{2}$ est classique et que l'hétérogénéité est portée uniquement par le mannose $\frac{4}{2}$ '.

En résumé, les structures probables retrouvées dans la fraction Cl sont présentées à la Fig. 56(p.173). Afin de mieux préciser les paramètres des déplacements chimiques des différentes structures, nous aurons à faire les analyses en résonance magnétique nucléaire du proton à 400 MHz des de dépouiller et d'interpréter les spectres de mélanges

5) Structures

complexes.

Les structures déterminées par méthylation, F.A.B. et résonance magnétique nucléaire sont présentées à la Fig. 56(p. 173). La fraction Cl est très hétérogène mais intéressante par le type de structures qu'elle renferme En effet deux nouvelles structures ont été mises en évidence : l'une renfermant un résidu de N-acétyl galactosamine lié à un résidu de N-acétyl glucosamine, l'autre renfermant le chaînon Gal (α 1-3) Gal ; on retrouve également la structure du composé Bl. Les analyses en F.A.B. ont permis de donner une idée des différentes combinaisons possibles entre ces structures ; six d'entre elles sont décrites à la Fig.56 (p. 173) mais il est probable que d'autres structures soient présentes dans la fraction Cl par association des cinq types d'antennes mis en évidence. A l'avenir nous essayerons de séparer ces composés par utilisation de techniques telles que l'HPLC ou les colonnes de lectines.

D - ETUDE DES GLYCANNES DES FRACTIONS D

1) Méthylation

Quatre des six fractions oligomannosidiques obtenues par HPLC sont méthylées et analysées en spectromètrie de masse. Les rapports molaires des différents dérivés méthylés sont donnés dans le tableau XL(p. 174).

a) Etude de la structure de l'oligosaccharide l

Les différents résultats nous montrent que l'oligosaccharide l contient 3,6 résidus de mannose pour l résidu de N-acétyl glucosaminitol. L'analyse des dérivés méthylés montre l'absence de résidu (2,4)Me2 -Man ce qui signifie l'absence du résidu de mannose disubstitué du core commun donc que le glycanne est peut-être linéaire. De plus nous ne retrouvons que 1,1 résidus de (2, 3, 4, 6)Me4 - Man. La présence de 1,6 résidus de (3, 4, 6)Me3 - Man nous indique que 2 résidus de mannose sont substitués en α - 1,2. - 173 -



FIGURE 56

Structures de la fraction C_1 N-acétyllactosaminique isolée de la lactotransferrine de Vache.

TABLEAU XL

Identification et rapports molaires des monosaccharides et des dérivés méthylés des oligomannosides de la lactotransferrine de Vache séparés par chromatographie en HPLC

Dérivés méthylés	Rapports	molaires	des éthers	méthyliques
	1+	2*	3*	4*
(2, 4)Me ₂ -Man	0,15	2	2	2
(2, 4, 6)Me ₃ -Man	1	0	0	0
(3, 4, 6)Me ₃ -Man	1,70	0	0,80	1,90
(2, 3, 4, 6)Me ₄ -Man	1,15	2,50	2,45	2,70
$(1, 2, 5, 6) Me_4 - GlcNAc^{itol}$	1,30	0,86	0,81	0,97

- + Les rapports molaires ont été calculés sur la base d'un résidu de (2, 4, 6)Me₃-Man.
- Les rapports molaires ont été calculés sur la base de deux résidus de (2, 4)Me₂-Man.

b) Etude de la structure de l'oligosaccharide 2

L'oligosaccharide 2 contient 5,3 résidus de mannose pour l résidu de N-acétyl glucosaminitol. L'analyse des dérivés méthylés indique la présence de 3 résidus de (2, 3, 4, 6)Me4 -Man donc de résidus de mannose externes pour 2 résidus de (2,4)Me2 - Man donc de résidus de mannose trisubstitués. Nous n'avons donc pas de résidus de mannose branchés en α - 1,2.

c) Etude de la structure de l'oligosaccharide 3

L'oligosaccharide 3 renferme 5,7 résidus de mannose pour l résidu de N-acétyl glucosaminitol. L'examen des dérivés méthylés montre la présence de 2 résidus de (2,4)Me2 - Man et de 3 résidus de (2, 3, 4, 6)Me4 - Man comme précédemment.

d) Etude de la structure de l'oligosaccharide 4

L'oligosaccharide 4 renferme 6,4 résidus de mannose pour un résidu de N-acétyl glucosaminitol. Les résultats de méthylationindiquentla présence de 2 résidus de (2,4)Me2 - Man, de 2 résidus de (3, 4, 6)Me3 - Manet de 3 résidus de (2, 3, 4, 6)Me4 - Man. Nous avons donc dans ce cas 2 résidus de mannose branchés en $\alpha - 1,2$. L'augmentation du nombre de dérivés (3, 4, 6)Me3 - Mans'explique par le fait que lors de la biosynthèse des oligomannosides de plus de 5 résidus de mannose liés en $\alpha - 1,2$.

Les deux oligosaccharides 5 et 6 renfermant respectivement 7,8 et 8,5 résidus de mannose pour l résidu de N-acétyl glucosaminitol n'ont pas été analysés par méthylation. En effet, la structure d'un mélange de deux glycopeptides renfermant 8,6 résidus de mannose pour 2 résidus de N-acétyl glucosamine a déjà été déterminée par résonance magnétique nucléaire à 500MHz (Van Halbeek <u>et al</u>., en 1981) (Fig. 59;p. 182) Maliet et Plantey en 1977 ont également étudié deux glycopeptides de type oligomannosidique renfermant respectivement 7 et 8 résidus de mannose.

2) Résonance magnétique nucléaire

Trois des quatre oligosaccharides précédents (2, 3, 4) ont été analysés en résonance magnétique nucléaire à 500 MHz par le groupe du Professeur Vliegenthart à Utrech ; le quatrième (1) a été analysé à 400 MHz à Lille. Les déplacements chimiques des différents groupements monosaccharidiques constituants ces oligosaccharides sont donnés dans le tableau XLI (p. 177). La Fig. (57 p. 178) donne le spectre de résonance magnétique nucléaire à 400 MHz de l'oligomannoside 1.

Oligomannoside 1

Le spectre nous montre qu'il s'agit d'un oligomannoside qui ne posséde plus le résidu N, N'-diacétyl chitobiose mais porte uniquement la N-acétyl glucosamine $\underline{2}$ sous ses formes α et β comme le prouvent les glissements chimiques suivants : H-l α = 5.205 ppm, H-l β = 4.71 ppm, NAc α = 2.042 ppm et NAc β = 2.040 ppm. Le dédoublement des signaux du à l'anomérisation ne se manifeste que sur GlNAc- $\underline{2}$ et Man - $\underline{3}$ (H-2 α = 4.221 ppm et H-2 β = 4.208 ppm). Les résidus de mannose $\underline{4}$,de mannose \underline{C} substitués et de mannose $\underline{D1}$ sont mis en évidence par les déplacements chimiques de leurs protons anomériques et protons H-2 qui sont tout à fait en accord avec ceux de la littérature (Vliegenthart <u>et al</u>., en 1981). En conclusion, la fraction analysée qui est d'ailleurs très homogène posséde la structure présentée à la Fig. 58 (p. 181).

TABLEAU XLI

Glissements chimiques à 400 et à 500 MHz des protons représentatifs de la structure primaire des oligosaccharides isolés de la lactotransferrine Bovine

		Oligoman- noside l	Oligoman- noside 2	Oligoman- noside 3	Oligoman- noside 4 () 0.7 0.3 0.7()
8-1	GlcNAc-2 a	5.205	5.246	5.246	5.088
NAC	GlcNAC-2 a B	2.042	2.043	2.043	2.009-2.01
ні	$Man-3 (\alpha, \beta)$ $Man-4 (\alpha, \beta)$ $Man-4' (\alpha, \beta)$	4.772	4.78 5.101 4.872	4.78 5.348 4.871	4.765 5.337 4.870
	Man-A α Man-A β	-	5.078	5.076	5.10-5.389
	$\begin{array}{l} \text{Man-B} \alpha , \beta \\ \text{Man-C} (\alpha , \beta) \\ \text{Man-Dl} (\alpha , \beta) \end{array}$	- 5.298 5.042	4.907	4.907-5.142 5.052	4.907-5.13 5.059-5.29 5.046
	Man-D2 (α , β) Man-D3 (α , β)	-	-	5.052 5.038	5.059 5.046
Н2	Man-3 α β	4.221 4.208	4.265	4.253 4.253	4.222 4.222
	$\begin{array}{c} \text{Man-4} & (\alpha, \beta) \\ \text{Man-4} & (\alpha, \beta) \end{array}$	4.082	4.077 4.142-4.148	n.d. 4.144	4.103 4.104
	$Man-A (\alpha, \beta)$ $Man-B (\alpha, \beta)$	-	4.048-4.063 3.98	n.d. 3.985-4.02	4.07-4.103 3.98-4.02
	Man-C (α,β) Man-D (α,β)	4.104 4.064	-	4.068 4.068	4.069-4.10 4.070

n.d. : non déterminé

Pour les explications concernant la nature des déplacements chimiques se reporter aux revues générales de Vliegenthart <u>et al</u>., en 1981 et 1983.



Oligomannoside 2

Comme le tableau XLI (p.177) nous l'indique, on constate la présence de résidus de mannose A et mannose B (H-1 α = 5.078, H-1 β = 5.105, H-1 (α,β) = 4.907, H-2 (α,β) = 4.048, H-2 (α,β) = 3.98). Comme précédemment, le composé ne renferme que la N-acétyl glucosamine 2 sous ses formes α et β . En conclusion, la fraction analysée renferme 5 résidus de mannose et est homogène. Sa structure est donnée à la Fig. 58(p.181) .

Oligomannoside 3

Le tableau XLI(p.177) nous montre que cet oligomannoside est plus complet que le précédent. Les résidus de mannose $\underline{4}$ et $\underline{4}$ ', de mannose \underline{A} et de mannose \underline{B} substitués et de mannose $\underline{D2}$ et $\underline{D3}$ sont mis en évidence par les déplacements chimiques de leurs protons anomériques et protons H-2. Environ 20 % de mannose \underline{A} sont substitués par un mannose $\underline{D2}$ et 30 % de mannose \underline{B} sont substitués par un mannose $\underline{D3}$. La fraction 3 est donc moins homogène, sa structure est donnée à la Fig. 58(p.181).

Oligomannoside 4

Les glissements chimiques des protons anomériques et protons H-2 de tous les mannoses sont mis en évidence cela signifie que l'oligosaccharide renferme au maximum neuf résidus de mannose. Cependant, les mannoses $\underline{D1}$, $\underline{D2}$ $\underline{D3}$ ne sont pas toujours présents ; On retrouve respectivement 30, 70 et 70 % de ces résidus. L'oligomannoside4 est plus hétérogène que les précédents. Sa structure est donnée à la Fig. 58(p. 182).

3) Structures

Les structures résultant de ce tableau sont données à la Fig. 58(p. 181 et 182).

L'oligomannoside 1 renferme 4 résidus de mannose pour l résidu de N-acétyl glucosamine. Sa structure linéaire est inattendue. Ce type de glycanne résulte du catabolisme des oligomannosides.

L'oligomannoside 2 renferme effectivement 5 résidus de mannose pour l résidu de N-acétyl glucosamine.

L'oligomannoside 3 contient en mélange de 6 à 8 résidus de mannose pour l résidu de N-acétyl glucosamine avec cependant une forte proportion d'oligomannoside à 6 résidus de mannose.

L'oligomannoside 4 renferme en mélange de 7 à 9 résidus de mannose pour l résidu de N-acétyl glucosamine. Mais c'est la proportion de mannose lié en α-1,2 sur chacune des branches qui varie. De ce fait, l'oligosaccharide majeur renferme probablement 7 résidus de mannose.

4) Conclusion

L'étude comparative de la structure des glycannes des lactotransferrines nous amène à distinguer deux groupes de glycoprotéines :

 - d'une part celui renfermant des lactotransferrines possédant à la fois des glycannes de type N-acétyllactosaminique et de type mannosidique (lactotransferrines de Vache et de Chèvre).









Oligomannoside 3

FIGURE 58

Structures des oligomannosides de la lactotransferrine de Vache isolés par chromatographie en haute pression.

- 181 -

$$(Man (\alpha 1-2)) Man (\alpha 1-2) Man (\alpha 1-3)
70 %
(Man (\alpha 1-2)) Man (\alpha 1-3)
30 %
Man (\alpha 1-6)
(Man (\alpha 1-2)) Man (\alpha 1-6)
70 %$$

Oligomannoside 4

FIGURE 58

Structures des oligomannosides de la lactotransferrine de Vache isolés par chromatographie en haute pression.

$$(Man (\alpha 1-2)) Man (\alpha 1-2) Man (\alpha 1-3)$$

O-1
Man (\alpha 1-2) Man (\alpha 1-3)
Man (\alpha 1-2) Man (\alpha 1-6)
Man (\alpha 1-2) Man (\alpha 1-6)

FIGURE 59

Structure du mélange de glycopeptides de type oligomannosidique analysé en résonance magnétique nucléaire selon Van Halbeek <u>et al</u>., en 1981. d'autre part celui renfermant des lactotransferrines possédant uniquement des glycannes de type N-acétyllactosaminique (lactotransferrine Humaine).

En ce qui concerne les structures de type oligomannosidique, nous retrouvons des glycannes de 4 à 9 résidus de mannose.

En ce qui concerne les structures de type N-acétyllactosaminique, nous retrouvons pour toutes les lactotransferrines, la structure classique biantennée plus ou moins sialylée sur laquelle se greffent de 0 à deux résidus de fucose pour la lactotransferrine Humaine (Fig. 60; p. 184).

En plus de cette structure, on retrouve pour la lactotransferrine de Vache isolée du lait, un glycanne particulier riche en résidus de galactose, de N-acétyl galactosamine et d'acide N-acétyl neuraminique. Cependant sa structure n'a pas été déterminée et la question se pose de savoir si ce glycanne appartient effectivement à la lactotransferrine de Vache ou si c'est un glycopeptide du lait.

On retrouve également un glycanne possédant de la N-acétyl galactosamine liée à un résidu de N-acétyl glucosamine.

Jusqu'à présent aucun résidu de N-acétyl galactosamine n'avait été mise en évidence dans les transferrines de secrétions diverses. Cependant dans certaines glycoprotéines comme les hormones, un résidu de N-acétyl galactosamine est lié à un résidu de N-acétyl glucosamine. Green <u>et al</u>., en 1985 ont établi la structure de trois types d'oligosaccharides sulfatés de la lutropine de



FIGURE 60

Structure des glycannes de la lactotransferrine humaine selon Spik <u>et al.</u>, en 1974, Montreuil et Spik en 1975, Spik et Mazurier en 1977, Spik, Fournet <u>et al.</u>, en 1979, Spik <u>et al</u>., en 1982.



Man (B1-4) GlCNAC (B1-4) GlCNAC (B1) Asn

Fuc (a1-6)

FIGURE 62

 $Gal(\beta 1-4) GlcNAc(\beta 1-2) Man(\alpha 1-6)$

Fuc (a1-3)

Structure des glycannes de type poly N-acétyllactosaminique présents dans la lactotransferrine humaine selon Matsumoto et al., en 1982.

- 184 -

Vache (LH) renfermant un ou deux résidus de N-acétyl galactosamine substitués aux résidus de N-acétyl glucosamine (Fig. 61.p. 186).

Ils ont montré que si la sulfatation était indépendante de la conformation du peptide, le résidu de N-acétyl galactosamine devait être présent pour que celle-ci se fasse ; Ce qui laisse suggérer que l'addition d'un résidu de N-acétyl galactosamine sert de régulateur spécifique de l'hormone de l'hypophyse. En ce qui concerne, la lactotransferrine de Vache, les dosages des ions sulfates du glycanne renfermant la N-acétyl galactosamine se sont révélés négatifs. On est en présence d'une structure non sulfatée.

Dans la lactotransferrine humaine, des structures particulières de type poly N-acétyllactosaminique ont également été isolées par Matsumoto <u>et al</u>., en 1982 (Fig. 62,p. 184).

III - DISCUSSION

Cette étude des variations glycanniques des lactotransferrines en fonction de l'espèce animale nous amène à nous reposer la question de l'existence de sites de glycosylation différents des lactotransferrines pour un même tissu à savoir la glande mammaire.

D'autre part, la modification des rapports entre les structures de type oligomannosidique et N-acétyllactosaminique, et parfois la modification de la structure des glycannes dans les lactotransferrines de Vache isolées à différents stades de lactation nous laisse supposer que le contrôle hormonal est très important.

Nous savons que le précurseur des structures

- 185 -







S₁ monosulfaté

SO4 (3 ou 4) GalNAc (
$$\beta$$
1-4) GlcNAc (β 1-2) Man (α 1-3)
Man (α 1-3)
Man (α 1-6)
(Man (α 1-6))
Man (α 1-6)

S, monosulfaté, hybride

FIGURE 61

Structure des oligosaccharides sulfatés de la lutropine bovine (Green <u>et al</u>., en 1985) glycanniques est un polymannoside à 9 résidus de mannose ; en période de non lactation, on peut donc penser que la lactotransferrine est peut-être plus riche en glycannes immatures donc polymannosidiques que ne l'est la lactotransferrine présente dans le lait. Cependant, les oligomannosides à 4 résidus de mannose essentiellement retrouvés dans la lactotransferrine isolée du lait, correspondent à des produits du catabolisme des glycannes. Sommes-nous en présence de glycannes en partie catabolisés ?

Enfin, la présence en plus grande quantité d'un type de glycanne dans l'une ou l'autre des secrétions joue peut-être un rôle particulier dans la défense de la glande mammaire lors d'infections. Toutes ces questions sont encore à résoudre d'autant que l'on ne connait pas bien le mécanisme de synthèse, de dégradation et d'action des différents glycannes des lactotransferrines.

CONCLUSION GENERALE

Une étude comparée de la structure des glycannes des transferrines a été entreprise afin de répondre aux trois questions suivantes :

- 1 Quels sont les facteurs responsables de l'hétérogénéité de la structure des glycannes des glycoprotéines ?
- 2 Les glycannes peuvent-ils être considérés comme des marqueurs de l'évolution ?
- 3 Quel est le rôle des glycannes des transferrines dans les différentes activités biologiques des transferrines ?

Dans le cadre de cette étude, les structures des glycannes de cinq sérotransferrines (Poule, Cheval, Boeuf, Mouton et Rat), de l'ovotransferrine de Dinde et des lactotransferrines de Vache et de Chèvre ont été comparées aux structures des glycannes de la sérotransferrine Humaine et de Lapin, de l'ovotransferrine de Poule et de la lactotransferrine Humaine précédemment déterminées.

La détermination des différentes structures a été réalisée grâce à l'application des techniques classiques suivantes : méthanolyse, méthylation couplée à la spectromètrie de masse, en collaboration avec A. Honvault et Y. Leroy appartenant à"l'Atelier National de Méthodologie des Glucides libres et conjugués", d'hydrolyses enzymatiques en collaboration avec le Professeur S. Bouquelet, de fragmentomètrie de masse en collaboration avec le Professeur H. Egge à Bönn et de résonance magnétique nucléaire en collaboration avec le groupe du Professeur J.F.G. Vliegenthart à Utrecht et J.M. Wieruszeski au Laboratoire de Chimie à Lille. Les différentes structures obtenues ont été rassemblées dans la Fig. 63(p.190 191192193).

Les remarques que nous pouvons faire à propos de ces structures sont les suivantes :





Structure de composé A



Structures de glycanne de la efrotraneferrine de Poulo



Structures du glycanne de la sérotransferrine de Poule



Structure du glycanne de l'ovotransferrine de Poule selon Spik <u>et el</u>.. en 1979 et Doriand <u>et el</u>., en 1979





Structure du verient transferrinique 8

Structures des glycannes des variants de la sérotransferrine de Cheval



 NeuAc (α2-3) Gal (β1-3) GleNAc (β1-2) Nan (α1-6)
 Yean (β1-4) GleNAc (β1-4) GleNAc (β1-4) GleNAc (β1-4) GleNAc (β1-6) (Fuc (α1-6))

Structure du variant transferrinique C

Structures des glycannes de trois variants de la sérotransferrine de Rat



Structures de la fraction ClN-acétyllactosaminique isolée de la lactotransferrine de Vache.







Oligomannoside 4

Structures des oligomannosides de la lactotransferrine de Vache isolés par chromatographie en haute pression.



Figure 63

Récapitulatif des différentes structures glycanniques présentes dans les sérotransferrines de Cheval, Rat, Poule, Boeuf et Mouton, dans l'ovotransferrine de Dinde et les lactotransferrines de Chèvre et de Vache.

Man (α1-2) Man (α1-2) Man (α1-3) Man (β1-4) GlcNAc (β1-4) GlcNAc (β1) Asn

Oligomannoside 1

1) LES SEROTRANSFERRINES contiennent uniquement des glycannes de type N-acétyllactosaminique dépourvus de N-acétyl glucosamine intercalaire. La structure biantennée classique caractérisée pour la première fois dans la sérotransferrine Humaine en 1974 est présente plus ou moins sialylée et parfois fucosylée dans toutes les transferrines étudiées jusqu'à présent. Néanmoins à côté de cette structure biantennée, il existe des structures qui semblent être plus spécifiques de l'espèce animale étudiée.

a) Sérotransferrine de Cheval

En collaboration avec le Docteur Stratil qui a isolé trois variants glycanniques de la sérotransferrine de Cheval, nous avons déterminé la structure et le nombre de glycannes présents dans ces trois variants A, B et C.

Les variants A et C renferment deux glycannes alors qu'un seul glycanne est lié à la chaîne polypeptidique du variant B. Les glycannes présents dans les variants A et B se différencient de ceux du variant C par le remplacement d'un résidu d'acide N-acétyl neuraminique par un résidu d'acide N-acétyl 4-0-acétyl neuraminique (Fig. 63;p. 190). Bien que nous ne possédions à l'heure actuelle que peu d'informations concernant la structure primaire de la chaîne protéique des trois variants de la sérotransferrine de Cheval, il semble que des différences au niveau de l'enchaînement peptidique des trois variants transferriniques expliqueraient la variation du nombre de glycannes.

b) <u>Sérotransferrine de Rat</u>

En collaboration avec le Docteur Regoeczi qui a isolé deux variants glycanniques de la sérotransferrine à partir du sérum de Rat, nous avons déterminé la structure des glycannes de ces deux variants. Elle se caractérise par la présence de trois résidus d'acide N-acétyl neuraminique liés à un glycanne biantenné de type N-acétyllactosaminique. Dans le variant glycannique B, deux résidus d'acide N-acétyl neuraminique sont liés en α - 2,6, l'un sur le galactose, l'autre sur la N-acétyl glucosamine alors que le 3ème résidu d'acide N-acétyl neuraminique est lié en α - 2, 3 sur le galactose.

Dans le variant glycanniqueC, deux résidus d'acide N-acétyl neuraminique sont liés en α - 2, 3 sur le galactose alors que le 3ème résidu d'acide N-acétyl neuraminique sur la N-acétyl glucosamine reste lié en α -2, 6.

La structure du glycanne C est une structure non identifiée jusqu'à présent alors que la structure du glycanne B a été caractérisée dans l'hémopexine de Rat. (Fig. 63;p.191).

c) Sérotransferrine de Poule

L'étude de la structure des glycannes de la sérotransferrine de Poule nous a révélé à côté de l'existence de glycannes biantennés plus ou moins sialylés, la présence d'une structure glycannique triantennée (Fig. 63, p. 190).

L'étude comparative de la structure des glycannes de la sérotransferrine de Poule avec celle de l'ovotransferrine de Poule, c'est-à-dire avec celle d'une protéine synthètisée par un gène identique mais dans une cellule différente en l'occurence l'oviducte, a révélé que des glycannes de structure différente peuvent être greffés sur une chaîne protéique identique. Dans ce cas particulier, la glycosylation dépend éssentiellement de l'équipement en glycosyl-transférases des cellules responsables de la biosynthèse de la protéine.

d) Sérotransferrines de Mouton et de Boeuf

La sérotransferrine de Mouton renferme un glycanne de structure biantennée identique à ceux de la sérotransferrine Humaine et de Lapin alors que la sérotransferrine de Boeuf posséde ce même glycanne monosialylé (Fig. 63.p. 191).
2) <u>LES OVOTRANŚFERRINES</u> de Poule et de Dinde ne sont pas sialylées et ne contiennent pas de glycannes de type oligomannosidique. Elles sont caractérisées par la présence d'un résidu de N-acétyl glucosamine intercalaire. L'ovotransferrine de Poule n'est pas galactosylée alors que celle de Dinde renferme un ou deux résidus de N-acétyl lactosamine (Fig. 63; p. 191).

3) <u>LES LACTOTRANSFERRINES</u> - Les glycannes des lactotransferrines de Vache et de Chèvre comparés à ceux de la lactotransferrine Humaine dont la structure a été déterminée de 1974 à 1982, sont beaucoup plus hétérogènes.

Outre la présence de glycannes biantennés plus ou moins complets, les lactotransferrines de Vache et de Chèvre renferment des glycannes de type oligomannosidique possédant de quatre à neuf résidus de mannose dont la structure a été déterminée (Fig. 63:p.192193.)

D'autre part, une étude comparative de la composition et de la structure des glycannes de la lactotransferrine de Vache en fonction de la lactation a permis de mettre en évidence une diminution du taux des glycannes de type oligomannosidique dans la lactotransferrine isolée à partir du colostrum et du lait stabilisé par rapport à la lactotransferrine isolée à partir de la sécrétion sèche.

En outre, une structure glycannique biantennée particulière dans laquelle nous avons mis en évidence le chaînon NeuAc ($\alpha 2-6$) GalNAc ($\beta 1-4$) GlcNAc - R et l'existence possible du chaînon Gal ($\alpha 1-3$) Gal ($\beta 1-4$) GlcNAc - R a été caractérisée uniquement dans la lactotransferrine de Vache isolée du lait et du colostrum (Fig. 63;P.192). Ce type de structure renfermant de la N-acétyl galactosamine a été mis en évidence dans les hormones de lutéinisation de la Vache par Green <u>et al</u>., en 1985. Cependant les deux antennes du glycanne possédent de la N-acétyl galactosamine et celle-ci est toujours sulfatée donc non sialylée. La diminution du taux de lactotransferrine dans le lait stabilisé. et le colostrum par rapport à la secrétion séche ainsi que la modification des structures glycanniques dans les lactotransferrines isolées de ces trois types de secrétion laissent entrevoir un contrôle hormonal de la biosynthèse de la protéine et de la glycosylation.

L'ensemble des résultats obtenus nous permet de conclure que l'hétérogénéité de la structure des glycannes est due à différents facteurs parmi lesquels nous pouvons citer la structure primaire et la conformation de la protéine, l'équipement en glycosyl transférases des cellules responsables de la biosynthèse de la protéine et des facteurs hormonaux dont la nature reste à préciser.

En outre, comme la structure des glycannes est variable d'une famille de transferrine à l'autre et d'une espèce animale à l'autre, il nous semble possible de considérer la structure des glycannes comme un marqueur de l'évolution.

L'ensemble des recherches que nous avons effectué nous a permis de franchir une étape concernant la détermination de la structure des glycannes des transferrines et la mise en évidence de certains facteurs responsables de l'hétérogénéité de la structure glycannique, sur la base. de la connaissance de cette hétérogénéité, il est possible d'aborder la dernière étape qui consiste à préciser le rôle des glycannes des transferrines dans la reconnaissance spécifique des récepteurs membranaires.

BIBLIOGRAPHIE

Les nombres terminaux entre parenthéses indiquent le numéro de la page.

- ABOLA J.E., WOOD M.K., CHUVEH A., ABRAHAM D., PULSINELLI P.D., "In the Biochemistry and Physiology of Iron", (P. SALMAN et J. HEGENAUER eds) (1983) 27-34 (19)
- AISEN P. "In Biological aspects of metals and metal related diseases", ed by B. SARKAR, Raven Press, New York, (1983) 67-80 (41)
- AISEN P., BROWN E.B., Prog. Hematol., 9 (1975) 25-26 (19)
- AISEN P., BROWN E.B., Semin. Hematol., <u>14</u> (1977) 31-53 (4)
- AISEN P., LISTOWSKY I., Annu. Rev. Biochem., <u>49</u> (1980) 357-393 (4)
- AL-HILAL P., BAKER E., CARLISLE C.H., GORINSKY B., HORSBURG R.L., LINDLEY P.F., MOSS D.S., SCHNEIDER H., STIMPSON R., J. MOL. Biol., <u>108</u> (1976) 255-257 (19-20)
- ARNOLD R.R., RUSSEL J.E., CHAMION W.J., BREVER M., GAUTHIER J.J., Infect. Immunity, <u>35</u> (1982) 792 (46)
- BAKER E.N., RUNBALL S.V., J. Mol. Biol., <u>111</u> (1977) 207-210 (19-20)
- BAKER E.N., SHAW D.C., MORGAN E.H., Biochemistry, 7 (1968) 1371-1378 (9-13)
- BARKAN G., Ztschr. Physiol. chem., 171 (1927) 194-221: (3)
- BAYARD B., KERKAERT J.P., Biochem. Biophys. Res. Commun., 95 (1980) 777-784 (24-27-80)
- BAYARD B., KERKAERT J.P., Eur. J. Biochem., <u>113</u> (1981) 405-414 (24-27-80)
- BELL K., MC KENZIE H.A., MULLER V., ROGERS C., SHAW D.C., Comp. Biochem. physiol., <u>68 B</u> (1981) 225-236 (87)
- BERESFORD C.H., NEALE R.J., BROOKS O.G., Lancet, <u>1</u> (1971) 568-572 (44)
- BERNARD N., ENGLER R., STRECKER G., MONTREUIL J.,
 VAN HALBEEK H., VLIEGENTHART J.F.G., Glyconjugate J.,
 1 (1984) 123-140 (111)

-198-

- BEZKOROVAINY A., ZSCHOCKE R. H., Arzneim Forsch., (Drug Res.), <u>24</u> (1974) 476-485 (4)
- BLANC B., Thèse Doct. ès.SCi. ed Medecine et Hygiène, (1964) Genéve (43)
- BLANC B., <u>in</u> PEETERCH, "In Protides of Biological Fluids", Elsevier, Amsterdam, <u>14</u> (1966) 125 (44)
- BLANC B., ISLIKER H., Bull. Soc. Chim. Biol., <u>43</u> (1961) 929 (44)
- BOBAK P., STRATIL A., VALENTA M., Comp. Biochem. Physiol., <u>79 B</u> (1984) 113-117 (8)
- BRISSON J.R., CARVER J.P., Biochemistry, <u>22</u> (1983) 1362-1368 (37-38)
- BROCK J.H., ARZABE F., LAMPREAVF F., PINEIRO A., Biochim. Biophys. Acta, <u>446</u> (1976) 214-225 (6)
- BROCK J.H., ARZABE F., RICHARDSON N., DEVERSON E., Biochem. J., <u>171</u> (1978) 73-78 (6)
- BROWN J.W., "In Proteins of Iron Metabolism, BROWN ed., New York, (1976) (19)
- BULLEN J.J., ROGERS H.J., LEIGH L., Brit. Med. J., 1 (1972) 69 (46)
- CACHE P., WIERUSZESKI J.M., MICHALSKI J.C., STRECKER G., MONTREUIL J., Eur. J. Biochem., Sous Presse (88)
- CASTELLINO F.J., FISH W.W., MANN K.G., J. Biol. Chem., 245 (1970) 4269 (4- 10-11-33-34)
- CHASTEEN N.D., Coord. Chem. Rev., 22 (1977) 1-36 (19)
- CHERON A., Thèse Doc. ès. Sci., (1975) Lille(10-12-26-28-32
- CHERON A., C.R. Acad. Sci., <u>284</u> (1977) 585 $(4-32-34-35)^{3}$
- CHUNG M.C.M., MC KENZIE H.A., Comp. Biochem. physiol., 80 B (1985) 287-297 (32-64-79)
- COX T.M., MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J., PETERS T.J., Biochim. Biophys. Acta, 588 (1979) 120-128 (43)

- CRICHTON R., WAUTERS M., ROMAN P., "In Proteins of Iron Storage", CRICHTON ed., North-Holland, Amsterdam, (1975) 287-294 (19)
- DAVOUST J., MICHEL V., SPIK G., MONTREUIL J.,(34) DEVAUX P.F., FEBS-lett., <u>125</u> (1981) 271-276 (37)
- DEBRAY H., DECCUT D., STRECKER G., SPIK G., MONTREUIL J., Eur. J. Biochem., 117 (1981) 41-45 (99)
- DEBRUYNE V., Thèse 3ème cycle, (1983) Lille (29)
- DE SOUZA M., Symp. Soc. Exp. Biol., <u>32</u> (1978) 393-409 (44)
- DORLAND L., HAVERKAMP J., SCHUT B.L., VLIEGENTHART J.F.G., SPIK G., STRECKER G., FOURNET B., MONTREUIL J., FEBS-lett., <u>77</u> (1977) 15-20 (29)
- DORLAND L., HAVERKAMP J., VLIEGENTHART J.F.G., SPIK G., FOURNET B., MONTREUIL J., Eur. J. Biochem., <u>100</u> (1979) 569-574 (29-51-62-79-82-93)
- DOUY A., GERVAIS M., GALLOT B., Macromol. Chem., <u>18</u> (1980) 1199 (37)
- DOUY A., GALLOT B., Biopolymers, 19 (1980) 493 (37)
- ELLEMAN T.C. WILLIAMS J., Biochem. J., <u>116</u> (1970) 515-535 (16)
- FEENEY R.E., Biochim. Biophys. Acta, 34 (1951) 196 (46)
- FEENEY R.E., ANDERSON J.S., AZARI P.R., BENETT N., RHODES M.B., J. Biol. Chem., 235 (1960) 2307-2311 (5)
- FEENEY R.E., KOMATSU S.K., "In Structure and Binding", Springer Berlin Heidelberg New York, <u>1</u> (1966) 149 (22)
- FRELINGER V.A., Anim. Blood Grps. Biochem. Genet., 4 (1973) 35-40 (6-8)
- GARDELL S., Acta Chem. Scand., 7 (1953) 207 (32)
- GARNIER J., OSGUTHORPE D.J., ROBSON B., J. Mol. Biol., 120 (1978) 97-120 (22)
- GLASNAK V., JAROLIMOVA, Zivocisna vyroba, <u>25</u> (1980) 461-468 (79)

- GORDON W.G., ZIEGLER J., BASCH J.J., Biochim. Biophys. Acta, 60 (1962) 410 (4-10)
- GORINSKY B., "In Advances in Red Cell Biology",
 D.J. WEATHERALL et al., ed. Raven Press, New York,
 (1982) 7-17 (4)
- GORINSKY B., HORSBURG C.R.L., LINDLEY P.F., MOSS D.S., PARKAR M., WATSON J.L., Nature, <u>281</u> (1979) 157-158(19-21-47
- GRAHAM I., WILLIAMS J., Biochem. J., <u>145</u> (1975) 263-279
- GREEN E.D., BAENZIGER J.U., BOIME I., J. Biol. Chem., <u>260</u> (1985) 15631-15638 (179)
- GREEN E.D., MORISHIMA C., BOIME I., BAENZIGER J.U., Proc. Natl. Acad. Sci., <u>82</u> (1985) 7850-7854 (179-182)
- GREEN E.D., VAN HALBEEK H., BOIME I. BAENZIGER J.U., J. Biol. Chem., 260 (1985) 15623-15630 (179)
- GROVES M.L., J. Amer. Soc., 82 (1960) 3345 (4-10-33)
- GUERIN G., WREEMAN H.J., NGUYEN T.C., Eur. J. Biochem., 67 (1976) 433-445 (6-8-30)
- HARDFORD J., ASHWELL G., "In the Glyconjugates", HOROWITZ ed., Academie New York, I V, (1981) 27-55 (41)
- HASHIZUME S., KURODA K., MURAKAMI H., Biochim. Biophys. Acta, 763 (1983) 377-382 (44)
- HATTON M.W.C., MARZ L., BERRY L.R., DEBANNE M.J., REGOECZI E., Biochem. J., 181 (1979) 633-638 (26-80)
- HATTON M.W.C., REGOECZI E., KAUR H., Can. J. Biochem., 56 (1978) 339-344 (6-30)
- HATTON M.W.C., REGOECZI E., WONG K.I., Can. J. Biochem., 52 (1974) 845-853 (6-30-31)
- HATTON M.W.C., REGOECZI E., WONG K.I., KRAAY G.J., Biochem. Genetics, <u>15</u> (1977) 621-640 (7)
- HAVERKAMP J., VAN HALBEEK H., DORLAND L., VLIEGENTHART J.F.G., PFEIL R., SCHAUER R., Eur. J. Biochem., <u>122</u> (1982) 305-311 (54)
- HELBOCK H.J., SALTMAN P., Biochim. Biophys. Acta, 251 (1971) 380 (41)

- HERSHKO C., Haematology, <u>10</u> (1977) 105-148 (4) - HORWITZ D.A., BAKKE A.C., ABO W., NISHIYA K.,

J. Immunol., <u>132</u> (1984) 2370-2374 (44) - HUDSON B.G., OHNO M., BROCKWAY W.J., CASTELLINO F.J., Biochemistry, 12 (1973) 1047-1053 (6-8-9) - HUEBERS H.A., HUEBERS E., FINCH C.A., MARIN A.W., J. Comp. Physiol., 148 (1982) 101-109 (4-6-8) - IACOPETTA B.J., MORGAN E.H., YEOH G.C.T., Biochim. Biophys. Acta, 687 (1982) 5129-5135 (41) - JANDL J.H., KATZ J.H., J. Clin. Invest., 42 (1963) 314 - 326(41)- JELTSCH J.M., CHAMBON P., Eur. J. Biochem., 122 (1982) 291-295 (5-11-15-48) - JOLLES J., DONDA A., AMIGUET P., JOLLES P., FEBS-lett., 176 (1984) 185-188 (11-13) - JORIEUX S., Thèse 3ème cycle, (1983) Lille (46) - JORIEUX S., SPIK G., MAZURIER J., NAVARRO J., ROMOND C., MONTREUIL J., Annales de Nestlé, (1983) (46) - KANDA Y., YAMADA K., MAEDA M., YOSHIMO Y., "In the Biochemistry and Physiology of Iron", (P. SALMAN et J. HEGENAUER, eds) (1983) 81-82 (6) - KERKAERT J.P., BAYARD B., Biochem. Biophys. Res. Commun., <u>108</u> (1982) 1023-1030 (24-27-80) - KINKADE J.M., KENDALL MILLER W.W., SEGAR S F.M., Biochim. Biophys. Acta, 446 (1976) 407-418 (13) - KISTLER P., NITSCHMANN H.S., WYTTENBACH A., STUDER M., NIEDERÖST C.H., MAUERHOFER M., Vox. Sanguinis., 5 (1960) 403 (3)

- LANE R.S., "In Structure and Function of Plasma Proteins", A.C. ALLISON Ed., <u>2</u> (1976) 53-78 (4)
- LAURELL C.B., Acta Physid. Scandinav., <u>14</u> (1947) 1-129(3-19)
- LAURELL C.B., Pharmacol. Rev., <u>4</u> (1952) 371-395 (3)
- LEFFELL M.S., SPITZNAGEL J.K., Infect. Immun ., <u>6</u> (1972) 761-765 (43)
- LEGER D., TORDERA Y., SPIK G., DORLAND L., HAVERKAMP J., VLIEGENTHART J.F.G., FEBS-lett., <u>93</u> (1978) 255-260(6-30-31
- LEGRAND D., MAZURIER J., METZ_ BOUTIGUE M.H., JOLLES J., JOLLES P., MONTREUIL J., SPIK G., Biochim. Biophys. Acta, 747 (1984) 90-96 (22)
- LEGRAND D., MAZURIER J., GARNIER J., MONTREUIL J., SPIK G., (1985) sous-presse. (22-23)
- MAC GILLIVRAY R.T.A., MENDEZ E., BREW K., "In Proteins of Iron Metabolism", BROWN <u>et al</u>., (ed), Grune and Statten, New York (1977) 133-141 (14)
- MAC GILLIVRAY R.T.A., MENDEZ E., SINHA J.K., SUTTON M.R., LINEBACK. ZINS J., BREW K., Proc. Math. Acad. Sci.U.S.A. 79 (1982) 2504-2508 (5-11-14)
- MAC GILLIVRAY R.T.A., MENDEZ E., SHEWALE J.G., SINHA S.K., LINEBACK-ZINS J., BREW K., J. Biol. Chem., <u>258</u> (1983) 3543-3553 (5-11-14-15-16-24-80)
- MAEDA K., Mc KENZIE H.A., SHAW D.C., Anim. Blood Grps Biochem. Genet., 11 (1980) 63-75 (7-32)
- MAG DOFF- FAIRCHILD B., LOW B.W., Arch. Biochem. Biophys., 138 (1970) 703 (19-20)
- MALIET A.M., PLANTEY M.C., D.E.A., (1977) Lille(10-11-32-33
- MARTEL P., KIM S.M., POWELL B., Biophys. J., Biophysical Society, <u>31</u> (1980) 371-380 (14)
- MARTIN A.W., HUEBERS E., WEBB J., VI International Conference in "Proteins of Iron Storage and Transport", July 11-14 (1983) Sapporo JAPAN (4-6-8)

- MARZ L., HATTON M.W.C., BERRY L.R., REGOECZI E., Can. J. Biochem., 60 (1982) 624-630 (26-27-29-112) - MASSON P.L., In "La lactotransferrine", (1970) Arscia, Bruxelles BELGIQUE (13) - MASSON P.L., HEREMANS J.F., In PEETERSH, Protides of the Biological Fluids, Elsevier, Amsterdam, 14 (1966) 115(44) - MASSON P.L., HEREMANS J.F., Comp. Biochem. physiol., 39 (1971) 119-129 (13) - MATSUMOTO A., YOSHIMA H., TAKASAKI S., KOBATA A., Biochem. J., 91 (1982) 143-152 (32-114-180-181) - MAZURIER J., D.E.A. (1972) Lille (10) - MAZURIER J., Thèse Doc. ès. sci, (1980) Lille (4) - MAZURIER J., METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., SPIK G., MONTREUIL J., JOLLES P., Experientia, <u>39</u> (1983) 135-141(14-16-17-24-26) - MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J., Abstracts of the Iron Club Meeting, (1984) 10-13 juillet - Rennes, FRANCE. (43) - METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., JOLLES P., MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J., Biochim. Biophys. Acta, 622 (1980) 308-314 (26) - METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., MAZURIER J., SCHOENTGEN F., LEGRAND D., SPIK G., MONTREUIL J., JOLLES B., Eur. J. Biochem., 145 (1984) 659-676 (10-11-14-15) - METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J., JOLLES P., Biochimie, 60 (1978) 557-561 (14) - METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J., JOLLES P., FEBS-lett., 142 (1982) 107-110(14) - METZ-BOUTIGUE M.H., MAZURIER J., JOLLES J., SPIK G., MONTREUIL J., JOLLES P., Biochim. Biophys. Acta, 670 (1981) 243 - 254 (12 - 14)- MICHEL V., Thèse 3ème cycle (1981) Lille (37) - MONTREUIL J., Pure App. Chem., 42 (1975) 431-477 (36)

-204-

- MONTREUIL J., Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., <u>37</u> (1980) 157-223 (36-38)
- MONTREUIL J., Proc. Aharon Katzir-Katchalsky, Conference
 "In Carbohydrate-Protein interactions", Kibbutz
 Kiryat Anavim 9th (1980) 3-4 (36-37-38)
- MONTREUIL J., Comp. Biochem., 19 B/II (1982) 1-188 (37-38)
- MONTREUIL J., Biochem. Soc. Transactions, <u>11</u> (1983) 134-136 (37-38)
- MONTREUIL J., Pure and Appl. Chem., <u>56</u> (1984) 859-877 (39)
- MONTREUIL J., ADAM-CHOSSON A., SPIK G., Bull. Soc. Chim. Biol., <u>47</u> (1965) 1867 (29)
- MONTREUIL J., FOURNET B., SPIK G., STRECKER G., C.R. Acad. Sci., Paris <u>287 D</u> (1978) 837-840 (36-38)
- MONTREUIL J., MULLET S., C.R. Acad. Sci., <u>250</u> (1960) 1376 (3-32)
- MONTREUIL J., SPIK G., In "Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine.", (1975) Crichton R.R. (Ed.) 27-38 North-Holland, Amsterdam.(29-180)
- MONTREUIL J., SPIK G., CHOSSON A., C.R. Acad. Sci., 255 (1962) 3483 (29)
- MONTREUIL J., TONNELAT J., MULLET S., Biochim. Biophys. Acta, <u>45</u> (1960) 413-421 (32)
- MOROZ C., GILER S., KUPFER B., URCA I., New England J. Med., <u>297</u> (1977) 1172-1173 (44)
- NAGLER A.L., KOCHWA S., WASSERMAN L.R., Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 111 (1962) 74-6 (3)
- ORAM J.D., REITER B., Biochim. Biophys. Acta, <u>170</u> (1968) 351 (4-13-44)
- OSBORNE T.B.J., J. Am. Chem. Soc., <u>21</u> (1899)477 (4)
- PALMOUR R.M., SUTTON E.H., Biochem., <u>22</u> (1971) 4026-4032 (6-8-9)
- PAN B.T., BLOSTEIN R., JOHNSTONE R.M., Biochem. J., 210 (1983) 37-47 (41)

- PEREZ S., WARIN V., Résultats non publiés.(37)
- POLIS B.D., SHMUKLER H.W., J. Biol.Chem., <u>201</u> (1953) 475-500 (4)
- PRIEELS J.P., PIZZO S.V., GLASGOW L.R., PAULSON J.C., HILL R.L., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., <u>75</u> (1978) 2215-2219 (42)
- REGOECZI E., TAYLOR P., DEBANNE M.T., MARZ L., HATTON M.W.C., Biochem. J., <u>184</u> (1979) 399-407 (24)
- REITER B., BROCK J.H., STEEL E.D., Immunology, <u>28</u> (1975) 83 (43)
- RETEGUI L.A., MOGUILESKI M., CASTRACANE C.E., MASSON P.L., Laboratory Invest., <u>50</u> (1984) 323-328 (42)
- RHODES M.B., AZARI P.R., FEENEY R.E., J. Biol. Chem., 230 (1958) 399 (4)
- RIDCHARSON M.E., BUTRESS M., FEINSTEIN A., STRATIL A., SPOONER R.L., Biochem. J;, <u>135</u> (1973) 87-92 (7)
- RISLEY J.M., VAN ETTEN R.L., Carbohydr. Res., <u>147</u> (1986) 21-29 (92)
- ROGERS H.J., Immunology, <u>30</u> (1976) 425-433 (46)
- ROGERS H.J., SYNGE C., Immunology, <u>34</u> (1978) 19-28(46) (46)
- ROOP W.E., PUTMAN F.W., J. Biol. Chem., <u>242</u> (1967) 2507-2513 (3)
- SAWATZKI G., HOFFMANN F.A., KUBANEK B., Infect. Immun., 39 (1983) 659-665 (6-8-13)
- SCHADE A.L., "In Protides of the Biological Fluids", 8ème Colloque de Bruges, Elsevier Ed., <u>261</u> (1961) (42)
- SCHADE A.L., CAROLINE L., Science, 100 (1944) 14-15(4-46)
- SCHADE A.L., CAROLINE L., Science, 104 (1946) 340-341(3-42)
- SCREIBER G., DRYBURGH H., MILLERSHIP A., MATSUDA Y., INGIS A., PHILLIPS J., EDWARDS K., MAGGS J., J. Biol. Chem., <u>254</u> (1979) 12013-12019 (8)
- SCHULTZE H.E., SCHMIDTBERGER R., HAUPT H., Biochem. J., 329 (1958) 490 (29)
- SMITH K.L., CONRAD H.R., PORTER R.M., Journal of Dairy Science, <u>54</u> (1971) 1427 (115)

- SMITH K.L., FERGUSSON L.C., Federation Prcc., 29 (1970) 1455 (115-118) - SØRENSEN M., SØRENSEN S.P.L., C.R. Travaux Lab. Calberg Ser. Chim., 23 (1939) 55 (3) - SPIK G., Thèse Doct. ès. Sci., (1968) Lille (29) - SPIK G., Anna. Nutr. Alim., 25 (1971) A81-A134 (43) - SPIK G., Falk Symposuim n : 34 "On Structural Carbohydrates in the Liver, Basel, (1982) Abstract p 42 and M T T Press limited (26-27-80) - SPIK G., BAYARD B., FOURNEI B., STRECKER G., BOUQUELET S., MONTREUIL J., FEBS-lett, 50 (1975) 296-299 (109) - SPIK G., BRUNET C., MAZURIER-DEHAINE C., FONTAINE G., MONTREUIL J., Acta Paediatr. Scand., 71 (1982) 979-985(43) - SPIK G., CHERON A., MONTREUIL J., DCLBY J., Immunology, 33 (1978) 663-671 (46) - SPIK G., DEBRUYNE V., MONTREUIL J., VAN HALBEEK H., VLIEGENTHART J.F.G., FEBS-lett., <u>183</u> (1985) 1 65-69(29-112) - SPIK G., FOURNET B., BAYARD B., VANDERSYPPE R., STRECKER G., BOUQUELET S., CHARET P., MONTREUIL J., Arch. Intern. Physiol.Biochim., 82 (1974) 791(95-109-112-180) - SPIK G., FOURNET B., CHERON A., STRECKER G., MONTREUIL J., DORLAND L., VLIEGENTHART J.F.G., In Proceeding of the Fith International Synposuim of Glycoconjugates, <u>1</u> (1979) 21-22(24-32-48-62-82-180) - SPIK G., FOURNET B., MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., 288 (1979) 967-970 (29-51-93) - SPIK G., GUERIN G., MONTREUIL J., DORLAND L., VAN HALBEEK H., VLIEGENTHART J.F.G., résultats non publiés (1981) (6-30) - SPIK G., MAZURIER J., Proteins of Iron Metabolism, (1977) 143-151 (32-180)- SPIK G., MONSIGNY M., MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., 260 (1965) 4282-4284 (29)

- SPIK G., MONSIGNY M., MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., <u>50</u> (1968) 2186 (24-31)
- SPIK G., MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., <u>51</u> (1969) 1271-1285 (24)
- SPIK G., MONTREUIL J., Bull. Eur. Physiopathol. Resp., 19 (1983) 123-130 (43-45-46)
- SPIK G., STRECKER G., FOURNET B., BOUQUELET S.,
 MONTREUIL J., DORLAND L., VAN HALBEEK H., VLIEGENTHART J.F.G.
 Eur. J. Biochem., <u>121</u> (1982) 413-419 (32-114-180)
- SPIK G., VANDERSYPPE R., FOURNET B., CHARET P., BOUQUELET S., Actes Coll. Intern. <u>221</u> (1974) 483-500 (26)
- SPOONER T.L., OLIVER R.A., RIDCHARDSON N., BUTTRESS N., FEINSTEIN A., MADDY A.H., STRATIL A., Comp. Biochem. Physiol., <u>52 B</u> (1975) 515-522 (6-30)
- STARKENSTEIN E., HARVALID Z., Arch. Esp. Path. v. Pharmakol., 172 (1933) 75-92 (3)
- STEPHEN S., DOLBY J., MONTREUIL J., SPIK G., Immunology, <u>41</u> (1980) 597-603 (46)
- STRATIL A., BOBAK P., TOMASEK V., VALENTA M., Comp. Biochem. Physiol., <u>76 B</u> (1983) 845-850 (6-7-8)
- STRATIL A., BOBAK P., VALENTA M., TOMASEK V., Comp. Biochem. Physiol., <u>74 B</u> (1983) 603-610 (6-7-8)
- STRATIL A., GLASNAK V., Animal Blood Grps. Biochem. Genet. 12 (1981) 113-122 (6-32-64)
- STRATIL A., KUBEK A., Int. J. Biochem., <u>5</u> (1974) 895-899 (6)
- STRATIL A., SPOONER P.L., Biochem. Genet., 5 347-365 (30)
- STRATIL A., TOMASEK V., BOBAK P., GLASNAK V., Animal
- Blood. Grps. Biochem. Genet., 15 (1984) 89-101 (80)
- SZUCHET-DERECHIN S., JOHNSON A., Europ. Polymer. J.,
 - 1 (1965) 271 (4)

-209-

- THEORELL, AKESON, Arch. Kemi. Miner. Geol., <u>17 B</u> 1943) (4)
- THIBODEAU S.N., LEE D.C., PALMITER R.D., J. Biol. Chem., 252 (1978) 3771-3774 (48)
- TSAI P., FREUER J., BALLOU C.E., J. Biol. Chem., 159 (1984) 3805-3811 (134)
- TURNBULL A., "In Iron in Biochemistry and Medicine, JACOBS and WORWOCD Ed., Academic Proc., London, (1974) 370-404 (41)
- VAN BOCKXMEER F.M., MORGAN E.H., Biochim. Biophys. Acta, 584 (1979) 76-83 (41)
- VAN EIJK H.G., VAN DIJK J.P., NOORT W.L., LEIJNSE B., MONFOCRT C.H., Scand. J. Haemat., <u>9</u> (1972) 267-270 (8-31)
- VAN HALBEEK H., DORLAND L., VLIEGENTHART J.F.G., SPIK G., CHERCN A., MONTREUIL J., Biochim. Biophys. Acta., <u>675</u> (1981) 293-296 (172-178)
- VAN HALBEEK H., VLIEGENTHART J.F.G., WINTERWERP H.,
 BLANKEN W.M., VAN DEN EIJNDEN D.H., Biochem. Biophys. Res.
 Commun., <u>110</u> (1983) 124-131 (167)
- VAN SNICK J.L., MASSON P.L., J. exp. Med., <u>144</u> (1976) 1568-1580 (44)
- VLIEGENTHART J.F.G., VAN HALBEEK H., DORLAND L., Pure Appl. Chem., <u>53</u> (1981) 45 (57-73-89-104-145-154-165-175)
- VLIEGENTHART J.F.G., DORLAND L., VAN HALBEEK H., Adv. Carb. Chem. Biochem., <u>41</u> (1983) 209 (57-73-89-104-145-154-165-175)
- WALSH R.J., THOMAS E.D., CHOW S.K., FLUNARTY R.G., FINCH A., Science, <u>110</u> (1949) 396-396 (41)
- WARIN V., BAERT F., FOURET R., STRECKER G., SPIK G., FOURNET B., MONTREUIL J., Carbohydr. Res. 76 (1979) 11 -22 (36)
- WARNER R.C., WEBER I., J. Biol. Chem., 191 (1951) 173 (4)
- WELTY F.K., SMITH L.K., SCHANBACHER F.L., Journal of Dairy Science, 59 (1975) 225 (115-119)

- WILLIAMS J., Biochem. J., 83 (1962) 355-368 (148)
- WILLIAMS J., Biochem. J., 108 (1968) 57-67 (129)
- WILLIAMS J., Trends Biochem. Sci., 7 (1982) 394-397 (16)
- WILLIAMS J., ELLEMAN T.C., KINGSTON I.B., WILKINS A.G., KUHN K.A., Eur. J. Biochem., <u>122</u> (1982) 297-203 (5-18)
- WILLIAMS J., GRACE S.A., WILLIAMS J.M., Biochem. J., 201 (1982) 417-419 (16-17-22)

APPENDICE TECHNIQUE

I - PREPARATION DES LACTOTRANSFERRINES

A - Préparation des lactosérums

1) Provenance des laits

Pour étudier la variation de structure glucidique de la lactotransferrine de Vache en fonction de la lactation, nos études ont porté sur les lactotransferrines isolées de 3 types de secrétion

- de la secrétion séche : environ six semaines avant la mise bas, on arrête de traire la Vache mais il est encore possible de recueillir durant cette période de faibles quantités de lait appelé secrétion séche.

- du colostrum recueilli après le vélage et ceci pendant cinq à six traites.

- du lait stabilisé

Ces différents laits nous ont été fournis par les fermes de Mesdames Hennette et Merlio de Mons en Pévéle que nous remercions vivement.

2) Délipidation et décaséination des laits

Pour préparer les lactotransferrines à partir des 3 types de secrétions, nous avons appliqué la méthode mise au point par Chéron en 1977.

Le lait est délipidé par centrifugation à 2000 t/mn à 4° C pendant 30 mn. Il est ensuite décaséiné par précipitation de la caséine à pH 4,6 avec de l'HCl 3 N. Après dialyse trois jours contre de l'eau permutée, le précipité est éliminé par centrifugation à 3500 t/mn à 4° C pendant 20 mn.

B - Fractionnement des lactosérums

Le surnageant obtenu, ajusté à pH 7 avec NH40H 3N est chromatographié sur colonne de SP - Séphadex C-50 (30x7cm) équilibrée dans l'acétate de sodium 0,22 M. Après lavage de la colonne par l'acétate 0,35 M, la lactotransferrine retenue par cet échangeur de cations est éluée par l'acétate de sodium 1M. La fraction obtenue est dialysée contre de l'eau permutée pendant trois jours, puis lyophilisée. Cependant, cette glycoprotéine contient encore des impuretés protéiques, de ce fait elle est de nouveau chromatographiée sur colonne de SP -Séphadex C-50 (3 x 30 cm) stabilisée dans l'acétate de sodium 0,22 M. L'élution se fait par un gradient discontinu en acétate de sodium 0,26 M et 0,4 M afin d'éliminer les impuretés restantes, la lactotransferrine est éluée par l'acétate de sodium 0,6 M et 1 M. Le dernier éluat est dialysé contre de l'eau permutée trois jours, puis lyophilisé.

C) Préparation de lactotransferrines réduites et alkylées

La réaction de réduction et d'alkylation des ponts disulfures permet une action plus efficace de la pronase lors de la préparation des glycopeptides. La lactotransferrine est réduite selon le procédé de Crestfield <u>et al</u>., en 1963 en présence de tampon pH 8,2, contenant de l'E.D.T.A. (Ethyléne Diamine Tétracétate de sodium) 0,03 M, de l'urée 8 M, du tris 1,5 M et du β - mercapto - éthanol0,2 M à température ambiante et à l'obscurité pendant 18 h. Elle est ensuite alkylée par addition de iodoacétamide 0,4 M. La réaction est terminée, quand le réactif au nitroprussiate vire au jaune.

L'ensemble est dialysé contre de l'eau permutée pendant trois jours.

II - PREPARATION DES SEROTRANSFERRINES

Les sérotransferrines sont préparées à partir des sérums de différents animaux.

Deux méthodes sont essentiellement utilisées :

- soit la précipitation du sérum par le rivanol

- soit la précipitation du sérum par le sulfate d'ammonium

Mais les deux précipitations peuvent être réalisées sur un même sérum. La purification des transferrines s'effectue ensuite par chromatographie d'échange d'ions.

A - Préparation de la sérotransferrine de Poulet

La méthode utilisée est une modification de la méthode mise au point par Williams en 1962.

Après une dialyse de 48 h. du sérum contre de l'eau permutée, celui-ci est précipité par du rivanol en présence de tampon Tris |HCl pH8,8 selon la technique de Roop et Putman en 1967. Le surnageant filtré puis dialysé est précipité à 55% puis à 70% de saturation en sulfate d'ammonium. Le deuxième précipité obtenu est purifié sur colonne de D E A E - Séphadex stabilisée dans un tampon Tris |HCl 0,05 M pH 8,6 renfermant du NaCl 0,05 M. L'élution de la transferrine se fait par un gradient de NaCl 0,05 M à 0,2M dans le tampon Tris |HCl 0,05 M.

On obtient trois pics. Le second pic élué par une concentration de 0,1 M renferme la sérotransferrine. Sa pureté est vérifiée par immunoélectrophorése et électrophorése en gel de**Polya**crylamide.

B - Préparation de la sérotransferrine de Mouton

La sérotransferrine de Mouton nous a été fournie par le Professeur G. Guérin de l'Institut de la Recherche Agronomique de Jouy-en-Josas. Elle est préparée selon la méthode décrite par Guérin <u>et al</u>., en 1976. Le procédé utilisé consiste à précipiter le sérum par le sulfate d'ammonium entre 50 à 60% de saturation. Le précipité dialysé est purifié sur colonne de CM - cellulose, puis sur D E A E-Séphadex A-50 équilibrée dans le tampon imidazol |HC1 0,05 M pH7. La sérotransferrine est éluée par un gradient en NaCl 0,1 à 0,3 M. Deux pics sont obtenus : le pic I correspond à la transferrine lente ou slow (TF - S) et le pic II correspond à la transferrine rapide ou fast (TF - F).

C - Préparation de la sérotransferrine de Rat

La sérotransferrine de Rat nous a été fournie par le Professeur E. Regoeczi du Département de Pathologie de

-213-

l'Université d'Hamilton (Ontario - Canada). Elle est préparée selon la méthode décrite par Charlwood <u>et al</u>., en 1976.

Le sérum est précipité par le sulfate d'ammonium à 60% de saturation. Le précipité obtenu est dialysé puis purifié sur colonne d'Amberlite I R C - 50. Une dernière purification a lieu sur colonne de D E A E - Séphadex A 50 équilibrée dans le tampon Tris HCl 0,05 M, NaCl 0,05 M, pH 8,6. La sérotransferrine est éluée par un gradient en NaCl 0,1 à 0,3 M.

Deux pics sont également obtenus : le pic correspondant à la transferrine lente ou slow (TF - S) et le pic II correspondant à la transferrine rapide ou fast (TF - F).

D - Préparation de la sérotransferrine de Boeuf

La sérotransferrine de Boeuf nous a été fournie par le Professeur J.H. Brock de l'Institut de Biochimie de Nutrition à Zaragoza (Espagne). Elle est préparée selon le procédé décrit par Stratil et Spooner en 1971.

Le sérum de Boeuf est précipité au rivanol en présence de tampon Tris HCl pH 8,8. Le surnageant obtenu est précipité à 70% de saturation en sulfate d'ammonium ;

Le précipité renfermant la transferrine est purifié sur colonne de D E A E - Séphadex A 50 équilibrée dans le tampon Tris HCl 0,05 M pH 7,6, NaCl 0,05 M. L'élution s'effectue par un gradient en NaCl 0,05 à 0,2 M. Souvent la transferrine obtenue renferme, un contaminant présumé être de l'hémopexine. Elle est donc repurifiée sur colonne de SP - Séphadex C 50 équilibrée dans le tampon citrate de sodium 0,02 M pH 5,1. La transferrine est éluée à pH 5,5.

E - Préparation de la sérotransferrine de Cheval

La sérotransferrine de Cheval nous a été donnée par le Professeur A. Stratil de l'Institut de physiologie et de Génétique Animales de Libechov (Tchécoslovaquie).

Elle est préparée selon la méthode décrite par Stratil et Glasnak en 1981.

Le sérum est précipité au rivanol en présence de tampon Tris HCl pH 8,8. Le précipité renfermant la transferrine est fractionné par gel filtration sur colonne de Séphadex G-100. La sérotransferrine est alors déssalée sur Séphadex G-25 en présence d'ammoniaque 6,9 m M.

Les variants de la sérotransferrine sont obtenus sur colonne de D E A E - Séphadex A-50 équilibrée dans le tampon Tris HCl 0,05 pH8. Ils sont élués de la colonne par une gradient linéaire de 0 à 0,15 M en NaCl dans le tampon Tris HCl. Les variants obtenus sont repurifiés par chromatographie sur colonne de SP - Séphadex équilibrée dans le tampon citrate de sodium 0,01 M pH 5, l'élution se fait par un gradient linéaire de 0,01 à 0,025 M en citrate de sodium pH 6 (Stratil et al.,en 1984).

III - PREPARATION DE L'OVOTRANSFERRINE DE DINDE

L'ovotransferrine de Dinde est commercialisée par la firme SIGMA sous le nom de Conalbumine C 3890. La méthode couramment utilisée pour la préparation de l'ovotransferrine a été mise au point par Azari et Baugh en 1966. Le blanc de l'oeuf homogénéisé est acidifié à pH 4,7 puis chromatographié sur colonne de CM -Cellulose. L'ovotransferrine est éluée par le tampon (NH4)₂ So4 0,3 M pH 8,5 puis précipitéepar le sulfate d'ammonium à 65% de saturation. Elle est ensuite purifiée par des cristallisations successives.

IV - DESATURATION EN FER DES TRANSFERRINES

A - Désaturation en fer des lactotransferrines

La désaturation est réalisée selon le protocole décrit pour la lactotransferrine humaine par Mazurier et Spik en 1980. La lactotransferrine est dissoute dans un tampon phosphate de sodium 0,5 M / Na OH 2 M (4/1 : v/v) ajusté à pH 4,2 avec de l'acide formique. On laisse reposer cette solution une nuit à température ambiante puis on la dialyse contre une solution d'E.D.T.A. à 1% puis trois jours contre de l'eau permutée.

B - Désaturation en fer des sérotransferrines

La désaturation se fait en tampon citrate/acide citrique 0,1 M pH4. La sérotransferrine est alors dialysée 48 h.à 4° C contre de l'eau permutée puis lyophilisée.

-215-

V - ANALYSE ELECTROPHORETIQUE ET IMMUNOELECTROPHORETIQUE DES TRANSFERRINES

A - <u>Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence</u> de S D S

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de S D S est réalisée d'après la méthode de Davis en 1964, l'appareillage et la méthodologie utilisés sont ceux décrits par Kerckaert en 1978. Le gel inférieur est constitué par un gel de gradient de réticulation 5 à 20 %. Le gel supérieur est un gel réticulation 5 %. L'électrophorèse est réalisée dans un tampon Tris 0,025 M, Gly 0,18 M, SDS (1% v : v) pH 8,6 à raison de 8v/cm pendant 4 h.

- B Etude immunoélectrophorétique
 - 1) Immunodiffusion radiale

La technique utilisée a été décrite par Mancini <u>et al</u>., en 1965. Un gel d'agarose contenant de l'anti-sérum antitransferrine est coulé sur une plaque de verre. Les produits à analyser sont déposés dans des puits pratiqués dans l'agarose. Après 48 h.de diffusion en chambre humide, la plaque est lavée, séchée et colorée au réactif à l'Amidoschwartz.

2) Immunoélectrophorèse mono et bidimentionnelle

La méthode a été décrite par Scheidegger en 1955. Les solutions protéiques à analyser sont déposées dans des puits réalisés dans l'agar noble. Après 1h30 de migration à 30 volts, l'antisérum est introduit dans des gouttières pratiquées dans le gel. Après diffusion en chambre humide 48 h., la plaque est lavée, séchée et colorée au réactif à l'Amido schwartz.

VI - PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES A PARTIR DES TRANSFERRINES

Les glycopeptides des tranferrines sont préparés par hydrolyse pronasique des glycoprotéines d'après les procédés décrits par Spik et Montreuil en 1969 et Spik et al., en 1974 Ils sont purifiés par gel filtration sur colonne de BioGel P2.

Les glycopeptides sont marqués au 14 C par l'anhydride acétique (Activité totale 0,1 m Ci, Activité spécifique 7mCi/ mmole) en solution dans le bicarbonate de sodium saturé. La réaction s'effectue par contact 2 h. à température ambiante puis l'ensemble est purifié sur colonne de BioGel P2 équilibrée dans l'acide acétique 1 %.

Le repérage s'effectue par comptage de la radioactivité au compteur Beckman LS 9000.

VII - HYDROLYSES ENZYMATIQUES DES GLYCOPEPTIDES

A - Hydrolyse par l'endo-N-acétyl-β - D glucosaminidase de Basidiomycés

L'endo-N-acétyl - β - D glucosaminidase* (e c 3-2-1-6) isolé d'un moût de fermentation de Basidiomycéte (Bouquelet <u>et al</u>., en 1980) est capable d'hydrolyser des asialo ou monosialo glycoasparagines, glycopeptides et glycoprotéines renfermant des structures de type N-acétyllactosaminique ou de type oligomannosidique. La coupure se fait entre les deux résidus de N-acétyl glucosamine du di N-acétyl-chitobiose lié à la chaîne peptidique. On obtient des oligosaccharides avec un résidu de N-acétyl glucosamine en position terminale réductrice.

L'endo N-acétyl – β – D glucosaminidase posséde une masse moléculaire située entre 50 000 et 100 000 et son pH optimum varie de 4,5 à 5,5 en tampon de Mac – Ilvaine (1921) (Jayssonen 1980) Pour plus de commodité d'utilisation, l'enzyme est immobilisé sur Sepharose – 4 B (1,61 m u d'activité oligomannosidique et 1,1 m u d'activité N – acétyllactosaminique/25 ml de Sepharose 4 B) (Kol en 1983).

Cet enzyme ne renferme ni activité protéasique, ni activité exoglycosidasique.

* L'enzymeinsolubilisé nous a été fourni par le Professeur
S. Bouquelet que nous remercions.

-217-

Les glycopeptides oligomannosidiques sont hydrolysés en circuit fermé sur la colonne d'endo-N-acétyl - 8 -D glucosaminidase insolubilisé, stabilisée dans le tampon phosphate/citrate 0,02 M /0,01 M pH 5 pendant 96 h.à température ambiante.

L'hydrolyse des glycannes est vérifiée par chromatographie en couche mince sur plaque de silicagel G-60 (Merck) en solvant : N butanol/acide acétique/eau (2 : 1 : 1, v/v) en effectuant quatre migrations successives (Palo et Savolainen en 1972).

Les oligosaccharides sont révélés par le réactif à l'orcinol sulfurique. Leur migration est comparée à celle d'oligosaccharides mannosidiques* isolés d'urines de patients atteints de mannosidose (Strecker et Montreuil en 1979). Les oligosaccharides sont ensuite réduits par le borohydrure de potassium l M pendant 24 h. à l'obscurité. La réaction est arrêtée par l'addition de Dowex 50 x 8 (20 - 50 Mesh). La solution est filtrée sur laine de verre, évaporée à sec et lavée cinq fois par un mélange de méthanol/acide acétique(99/1 ; v/v). Le produit réduit est déssalé sur colonne de BioGel P2 . Cette étape permet de stabiliser la N-acétyl glucosamine terminale en milieu alcalin'lors de réactions ultérieures

* Nous remercions G. Strecker et J.C. Michalski qui nous ont fourni les témoins oligomannosidiques.

B - Hydrolyse par l'endo-N-acétyl-β - D glucosaminidase*

L'endoglycosidase H isolé de Streptomycés Griseus (Ac : 30 u/mg protéine) coupe comme précédemment entre les deux résidus de N-acétyl glucosamine ; cependant cet enzyme hydrolyse uniquement des glycopeptides de type oligomannosidique.

Un mg de glycopeptides est hydrolysé par 20 mu d'enzyme en présence de tampon phosphate/citrate 0,2 M/0,1 pH 5 pendant 48 h. à 37° C. Les oligomannosides obtenus sont dessalés sur colonne de BioGel P2 et déposés sur couche mince (Silicagel G-60). La migration s'effectue dans le solvant propanol/nitrométhane/H20 5 : 2 : 3, (v/v) Tsai et al., en 1984).

C - Hydrolyse par la neuraminidase

Les glycopeptides sont désialylés par action d'une meuraminidase soluble isolée de <u>clostriduim Perfringens</u>* (1,25 u/ml d'enzyme en présence de tampon acétate de sodium 0,1 M pH 6 une nuit à 37° C. L'acide N-acétyl neuraminique et les sels sont éliminés par gel filtration sur Dowex 1 x 2 (200 - 400 Mesh) équilibrée dans l'eau.

D - Hydrolyse par la β -D galactosidase

Les glycopeptides désialylés sont dégalactosylés par action d'une B - D galactosidase de Jack bean* (1,14 u/300 µl de solution enzymatique) en présence de tampon phosphate/citrate 0,2M/0,1M pH 3,5 pendant 48 h.à 37° C. Après purification sur colonne de BioGel P2, le produit obtenu est lyophilisé.

* L'endoglycosidase H est commercialisé par la firme Seikagaku Koggo Co (Japon).

- * La neuraminidase nous a été fournie par le Professeur R. Schauer que nous remercions.
- * La β D galactosidase nous a été fournie par le Professeur S. Bouquelet que nous remercions.

VIII - PREPARATION D'OLIGOSACCHARIDES PAR HYDROLYSE ALCALINE

Les oligosaccharides sont préparés suivant la méthode de Lee et Scocca en 1972 dont le principe est fondé sur l'hydrolyse des liaisons amides en milieu alcalin réducteur et à chaud.

Deux mg de glycopeptides sont dissous dans 300 µl d'une solution de NaOH 1 N, BH₄K 1 M et chauffés au bain marie durant 6 h. La réaction s'effectue dans un petit ballon auquel est adapté un réfrigérant. Elle est alors arrêtée, à 4° C, par l'addition goutte à goutte d'acide acétique concentré jusqu'à l'obtention d'un pH voisin de 4. Le mélange est déssalé sur BioGel P2 équilibrée dans H20. Après repérage à l'orcinol sulfurique des fractions glucidiques, cellesci sont concentrées à sec puis N-réacétylées en présence de bicarbonate de sodium saturé (300 µl)et d'anhydride acétique ajouté progressivement 5 fois 20 µl toutes les 20 mm . Un nouveau déssalage sur BioGel P2 est effectué. Les fractions d'oligosaccharides sont lyophylisées.

IX - FRACTIONNEMENT DES GLYCOPROTEINES, DES GLYCOPEPTIDES ET DES OLIGOSACCHARIDES

A - Chromatographie d'affinité sur colonne de Concanavaline A Sepharose 4 B (Con A) des glycoprotéines et des glycopeptides

Les glycoprotéines et les glycopeptides sont chromatographiés sur colonne de Con A (10 mg de Con A/ml de gel ; pharmacia)équilibrée dans le tampon acétate de sodium 5 m M MnCl2 lmM, CaCl2 lmM, MgCl2 lmM, NaCl 0,1 M pH 6,5 et selon le protocole décrit par Krusius <u>et al</u>., en 1976 pour la sérotransferrine Humaine. L'élution des glycoprotéines et des glycopeptides est réalisée par le passage du tampon précédent renfermant de l'α-D-méthyl-glucopyrannoside 5mM, 10mM, 15mM, 20mM, 50mM et 200mM selon le type de transferrine étudié. Les fractions glycoprotéiniques sont visualisées à 280 nm. Les fractions glycopeptidiques sont repérées par dépôt sur plaque de silicagel G-60 (Merck)

-220-

et révélation à l'orcinol (solution d'orcinol à 0,2 % dans H2So4 20%) Les fractions glycopeptidiques éluées par le tampon contenant de l'α -D-méthylglucoside sont repérées par chromatographie en couche mince (Silicagel G-60) en utilisant le solvant : n butanol/éthanol/eau/acide acétique/pyridine (10 : 100 : 30 : 10 : (v/v) Bayard <u>et al</u>., en 1979). Chaque fraction est dessalée par gel filtration sur colonne de BioGel P2.

B - Chromatographie liquide en haute pression (H.P.L.C.) des glycopeptides et des oligosaccharides

L'H.P.L.C. permet la séparation des produits d'un échantillon grâce à la distribution compétitive entre deux phases : une phase mobile liquide et une phase stationnaire. L'appareil utilisé est un "Spectraphysics". Il est équipé d'une colonne Amino AS-5A (30 cm x 4mm).

1) Séparation sur colonne Amino AS-5A

L'élution des glycopeptides et des oligosaccharides est réalisée par le gradient acétonitrile/H2O suivant : 60/35 (v/v) pendant 40 mm, 60/40 (v/v) pendant 20 mm et 50/50 (v/v) pendant 30 mm (Turco en 1981). L'addition d'acide acétique dans l'eau dans les proportions de 0,5 ml pour 1800 ml d'eau permet de garder une ligne de base régulière.

Le débit de la pompe est de un ml/mn. Les pics recueillis sont concentrés à l'évaporateur rotatif et purifiés sur colonne de BioGel P2.

X - ETUDE DE LA STRUCTURE PEPTIDIQUE

La composition en acidesaminés des glycopeptides est déterminée à l'autoanalyseur "Beckman Multichrom" S 120 B, après hydrolyse acide selon la méthode décrite par Spackman <u>et al</u>., en 1958 et modifiée par Charet <u>et al</u>., en 1973. L'hydrolyse acide s'effectue en tubes scellés sous vide par l'acide chlorhydrique redistillé 5,6 N pendant 24 h.à 105° C en présence d'un témoin interne la norleucine.

XI - ETUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES

A - <u>Détermination de la composition centésimale en monosaccha-</u> rides

Les compositions centésimales sont déterminées selon les protocoles expérimentaux préconisés par Montreuil et Spik en 1963.

La méthode utilisée pour le dosage des oses neutres est celle à l'orcinol sulfurique de Tillmans et Philippi en 1929.

La méthode utilisée pour le dosage des osamines est celle d'Elson et Morgan en 1933 et modifiée par Belcher <u>et al</u>., en 1954. Les osamines sont libérées au préalable par hydrolyse à l'acide chlorhydrique 4 N redistillé 4 h.à 100° C. La méthode utilisée pour le dosage de l'acide N-acétyl neuraminique est celle à la diphénylamine de Niazi et State en 1948 modifiée par Werner et Odin en 1952.

B - Détermination de la composition molaire en monosaccharides

1) Chromatographie en phase gazeuse sur colonne remplie OV 210

La composition molaire en monosaccharides a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et trifluoroacétylation suivant la méthode décrite par Zanetta <u>et al</u>., en 1972.

A l mg de glycoprotéine ou 100 µg de glycopeptides sont ajoutés 10 µg d'une solution de mésoinositol (témoin interne) à 100 µg/ml.

Après lyophilisation, le produit est désséché sous P205 à 50° C. La méthanolyse est réalisée dans un tube hermétiquement fermé, par un ml de CH30H/HCl 0,5 N pendant 24 h.à 80° C. S'il s'agit d'une glycoprotéine, il est nécessaire de centrifuger afin d'éliminer le culot, puis de délipider à l'heptane avant d'évaporer le CH30H/HCl sous azote.

Le résidu sec est repris par 50 μ l de dichlorométhane et 50 μ l d'anhydride trifluoroacé \pm ique, chauffé 5 mn à 150° C.

Le produit ainsi méthanolysé se conserve à -20° C.

-223-.

Les monosaccharides trifluoroacétylés sont analysés en chromatographie en phase gazeuse. La colonne utilisée est une colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de silicone OV 210 à 5 % sur Varaport 30, mesh 80-100.

La température est programmée de 100° à 220° C à . raison de 2° c/mn. Le débit du gaz vecteur (N2) est de 10 ml/mn et la pression d'entrée de 0,4 bars.

2) <u>Chromatographie en phase gazeuse sur colonne capil-</u> laire OV 201

La composition molaire en monosaccharides à également été déterminée par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et triméthylsilylation suivant la méthode décrite par Kamerling <u>et al</u>., en 1975. Cette technique permet de doser des quantités de l'ordre de 1 à 5 µg de monosaccharides.

Aux échantillons à doser est ajoutélugd'une solution de mésoinositol (témoin interne) à lug/ml. Aprés lyophilisation, la méthanolyse est réalisée dans un tube hermétiquement fermé, par 250 µl de CH,OH/HCl 0,5 N pendant 24 h. à 80° C. La solution est ensuite neutralisée par du carbonate d'argent ajouté grain par grain, puis Nréacétylée par 10 µl d'anhydride acétique. Après une nuit de repos à température ambiante et à l'obscurité le tube est centrifugé. Le surnageant introduit dans une pipette pasteur scellée à une extrémité, est délipidé 3 fois par 200 µl d'heptane puis évaporé sous N2. Le résidu sec est repris par 25 µl de pyridine et 25 µl de B.S.T.F.A. (Bis Silyl Trifluoro Acétamide). Après 3 h. de réaction à température ambiante, les monosaccharides silylés sont analysés en chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire (0,2 mm x 25 m) remplie de silicone OV 201. La température est programmée de 120° à 240° C à raison de 2°c/mn. Le débit du gaz vecteur (He) est de 1 ml, la pression d'entrée étant de 0,6 bars.

C - Analyse desmonosaccharides sous forme de polyols acétates

Les fractions glycopeptidiques (200 µg) sont additionnées de ribitol (témoin interne) et l'hydrolyse est réalisée par 150 µl d'acide trifluoroacétique 4 N pendant 4 h.à 100° C. L'acide est éliminé par séchage de la solution souséxcicateur de soude puis lavage par le méthanol distillé. L'hydrolysat est réduit par 150 µl d'une solution de borohydrure de potassium à 2mg/ml, en milieu alcalin (pH9) pendant 2 h à température ambiante. La réaction est arrêtée par addition de quelques gouttes d'acide acétique à 20%, puis l'hydrolysat réduit est séché à l'évaporateur rotatif. L'acide borique est éliminé en présence de méthanol sous forme de méthylborate après plusieurs codistillations. La solution séchée sous N2 est reprise par une quantité déterminéede dichlorométhane et analysée en chromatographie en phase gazeuse sur colonne ECNSSM (0,30 cm x 150 cm) avec programmation de température de 80° à 220° C à raison de 4° C/mn Le débit du gaz vecteur (N2) est de 20 ml/mn.

D - Identification des acides sialiques

Les acides neuraminiques sont libérés selon la méthode mise au point par Schauer en 1978. La solution de glycoprotéine dans H20 (lmg/300 µl) est ajustée à pH2,2 avec de l'acide formique dilué et hydrolyséel h.à 80° en tube hermétiquement fermé. Après lyophilisation l'hydrolysat est silvlé suivant la méthode de Kamerling <u>et al</u>., en 1975. Dans un premier temps, on précipite la protéine par addition de 400 µl de pyridine et 400 µl de BSTFA. Les acides neuraminiques sont solubles. Après une nuit de réaction à température ambiante, on centrifuge la solution. Le surnageant est évaporé sous N2. Le résidu sec est repris par 20 µl de pyridine et 20 µl de BSTFA et analysé en spectrométrie de masse.

E - Microméthylation

Certaines précautions élémentaires sont à prendre :

- La vaisselle doit être rigoureusement propre et séche
- Le produit à méthyler doit être sec

Lors des extractions, il faut utiliser de l'eau milli Q
 La méthylation est réalisée selon le protocole décrit
 par Finne et al., en 1980, et adaptée au Laboratoire par Fournet
 et al., en 1981.

Le produit à méthyler (100 µg de glycopeptides ou d'oligosaccharides) est lyophilisé dans un tube à méthanolyse. On y ajoute sous azote 100 µl de diméthyl sulfoxide et la solution est soniquée pendant 30 mn. On ajoute alors sous N2,50 µl de base de méthylation (méthyl sulfinyl potassium carbanion ou lithium méthyl sulfinyl carbanion) (Paz Parenté <u>et al</u>., en 1985) préalablement chauffée à 37° C. Le tube hermétiquement bouché est soumis aux ultra-sons pendant l h, puis congelé. L'excés de base est éliminé en ajoutant 100 µl d'iodure de méthyle et l'ensemble est de nouveau soumis aux ultra-sons pendant l h.

Les extractions sont réalisées par l'addition dans un premier temps de 500 µl d'eau milli Q froide, de un à deux cristaux de thiosulfate de sodium et de 300 µl de chloroforme distillé: La phase chloroformique inférieure est prélevée tandis que la phase aqueuse est conservée pour deux nouvelles extractions par 500 µl de chloroforme distillé.

Les phases chloroformiques sont lavées cinq fois par un ml d'eau milliQ. L'addition de sulfate de sodium permet d'absorber l'excés d'eau. La solution filtrée sur laine de verre est évaporée sous azote, puis lyophilisée pour éliminer le diméthyl sulfoxide.

Les composés méthylés sont méthanolysés par l'addition de 500 µl de CH30H/HC1/0,5 N pendant 24 h.à 80° C. Après évaporation à sec, la peracétylation est effectuée par l'addition de 10 µl de pyridine et 50 µl d'anhydride acétique pendant une nuit à 37° C. Le produit méthylé, méthanolysé est enfin évaporé sous azote et repris par une quantité déterminée de méthanol distillé

Les produits sont préalablement séparés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire.

La température du four est programmée de 120° à 240° C à raison de 2° C/mn puis on a un palier à 240° C pendant 30 mn Les glycannes méthylés sont alors analysés en spectrométrie de masse. Les analyses ont été effectuées sur appareil RIBER Mag GCMS R 10-10 à filtre quadripolaire.

F - Résonance magnétique nucléaire

Les analyses en résonance magnétique nucléaire du proton à 500 MHZ ou 400 MHZ des composés ont été réalisées par l'équipe du Professeur Vliegenthart à Utrech et par Wieruszeski au Laboratoire de Chimie à Lille.

La résonance magnétique nucléaire du proton est réalisée sur les glycopeptides préalablement traités à l'eau lourde (D20) à 27° C de manière à obtenir un échange des hydrogènes mobiles. Les analyses sont effectuées sur un appareil Brucker HX 500 à 500 ou à 400 MHZ opérant en transformés de Fourier.

Les détails expérimentaux sont décrits dans les revues générales de Vliegenthart et al., en 1981 et 1983.

BIBLIOGRAPHIE APPENDICE TECHNIQUE

. .

1	-	AZARI P., BAUGH R.F., Ar. Biochem. Biophys., <u>118</u>
		(1967) 138-144 (5)
2		BAYARD B., KERKAERT J.P., ROUX D., STRECKER G.,
		"In protides of Biological Fluids", Pergamon Press,
		(1979) 153-156 (11)
3	-	BELCHER R., NUTTEN A.J., SAMBROOK C.M., Analyst.,
		<u>79</u> , (1954) 201 (12)
4	-	BOUQUELET S., STRECKER G., MONTREUIL J., SPIK G.,
		Biochimie <u>62</u> (1980) 43 (7)
5	-	CHARET P., TETAERT D., HANK P., MONTREUIL J., C.R.
		Acad. Sci., 276 (1973) 1629-1630 (11)
6	-	CHARLWOOD P.A., HATTON M.W.C., REGOEGZI E., Biochim.
		Biophys. Acta, <u>453</u> (1976) 81-92 (4)
7	-	CHERON A., C.R. Acad. Sci., <u>284</u> , (1977) 585 (1)
8	-	CRESTFIELS A.M., MOORE S., STEIN W.H., J.Biol. Chem.,
		238 (1963) 522 (2)
9	-	DAVIS B., Ann. N.Y. Acad. Sci., <u>121</u> (1964) 404-427 (16)
10'	-	ELSON L.A., MORGAN W.T.J., Biochem. J., <u>27</u> (1933) 1824 (12)
11	-	FINNE J., KRUSIUS T., RAUVALA H., Carb. Research.,
		80 (1980) 336-339 (14)
12	-	FOURNET B., STRECKER G., LEROY Y., MONTREUIL J.,
		Anal. Biochem., <u>116</u> (1981) 489-502 (14)
13	-	GUERIN G., VREEMAN H.J., N GUYEN T.C., Eur. J.
		Biochem., <u>67</u> (1976) 433-445 (3)
14	-	JAYSSON M.O., Thèse Ingénieur (1980) Lille (7)
15	-	KAMERLING J.P., GERWIG G.J., VLIEGENTHART J.F.G.,
		CLAMPS J.R., Biochem. J., <u>151</u> (1975) 491-495 (13-14)
16	-	KERKAERT J.P., Anal. Biochem. J., <u>84</u> (1978) 354-360 (6)
17	-	KOL O., Thèse 3ème cycle (1983) Lille 40 (7)

18	-	KRUSIUS T., FINNE J., RAUVALA H., FEBS-lett., 71
		(1976) 117-120 (10)
19	-	LEE Y.C., SCOCCA J.R., J. Biol. Chem., 247 (1972)
		(5733-5758) (10)
20		MAC-ILVAINE J.C., J. Biol. Chem., <u>49</u> (1921) 183-186 (7)
21	-	MANCINI G., CARBONARA A.O., HEREMANS J.F., Immuno-
		chemistry, <u>2</u> (1965) 235 (16)
22	-	MAZURIER J., SPIK G., Biochim. Biophys. Acta, 629
		(1980) 399-408 (5)
23	80	MONTREUIL J., SPIK G., Microdosage des glucides
		monographie n° 1, (1963) Lille (12)
24		NIAZI S., STRATE D., Cancer Research, 8 (1948) 653 (12)
25	-	PALO J., SAVOLAINEN H., J. chromatog., 65 (1972)
		447-450 (18)
26		PAZPARENTE J., CARDON P., LEROY Y., MONTREUIL J.,
		FOURNET B., RICARD G., Carb. Research, 141, (1985)
		41-47 (15)
27		ROOP W.E., PUTMAN F.W.J.Biol. Chem., 242 (1967)
		2507-2513 (3)
28	80	SCHEIDEGGER J.J., Intern. Arch. Allergy. Appl.
		Immunol., <u>7</u> (1965) 103 (6)
29		SCHAUER R., Methods in Enzymology. 50 C (1978) 64-89(14)
30	-	SPACKMAN P.H., STEIN W.H., MOORE S., Anal. Chem.,
		30 (1958) 490 (11)
31	-	SPIK G., FOURNET B., BAYARD B., VANDERSYPPE R.
		STRECKER G., BOUQUELET S., CHARET P., MONTREUIL J.,
		Arch. Intern. Physiol. Biochim., <u>82</u> (1974) 791 (6)
32	-	SPIK G., MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 51
		(1969) 1271-1285 (6)
33	-	STRATIL A., GLASNAK V., Anim. Blood Grps Biochem.
		Genet., <u>12</u> (1981) 113-122 (4)
34	-	STRATIL A. GLASNAK V., TOMASEK K., WILLIAMS J.,
		CLAMPS J.R., Anim. Blood Grps Biochem. Genet., 15
		(1984) 285-297 (5)

-228-

35	-	STRATIL A., SPOONER R.L., Biochem. Genet., <u>5</u>
		(1971) 347-365 (4)
36	-	STRECKER G., MONTREUIL J., Biochimie, <u>61</u> (1979)
		1199-1246 (8)
37	-	TILLMANS J., PHILIPPI K., Biochem. J., <u>215</u> (1929) 36 (12
38	-	TSAI P.K., FREUER T., BALLOU C.E., J. Biol. Chem., <u>256</u> (1984) 3805-3811 (9)
39	-	TURCO S.J., Anal. Biochem., <u>118</u> (1981) 278 (11)
40	-	VERNER I., ODIN L., Acta Soc. Med. Upsaliensis,
		57 (1952) 230 (12)
41	-	VLIEGENTHART J.F.G., DORLAND L., VAN HALBEEK H.,
		Adv. Carb. Chem. Biochem., <u>41</u> (1983) 209 (16)
42	-	VLIEGENTHART J.F.G., VAN HALBEEK H., DORLAND L.,
		Pure Appl. Chem., <u>53</u> (1981) 45 (16)
43		WILLIAMS J., Biochem. J., <u>83</u> (1962) 355-368 (3)
44		ZANETTA J.C., BRECKENRIDGE W.C., VINCENDON G.,

J. Chromatog., <u>69</u> (1972) 291-304 (12)



RESUME

Les tranfermines constituent une famille homogène de glycoprotéines qui comprend 1-5 <u>séro-</u> <u>transfermines</u> (STF), présentes ians le sang de tous les vertébrés, les <u>lutationsfermines</u> (LF), ciraccèrisées cans le lait de la plupart des Mammiféres, et les <u>ovotransfermines</u> (DTF). isplæs du plant élocuf d'Oiseaux. La chaîne polypaptidique de ces trois groupes de trans-Permines se répontit en 2 domaines semblables, dont chacum propéed un site de fixation du fer et qui presentent 40 à 45 % d'homologies. Par contre, le nombre et la structure des glycannes de canactérisent par une très grande variabilité qui est fonction de l'aspece animale, de l'origine tissulaire de la transfermine et des conditions physiologiques de l'organisme. L'étude comparative de la transfermine des glycannes réalisée sur les 6 STP/Homme, Poule, Chevel, Bomf, Mouton, Rac), sur les 2 CTP (Poule, Linde) et sur les 3 LH (laius de Femme, de Chevre et de Vache) nous a conduit aux appendants suivantes :

1- Les sérotransferrines contiennent uniquement des glycannes de type N-acétyliactosaminique renformant peu ou pas de fucese et dépourvus de résidué de N-acétyle accombine intercalaire. Dans toutes les espèces animales étudiées, les glycannes sont biantemnés. Néannoins, à côté de cotte structure classique, existent dus cuructures qui semblent spécifiques de l'espèce animale, ainsi, chez l'Homme, on trouve 15 à 20 % de glycannes de type triantenné, chez le Rat, 25 à 30 % de glycannes biantennés renferment un gème résidu d'acide N-acétylneuravisigne et chez la Cheval, 20 à 25 % de glycanner de type biantenné : endermant un résidu c'acide N-acétyl 4-0-acétylneuraminique.

2- Les protransfervines de Foule et de Dinde ne sont pas sielyféer. Illes reaferment des plycames de type blantenné possédant un résidu de N-épôtriquecisamine intercalaire. L'OTF de Poule n'est pas galactosylée, terdis que celle de Dimis reaferme 1 du 2 résidus de N-acérvilacrosamine:

9. Les glycannes des <u>lactofransferrines</u> sont les plus métérogènes. Ainsi, ceux de la LTP humaine sont de type N-acétyflactosaminique bianterni,fucosylé. 15 à 25 % des glycannes des 15% de Vache et de Chèvre sont de type N-acétyflactosaminique parfois complexes (résidu de galactose supplementaire et résidu de N-acétyfgalactosamine remplaçant le galactose), Les autres glycanne- sont de type oligemennosidécue possèdent de 4 à 9 révidus de mémose. Au nours de la factantion, la proportion de cas cligonannosides est fortement diminuée impliquent un contrôle hormonal de 12 bénaymentèse des glycoprotéines.

En conclusion, les glycannes présentent des structures primaties qui sont spécifiques de chaque transferrine, ils apparaissent donc bles comme des manoueurs de l'evolution.

