

50376
1989
263

N° d'ordre : 353

50376
1989
263

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

par

Béatrice DELPOUVE-ROUZE



CONTRIBUTION A L'ETUDE DES GALACTOSYLTRANSFERASES - DU LAIT DE FEMME - DES CELLULES DE REIN DE HAMSTER

Présentée le 6 Mai 1989 devant la Commission d'Examen

Président :
Rapporteur :
Rapporteur :
Examineur :

J. MONTREUIL
P. ROUSSEL
A. VERBERT
R. CACAN

à Marc
et à ma famille

"On prouve tout ce qu'on veut
et la vraie difficulté est de savoir
ce qu'on veut prouver"

ALAIN

Je tiens à remercier tout particulièrement :

- Monsieur J. MONTREUIL, Professeur, Directeur du laboratoire des "Relations Structure-Fonction des Constituants Membranaires" de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois (USTL), Unité Mixte de Recherche du CNRS N° 111, qui m'a accueillie dans son laboratoire et réalisé mon intégration au sein de son équipe de recherche. Il m'a toujours encouragée et conseillée avec beaucoup de rigueur,

- Monsieur A. VERBERT, Professeur à l'USTL Flandres-Artois, qui a toujours accepté de discuter de mes travaux et de me conseiller à chaque étape déterminante. Je le remercie sincèrement pour sa disponibilité,

- Monsieur P. ROUSSEL, Professeur, Directeur du laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Calmette de l'Université de Lille II et Monsieur R. CACAN, Maître de Conférences à l'USTL Flandres-Artois, qui ont accepté de participer à mon jury en raison de l'intérêt que leur suscitent les galactosyltransférases.

Mes remerciements vont également à :

- Monsieur Y. PLANCKE, Chargé de Recherche au CNRS, qui n'a jamais compté son temps pour me former aux techniques biochimiques, me conseiller tout le long de mon travail et me faire part de sa culture scientifique. Je le remercie très vivement pour toute son énergie mis à la disposition de notre équipe, dans un contexte à la fois studieux et amical,

- L'ensemble du personnel du laboratoire dont ses membres m'ont fait profiter de leur compétence ainsi que la Cellule Recherche de l'Université qui m'a apporté son soutien,

- Madame J. DEKEYSER qui a assuré la dactylographie de ce mémoire avec une très grande compétence et un sens aigu pour les initiatives constructives, et Madame J. CELEN pour le tirage des photographies.

RESUME

L'activité galactosyltransférase du lait de Femme est stable à la protéolyse et s'élué globalement en un seul pic par tamisage moléculaire sur Ultrogel AcA54. Les fractions enzymatiques, après électrophorèse sur gel de polyacrylamide, correspondent à des polypeptides de 45-55 kDa de masse moléculaire (taille communément annoncée par les auteurs) et 14 kDa. L'électrotransfert de ces peptides sur feuille de nitrocellulose, méthode originale, révèle l'activité galactosyltransférase avec le N-acétylglucosamine comme accepteur.

Toutefois, nous avons isolé à l'état pur une galactosyltransférase de 83 kDa qui s'adsorbe sur la colonne de chromatographie. Cette fraction peut transférer du galactose sur la N-acétylglucosamine libre ou en position terminale non réductrice d'un glycanne. Elle ne possède pas d'activité lactose synthétase.

Enfin, en modifiant la force ionique du tampon de chromatographie, nous avons obtenu des polypeptides de 110 à 45 kDa portant tous une activité galactosyltransférase après électrotransfert.

Ainsi, nous posons en hypothèse que la galactosyltransférase se trouve dans le lait de Femme après avoir subi une protéolyse endogène qui se traduit par la co-existence de peptides de différente taille moléculaire (110 à 14 kDa). Enfin, pour la première fois, nous avons démontré que la galactosyltransférase de 14 kDa pouvait conserver une activité. Ce peptide contient donc à la fois le site actif et le site de fixation de l'a-lactalbumine. La question se pose de savoir si le fragment représente un protomère de l'enzyme ou s'il en est un produit de dégradation. Quoi qu'il en soit, le séquençage du composé s'impose ainsi que sa cristallisation en vue de définir la structure encore inconnue du site actif d'une glycosyltransférase.

Pour comprendre le comportement des galactosyltransférases en corrélant taille moléculaire-site d'action- spécificité de substrat comparativement aux enzymes des liquides biologiques, nous les avons étudiées dans les cellules de rein de Hamster. Nous avons déterminé trois types d'activité et nos travaux préliminaires ont permis de mettre en évidence, en particulier, une nouvelle activité galactosyltransférase sur le N-acétyllactosamine et sur des glycopeptides désialylés d'orosomucoïde comme accepteurs. Il s'agit très probablement de la galactose-a-1-3-N-Acétyl-lactosyltransférase dépendante de l'UDP-Gal, des ions Mn^{2+} , de la concentration en protéine et en accepteurs et activée par le Triton X100. Ses constantes d'affinité sont de 1,38 mM pour la N-acétyllactosamine et 0,97 mM (équivalent galactose) pour les glycopeptides désialylés d'orosomucoïde. L'analyse des produits de réaction enzymatique par spectrométrie de masse ou par RMN s'impose.

MOTS-CLES : Galactosyltransférases - Site actif - Electrotransfert

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	p. 1
GÉNÉRALITÉS	p. 4
CHAPITRE I : Les glycoconjugués	
I - Les glycoprotéines	p. 6
A - Structure primaire	p. 6
1 - Les O-glycoprotéines	p. 6
<i>a - Liaison à la sérine ou à la thréonine</i>	p. 7
<i>b - Liaison à l'hydroxylysine ou hydroxyproline</i>	p. 10
2 - Les N-glycosylprotéines	p. 10
<i>a - Le type oligomannosidique</i>	p. 12
<i>b - Le type N-acétyllactosaminique</i>	p. 12
<i>c - Le type hybride</i>	p. 12
3 - Conclusion	p. 18
B - Rôle des glycoprotéines	p. 19
1 - Rôle des glycannes dans la conformation des glycoprotéines	p. 20
2 - Effets protecteurs des glycannes envers la protéolyse	p. 20
3 - Les glycannes en tant que signaux de reconnaissance	p. 21
C - Biosynthèse des glycoprotéines	p. 24
1 - Biosynthèse des glycannes de type N-glycosidique	p. 25
2 - Biosynthèse des glycannes de type O-glycosidique	p. 29
II - Les glycolipides	p. 32
A - Structure primaire	p. 32
B - Biosynthèse	p. 34
1 - Biosynthèse des gangliosides	p. 35
2 - Biosynthèse des séries lacto- et globodes glycosphingolipides	p. 37
III - Glycosyltransférases communes aux glycosphingolipides et aux glycoprotéines	p. 39
CHAPITRE II : Les galactosyltransférases	
I - Mode d'action des galactosyltransférases	p. 44
A - Les glycosylnucléotides	p. 44
B - Les effecteurs	p. 45

1 - Les cations	p. 45
2 - Le pH	p. 46
3 - Autres paramètres	p. 47
<i>a - Stabilité</i>	p. 47
<i>b - Influence du Triton X100</i>	p. 48
<i>c - Influence des lipides</i>	p. 48
C - Le glucide accepteur	p. 49
1 - Mode d'action	p. 49
2 - Spécificité de branchement	p. 50
<i>a - Galactosylation sur la branche</i> <i>Man α-1,6 - Man</i>	p. 50
<i>b - Galactosylation sur la branche</i> <i>Man α-1,3 - Man</i>	p. 51
<i>c - Influence de l'environnement</i> <i>glucidique</i>	p. 51
D - Caractéristiques des galactosyltransférases	p. 53
1 - Localisation	p. 53
2 - Comparaison des formes solubles membranaires	p. 54
3 - Composition glucidique et amino-acide des galactosyltransférases	p. 55
4 - Site actif-interaction avec l' α -lactalbumine	p. 58
<i>a - Contrôle de l'activité enzymatique</i>	p. 58
<i>b - Le site de fixation</i>	p. 58
<i>c - Relation α-lactalbumine-accepteur</i>	p. 59
II - Purification des galactosyltransférases	p. 61
A - Modes de purification	p. 61
B - Les galactosyltransférases du lait	p. 67
1 - Hétérogénéité des masses moléculaires	p. 67
2 - Protéolyse de la transférase	p. 68
3 - Variété des résultats	p. 68
4 - Origine multigénique	p. 70
C - Les galactosyltransférases dans le sérum	p. 70
D - Relations entre les transférases solubles et intégrées	p. 72
E - Les autres galactosyltransférases	p. 72
1 - Autres formes de transférases	p. 72
2 - Une seconde N-acétylglucosamine (β 1-4) galactosyltransférase	p. 73
3 - La N-acétylgalactosamine (β 1-3) galactosyltransférase	p. 74
<i>a - La purification</i>	p. 74
<i>b - La spécificité d'action enzymatique</i>	p. 75
<i>c - Caractéristiques protéiques</i>	p. 75
III - Conclusion	p. 76
MATÉRIEL ET MÉTHODES	p. 79

I - Matériel	p. 79
A - Les glycosynucléotides	p. 79
B - Source enzymatique	p. 79
C - Matériel de chromatographies	p. 79
1 - Ultrogel Ac A 54	p. 79
2 - Supérose 12	p. 80
3 - Supports d'affinité	p. 80
a) <i>UDP-Agarose</i>	p. 80
b) <i>GlcNAc-Agarose</i>	p. 80
D - Les accepteurs	p. 80
II - Méthodes	p. 81
A - Préparation de glycopeptides désialylés	p. 81
1 - Désialylation du glycopeptide de l'orosomucoïde	p. 81
2 - Désialylation de la mucine sous-maxillaire de Mouton	p. 81
B - Mesure de l'activité galactosyltransférase	p. 81
1 - Milieu d'incubation	p. 81
2 - Identification des produits radioactifs en chromatographie sur papier	p. 83
3 - Chromatographie en couche mince	p. 85
C - Préparation de la galactosyltransférase	p. 85
1 - Préparation des extraits cellulaires des BHK	p. 85
a) <i>Cultures des cellules</i>	p. 85
b) <i>Extraction des enzymes solubilisées</i>	p. 86
2 - Précipitation au sulfate d'ammonium du lait humain	p. 86
3 - Purification de la galactosyltransférase du lait	p. 88
a) <i>Sur Ultrogel Ac A 54</i>	p. 88
b) <i>En FPLC sur Supérose 12</i>	p. 88
c) <i>Colonne d'affinité</i>	p. 89
α - <i>UDP-Agarose</i>	p. 89
β - <i>GlcNAc-Agarose</i>	p. 89
D - Analyse des protéines purifiées	p. 90
1 - En gel de polyacrylamide en présence de SDS (PAGE-SDS)	p. 90
a) <i>Les gels</i>	p. 90
b) <i>Coloration des gels</i>	p. 91
α - <i>au bleu de Coomassie</i>	p. 91
β - <i>au nitrate d'argent</i>	p. 91
c) <i>Solutions étalons</i>	p. 92
2 - Électrotransfert sur feuille de nitrocellulose	p. 92
a) <i>Technique</i>	p. 92
b) <i>Analyse des protéines</i>	p. 93
3 - Analyse immunologique	p. 93
a) <i>Préparation de l'immun-sérum anti-précipité P'2 du lait humain</i>	p. 93

b) <i>Immunoélectrophorèse monodimensionnelle</i>	p. 95
c) <i>Technique des Rockets</i>	p. 95
d) <i>Immunoélectrophorèse bidimensionnelle</i>	p. 95
- 1ère dimension	p. 95
- 2ème dimension	p. 96
4 - Dosage des protéines	p. 96
a) 1ère méthode selon Peterson	p. 96
b) 2ème méthode selon Wessel et Flüge	p. 97

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE I : Caractérisation de l'activité galactosyltransférase du lait humain	p. 98
I - Mise en évidence de l'activité galactosyltransférase	p. 98
A - Dans le lait humain	p. 98
B - Dans la fraction P'2	p. 100
1 - Activité galactosyltransférase	p. 100
2 - Analyse immunologique de la fraction P'2	p. 100
II - Étude de l'activité galactosyltransférase	p. 102
A - Choix du tampon de solubilisation	p. 102
B - Influence d'autres paramètres	p. 105
1 - Concentration en protéines	p. 105
2 - Concentration en accepteurs	p. 105
3 - Stabilité de la galactosyltransférase	p. 105
a) à 4°C	p. 105
b) à 37°C	p. 105
C - Compétition d'accepteurs	p. 108
Conclusion	p. 109
CHAPITRE II : Purification de la galactosyltransférase dans le lait humain	p. 112
I - Tamisage moléculaire sur Ultrogel Ac A 54	p. 112
A - Mise au point de la technique	p. 112
B - Analyse des fractions	p. 114
1 - Activité galactosyltransférase	p. 114
2 - Analyse des protéines en électrophorèse sur gel de polyacrylamide	p. 114
C - Conclusion	p. 115
II - Purification de la fraction P'2 par chromatographie d'affinité	p. 117
A - Chromatographie sur UDP-Agarose	p. 118
1 - Analyse de l'activité	p. 118
2 - Étude des protéines	p. 120
B - Chromatographie sur GlcNAc-Agarose	p. 120
C - Conclusion	p. 122
1 - Existence de deux activités distinctes ou non?	p. 122
2 - Masse moléculaire de la galactosyltransférase	p. 124
3 - Utilisation du NaCl 1M dans les tampons d'éluion	p. 125

III - Isolement de la galactosyltransférase à l'état pur	p. 126
A - Mise au point de la technique	p. 126
B - Caractérisation de l'activité du pic 3	p. 126
C - Caractérisation des protéines	p. 128
1 - Par électrophorèse sur gel de polyacrylamide	p. 128
2 - Par immunoelectrophorèse	p. 130
IV - Mise en évidence des différentes tailles moléculaires de la galactosyltransférase	p. 130
A - Technique utilisée	p. 130
B - Analyse de l'activité enzymatique	p. 133
C - Analyse des protéines	p. 133
1 - Par immunoelectrophorèse	p. 133
2 - Par électrophorèse sur gel de polyacrylamide	p. 133
Discussion	p. 135
CHAPITRE III : Relation protéine/Activité galactosyltransférasique et mise en évidence d'une protéolyse endogène dans le lait humain	p. 138
I - A solid phase assay for galactosyltransférases	p. 148
II - Mise en évidence d'une protéolyse endogène dans le lait	p. 148
A - Recyclage de certaines fractions sur Ultrogel AcA54	p. 148
1 - 1er passage sur Ultrogel AcA54	p. 148
2 - Recyclage des fractions actives	p. 148
B - Fractionnement en FPLC de tamisage moléculaire de la fraction P'2 préincubée à 37°C	p. 150
C - Conclusion	p. 152
III - Conclusion	p. 152
CHAPITRE IV : Activités galactosyltransférasiques des cellules de rein de Hamster : mise en évidence d'une nouvelle activité enzymatique	p. 153
Introduction	p. 153
I - Activités galactosyltransférasiques présentes dans les cellules de rein de Hamster	p. 156
A - Substrats accepteurs	p. 156
B - Détermination du nombre de sites d'action enzymatique	p. 156
II - Caractérisation de l'activité Gal-LacNAc-R-galactosyltransférasique	p. 160
A - Exigences de l'activité enzymatique	p. 160
B - Identification des produits de la réaction	p. 160
C - Variation de la concentration en accepteur	p. 163
D - Caractérisation du type de liaison formée	p. 163

III - Perspectives : Relations entre spécificité d'action et masse moléculaire de l'enzyme	p. 165
IV - Conclusion	p. 167
CONCLUSION GÉNÉRALE	p. 169
BIBLIOGRAPHIE	p. 173

ABRÉVIATIONS

ABRÉVIATIONS

A.S. :	Activité spécifique
AsAgGP :	Asialo - Agalacto - α -1 - glycoprotéine acide
As-OSM :	Mucine sous-maxillaire d'ovin désialylée
Asn :	Asparagine
BHK :	Reins de bébés Hamster
C.A :	Chromatographie d'affinité
Cer :	Céramide
CPM :	Coup par minute
Dol :	Dolichol
EDTA :	Acide éthylène diamine tétra - acétique (sel disodique)
kDa :	Kilo Dalton
F-T :	Fucosyltransférase
Fig. :	Figure
Fuc :	Fucose
Gal :	Galactose
GalNAc :	N-acétylgalactosamine
GalTf :	Galactosyltransférase
GDP :	Guanine diphosphate
Glc :	Glucose
GlcNAc :	N-acétylglucosamine
GnT :	N-acétylglucosamine transférase
LacNAc :	N-acétyllactosamine
M :	Mole
mM :	Millimole
Man :	Mannose
min :	Minute
NeuAc :	Acide neuraminique
P ^r :	Phosphate
PAGE :	Electrophorèse en gel de polyacrylamide
PBS :	Tampon phosphate de sodium 0,01 M ; 0,015 M NaCl pH 7,4
SDS :	Sodium docécyll sulfate
SDS-PAGE :	Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyll sulfate
Ser :	Sérine
Thr :	Thréonine
UDP :	Uridine diphosphate
UMP :	Uridine monophosphate
Unité :	1 unité enzymatique : 1 mole de galactose incorporée x $\text{min}^{-1} \times (\text{mg de protéine})^{-1}$
Xyl :	Xylose

INTRODUCTION

Les glucides sont largement répartis chez tous les organismes vivants soit sous la forme libre, soit sous la forme conjuguée par des liaisons covalentes à des protéines (glycoprotéines) ou à des lipides (glycolipides).

Les glycolipides et glycoprotéines sont intégrés dans les systèmes membranaires de la cellule (membranes plasmiques, réticulum endoplasmique et membranes des organites intracellulaires).

En outre, des glycoprotéines existent en solution dans les liquides biologiques et dans les sécrétions muqueuses.

Les fractions glucidiques ou glycannes des glycoprotéines et des glycolipides jouent des rôles biologiques importants.

Dans le cas particulier des glycoprotéines, on sait que la glycosylation représente l'un des événements post-traductionnels les plus importants en raison d'une part, de l'universalité du phénomène et, d'autre part, du rôle capital que jouent les glycannes :

- dans le «folding» et le maintien des protéines dans une conformation biologiquement active,
- dans la protection des chaînes peptidiques contre l'attaque des enzymes protéolytiques,
- dans le masquage des épitopes peptidiques,
- dans le contrôle de la durée de vie des glycoprotéines et des cellules circulantes,
- dans la reconnaissance par les cellules de médiateurs chimiques les plus variés, de toxines, de virus et de bactéries,
- dans la reconnaissance et l'association des cellules par le jeu de lectines endogènes,
- dans l'inhibition de contact.

En outre, de nombreux glycannes sont des épitopes et la découverte récente que l'épitope bilharzien est de nature glycanique parachève la démonstration de l'importance capitale de la glycosylation des protéines.

Enfin, la démonstration a été apportée que la structure des glycannes des glycoprotéines membranaires des cellules cancéreuses était profondément modifiée et que les «néostructures» apparues intervenaient certainement dans le mécanisme même de la métastase.

C'est pourquoi, dans la dernière décennie, les recherches se sont orientées vers les mécanismes de la biosynthèse des glycannes et de sa régulation dans le but de déterminer l'origine du trouble métabolique qui expliquerait la formation de ces «monstres moléculaires» membranaires.

Cette connaissance passe par l'isolement et la détermination des propriétés des glycosyltransférases dont on ignore encore les caractéristiques essentielles et la nature des systèmes de régulation dont elles dépendent.

Le but de notre travail était donc de tenter d'isoler l'une des glycosyltransférases dont on sait, dès à présent, qu'elles sont impliquées dans les modifications que connaissent les glycannes des glycoprotéines des membranes de cellules cancéreuses : sialyl - fucosyl ou galactosyltransférase.

Notre choix s'est porté sur la galactosyltransférase qui transfère le galactose apporté par l'Uridine Diphosphate - Galactose sur des oligosaccharides accepteurs libres ou conjugués.

A partir du lait humain, d'une part, nous avons tenté de contribuer à la compréhension des régulations de la galactosyltransférase présente grâce aux observations que nous avons faites au cours de sa purification.

Nous avons étudié, d'autre part, les galactosyltransférases présentes dans les cellules normales de reins de Hamsters (B.H.K.). Intégrées aux membranes, les galactosyltransférases présentes ont probablement des comportements différents de ceux des galactosyltransférases solubles. Cette dernière étude est sommaire mais elle a néanmoins conduit à la mise en évidence d'une nouvelle galactosyltransférase et peut aussi servir de base à une étude comparative avec les galactosyltransférases des cellules B.H.K. transformées, c'est à dire à caractère tumorigène.

Avant de présenter nos résultats, nous rappellerons, dans un premier temps, l'état actuel de nos connaissances sur la structure primaire et sur la biosynthèse des glycoconjugués afin de mettre en évidence la microhétérogénéité des structures primaires des glycannes. Dans un deuxième temps, nous développerons plus particulièrement les recherches réalisées sur les galactosyltransférases afin de souligner la complexité de la régulation de ces enzymes.

GÉNÉRALITÉS

Les glycoprotéines forment avec les glycolipides la classe des glycoconjugués, composés résultant de l'association covalente d'une copule glucidique, le glycane, avec une protéine ou un lipide.

On trouve les glycoprotéines chez les Procaryotes et chez les Eucaryotes des règnes végétal et animal, ainsi que chez les Virus. La glycosylation des protéines et des lipides est donc un phénomène universel et la question majeure qui se pose à leur égard concerne leur rôle biologique.

Les récentes découvertes dans ce domaine révèlent l'importance de la structure des glycannes dont une modification peut aboutir à un bouleversement de la vie cellulaire.

C'est pourquoi, depuis ces deux dernières décennies, les scientifiques recherchent à la fois de nouvelles structures de glycannes et étudient les systèmes de régulation intervenant dans la biosynthèse de glycoconjugués.

La première structure d'un trisaccharide lié O-glycosidiquement à la protéine (voir p. 6) a été déterminée en 1950 à partir de mucines (Gottschalk et Graham - 69 -). Il a fallu attendre les années 1970 pour que les premières structures complètes d'oligosaccharides liés N-glycosidiquement à la protéine (voir p. 10) soient publiées. On dénombre actuellement plusieurs centaines de structures différentes, dérivant d'un pentasaccharide commun invariant substitué par diverses structures glycosidiques porteuses de l'activité biologique (Montreuil - 121 -).

La découverte d'un mécanisme biosynthétique commun d'élaboration de ces glycannes se complique au fur et à mesure de l'évolution des êtres vivants, les fonctions biologiques attribuables à ces glycannes sont autant de preuves de la nécessité biologique de cette grande hétérogénéité.

Nous essaierons, dans le chapitre I, d'en dégager les aspects principaux.

Les glycosyltransférases, responsables de la glycosylation des protéines et des lipides sont à la base de la diversité des structures rencontrées. Il apparaît fondamental de comprendre leur mécanisme d'action et leur régulation afin d'expliquer les modifications fines des structures glycaniques des glycoprotéines s'accompagnant généralement de l'apparition de nouvelles propriétés biologiques.

Marqueurs de la cancérisation, les galactosyltransférases sont responsables de la conjugaison du galactose en position terminale non réductrice sur la chaîne glycanique. Nous essaierons, dans un second chapitre, de développer le rôle de ces galactosyltransférases et de faire le point sur la connaissance actuelle concernant leur mécanisme d'action à travers les difficultés de purification que présentent ces enzymes.

CHAPITRE I

LES GLYCOCONJUGUES

CHAPITRE I : LES GLYCOCONJUGUÉS

I - LES GLYCOPROTÉINES

A - STRUCTURE PRIMAIRE

Dans les dix dernières années, les structures glucidiques de nombreuses glycoprotéines ont été élucidées grâce au développement des techniques d'analyse structurale.

La première étape de cette analyse est l'obtention de glycopeptides par dégradation protéolytique, par libération chimique ou enzymatique des oligosaccharides.

Les glucides liés aux protéines peuvent être divisés en deux classes, dépendantes de la nature de la liaison covalente avec la protéine :

- le type O-glycosidique pour lequel la N-acétylgalactosamine est liée au groupe hydroxyl de la sérine ou de la thréonine,
- le type N-glycosidique contenant un résidu de N-acétylglucosamine lié à l'azote du groupe aminé de l'asparagine.

Nous allons présenter brièvement les structures primaires de chaque classe, les revues de Spiro (- 182 -), Kornfeld et Kornfeld (- 92 - 93 -) et Montreuil (-121 -) peuvent apporter des informations complémentaires.

1 - Les O-glycosylprotéines

Les O-glycosylprotéines présentent une grande variété de types de conjugaison.

Plusieurs monosaccharides (galactose, N-acétylgalactosamine, mannose, xylose) et plusieurs amino-acides (sérine, thréonine, hydroxylysine, hydroxyproline) sont impliqués dans les points d'attache. On distingue deux grandes classes :

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

a - Liaison à la sérine ou à la thréonine.

En général c'est la N-acétylgalactosamine qui se lie à la sérine ou à la thréonine par une liaison α -1,3. Une caractéristique des glucides de type mucine est la présence d'un noyau disaccharidique Gal(β 1-3) GalNAc (Tableau I p.8). Toutefois, à ce jour, plus de 300 structures différentes peuvent être dénombrées. A titre d'exemple, dans la mucine sous-maxillaire de Porc, l'acide sialique, le fucose et la N-acétylgalactosamine sont attachés au noyau disaccharide pour former les déterminants du groupe sanguin H et A.

Dans quelques cas, ce noyau peut s'allonger par l'addition d'unités de répétition Gal (β 1-3) GalNAc ou Gal (β 1-4) GlcNAc (Oates *et al.*-133-). Une très grande chaîne glycanne a été trouvée dans les substances du groupe sanguin (Lloyd *et al.*-104-).

Du sulfate peut se trouver dans les glycannes liés 0-glycosidiquement des protéoglycannes de tissus de Mammifère (Hascall -75-), (Fig. 1 ; p. 9).

La liaison du glycanne à la sérine ou à la thréonine peut se faire exceptionnellement par le Man en α ou β -1,3 ou le Galactose en α -1,3 (Spiro et Bhoyroo -184-, Nakajima et Ballou -126-, ; Fig. 2 p. 9). Cela n'a été rencontré que chez des Invertébrés.

STRUCTURES	ORIGINE	REFERENCES
GalNac(α1-3)Ser(Thr)	Erythrocytes Tn-réactifs	DAHR <u>et al.</u> -35-
Gal(β1-3)GalNac(α1-3)Ser(Thr)	Erythrocytes T-réactifs	-id-
$\begin{array}{l} \text{NeuAc}(\alpha 2-6) \\ \text{Gal}(\beta 1-3) \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{GalNac}(\alpha 1-3)\text{Ser}(\text{Thr})$	Glycoprotéine de cerveau de Rat	FINNE - 49 -
$\begin{array}{l} \text{NeuAc}(\alpha 2-6) \\ \text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3) \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{GalNac}(\alpha 1-3)\text{Ser}(\text{Thr})$	Glycophorine Humaine (groupe M)	THOMAS <u>et WINZLER</u> -195-
$\begin{array}{l} \text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNac}(\beta 1-6) \\ \text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3) \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{GalNac}(\alpha 1-3)\text{Ser}(\text{Thr})$	Glycoprotéine plaquettaire Humaine	TSUJI <u>et al.</u> -199-
$\begin{array}{l} \text{NeuGlc}(\alpha 2-8)\text{NeuGlc}(\alpha 2-8)\text{NeuGlc}(\alpha 2-6) \\ \text{Gal}(\beta 1-4) \\ \text{Fuc}(\alpha 1-3) \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{GalNac}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Gal}(\beta 1-3) \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{GalNac}(\alpha 1-3)\text{Ser}(\text{Thr})$	Glycoprotéines d'oeufs de Truite	IWASAKI <u>et al.</u> -84-
$\begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-4) \\ \text{Fuc}(\alpha 1-3) \\ \text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNac}(\beta 1-3) \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{GlcNac}(\beta 1-6) \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNac}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GalNac}(\alpha 1-3)\text{Ser}(\text{Thr})$	Immunoglobuline A du lait de Femme	CRÉTEL <u>et al.</u> -33-
$\begin{array}{l} \text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNac}(\beta 1-3) \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{Gal}(\beta 1-4) \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{GalNac}(\alpha 1-3)\text{Ser}(\text{Thr})$	Glycoprotéine sous-linguale de Rat	SLOMIANY <u>et SLOMIANY</u> -176-

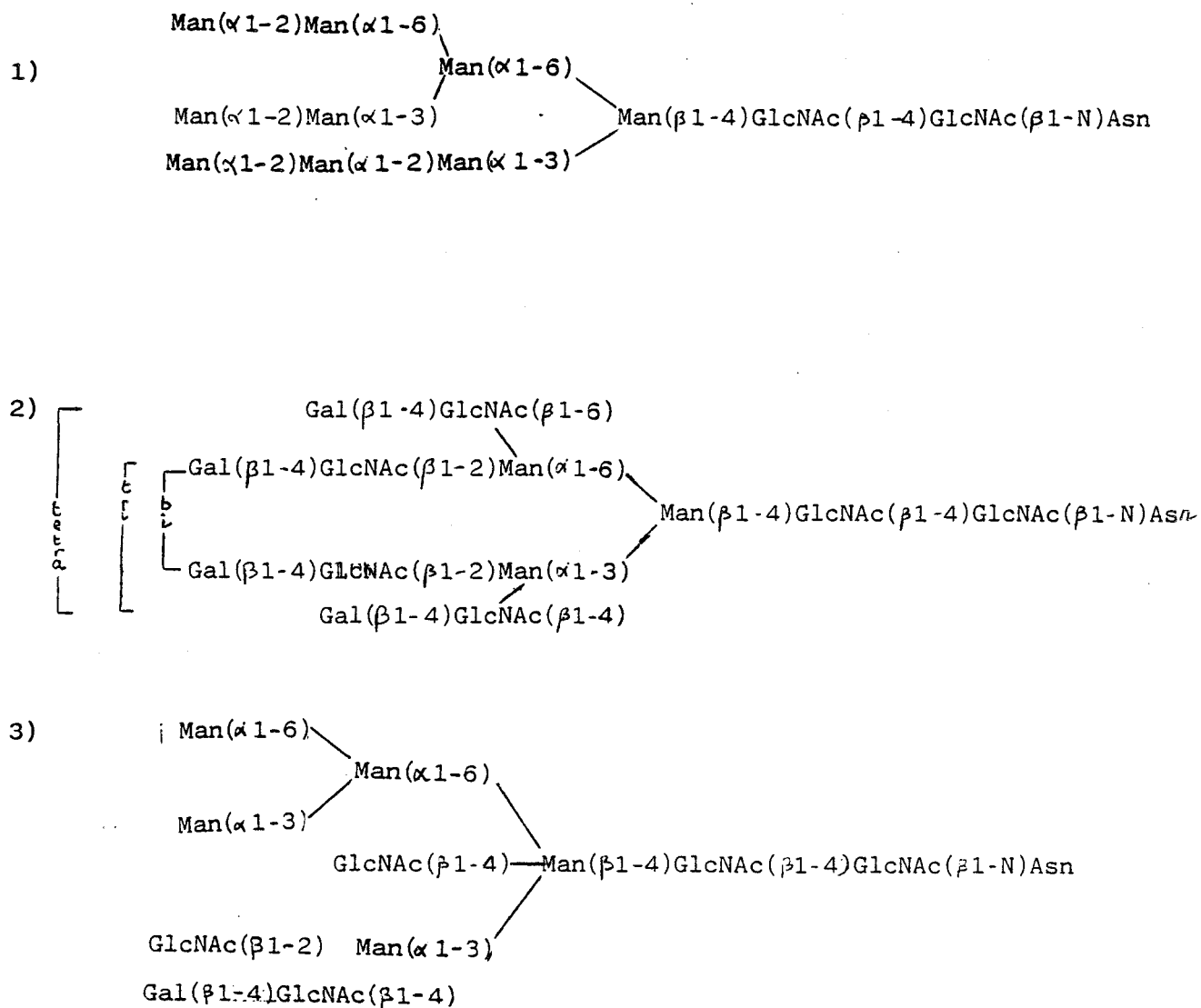


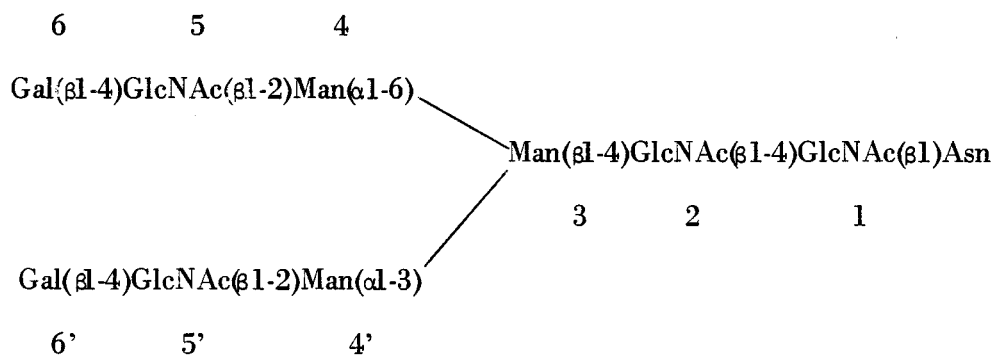
FIGURE 3: Les trois classes de glycanes de type N-glycosidique

- 1) Type oligomannosidique
- 2) Type N-Acétyllactosaminique
- 3) Type mixte ou "hybride"

a - Le type *Oligomannosidique* contenant seulement des résidus de mannose et de N-acétylglucosamine. Des exemples de structures sont présentés dans le Tableau II (p. 13).

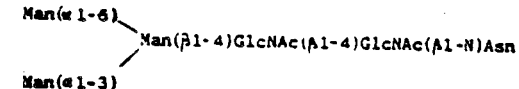
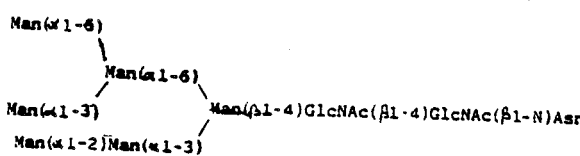
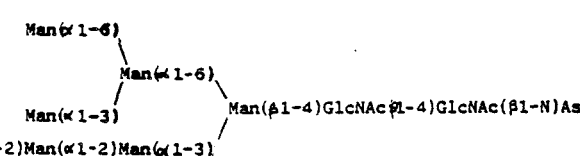
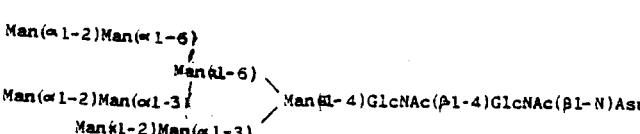
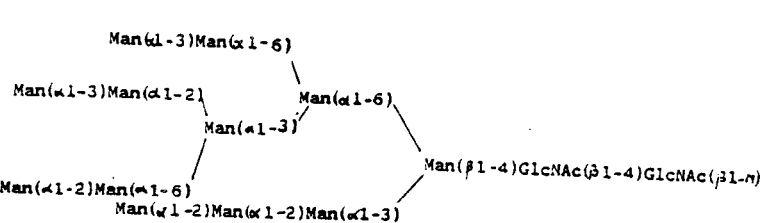
b - Le type *N-acétyllactosaminique* ou type «complexe» contenant un nombre variable de résidus de N-acétyllactosamine Gal (β 1-4) GlcNAc, d'acide sialique et/ou de fucose. La substitution des résidus N-acétyllactosaminyl s'effectue en position 2, 4 et 6 des mannoses externes 4 et 4' pour donner des structures bi, tri, tétraantennées, sialylées, fucosylées ou non.

La structure de base des glycanes biantennés de type N-acétyllactosaminique est la suivante :



La structure de quelques glycoprotéines de type N-acétyllactosaminique est donnée dans le Tableau III (p.14 et 15).

c - Le type *hybride* possédant à la fois la structure oligomannosidique et N-acétyllactosaminique (Tableau IV p. 16).

STRUCTURES	ORIGINE	REFERENCES
 <p>Man(α 1-6) Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc(β 1-N)Asn Man(α 1-3)</p>	Ovomucoïde de Poule	Yamashita <u>et al</u> -211-
 <p>Man(α 1-6) Man(α 1-6) Man(α 1-3) Man(α 1-2)Man(α 1-3) Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc(β 1-N)Asn</p>	Ovalbumine de Poule	Conchie et Strachan -32-
 <p>Man(α 1-6) Man(α 1-6) Man(α 1-3) Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-3) Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc(β 1-N)Asn</p>	Lactotransferrine de Vache	Van Halbeek <u>et al</u> -204-
 <p>Man(α 1-2)Man(α 1-6) Man(α 1-6) Man(α 1-2)Man(α 1-3) Man(α 1-2)Man(α 1-3) Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc(β 1-N)Asn</p>	Immunoglobuline M de macroglobulinémie de Waldenström	Chapman et Kornfeld -28-
 <p>Man(α 1-3)Man(α 1-6) Man(α 1-3)Man(α 1-2) Man(α 1-3) Man(α 1-2)Man(α 1-6) Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-3) Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)GlcNAc(β 1-N)Asn</p>	Carboxypeptidase de <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	Hashimoto <u>et al</u> -76-

STRUCTURE	ORIGINE	REFERENCES
<p>Biancennée</p> <p>Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-6) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-3) } Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn</p> <p>NeuAc(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-6) NeuAc(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-3) } Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn</p> <p>NeuAc(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-6) GlcNAc(β1-4) } Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn NeuAc(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-3) } (α1-6) Fuc</p> <p>Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-6) (α1-3) Fuc } Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn NeuAc(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-3) } (α1-6) Fuc</p>	<p>Immunoglobuline G du colostrum de Veau</p> <p>Serotransferrine Humaine</p> <p>Immunoglobuline G sérique Humaine</p> <p>Immunoglobuline de sécrétion du lait de Femme</p>	<p>CHERON <u>et al.</u> -31-</p> <p>SPIK <u>et al.</u> -179-</p> <p>BAEZINGER <u>et al.</u> - 6 -</p> <p>PIERCE-CRETEL <u>et al.</u> -147-</p>
<p>Triantennée</p> <p>NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-6) NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-4) } Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn NeuAc(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2) } Man(α1-3)</p> <p>NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2) } Man(α1-6) NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GlcNAc(β1-6) NeuAc(α2-6) } Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-3)</p>	<p>Fétuine de Veau</p> <p>Facteur IX bovin</p>	<p>NILSSON <u>et al.</u> -132-</p> <p>MIZUOCHI <u>et al.</u> -118-</p>

Les glycannes de type complexe peuvent être substitués par une grande variété de liaisons :

- le résidu N-acétylglucosamine lié à l'asparagine peut être substitué par un α -1,6-Fuc alors que le mannose β peut être substitué en position C-4 par un résidu β -1,4-GlcNAc qui a été appelé par Schachter «N-acétylglucosamine intercalaire» ou «bisectrice» (bisecting N-acetylglucosamine)

- la séquence terminale Gal(β 1-4)GlcNAc peut être substituée par de l'acide sialique ou du galactose

- la chaîne glucidique peut aussi s'allonger de la séquence répétée Gal (β 1-4)GlcNAc(β 1-3).

Cette séquence polylectosaminique peut aussi être fucosylée (α -1,2-Fuc sur le galactose, α -1,3-Fuc sur la N-acétylglucosamine) ou galactosylée α -1,3-Gal sur le galactose.

Enfin les résidus N-acétyllectosaminiques peuvent être remplacés par des structures de type «iso-N-acétyllectosaminique» (Gal β 1-6GlcNAc) (Miller -113) (Fig. 4 p. 16).

Un grand nombre de ces structures sont discutées dans la revue de Montreuil (-120-).

3 - Conclusion

Comme nous le décrivons dans le paragraphe c (p. 12), les chaînes glucidiques des glycoprotéines sont formées par l'action séquentielle des glycosyltransférases. La structure de la chaîne glycanique finale ainsi produite est déterminée par la spécificité de chaque glycosyltransférase pour un glycosylnucléotide particulier et pour un accepteur glycosylé spécifique, et par sa capacité de synthétiser un type particulier de liaison.

Ce mécanisme peut expliquer la microhétérogénéité de la chaîne glucidique, très souvent trouvée dans la partie glycanique des glycoprotéines.

Compte tenu de l'insuffisance de certains glycosylnucléotides, les changements d'activité relative des glycosyltransférases et d'autres paramètres, peuvent théoriquement induire un changement dans les structures majeures des chaînes glycaniques. Un tel mécanisme a été proposé pour expliquer la microhétérogénéité des glucides isolés de l'albumine d'oeuf (Huang *et al.* -81-) et de la ribonucléase pancréatique de Boeuf (Tarentino *et al.* -194-). Ces deux glycoprotéines possèdent une seule chaîne glucidique reliée à l'asparagine, mais semblent contenir un mélange de séries d'intermédiaires à côté de la chaîne complète.

Néanmoins, une signification fonctionnelle et/ou structurale peut être associée à une biosynthèse apparemment hasardeuse des unités oligosaccharidiques.

En effet, de récentes études des chaînes glucidiques de gonadotropine chorionique humaine (HCG) (Endo *et al.* -48- ; Mizuochi et Kobata -116- ; Swaminathan et Bahl -189-) et des facteurs de coagulation du sang (Mizuochi *et al.* -117-) prouvent de façon évidente que le phénomène apparent de microhétérogénéité doit être interprété avec précaution.

La répartition spécifique des différentes chaînes glucidiques liées à différentes asparagines de la molécule protéique, ne peut pas être expliquée par notre connaissance des mécanismes de biosynthèse de la liaison des glycannes à l'asparagine. Il serait intéressant de voir à quel niveau la régulation biochimique est maintenue.

B - ROLE DES GLYCOPROTÉINES

Les glycoprotéines sont largement répandues dans le monde vivant, au niveau cellulaire, dans le cytoplasme ou intégrées dans les membranes et les parois cellulaires, ainsi que dans les sécrétions et dans les liquides biologiques. De nombreuses protéines longtemps considérées comme des holoprotéines se révèlent être des glycoprotéines et la contribution des sucres aux différentes activités biologiques de ces composés (enzymes, hormones, récepteurs, transporteurs membranaires ...) demeure en grande partie inconnue.

Des expérimentations réalisées dans les dernières décades, il apparaît que le rôle des glycannes est très diversifié et que ces derniers interviennent dans les mécanismes suivants :

1 - Rôle des glycannes dans la conformation des glycoprotéines

La glycosylation des protéines introduit des modifications de leur masse moléculaire, de leur forme et de leurs propriétés physicochimiques. La chaîne glycannique influence la conformation des protéines (Gibson *et al.* -64-) et les propriétés physiques comme la solubilité (Callaghan *et al.* -27-) ou la sensibilité à de la dénaturation par la chaleur (Leavitt -98-).

2 - Effets protecteurs des glycannes envers la protéolyse

Au niveau cellulaire, de nombreuses protéines et glycoprotéines de haute ~~masse~~ moléculaire deviennent biologiquement actives après l'action de protéases spécifiques (voir la revue de Schwartz et Datema -168-). En l'absence de glycane, les protéases ne reconnaissent plus leurs sites spécifiques de coupure et produisent des peptides atypiques dépourvus d'activité biologique (Loh et Gainer -105-).

A l'opposé, il est maintenant bien démontré que les glycannes des glycoprotéines jouent un rôle dans la protection contre les dégradations protéolytiques (Lijnen *et al.* -102- ; Olden *et al.* -134- ; Nazir ud Din -129-).

Le mécanisme n'est pas bien connu, mais il peut s'agir simplement d'un masquage de la protéine par les glycannes.

3 - Les glycannes en tant que signaux de reconnaissance

En tant que déterminants antigéniques

Un très grand nombre de réactions immunologiques font intervenir des hétérosaccharides de surface et la partie glycannique semble jouer le rôle de déterminant antigénique et porter la spécificité antigénique.

Les déterminants des érythrocytes qui constituent le système du groupe sanguin humain, sont portés par des glycoprotéines ou des glycosphingolipides. Les glycolipides de l'hématie supportent les activités de groupe sanguin A, B, O. Les glycoprotéines de la membrane du globule rouge portent les déterminants M et N qui constituent le second système du groupe sanguin. Les chaînes glycanniques sont de type O-glycosidique (activités du groupe sanguin M et N) ou N-glycosidique (activités du groupe sanguin I et i) (Winzler -208- ; Lisowska -103- ; Ebert *et al.*-44-).

Les glycannes jouent un rôle de reconnaissance dans de très nombreux cas. Pour résumer, nous attribuons, en dehors du rôle en tant que déterminant antigénique, les rôles suivants :

En tant que récepteurs de Virus et de Bactéries

En tant que récepteurs de molécules solubles

Reconnaissance intercellulaire et l'adhésion cellulaire

Dans certains cas, il s'agit d'une interaction entre les glycannes et les lectines (Rosen *et al.*-162- ; Ray *et al.*-159- ; Tonegawa -196-)

Dans le recyclage des glycoprotéines membranaires

Dans le transport et l'excrétion des glycoprotéines solubles

La glycosylation est nécessaire à l'excrétion de l'invertase et la phosphatase acide des levures (Onishi *et al.*-137-), des IgA, IgE et IgM des cellules de plasmocyte de Souris (Melchers -112- ; Hickman *et al.*-79-) et certaines glycoprotéines de cellules de BHK «Baby Hamster Kidney» (Hughes *et al.*-83-).

Cependant, pour un grand nombre de glycoprotéines, la présence de chaînes glucidiques n'est pas essentielle à l'excrétion ou à la sécrétion. C'est le cas par exemple du procollagène (Duksin *et al.*-43-), de la sérotransferrine (Struck *et al.*-186-) ou de la carboxy-peptidase de Levure (Hasilik *et al.*-77-).

C'est en ce qui concerne les hydrolases lysosomiales que le rôle des glycanes est le plus clair. Ces enzymes, synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique rugueux, de la même manière que les glycoprotéines de sécrétion, vont être spécifiquement transférées dans les lysosomes. Le ciblage des enzymes lysosomiales vers les lysosomes met en jeu une série de modifications du glycanne conduisant à la formation de mannose-6-phosphate à l'extrémité non réductrice du glycanne (Kaplan *et al.*-88I-, Hasilik *et al.*-78-). La présence de ces résidus de mannose-6-phosphate est un signal de reconnaissance. Un déficit en N-acétylglucosamine-1-phosphotransférase entraîne la non-formation de ce signal et la non excrétion des enzymes.

Rôle dans l'endocytose

L'endocytose est réalisée par des récepteurs spécifiques. Le récepteur d'hépatocyte de Mammifères a été décrit par Aschwell et Morel (-5-) et a été purifié (Hudgin *et al.*-82-). Ce récepteur se lie spécifiquement au galactose.

Relation entre la métastase et la modification de la structure des glycannes

Les modifications profondes que connaissent les glycannes des glycoprotéines membranaires des cellules cancéreuses, ont été récemment définies. Elles concernent essentiellement les N-glycosylprotéines dont la proportion des glycannes de type N-acétyllactosaminique tri et tétraantennés augmente de façon très nette au détriment des structures biantennées (Debray *et al.*-38-). Ces transformations pourraient être en partie responsables des perturbations du «comportement social» que présente la cellule cancéreuse et, en particulier, de la diffusion métastatique (Debray -37- ; Smets *et al.*-177-).

Nous n'avons pas développé tous les rôles biologiques des glycannes des glycoprotéines tant ils sont nombreux. Nous pouvons néanmoins dégager deux aspects de leurs rôles.

Le premier est d'ordre physicochimique : les glycannes stabilisent la protéine, contribuent à la formation de sa structure tertiaire, la protègent de l'action de protéases non spécifiques et contrôlent, dans certains cas, la perméabilité des membranes.

Le second est beaucoup plus précis puisqu'il est fondé sur le concept de signal de reconnaissance porté par les glycannes. Il n'existe pas de fonction précise pour les glycannes en ce domaine, mais toute une série d'activités biologiques dépendantes de la structure glycanique et également de la nature de la protéine.

Néanmoins, deux questions majeures restent actuellement sans réponse :

1 - la microhétérogénéité structurale des glycannes, se traduisant par des différences allant jusqu'à des variations minimales affectant les monosaccharides situés à l'extrémité terminale non réductrice des glycannes, a-t-elle une signification biologique ?

2 - Qu'elle est l'origine et la signification de l'hétérogénéité des glycannes portés par une glycoprotéine ?

C - BIOSYNTHESE DES GLYCOPROTÉINES

La chaîne glucidique est synthétisée par l'addition séquentielle des résidus glucidiques, catalysée par des glycosyltransférases. Les sucres sont transférés d'un glycosylnucléotide correspondant vers la chaîne glycanique en croissance (voir Chapitre II).

Les glycosyltransférases sont spécifiques du monosaccharide qui va être transféré, de l'accepteur à glycosyler, de l'anomérisation, de la configuration et du type de liaison qui relie le sucre à la chaîne (voir les revues de Montreuil -121- ; Schachter et Roseman -163-).

Compte tenu de cette spécificité et du nombre très grand de structures glycaniques, il en résulte une grande variété de glycosyltransférases dont certaines ont été particulièrement étudiées (voir Chapitre II).

1 - Biosynthèse des glycanes de type N-glycosidique.

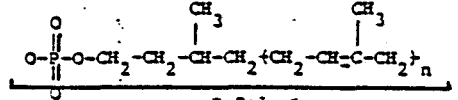
La biosynthèse des glycanes liés N-glycosidiquement aux protéines, bien que nécessitant une suite de réactions plus complexe que celle qui conduit à la biosynthèse des oligosaccharides de type O-glycosidique, est mieux connue et peut se subdiviser en quatre étapes (voir revues générales Kornfeld and Kornfeld -93-94; Montreuil -121-) :

- * Synthèse du précurseur dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide
- * Transfert en bloc de l'oligosaccharide sur la protéine
- * Maturation et biosynthèse des glycanes de type oligomannosidique
- * Synthèse des glycanes de type hybride et N-acétyllactosaminique et allongement des glycanes.

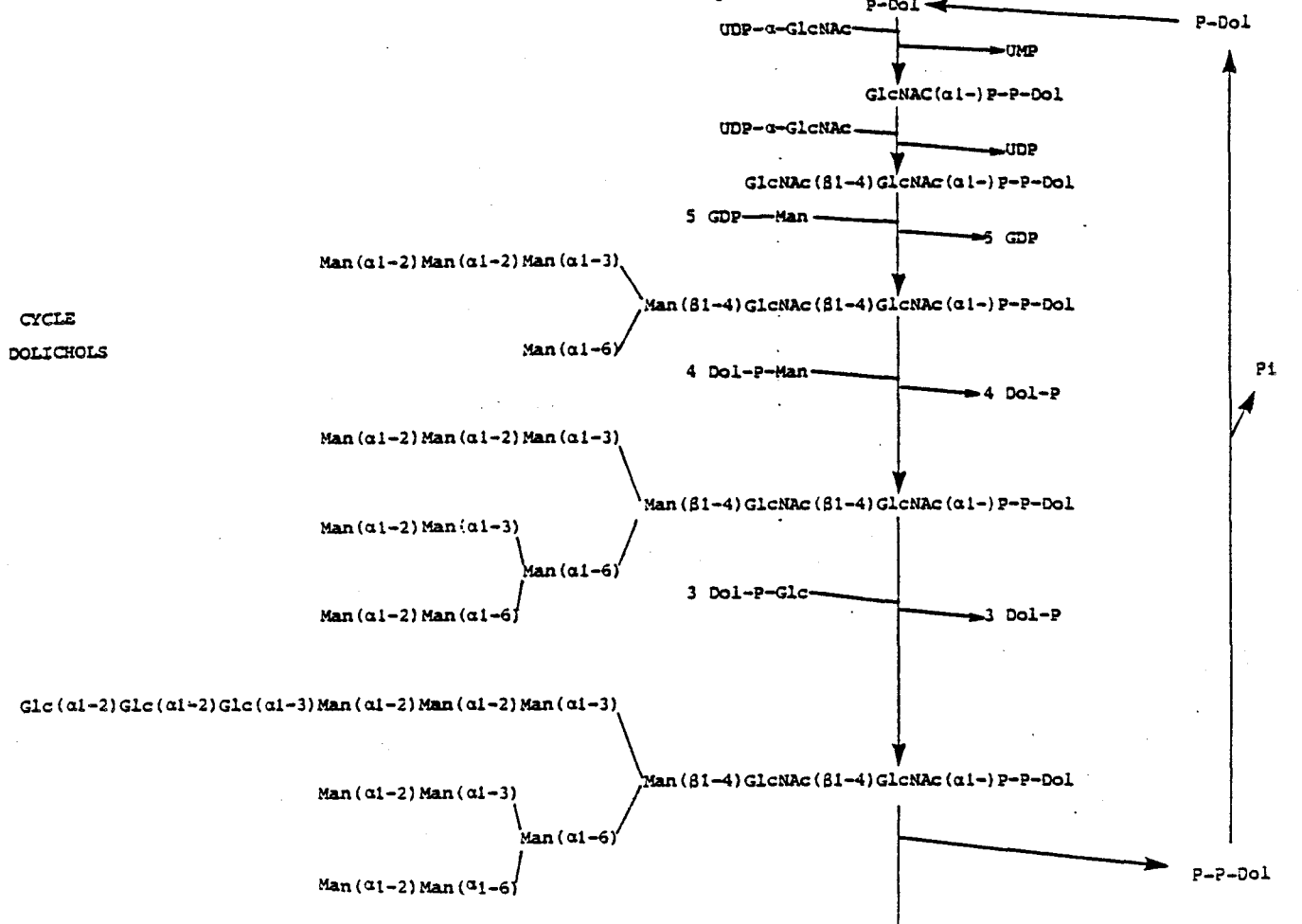
L'ensemble de ce mécanisme est résumé à la Figure 5 p. 26.

La synthèse du précurseur Dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide comprend l'addition de 2 résidus de N-acétylglucosamine à partir de l'UDP-GlcNAc sur le Dolichol pour conduire à la formation de $(\text{GlcNAc})_2\text{-P-P-Dol}$. Des additions successives de 5 mannose à partir de GDP-Man, puis de 4 mannose à partir de Dol-P-Man vont conduire à l'élaboration du glycanne $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ (Chapman *et al.* -29-) complété par l'addition de 3 résidus de glucose à partir de Dol-P-Glc (Staneloni *et al.* -185-).

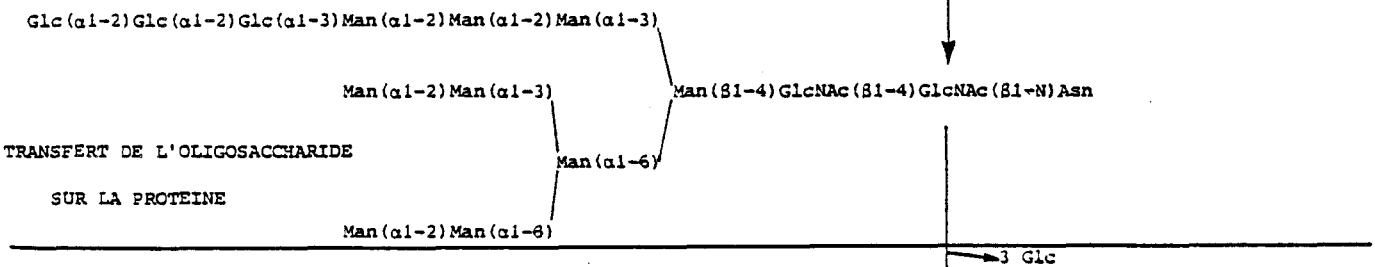
La dernière addition du α - 1,2 - Glc peut servir de signal pour une oligosaccharyltransférase (Spiro *et al.* -183-) qui est responsable du transfert en bloc sur un résidu d'asparagine de la chaîne polypeptidique naissante (Behrens *et al.* -9-).



CYCLE
DES DOLICHOLS



TRANSFERT DE L'OLIGOSACCHARIDE
SUR LA PROTEINE



MATURATION ET BIOSYNTHESE
DES GLYCANNES OLIGOMANNOSIDIQUES

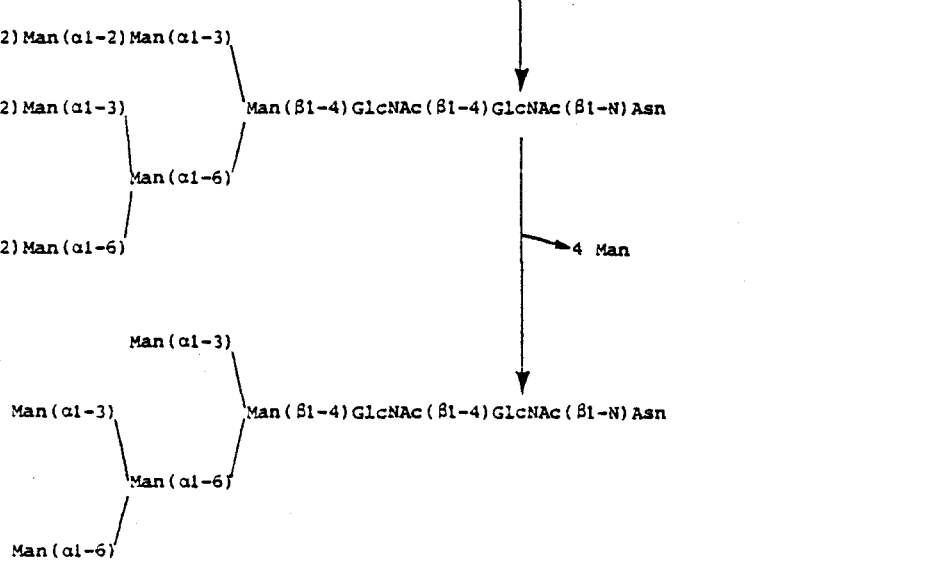


FIGURE 5 : - Biosynthèse des glycanes des N-glycosylprotéines: synthèse du dolichol-pyrophosphate-oligosaccharide et transfert sur la protéine suivis des étapes de maturation; synthèse des glycanes de type oligomannosidique.

Les recherches réalisées sur la spécificité de l'enzyme transférant l'oligosaccharide, montrent que la séquence amino-acide Asn-X-Ser/Thr, dans laquelle X est n'importe quel acide aminé sauf la proline, est la séquence minimale pour le transfert (Pless *et al.*-151- ; Struck *et al.*-187-).

Un autre système de transfert et de synthèse de N-glycosylprotéines a été démontré par Hoflack *et al.*(-80-). L'oligosaccharidyltransférase serait capable *in vitro* de transférer du N-N'-diacétylchitobiose directement sur la protéine à partir de Dol-P chitobiose, auquel succéderait un allongement du glycane par l'addition de mannose provenant du GDP-Man.

Dans une série de réactions, appelée maturation de l'oligosaccharide, les résidus glucose et la plupart des résidus mannose sont éliminés par des α -glucosidases et α -mannosidases spécifiques, conduisant ainsi aux différentes structures de type oligomannosidique décrites dans le Tableau I, p. 8 (Opheim *et al.*-138-).

Un point important de contrôle est réalisé à l'étape du $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2$ (Fig. 6 p. 28) parce que l'élimination des autres résidus mannose ne peut avoir lieu qu'après l'action de la N-acétylglucosamine-Transférase I (Harpaz *et al.*-74-). C'est à ce stade de la maturation que se différencient les voies biosynthétiques conduisant aux glycanes de type mixte et de type N-acétyllactosaminique. L'allongement des glycanes $\text{GlcNAcMan}_5\text{-GlcNAc}_2$ et $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}$, se traduisant par la formation d'antennes, se fera par l'addition de fucose, de galactose ou d'acide sialique. Le transfert de ces résidus est réalisé par des glycosyl-

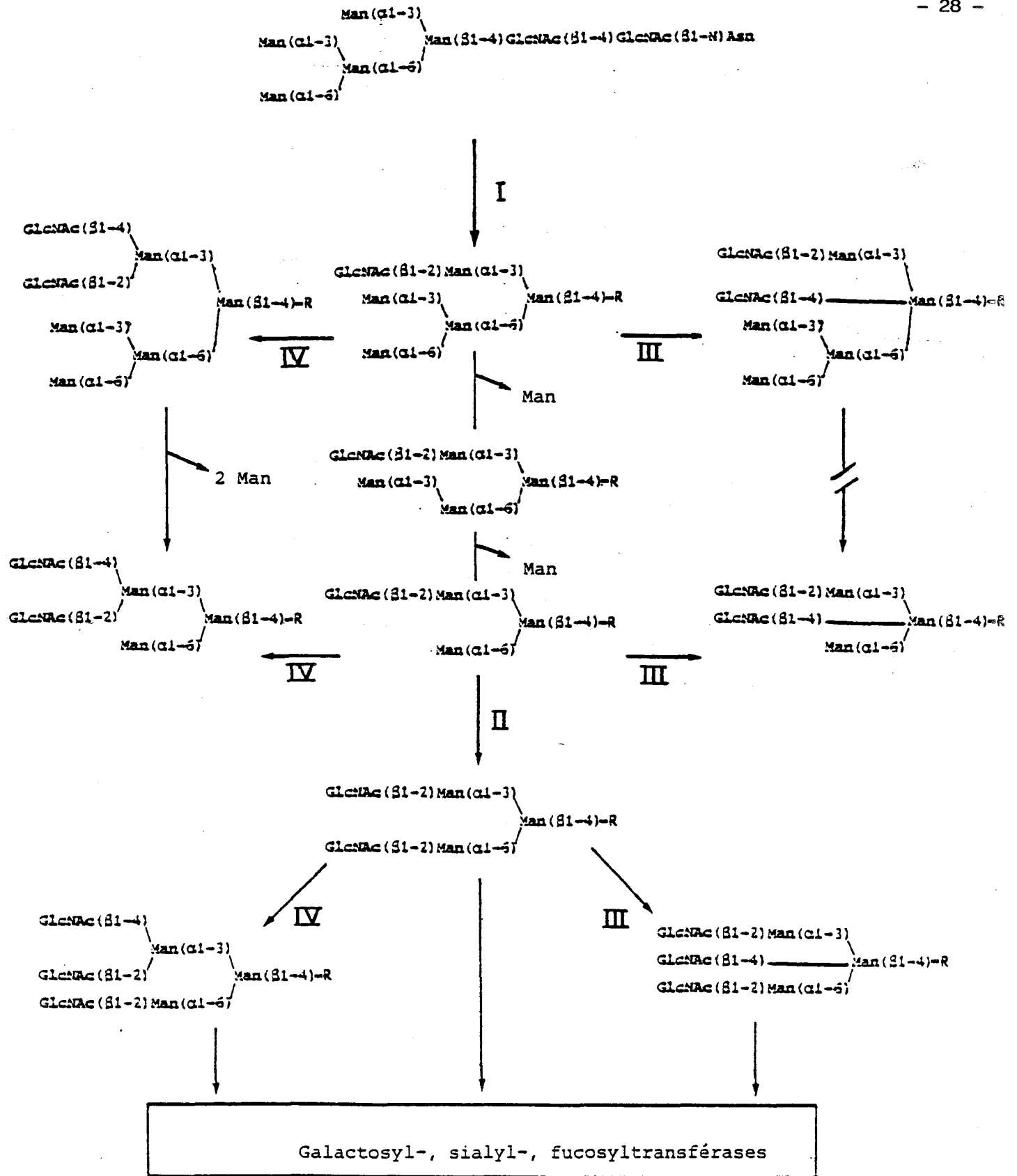


FIGURE-6 - Synthèse des glycannes de type mixte et N-acétyllactosaminique.
 R = $(\text{GlcNAc})_2\text{Asn}$; I, II, III et IV : N-acétylglucosaminyltransférases
 I, II, III et IV. (D'après SCHACHTER et al. - 166-.)

transférases dont quelques galactosyltransférases impliquées seront discutées au Chapitre II.

L'assemblage, aussi bien que le transfert de l'oligosaccharide $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ sur la protéine a lieu dans le réticulum endoplasmique rugueux et il s'agit certainement d'un phénomène cotranslationnel (revues générales de Hanover et Lennarz -72- ; Montreuil -121-). Pendant le transfert de la glycoprotéine vers l'appareil de Golgi, les résidus de glucose et certain mannose (élimination du Man_9 de l'oligosaccharide) (Godelaine *et al.* -68- ; Bischoff et Kornfeld -16-) sont éliminés dans le réticulum endoplasmique rugueux et lisse, alors que les autres mannoses sont éliminés dans l'appareil de Golgi. L'addition des résidus monosaccharidiques conduisant aux glycanes de type complexe et de type mixte a lieu dans le Golgi (Hanover et Lennarz -72-).

2 - Biosynthèse des glycanes de type O-glycosidique

La biosynthèse des O-glycanes est plus simple que celle des N-glycanes. Un résidu N-acétylgalactosamine est transféré sur la serine ou sur la thréonine par une N-acétylgalactosamine-transférase. Cette enzyme a été caractérisée en 1967 (McGuire *et al.* -111-) et a été purifiée (Sugiura *et al.* -188-).

A partir des données de plusieurs études (Williams *et al.* -206- ; Brockhausen *et al.* -23-), il est possible de composer un schéma montrant les glycosylations initiales (Fig. 7 p. 31).

Les points importants de la biosynthèse des O-glycannes sont la glycosylation des GalNAc-protéines (3 voies possibles) et la glycosylation de Gal(β 1-3)-GalNAc-protéines (5 voies possibles).

La plupart des résultats indiquent que la biosynthèse des O-glycannes est un phénomène post-translationnel qui se réalise entièrement dans l'appareil de Golgi (Schachter *et al.*-164- ; Beyer *et al.*-15-).

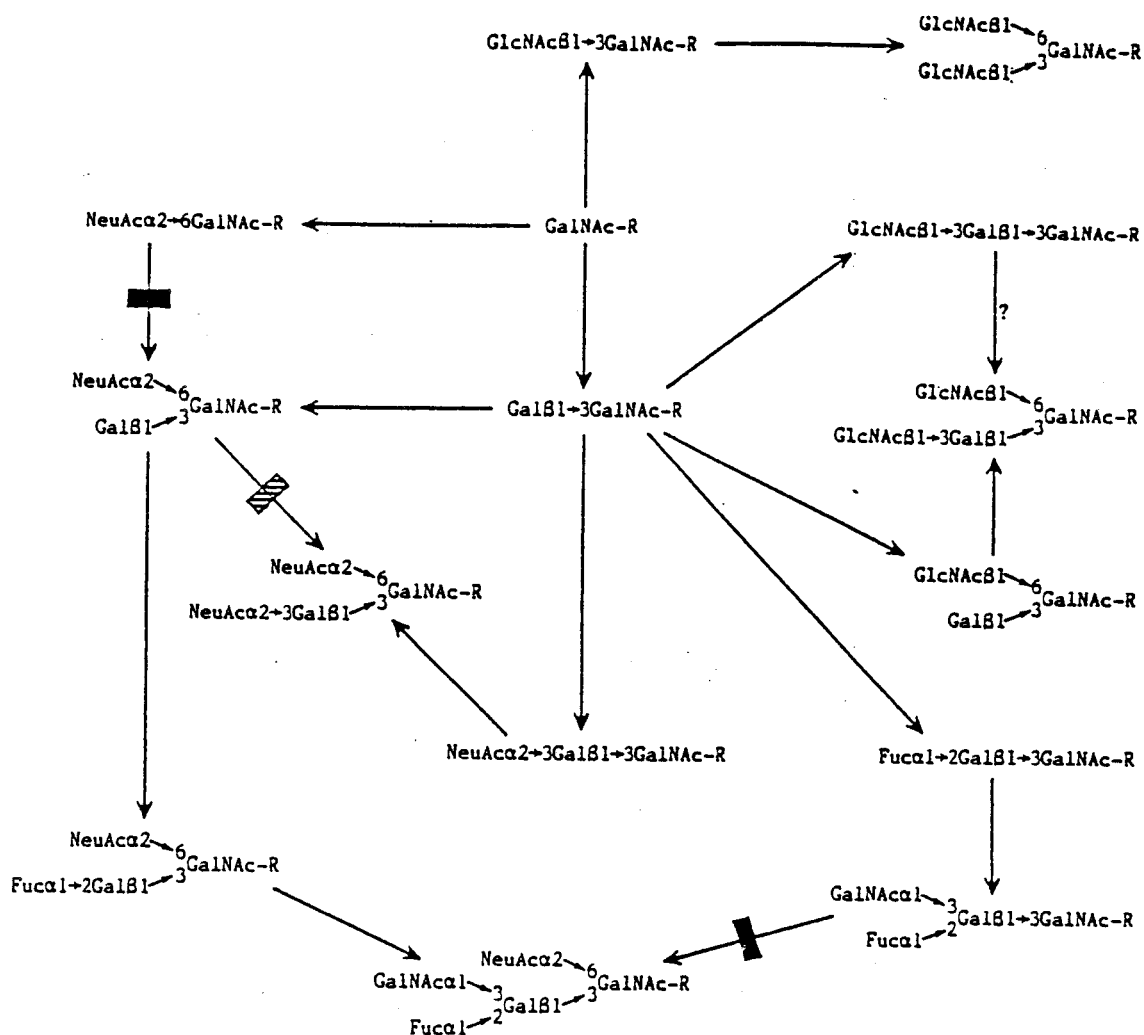


FIGURE 7 : Voie de biosynthèse possible des chaînes glucidiques des O-glycannes.

Les réactions qui ne peuvent pas se réaliser sont représentées par des barres en plein, les réactions qui ont lieu lentement sont représentées par des barres hachurées.

Abréviation : R, protéine.

(figure tirée de la thèse de W. Blanken -19.)

II - LES GLYCOLIPIDES

A - STRUCTURE PRIMAIRE

Les glycolipides à sphingosine ou glycosphingolipides restent les structures les mieux connues parmi les glycoconjugués membranaires. En effet, d'une part ils ne possèdent qu'un seul glycanne par molécule ce qui en simplifie l'étude et, d'autre part, 80 à 90 % d'entre eux sont localisés dans la membrane plasmique, ce qui permet de les étudier à partir de cellules totales.

La partie lipidique : la céramide, permet l'intégration de la molécule dans la membrane. Le glycanne possède le motif de base commun du lactose Gal (β 1-4)Glc, le glucose se liant sur la céramide. A partir de cette lactosyl-céramide (ou GL₂) se constituent des glycolipides de plus en plus complexes.

Les glycosphingolipides peuvent être subdivisés en trois groupes : les gangliosides contenant un ou plusieurs résidus d'acide sialique, les glycosphingolipides neutres et les sulfato-glycosphingolipides.

Les glycosphingolipides peuvent être, d'un point de vue structural, divisés en cinq séries (voir Tableau V ; p. 33).

Les gangliosides de la série ganglio contiennent un ou plusieurs résidus d'acide sialique liés au galactose ou à d'autres résidus d'acide sialique (Fig. 8 p. 36). Moins communément, le galactose en position terminale peut être substitué par du fucose ou par de la N-acétylgalactosamine.

TABLEAU V : Structures de base des oligosaccharides des glycosphingolipides et leurs symbols.

	Oligosaccharides	nom usuel	symbols
1. Globo-series (major)	$\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 4\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$	Globotriaose	Gb3a or GbOse3a
	$\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$	Globotriaose	Gb3b or GbOse3b
	$\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 4\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$	Globotetraose	Gb4a or GbOse4a
	$\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$	Globotetraose	Gb4b or GbOse4b
	$\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 4\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$	Globopentaose	Gb5 or GbOse5
2. Lacto-series (major)	$\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$	Lactotriaose	Lc3 or LcOse3
	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$	Lactotetraose	Lc4a or LcOse4a
	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$	Lactotetraose	Lc4b or LcOse4b
	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$	Lactohexaose	Lc6 or LcOse6
	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1$ ↓ ↑ $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1$	(or lactonorhexaose)	
	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$	Lactooctaose	Lc8 or LcOse8
3. Ganglio-series (major)	$\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$	Gangliotriaose	Gg3 or GgOse3
	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$	Gangliotetraose	Gg4 or GgOse4
	$\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Cer}$	Gangliopentaose	Gg5 or GgOse5
4. Muco-series (minor)	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$	Mucotriaose	Mc3 or McOse3
	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$	Mucotetraose	Mc4 or McOse4
5. Gal-series (minor)	$\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 4\text{Gal}$	Galabiose	Ga2 or GaOse2
	$\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 4\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 4\text{Gal}$	Galatriaose	Ga3 or GaOse3

Les glycosphingolipides de la série globo contiennent généralement une séquence Gal(α 1-4)Gal ou Gal (α 1-3)Gal. La N-acétylgalactosamine peut être substituée par une α -1,3-N-acétylgalactosamine.

Dans la série lacto, les glycosphingolipides peuvent contenir plusieurs séquences de Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3) . Ils peuvent être branchés par une séquence GlcNAc (β 1-6)Gal. Le résidu galactose en position terminale peut être substitué par l'acide sialique ou par le galactose en position α -1,3 ou β - 1,3.

La partie glycannique de la série muco peut être substituée par du fucose ou du galactose lié en α -1,2 et α -1,3 respectivement au Gal terminal lié en β -1,3.

Les différentes structures des glycosphingolipides et leurs substitutions sont résumées dans la revue de Kanfer et Hakomori (-87-).

B - BIOSYNTHESE

Comme la biosynthèse des glycoprotéines, la partie glycannique des glycosphingolipides est synthétisée par l'addition séquentielle des résidus de sucre par l'action de glycosyltransférases.

Selon une autre hypothèse (Arce *et al.*, -4- ; Maccioni *et al.*, -107-), des glycolipides seraient synthétisés par un système multiglycosyltransférase différent de celui des glycoprotéines.

Dans les tissus extraneuraux, les glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse des glycosphingolipides sont localisées dans le Golgi à l'exception probablement de la lactosylcéramide sialyltransférase (Roseman -161- ; Pacuszka *et al.* -139-). La localisation dans le tissu cérébral est encore controversée. Des études indiquent que des glycosyltransférases de surface des membranes synaptiques seraient impliquées (Den *et al.*, -40-) alors que Fishman (-51-) en trouve dans les microsomes et dans les myélines.

1 - Biosynthèse des gangliosides

Elle est résumée à la Figure 9 ; p. 36

La biosynthèse conduit au GD_{1a} et GT_{1b} respectivement. Les enzymes impliquées dans la formation de GD_{1a} ont été découvertes dans le cerveau d'embryon de Poulet (Roseman -161-) et de Rat (Arce *et al.*, -4-).

Les tissus extraneuraux contiennent essentiellement le GM3 et le GD3 et un peu de gangliosides plus longs, dus à une très faible ou à un manque d'activité de la N-acétylgalactosamine-transférase synthétisant le GM2 (Fishman -51-). Une faible activité de cette enzyme a également été détectée dans les fibroblas-

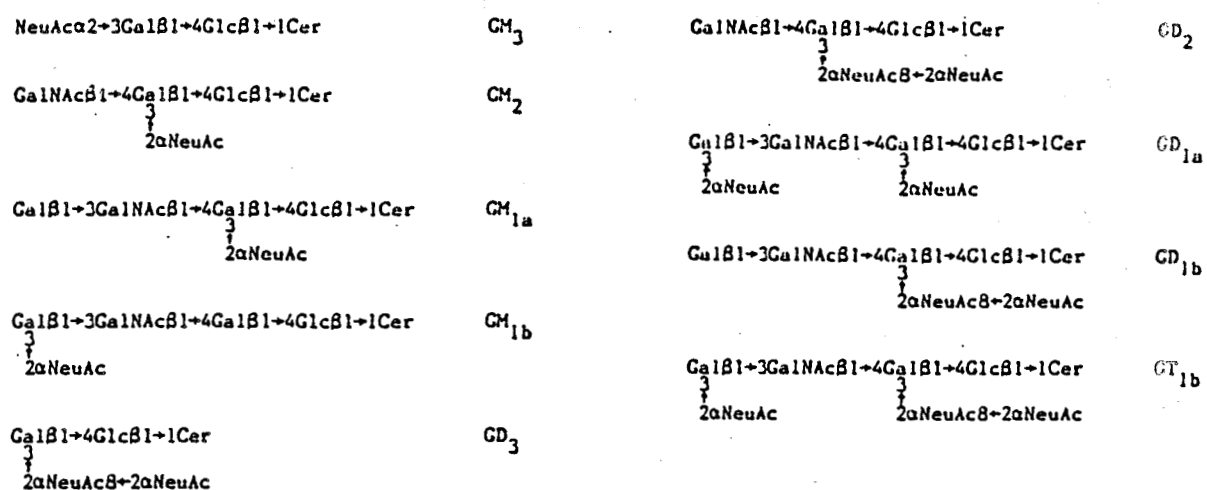


FIGURE 8 : Structures de gangliosides de la série ganglio.
(figure tirée de la thèse de W. Blanken -19-)

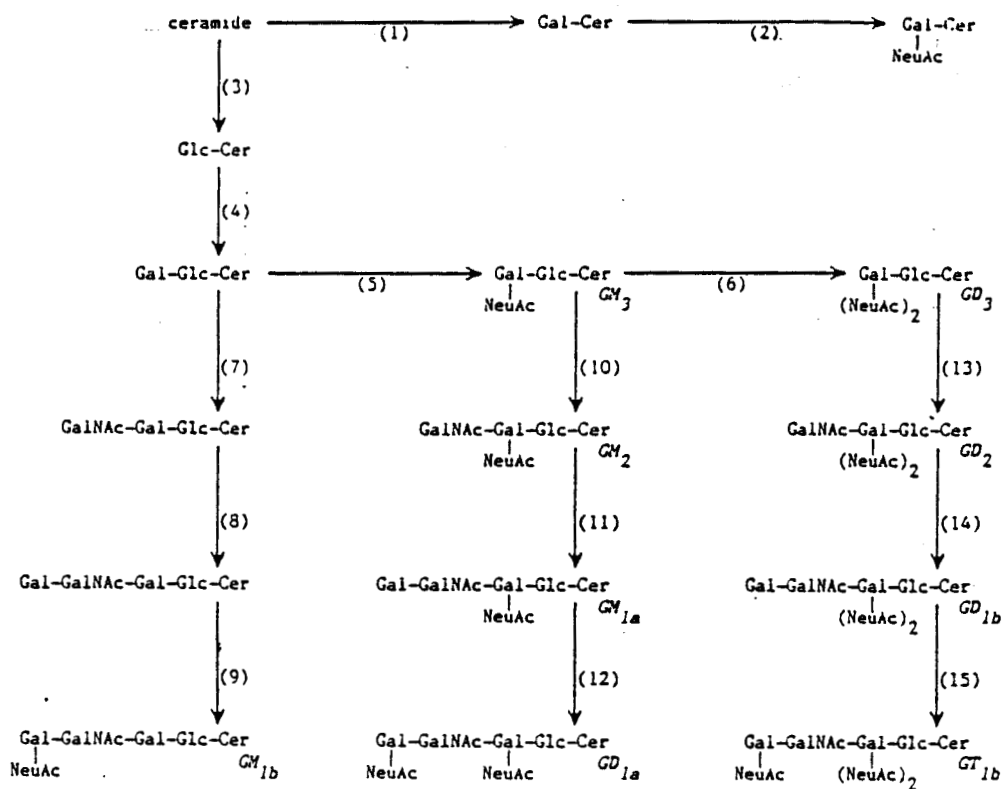


FIGURE 9 : Voie de biosynthèse possible de gangliosides. Pour le type de liaisons, se référer à la figure n° 8.

tes de peau humaine qui, pourtant, possèdent des activités GM2 galactosyl-transférase (Fig. 9 p. 36 réaction 11) et GM1 sialyl-transférase (réaction 12) (Fishman *et al.*-52-), ce qui est en faveur d'un contrôle par la N-acétylgalactosamine-transférase.

Les glycosyltransférases responsables de la synthèse de GD_{1b} ont été mises en évidence dans le cerveau de Rat (Cumar *et al.*-34-).

Une autre voie mène au GM_{1B} (Handa *et al.*-71-). Des expériences de compétition indiquent qu'une galactosyltransférase catalyse la réaction 8 et 11 (Fig. 9, p. 36), alors que deux N-acétylgalactosamine-transférases sont impliquées dans les réactions 7 et 10 (DiCesare -41-).

2 - Biosynthèse des séries lacto et globo des glycosphingolipides

La voie de biosynthèse est présentée Fig. 10 p. 38. Toutes les glycosyltransférases impliquées ont été mises en évidence *in vitro* en utilisant des glycosphingolipides comme accepteurs (Basu *et al.*-8-).

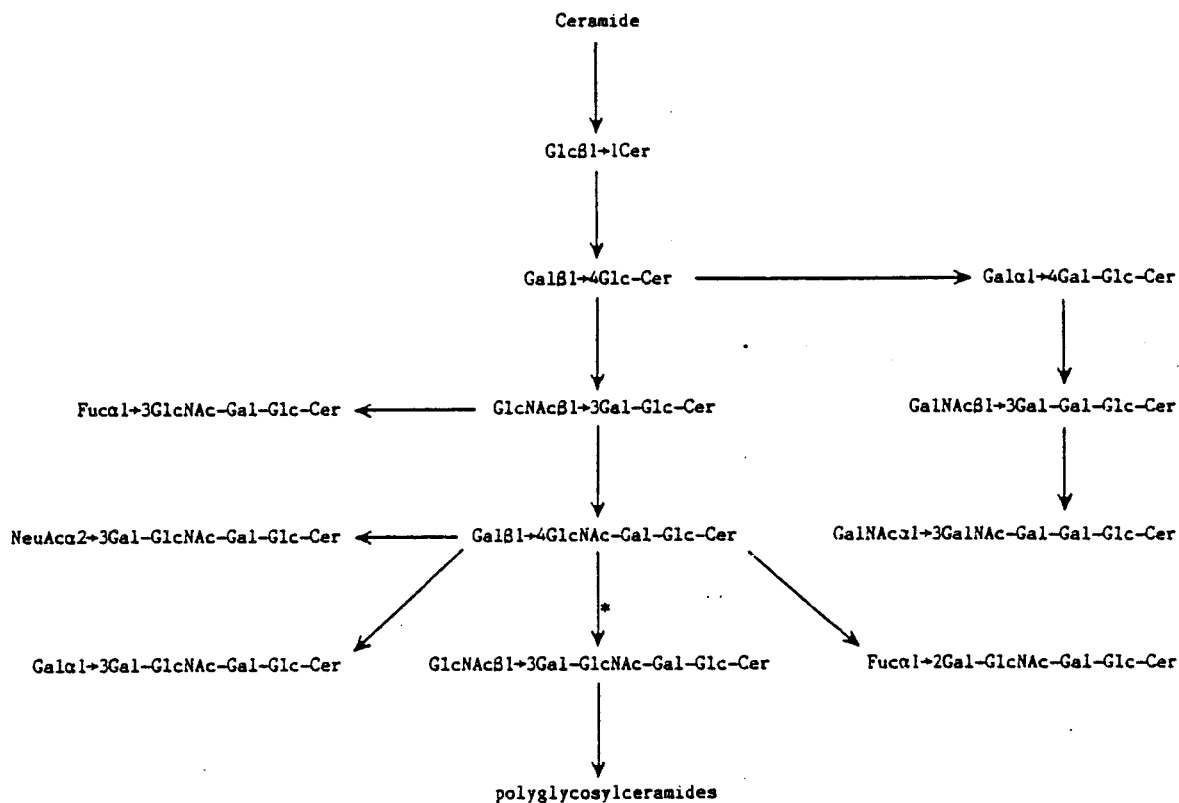


FIGURE 10 : Voie de biosynthèse des glycosphingolipides des séries lacto et globo. Seul, le type de liaison du dernier oligosaccharide ajouté, est indiqué.

III - GLYCOSYLTRANSFÉRASES COMMUNES AUX GLYCOSPHINGOLIPIDES ET GLYCOPROTÉINES

De nombreuses séquences de la partie glycannique se retrouvent dans les glycoprotéines et les glycosphingolipides.

Des expériences de compétition entre une Gal(β 1-3)GalNAc-protéine et le GM₁ indiquent que la glande sous maxillaire de Porc contient une sialyltransférase agissant sur les deux substrats (Rearick *et al.*-159 II-).

De même, la α -2,3 sialyltransférase purifiée de la glande sous maxillaire de Porc (Rearick *et al.*-159 II-), la (β 1-3)GlcNAc-transférase de sérum humain (Piller *et al.*-149-) et la (α 1-3)-galactosyltransférase purifiée de thymus de Veau (Blanken *et al.*-18-) agissent aussi bien sur les glycoprotéines que sur les glycosphingolipides. Cependant, des résultats inverses ont été obtenus avec la α -2,3 sialyltransférase de cerveau de Rat (Ng et Dain -131-) et la GalNAc-R (β 1-3) galactosyltransférase (Kaplan *et al.*-89- ; Schachter *et al.*-164-).

Cela signifie que les portions glycanniques périphériques des glycoprotéines et des glycosphingolipides sont synthétisées par des enzymes communes alors que les noyaux oligosaccharidiques sont assemblés par des glycosyltransférases spécifiques à chaque classe des glycoconjugués. Il faut souligner néanmoins que ces hypothèses ont été formulées à partir d'expériences réalisées *in vitro*.

CHAPITRE II

LES GALACTOSYLTRANSFERASES

CHAPITRE II : LES GALACTOSYLTRANSFÉRASES

Les glycosyltransférases largement répandues dans le monde vivant, ont été décrites **dans** les plantes et les organismes supérieurs. Elles catalysent le transfert de monosaccharides à partir de leurs dérivés activés sur des molécules acceptrices.

Les glycosyltransférases sont spécifiques du monosaccharide qu'elles reconnaissent et de la liaison qu'elles forment (Roseman -161-).

Elles montrent, en outre, une très grande spécificité pour le résidu glycosylé situé en position terminale non réductrice de l'accepteur et pour la liaison qu'elles forment. C'est pourquoi, au concept «un monosaccharide - une glycosyltransférase», on peut ajouter «une liaison - une glycosyltransférase».

Les glycosyltransférases, qui sont des enzymes membranaires de la cellule, ont été découvertes aussi dans le sérum et dans les liquides biologiques. Les élévations des activités de différentes glycosyltransférases dans le sérum ont été corrélées à la présence de tumeurs (Podolsky et Weiser -152-).

Ces enzymes qui ajoutent des monosaccharides à des oligosaccharides attachés aux protéines sont elles-mêmes des glycoprotéines et une élévation de leur activité dans le sérum de patients cancéreux a été considérée comme l'évidence d'une synthèse de glycoprotéines altérées dans les cellules tumorales.

De nombreux travaux ont été réalisés en comparant les structures des glycoprotéines des cellules normales et transformées, ainsi que la mesure des activités des glycosyltransférases.

La tumorigénicité s'accompagne d'une augmentation de la taille des glycoconjugués (Buck *et al.* -24- ; Van Beek *et al.* -202- et -203-). L'augmentation de la taille des glycanes a également été retrouvée lors d'hépatite virale ou de cirrhose (Spik *et al.* -181-) ou lors du phénomène de grossesse, ce qui laisse penser que la modification des glycanes n'est pas spécifique du cancer. Takasaki *et al.* (-191-) pensent que la clef de l'augmentation de la taille des glycoprotéines des cellules transformées réside dans la multiantennarisation des structures glycaniques. La transformation maligne serait donc accompagnée de l'apparition de glycosyltransférases n'existant pas ou ayant une activité faible dans les cellules normales.

Toutes les modifications observées jusqu'à ce jour sont vraisemblablement liées à un dérèglement de la biosynthèse des glycoprotéines. De nombreuses hypothèses sont avancées mais aucune preuve directe ne peut, à l'heure actuelle,

répondre aux nombreuses énigmes posées par ce phénomène. C'est pourquoi il est nécessaire de poursuivre des études précises sur les enzymes intervenant entre autre dans la poly-antennarisation et notamment sur les galactosyltransférases responsables en partie de l'augmentation de taux de glycosylation.

En dehors du phénomène de cancérisation, les galactosyltransférases interviennent dans de nombreux phénomènes reliés à l'activité biologique des cellules. Les travaux réalisés par Shur et son équipe tentent de corréler l'activité ectogalactosyltransférasique à la fertilisation chez la Souris. On peut y associer les études conduisant à la relation entre l'activité ectogalactosyltransférasique et les rôles d'adhésion ou de reconnaissance de la surface cellulaire (voir revue générales de Pierce *et al.*-148).

Dans ce chapitre, nous ferons le point de nos connaissances actuelles sur le mode d'action des galactosyltransférases et, après avoir détaillé les modes de purification utilisés jusqu'à présent, nous discuterons l'hétérogénéité des résultats obtenus notamment sur la signification des différentes masses moléculaires trouvées pour les galactosyltransférases et leur spécificité d'action.

Le Tableau VI (p. 43) présente les types de liaison du galactose qui ont été détectés sur les glycanes des oligosaccharides ou glycoconjugués et les galactosyltransférases mises en évidence ou purifiées à ce jour.

TABLEAU VI : Type de liaison du galactose, rencontré chez les oligo saccharides et les glycoconjugués, ainsi que les transférases détectées.

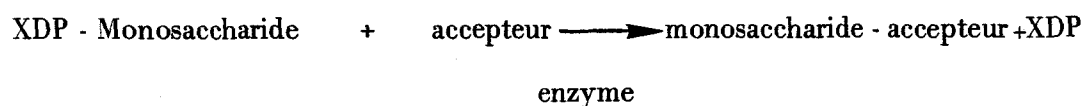
Type de liaison rencontré	Transférase détectée	Mot clé	Remarques
Gal (β1-1) Cer	+	L	
Gal (β1-4) Glc	+	L/O	Lactose synthase purifiée
Gal (β1-3) GlcNAc	+	P/L/O	Purifiée
Gal (β1-4) GlcNAc	+	P/L/O	Purifiée
Gal (β1-6) GlcNAc	-	P	
Gal (α1-3) [Fuc (α1-2)] Gal	+	P/L/O	Enzyme du groupe sanguin B- Purifiée
Gal (α1-3) Gal	+	P/L	Purifiée
Gal (α1-4) Gal	+	P/L	Enzyme du groupe sanguin P Purifiée
Gal (α1-4) LacCer	+	L	
Gal (α1-6) Gal	-	P	
Gal (β1-3) Gal	-	P/L/O	
Gal (β1-4) Gal	-	L	
Gal (β1-6) Gal	-	P/L/O	
Gal (α1-3) GalNAc	-	P	
Gal (β1-3) GalNAc	+	P/L	Enzyme du GM1- Purifiée
Gal (β1-6) GalNAc	-	P	

Mots clés: P, glycoprotéine
L, glycolipide
O, oligosaccharide

I - MODE D'ACTION DES GALACTOSYLTRANSFÉRASES

Les glycosyltransférases sont des enzymes qui catalysent le transfert d'un monosaccharide à partir d'un donneur (glycosyl-nucléotide) vers un accepteur glycosylé.

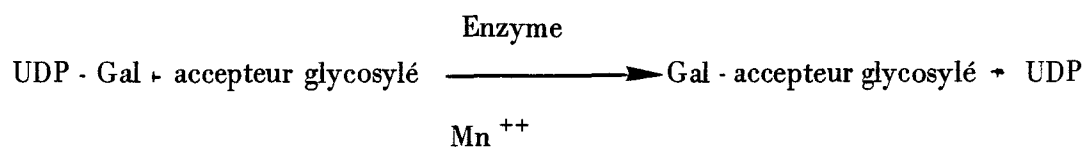
Trois composés de base sont impliqués dans les réactions catalysées par les glycosyltransférases :



A - LES GLYCOSYLNUCLEOTIDES

Dans le cas des galactosyltransférases, le glycosylnucléotide donneur est l'UDP-Gal (Berliner et Robinson -14a-).

La réaction globale des galactosyltransférases est donc :



B - LES EFFECTEURS

1 - Les cations

Il est démontré que l'ensemble des glycosyltransférases agissent en présence de cations divalents.

Pour les galactosyltransférases (GalTf), les ions Mn^{2+} sont indispensables au mécanisme d'action.

Pour la plupart des GalTf, les ions Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ou Co^{2+} ne peuvent remplacer réellement les ions Mn^{2+} (Fraser *et al.*-57-). Ils sont éventuellement activateurs des GalTf ou inhibiteurs compétitifs du Mn^{2+} (O'Keefe *et al.* -135- ; Taniguchi *et al.*-193- ; Powell et Brew -155-).

Des mécanismes de cinétiques enzymatiques montrent que les ions Mn^{2+} sont les premiers éléments à se fixer sur l'enzyme, suivis de l'UDP-Gal (Powell et Brew -154-).

A de faibles concentrations en Mn^{2+} , l'activité N-acétylglucosamine galactosyltransférase est activée par les ions Ca^{2+} (Powell et Brew -155-). L'hypothèse de l'existence de deux sites de fixation des ions métalliques est alors proposée (Powell et Brew -155- ; O'Keefe -135-).

A de fortes concentrations en Mn^{2+} , ces ions sont parfois inhibiteurs des N-acétylglucosamine galactosyltransférases. La discussion, à ce niveau, peut être soulevée puisque les auteurs ne sont pas toujours du même avis.

Pour Morisson et Ebner (-123-), la lactose synthétase du lait de Vache est inhibée par plus de 10 mM en Mn^{2+} , alors que Khatra *et al.*(-90-) trouvent pour la même N-acétylglucosamine galactosyltransférase une inhibition à partir de 50 mM en Mn^{2+} .

En réalité, il s'agit plutôt du rapport Mn^{2+} /UDP-Gal. Tspanakis et Hennis (-198-) suggèrent, pour expliquer les résultats différents des auteurs, la formation d'un complexe Mn^{2+} - UDP-Gal. Les N-acétylglucosamine galactosyltransférases seraient plutôt sensibles au rapport Mn^{2+} libre et Mn^{2+} - UDP-Gal «complexé».

L'effet inhibiteur des ions Mn^{2+} n'est pas toujours observé. Cela dépend de l'origine des N-acétylglucosamine galactosyltransférases et de la constante d'affinité déterminée pour chacune. Andree et Berliner (-2-) pensent néanmoins que deux molécules de Mn^{2+} sont nécessaires par molécules d'enzyme.

2 - Le pH

Les N-acétylglucosamine galactosyltransférases ont un mode d'action assez large en fonction du pH. Agissant entre pH 5,5 et 8, l'optimum est souvent obtenu entre 6,5 et 7,5. Kaplan et Hechtman (-89-) parviennent cependant à séparer deux GalTf de foie de Rat transférant sur le ganglioside GM_2 dont la seule différence entre les formes concerne le pH. L'une est active à pH 6,0 et l'autre à 7,0.

Enfin, si le mode d'action des N-acétylglucosamine galactosyltransférases est très large en fonction du pH, il est important de remarquer que les traitements aux pH acides (inférieur à 5) peuvent dénaturer de façon irréversible les GalTf (Grunwald *et al.*-70-).

Cette connaissance peut s'appliquer aux purifications des N-acétylglucosamine galactosyltransférases du lait où il faut préférer une précipitation de la caséine par le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à la précipitation acide.

3 - Autres paramètres

a) Stabilité

Les N-acétylglucosamine galactosyltransférases sont en général sensibles à la dialyse et à la congélation. L'addition de sérum albumine bovine (BSA) (1 à 10 mg/ ml) ou de glycérol (20 à 50 %) est alors souhaitable pour assurer la conservation de l'enzyme.

Pour la β 1,4 GlcNAc galactosyltransférase, l'addition de GlcNAc (5 mM) peut stabiliser l'enzyme (Fujita-Yamaguchi et Yoshida -59- ; Geren *et al.*-63-).

b) Influence du Triton X-100

De nombreux auteurs utilisent le Triton X-100, surtout pour la solubilisation des N-acétylglucosamine galactosyltransférases membranaires et aussi pour la stabilisation de l'activité enzymatique. Son omission dans les tampons peut, de plus, inactiver l'enzyme (Fraser et Mookerjea -57- ; Blanken *et al.* -18-) ou diminuer l'interaction avec des supports de chromatographie d'affinité (Fraser et Mookerjea -57-), ce qui signifie que le site actif des N-acétylglucosamine galactosyltransférases solubles ou membranaires nécessite un environnement particulier qui stabilise l'activité enzymatique (Fraser et Mookerjea - 58- ; Chattergee *et al.* -30-) et laisse supposer la présence de séquences hydrophobes sur l'enzyme. Selon Fleisher et Smigel (-53-), il semble que le traitement du Triton X-100 dissocie l'enzyme de l'ensemble des phospholipides présents dans les membranes ce qui indiquerait que le Triton X-100 se fixe au site de la protéine normalement lié aux lipides membranaires.

c) Influence des lipides

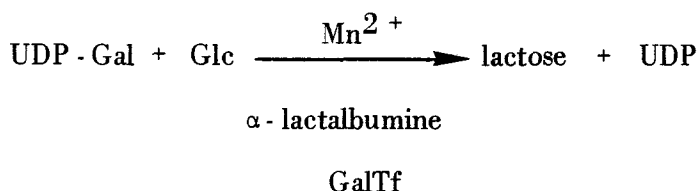
L'activité de certaines N-acétylglucosamine galactosyltransférases (celle du lait par exemple) est affectée par certains lipides. La phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine et le phosphatidylglycérol stimulent l'activité de l'enzyme purifiée du lait de Vache, alors que l'acide phosphatidique et la phosphatidylsérine l'inhibent (Mitranic et Moscarella -114-). L'effet sur l'enzyme est probablement relié à la nature du groupe polaire car l'inhibition par l'acide phosphatidique peut être

transformée en une stimulation par méthylation de l'acide phosphatidique (Moscarello *et al.*-124-). L'état physique des lipides enfin, affecte l'activité de façon marquée. Quand l'enzyme est combinée à la dimyristylphosphatidylcholine, l'activité est considérablement stimulée si le lipide est à l'état liquide-cristallin (c'est à-dire au dessus de la transition de phase trouvée généralement dans les membranes biologiques). Dans les travaux plus récents, Mitranic *et al.*(-115-) précisent que la spécificité de fixation des lipides à la galactosyltransférase de lait de Vache n'est pas due à la charge du lipide, mais à des propriétés chimiques et structurales des groupes terminaux des lipides.

C - LE GLUCIDE ACCEPTEUR

Les galactosyltransférases agissent sur les glycoprotéines, glycolipides et oligosaccharides possédant soit un résidu de N-acétyl-galactosamine de D-galactose ou de N-acétyl-glucosamine, tous en position terminale (voir Tableau VI p. 43).

Dans le cas de la N-acétylglucosamine (β 1,4) galactosyltransférase, la synthèse du lactose est possible. Il s'agit de la lactose synthétase dont l'action est combinée avec l' α -lactalbumine :



En ce qui concerne les oligosaccharides ou les glycoprotéines, la spécificité d'action de galactosyltransférase n'est pas évidente.

b) Galactosylation sur la branche $\text{Man}_{\alpha}1,3\text{-Man}$

Cependant, depuis peu de temps, des équipes ont abouti à des résultats opposés. En effet, la N-acétylglucosamine ($\beta 1-4$)galactosyltransférase de colostrum ou de thymus de Veau (Blanken *et al.*-17 b-), de lait de Vache (Narasimham *et al.*-127-) ou du Golgi de foie de Rat (Pâquet *et al.*-141-) préfère la branche $\text{Man}_{\alpha}1,3\text{-Man}$ des oligosaccharides ou glycoprotéines biantennés. Même si les N-acétylglucosamine galactosyltransférases agissent sur les deux antennes, le branchement du premier galactose est réalisé 5 fois plus vite sur la branche $\text{Man}_{\alpha}1,3\text{-Man}$ (Pâquet *et al.*-141-). Montreuil (-120-) a d'ailleurs démontré que la branche $\text{Man}_{\alpha}1,3\text{-Man}$ était fixe dans l'espace alors que la branche $\text{Man}_{\alpha}1,6\text{-Man}$ a une liberté de rotation autour de sa liaison glycosidique. Il est donc possible que cette dernière soit moins facile à galactosyler que la branche $\text{Man}_{\alpha}1,3\text{-Man}$.

Un schéma de galactosylation des glycoprotéines est proposé dans la figure 11 (p. 52).

c) Influence de l'environnement glucidique

Blanken *et al.*(-18-) trouvent que la galactose ($\alpha 1-3$) galactosyltransférase purifiée de thymus de Veau branche du galactose préférentiellement sur l'antenne $\text{Man}_{\alpha}1,6\text{-Man}$ des biantennés. Ces différences de spécificité de branchement trouvées chez les N-acétylglucosamine transférases signifieraient que ce n'est pas la nature des accepteurs qui contrôlerait la galactosylation mais une haute spécificité de reconnaissance pour la structure tridimensionnelle des accepteurs.

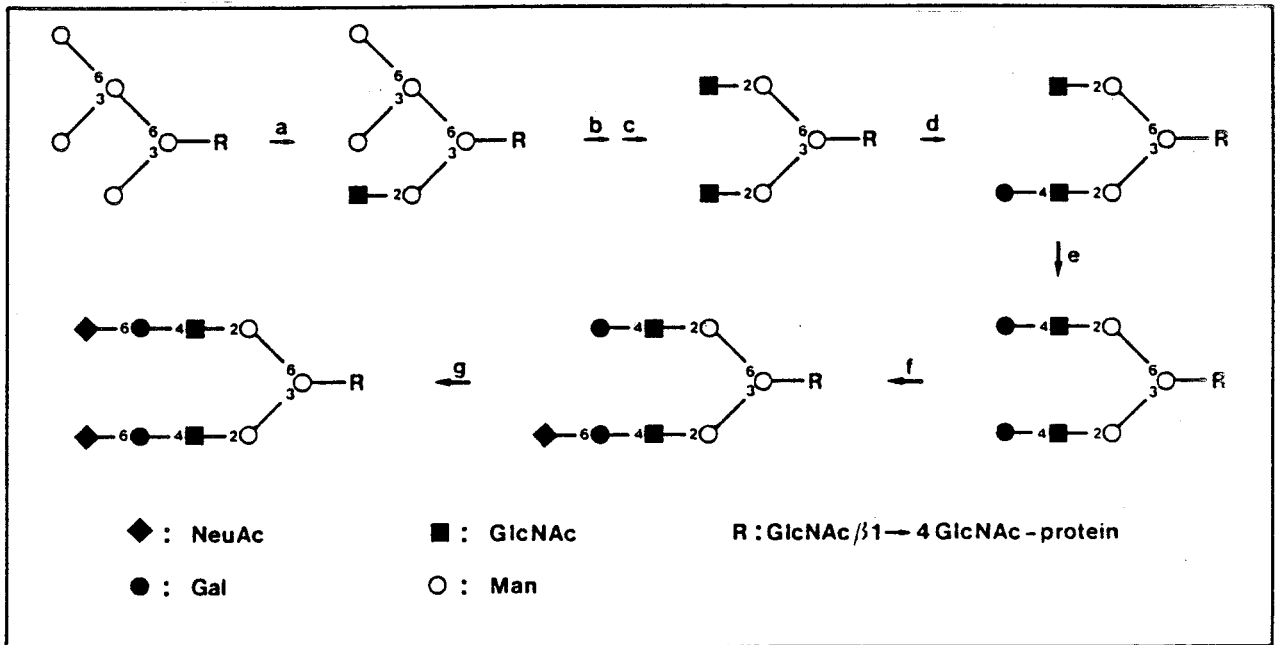


FIGURE 11: Voie préférentielle de synthèse des parties glycaniques liées

N-glycosidiquement, biantennées et bisialylées.

Les étapes sont: a) addition de GlcNAc par la N-acétylglucosaminyl-transférase I
 b) élimination de deux Man par la mannosidase II
 c) addition de GlcNAc par la N-acétylglucosaminyltransférase II
 d et e) addition préférentielle de deux Gal par la β 1-4galactosyltransférase
 f et g) addition préférentielle de deux acides sialiques par la α 2-6 sialyltransférase.

(Fig. tirée de la thèse de W. BLANKEN-19-)

Il est également démontré que la présence du premier galactose branché sur la première branche des glycoprotéines biantennés diminue considérablement la galactosylation sur la seconde antenne (Narasinham *et al.*, -127- ; Rao et Mendicino -158-). Pour N-acétylglucosamine β 1-4 galactosyltransférase des mésentères de Porc, les constantes d'affinité pour les glycopeptides d'IgG et pour l'UDP-Gal augmentent parallèlement avec le taux de galactosylation de la première branche des glycoprotéines biantennées.

La présence d'acide sialique bloque la galactosylation, il contrôle ainsi le degré de synthèse de la chaîne glycanique (Blanken *et al.*, -17 b- ; Rao et Mendicino -158- ; Taniguchi *et al.*, -193-). Cependant, la galactosylation du ganglioside GM2 est réalisée au même taux en présence ou non d'acide sialique (Kaplan et Hechtman -88 II-).

Enfin, la présence d'un résidu de GlcNAc intercalaire diminue jusqu'à 80 % le taux de galactosylation des branches des glycoprotéines biantennés. Cela provient de l'encombrement stérique de cette N-acétylglucosamine intercalaire qui gêne la galactosylation (Brisson et Carver -22-).

Berman et James (-14 b-) prouvent que la N-acétylglucosamine intercalaire peut être galactosylée alors que Blanken *et al.*, (-17 b-) et Narasimhan *et al.*, (-127-) n'ont jamais trouvé de galactose branché sur la N-acétylglucosamine intercalaire des glycoprotéines biantennés.

D - CARACTÉRISTIQUES DES GALACTOSYLTRANSFÉRASES

1 - Localisation

Les galactosyltransférases et notamment l'activité N-acétylglucosa-

mine (β 1-4) galactosyltransférase apparaissent dans de nombreuses cellules. Elles sont très souvent localisées à l'intérieur des cellules au niveau de la membrane de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique (Andersson et Ericksson -1- ; Pestalozz *et al.* -146-). Le rôle à ce niveau est l'élongation de la chaîne glycanique des glycoconjugués (Berger et Hesford -13- ; Gist Farquhar et Palade -65-).

Les mesures de l'activité galactosyltransférase sont couramment utilisées comme marqueur spécifique pour les études de fractionnement des membranes de l'appareil de Golgi (Bretz *et al.* -20-). De plus, pour certaines cellules hautement spécialisées, la N-acétylglucosamine galactosyltransférase se retrouve aussi à la surface des cellules (Pierce *et al.* -148-).

Dans les cellules embryonnaires de Carcinome (Shur -173-174-), l'ectogalactosyltransférase participe aux interactions cellulaires en tant que récepteur d'un glycoconjugué. Shur (-174-) démontre en outre que cette galactosyltransférase est une enzyme dépendante du Ca^{2+} permettant l'adhésion des cellules.

Dans le sperme de Souris, l'ectogalactosyltransférase est un récepteur du gamète pendant la fertilisation (Lopez *et al.* -106-), elle permet la fixation à la zone pellucide de l'ovaire (Shur et Hall -172-).

Enfin, les N-acétylglucosamine galactosyltransférases se trouvent dans de nombreux liquides biologiques (lait, liquide amniotique, liquide céphalorachidien, salive, urine, colostrum, sérum) (Schachter et Roden -165-).

2 - Comparaison des formes solubles et membranaires

De nombreux auteurs ont comparé la N-acétylglucosamine (β 1-4) galactosyltransférase intégrée dans les membranes et en solution dans des liquides biologiques.

Peu de différences existent entre les deux formes. Du point de vue enzymatique, chez le Rat, les N-acétylglucosamine galactosyltransférases des membranes de l'appareil de Golgi de foie comparée à celle du sérum montrent de très grandes similitudes et, seules les constantes affinités pour les substrats sont très légèrement différentes (Pâquet et Moscarello -140-).

D'un point de vue immunologique, Berger *et al.* (-12-) concluent à une très grande similitude structurale des N-acétylglucosamine galactosyltransférases obtenues de différents liquides biologiques, comparées à celle des cellules HeLa.

Les N-acétylglucosamine transférases des membranes de glandes mammaires diffèrent des N-acétylglucosamine transférases du lait par des propriétés hydrodynamiques (Gmeiner -67-, Fraser *et al.* -57-). Cependant, Gmeiner (-67-) prouve que la N-acétylglucosamine transférase, intégrée dans les membranes des cellules de carcinome mammaire humain est de la forme amphiphile et que, par dégradation protéolytique, elle passe à une forme hydrophile comparable à celle du lait.

Enfin, les études de Appert *et al.* (3 bis) indiquent que le mRNA de la galactosyltransférase préparée du foie humain code pour les deux formes de l'enzyme (soluble et intégrée aux membranes). L'auteur pense que la forme enzymatique soluble dérive de l'action protéolytique de la forme enzymatique intégrée aux membranes.

3 - Compositions glucidique et amino-acide des galactosyltransférases

La N-acétylglucosamine (β 1-4) galactosyltransférase du lait de vache est une glycoprotéine (Ebner -45-) qui contient 12 % de glucides (Trayer et Hill -197-) se répartissant comme suit :

	Man	Gal	GlcNAc	GalNAc	Fuc	NeuAc
Par molécule enzymatique	6,8	8,9	6	7	1,7	5
Rapport molaire	3	4	3	3	1	2

La N-acétylglucosamine transférase serait composée d'au moins trois glycannes liées N- et O- glycosidiquement. L'acide sialique n'existe pas toujours dans les différentes fractions (Lehman *et al.*-100-).

Cette connaissance peut servir pour la purification des N-acétylglucosamine transférases qui ont la propriété de se fixer sur un support de Concanavalline-Sépharose (Wong *et al.*-209-, Chatterjee *et al.*-30-).

Différentes activités de N-acétylglucosamine galactosyltransférases peuvent aussi être séparées par chromatographie sur DEAE-sépharose grâce à leur différent degré de sialylation (Furukawa et Roth -60-).

Enfin, la composition amino-acide a été déterminée sur certaines galactosyltransférases (Trayer and Hill -197-, Appert *et al.*-31-), Navaratnam *et al.*-130-). Il apparaît une très grande similitude des galactosyltransférases d'origines différentes (cf. Tableau VI bis p. 57) avec une dominance des acides aminés Asp, Glu, Pro, Gly et le Leu.

TABLEAU VI bis: Composition amino-acide de la galactosyltransférase. Sont indiqués, le nombre de chaque acide aminé pour 100 résidus des différentes galactosyltransférases trouvées dans le lait Humain (APPERT et al.-3bis-), le lait de Vache(TRAYER et al.-197-) et les glandes mammaires de Rat(NAVARATNAM et al.-130-).

ACIDE AMINE	Résidus dans la galactosyltransférase			
	glande mam- maire de Rat-46 kDa-	glande mam- maire de Rat-43 kDa	lait Hu- main	lait de Vache
	%			
Asp	14,1	12,7	13,5	12,4
Thr	4,4	4,0	3,8	5,2
Ser	7,9	7,5	7,1	8,0
Glu	9,3	9,6	8,2	9,4
Pro	8,5	7,8	9,8	7,3
Gly	10,1	10,8	9,6	8,1
Ala	5,5	5,7	5,6	5,0
Val	5,4	5,6	7,2	5,8
Ile	5,3	5,7	4,4	4,4
Leu	7,9	8,8	8,2	8,9
Tyr	2,3	2,1	4,2	5,1
Phe	4,3	5,1	3,9	5,3
His	2,4	2,3	2,7	3,6
Lys	6,1	6,1	2,2	5,8
Arg	6,7	6,3	7,5	5,6

4 - Site Actif-Interaction avec l' α -lactalbumine

a) Contrôle de l'activité enzymatique

L'enzyme du lait est une galactosyltransférase identifiée à la protéine A de la lactose synthétase (Brew *et al.*-21-), la protéine B étant l' α -lactalbumine qui ne possède aucune activité enzymatique. La lactose synthétase présente une faible affinité pour le glucose mais peut néanmoins synthétiser du lactose en utilisant des concentrations élevées de glucose.

En présence d' α -lactalbumine, l'affinité de la protéine A pour le glucose est 1000 fois supérieure (Ebner -46-). En l'absence d' α -lactalbumine, la N-acétylglucosamine galactosyltransférase transfère du galactose sur la N-acétylglucosamine pour former de la N-acétyllactosamine, ou plus généralement sur des glycoconjugués avec un résidu de GlcNAc en position terminale non réductrice. Les N-acétylglucosamine (β 1-4) galactosyltransférase d'autres origines (liquides biologiques, tissus) peuvent former du lactose en présence d'un apport exogène en α -lactalbumine.

Dans le cas du lait, la présence ou l'absence d' α -lactalbumine contrôle le taux de synthèse du lactose (Khatra *et al.*-90-).

b) Le site de fixation

Takase et Ebner (-192-) suggèrent qu'un résidu tryptophane est impliqué dans l'interaction protéine A - protéine B et que deux résidus de lysine sont localisés sur, ou près du site d'interaction (Richardson *et al.*-160- ; Sinha *et al.*-175- ; Shewale *et al.*-171-).

O'Keefe *et al.* (-136-) démontrent que le site de fixation de l' α -lactalbumine sur l'enzyme est différent du site accepteur du substrat. L' α -lactalbumine n'interagit pas avec le domaine de fixation de l'UDP-Gal (Lee *et al.* -99-). Enfin, la partie glycanique de la N-acétylglucosamine galactosyltransférase n'est pas impliquée dans les interactions avec l' α -lactalbumine (Wong *et al.* -209-).

En revanche, l' α -lactalbumine interagit au niveau, ou près, du site accepteur du galactose.

O'Keefe (-136-) a proposé une représentation du site actif de la transférase (Fig.12; p.60). La N-acétylglucosamine galactosyltransférase contient deux sites de liaison pour les ions métalliques : le site I pour les ions Mn^{2+} , le site II pour certains métaux tels que la Ca^{2+} ou Co^{2+} , l'affinité pour ces derniers étant cependant très faible. Le site II est associé au site de fixation de l'UDP-Gal, un résidu sulfhydryl proche du site de l'UDP-Gal se lie au site I.

Le site de fixation de l'accepteur à glycosyler est très proche de la zone d'interaction pour l' α -lactalbumine. Cette localisation a une grande influence sur le comportement de la N-acétylglucosamine galactosyltransférase vis-à-vis des accepteurs (Lambright *et al.* -96-)

c) Relation α -lactalbumine/accepteur

A de faibles concentrations en N-acétylglucosamine, l' α -lactalbumine active la N-acétylglucosamine galactosyltransférase, mais à de hautes concentrations elle devient inhibitrice du transfert (Johnson *et al.* -85-). Les cinétiques de cette inhibition de type mixte indiquent qu'un complexe quaternaire entre la N-acétylglucosamine galactosyltransférase, l' α -lactalbumine, Mn^{2+} -UDPGal et la N-acétylglucosamine existe pendant le processus de catalyse. Le résultat suggère que l' α -lactalbumine ne couvre pas le domaine accepteur du galactose (Johnson *et al.* -85- ; O'Keefe -136-).

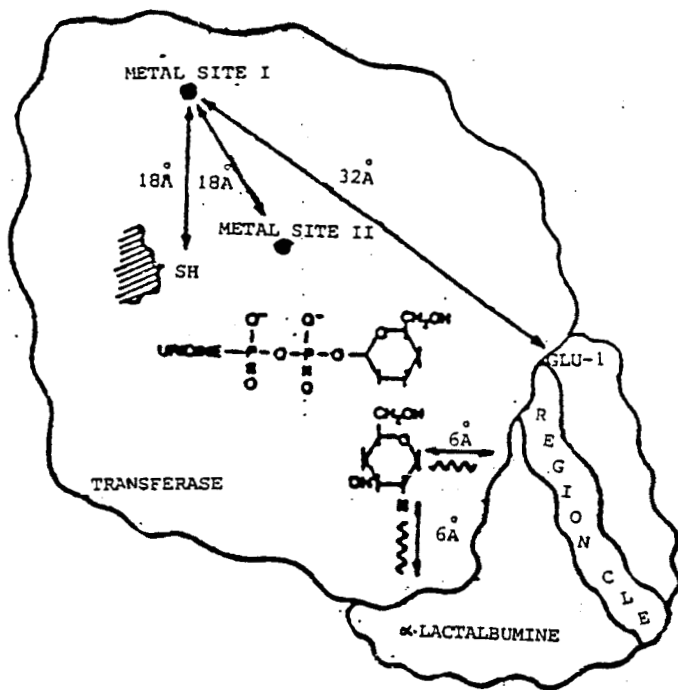


FIGURE 12: Représentation schématique du site actif de la galactosyl-
transférerase de bovin, et son interaction avec l' α -lactalbumine .
(O'KEEFEE-136 -).

L'effet inhibiteur de l' α -lactalbumine pour la formation de la N-acétyllactosamine est probablement une conséquence des changements conformationnels de la N-acétylglucosamine transférase (Lambright *et al.*-96-).

La fixation de l' α -lactalbumine peut être bloquée quand l'accepteur à glycosyler est un glucide comprenant plus d'atomes de carbone (O'Keefe -136-), alors que Lambright (-96-) trouve que la liaison avec l' α -lactalbumine et les composés à N-acétylglucosamine est mutuellement exclusive.

Il en résulte que dans les glandes mammaires en lactation où l' α -lactalbumine est synthétisée en quantités importantes qui peuvent atteindre, chez certains mammifères, 5,5 mg/ml, la liaison des glycoprotéines à la galactosyltransférase est inhibée de façon compétitive mais pas complètement impossible, alors que l'affinité pour le glucose est considérablement augmentée et conduit à la production du lactose.

II - PURIFICATION DES GALACTOSYLTRANSFÉRASES

A - MODES DE PURIFICATION

C'est à partir de 1970 que les premières purifications de galactosyltransférases ont abouti. Elles incluent des étapes de chromatographie d'affinité. Des exemples de purification de galactosyltransférases sont présentés dans le Tableau VII p. 62 à 66.

L'affinité sur les supports chromatographiques sont en général possibles par l'addition d'ions Mn^{2+} (avec UDP ou GlcNAc immobilisé) ou Mn^{2+} et N-acétylglucosamine ou glucose (avec l' α -lactalbumine immobilisé).

ORIGINE	LAIT HUMAIN	LAIT DE VACHE	LAIT DE VACHE	LAIT HUMAIN	LAIT DE VACHE
TYPE DE LIAISON	Gal (β 1-4) GlcNAc ou lactose synthétase	Gal (β 1-4) GlcNAc ou lactose synthétase	Gal (β 1-4) GlcNAc ou lactose synthétase	Gal (β 1-4) GlcNAc ou lactose synthétase	Gal (β 1-4) GlcNAc ou lactose synthétase
MODE DE PURIFICATION	1-Précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄ 2-Gelfiltration sur Sépharose 6B 3-Précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄ 4-Gelfiltration sur Bio-gel P 100 5-Chromatographie d'affinité (C.A.) sur αlactalbumine-Sépharose	1-DEAE - Séphadex 2-Chromatographie sur Cellulose Phosphate 3-C.A. sur αlactalbumine-Sépharose 4-C.A. sur αlactalbumine-Sépharose	1-Précipitation acide 2-C.A. sur UDP-Sépharose 3-C.A. sur GlcNAc-Sépharose 4a-C.A. sur GlcNAc-Sépharose ou 4b-C.A. sur αlactalbumine-Sépharose	1-Gelfiltration sur Séphadex G-150 2-C.A. sur αlactalbumine-Sépharose 4B 3-C.A. sur αlactalbumine-Sépharose 4B	1-Précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄ 2-Chromatographie sur Norleucine-Sépharose (éluée par un gradient (NH ₄) ₂ SO ₄) 3-C.A. sur UDP-Sépharose 4-C.A. sur αlactalbumine-Sépharose
SPECIFICITE OU REMARQUES				Stabilisée par le sérum albumine bovine et le Triton X 100	Stabilisée par 100mM de (NH ₄) ₂ SO ₄ ou 100 mM ε amino-n-acide caproïque
MASSE MOLECULAIRE ESTIMEE	40-42 kDa en PAGE-SDS 60 kDa par gelfiltration	44 kDa en PAGE-SDS 40 kDa par gelfiltration	54 kDa + 49 kDa + 43kDa en PAGE-SDS	50 kDa + 96 kDa en PAGE-SDS	2 formes en PAGE-SDS
DEGRE DE PURIFICATION (augmentation de l'activité spécifique)	x 1150 AS = 5,74 μmole d'UDP formé / min ⁻¹ mg ⁻¹ protéine	x 11750 AS = 14,1 μmole Gal incorporé / min ⁻¹ mg ⁻¹ protéine = 14,1n Unités	x 5000 AS = 11,6 μ Unités	60 % de rendement	x 6000 AS = 5,6 μ mole lactose formé / min/mg protéines
REFERENCES	Andrews - 1970 - 3 -	Trayer et Hill - 1971 -197-	Barker et al. - 1972 - 7 -	Khatra et al. - 1974 -90-	Geren et al. - 1976 -63-

Abréviations : CA = Chromatographie d'affinité
AS = Activité spécifique
PAGE-SDS = Electrophorèse en gel de polyacrylamine en présence de SDS
1 unité enzymatique = 1 mole de galactose incorporé . min⁻¹ . mg⁻¹ de protéine
As = asialo-
Ag = agalacto-
OSM = mucine sous maxillaire de Mouton
AGP = α₁-acide glycopeptide (orosomucoïde)

TABLEAU VII : Purification des galactosyltransférases

ORIGINE	COLOSTRUM DE VACHE	LAIT HUMAIN LIQUIDE AMNIOTIQUE ASCITES MALIGNES	GLANDES MAMMAIRES DE MOUTON	SERUM DE VEAU FOETAL	SERUM HUMAIN
TYPE DE LIAISON	Gal (β1-4)GlcNAc	Gal (β1-4)GlcNAc	Gal (β1-4)GlcNAc	Gal (β 1-4)GlcNAc	Gal (β 1-4)GlcNAc
MODE DE PURIFICATION	1-Précipitation acide 2-CA sur p-aminophényl-GlcNAc- Eupergit C (puis dialyse) 3-CA sur UDP-hexanolamine-Sépharose	1-Précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄ pour le lait et acide pour les autres 2-CA sur GlcNAc-Sépharose 3-CA sur αlactalbumine-Sépharose	1-Solubilisation au Triton X 100 2-Gelfiltration Biogel P150 3-CA sur UDP-Sépharose 4-CA sur αlactalbumine-Sépharose 5-CA sur αlactalbumine-Sépharose	1-Précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄ 2-CA sur ovalbumine-Sépharose 3-CA sur UDP-Sépharose 4-CA sur αlactalbumine-Sépharose 5-CA sur αlactalbumine-Sépharose 6-CA sur αlactalbumine-Sépharose	1-Précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄ 2-CA sur αlactalbumine-Sépharose 3-CA sur αlactalbumine-Sépharose
SPECIFICITE OU REMARQUES	Galtf active sur GlcNAc et oligosaccharides à GlcNAc terminale	hétérogénéité des charges des différentes Galtf	Galtf active sur GlcNAc, ovalbumine et Glc + α lactalbumine. Activation par Mn ²⁺ et Ca ²⁺	Galtf active sur GlcNAc et ovalbumine	Galtf active sur de nombreuses glycoprotéines avec une GlcNAc en position terminale
MASSE MOLECULAIRE ESTIMEE		55 kDa en PAGE SDS pour toutes les origines	69 kDa + 53 kDa en PAGE SDS 65 kDa + 55 kDa en gelfiltration	47,8 kDa en PAGE SDS	70-80 kDa en PAGE SDS 85-90 kDa en gelfiltration
DEGRE DE PURIFICATION (augmentation de l'activité spécifique)	X 7800 AS = 8 μUnités		X 7400 AS = 16,6 n Unités	X 19 600 AS = 8,5 μUnités	X 28 000 AS = 0,535 μUnités
REFERENCES	Blanken et al.- 1982 -17a-	Gerber et al.- 1979 -62-	Smith et Brew - 1977 -178-	Turco et Heath - 1976 -200-	Bella et al.- 1977 -10-

Abréviations : CA = Chromatographie d'affinité
AS = Activité spécifique
PAGE-SDS = Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS
1 unité enzymatique = 1 mole de galactose incorporé . min⁻¹ . mg⁻¹ de protéine
As = asialo-
Ag = agalacto-
OSM = mucine sous maxillaire de Mouton
AGP = α₁-acide glycopeptide (orosomucoïde)

TABLEAU VII(suite)

ORIGINE	SERUM HUMAIN	SERUM DE RAT	FOIE DE RAT	SERUM DE RAT	GOLGI DES CELLULES DE FOIE DE RAT	EFFUSIONS MALIGNES HUMAINES	EFFUSIONS MALIGNES HUMAINES
TYPE DE LIAISON	Gal (β1-4)GlcNAc	Gal(β1-4)GlcNAc		Gal(β 1-4)GlcNAc		Gal (β 1-4)Nac 2 activités Galtf	Gal(β 1-4)GlcNAc
MODE DE PURIFICATION	1-Gelfiltration sur Sépharose 4B 2-CA sur αlactalbumine-Sépharose 3-CA sur αlactalbumine-Sépharose	1-CA sur αlactalbumine-Sépharose 2-CA sur αlactalbumine-Sépharose	1-Solubilisation au Triton X100 2-Gelfiltration sur Séphadex G 200	1-CA sur αlactalbumine-Sépharose 2-CA sur UDP-hexanolamine	1-Solubilisation au Triton X100 2-CA αlactalbumine-Sépharose 3-CA sur UDP hexanolamine	1-Précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄ 2-Chromatographie hydrophobe sur Norleucine-Sépharose 3-Précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄ 4-DEAE-cellulose 5-CA sur αlactalbumine-Sépharose 6-CA sur GlcNAc-Sépharose	1-Précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄ 2-CA sur αlactalbumine-Sépharose 3-CA sur GlcNAc-Sépharose 4-Chromatographie avec les anticorps antisérum normal humain immobilisés 5-Chromatographie avec anti-IgG humain immobilisés
SPECIFICITE OU REMARQUES		Activation de la Galtf par Triton X100, même pour celle du sérum		* Très instables après les deux chromatographies d'affinité * Très grandes similitudes vis-à-vis des paramètres enzymatiques		2 activités séparées : GaltfI et GaltfII Mêmes caractéristiques pour les ions Mn ²⁺ , UDP-Gal et ovalbumine km Fétuine GamTfII = 10 xkm fétuine GaltfI	Protection de l'activité par le TritonX100 Elimination des Immunoglobulines contaminantes
MASSE MOLECULAIRE ESTIMEE	49 kDa en PAGE-SDS 80 kDa en gelfiltration	Masse moléculaire de la Galtf du foie supérieure à celle de Galtf du sérum				GaltfI : 54 kDa GaltfII : 76 kDa déterminée par gelfiltration	
DEGRE DE PURIFICATION (augmentation de l'activité spécifique)	X 28 600 AS = 10,9 μUnités	X 6500 AS = 66 μUnités	X 6 AS = 0,05μ Unité	X 140 000 AS = 2,5μ Unité	X 7 900 AS = 2,2μ Unités	GaltfI : X 4 300 GaltfII : X 5 400	X 48 000 AS = 480μ Unités
REFERENCES	Fujita-Yamaguchi et Yoshida - 1981 -59-	Fraser et Mookerjea - 1976 -57-		Pâquet et Moscarello - 1984 -140-		Podolky et Weiser - 1979 -153-	Wilson et al. - 1982 -207-

Abréviations : CA = Chromatographie d'affinité
AS = Activité spécifique
PAGE-SDS = Electrophorèse en gel de polyacrylamine en présence de SDS
1 unité enzymatique = 1 mole de galactose incorporé . min⁻¹ . mg⁻¹ de protéine
As = asialo-
Ag = agalacto-
OSM = mucine sous maxillaire de Mouton
AGP = α-acide glycopeptide (orosomucoïde)

TABLEAU VII (suite)

ORIGINE	ASCITES D'OVAIRE DE PATIENTS CANCEREUX	MEMBRANES DE MICROSOAMES DE FOIE DE RAT	NOUVEAU LYMPHATIQUE DE MESSAGES DE PORC	SÉRUM HUMAIN DE SUJETS DU GROUPE A & O	CELLULES DE B H K	FOIE D'EMBRYON DE POULET
TYPE DE LIAISON	2 isoformes de la Gal (β1-4)GlcNAc Galtf	Gal (β1-4)GlcNAc	Gal (β1-4)GlcNAc	Gal (β1-3)GalNAc Gal (β1-3)GlcNAc	Gal (β1-4)GlcNAc Gal (β1-3)GalNAc	Gal (β1-4)GlcNAc Gal (β1-3)GalNAc
MODE DE PURIFICATION	1-Précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄ 2-CA sur αlactalbumine-Sépharose 3-CA sur GlcNAc-Sépharose 4-CA sur αlactalbumine-Sépharose 5-Chromatographie sur Concanavalline A-Sépharose (élue par 10% de méthyl-mannoside)	1-Solubilisation au Triton X 100 2-CA sur αlactalbumine-Sépharose	1-Précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄ 2-Chromatographie sur DEAE-Biogel A 3-CA sur p-aminophényl-GlcNAc-Sépharose	1- CA sur GlcNAc-Agarose	1-Solubilisation au Triton X 100 2-CA sur αlactalbumine-Sépharose	1-Solubilisation au Triton X 100 2-Geifiltration sur Biogel A 1-5 m 3-DEAE-Sépharose 4-CA sur UDP-hexanolamine-Sépharose 5-CA sur αlactalbumine Sépharose 6a-CA sur GlcNAc-Sépharose 7a-CA sur As-Ag-glycopeptide-Sépharose 6b-CA sur As-OSM-Sépharose
SPECIFICITE ET REMARQUES	Transfert de Gal sur des glycopeptides liés O-et N-glycosidiquement	Activité sur GlcNAc AsAg-Féruine et Gic + αlactalbumine	Activation par le Triton X 100 Activité sur glycoprotéines et oligosaccharides à GlcNAc terminale et les chaînes lourdes des IgG de Porc comme accepteur endogène	La(β1-3)Galtf n'est pas retenue par le support d'affinité	(β1-4)Galtf, transfert sur GlcNAc et ovalbumine (β1-3)Galtf transfert sur la mucine bovine	β1-4 Galtf active sur GlcNAc, AsAgGP mais un peu sur GalNAc β1-3 Galtf active sur AsOSM, ganglioside GM ₂ mais un peu sur GlcNAc
MASSE MOLECULAIRE ESTIMEE	47,6 kDa en PAGE-SDS 155 kDa et 75 kDa en Geifiltration	65-70 kDa en PAGE-SDS	57 kDa en PAGE-SDS et Geifiltration			68 kDa en PAGE-SDS toutes les deux
DEGRE DE PURIFICATION (Augmentation de l'activité spécifique)	x 100 000	x 680 AS = 62,5n Unités	x 2200 AS = 35n Unités	Purification partielle	80 % de l'activité(β1-4) Galtf sur ovalbumine est retenue sur le support d'affinité 50 % de l'activité(β1-3) Galtf. est retenue	(β1-4)GlcNAc : x 7000 AS = 65,6n Unités (β1-3)GalNAc : x 4000 AS = 4,3n Unités
REFERENCES	Chatterjee et al.- 1985 -30-	Fraser et Mookerjee - 1977 -58-	Reo et al. - 1976 -157-	Berger et al. - 1978 -11-	Gleeson et al.- 1984 -66-	Furukawa et Roth - 1985 -61-

Abréviations : CA = Chromatographie d'affinité
AS = Activité spécifique
PAGE-SDS = Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS
1 unité enzymatique = 1 mole de galactose incorporé . min⁻¹ . mg⁻¹ de protéine
As = asialo-
Ag = agalacto-
OSM = mucine sous maxillaire de Mouton
AGP = α₁-acide glycopeptide (orosomucoïde)

TABLEAU VII (suite)

ORIGINE	TRACHEE DE PORC	FOIE DE RAT	THYMUS DE VEAU	TUMEURS D'ASCITES D'EHRlich	SERUM HUMAIN DE SUJETS DU GROUPE B	FOIE DE RAT
TYPE DE LIAISON AVEC le Gal	β1-4)GlcNAc (différente de la lactose synthase) lactose synthase β1-3)GlcNAc	(β1-3)GM ₂ 2 activités séparées	(β1-4)GlcNAc (α1-3)Gal	(α1-3)Gal	(α1-3)Fucosylactose	(α1-4)LacCer
MODE DE PURIFICATION	1-Solubilisation au Triton X 100 2-CA sur αlactalbumine-Sépharose 3-CA sur AsOSM-DEAE-Séphacel 4-CA sur UDP-hexanolamine-Sépharose 5-Gelfiltration sur Séphacryl S 200	1-Solubilisation au Triton X 100 2-Gelfiltration sur Sépharose CL-6B 3-DEAE-Sépharose UDP	1-Solubilisation au Triton X 100 2- CA sur UDP-Sépharose 3-CA sur αlactalbumine-Sépharose 4-CA sur Sépharose 6B	1-Solubilisation au Triton X 100 2-CA sur αlactalbumine-Sépharose 3-CA sur UDP-Sépharose 4-CA sur UDP-Sépharose 5-CA sur βGlcNAc-Synsorb	1-Chromatographie sur CM Séphadex 2-Précipitation au (NH ₄) ₂ SO ₄ 3-Gelfiltration sur Séphadex S-200 4-DEAE-Séphadex 5-Chromatographie sur hydroxyapatite	1-Solubilisation au Triton X 100 2-CA sur UDP-hexanolamine-Sépharose 3-CA sur LacCer-Sépharose 4-CA sur LacCer-Sépharose 5-Gelfiltration sur Séphadex G 150
SPECIFICITES ET REMARQUES	β1-4)GlcNAc Galtf différente de la lactose synthase, inhibée par 200mM de GlcNAc, ne transfère pas sur Glc + αlactalbumine	Activité à la fois sur le GM ₂ et As-GM ₂ Activité I à pH 7,0 Activité II à pH 6,0	Activité (α1-3)Gal sur lactosamine et glycoprotéines ou oligosaccharides à LacNAc en position terminale Peu de transfert sur lactose. Pas de transfert sur le fucosylactose	Mêmes activités que trouvées par Blanken -18-	Activité sur le fucosylactose	Activité sur LacCer ainsi que lactose Ions activateurs Mn ²⁺ et un peu Cu ²⁺ et Ni ²⁺
MASSE MOLECULAIRE ESTIMEE		38 kDa toutes les deux en PAGE-SDS 43,5 kDa par sédimentation en gradient de sucrose	β1-4 : 51 kDa + 41 kDa en PAGE-SDS 83 kDa + 59 kDa en gelfiltration α1-3 : 39 kDa en PAGE-SDS 150 kDa + 43 kDa en gelfiltration	80 kDa en PAGE-SDS	40 kDa en PAGE-SDS 80 kDa en gelfiltration	65 kDa + 22 kDa en PAGE-SDS 90 kDa par sédimentation
DEGRE DE PURIFICATION (Augmentation de l'activité spécifique)	Lactose synthase, seule retenue par CA sur αlactalbumine 70 % de β1-4)GlcNAc séparée de la β1-3)GlcNAc après la 5ème étape	x 120 et 140 (activité I et II) ASI = 78p Unités ASII = 93p Unités	β1-4 x 101 000 AS = 15,3μ Unités α1-3 : x 44 000 AS = 4,3μ Unités	x 205 000 AS = 265μ Unités	x 430000 AS = 0,7μ Unités	x 3300 AS = 4,6μ Unités
REFERENCES	Sheares et Carlson - 1984 -170-	Kaplan et Hechtman - 1983 -88II-	Blanken et al.- 1985 -18-	Elices et al.- 1986 -47-	Nagai et al.- 1978 -125-	Taniguchi et al.- 1985 -193-

Abréviations : CA = Chromatographie d'affinité
AS = Activité spécifique
PAGE-SDS = Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS
1 unité enzymatique = 1 mole de galactose incorporé . min⁻¹ . mg⁻¹ de protéine
As = asialo-
Ag = agalacto-
OSM = mucine sous maxillaire de Mouton
AGP = α₁-acide glycopeptide (orosomucoïde)

TABLEAU VII(suite)

L'élution de l'enzyme est réalisée généralement en omettant les ions Mn^{2+} du tampon avec ou sans EDTA et en éliminant le glucose ou la N-acétylglucosamine. Dans de très nombreux cas, l'apport de chlorure de sodium 1M ou d'urée 0,6 M ou de KSCN 0,5 N est souvent indispensable à l'élution de l'enzyme.

B - LES GALACTOSYLTRANFÉRASES DU LAIT

1 - Hétérogénéité des masses moléculaires pour une transférase

Les études sur la lactose synthétase purifiée du lait conduisent à une hétérogénéité moléculaire de cette galactosyltransférase. Magee *et al.* (-109-) trouvent deux formes moléculaires, de masse moléculaire 42,000-44 000 et 55,000-59,000 daltons déterminé par électrophorèse et chromatographie de tamisage moléculaire sur Biol-Gel P-200. Les deux formes possèdent des propriétés catalytiques comparables vis-à-vis du K_m apparent pour l'UDP-Gal, GlcNAc et α -lactalbumine.

Prieels *et al.* (-156-), cependant, trouvent une considérable hétérogénéité en électrophorèse de gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE) avec trois formes majeures : 50, 43 et 38 kDa, respectivement attribuée à une dégradation protéolytique.

Des différences appréciables sont observées entre les deux formes enzymatiques 50 kDa et 38 kDa, vis-à-vis de la synthèse du lactose et de la N-acétyl lactosamine. L'effet inhibiteur de l' α -lactalbumine sur l'activité de synthèse de la N-acétyl-lactosamine par la transférase de 38 kDa, devient activateur pour la transférase de 50 kDa. Il semble probable que la protéolyse partielle de la protéine A du lait humain affecte la synthèse du lactose et de la N-acétyllactosamine par une association - dissociation différente avec l' α -lactalbumine.

2 - Protéolyse de la transférase

Les études de Magee *et al.* (-108-) concernant la protéolyse trypsique et chymotrypsique de la N-acétylglucosamine galactosyltransférase native de masse moléculaire 58 kDa, prouvent que les formes actives de masse moléculaire 42 - 38 et 25 kDa

apparaissent successivement pendant la protéolyse. Des fragments peptidiques de masse moléculaire inférieure à 20 kDa ne possèdent plus de chaînes glucidiques et l'activité enzymatique est considérablement diminuée, voire nulle.

On peut donc penser que, dans le lait, l'attaque protéolytique endogène dégrade la N-acétylglucosamine galactosyltransférase de haute masse moléculaire en une glycoprotéine de 20 kDa légèrement active.

3 - Variété des résultats

Khatra *et al.* (-90-) rapportent la présence d'une N-acétylglucosamine galactosyltransférase de 98 ou 100 kDa dans le lait humain, déterminée par SDS-PAGE et par chromatographie de tamisage moléculaire respectivement.



En utilisant des anticorps dirigés contre la galactosyltransférase du lait humain, Berger *et al.* (-12-) montrent que l'enzyme possède une masse moléculaire de 55 kDa déterminée en SDS-PAGE mais qu'une réaction croisée avec les anticorps est observée avec des bandes présentes à 110 kDa et 20 kDa.

Enfin, le colostrum de Porc renferme une galactosyltransférase de 98 kDa et 55 kDa, le lait et le colostrum humains une galactosyltransférase de 98 kDa plus 53 kDa, le lait de Vache une galactosyltransférase de 53 kDa plus 47 kDa plus 42 kDa et le colostrum de Mouton une galactosyltransférase de 53 kDa (Powell et Brew -154-).

L'ensemble de ces données est résumé au Tableau VIII p. 69.

TABLEAU VIII : Répartition de la masse moléculaire trouvée pour la (β 1-4)GlcNAc galactosyltransférase purifiée
(cf TABLEAU VII pour le complément d'information)

TEMOINS DE MASSE MOLE- CULAIRE	ORIGINE													
	Lait humain		Lait de Vache		Glande mammai- re de Mouton	Sérum de Veau	Sérum humain		Foie de Rat		Foie de Poulet	Thymus de Veau	Nodosités lymphati- ques de Porc	
94 kDa →														
67 kDa →														
43 kDa →														
30 kDa →														
20 kDa →														
14,4 kDa →														
REFERENCES	-3-	-90-	-62-	-197-	-7-	-178-	-200-	-10-	-59-	-58-	-191-	-61-	-18-	-157-

Symbole :  bandes présentes en P.A.G.E. SDS;  réaction croisée avec des anticorps spécifiques.

4 - Origine multigène

En 1986, Ulrich *et al.* (-201-) ont utilisé des anticorps monoclonaux dirigés contre la lactose synthétase du lait de Vache. Ces anticorps reconnaissent deux épitopes différents sur un fragment de 6 kDa qui est issu de la conversion de l'enzyme d'une taille de 48 kDa en un fragment de 42 kDa.

Enfin, Narimatsu *et al.* (-128-), en clonant la galactosyltransférase du lait de Vache, montrent qu'un peptide de 65 kDa peut être synthétisé par un système de traduction *in vitro* avec des mRNA multiples, de tailles différentes (4,5 - 2,2 et 1,8 kilobases) et d'extrémités 5' différentes, suggérant la possibilité d'une synthèse directe de protéines de taille plus faible.

La conversion protéolytique rencontrée *in vivo* dans le lait n'est donc peut-être pas la seule explication à l'existence des différentes formes enzymatiques qui ont été décrites.

C - LES GALACTOSYLTRANSFÉRASES DANS LE SERUM

Dans le sérum, la masse moléculaire de la galactosyltransférase n'est pas mieux définie. Elle possède une masse de 85 kDa déterminée en SDS-PAGE et par chromatographie de tamisage moléculaire dans le plasma humain (Bella *et al.* -10-) alors que Fujita-Yamaguchi et Yoshida (-59-) trouvent une galactosyltransférase du sérum humain à 49 kDa uniquement en SDS-PAGE et 80 kDa en chromatographie de tamisage moléculaire sur Sépharose G-100. Cette différence est attribuée à la forme dimérique de la galactosyltransférase native du sérum. L'existence

de cette forme dimérique est aussi la conclusion des travaux de Nagai *et al.* (-125-) pour la galactosyltransférase du sérum des sujets du groupe sanguin B (α 1-3-fucosyl-lactose) de 40 kDa en SDS-PAGE et 80 kDa par tamisage moléculaire.

Une galactosyltransférase du sérum de patients cancéreux se différencie, cependant, par sa taille moléculaire, de celle généralement trouvée chez les sujets normaux. De masse moléculaire 76 kDa déterminée en PAGE (Podoloky et Weiser -153-), cette galactosyltransférase (galactosyltransférase II) se distingue de la galactosyltransférase I (54 kDa) par une plus faible affinité pour le dérivé de la fétuine (désialylée et dégalactosylée) et par sa composition en amino-acides. Wilson *et al.* (-207-) trouvent néanmoins que cette dernière différence est la conséquence de la contamination de la galactosyltransférase II par des immunoglobines associées à la galactosyltransférase (IgA et IgG).

D - RELATIONS ENTRE LES GALACTOSYLTRANSFÉRASES SOLUBLES ET LES GALACTOSYLTRANSFÉRASES INTÉGRÉES

Les informations concernant les galactosyltransférases liées aux membranes sont plus restreintes.

L'origine de la galactosyltransférase du lait est la glande mammaire, celle du sérum est le foie (Kim *et al.* -91-).

En comparant les galactosyltransférases des glandes mammaires et du lait, ou celles du sérum avec le foie, il paraît logique de penser que les galactosyltransférases liées aux membranes subissent une dégradation protéolytique avant de se retrouver dans le liquide biologique (Gmeiner -67-).

Cette hypothèse semble se vérifier à la vue des résultats de purification comparative de différents auteurs.

Fraser et Mookerjea (-67-), Pâquet et Moscarello (-140-) trouvent que les spécificités des N-acétylglucosamine galactosyltransférases purifiées du foie et du sérum de Rat sont comparables ; seule l'influence du Triton X-100 et une masse moléculaire plus grande différencient la N-acétylglucosamine galactosyltransférase du foie de celle du sérum. En PAGE, la galactosyltransférase du foie a une masse moléculaire de 65-70 kDa (Fraser *et al.* -58-) ou 47,8 kDa dans le sérum de veau foetal (Turco et Heath -200-). La séquence des amino-acides des N-acétylglucosamine galactosyltransférases de foie et du sérum montre des différences très mineures (Fraser *et al.* -57-).

Dans la glande mammaire de Mouton, Smith et Brew (178) purifient une lactose synthétase comprenant deux formes distinctes par leur masse moléculaire : 69 kDa et 53 kDa. La forme retrouvée dans le colostrum de Mouton est de 53 kDa (Powell et Brew -154-).

L'origine de la N-acétylglucosamine galactosyltransférase du liquide amniotique pourrait provenir, soit du tissu foetal, soit de trophoblastes syncytiels placentaires.

L'origine de la N-acétylglucosamine galactosyltransférase II du sérum de patients cancéreux est incertaine.

E - LES AUTRES GALACTOSYLTRANSFÉRASES

I - Autres formes de transférases

Même si la N-acétylglucosamine (β 1-4) galactosyltransférase est la plus étudiée, des N-acétylglucosamine galactosyltransférases réalisant la liaison Gal (β 1-3) GalNAc (Berger *et al.* -11- ; Gleeson *et al.* -66- ; Furukawa et Roth -61-),

Gal (β 1-3)GlcNAc (Sheares et Carlson -170-), Gal (β 1-3) Ganglioside GM2 (Kaplan et Hechtman -88 II-), Gal (α 1-4) Lac Cer (Taniguchi *et al.* -193-), Gal (α 1-3) Fucosyl-lactose (Nagai *et al.* -125-), Gal (α 1-3)Gal (Blanken *et al.* -18- ; Elices *et al.* -47-) ont été partiellement ou totalement purifiées depuis peu.

Pour purifier des galactosyltransférases plus rarement rencontrées jusqu'à présent, les chromatographies d'affinité avec l'accepteur spécifique de la galactosyltransférase comme ligand immobilisé sur le support, conduisent généralement à un bon isolement de l'enzyme (exemples fournis par Taniguchi *et al.* -193- ou Elices *et al.* -47-).

Les chromatographies classiques sont toujours utilisées actuellement (Nagai *et al.* -142- ; Kaplan et Hechtman -88 II-).

2 - Une seconde N-acétylglucosamine (β 1-4) galactosyltransférase

Sheares et Carlson (-170-) parviennent cependant à séparer de la trachée de Porc trois N-acétylglucosamine galactosyltransférases de spécificités différentes : * Une nouvelle forme transférant du galactose sur la N-acétylgalactosamine par une liaison (β 1-3),

* la forme connue de la lactose synthétase

* et une troisième forme N-acétylglucosamine (β 1-4) galactosyltransférase qui n'a pas d'affinité pour l' α -lactalbumine immobilisée.

Cette dernière forme de galactosyltransférase a été mise en évidence dans la trachée de Porc, mais doit exister certainement dans d'autres tissus.

En effet, dans les cellules de reins de Hamster (BHK), Gleeson *et al.* (-66-) séparent deux types de N-acétylglucosamine (β 1-4) galactosyltransférase. 20 % de cette activité n'est pas retenue sur un support de chromatographie d'affinité avec l' α -lactalbumine immobilisée. L'activité spécifique de cette fraction déterminée pour

l'ovalbumine est plus importante que celle de la galactosyltransférase retenue sur le support de chromatographie. La fraction retenue est assimilée à la lactose synthétase.

La présence de cette «nouvelle» forme de N-acétylglucosamine (β 1-4) galactosyltransférase peut être la raison des mauvais rendements de purification obtenus très souvent après chromatographie d'affinité (Rao et Mendicino -157- ; Pâquet et Moscarello -140- ; Turco et Heath -200-).

3 - La N-acétylgalactosamine (β 1-3) galactosyltransférase

a) La purification

Concernant la N-acétylgalactosamine (β 1-3) galactosyltransférase, la purification semble plus difficile. Cette galactosyltransférase est retenue sur un support avec l' α -lactalbumine immobilisée (Gleeson *et al.* -66- ; Furukawa et Roth -61-). La N-acétylglucosamine galactosyltransférase isolée du sérum par Berger *et al.* (-11- -12-) n'est pas totalement retenue sur un support de N-acétylglucosamine-Agarose.

Furukawa et Roth (-61-) déclarent cependant avoir isolé la N-acétylglucosamine (β 1-4) galactosyltransférase de la N-acétylgalactosamine (β 1-3) galactosyltransférase à partir de foie d'embryon de Poulet, après 6 à 8 étapes de chromatographies classiques et de chromatographies d'affinité. La séparation finale est réalisée par chromatographie d'affinité avec l'asialo-agalacto- α 1 glycoprotéine acide (AsAgAGP) immobilisée sur laquelle la N-acétylglucosamine (β 1-4) galactosyltransférase est retenue spécifiquement et avec la mucine sous-maxillaire de Mouton désialylée immobilisée où la N-acétylgalactosamine (β 1-3) galactosyltransférase est retenue spécifiquement.

b) La spécificité d'action enzymatique

A l'égard des spécificités de substrat, la fraction retenue sur l'orosomucoïde désialylé et dégalactosylé (AsAgAGP) immobilisé, transfère du galactose sur la N-acétylglucosamine et l'AsAgAGP mais aussi sur la N-acétylgalactosamine et la mucine sous-maxillaire d'Ovin désialylés.

La fraction retenue sur la mucine sous-maxillaire de Mouton désialylée (AsOSM), quant à elle, transfère sur l'AsOSM et non sur la N-acétylgalactosamine et possède une activité résiduelle sur la N-acétylglucosamine et l'orosomucoïde désialylé et dégalactosylé.

c) Caractéristiques protéiques

Les deux galactosyltransférases ont le même comportement en chromatographie de tamisage moléculaire, sur DEAE-Sépharose, en chromatographie d'affinité sur UDPhexanolamine-Sépharose et α -lactalbumine-Sépharose, en électrophorèse sur acétate de cellulose et en électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (68 kDa de masse moléculaire pour les deux enzymes) et en électrophorèse de focalisation. Toutes deux sont inhibées par la α -lactalbumine.

L'ensemble de ces données suggère que les deux galactosyltransférases contiennent des séquences peptidiques communes. Cette hypothèse de Furukawa et Roth semble se vérifier grâce aux résultats du clonage de la N-acétylglucosamine (β 1-4) galactosyltransférase du lait de Vache (Narimatsu *et al.* -128-). Ils observent, en effet, qu'un premier plasmide de 3,7 kbases synthétise la N-acétylglucosamine (β 1-4) galactosyltransférase et qu'un second plasmide de 4,1 kbases code pour un polypeptide contenant 120 résidus carboxyl terminaux identiques au peptide synthétisé par le premier plasmide. Les auteurs suggèrent que le plasmide de 4,1 kbases code pour une galactosyltransférase aux structures identiques à la (β 1-4) galactosyltransférase mais aux spécificités enzymatiques différentes.

La question de savoir si la galactosyltransférase fait partie d'une famille multigène ou non est déjà soulevée par Shaper *et al.* (-169-) et Narimatsu *et al.* (-128-).

Des analyses futures des clones génomiques et des clones de cDNA individuels des transférases spécifiques devraient indiquer le ou les mécanismes impliqués dans la synthèse d'un grand nombre de transférases possédant des structures communes et des spécificités enzymatiques différentes.

III - CONCLUSION

Les galactosyl transférases étudiées jusqu'à présent semblent posséder toutes, des similitudes d'action.

Le spectre d'action en fonction du pH est large, mais l'optimum d'activité est obtenu à un pH acide proche de la neutralité. La molécule enzymatique est une glycoprotéine plus ou moins chargée possédant quelle que soit sa spécificité un site pour l'UDP-Gal, un site pour les ions Mn^{2+} , un site pour l' α -lactalbumine, un site pour l'oligosaccharide ou le glycoconjugué à glycosyler. Dans certains cas, un site de moindre importance pour d'autres cations est présent.

Pour certaines galactosyl transférases, l' α -lactalbumine est un co-facteur indispensable à l'activité, parfois un inhibiteur compétitif de l'accepteur à glycosyler jouant ainsi un rôle de régulateur de l'enzyme, ou enfin ne jouant aucun rôle connu mais ce site semble présent car l'enzyme se fixe à l' α -lactalbumine immobilisé.

Les galactosyltransférases ont une origine membranaire et comprennent des séquences hydrophobes qui leur confèrent des propriétés particulières vis-à-vis des lipides ou des détergents.

Elles sont particulièrement stables quand leur environnement est de nature protéique.

Cependant, les auteurs qui purifient les galactosyltransférases sont très rarement unanimes quant à la masse moléculaire des enzymes. L'hypothèse de cette hétérogénéité au sein même d'une famille de galactosyltransférases, est l'existence d'une protéolyse active mais encore inconnue qui induit des modifications dans la taille de la molécule et parfois même dans la spécificité ou la régulation de l'enzyme.

Ce qui différencie essentiellement les galactosyltransférases entre elles, est leur spécificité d'action. A chaque type de liaison rencontrée correspond une gamme très limitée d'accepteurs pour une même galactosyltransférase.

C'est grâce à cette spécificité d'action qu'il est possible d'isoler l'enzyme responsable d'une action.

Cependant, les observations faites au cours des purifications par chromatographie d'affinité soulèvent un certain nombre de questions. En effet, si on tente de résumer les différentes « anomalies » observées, nous dégagerons deux aspects :

- il semble exister pour une même fonction, c'est à dire pour un type de liaison donné, deux galactosyltransférases qui ne possèdent pas le même comportement vis-à-vis des supports de chromatographie d'affinité (Gleeson *et al.* -66- ; Sheares et Carlson -170-). Il peut s'agir de deux enzymes distinctes ou d'une modification sur la molécule enzymatique qui conduit à une régulation différente.

- à l'opposé, s'il est possible de séparer deux activités galactosyltransférasiques différentes et de les purifier (Furukawa et Roth -61-), il semble difficile de leur attribuer un accepteur bien précis car il existe toujours des interférences de spécificité. Tout se passe comme si deux fonctions différentes supportées par deux galactosyltransférases pouvaient, en fait, se confondre tant il existe de ressemblances entre ces enzymes.

Selon Schachter, le seul moyen de départager les galactosyltransférases, réside dans l'utilisation d'accepteurs hautement spécifiques qui ne seraient galactosylables que par une seule enzyme.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - MATÉRIEL

A - LES GLYCOSYLNUECLÉOTIDES

Le donneur activé UDP- [^{14}C] Gal nous a été fourni par Radiochemical Center, Amersham, Grande-Bretagne (activité spécifique : 310 m Ci/m mole). L'UDPGal non radioactif provenait de la firme Sigma (St Louis, U.S.A.).

B - SOURCE ENZYMATIQUE

Nous avons utilisé, d'une part, le lait de femme qui nous a été aimablement fourni par le Lactarium de Lille et, d'autre part, des cellules de reins de Hamster (cellules BHK, variété 21, clone 13) cultivées dans notre Laboratoire.

C - MATÉRIEL DE CHROMATOGRAPHIE

1 - Ultrogel Ac A 54

Le support de tamisage moléculaire Ultrogel Acrylamide 5 % Agarose 4 % (Ac A 54) nous a été fourni par IBF. La zone linéaire de fractionnement des protéines est de 5000 à 70 000 daltons, la limite d'exclusion est de 90 000 daltons.

2 - Superose 12

Un tamisage moléculaire a été réalisé en FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) avec une colonne Superose 12 obtenue chez Pharmacia. La zone linéaire de fractionnement des protéines est de 1000 à 100 000 daltons.

3 - Les supports de chromatographie d'affinité

a) UDP-Agarose

L'Uridine 5' diphosphate attachée par le groupe hydroxyl du ribose à l'agarose a été fourni par Sigma. Elle contient 1 à 3 μ moles d'UDP par ml de gel.

b) GlcNAc-Agarose

La N-acétylglucosamine liée sur agarose activée a été fourni par Sigma.

D - ACCEPTEURS

Les différents monosaccharides utilisés (N-acétylglucosamine, glucose, galactose) sont d'origine commerciale. L' α -lactalbumine bovine ou humaine est fournie par Sigma.

Le disaccharide N-acétyllactosamine nous a été généreusement donné par G. STRECKER (Maître de Recherches au C.N.R.S.), la mucine sous-maxillaire de Mouton par J.C. MICHALSKI (Chargé de Recherches à l'I.N.S.E.R.M.), les glycopeptides d'orosomucoïde par F. DELPLACE (Maître de Conférences à l'U.S.T.L. Flandres-Artois), les rapports molaires sont résumés au Tableau IX p. 82, les glycopeptides

du blanc d'oeuf de poule (glycopeptides β de l'ovomucoïde) par B. FOURNET (Professeur à l'U.S.T.L. Flandres-Artois), le Tableau IX p.82 représente les différentes chaînes glycaniques de l'ovomucoïde.

L'ovotransferrine nous a été fournie par la firme Sigma.

II - MÉTHODES

A - PRÉPARATION DE GLYCOPEPTIDES DÉSIALYLÉS

1 - Désialylation de glycopeptide de l'orosomucoïde

La désialylation des glycopeptides est obtenue par une méthode enzymatique en continu, grâce à la neuraminidase de *Clostridium perfringens* immobilisée sur Sépharose 4B. Le glycopeptide dissous dans un tampon citrate (citrate de sodium 0,1 M pH 5,1 0,02 % azide de sodium) est recyclé sur la colonne de neuraminidase pendant 48 heures à 37°C.

2 - Désialylation de la mucine sous-maxillaire de Mouton

L'acide sialique est éliminé par hydrolyse acide en présence d'acide sulfurique (0,005N) pendant 1 heure à 80°C. La solution est neutralisée et désalée par tamisage moléculaire sur Biogel P₂ éluée par l'eau.

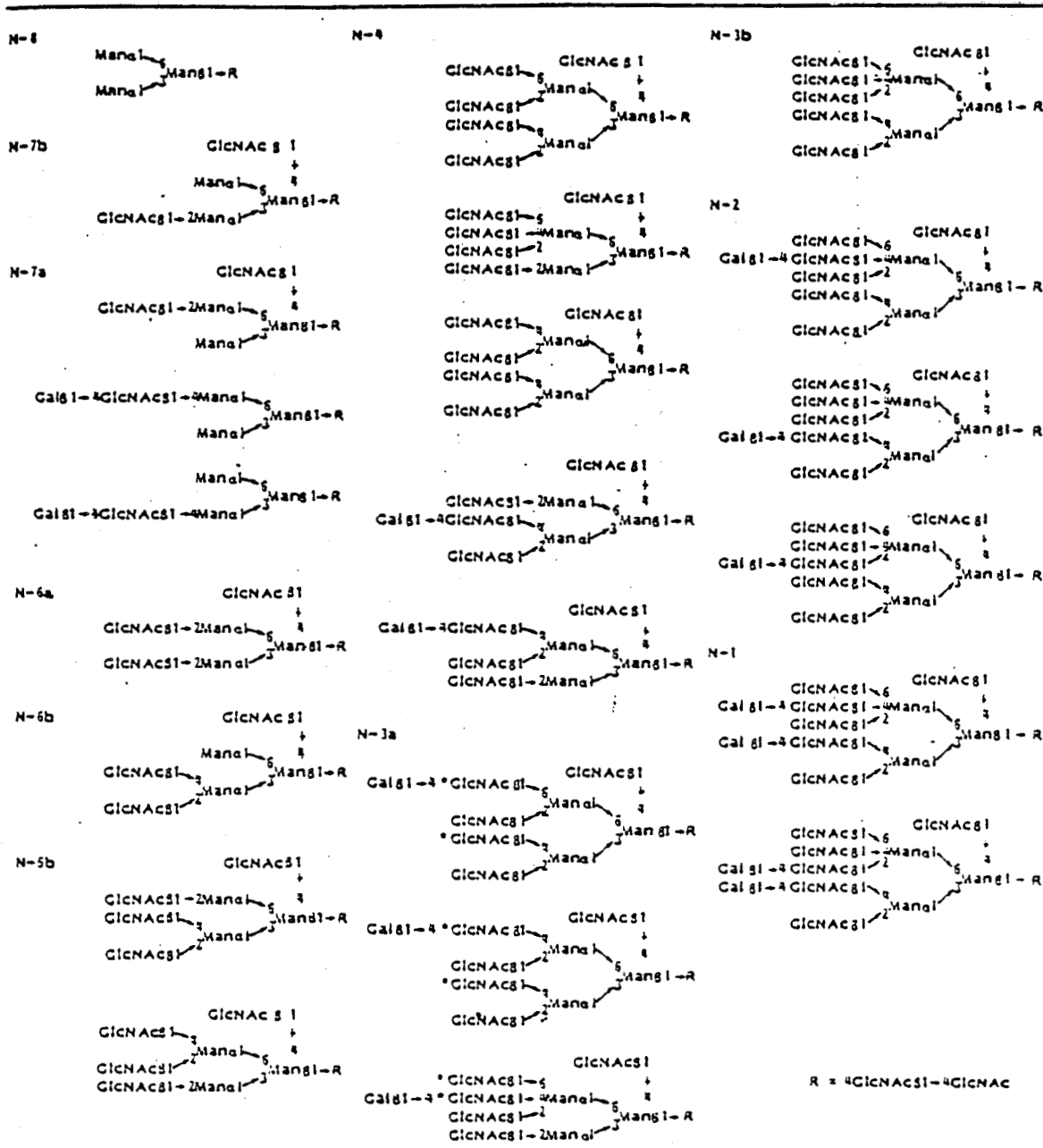
B - MESURE DE L'ACTIVITÉ GALACTOSYLTRANSFÉRASIQUE DU LAIT

1 - Milieu d'incubation

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

TABLEAU IX : Chaines glycaniques de l'ovomucoïde de Poule (Yamashita et al)
et le rapport molaire des glycopeptides de l'orosomucoïde désialylé

OVOMUCOÏDE :



MONOSACCHARIDES DES GLYCOPEPTIDES DE L'OROSOMUCOÏDE DESIALYLÉ :

FUC	GAL	MAN	GLCNAc	NEUAc
0,31	3,47	3	4,45 + 1	0

Le % total de sucre est de 53,5 %.

- 15 μ l tampon cacodylate 0,5 M pH 6,5
- 5 μ l $MnCl_2$ 0,4 M
- 5 μ l AMP 1mM
- 5 μ l accepteur
- 5 μ l de précurseur UDP - [^{14}C]Gal 50 μ M à 10 nCi/nmole
- 45 μ l de la solution enzymatique

D'une manière classique, la concentration des solutions d'accepteur est de 100 mM pour la N-acétylglucosamine et le glucose, 5 mg/ml pour le glycopeptide β de l'ovomucoïde (soit 1mM équivalent GlcNAc) 10 mg/ml pour l'ovotransferrine (soit 0,35 mM équivalent GlcNAc) et 50 mg/ml pour tout autre accepteur de type glycoprotéine.

Le milieu réactionnel est incubé à 37^o C pendant une heure. L'activité enzymatique est mesurée dans une zone linéaire en fonction de la quantité de protéine pour une concentration en UDP-Gal de 0,5 μ M/test.

2 - Identification des produits radioactifs par chromatographie sur papier

Après incubation des essais enzymatiques, la réaction est arrêtée dans la glace par addition d'EDTA 2 M (15 μ l). Les échantillons sont déposés sur des feuilles de papier Whatman 3 et soumis à une chromatographie descendante dans un système solvant : Pyridine/Acétate d'Éthyle/Acide Acétique/H₂O dans les proportions 5/5/1/3 pendant 16 heures (selon Fischer *et al.* -50-). Les chromatographies sont alors séchées à l'air libre ; elles sont découpées en bandes de 1 x 5 cm et mises dans les piluliers de comptage radioactif où 2ml de liquide scintillant (lipoluma, Lumac, France) sont ajoutés. La radioactivité est ensuite comptée dans

un compteur à scintillation liquide.

Des témoins oligosaccharidiques sont déposés puis, après chromatographie, ce témoin est révélé à l'oxalate d'aniline (spécifique des sucres) permettant ainsi de situer la migration du produit formé lors de la réaction de glycosylation.

Au cours de la réaction enzymatique, l'UDP-Gal se dégrade chimiquement en galactose-1-phosphate et en galactose -1-2-phosphate cyclique. Du galactose peut également se libérer.

L'AMP, introduit dans le milieu réactionnel, limite l'action des pyrophosphatases présentes.

Le rapport RF (Migration du produit par rapport au front de migration) a pu être calculé pour différents produits en utilisant l'orangé GN comme référence :

Sucres :	R.F. :
Glycopeptide	0
UDP-Gal	0,18
Gal-1P	0,23
Gal-1,2 Pc	0,34
lactose	0,55
Gal-LacNAc	0,70
LacNAc	0,77
Gal	0,80
Glucose	0,87
GlcNAc	1,11

3 - Chromatographie en couche mince

C'est une méthode simple qui nous permet de suivre la glycosylation de molécules disponibles en faible quantité.

Le solvant de migration est : éthanol/butanol/acide acétique/pyridine/eau (100/10/3/10/30) ou le butanol/pyridine/eau (2/1/1). Les sucres sont révélés par l'orcinol sulfurique.

C - PRÉPARATION DE LA GALACTOSYLTRANSFÉRISE

Nous avons employé différentes méthodes conventionnelles (comme la chromatographie de tamisage moléculaire ou la précipitation au sulfate d'ammonium) et la chromatographie d'affinité pour la préparation de la galactosyltransférase.

Pour le lait de femme, la première étape de préparation de l'enzyme est constituée par la délipidation et l'élimination de la caséine, par centrifugation. Dans le cas des cellules de reins de Hamster, l'extraction des enzymes solubilisées constitue la première étape.

1 - Préparation des extraits cellulaires de B.H.K.

a) Culture des cellules

Les cellules B.H.K. 21 clone 13 sont mises en culture dans des flacons de plastique traités, de contenance 175 cm². Elles se développent dans un milieu de Eagle modifié (MEM), à 37°C et en présence de CO₂ (5 %). Ce sont des cellules adhérant rapidement sur le fond de la boîte où elles poussent en travées jusqu'à confluence. Au microscope optique, on contrôle la forme allongée de ces cellules fibroblastiques et leur état physiologique.

b) Extraction des enzymes solubilisées

Les cellules sont choisies à confluence, 72 heures après l'ensemencement ; elles sont estimées à 1.10^8 cellules/boîte. Ce milieu de culture est éliminé et les cellules sont rincées dans un tampon phosphate isotonique (PBS : Phosphate 10 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M). Les cellules sont récupérées dans ce tampon PBS puis centrifugées 5 minutes à 3000 x g. Le culot est suspendu dans un tampon cacodylate 25mM, $MgCl_2$ 5 mM, NaCl 25 mM, Triton X100 2 % et 2- β Mercapto-éthanol 0,5 mM.

La solution est placée sous ultrasons avec une sonde Sonifier Branson B 30, Sonotrope Gobelet. L'opération est réalisée trois fois pendant 1 minute avec 2 minutes de pause entre chaque série, dans la glace fondante.

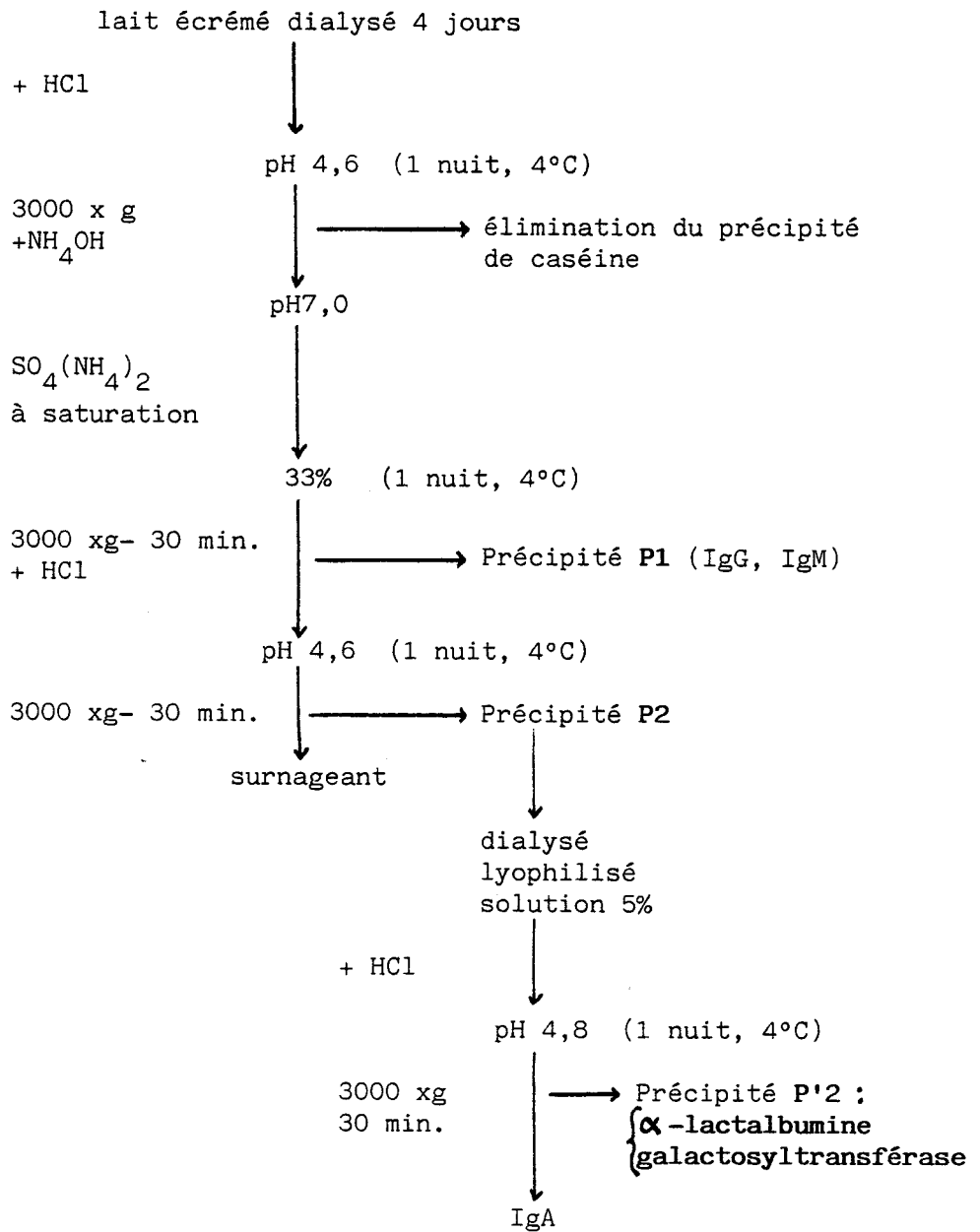
Après 2 à 3 heures de repos, l'homogénat est centrifugé 30 minutes à 10 000 x g. Le surnageant est récupéré et congelé à $-20^{\circ}C$ s'il n'est pas utilisé immédiatement.

2 - Précipitation du lait humain au sulfate d'ammonium.

Il s'agit du procédé de fractionnement du lait maternel mis au point par Montreuil *et al.* (-119-) et modifié par Descamps (-39-). Le lactosérum obtenu après délipidation et élimination de la caséine, subit une série de précipitations au sulfate d'ammonium. Les précipités P_1 et P_2 sont obtenus à 33 % de saturation en sulfate d'ammonium et respectivement aux pH 7 et 4,6 (Tableau X p.87). Des précipitations successives au sulfate d'ammonium peuvent conduire à la séparation de différentes protéines du lait.

Dans notre cas nous utilisons le précipité P_2 contenant en majorité de l' α -lactalbumine et des Immunoglobulines A (IgA). Ces IgA sont éliminées par précipitation acide. Le précipité P_2 restant est constitué à 60 % voire 70 % d' α -lactalbumine et contient l'activité galactosyltransférase. Le précipité est redissous dans une solution de NaCl 0,15 M, dialysé, lyophilisé et congelé à $-20^{\circ}C$.

TABLEAU X: Protocole de fractionnement du lait Humain
selon MONTREUIL modifié par DESCAMP (39)



3 - Purification de la galactosyltransférase du lait

a) sur *Ultrogel Ac A 54*

Le précipité P₂ du lait humain est mis en solution dans un tampon cacodylate 25 mM pH 7,1, MgCl₂ 5 mM, NaCl 25 mM, Mercapto-éthanol 0,5 mM, NaN₃ 0,05 ‰, Triton X 100 2 % ou 0,2 % selon l'expérience.

Le produit est injecté sur une colonne AcA 54 (2,8 cm x 140 cm) équilibré dans ce même tampon. Dans certains cas, la colonne est rincée avec 50 ml de ce même tampon contenant du NaCl 1M. Cette opération a pour objectif de désorber la ou les protéines retenues éventuellement sur le support. Cette addition de NaCl 1M peut avoir lieu au moment de l'injection ou au cours du fractionnement. Des fractions de 10 ml sont collectées, le lavage de la colonne s'effectuant à 15ml/h. L'activité enzymatique est mesurée comme décrit précédemment en mesurant le nombre de c.p.m. de [¹⁴C] Gal transférés sur le glycopeptide β de l'ovomucoïde à une concentration de 25 µg/test ou sur la N-acétylglucosamine à une concentration de 0,5 mM/test.

Les fractions sont également analysées en électrophorèse de gel de polyacrylamide et en immunoélectrophorèse (voir paragraphe D).

b) *Tamissage moléculaire en FPLC sur Supérose 12.*

Le précipité P₂ ou des fractions issues d'un tamissage moléculaire préliminaire sont injectés en FPLC sur une colonne de gel filtration Supérose 12 (24 ml) équilibrée dans le même tampon que celui décrit au paragraphe précédent. Selon le cas, du NaCl 1M peut être ajouté pendant toute la chromatographie. Les tests effectués après cette méthode sont identiques à ceux décrits précédemment.

c) Par chromatographie d'affinité

α) UDP-Agarose

Une colonne d'UDP-Agarose (5 ml) est équilibrée dans du tampon cacodylate 25 mM pH 7,1, MnCl₂ 25 mM, Mercaptoéthanol 5 mM, Triton X 100 0,2 %. Le précipité P₂ du lait humain est solubilisé dans ce même tampon (25 mg sous un volume de 2 ml) et injecté sur la colonne. La colonne est rincée avec 100 ml de tampon. L'élution de l'activité enzymatique retenue sur le support est réalisée d'une part en supprimant les ions Mn²⁺ (25 ml) du tampon de lavage et, d'autre part, par 25 ml de tampon de lavage sans MnCl₂ plus NaCl 1 M. La majeure partie de l'activité enzymatique étant éluee par ce dernier tampon, l'élution directe sera réalisée en routine par ce tampon contenant du NaCl 1 M. Toutes les expériences sont effectuées à +4°C. Le débit de fractionnement est de 30 ml/h et des fractions de 0,8 à 1,2 ml sont collectées. L'activité enzymatique est mesurée sur différents accepteurs selon la technique décrite précédemment.

La colonne de chromatographie d'affinité peut être utilisée plusieurs fois. Il suffit de laver la colonne dans un tampon Cacodylate contenant du NaCl 1 M (150 ml) et de l'équilibrer dans le tampon initial pour une prochaine utilisation.

β) GlcNAC-Agarose

Les fractions actives retenues sur la colonne d'UDP-Agarose sont récupérées. Du MnCl₂ est ajouté de façon à obtenir une concentration de 25 mM. L'ensemble des fractions actives sont injectées sur la colonne de GlcNAC-Agarose équilibrée dans le tampon Cacodylate 25 mM pH 7,1- MnCl₂ 25 mM, Mercaptoéthanol 5 mM, NaCl 1 M, Triton X 100 0,2 %. Le NaCl est ajouté de façon à éviter les adsorptions non spécifiques sur le support.

La colonne est ensuite rincée avec ce même tampon (50 ml). L'élution spécifique de la galactosyltransférase retenue est réalisée avec le même tampon sans $Mn Cl_2$ et par addition de N-acétylglucosamine 10 mM.

D - ANALYSE DES PROTÉINES PURIFIÉES

1 - Électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) (Laemmli -95-)

Les fractions du lait de femme chromatographiées sont analysées en électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS :

a) Les gels

Tampon électrophorèse :

Tris 3 g
Glycocolle 14,4 g
SDS 1,3 g
qsp H_2O 1,3 l

Solution 1 A : 36,3 g Tris qsp 100 ml pH 8,9

Solution 2 A : Acrylamide 48 g, bisacrylamide 1,28 g, qsp 100 ml

Solution 3 A : Persulfate 10 %

Concentration du gel	5 %	12 %	25 %	Gel supérieur
2A	1 ml	2,4 ml	5 ml	1 ml
1A	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	1 ml
H_2O	6,5 ml	5,2 ml	-	8 ml
Glycérol	-	-	2,5 ml	-
SDS 10 % (P/v)	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Temed	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
3A	50 μ l	40 μ l	30 μ l	130 μ l
Total :	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

Les gels sont réalisés avec des plaques de 10 x 15 x 1 cm. Les échantillons à tester sont dilués au demi avec du tampon comprenant : 1 ml de la solution 1A, 5 ml de SDS 10 % (P/V), 0,5 ml de Mercaptoéthanol, 2 ml de Glycérol, 2,5 ml H₂O et du bleu de bromophénol. Les protéines sont dénaturées à 100°C pendant 2 minutes. Le gel est soumis à un courant continu de 80 volts pendant 3 à 4 heures.

b) Coloration des gels

α) Au bleu de Coomassie

Cette coloration permet de détecter des protéines de l'ordre du microgramme. Le gel, après électrophorèse est fixé dans un solvant éthanol/acide acétique/eau (5/2/9) comprenant 1 % de bleu de Coomassie R 250 pendant une nuit. La décoloration du gel est réalisée dans ce même solvant, sans bleu de Coomassie.

β) Au nitrate d'argent

La coloration des gels au nitrate d'argent selon la technique de Marissey (-110-) permet de révéler des bandes protéiques de l'ordre du nanogramme. Après électrophorèse, le gel est fixé 30 minutes dans un solvant méthanol/acide acétique/eau (50/10/40) puis 30 minutes dans ce même solvant en proportion 5/7/88. Il est oxydé à la glutaraldéhyde 10 %, 30 minutes, puis rincé par l'eau une nuit. Il est réduit 30 minutes par une solution de dithiothreitol (5 µg/ml). Après 30 minutes dans une solution de nitrate d'argent (0,1 %), le gel est rincé à l'eau et révélé par 50 µl de formol à 37 % dans 100 ml de Na₂CO₃ à 3 %. La révélation est arrêtée par addition d'acide citrique 2,3 M pH neutre.

c) Solutions étalons

Des échantillons témoins de migration sont déposés pour chaque électrophorèse. Il s'agit de protéines fournies par Pharmacia :

phosphorylase 94 kDa

sérum albumine Bovine 67 kDa

ovalbumine 43 kDa

anhydrase carbonique 30 kDa

inhibiteur trypsique 20,1 kDa

α -lactalbumine 14,4 kDa

Des artéfacts peuvent apparaître aux voisinages de 55 et 67 kDa dus à la présence de β -mercaptoéthanol dans le tampon d'échantillon.

2) Electro-transfert sur feuille de nitrocellulose

a) Technique

Les protéines sont électro-éluées du gel de polyacrylamide et adsorbées sur une feuille de nitrocellulose. Cette technique permet d'éliminer le SDS du milieu et nous permettra de détecter l'activité enzymatique en fonction des bandes protéiques visualisées.

Pour ce faire, les protéines, après électrophorèse, ne sont pas fixées dans le gel de polyacrylamide. Ce dernier est placé sur une feuille de nitrocellulose à dimension et l'ensemble est maintenu par du papier Whatman 3 imbibé de tampon Tris 25 mM, Glycocolle 192 mM, méthanol 800 ml pour 4 l de tampon à pH 8,6. Une électrophorèse est alors réalisée à 75 volts pendant une nuit (ou 250 volts pendant 5 heures) avec le même tampon, avec un

appareil «Biorad». Le gel de polyacrylamide est face à la cathode, la feuille de nitrocellulose face à l'anode. Cette électrophorèse permet d'extraire les protéines du gel et de les fixer sur la feuille de nitrocellulose.

b) Analyse des protéines

** Coloration*

Après électrophorèse, des bandes latérales de la feuille de nitrocellulose sont découpées et colorées 30 secondes au bleu de Coomassie selon la technique décrite au paragraphe 1. Ces bandes permettent de contrôler l'électro-transfert (cf. fig. 13 p. 94).

** Mesure de l'activité enzymatique*

Le reste de la feuille est alors découpée en fonction des protéines présentes. Chaque bande correspond à une bande protéique visualisée et l'activité galactosyltransférase est alors mesurée en utilisant le glycopeptide β de l'ovomucoïde comme accepteur. Le milieu réactionnel est le même que pour les tests classiques, le volume est calculé de façon à immerger totalement les bandes de nitrocellulose préalablement découpées en petits morceaux. Le volume du milieu réactionnel est de l'ordre de 200 μ l additionné de 200 μ l de tampon cacodylate 0,5 M pH 6,5. L'incubation dure 5 heures à 37°C. L'analyse des produits formés au cours de la réaction enzymatique est identique à celle décrite au paragraphe B.

3) Analyse immunologique

a) Préparation de l'immun. sérum anti-précipité P'2 du lait humain

L'antisérum est préparé au laboratoire par injection intramusculaire à un Lapin du précipité P'2 de lait humain (1 mg) en présence d'adjuvant de

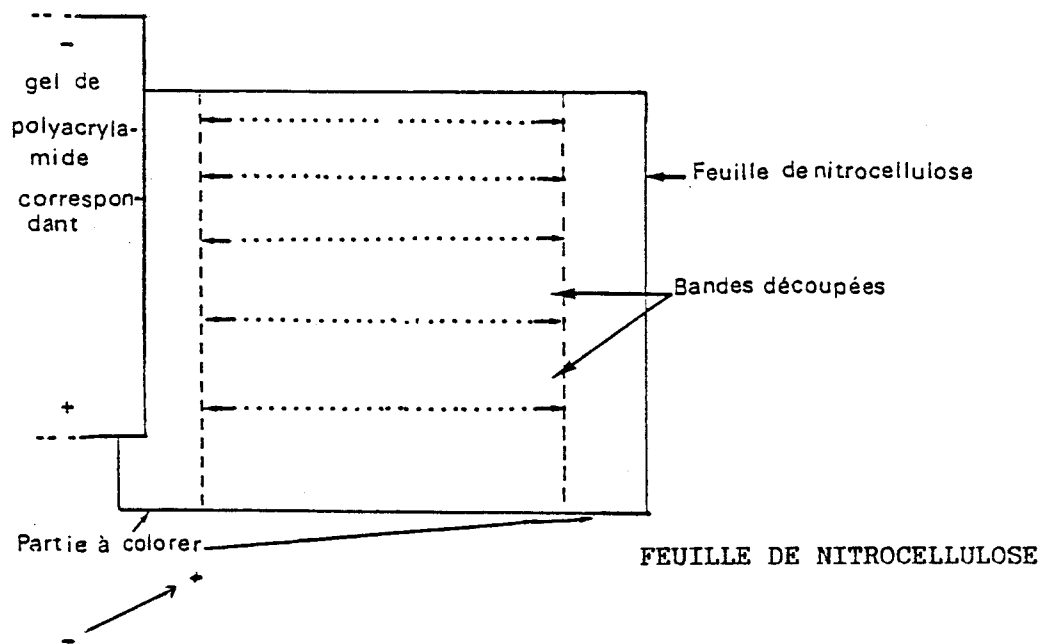
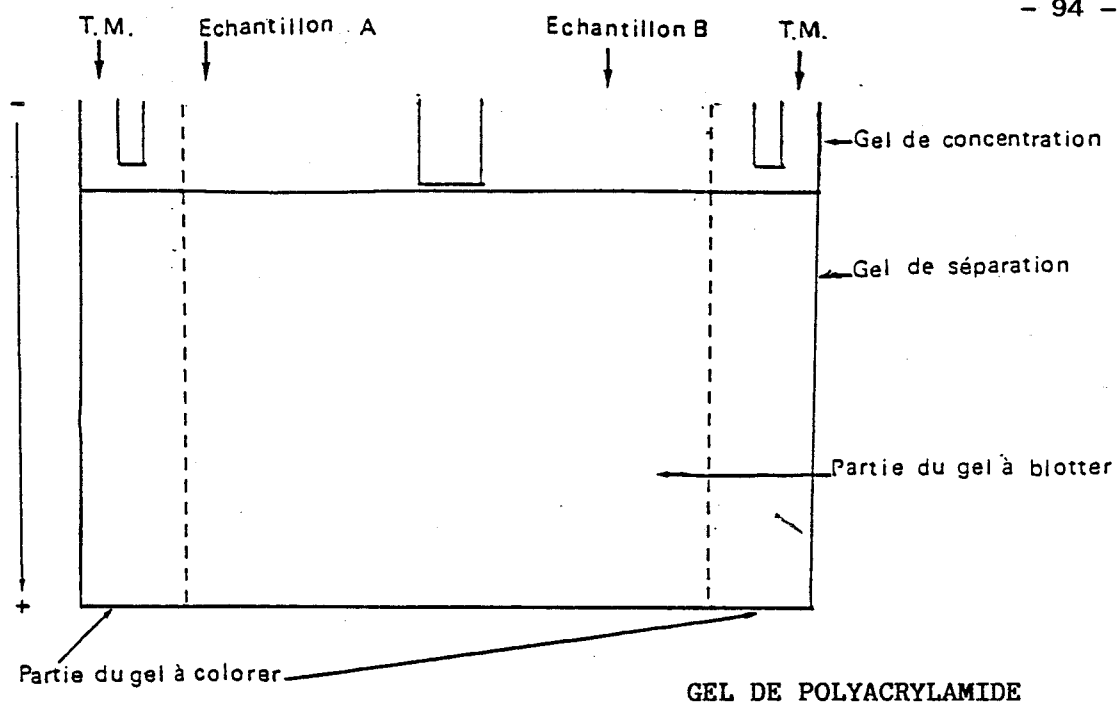


Figure 13: Disposition du gel de polyacrylamide permettant de réaliser un électrotransfert sur feuille de nitrocellulose.

- LEGENDE: T.M. : Témoins de masse moléculaire
- : Ligne de découpe du gel de polyacrylamide ou de la feuille de nitrocellulose avant coloration .
- : Ligne de découpe de la feuille de nitrocellulose avant réaction enzymatique.

Freund (1 ml/ml). Les injections sont répétées quatre fois à une semaine d'intervalle. Le sang, prélevé à la veine de l'oreille de Lapin, est centrifugé et laissé à + 4°C une nuit. Le sérum obtenu est conservé congelé.

b) Immunoélectrophorèse monodimensionnelle

La technique a été décrite par Scheidegger en 1955 (-167-). Les solutions protéiques à analyser (2 à 8 μ l) sont déposées dans des puits réalisés dans l'agar noble (1 %) (1 ml/cm de plaque). La migration s'effectue pendant 45 minutes à 10 volts/cm. Le tampon utilisé est le véronal acide 28 g, Tris 55,4 g, lactate de calcium 0,66 g, azide de sodium 0,81 g qsp 5 litres à pH 8,6. Après diffusion 48 heures en chambre humide, la plaque est lavée, séchée et colorée au bleu de Coomassie (même technique que la coloration des gels en PAGE)

c) Technique des Rockets (Laurell, 1952 - 97-)

Les solutions protéiques à analyser (2 à 8 μ l) sont déposées dans des puits réalisés dans l'agar noble (1 %) (1,5 ml/100 cm² de plaque) mélangé à 1 ml d'antisérum. La migration s'effectue pendant 5 heures à 10 volts/cm. Le tampon utilisé est le même que pour l'immunoélectrophorèse.

La plaque est ensuite lavée (dans l'eau physiologique) séchée et colorée au bleu de Coomassie.

d) Immunoélectrophorèse bidimensionnelle

α) 1ère dimension

Un volume de 15 ml de gel d'agarose humidifié à 50 °C (type II, médium EEO, Sigma) à 1 % dans le tampon Tris/HCl 72 mM, Véronal sodé 24 mM (24,74 g), lactate de calcium 0,4 mM (616 mg), azide de sodium (1 g) (qsp 5 l) pH

8,6 en présence des ions MnCl_2 , MgCl_2 , CaCl_2 1 mM, est déposé sur une plaque de verre (10 x 10 cm). Les solutions à analyser (2 à 8 μl) sont introduites dans les 8 puits pratiqués à l'emporte-pièce. L'électrophorèse est réalisée pendant 1 heure ou 3 heures à 10 V/cm dans un appareil LKB 2117 multiphor muni d'une plaque réfrigérante.

β) 2 ème dimension

L'agarose utilisé pour la seconde dimension contient l'antisérum du précipité P'2 du lait. La migration est réalisée pendant 18 heures à 2V/cm à +4°C. Les plaques sont ensuite lavées, séchées et colorées au bleu de Coomassie.

4) Dosage de protéines

a) Première méthode selon Peterson

La méthode utilisée est celle de Lowry modifiée par Peterson (-144-). Elle est utilisée pour les échantillons contenant du Triton X 100 qui sera éliminé par une étape de précipitation.

Les protéines à doser, de 5 à 100 $\mu\text{g/ml}$ d'eau, sont précipitées par 100 μl de déoxycholate de sodium (0,15 %) et 100 % d'acide trichloracétique (72 %) puis centrifugées 15 minutes à 3 000 x g.

Le culot est solubilisé par 1 ml d'eau et 1 ml de réactif A : NaOH (0,8 N), SDS (10 %), H_2O et solution de CuSO_4 (0,1 %) dans une proportion (1/1/1/1). Après 10 minutes à température ambiante, 500 μl de réactif B (réactif de Folin-Ciocalteuphénol dilué au 1/6^e) sont ajoutés et laissés 30 minutes dans l'obscurité.

Les échantillons sont ensuite dosés au spectrophotomètre à 550 nm contre une référence sans protéine. La concentration en protéine des échantillons est déterminée grâce à une courbe étalon établie avec la sérum albumine bovine.

β) Deuxième méthode selon Wessel et Flügge

Quand la concentration en Triton X 100 est supérieure à 1 %, la précipitation des protéines, décrite précédemment n'est pas satisfaisante. Il faut alors adopter une autre technique décrite par Wessel et Flügge en 1984 (-205-).

0,1 ml de solution à doser contenant 10 à 100 µg de protéines sont mélangés avec 0,4 ml de méthanol, centrifugés 1 minute à 3000 x g puis avec 0,1 ml de chloroforme et centrifugés 1 minute à 3000 x g.

0,3 ml d'H₂O sont ensuite ajoutés aux échantillons, agités fortement et centrifugés 10 minutes à 3000 x g.

La phase supérieure est écartée.

0,3 ml de méthanol sont ajoutés à la phase inférieure et à l'interface contenant le précipité des protéines. Cette opération a pour objectif de culoter les protéines afin de les séparer de l'interface. Les échantillons sont centrifugés 5 minutes à 3000 x g. Le surnageant est écarté et le culot des protéines est séché sous un faible courant d'air.

Le dosage est alors effectué selon la technique de Lowry décrite précédemment après l'étape de précipitation.

Cette technique est bien adaptée pour les échantillons contenant du Triton X 100 à de faibles concentrations, des sels et des lipides qui sont ainsi éliminés. Le culot protéique peut aussi être repris par le tampon d'échantillon utilisé pour les électrophorèses en gel de polyacrylamide (PAGE).

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE I

**CARACTERISATION DE L'ACTIVITE GALACTOSYL-
TRANSFERASIQUE DU LAIT HUMAIN**

CHAPITRE I

CARACTÉRISATION DE L'ACTIVITÉ GALACTOSYLTRANSFÉRASIQUE DU LAIT HUMAIN

Les travaux menés sur la galactosyltransférase du lait humain ont pour objectif de caractériser l'activité enzymatique et la protéine qui en est responsable.

Les nombreuses études réalisées sur le lait humain ont montré que la galactosyltransférase synthétise le lactose à partir de glucose et d'UDP-Gal en présence d' α -lactalbumine. L'enzyme utilise également des oligosaccharides ou glycopeptides comme accepteurs du galactose en créant la liaison Gal (β 1-4) sur la N-acétylglucosamine en position terminale non réductrice.

Pour étudier la molécule enzymatique proprement dite nous avons, dans ce premier chapitre, déterminé les paramètres enzymatiques dans une fraction enrichie en galactosyltransférase, issue des différentes précipitations du lait, appelée fraction P₂. C'est en analysant précisément les résultats que nous pourrons, ensuite, mieux comprendre les problèmes liés à la purification de l'enzyme.

I - MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTIVITÉ GALACTOSYLTRANSFÉRASIQUE

A - DANS LE LAIT HUMAIN

L'activité galactosyltransférasique a été mesurée avec différents accepteurs. Le Tableau XI p. 99 indique l'ensemble des résultats obtenus.

Nous retiendrons l'activité spécifique déterminée avec la N-acétylglucosamine comme accepteur qui est de 48,4 pmoles de galactose incorporé/min./mg de protéine.

TABLEAU XI : Activité galactosyltransférase mesurée dans le lait humain et dans le précipité P'2 ,sur différents accepteurs(les conditions d'incubation et la détermination des différents composés formés sont décrits dans le Chapitre Matériel et Méthodes).



ACCEPTEURS	INCORPORATION DU GALACTOSE	
	pmole/min/mg de protéine	
	Lait	Précipité P'2
N-Acétyleglucosamine (10mM)	48,4	230
Glucose(10mM)	49,3	160
Glucose(10mM) + α-lactalbumine	50,5	200
Glycopeptide β de l'Ovomucoïde(0,5mg/ml soit 1,1mM équivalent GlcNAc)	46,2	230
Ovotransferrine(1mg/ml soit 35μM équivalent GlcNAc)	6,3	55

B - DANS LA FRACTION P'₂

1 - Activité galactosyltransférase

Après précipitation du lait humain au sulfate d'ammonium (voir la méthode p. 87), l'activité spécifique déterminée avec la N-acétylglucosamine comme accepteur est de l'ordre de 230 pmoles de galactose incorporé/min/mg de protéine (Tableau XI p. 99).

L'enrichissement de l'activité est donc de l'ordre de 4,7 fois.

La N-acétylglucosamine, le glycopeptides de l'ovomucoïde et l'ovo-transferrine sont des accepteurs de la galactosyltransférase. La synthèse du lactose peut également être réalisée à partir du glucose comme accepteur, sans addition supplémentaire d' α -lactalbumine.

Le taux d'incorporation de galactose sur le glucose est identique à celui déterminé avec la N-acétylglucosamine. Toutefois, la présence d' α -lactalbumine dans la fraction P'₂ aurait dû inhiber la synthèse de la N-acétyllactosamine. Nous tenterons ultérieurement d'interpréter ce résultat.

2 - Analyse immunologique de la fraction P'₂

Par les techniques immunologiques classiques, nous avons quantifié la proportion d' α -lactalbumine présente dans la fraction P'₂ du lait.

Par immunoélectrophorèse selon la technique dite de Rockets, nous pouvons estimer à 60-70 % la quantité de l' α -lactalbumine (photos N° 1A p. 101). Par immunodiffusion, le seul arc de précipitation obtenu est celui de l' α -lactalbumine (photos N° 1B p. 101). En immunoélectrophorèse bidimensionnelle, la sensibilité de la technique permet d'observer un second arc de précipitation autre que celui de l' α -lactalbumine (photo 1C p. 101).



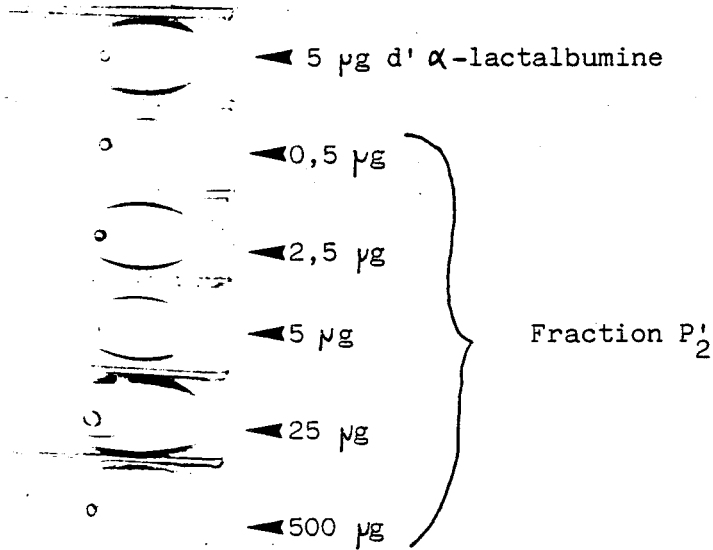
A- Immunoélectrophorèse selon la technique de ROCKETS

Anticorps: anti-précipité P₂[']; 2ml/plaque 20x10

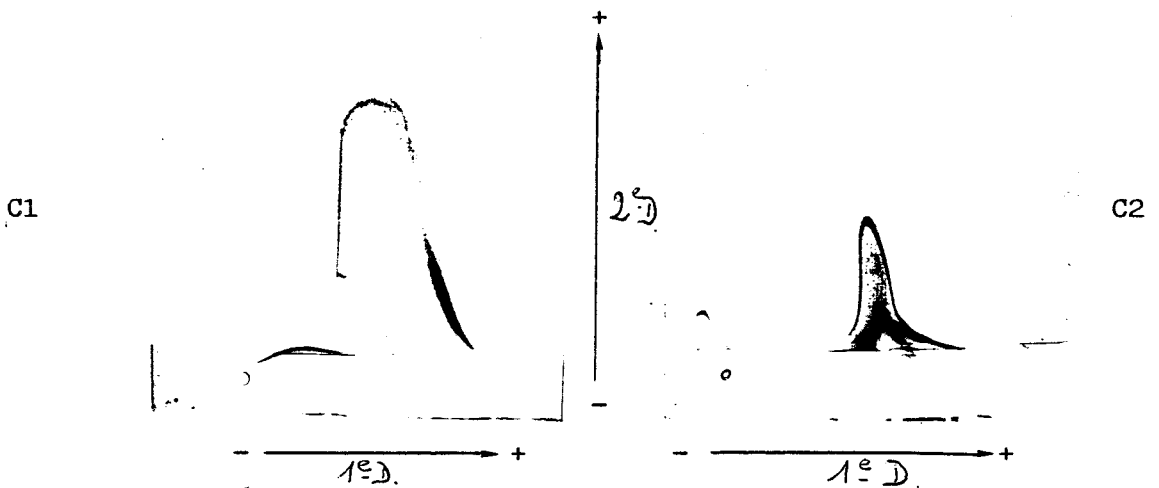
Antigènes: de a à e, fraction P₂['] — de a' à e', α-lactalbumine

a et a': 0,05 μg; b et b': 0,1 μg; c et c': 0,25 μg; d et d': 0,5 μg

e et e': 1 μg



B- Immunodiffusion; Anticorps: anti-précipité P₂['] (50 μl/Rigole)



C- Immunoélectrophorèse bidimensionnelle

C1: Anticorps, anti-précipité P₂['] (700 μl/plaque 10x10);

Antigènes: fraction P₂['] (5 μg)

C2: Anticorps, anti-α-lactalbumine (700 μl/plaque 10x10)

Antigènes, fraction P₂['] (1 μg)

PHOTO 1 : Analyses immunologiques de la fraction P₂['] du lait Humain. Les Anticorps sont l'antisérum de lapin de la fraction P₂['] ou de l'α-lactalbumine.

II - ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ GALACTOSYLTRANSFÉRASIQUE

A - CHOIX DU TAMPON DE SOLUBILISATION DU PRÉCIPITÉ P₂

La composition du tampon de solubilisation du précipité P₂ du lait humain a été définie afin de réaliser le meilleur transfert de galactose sur les différents accepteurs. Pour limiter les analyses, nous avons testé l'activité de la galactosyltransférase en utilisant la N-acétylglucosamine comme accepteur. Les résultats sont résumés dans le Tableau XII p. 103.

Le tampon cacodylate est préférable au tampon Tris. Une augmentation sensible de l'activité enzymatique est obtenue par l'addition de β -mercaptoéthanol, de MgCl₂ et de NaCl. Par ailleurs, l'activité enzymatique augmente de 20 à 30 % quand le Triton X100 est ajouté au tampon. Ce détergent, connu pour son action de solubilisation des galactosyltransférases intégrées, s'avère être un activateur de l'activité des galactosyltransférases solubles (Fraser et Mookerjea -57- ; Wilson *et al.* -207-).

Dans le lait humain, l'optimum de l'activité galactosyltransférase est obtenu avec 0,2 % de Triton X100 dans le tampon de solubilisation (Fig. 14 p. 104). Toutefois, pour une meilleure solubilisation nous utiliserons en routine 2 % de Triton X100.

En résumé, le tampon de solubilisation utilisé pour les études ultérieures sera le tampon cacodylate (25 mM) pH 7,2, MgCl₂ (5 mM), NaCl (25 mM) Triton X100 (0,2 à 2 % selon les cas) et β -mercaptoéthanol (0,5 mM).

TABLEAU XII : Influence du milieu d'incubation pour le transfert du galactose sur la N-Acétyleglucosamine à partir du précipité P'2.
(Conditions standard de réaction enzymatique)

Rapport= Activité/ Activité avec le meilleur tampon

Composition du tampon de solubilisation du précipité P'2	INCORPORATION du galactose sur la N-Acétyleglucosamine en pMole/min/mg de protéine	
	Activité	RAPPORT
Cacodylate pH 7,2(25mM) + β mercaptoéthanol(5mM) = Tampon de base (T.B.)	111	56
T.B.+ MnCl ₂ (5mM)	108	55
T.B.+MgCl ₂ (5mM) = T.B.Mg	152	77
T.B.Mg+ NaCl(25mM)	172	87
T.B.Mg+ NaCl(75mM)	155	79
T.B.Mg+ NaCl(1M)	105	53
T.B.Mg+ TritonX100(2%)	183	93
T.B.Mg+TritonX100(2%)+NaCl(25mM)	197	100
Tris/HCl(30mM)+β mercaptoéthanol(5mM) +MgCl ₂ (5mM)+TritonX100(2%)+NaCl(25mM)	133	67

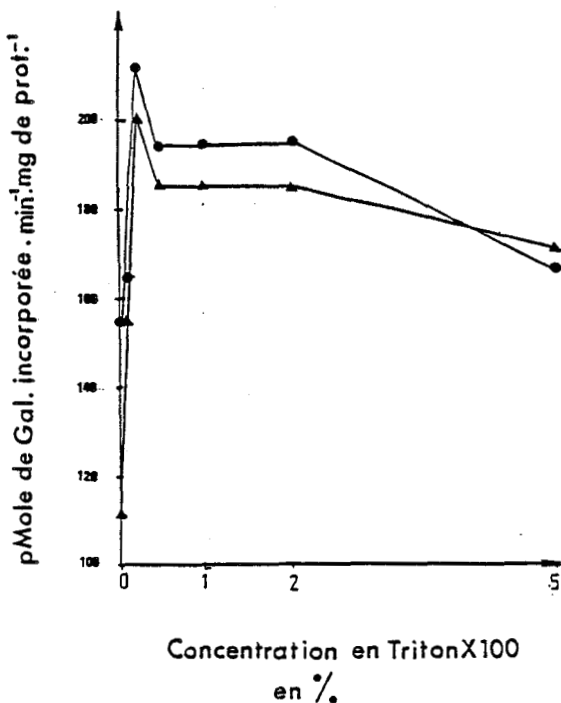


Figure 14 : Influence de la concentration en Triton X100 dans le tampon de solubilisation du précipité P'2 , sur l'activité de la galactosyltransférase du lait humain.

L'activité enzymatique est mesurée dans les conditions standard décrites dans le Chapitre Matériel et Méthodes. Elle est mesurée avec la N-Acétyleglucosamine (●) et le glycopeptide β de l'ovomucoïde (▲).

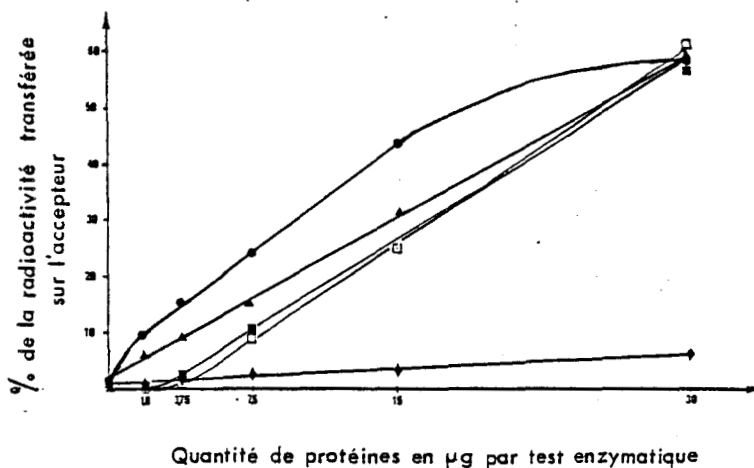


Figure 15 : Variation de l'activité galactosyltransférase avec différents accepteurs, en fonction de la quantité de protéines (exprimée en μ g introduit par essai enzymatique).

Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité [14 C] Gal incorporée au niveau de l'accepteur par rapport à la radioactivité totale introduite dans le milieu réactionnel sous la forme d'UDP- 14 C Gal (500pMole/test)

LEGENDE: ● N-Acétyleglucosamine, ◆ ovotransferrine
■ glucose, □ glucose + α -lactalbumine, ▲ glycopeptide β de l'ovomucoïde

B - INFLUENCE D'AUTRES PARAMETRES

1 - Concentration en protéines

Nous avons vérifié que dans nos conditions standard l'activité enzymatique était proportionnelle à la concentration en protéines : Fig. N° 15 p. 104.

2 - Concentration en accepteurs

Pour comparer la galactosylation du glucose et de la N-acétylglucosamine, les constantes d'affinité de l'enzyme ont été définies pour chacun de ces deux accepteurs. Elles sont de 5,5 mM et 1,1 mM respectivement : Fig. n° 16 p. 106.

3 - Stabilité de la galactosyltransférase

a) A + 4° C

La conservation de la fraction P₂ du lait solubilisée à +4° C pendant plus de 30 jours n'entraîne aucune perte de l'activité enzymatique.

b) A + 37° C

Quand la fraction P₂ est préincubée à + 37° C, quatre phases sont à considérer :

- Dans les 20 premières heures de préincubation à 37 ° C, l'activité galactosyltransférase augmente quelque soit l'accepteur : Tableau XIII p. 107.

En moyenne, cette augmentation est de l'ordre de 25 à 50 %.

- Une fois l'optimum de l'activité enzymatique atteint, celle-ci chute de l'ordre de 10 % en deux heures.

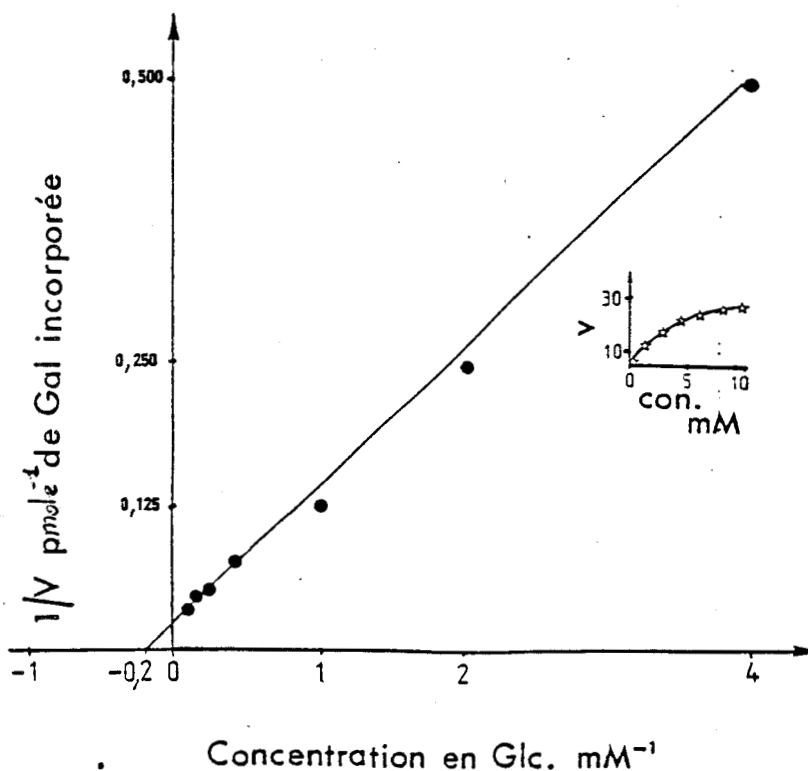
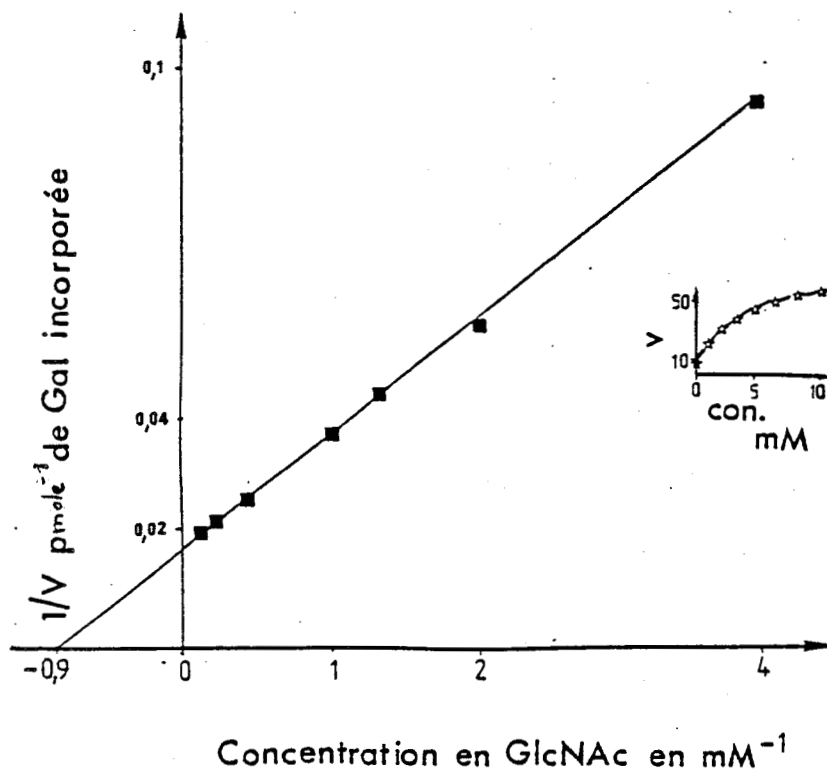


Figure 16 : Influence de la concentration en accepteur sur l'activité de la galactosyltransférase de la fraction P'2 du lait humain. Les accepteurs sont la N-Acétyleglucosamine (■) et le glucose (●). Les figures intégrées représentent l'activité enzymatique, exprimée en % de [^{14}C]Gal incorporé au niveau de l'accepteur, en fonction de la concentration en accepteur (mM).

TABLEAU XIII: Stabilité de l'activité galactosyltransférasique de la fraction P'2 du lait préincubé à 37°C.
 La mesure de l'activité est réalisée dans les conditions standard de réaction enzymatique.

Temps de préincubation à 37°C en min. Accepteurs	Activité galactosyltransférasique en pMole incorporé/min/mg de protéine				
	t=0	t=20	t=22	t=100	t=150
N-acétylglucosamine	190	240	210	200	75
Glycopeptide β de l'ovomucoïde	150	230	210	200	60
Glucose	130	160	144	100	0
Glucose + α -lactalbumine	130	200	180	150	0
Ovotransferrine	40	55	50	27	0

-Après 22 heures de préincubation à 37° C, l'activité galactosyltransférase reste stable une certaine d'heures

- Au delà de 100 H de préincubation à 37° C, l'activité enzymatique décroît progressivement.

Quand le glucose est l'accepteur, elle devient nulle après 140 H à 37° C. Quand la N-acétylglucosamine et le glycopeptide β de l'ovomucoïde sont utilisés en tant qu'accepteurs, il faut attendre 300 H avant de voir disparaître toute activité.

La préincubation à 37° C affecterait les sites enzymatiques de régulation conduisant à une perte de spécificité de substrats. La question est de savoir si nous sommes en présence d'une seule enzyme possédant les activités lactose et N-acétyllactosamine synthétase ou de deux enzymes distinctes aux propriétés différentes.

Pour ce faire, des expériences de compétition de substrats ont été menées.

C - COMPÉTITION D'ACCEPTEURS

Une série d'analyses nous ont permis de mettre en évidence une compétition entre les différents accepteurs vis-à-vis de la galactosyltransférase. Nous avons calculé la vitesse de réaction dans le cas où deux accepteurs entrent en compétition pour le site actif d'une enzyme en utilisant l'équation suivante (Dixon et Webb -42-) :

$$v = (V_1 \cdot S_1 \cdot K_1^{-1} + V_2 \cdot S_2 \cdot K_2^{-1}) (1 + S_1 \cdot K_1^{-1} + S_2 \cdot K_2^{-1})$$

V_1 et V_2 sont les vitesses maximales de réaction

S_1 et S_2 sont les concentrations des deux accepteurs

K_1 et K_2 sont les valeurs des K_m apparents correspondants.

La vitesse de la réaction, pour le cas où deux enzymes distinctes agissent indépendamment sur les accepteurs, est la somme des vitesses de réaction évaluées séparément.

En fonction des résultats indiqués au Tableau XIV p. 110 et de la représentation de Scatchard de la constante d'affinité pour la N-acétylglucosamine comme accepteur en présence dans le milieu enzymatique de glucose (Fig. 17 p. 110), nous pouvons affirmer qu'un seul site enzymatique est présent dans la fraction P₂ du lait humain.

CONCLUSION

Ces premiers résultats conduisent à trois constatations :

1 - La fraction P₂ du lait humain contient 60 à 70 % d' α -lactalbumine

2 - La fraction P₂ possède une activité galactosyltransférasique. Cette enzyme transfère du galactose sur le glucose, la N-acétylglucosamine, le glycopeptide β de l'ovomucoïde et l'ovotransferrine.

3 - Après avoir défini les conditions optimales d'activité, il a été démontré qu'il n'existe qu'un seul site enzymatique accepteur du glucose et de la N-acétylglucosamine. Ce dernier point permet de soulever la discussion à deux niveaux :

a) Les travaux de Pertsounis (-145-) ont permis de mettre en évidence deux activités galactosyltransférasiques distinctes dans la fraction P₂ du lait humain : l'une d'entre elle ne transférant pas de galactose sur le glucose, même en présence d' α -lactalbumine. Ce résultat a été obtenu après purification de la fraction. Il paraît donc important de rechercher l'origine de cette différence compte tenu

TABLEAU XIV : Expérience de compétition entre le glucose et la N-Acétylglucosamine ~~et la~~ galactosyltransférase du précipité P'2 du lait humain. Le calcul de la vitesse de réaction lors de la compétition entre les deux accepteurs, pour un seul site enzymatique est:

$$v = (V_1 \cdot S_1 \cdot K_1^{-1} + V_2 \cdot S_2 \cdot K_2^{-1}) (1 + S_1 \cdot K_1^{-1} + S_2 \cdot K_2^{-1})^{-1}$$

K_1 et K_2 sont les K_m déterminées pour la GlcNAc et Glc respectivement

V_1 et V_2 sont les V_m déterminées pour la GlcNAc et Glc respectivement

Le milieu réactionnel est identique aux conditions standard .

ACCEPTEURS		INCORPORATION DU GALACTOSE		
GlcNAc	Glc	pmole/min/mg de protéine		
mM	mM	Mesurée	Calculée pour	
			1 enzyme	2 enzymes
1	0	150		
0	10	157		
1	10	190	207	307
10	0	272		
0	10	157		
10	10	255	277	429

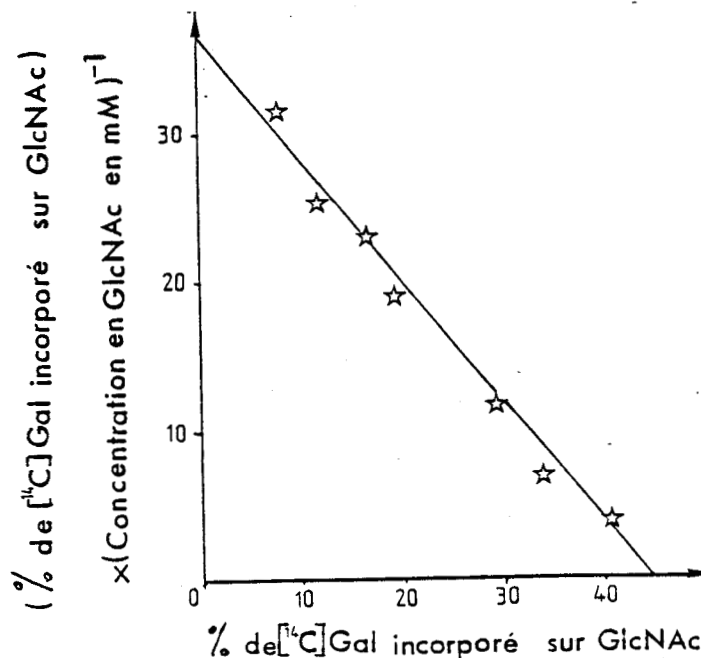


Figure 17 : Représentation de Scatchard de l'activité galactosyltransférasique de la fraction P'2 du lait humain. L'activité enzymatique est mesurée dans les conditions standard , en présence de glucose(10mM) L'activité est exprimée en % de la radioactivité $[^{14}\text{C}]$ Gal incorporée sur l'accepteur.

de la présence apparente d'un seul site enzymatique.

b) S'il est possible de trouver, au cours d'une purification, une fraction enzymatique ne possédant pas l'activité lactose synthétase, la question serait donc de savoir dans quelles mesures ce résultat est à rapprocher de notre étude de stabilité à 37° C. En effet, après 140 H à 37° C la galactosyltransférase de la fraction P₂ agit uniquement sur la N-acétylglucosamine utilisé en tant qu'accepteur, le transfert sur le glucose devenant nul.

Dans le chapitre II, nous tenterons donc, au cours de sa purification de comprendre le comportement de la molécule enzymatique.

CHAPITRE II

PURIFICATION DE LA GALACTOSYLTRANSFERASE

DU LAIT HUMAIN

CHAPITRE II

PURIFICATION DE LA GALACTOSYLTRANSFÉRISE

DANS LE LAIT HUMAIN

Pour comprendre le comportement de la galactosyltransférase du lait, nous avons entrepris sa purification afin de préciser la spécificité d'action et la taille moléculaire de l'enzyme. Ainsi, nous avons choisi deux méthodes : la première est une chromatographie de tamisage moléculaire, la seconde est une chromatographie d'affinité.

I - TAMISAGE MOLÉCULAIRE SUR ULTROGEL AcA54

L'Ultrogel AcA54 a été choisi pour la purification de la fraction P₂ du lait parce que la zone de fractionnement de ce support doit permettre la séparation de l'enzyme avec l' α -lactalbumine.

A - MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE

Dans un premier temps, 10 mg de la fraction P₂ du lait ont été solubilisés dans un tampon de cacodylate (25 mM) pH 7,2, MgCl₂ (5 mM), β -mercapto-éthanol (0,5 mM) NaCl (25 mM) et Triton X100 (2 %). Après injection des protéines sur la colonne d'Ultrogel AcA54 (2 x 140 cm) équilibrée dans ce même tampon, l'activité galactosyltransférase a été mesurée sur chaque fraction (10 ml).

Dans un second essai, 2 g de la fraction P₂ ont été injectés dans les mêmes conditions.

Comme l'indiquent les profils chromatographiques présentés aux Fig. 18 A et B p. 113, la zone de fractionnement de la galactosyltransférase est très large. Elle s'étend du volume mort au volume total de la colonne.

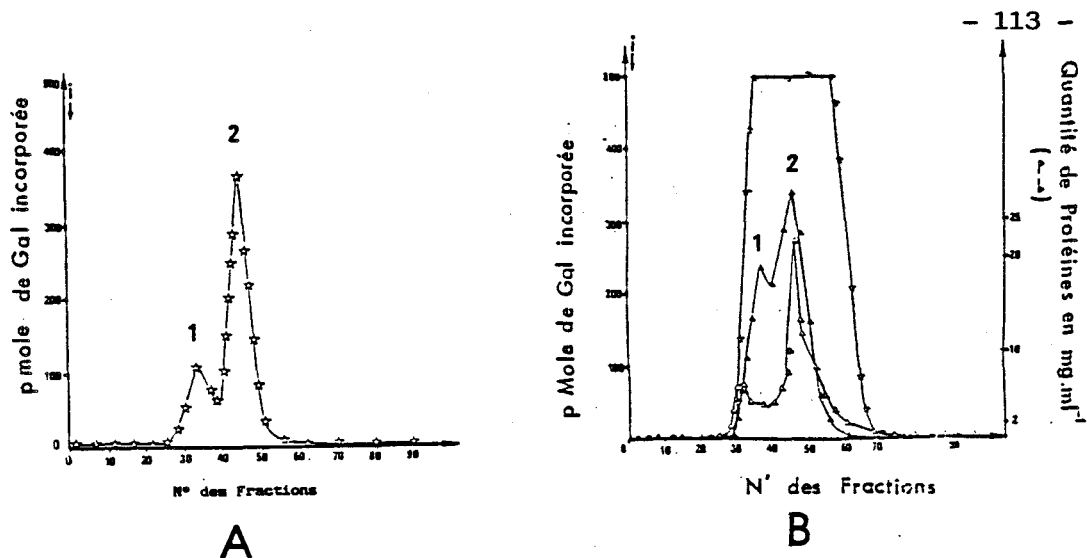


Figure 18 : Chromatographies de tamisage moléculaire sur Ultrogel ACA54. 10 mg(A) ou 2g(B) de la fraction P'2 du lait Humain sont injectés sur la colonne(860ml) dans un tampon: Cacodylate (25mM), $MgCl_2$ (5mM), NaCl(25mM), β -mercaptoéthanol(0,5mM) et Triton X-100(2%). Des fractions de 10 ml sont collectées et l'activité galactosyltransférase est mesurée avec la N-acétylglucosamine et le glycopeptide β de l'ovomucoïde comme accepteurs.

LEGENDE : 1, injection

- (*) Activité galactosyltransférase mesurée à partir des fractions non diluées.
- (\blacktriangle) Activité galactosyltransférase mesurée sur les fractions diluées 40 fois
- (\triangle) Quantité de protéines exprimée en mg/ml .

1 et 2 sont les deux pics d'activité galactosyltransférase détectés.

TABLEAU XV : Activité galactosyltransférase de la fraction 48 éluée de la colonne de chromatographie de tamisage moléculaire sur Ultrogel ACA54 décrite à la Fig. 18B. Correspondance avec la Photo 2 p.(16couloir 5).

ACCEPTEURS	INCORPORATION DU GALACTOSE pMole/min./mg de protéine Fraction 48
N-acétylglucosamine (10mM)	496
Glycopeptide β de l'ovomucoïde(0,5 mg/ml soit 1.1mM équivalent GlcNAc)	517
Glucose (10 mM)	307
Glucose + α -lactalbumine (10mM)	362
Ovotransferrine(1mg/ml soit 35 μ M équivalent GlcNAc)	84

B - ANALYSE DES FRACTIONS

I - Activité galactosyltransférase

Différents accepteurs ont été utilisés pour mesurer l'activité de la galactosyltransférase. A l'optimum de l'activité enzymatique (fraction 48 : élue à 480 ml), un transfert de galactose peut avoir lieu avec la N-acétylglucosamine, le glucose, le glycopeptide β de l'ovomucoïde et l'ovotransferrine comme accepteurs (Tableau XV p. 113).

Dans ce tableau, deux remarques peuvent être dégagées :

* Les fractions enzymatiques chromatographiées n'excluent aucun accepteur par rapport à la fraction P₂ initiale.

* Après tamisage moléculaire, le transfert de galactose sur le glucose est toujours possible sans apport exogène d' α -lactalbumine. A l'optimum de l'activité enzymatique, l'incorporation du galactose sur le glucose est de 307 pmoles/min./mg de protéine contre 362 en présence d' α -lactalbumine. Ce résultat signifie que le cofacteur de la lactose synthétase est élué de la colonne de tamisage moléculaire en même temps que la galactosyltransférase.

2 - Analyse de protéines en électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les fractions issues du tamisage moléculaire (2 g de protéines injectées) ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12 %) en présence de SDS.

Comme on peut le constater sur la Photo N° 2 p. 116, l' α -lactalbumine (14,4 kDa) représente la protéine majeure de la fraction P₂. Au cours du tamisage moléculaire, les protéines de masse moléculaire supérieure à 30 kDa sont éluées en majorité avec l' α -lactalbumine. Cette dernière toutefois se purifie essentiellement avec une protéine de 67 kDa et des protéines de taille inférieure à 14 kDa, c'est-à-dire quand l'activité galactosyltransférase est optimale (fractions éluées vers 480 ml).

C - CONCLUSION

Le fractionnement par chromatographie de tamisage moléculaire de la fraction P₂ du lait, nous révèle une grande hétérogénéité des masses moléculaires de l'enzyme pouvant supporter l'activité galactosyltransférase. Le spectre chromatographique de l'enzyme sur colonne d'Ultrogel AcA54 est en effet très large.

L'optimum de l'activité enzymatique, effective sur les différents accepteurs utilisés jusqu'à présent, coïncide avec l'éluion de l' α -lactalbumine. En fin de chromatographie, les seules protéines visibles en gel de polyacrylamide sont l' α -lactalbumine, une protéine de 67 kDa de masse moléculaire et un petit groupe de protéines de masse inférieure à 14 kDa. Il semble difficile d'attribuer l'activité enzymatique à une masse moléculaire bien précise, mais toutefois la présence d'une protéine de 67 kDa en relation avec l'activité galactosyltransférase pourrait être une indication.

Par différentes méthodes, de nombreux auteurs ont déterminé la taille de la galactosyltransférase. Les résultats sont tous sensiblement différents

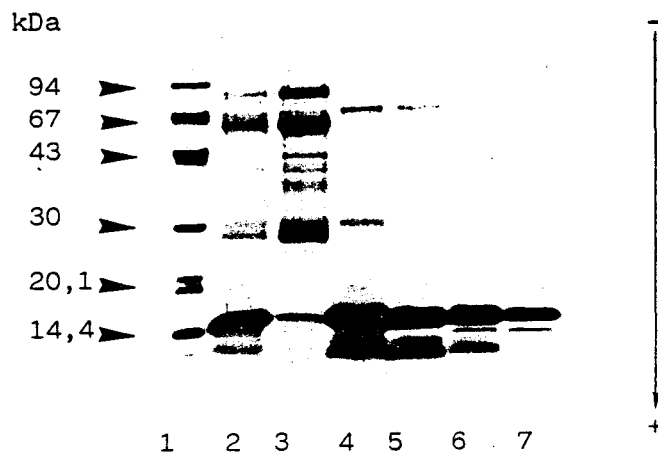


PHOTO 2 : Présentation des protéines éluées de la colonne d'Ultrogel AcA54, tamisage moléculaire de la fraction P₂' du lait Humain(cf Fig 10 B p.413).

Les protéines sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide(12%) en présence de SDS.

- Couloirs 1 : Témoins de masse moléculaire
2 : Fraction P₂' initiale
3 à 7 : Fractions (10 ml) successivement éluées de la colonne: fractions 32-42-48-54-60

et discutables (voir Chapitre II des Généralités), mais d'une manière générale, elle est estimée entre 40 et 96 kDa dans le lait humain (40 kDa selon Andrews -3-, 50 et 96 kDa selon Khatra *et al.*-90-, 55 kDa selon Gerber *et al.*-62-).

La purification de nombreuses galactosyltransférases étant réalisée par chromatographie d'affinité, nous avons tenu à comparer nos résultats avec ceux obtenus avec cette technique afin de mieux analyser l'hétérogénéité apparente de la galactosyltransférase du lait.

II - PURIFICATION DE LA FRACTION P₂ PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ

Cette méthode est largement utilisée pour la purification de la galactosyltransférase. Elle permet de sélectionner spécifiquement l'enzyme recherchée en adaptant le support chromatographique à la spécificité d'action de l'enzyme.

Dans le cas de notre étude, différents supports ont été testés. Avec la fraction P₂, l'affinité avec l' α -lactalbumine immobilisée, cofacteur de la lactose synthétase, n'est pas adaptée ; l' α -lactalbumine libre dans la fraction P₂ serait immédiatement compétitrice de celle immobilisée.

La présence d'hexosaminidases très actives dans la fraction P₂ exclut la chromatographie d'affinité avec un accepteur de l'enzyme immobilisé. Les essais toutefois réalisés avec le glycopeptide β de l'ovomucoïde sont intéressants mais il devient impossible de renouveler l'opération plus de deux fois avec le même support.

Nous avons donc purifié la galactosyltransférase avec l'UDP immobilisé. L'enzyme forme, en présence d'ions Mn^{++} , un complexe avec l'UDP. Dans un second temps, nous avons poursuivi la purification par chromatographie d'affinité avec la N-acétylglucosamine immobilisée.

A - CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ SUR UDP-AGAROSE

25 mg de la fraction P₂ sont injectés sur la colonne d'UDP-Agarose. Le tampon d'éluion est le cacodylate (25 mM) pH 7,2, $MnCl_2$ (25 mM), NaCl (25 mM), β -mercapto-éthanol (0,5 mM) et Triton X100 (2 %).

L'éluion spécifique de la galactosyltransférase est réalisée, dans un premier temps, par un tampon sans $MnCl_2$ puis, dans un second temps, en ajoutant du NaCl 1M. La Fig. 19 p. 119 présente le profil de l'activité galactosyltransférase obtenue après chromatographie.

1 - Analyse de l'activité

Trois pics d'activité enzymatique sont obtenus :

* Un pic F1 non retenu sur la colonne d'UDP-Agarose, contient l'ensemble des protéines de la fraction P₂. Le transfert de galactose peut être réalisé avec la N-acétylglucosamine, le glycopeptide β de l'ovomucoïde, l'ovotransferrine et le glucose comme accepteurs (Fig. 20 II p. 119).

* Un pic F2 est élué par le tampon sans ions Mn^{++} . Cette fraction F2, de faible amplitude d'activité galactosyltransférase, réalise essentiellement le transfert de galactose avec la N-acétylglucosamine et le glycopeptide β de l'ovomucoïde comme accepteurs (Fig. 20 II p.119). La synthèse du lactose est très faible et nécessite un apport d'exogène en α -lactalbumine.

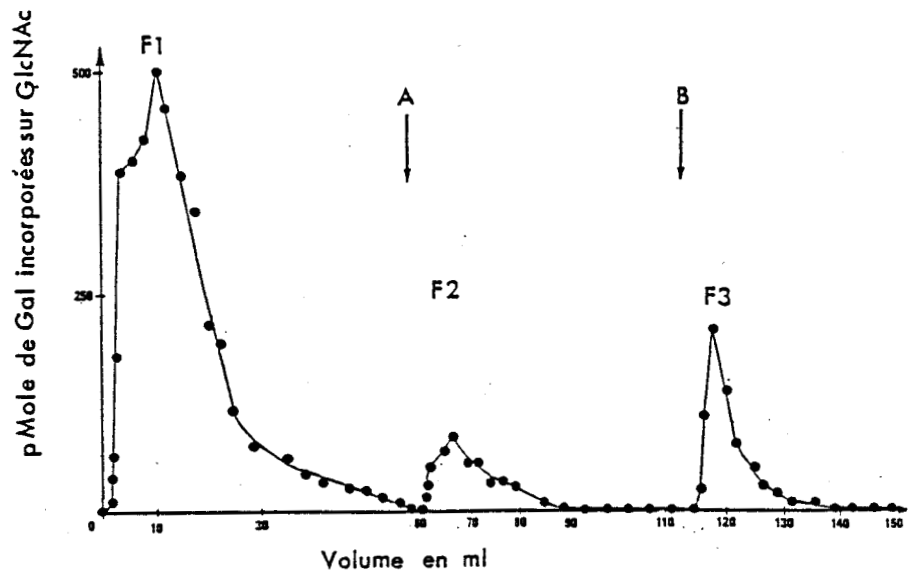


Figure 19 : Chromatographie d'affinité sur UDP-Agarose.
 25 mg de la fraction P'2 du lait humain sont appliqués sur une colonne (1,5x4cm) équilibrée dans un tampon cacodylate (25mM), $MnCl_2$ (25mM) μ mercaptoéthanol (0,5mM), Triton X100 (2%). L'activité enzymatique est mesurée dans les conditions standard avec la N-Acétyleglucosamine. Chaque fraction correspond à 1,2ml (F1) , 0,8ml (F2 et F3) . Les éluitions successives sont indiquées en:
 A : Tampon sans $MnCl_2$
 B : Tampon sans $MnCl_2$ plus NaCl 1M
 F₁- F₂- F₃ : trois pics d'activité enzymatique obtenus

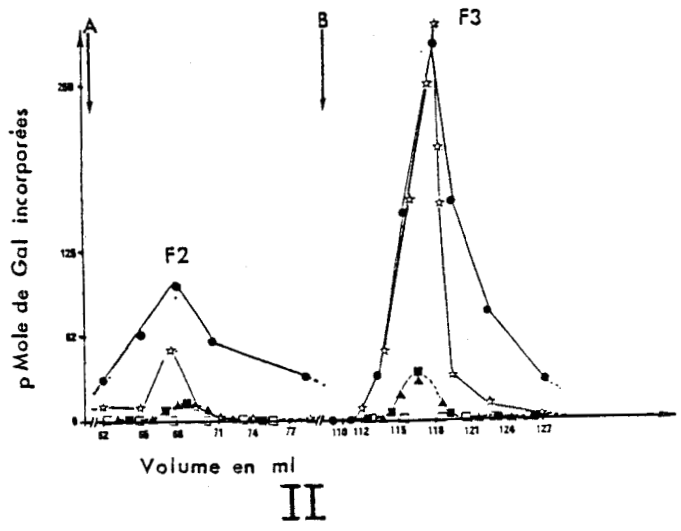
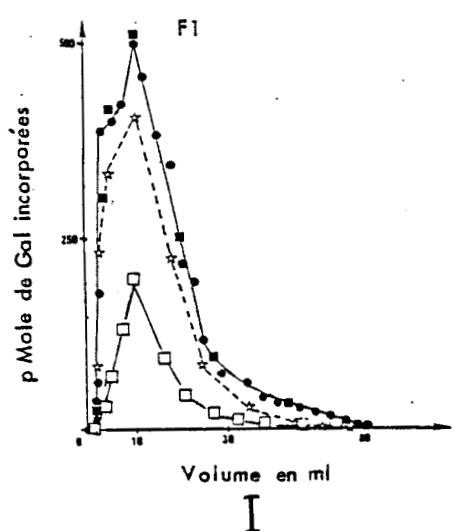


Figure 20 : Chromatographie d'affinité sur UDP- Agarose . La galactosyltransférase de la fraction P'2 du lait humain chromatographiée (cf Fig. 19) est mesurée avec différents accepteurs:
 (●) N-Acétyleglucosamine, (□) glucose , (▲) ovotransferrine,
 (■) glucose + α -lactalbumine, (*) glycopeptide β de l'ovomucoïde
 I: Fraction F1 non retenue sur le support d'affinité
 II: Fractions F2 et F3 éluées par A (tampon sans $MnCl_2$) et B(tampon sans $MnCl_2$ plus NaCl 1M).

* Un pic majeur d'activité, F3, est enfin élué de la colonne d'UDP-Agarose par un tampon sans Mn^{++} mais enrichi de NaCl 1M. Les fractions sont actives en utilisant la N-acétylglucosamine et le glycopeptide β de l'ovomucoïde comme accepteurs (Fig. 20 II p. 119). L'activité lactose synthétase devient négligeable dans ces fractions.

2 - Étude des protéines

L'analyse des fractions F2 et F3 par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Photos 3 p. 121), nous confirme l'hétérogénéité des masses moléculaires de la galactosyltransférase éluee. Peu de différences apparaissent entre ces différentes fractions hormis la quantité protéique plus faible dans F2.

Par immunoélectrophorèse monodimensionnelle (technique des Rockets), avec un sérum anti- α -lactalbumine (Photos 4 p. 121), la présence d' α -lactalbumine peut être détectée dans chacune des fractions F1, F2 et F3. Il convient donc de purifier davantage par une seconde chromatographie d'affinité : la N-acétylglucosamine-Agarose.

B - CHROMATOGRAPHIE SUR GlcNAc-AGAROSE

Pour éviter la dialyse des fractions F2 et F3, nous avons maintenu la présence de NaCl 1M dans le tampon de chromatographie (méthode de Furukawa et Roth -60-). F2 et F3 sont donc injectées respectivement sur la colonne (10 ml), dans le même tampon cacodylate (25 mM) pH 7,2, β -mercapto-éthanol (0,5 mM), Triton X100 (2 %), NaCl (1M) et $MnCl_2$ (25 mM). L'élution spécifique de la galactosyltransférase est réalisée par ce même tampon en présence de N-acétylglucosamine (10 mM).

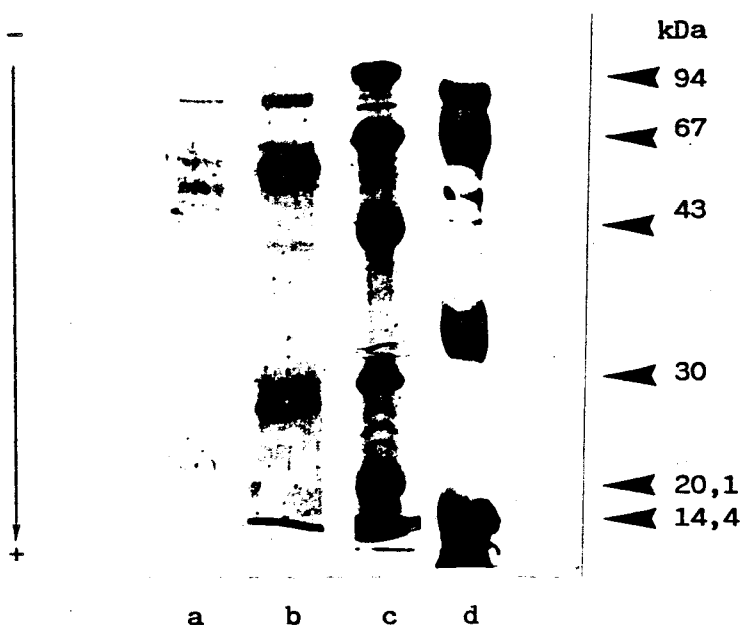


PHOTO 3 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% en présence de SDS, des fractions F2 et F3 obtenues par chromatographie d'affinité (cf Fig. 20 p.119).

- a : F2, fraction retenue et éluée par le tampon sans $MnCl_2$
- b : F3, fraction retenue et éluée par le tampon sans $MnCl_2$ plus NaCl 1M
- c : Témoins de masse moléculaire
- d : Fraction P'_2 initiale

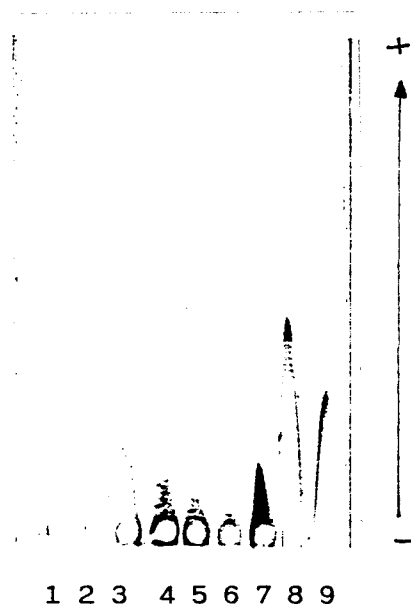


PHOTO 4 : Immunoélectrophorèse monodimensionnelle(technique de ROCKETS), des fractions F1, F2 et F3(3 μ l) obtenues après chromatographie d'affinité sur UDP-Agarose, contre un sérum anti- α -lactalbumine (300 μ l/plaque 5x10).

- 1-2-3 : fractions de F1
- 4-5-6 : fractions de F2
- 7-8-9 : fractions de F3

L'ensemble des résultats est présenté dans la Fig. 21 p.123 et l'activité mesurée sur les différents accepteurs est exprimée dans le Tableau XVI p.123.

Ce qu'il faut retenir de ces figures et tableau se résume en deux points :

* la fraction F3 injectée sur la colonne de GlcNAc-Agarose contient une partie de la galactosyltransférase qui n'est pas retenue sur le support

* la fraction retenue quant à elle, possède l'activité N-acétyllactosamine synthétase uniquement.

Enfin, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide coloré au nitrate d'argent ou par immunoelectrophorèse, aucune protéine n'est détectable dans la fraction F3 retenue sur GlcNAc-Agarose. La concentration de ces fractions par dialyse implique une perte totale de l'activité enzymatique.

C - CONCLUSION

1 - Existence de deux activités distinctes ou non ?

Les résultats que nous venons d'obtenir en purifiant la fraction P₂ par chromatographie d'affinité, corrobore ceux de Pertsounis (-145-), qui avait utilisé deux autres supports (α -lactalbumine-Sépharose et glycopeptide β de l'ovomucoïde-Sépharose).

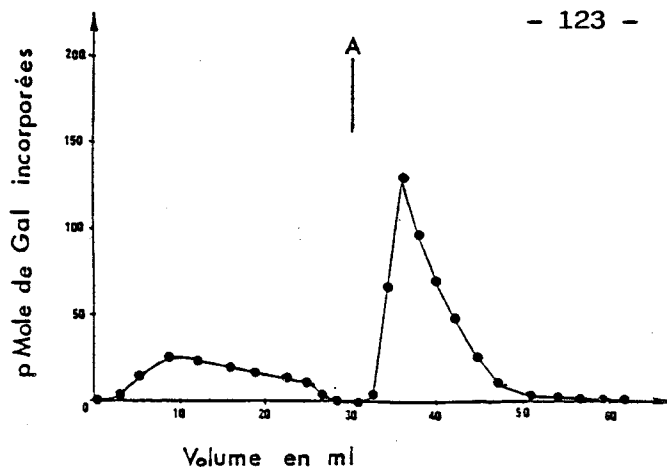
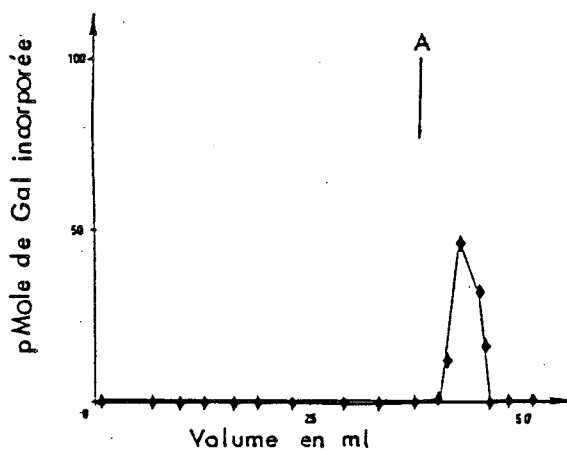


Figure 21 : Chromatographie d'affinité sur GlcNAc-Agarose.

Les fractions retenues sur la colonne d'UDP-Agarose (cf Fig. 20) sont appliquées sur une colonne de GlcNAc-Agarose (1,5x6cm), équilibrée dans un tampon cacodylate (25mM), $MnCl_2$ (25mM), β mercaptoéthanol (0,5mM), Triton X100 (2%) et NaCl 1M.

F1 et F3, les deux pics d'activité enzymatique retenus sur sur la colonne d'UDP-Agarose.

L'éluion de la galactosyltransférase réalisée sur GlcNAc-Agarose

se fait en A par le tampon contenant la N-acétylglucosamine (10mM)

L'activité enzymatique est mesurée avec la N-acétylglucosamine comme accepteur (conditions standard).

TABLEAU XVI : Activité galactosyltransférasique après purification sur UDP-Agarose et GlcNAc-Agarose. L'activité enzymatique mesurée dans les conditions standards, a été mesurée à partir de la fraction la plus active

ACCEPTEURS	GlcNAc	Glc	Glc + M-lactalbu- mine	Glycopepti- de β de l'ovo- mucoïde	Ovotrans- ferrine
INCORPORATION DU GALACTOSE EN pMole/heure					
Colonne d'UDP-Agarose					
Fraction non retenue (F1)	355	390	365	420	150
Fraction retenue (F3)	350	0	3,5	350	20
Colonne de GlcNAc-Agarose (F3 injectée)					
Fraction non retenue	30	0	3,5	23	6
Fraction retenue	125	0	0	0	0

En effet, dans tous les cas, les fractions retenues spécifiquement sur les supports chromatographiques ne possèdent pas l'activité lactose synthétase. Tout se passe comme si cette activité était distincte de l'activité Gal(1-4)GlcNAc-6S-galactosyltransférase. Toutefois, plusieurs éléments nous obligent à nuancer cette hypothèse.

a - Les expériences de compétitions d'accepteurs (Chapitre I p.108) révèlent l'existence d'un seul site enzymatique.

b - Les ions Mn^{++} du tampon et l' α -lactalbumine de la fraction P₂ peuvent avec la galactosyltransférase former un complexe stable qui serait exclu des colonnes d'affinité.

c - les fractions retenues sur les supports chromatographiques peuvent contenir la galactosyltransférase dépourvue du site de fixation avec l' α -lactalbumine. Ceci expliquerait pourquoi dans la fraction P₂, la synthèse de la N-acétyllactalbumine soit tout aussi importante que celle du lactose. L' α -lactalbumine, connu pour son rôle inhibiteur de l'activité N-acétyllactosamine synthétase aurait une fonction limitée sur la galactosyltransférase de la fraction P₂. Ce fait a été observé par Prieels *et al.* (-156-) dans le lait de Vache : la galactosyltransférase possède 3 masses moléculaires (50 - 43 et 38 kDa), seule la protéine de 50 kDa supporte une activité N-acétyllactosamine synthétase non inhibée par l' α -lactalbumine.

Une hypothèse de protéolyse endogène est alors avancée pour expliquer les différences de spécificité d'action.

2 - Masse moléculaire de la galactosyltransférase ?

Les résultats obtenus grâce aux chromatographies d'affinité permettent de confirmer ceux de la purification de la fraction P₂ par tamisage moléculaire.

La galactosyltransférase est une enzyme dont la taille n'est pas unique.

Les résultats des différents auteurs ont été précisés au paragraphe précédent. Il convient toutefois de rappeler ceux de Gmeiner (-67-) qui prouvent l'existence de galactosyltransférases hydrophiles et amphiphiles dans le lait humain. Cette distinction est née de la protéolyse de la galactosyltransférase des Glandes Mammaires Humaines, qui se solubilise progressivement pour passer dans le lait. Cette protéolyse implique l'existence de galactosyltransférases de différentes masses moléculaires dont certaines protéines ont gardé le caractère hydrophobe de la protéine initiale.

Il convient donc de rechercher cette protéine hydrophobe dans la fraction P₂ du lait afin de déterminer ses caractéristiques enzymatiques.

3 - Utilisation du NaCl 1M dans les tampons d'élution

Enfin on peut s'interroger sur l'utilisation de NaCl 1M dans les tampons d'élution spécifique des galactosyltransférases des chromatographies d'affinité.

Comme nous l'avons observé dans nos expériences et dans celles de différents auteurs, il est nécessaire pour éluer complètement l'enzyme des supports chromatographiques d'ajouter du NaCl 1M voire même 2 ou 3M dans certains cas au tampon d'élution.

Il nous semble donc indispensable de contrôler la réelle affinité de l'enzyme pour un support de chromatographie d'affinité. Pour ce faire, nous avons appliqué cette technique à la chromatographie de tamisage moléculaire sur Ultrogel AcA54.

III - ISOLEMENT DE LA GALACTOSYLTRANSFÉRISE A L'ÉTAT PUR

A - MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE

Comme nous l'avons discuté dans le paragraphe précédent, l'isolement de la galactosyltransférase par chromatographie d'affinité nécessite l'addition de NaCl 1M dans le tampon d'élution. Nous avons donc appliqué ce principe au cours des tamisages moléculaires réalisés afin d'évaluer le degré d'adsorption de l'enzyme pour un support.

3 g de la fraction P₂ sont injectés sur la colonne (850 ml), dans les conditions établies au Chapitre précédent. 50 ml de tampon contenant du NaCl 1M sont injectés selon le cas avant les protéines (Fig. 22 I p. 127) ou au 1/3 du fractionnement (Fig. 22 II p. 127).

Comme l'indiquent ces figures, il apparaît un troisième pic d'activité par rapport au tamisage moléculaire présenté à la Fig. 18 p. 113. Les fractions de ce pic ont donc été analysées tout particulièrement.

B - CARACTÉRISATION DE L'ACTIVITÉ DU PIC 3

Le pic 3 correspond à une activité galactosyltransférasique. Nous obtenons un transfert de galactose avec la N-acétylglucosamine et le glycopeptide de l'ovomucoïde comme accepteurs (Tableau XVII p. 127).

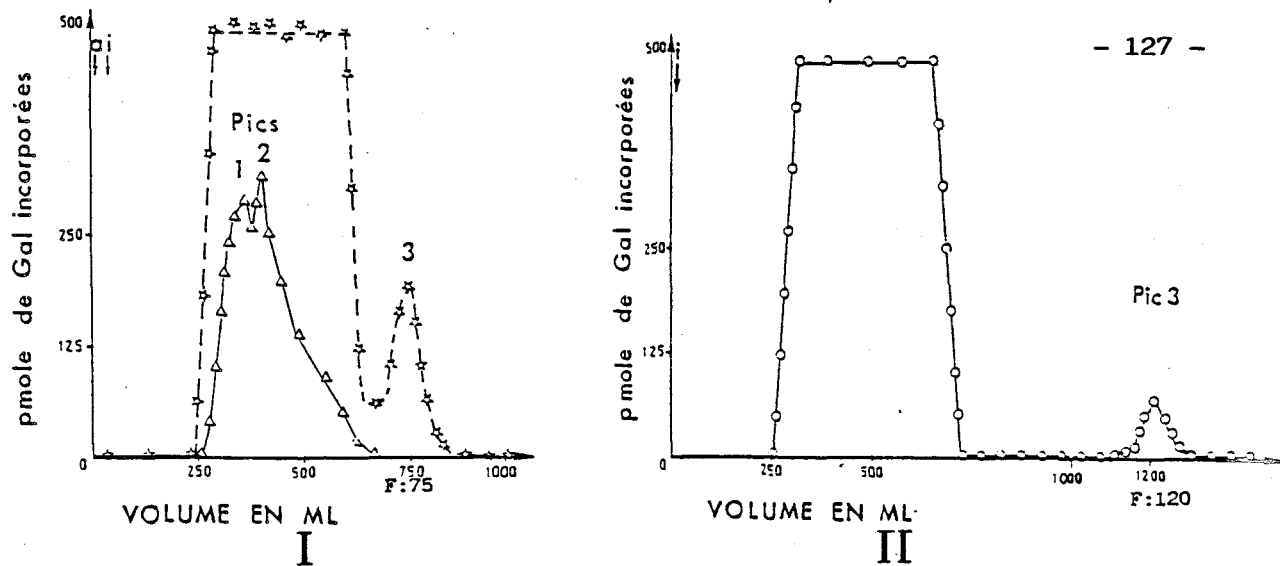


Figure 22 : Chromatographie de tamisage moléculaire sur Ultrogel AcA54 .

3g de la fraction P'2 du lait humain sont injectés sur la colonne dans les mêmes conditions que celles décrites à la Fig. 18. L'injection des protéines est réalisée en i , l'addition de NaCl 1M se fait en a, avant l'injection, cas I, ou à 350 ml après injection, cas II. L'activité galactosyltransférase est mesurée avec la N-Acétyleglucosamine et le glycopeptide de l'ovomucoïde comme accepteurs.

LEGENDE : ☆ ou ○ Activité enzymatique mesurée sur les fractions non diluées
 Δ Activité enzymatique mesurée sur les fractions diluées 100 fois
 F : FRACTION

TABLEAU XVII: Activité spécifique de la galactosyltransférase des fractions 75 et 120 éluées respectivement des chromatographie de tamisage moléculaire par le tampon contenant du NaCl 1M, présentées à la Fig. 22 I et II .

ACCEPTEURS	INCORPORATION DU GALACTOSE pMole/min/mg de protéine	
	Fraction 75	Fraction 120
N-acétyleglucosamine(10 mM)	704	450
Glycopeptide β de l'ovomucoïde(0,5mg/ml soit 1,1mM équiv.GlcNAc)	748	450
Glucose (10mM)	0	0
Glucose + α-lactalbumine (10mM)	176	88
Ovotransferrine(1mg/ml soit 35 μM équivalent GlcNAc)	44	22

L'activité spécifique, de l'ordre de 700 pMoles de galactose/min./mg de protéine pour la N-acétylglucosamine comme accepteur, passe à 170 quand il s'agit du glucose en présence d' α -lactalbumine ; elle est nulle sans cette protéine.

C - CARACTÉRISATION DES PROTÉINES

1 - Par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12 %) en présence de SDS, les fractions du pic 3 révèlent une grande pureté (Photo 5 couloir 9 et Photo 6 p. 129).

Pour la fraction 75 (Fig. 22 p. 127), la bande protéique est située au voisinage de 83 kDa de masse moléculaire. Une très fine bande se distingue à environ 14,4 kDa de masse moléculaire.

Dans la seconde chromatographie (Fig. 22 II p. 127), le pic 3 se répartit sur 6 fractions de 10 ml. Les premières (Photo 6 couloirs e et f p. 129) possèdent 2 bandes protéiques de 110 et 83 kDa environ. Dans les dernières fractions (Photo 6 couloirs g et h p. 129), la protéine de masse 83 kDa est unique.

Le gel de polyacrylamide coloré au nitrate d'argent ne révèle aucune autre bande protéique en dehors de 2 traces à 67 et 55 kDa ; ce doublet est en réalité artificiel, il résulte d'une réaction avec le β -mercapto-éthanol du tampon d'échantillon (Tasheva et Dessev -194 bis-).

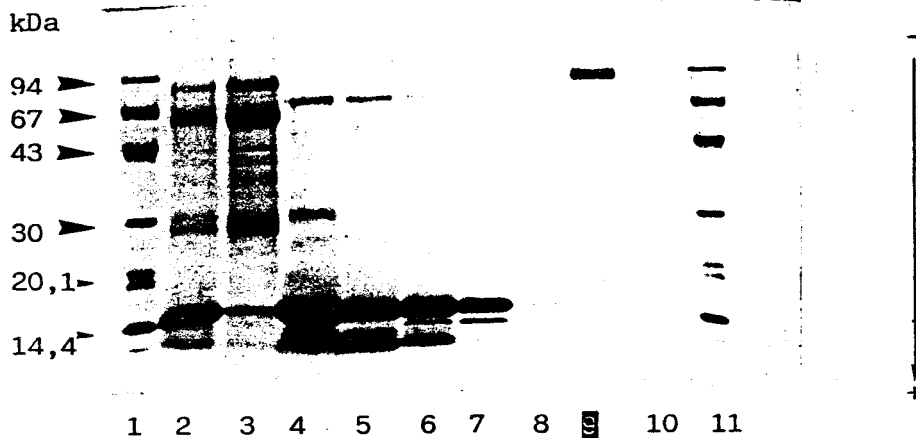


PHOTO 5: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide(12%) en présence de SDS des protéines éluées de la chromatographie présentée Fig. 22I p.127.

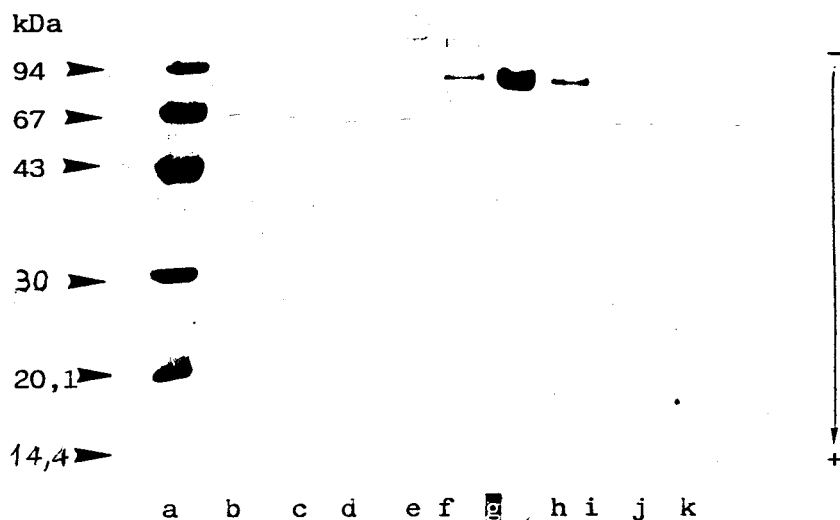


PHOTO 6: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide(12%) en présence de SDS des fractions du pic 3 éluées de la chromatographie présentée à la Fig. 22II p.127.

LEGENDE DES PHOTOS 5 et 6:

- 1 - 11 et a: Témoins de masse moléculaire
- 2 : Fraction P₂' initiale
- 3 à 9 : Fractions(10 ml) éluées successivement de la colonne de chromatographie, N° 32-42-48-54-60-66-75
- 10 : Tampon d'échantillon
- b à k : Fractions(10ml) éluées successivement de la colonne de chromatographie, N°113-114-115-116-118-120-121-123-124-125

2 - Par immunoelectrophorese

En utilisant un serum anti-fraction P₂ du lait, nous pouvons constater un seul arc de precipitation des fractions testees du pic 3 (Photo 7A p. 131).

En immunoelectrophorese monodimensionnelle (technique de Rockets), la hauteur des arcs de precipitation est proportionnelle a la concentration proteique (Photo 7 C p. 131).

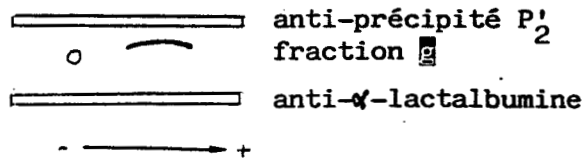
En immunoelectrophorese bidimensionnelle, l'unique arc de precipitation confirme le haut degre de purete de cette preparation (Photo 7 C p. 131).

IV - MISE EN EVIDENCE DES DIFFERENTES TAILLES MOLECULAIRES DE LA GALACTOSYLTRANSFERASE

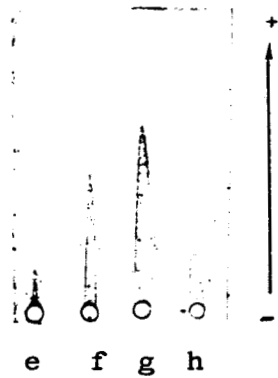
A - TECHNIQUE UTILISEE

La methode utilisee est celle decrite au paragraphe precedent, seule la force ionique du tampon a ete modifiee.

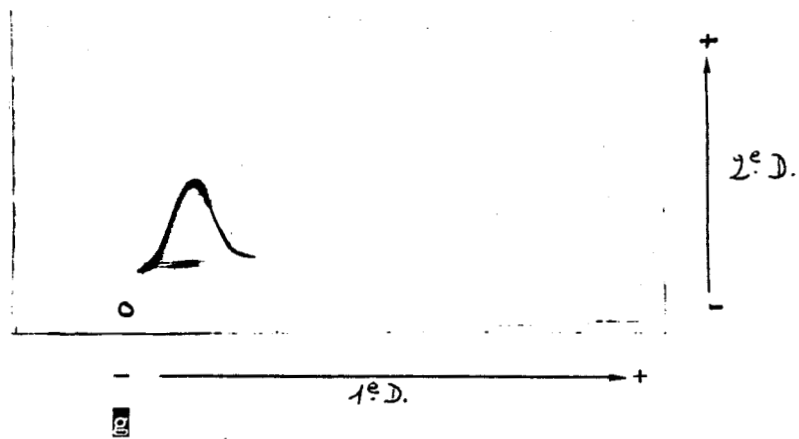
2 g de la fraction P₂ sont injectes sur la colonne d'Ultrogel AcA54 equilibree dans un tampon cacodylate (12 mM) pH 7,2, MgCl₂ (2,5 mM), NaCl (12 mM), Triton X100 (1 %) et sans β-mercapto-ethanol. Au cours du fractionnement, 50 ml de tampon contenant du NaCl 1M sont injectes pour permettre l'elution de la fraction adsorbée sur le support. La courbe d'activite enzymatique est presentee a la Fig. 23 p. 132 .



A- Immunoélectrophorèse monodimensionnelle de la fraction 120 (couloir g PHOTO 6)- 20 µl-contre les sérum anti-précipité P₂' et anti-α-lactalbumine-100 µl.



B- Immunoélectrophorèse monodimensionnelle selon la technique de ROCKETS des fractions 116-118-120 -121(5 µl)(couloirs e,f,g,h, de la PHOTO 6) contre le sérum anti-précipité P₂' (1,2 ml/plaque 10x10).



C- Immunoélectrophorèse bidimensionnelle de la fraction 120 (30 µl) (couloir g de la PHOTO 6) contre le sérum anti-précipité P₂'(400 µl/ plaque 10x10)- 1^{ère} dimension,1H- 2^{ème} dimension,16H.

PHOTO 7 : Immunoélectrophorèses du pic 3 d'activité galactosyltransférase élué de la chromatographie de tamisage moléculaire présenté à la Fig. 22II p.127.

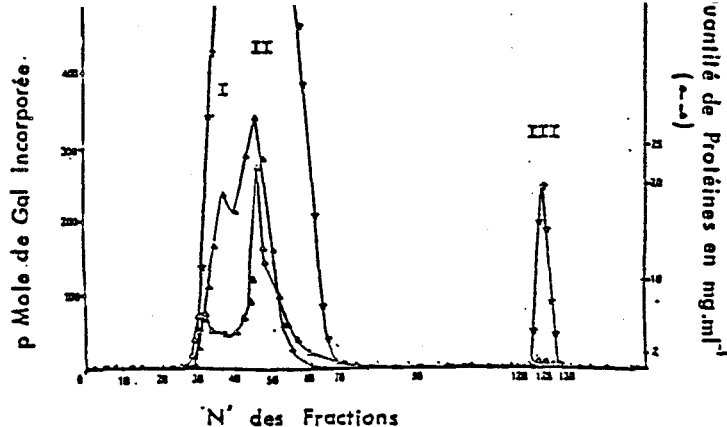


Figure 23 : Chromatographie de tamisage moléculaire sur Ultrogel AcA54.

2g de la fraction P'2 du lait humain sont injectés sur la colonne(860 ml) dans un tampon de faible force ionique : cacodylate(25mM), MgCl₂ (2,5mM), NaCl (12mM), Triton X-100(1%). Les fractions sont collectées(9ml) et l'activité galactosyltransférase est mesurée avec la N-acétylglucosamine et le glycopeptide β de l'ovomucoïde.

LEGENDE : i, injection; a. 50ml de tampon contenant du NaCl 1M

(*) Activité galactosyltransférase mesurée à partir des fractions non diluées.

(▲) Activité galactosyltransférase mesurée sur les fractions diluées 40 fois

(△) Quantité de protéines exprimée en mg/ml .

I,II,III, sont les trois pics d'activité galactosyltransférase détectés .

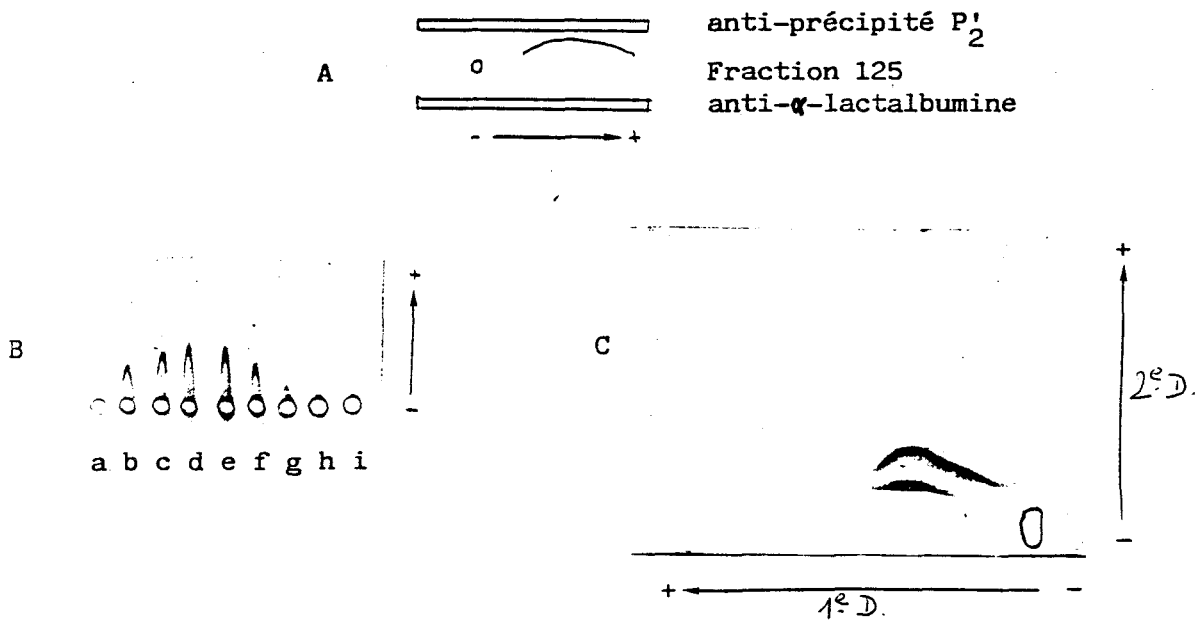


PHOTO 8 : Immunoélectrophorèses du pic III d'activité galactosyltransférase présenté ci-dessus(Fig. 23).

A: Immunoélectrophorèse monodimensionnelle de la fraction 125 (20 µl) contre les sérum anti-précipité P'₂ et anti-α-lactalbumine (100 µl).

B- Immunoélectrophorèse monodimensionnelle selon la technique des ROCKETS, des fractions éluées successivement de la colonne 122 à 130(a à i)-5 µl- contre le sérum anti-précipité P'₂(1ml)

C- Immunoélectrophorèse bidimensionnelle de la fraction 125 (20 µl) contre le sérum anti-précipité P'₂(400 µl/plaque 10x10).

B - ANALYSE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

Comme dans le cas des expériences décrites au paragraphe III, le profil de l'activité galactosyltransférasique se découpe en trois pics. Le pic 3 représente les fractions enzymatiques adsorbées sur le support. L'activité spécifique de ces fractions, mesurée avec la N-acétylglucosamine comme accepteur, est de 1828 n Moles de galactose incorporé/min./mg de protéine et de 1843 quand le glycopeptide β de l'ovomucoïde est l'accepteur. Cette activité spécifique est 2,5 fois plus élevée que celle des expériences précédentes (force ionique du tampon, double) soit 38 fois plus élevée que celle du lait de départ.

C - ANALYSE DES PROTÉINES

1 - Par immunoélectrophorèse

Le pic 3 d'activité galactosyltransférasique, étudié plus particulièrement, révèle un haut degré de pureté en immunoélectrophorèse réalisée avec un sérum anti-fraction P₂ (Photos 8 p. 132). Nous obtenons, en effet, un seul arc de précipitation.

2 - Par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % en présence de SDS, indique des résultats très différents de ceux des expériences du paragraphe III (Photo 9 p. 134).

Chacune des fractions du pic 3 est composée de plusieurs protéines qui correspondent pour les majeures aux masses moléculaires - 110 - - 83 - - 67 - et

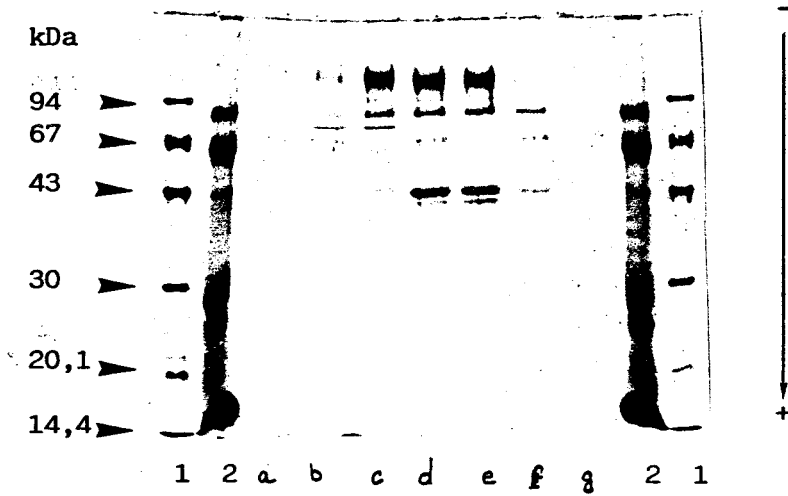


PHOTO 9 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide(12%) en présence de SDS des fractions du pic III éluées de la colonne de chromatographie présentée à la Fig. 23 p.132.

- 1 : Témoins de masse moléculaire
- 2 : Fraction P'_2 initiale
- a à g : Fractions 122 à 128 éluées successivement de la colonne

43 kDa, et, pour les mineures à 30 et 20 kDa.

On peut se demander, à présent, pourquoi par immunoélectrophorèse l'analyse de protéines révèle une homogénéité dans ces fractions alors que l'électrophorèse en gel de polyacrylamide indique une grande hétérogénéité des protéines.

Avons-nous réussi à visualiser toutes les formes de la galactosyltransférase ou s'agit-il d'un phénomène différent ?

DISCUSSION

Dans ce Chapitre, nous avons isolé une protéine de masse moléculaire 83 kDa qui réalise le transfert de galactose avec la N-acétylglucosamine et le glycopeptide β de l'ovomucoïde comme accepteurs. Le transfert avec le glucose, même en présence d' α -lactalbumine est négligeable.

L'adsorption d'une enzyme sur un support de tamisage moléculaire n'est pas exceptionnelle. Blanken (-19-) rapporte, en effet, dans ses expériences, l'existence d'une N-acétylglucosamine (β 1-4) galactosyltransférase de Thymus de Veau s'adsorbant sur un support Séphadex G100. Cette enzyme possède une masse moléculaire de 83 kDa également. L'auteur n'a cependant pas déterminé la spécificité d'action de cette protéine.

La présence dans le lait humain d'une galactosyltransférase de masse moléculaire supérieure à 60 kDa a déjà été rapportée. Khatra *et al.* (-90-), en purifiant par chromatographie d'affinité l'enzyme du lait, isolent un doublet de pro-

téines correspondant à la galactosyltransférase. Elles ont pour taille : 98 et 50 kDa. Ces résultats ont été confirmés par Powell *et al.* (-154-) dans le lait humain et les colostrum humains et de Porc. Toutefois, aucun auteur n'a isolé uniquement l'enzyme de taille plus élevée.

Berger *et al.* (-13-) ont recherché dans des liquides biologiques - lait humain - liquide amniotique - ascites malignes - les différentes formes de la galactosyltransférase. Pour ce faire, ils ont purifié les anticorps dirigés contre la galactosyltransférase du lait selon la technique de Gerber *et al.* (-62-). Ces anticorps polyclonaux débarrassés des immunoglobines, inhibent jusqu'à 40 % l'activité de la galactosyltransférase. Après électro-transfert sur une feuille de nitrocellulose des protéines des liquides biologiques ayant subi au préalable une électrophorèse sur gel de polyacrylamide, une réaction avec les anticorps polyclonaux est initiée. Pour les trois liquides analysés, une réaction immunologique a lieu avec la bande protéique de 55 kDa de masse moléculaire. Dans le cas du lait humain délipidé, deux autres bandes réagissent : celle de masse moléculaire voisine de 110 kDa et celle de 20 kDa.

Grâce à la propriété amphiphile que possède la galactosyltransférase du lait humain, nous avons pu isoler l'enzyme de haute masse moléculaire 83 kDa voire 110 kDa pour certaines fractions. Cette protéine ne transfère pas ou très peu de galactose sur le glucose. Elle semble donc posséder les caractéristiques enzymatiques de la galactosyltransférase que nous avons purifiée par chromatographie d'affinité sur UDP-Agarose ou par les méthodes de Pertsounis (-145-). La chromatographie d'affinité ne nous avait cependant pas permis de l'isoler à l'état pur.

En diminuant la force ionique du tampon de tamisage moléculaire, la galactosyltransférase adsorbée sur le support chromatographique présente une grande hétérogénéité des masses moléculaires. Par immunoélectrophorèse, nous constatons que les protéines de ces fractions ont une origine commune puisqu'un seul arc de précipitation se forme avec le sérum anti-fraction P₂.

La coexistence des différentes tailles de l'enzyme n'est pas surprenante, encore faut-il s'assurer que chaque protéine possède bien l'activité galactosyltransférasique.

Par une technique que nous avons mis au point, nous allons donc vérifier l'activité des protéines de ce pic. La méthode employée et les résultats sont développés dans le Chapitre III.

En immunoélectrophorèse, l'homogénéité des fractions révélées laisse supposer que l'origine des différentes tailles de l'enzyme serait liée à une protéolyse endogène, formant ainsi une seule et même famille de galactosyltransférase.

CHAPITRE III

RELATION PROTEINE/ACTIVITE GALACTOSYLTRANSFERASIQUE

ET

MISE EN EVIDENCE D'UNE PROTEOLYSE ENDOGENE DANS LE LAIT HUMAIN

CHAPITRE III :
RELATION PROTEÏNE-ACTIVITÉ GALACTOSYLTRANSFÉRASIQUE ET
MISE EN ÉVIDENCE D'UNE PROTÉOLYSE ENDOGENE DANS LE LAIT

Par tamisage moléculaire, nous avons isolé la galactosyltransférase adsorbée sur le support chromatographique. Dans un cas particulier, en diminuant la force ionique du tampon, nous constatons par électrophorèse sur gel de polyacrylamide que les protéines adsorbées possèdent des tailles moléculaires différentes. Toutefois, par immunoélectrophorèse, ces protéines ne forment qu'un seul arc de précipitation ce qui nous laisse croire que chaque bande observée correspond à une galactosyltransférase qui aurait subi une protéolyse.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mis au point une technique qui permet de contrôler l'activité galactosyltransférasique de chaque bande obtenue en électrophorèse.

Nous essaierons, ensuite, de mettre en évidence par différents tamisages moléculaires, la protéolyse de l'enzyme du lait de Femme.

Bioscience Reports, Vol. 7, No. 9, 1987

A Solid Phase Assay for Galactosyl Transferases. Evidence for an Active Site of Less than 14 kDa

Yves Plancke¹, Béatrice Delpouve and Jean Montreuil

Received August 20, 1987

KEY WORDS: active site; galactosyl transferase; solid phase assay.

ABBREVIATIONS: UDP-Gal, uridine diphosphatidyl galactose; GlcNAc, N-acetylglucosamine; Glc, glucose; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; GalTase, galactosyl transferase (EC 2.4.1.22); β -ovo, pronosac digest fraction of hen ovomucoid.

Galactosyltransferase (GalTase) prepared from human milk was found to exist as a complex with α -lactalbumin as demonstrated by crossed immunoelectrophoresis against specific antibodies raised against the complex. GalTase activity was stable to proteolysis and, when subjected to gel filtration on Ultrogel AcA54, the enzyme activity eluted as a single peak. A second peak of activity was found to be adsorbed to the column matrix and was eluted with buffer containing 1 M NaCl. The hydrophobic fraction represented 5% of the total GalTase activity in human milk. After polyacrylamide gel electrophoresis the main enzyme activity peak was represented by polypeptides of 67 kDa molecular weight and of 14 kDa molecular weight. Electroblooming of these peptides onto a nitrocellulose membrane followed by determination of GalTase activity showed activity for 45–55 kDa and for 14 kDa peptides. The hydrophobic fraction from the AcA54 column was resolved into polypeptides of 110 kDa–45 kDa molecular weight, all of which contained GalTase activity after blotting. It is supposed that the GalTase from non-proteolyzed milk is composed of a 14 kDa polypeptide containing the active site together with another part of the polypeptide backbone which is involved in the regulation of GalTase activity by α -lactalbumin, a third part of the polypeptide is responsible for the membrane insertion.

Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, Laboratoire de Chimie Biologique et Laboratoire Associé au CNRS No. 217, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France.

¹ To whom correspondence should be addressed.

INTRODUCTION

Lactose synthase (EC 2.4.1.22) catalyzes the terminal step in the synthesis of lactose according to the reaction: UDP-galactose + glucose \rightarrow lactose + UDP. The enzymic synthesis of the galactose β 1 \rightarrow 4 glucose linkage was first demonstrated by Wakins and Hassid (1) in particulate fractions obtained from bovine and guinea pig lactating mammary gland. The enzyme present in milk functions as a lactose synthetase in the presence of α -lactalbumin. Without α -lactalbumin, GalTase catalyzes the synthesis of N-acetyl lactosamine (2), since this enzyme can also utilize GlcNAc covalently bound to an oligosaccharide or a glycoprotein as an acceptor. Roth and Berger (3) showed that GalTase was localized in only two or three trans cisternae of the Golgi stacks. It is part of the enzymic system involved in the assembly of Asn-linked oligosaccharides (for review see Kornfeld and Kornfeld (4)).

Endogenous proteolytic cleavage of GalTase has been documented and is more important in the milk enzyme than in the serum enzyme which is protected by the protease inhibitors in plasma (5). Smith and Brew (6) suggested that soluble GalTase may be produced by the proteolytic cleavage of the membrane bound enzyme.

Electroelution of proteins from polyacrylamide gels and adsorption on an immobilized layer such as nitrocellulose is a widespread technique, which allows subsequent analysis of the adsorbed proteins. The principles of the procedure known as protein blotting have been recently reviewed (7).

It is shown here that the human milk GalTase activity is very stable to proteolysis and after electrotransfer onto nitrocellulose following PAGE, several bands, including a low molecular weight polypeptide chain of less than 14 kDa were found to exhibit the GalTase activity.

MATERIALS AND METHODS

UDP-[^{14}C]galactose (from the Radiochemical Centre, Amersham, England) with a specific radioactivity of 310 mCi/mole was diluted with cold UDP-Gal (from Sigma, St Louis, MO) to give 10,000 cpm per assay and 50 μM UDP-Gal. The enzymatic assay mixture was: 150 mM sodium cacodylate buffer pH 6.5, 40 mM MnCl_2 , 0.1 mM ATP, 50 μM radiolabelled sugar nucleotide precursor, 10 mM acceptor substrate and 15 μl of the enzyme solution in a final volume of 50 μl .

The acceptors used were GlcNAc, Glc, ovotransferrin or a glycopeptide fraction from hen ovomucoid obtained after pronase digestion as in (8). Since the enzyme concentration constituted the limiting factor of the reaction, acceptor concentrations were adjusted to give maximal transfer to increase the sensitivity of detection. Preincubation of the GalTase preparation was done in the enzymatic assay medium prior to the addition of radiolabelled UDP-Gal and acceptor.

A GalTase fraction from human milk was obtained as in (9). Briefly, the milk was delipidated by centrifugation and casein was removed at pH 4.6 by precipitation. The supernatant from a 33% ammonium sulfate precipitation at pH 7.0 was acidified to pH 4.6 and gave a "P₂" precipitate free of immunoglobulins. This precipitate was dialyzed, lyophilized and used to raise an antiserum in rabbits. This fraction was homogenized

Galactosyl Transferase Assay

in the gel filtration buffer by sonication. Its main component was found to be α -lactalbumin, as ascertained by cross immuno electrophoresis (10) against monospecific anti- α -lactalbumin antibodies (from Sigma, St Louis, MO).

Gel filtration was performed with a column (2.5 \times 140 cm) of Ultrogel AcA54 (from IBF, Villeneuve la Garenne, France) equilibrated with a buffer of the composition: 25 mM sodium cacodylate pH 7.1, 5 mM MgCl₂, 25 mM NaCl, 0.5 mM mercaptoethanol, 0.05% NaN₃, 2% Triton X100, 10 ml fractions were collected. Proteins were quantified according to Peterson (11). PAGE was performed according to Laemmli (12). Blotting was performed with a Biorad (Richmond, CA) apparatus according to the manufacturer's instructions. Control lanes, including those containing the standard molecular weight proteins (from Pharmacia Uppsala, Sweden) were stained with Coomassie blue. Areas on the nitrocellulose blot corresponding to protein bands were cut out and GalTase activity determined by incubation in enzymatic assay medium. The nitrocellulose areas between the stained bands were also incubated, to determine the background. After two hours incubation at 37°C, 5 μ l of 2 M EDTA was added and the incubation mixture kept on ice and spotted on Whatman No. 1 chromatography paper. Descending chromatography was performed with ethyl acetate-pyridine-acetic acid-water (5/5/1/3 (v/v)) as solvent. Determination of radioactivity on paper by liquid scintillation counting was accomplished by placing 1 cm strips in 3 ml of a toluene-based scintillation fluid.

RESULTS

Crossed immuno electrophoresis of the GalTase preparation from milk showed the presence of an α -lactalbumin-GalTase complex. The immuno precipitation line for α -lactalbumin exhibited two peaks, whereas GalTase exhibited a single precipitation line nearer to the starting well (Fig. 1A). This pattern probably reflects the dissociation of the α -lactalbumin-GalTase complex in both dimensions.

The stability of GalTase towards endogenous proteases is shown in Fig. 1B. After a 10% decrease in the first two hours of incubation, the GalTase activity remained constant. Comparison of radiolabelled Gal transfer to either GlcNAc, Glc or β -ovomucoid fraction alone, with that obtained when two acceptors were present together, showed transfer to the same extent. According to Dixon and Webb (13), we concluded that the same enzymatic site was involved (not shown).

Moreover, although α -lactalbumin is quantitatively the major protein in the preparation, it appears (Fig. 1B) that part of GalTase activity is independent of it, since transfer of Gal to GlcNAc was almost twice that to Glc (Fig. 1B).

On gel filtration on UltrogelAcA54 maximum GalTase activity was associated with the maximum of the protein peak (Fig. 2A). A second peak of transferase activity was eluted following the inclusion of 1 M NaCl in the buffer (Fig. 2B). This second peak had a specific activity of 177 nmole of Gal transferred per minute per mg of protein. The purification factor from human milk was estimated to be 37,000. This adsorbed material represented less than 5% of the total activity.

Material present in peak A (Fig. 2) was subjected to SDS-PAGE and when stained with Coomassie blue a main band at 67 kDa was detected (Fig. 3, lane B). The

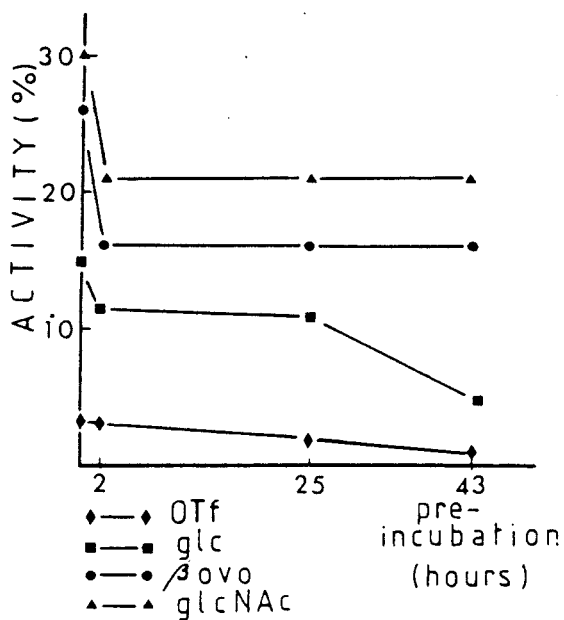
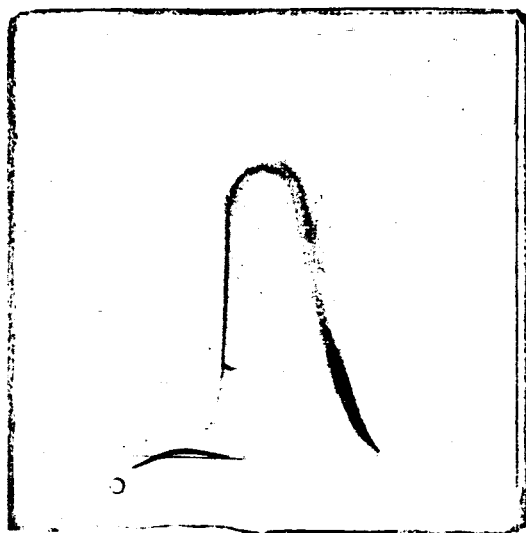


Fig. 1. Characterization of the galactosyl transferase enriched fraction. A. Cross immuno electrophoresis with antibodies raised against the milk extract used in this study. B. Stability of the galactosyl transferase activity towards endogenous porteases. Activity (in %) is the percentage of transfer of galactose per mg of protein. GlcNAc: N-acetylglucosamine; β ovo: hen ovomucoid pronasic glycopeptides; Glc: glucose; OTf: ovotransferrin. Each acceptor is in excess versus the enzyme.

Galactosyl Transferase Assay

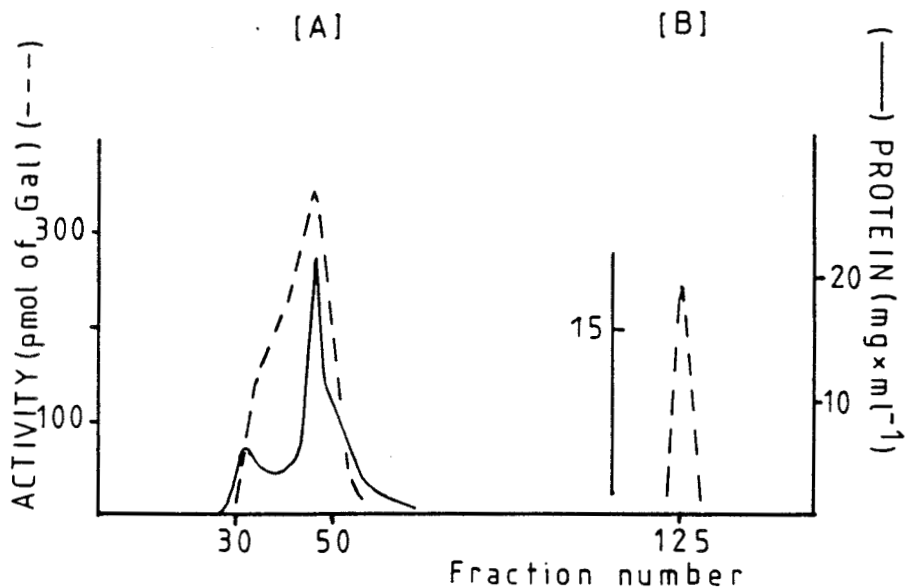


Fig. 2. Molecular sieve chromatography with Ultrogel AcA54 of the human milk fraction free from casein and immunoglobulins. Continuous line: protein determination. Dotted line: Enzymatic activity in pM of galactose transferred into the β -ovomucoid pronasic glycopeptides. [A]: Elution in the gel filtration buffer. [B]: This buffer was made 1 M in NaCl.

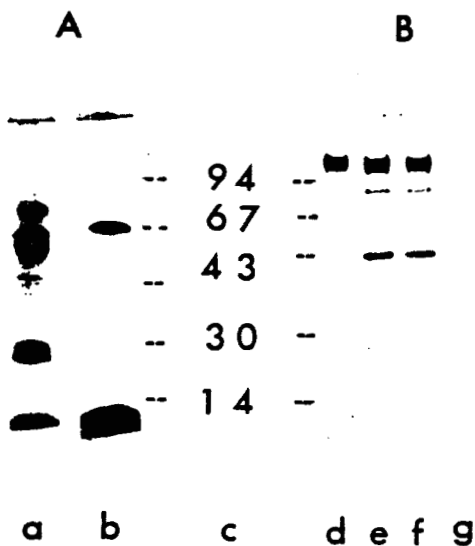


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) analysis of the molecular sieve chromatography fractions. A: Lane a: Milk extract. Lane b: maximum of the enzymatic peak in gel filtration. Lane c: standard molecular weight (in kDa). B: Lanes d, e, f, g: elution peak caused by 1 M NaCl in the gel filtration buffer. Fractions 124, 125, 126, 127.

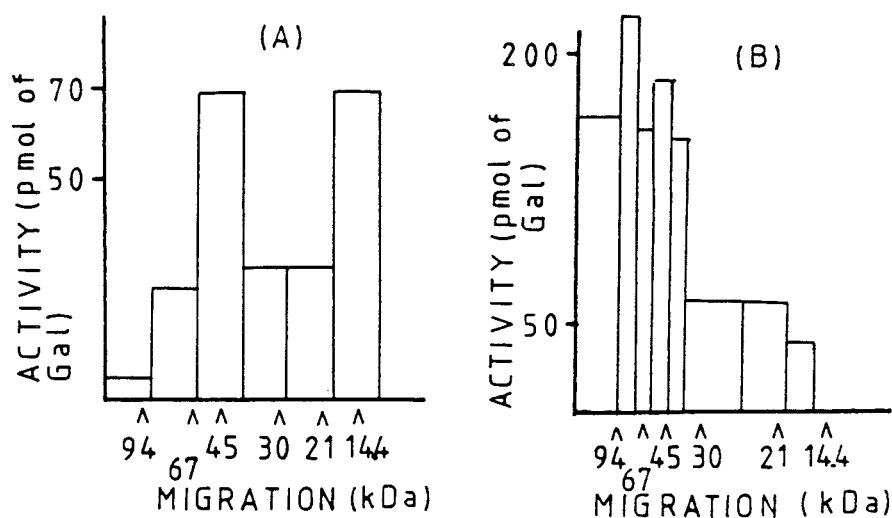


Fig. 4. Protein electrotransfer onto nitrocellulose membrane filter after PAGE. Activity (pmole of gal): picomole of galactose transferred by the protein adsorbed onto nitrocellulose. A: Blotting of the fraction from the maximum of activity after gel filtration. B: Blotting of the fraction eluting with 1 M NaCl.

migration front of these fractions is heavily stained. SDS-PAGE analysis of the material desorbed from the Aca54 column by 1 M NaCl showed a main band at 110 kDa together with a 45 kDa band and a faint 83 kDa band.

Electrotransfer of the protein from the gel to a nitrocellulose membrane was performed. Analysis of the main peak of enzymatic activity from the Aca54 column showed that GalTase activity was exhibited not only by the 67 kDa band but also to higher levels by polypeptides whose molecular weights ranged between 45 and 55 kDa. An equivalent amount of transfer was exhibited using fractions comigrating with the tracking dye (Fig. 4A). Thus, this polypeptide contains the active site of the enzyme and is responsible for about 30% of the enzymatic activity of the milk extract. The recovery of small peptides by adsorption to the nitrocellulose filter is low and as a result it is proposed that the GalTase activity has been underestimated by this method. Therefore, the actual activity of this peptide in the milk extract would be much higher.

In order to determine the molecular weight of the small peptide a 20% gel was run (not shown). However, after blotting, a very low enzymatic activity was measured. This result suggests that lipids which may be present in the migration front of the 12% gel comigrate with the small peptide containing GalTase activity. In the 20% gel, only one band having a molecular weight of 8.5 kDa was stained (not shown).

The small peptide containing the active site was dissociated from other parts of the molecule only after PAGE and not after gel filtration. Detergent was present in both techniques: 1% SDS in PAGE and 2% Triton X100 in molecular sieve chromatography. The fragments of proteolysis are thus more efficiently dissociated by more reducing agent, β -mercaptoethanol in PAGE. In fact, 10 mM mercaptoethanol in gel filtration led to smaller peptides but the enzymatic activity was lost (not shown).

Galactosyl Transferase Assay

Table 1. Specific activity: transfer of galactose (in nanomole/mg of protein)

Fraction	Molecular sieve	Blotting	Blotting yield
Peak A	26	0.34	1%
Peak B	53	6.0	11%

The hydrophobic polypeptides with GalTase activity desorbed from the AcA54 column by 1 M NaCl displayed a high level of GalTase activity after blotting (Fig. 4B). However, this activity was displayed over a continuous range of molecular weights from 45 kDa to more than 110 kDa. A higher level of activity was found for the 83 kDa band.

The efficiency of blotting was evaluated for the two peaks of enzymatic activity separated on the AcA54 column by comparing the specific activities before and after electrotransfer. Table 1 shows that the blotting of the non-adsorbed fraction (in A, Fig. 2), containing the active site peptide resulted in a lower yield of recovery of specific activity with respect to that of the adsorbed hydrophobic polypeptides of higher molecular weight which retained more of their enzymic activity.

DISCUSSION

GalTase activity in preparations of proteolyzed milk was found to be stable to proteolysis by endogenous proteases. One antigenic species was found in the milk extract by cross immuno electrophoresis for GalTase and only one major peak was eluted from the AcA54 column which had a molecular weight of 67 kDa in SDS-PAGE. Some minor hydrophobic components of GalTase were bound by the AcA54 matrix. Their membranous location may have protected them from proteolysis since a polypeptide of 110 kDa was the main component on SDS-PAGE.

When analyzed by blotting, these hydrophobic components displayed a GalTase activity over a continuous range of molecular weights from 45 kDa to 110 kDa. Analysis of the main peak of enzymatic activity eluted from the AcA54 column after blotting showed that GalTase activity was exhibited by polypeptides in the range of 45–55 kDa. Moreover, the same level of activity was found for the migration front. The corresponding molecular weight was less than 14 kDa.

The heterogeneity in molecular weight of GalTase preparations has been found in delipidated milk by Berger *et al.* (14). Specific polyclonal antibodies inhibiting the GalTase activity revealed by the immune replica technique a 55 kDa protein for the milk enzyme. This band was surrounded by other bands between 40 kDa and 70 kDa. A minor band which appears to be slightly displaced of approximately 110 kDa was identified. This observation is in good agreement with the pattern of activity presented here in this area of the gel. Two peptides in the 20 kDa range were also stained by the antibodies. Again, as in our experiments, we assume that for low molecular weight peptides, electroblotting efficiency onto nitrocellulose is low, and these small peptides are quantitatively underestimated.

The finding of a 67 kDa protein in fractions under maximum GalTase activity in molecular sieve chromatography is in agreement with the work of Furukawa and Roth (15). This band was found for two different affinity purified GalTases. One enzyme transferred Gal from UDP-Gal to form a β -(1 \rightarrow 4)-linkage to GlcNAc or asialoagalacto- α ₁-acid glycoprotein. The other enzyme formed a β -(1 \rightarrow 3)-linkage to AsOSM (asialo-(ovine submaxillary mucin)).

On gel filtration, a single activity peak with a molecular weight of more than 80,000 has been observed by different authors (5,16). Khatra *et al.* (17) and Powell and Brew (18) reported that preparations of human and bovine milk enzymes contained a minor contaminant of 100 kDa in addition to the major component of 40–50 kDa. This minor component disappeared after treatment with 2-mercaptoethanol in the presence of SDS or urea.

Proteolytic conversion of the molecular forms of bovine milk GalTase has been carried out by Magee *et al.* (19). Trypsin digestion led to a 40 kDa polypeptide in SDS-PAGE, whereas chymotrypsin digestion led to the formation of a small peptide which migrated near the tracking dye. Thus, the milk presumably contains not only a trypsin-like activity as shown by these authors, but also a chymotrypsin-like activity which has led to the small active site polypeptide which can still exhibit, even after blotting, a GalTase activity.

The presence of endogenous proteases explains the persistence of considerable uncertainty about the size heterogeneity of GalTases. However, in cloning experiments by Narimatsu *et al.* (20) the largest peptide that was synthesized in an *in vitro* translational system programmed with the hybrid selected mRNA was about 65 kDa. The presence of multiple mRNAs with variable sizes and with sequence differences at the 5' end raised, for these authors, the possibility that some of the smaller size proteins may be directly synthesized from different size mRNAs.

The enzymic blotting assay presented here may be useful to check any preparation of GalTase. Its sensitivity is comparable with immunoblotting. This is why it could be used for screening genomic libraries or for testing *in vitro* translation products of mRNA.

Decreasing acceptor concentration would eventually lead to the ability to distinguish differences in specificity between different molecular weight polypeptides of the enzyme, but in this case the detection level would be higher since in our study the acceptor concentrations were chosen to give the maximum transfer. It should be noted that, *in vivo*, the enzyme works in conditions of limited acceptor availability.

Thus, GalTase seems to have a polypeptide containing the active site to which is linked another polypeptide chain responsible for the regulation by α -lactalbumin. A hydrophobic part of the whole molecule seems to be responsible for the interactions with membranes. This scheme of organization may be shared by other transferases (21).

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Ralph Schwartz, Bernard Hoflack and William McDowell for critical readings of the manuscript.

Galactosyl Transferase Assay

REFERENCES

1. Watkins, W. M. and Hassid, W. Z. (1962). *J. Biol. Chem.* **237**:1432-1440.
2. Brew, K., Vanaman, T. C. and Hill, R. L. (1968). *Proc. Natl. Acad. Sc.* **59**:491-497.
3. Roth, J. and Berger, E. G. (1982). *J. Cell. Biol.* **93**:223-229.
4. Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985). *Ann. Rev. Biochem.* **54**:631-634.
5. Fujita-Yamaguchi, J. and Yoshida, A. (1981). *J. Biol. Chem.* **256**:2701-2706.
6. Smith, C. A. and Brew, K. (1977). *J. Biol. Chem.* **252**:7294-7299.
7. Gerschoni, J. M. and Palade, G. E. (1983). *Anal. Biochem.* **131**:1-15.
8. Paz-Parente, J., Strecker, G., Leroy, Y., Montreuil, J. and Fournet, B. (1982). *J. Chromatogr.* **249**:199-204.
9. Montreuil, J., Chosson, A., Havez, R. and Mullet, S. (1960). *C. R. Soc. Biol.* **154**:732-736.
10. Laurell, C. B. (1965). *Anal. Biochem.* **10**:358-361.
11. Peterson, G. L. (1977). *Anal. Biochem.* **83**:346-356.
12. Laemmli, U. K. (1970). *Nature* **227**:680-685.
13. Dixon, M. and Webb, E. C. (1964). *Enzymes*, 2nd edn, pp. 84-87. Longmans, London.
14. Berger, E. G., Verdon, B., Mandel, T., Fey, H. and Strous, G. (1983). *Enzymes* **29**:175-182.
15. Furukawa, K. and Roth, S. (1985). *Biochem. J.* **227**:573-582.
16. Bella, A., Whitehead, J. S. and Kim, Y. S. (1977). *Biochem. J.* **167**:621-628.
17. Khatra, S. B., Herries, D. G. and Brew, K. (1974). *Eur. J. Biochem.* **44**:537-560.
18. Powell, J. T. and Brew, K. (1974). *Eur. J. Biochem.* **48**:217-228.
19. Magee, S. C., Mawal, R. and Ebner, K. E. (1973). *J. Biol. Chem.* **248**:7565-7569.
20. Narimatsu, H., Sinha, S., Brew, K., Okayama, H. and Kasba, P. K. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sc.* **83**:4720-4724.
21. Watkins, W. M. (1986). *Carbohydr. Res.* **149**:1-12.

II - MISE EN ÉVIDENCE D'UNE PROTÉOLYSE ENDOGENE DANS LE LAIT

A - RECYCLAGE DE CERTAINES FRACTIONS SUR ULTROGEL

AcA54

1 - Premier passage sur Ultrogel AcA54

Un premier passage de la fraction P₂ du lait (2 g) sur la colonne d'Ultrogel AcA54 a été réalisé dans un tampon cacodylate (25 mM), MgCl₂ (5 mM) β-mercapto-éthanol (0,5 mM), Triton X100 (0,2 %) et NaCl 1M. La présence de NaCl 1M permet d'annuler les adsorptions sur le support chromatographique et 0,2 % de Triton X100 permet d'activer suffisamment l'enzyme sans modifier la séparation des protéines que l'on peut alors doser plus facilement.

Le profil chromatographique est présenté à la Fig. 24 p. 149. On constate que la présence de NaCl 1M dans le tampon d'élution, a un effet positif sur la séparation des protéines. On distingue cette fois 2 pics majeurs de protéines mais l'élution de la galactosyltransférase reste pratiquement inchangée par rapport aux chromatographies précédentes. Si l'optimum de l'activité enzymatique est obtenu au niveau de la fraction 37, aucune activité n'est détectable au niveau des fractions du second pic protéique constitué essentiellement par la α -lactalbumine (Photo 10 p. 149).

2 - Recyclage des fractions actives

Les fractions actives issues de ce tamisage moléculaire sont recyclées dans les mêmes conditions. Ainsi, les fractions 25 à 29 (pic 1 d'activité enzymatique

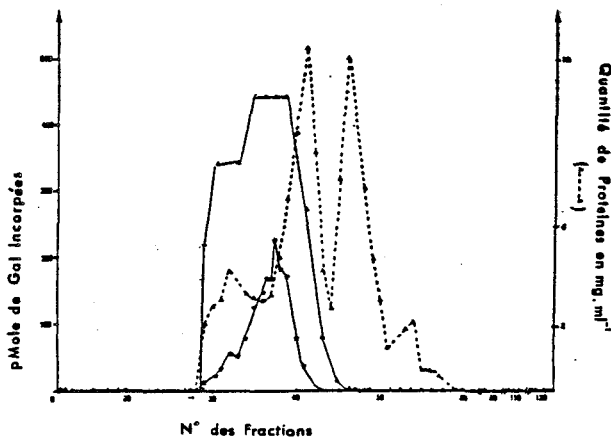


Figure 24 : Chromatographie de tamisage moléculaire sur Ultrogel AcA54.

La fraction P'2 du lait humain (2g) est injectée sur la colonne (860ml), équilibrée dans un tampon cacodylate (25mM), $MgCl_2$ (5mM), β -mercaptoéthanol (0,5mM), NaCl (1M) et Triton X-100 (0,2%). Les fractions (10ml) sont collectées et l'activité galactosyltransférase avec mesurée sur la N-acétylglucosamine.

LEGENDE : (▲) Quantité de protéines en mg/ml
 (Δ) Activité galactosyltransférase testée sur les fractions non diluées
 (☆) Activité galactosyltransférase mesurée sur les fractions diluées au 1/25.

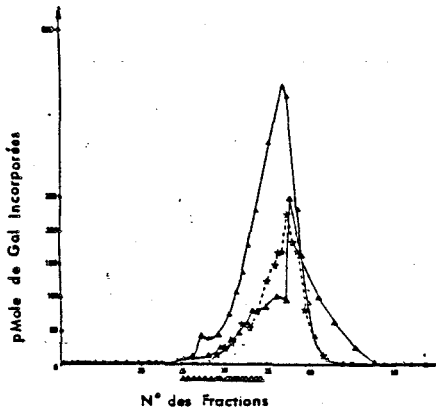


Figure 25 : Chromatographie de tamisage moléculaire sur Ultrogel AcA54: recyclage des fractions issus d'un premier tamisage moléculaire sur Ultrogel AcA54 de la fraction P'2 du lait humain (cf Fig. 24). 50ml des fractions 25 à 29 de la première chromatographie (représenté par ~~.....~~) et 50 ml des fractions 30 à 34 (.....) ont été successivement injectées sur la colonne équilibrée dans le même tampon détaillé à la Fig. 24. L'activité galactosyltransférase des fractions collectées (10ml) a été mesurée avec la N-acétylglucosamine comme accepteur

LEGENDE : ☆ Activité galactosyltransférase des fractions diluées 25 fois, du premier tamisage moléculaire
 Δ Activité galactosyltransférase des fractions non diluées après recyclage des fractions 25-29 (▲) et 30-34 (Δ).
 ▲ Quantité de protéines en mg/ml

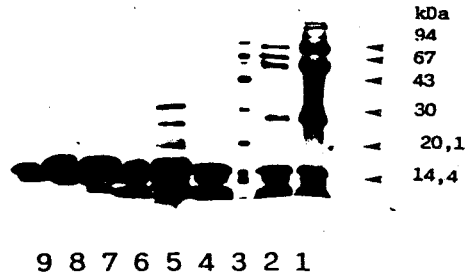


PHOTO 10: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (15%) en présence de SDS, des protéines de la fraction P'2 chromatographiée par tamisage moléculaire dans les conditions précisées à la Fig. 24

Légende:

3 - Témoins de masse moléculaire
 1 à 9 - Protéines des fractions 30-35-37-40-43-45-48-50 présentées Fig.24.

élué au volume mort de la colonne) et les fractions 30 à 34 (partie du pic 2 d'activité enzymatique) sont recyclées successivement. La Fig. 25 p. 149, résume les profils d'activité galactosyltransférase obtenus.

Quelles que soient les fractions recyclées, l'élution optimale de l'enzyme se situe au niveau de la fraction 37. Cette fraction possédait déjà l'activité optimale lors du premier passage.

B - FRACTIONNEMENT EN FPLC DE TAMISAGE MOLÉCULAIRE DE LA FRACTION P₂ PRÉINCUBÉE A 37° C

Nous avons fractionné sur Supérose 12 en FPLC de tamisage moléculaire, la fraction P₂ du lait après différents temps de préincubation à 37° C.

1 mg de protéines sont injectées sur la colonne (24 ml) avec le même tampon décrit ci-dessus. Le profil du fractionnement est présenté à la Fig. 26 A p.151.

Les mêmes fractionnements sont réalisés avec la fraction P₂ préincubée 6 H et 24 H à 37° C. Les différents profils d'activité galactosyltransférase sont résumés à la Fig. 26 B p. 151.

Quand la fraction P₂ est fraîchement solubilisée et injectée immédiatement sur la colonne, la galactosyltransférase est éluee dès la fraction 25, l'optimum d'activité étant dans la fractions 33. Après incubation des protéines de départ, l'élution de l'enzyme ne commence qu'à partir des fractions 28 et 30 respectivement après 6 H ou 24 H à 37° C. L'optimum de l'activité se situe dans la fractions 34, l'adsorbance à 280 nm est identique dans tous les cas.

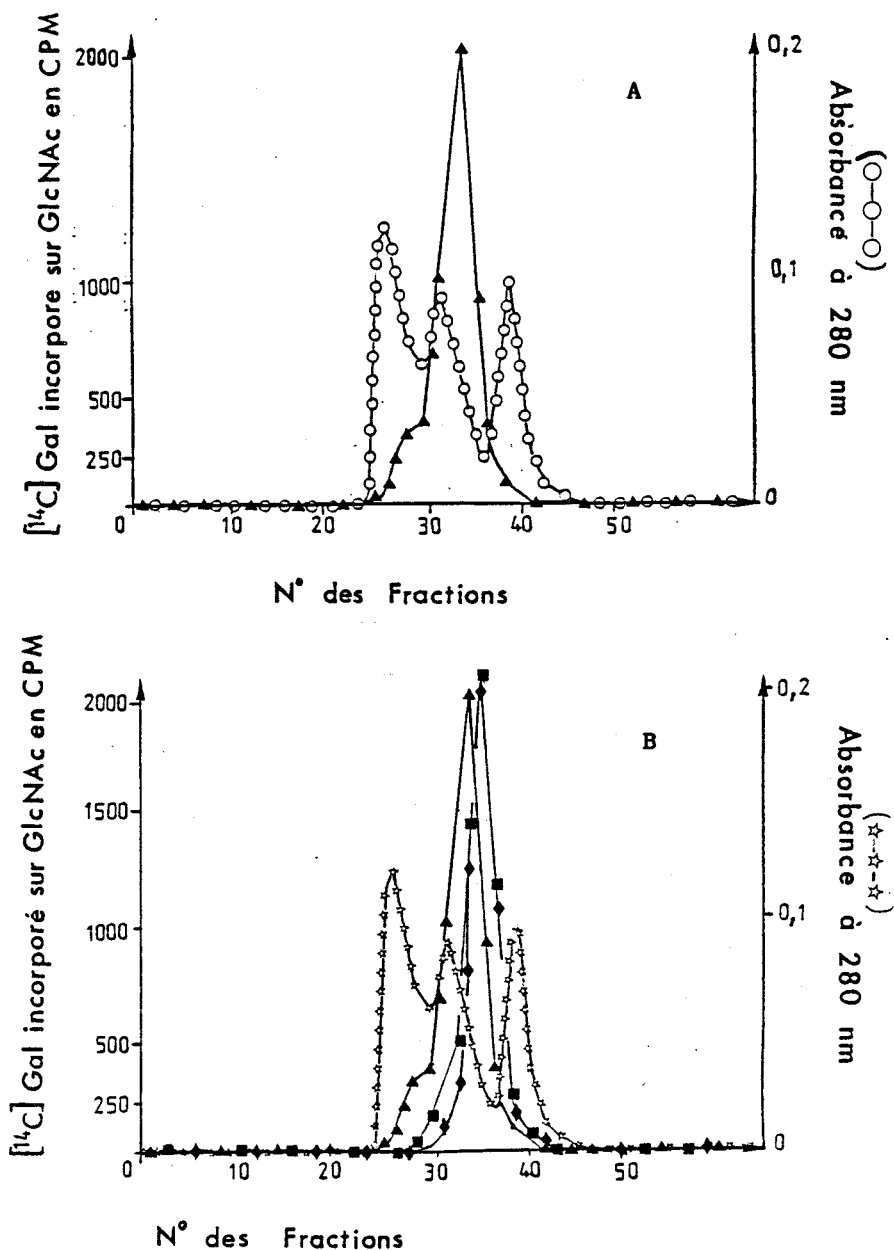


Figure 26 : Profils des fractionnements de la fraction P'2 du lait humain en F.P.L.C. sur Supérose 12 .

Le tampon utilisé est le cacodylate(25 mM) pH 7,1; MgCl₂(5mM); β mercaptoéthanol(1mM); Triton X100(2%); NaCl(1M). L'activité enzymatique mesurée sur la N-Acétyleglucosamine est exprimée en nombre de cpm de [¹⁴C]Gal incorporé sur l'accepteur. Chaque fraction correspond à 0,4 ml.

A : Profil réalisé après solubilisation immédiate du précipité P'2 .

B : Profil réalisé après préincubation de la fraction P'2 .

LEGENDE : ▲ Sans préincubation; ■ 6 heures et ◆ 24 heures de préincubation.

C - CONCLUSION

Dans cette série d'expériences nous avons assisté à la conversion de la molécule enzymatique de masse moléculaire la plus élevée en molécule de plus faible taille. Deux phénomènes se produisent. Il s'agit, dans un premier temps, d'une solubilisation progressive des protéines de la fraction P₂. Au cours du recyclage des fractions éluées au volume mort de la colonne d'Ultrogel AcA54, la dissociation de complexes présents dans la fraction P₂ initiale devient alors possible. L'éluion de la galactosyltransférase est ainsi moins étalée.

Dans un second temps, la préincubation à 37° C accélère la dégradation protéolytique des protéines. Ainsi, par tamisage moléculaire on observe la dégradation des molécules enzymatiques actives, de masse moléculaire élevée.

III - CONCLUSION

A l'issue de cette étude, une question n'a pas obtenu de réponse dans l'ensemble des expériences réalisées. Pour quelles raisons l'enzyme de masse moléculaire élevée n'utilise pas le glucose comme accepteur ? Existe-t-il un fragment dans la protéine qui permet de contrôler la synthèse du lactose ? Ou peut-on parler d'une seule classe de galactosyltransférases qui, après action de protéases spécifiques, mettrait en évidence des sites d'action précis ?

Nous avons tenté d'étudier cette dernière hypothèse en utilisant un matériel comprenant plusieurs types de galactosyltransférases non solubles. Pour ce faire, nous avons choisi les cellules de reins de Hamster (BHK) cultivées au laboratoire.

CHAPITRE IV:

ACTIVITES GALACTOSYLTRANSFERASIQUES DES CELLULES

DE REINS DE HAMSTER: MISE EN EVIDENCE

D'UNE NOUVELLE ACTIVITE ENZYMATIQUE

CHAPITRE IV :
ACTIVITÉS GALACTOSYLTRANSFÉRASIQUES
DES CELLULES DE REIN DE HAMSTER :
MISE EN ÉVIDENCE D'UNE NOUVELLE ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

Introduction

A l'issue des travaux menés sur la galactosyltransférase du lait humain, nous avons identifié ou isolé des fractions peptidiques supportant toutes l'activité enzymatique. Le site de régularisation de l' α -lactalbumine semble perturbé, toutefois un seul type de liaison peut être réalisé : l'enzyme fixe uniquement le galactose sur une N-acétylglucosamine libre ou en position terminale non réductrice. Par conséquent, la protéolyse de la galactosyltransférase du lait conduit à une modification de la spécificité d'action selon l'accepteur utilisé, mais ne permet pas la galactosylation de nouveaux substrats. Réciproquement, les résultats du clonage de la galactosyltransférase du lait de Vache (Narimatsu *et al.*- 128 -) laissent supposer qu'il est possible de générer une famille de galactosyltransférases à partir d'un mRNA de faible taille (4,5 kbases) et que l'augmentation de la taille de l'enzyme conduit à la haute spécificité d'action et de régulation bien connue chez ces enzymes.

Dans le même contexte, nous avons voulu savoir si, pour d'autres galactosyltransférases, en particulier les molécules intégrées aux membranes, il était possible d'épouser le même schéma d'action des galactosyltransférases du lait. Pour cela, nous avons choisi comme modèles les cellules de rein de Hamster (Cellules BHK) cultivées au laboratoire.

Il est donc nécessaire :

- de détecter l'ensemble des activités galactosyltransférasiques
- de caractériser l'activité Gal α 1-3 - Gal - galactosyltransférasique
- de comparer les spécificités d'action en fonction de la protéolyse

afin de comparer les résultats avec ceux obtenus du lait.

I - ACTIVITÉS GALACTOSYLTRANSFÉRASIQUES PRÉSENTES DANS LES CELLULES DE REINS DE HAMSTER (Cellules BHK)

A - SUBSTRATS ACCEPTEURS

Après solubilisation des molécules enzymatiques des cellules BHK (cf. Chapitre Matériel et Méthodes p. 86), les activités galactosyltransféra-siques ont été mesurées à partir de plusieurs substrats. Le Tableau XVIII p. 157 résume l'ensem-ble des résultats obtenus.

Par rapport au lait humain, trois autres substrats sont accepteurs de galactose :

- la N-acétyllactosamine
- le glycopeptide d'orosomucoïde désialylé (Asialo - α - glycopepti-de - acide)
- la mucine sous-maxillaire de Mouton

Comme dans le lait, la N-acétylglucosamine et le glycopeptide β de l'ovomucoïde sont également accepteurs de galactose.

Compte tenu de la structure de ces différents substrats, il est proba-ble que le type de liaison formé soit différent selon l'accepteur.

B - DÉTERMINATION DU NOMBRE DE SITE D'ACTION ENZY-MATIQUE

Pour connaître le nombre d'enzymes impliquées dans la galactosyla-tion des oligosaccharides ou glycopeptides utilisés, nous avons déterminé le nombre de sites d'action retrouvés dans l'extrait brut des cellules BHK.

TABLEAU XVIII. Transfert de galactose réalisé par les extraits bruts de cellules BHK sur différents accepteurs. Les activités galactosyltransférasiques ont été mesurées dans les conditions standard. L'incubation a été conduite pendant 1H. (▲) ou 2H30 (●). L'incorporation du ^{14}C -Gal sur les accepteurs est déterminée par chromatographie papier. Pour chaque cas, le résultat exprimé correspond à l'incorporation nette du galactose (i.e. sans la radio-activité retrouvée au niveau du témoin sans accepteur).

ACCEPTEURS		INCORPORATION DU GALACTOSE en pMole/h/mg de protéine
N-acétylglucosamine -10mM-	▲	2933
Glucose -10mM- + α -lactalbumine (0,1mg/ml)	▲	0
Glycopeptide β de l'ovomucoïde - 0,5mg/ml (soit 1,1mM équivalent GlcNAc)	▲	2954
Ovotransferrine - 1mg/ml- (soit 35 μM équivalent GlcNAc)	▲	374
N-acétylgalactosamine -10mM-	●	0
Galactose -10mM-	●	0
N-acétyllactosamine -10mM-	●	200
Glycopeptides de l'orosomucoïde désialylés - 5mg/ml- (soit 8,7mM équivalent Gal)	●	220
Mucine sous maxillaire de mouton désialylée - 3,2mg/ml -	●	173

Ainsi, par une expérience de compétition de substrats et utilisation des formules de Dixon et Webb (-42-), il est possible d'identifier 3 enzymes distinctes (Tableau XIX p. 159):

- le transfert de galactose sur le glycopeptide de l'orosomucoïde désialylé et sur le N-acétyllactosamine est réalisé par la même enzyme

- deux enzymes distinctes agissent avec la N-acétyllactosamine et le glycopeptide β de l'ovomucoïde comme accepteurs

- deux enzymes différentes sont actives avec la mucine sous-maxillaire de Mouton désialylée et la N-acétyllactosamine comme accepteurs

- des enzymes utilisant cette même mucine et le glycopeptide β de l'ovomucoïde comme accepteurs sont distinctes

Nous avons vérifié que l'enzyme responsable du transfert de galactose sur la N-acétylglucosamine et le glycopeptide β de l'ovomucoïde était identique. La N-acétylglucosamine n'a plus été utilisée ultérieurement pour les compétitions de substrats car la mesure des différents produits formés après réaction enzymatique n'est pas possible en chromatographie papier.

Par conséquent, nous déduisons que, dans l'extrait brut des cellules BHK, nous sommes en présence d'au moins 3 galactosyltransférases agissant séparément à partir des accepteurs :

- la N-acétylglucosamine et glycopeptide β de l'ovomucoïde
- mucine sous-maxillaire de Mouton désialylée
- la N-acétyllactosamine et glycopeptide d'orosomucoïde désialylé.

Compte tenu des résultats acquis de Gleeson *et al.*(-66-) ou Blanken (18), il n'est pas surprenant de distinguer les deux premières enzymes identifiées par

TABLEAU XIX : Compétitions de substrats, accepteurs des galactosyltransférases des extraits bruts de cellules BHK . Les milieux d'incubation contiennent tous les composés décrits dans le Matériel et Méthodes et après 2H30 de réaction, la radioactivité est comptée au niveau de l'accepteur. A partir des valeurs des constantes d'affinité et de la vitesse maximale de réaction déterminées pour chaque accepteur, la vitesse de réaction est calculée pour le cas où 2 accepteurs sont en compétition pour un site enzymatique commun, grâce à l'équation:

$$v = (V_1 \cdot S_1 \cdot K_1^{-1} + V_2 \cdot S_2 \cdot K_2^{-1}) (1 + S_1 \cdot K_1^{-1} + S_2 \cdot K_2^{-1})^{-1}$$

v : vitesse totale de réaction ; V_1 et V_2 : vitesses maximales pour chacun des substrats ; S_1 et S_2 : concentration de chacun des accepteurs ; K_1 et K_2 : les constantes d'affinité respectives des différents substrats. La vitesse totale calculée dans le cas de deux paires indépendantes enzyme-substrat, est la somme des vitesses trouvées pour chaque substrat testé séparément.

ACCEPTEURS en mg/ml				INCORPORATION DU GALACTOSE		
.....				en pMole/h/mg de protéine		
ASOR	LacNac	OSM dés.	β ovo	trouvée	calculée pour	
					1 enzyme	2 enzymes
5	--	--	--	200		
--	3,6	--	--	213		
5	3,6	--	--	200	200	413
--	--	3,2	--	118		
--	3,6	3,2	--	266	135	290
--	--	--	1	665		
--	3,6	--	1	904	532	840

ASOR : Glycopeptide de l'orosomucoïde désialylé

LacNac : N-acétyllactosamine

OSM dés. : Mucine sous maxillaire de mouton désialylée

β ovo : glycopeptide β de l'ovomucoïde

ces auteurs en GalNAc β 1-4 galactosyltransférase et GalNAc β 1-3 galactosyltransférase. En revanche, aucun auteur n'avait utilisé les accepteurs à N-acétyllactosamine en position terminale non réductrice. Même si l'on sait que dans le thymus de Veau (Blanken -18-) ou dans les tumeurs d'ascites d'Ehrlich (Elices *et al.* -47-) ces substrats sont les accepteurs de la LacNAc α 1-3 galactosyltransférase, il convient de vérifier que dans les cellules BHK, cette action enzymatique ne soit par artéfactuelle et corresponde à la famille des galactosyltransférases.

II - CARACTÉRISATION DE L'ACTIVITÉ Gal - LacNAc - R - GALACTOSYL- TRANSFÉRASIQUE

A - EXIGENCES DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

La composition du système d'incubation enzymatique a été modifiée afin de contrôler que le transfert de galactose sur les accepteurs à N-acétyllactosamine en position terminale non réductrice était bien le fait d'une galactosyltransférase. Le Tableau XX p. 160 résume les résultats obtenus et prouve que l'action mesurée est l'objet d'une enzyme agissant en présence UDP-Gal, Mn^{+r} et accepteur de galactose.

B - IDENTIFICATION DES PRODUITS DE LA RÉACTION

La Fig. N° 29 p. 162 indique la répartition de la radioactivité le long de la chromatographie papier après réaction enzymatique. Ainsi, après élimination de réactions de type chimique ou enzymatique endogène, on peut indiquer que le

TABLEAU XX : Exigences de l'UDP-Gal:asialo- α_2 - glycopeptide acide-galactosyl-transférase et de l'UDP-Gal:N-acétyllactosamine - galactosyltransférase. les activités sont mesurées deans les conditions standard . L'incubation est conduite à 37°C pendant 2H30. Les déviations dans le système d'incubation sont précisées.

Composition du système d'incubation	INCORPORATION DU GALACTOSE en pMole/h/mg de protéine	
	ACCEPTEURS	
	Asialo- α - glyco- peptide acide	N-acétyllacto- -samine
Système standard	352	342
Moins accepteur	146	128
Moins enzyme (extraits des cellules BHK)	0	0
Moins MnCl ₂	35	20
Moins AMP	293	300

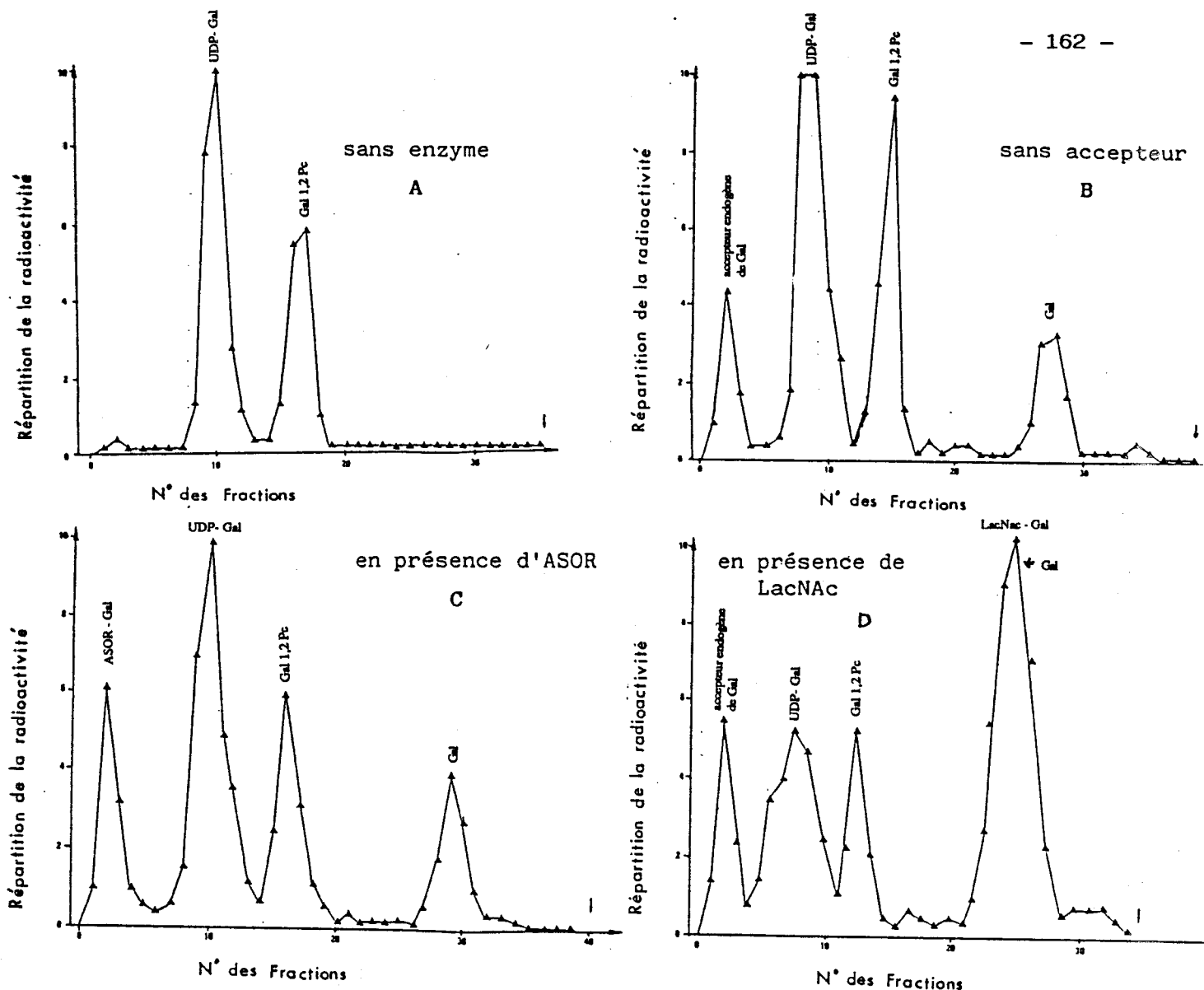


Figure 29 : Répartition de la radioactivité le long de la chromatographie papier après incubation dans le système standard d'UDP-¹⁴C-Gal et d'extraits bruts de cellules BHK ,pendant 2H30.Les variations du système enzymatique sont en A : sans extraits bruts, en B : sans accepteur; en C : système complet avec les glycopeptides de l'orosomucoide désialylés(ASOR) , en D : le système complet en présence de N-acétyllactosamine(LacNac).

En abscisse: le nombre de fractions comptées dans un compteur à scintillation liquide de la chromatographie sur papier après réaction enzymatique Le 0 correspond au trait de dépôt, la flèche indique la migration du du témoin Orangé GN.

En ordonnée : La répartition de la radioactivité est calculée par l'intégrateur couplé au compteur. le chiffre 10 est attribué à la valeur la plus élevée ,comptée pour l'ensemble de la chromatographie.

taux de galactosylation de la N-acétyllactosamine est de l'ordre de 220 pmoles de galactose incorporé/h/mg de protéine contre 210 avec le glycopeptide de l'orosomucoïde désialylé et ce, dans les conditions standard d'incubation établies.

C - VARIATION DE LA CONCENTRATION EN ACCEPTEUR

Les constantes d'affinité pour la N-acétyllactosamine et le glycopeptide de l'orosomucoïde désialylé ont été déterminées. Elles sont respectivement de 1,38 mM et de 0,97 mM (Exprimée en équivalent galactose), Fig. N° 30 et 31 p. 164. Ces résultats sont à comparer avec ceux déterminés par Blanken *et al.* (-18-) dans le thymus de Veau qui établissent des Km de 2,7 mM et 3,7 mM respectivement pour ces mêmes accepteurs ou avec ceux définis par Elices *et al.* (-47-) qui sont de 1,15 mM et 0,10 mM respectivement (N-acétyllactosamine et glycopeptide de l'orosomucoïde désialylé).

D - CARACTÉRISATION DU TYPE DE LIAISON FORMÉE

La purification partielle par chromatographie d'affinité sur UDP-Agarose ou par tamisage moléculaire en FPLC sur Supérose 12, de l'extrait brut des cellules BHK, ne permet pas en une seule étape de séparer convenablement les trois galactosyltransférases. De plus, la présence de galactosidases hexosaminidases ou pyrophosphatases interfèrent sur les produits de réaction galactosyltransférasique. Par conséquent, il n'est pas envisageable de déterminer le type de liaison formé par l'action enzymatique étudiée sans passer par un protocole complexe de purification de l'extrait.

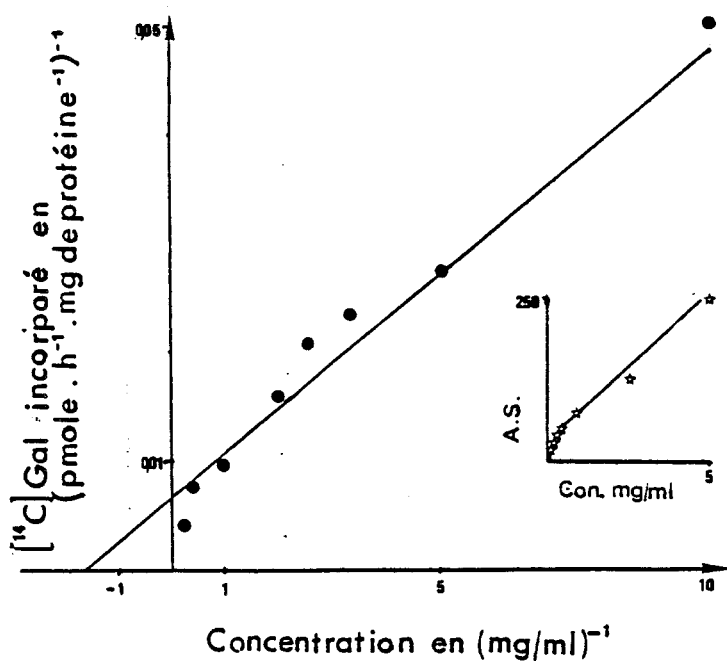


Figure 30 : Effet de la variation de la concentration en glycopeptide de l'orosomucoïde désialylé dans les essais enzymatiques en présence d'extraits bruts de cellule BHK. Le taux de ^{14}C -Gal incorporé au niveau de l'accepteur est exprimé en pMole/h/mg de protéine(A.S.) et la concentration en accepteur est en mg/ml(schéma inséré ☆). La figure représentée par ●, correspond à l'inverse des valeurs de l'incorporation du galactose en fonction de l'inverse de la concentration en accepteurs. Le point d'intersection de la droite avec l'axe des abscisses correspond à $-1/K_m$, ce qui donne un K_m de l'ordre de 0,62mg/ml.

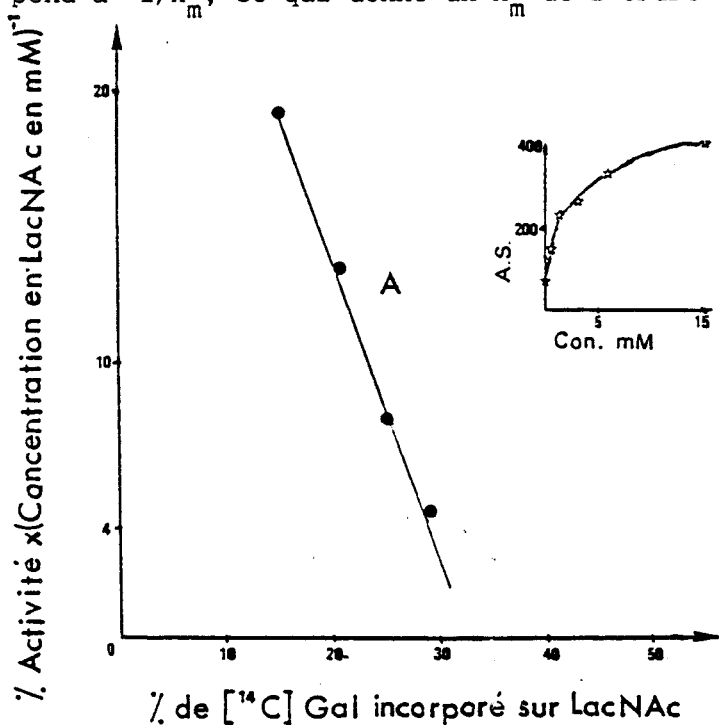


Figure 31 : Variation de la concentration en N-acétyllactosamine en fonction de l'activité de la galactosyltransférase des extraits bruts de cellules BHK. Les résultats sont représentés selon le modèle de SCATCHARD (●), la pente A indique la valeur de la constante d'affinité. Le schéma inséré(☆) a la même légende que celui de la Fig. 30.

Toutefois, notre approche du sujet, calquée sur les méthodes de Blanken *et al.* (-18-) et Elices *et al.* (-47-) et la confrontation des résultats obtenus, nous permettent de croire que l'activité galactosyltransférase détectée sur la N-acétyllactosamine et le glycopeptide de l'orosomucoïde désialylé engendre une liaison de type Gal- α -1-3 - LacNAc - R. Cela constituerait notre hypothèse de travail pour de futures investigations. Dans un tel cas, il serait très intéressant de pouvoir purifier cette galactosyltransférase en incluant une étape de chromatographie d'affinité en immobilisant le glycopeptide isolé des membranes des cellules BHK par Plancke *et al.* (-150-) et accepteur d'un galactose lié en α 1-3 sur l'une des quatre antennes.

III - PERSPECTIVES : RELATIONS ENTRE SPÉCIFICITÉ D'ACTION ET MASSE MOLECULAIRE DE L'ENZYME

Après avoir précisé l'ensemble des activités galactosyltransféra-siques détectées dans les cellules BHK, nous avons suivi la répartition des activités au cours du fractionnement de l'extrait brut et par tamisage moléculaire sur Supérose 12 en FPLC. Les résultats obtenus sont présentés Fig. N° 32 p. 166.

Deux activités distinctes peuvent être séparées par cette technique : celle qui agit en présence de mucine sous maxillaire de mouton désialylée et celle avec la N-acétyllactosamine comme accepteurs. En revanche, l'activité enzymatique en présence de N-acétylglucosamine se répartit en 2 pics. Ce résultat peut être attribué au choix de l'accepteur insuffisamment spécifique dans ces essais ou à l'existence de deux activités enzymatiques pour un même type de liaison. En effet, selon Gleeson *et al.* (66), l'activité galactosyltransférase des cellules BHK en présence de N-acétylglucosamine ou d'ovalbumine comme accepteurs n'est retenue qu'à 50 % par chromatographie d'affinité avec l' α -lactalbumine immobilisée. Après plusieurs essais, ils concluent qu'il existe dans les cellules BHK deux activités enzymatiques réalisant le même type liaison mais possédant des affinités différentes pour l' α -lactalbumine.

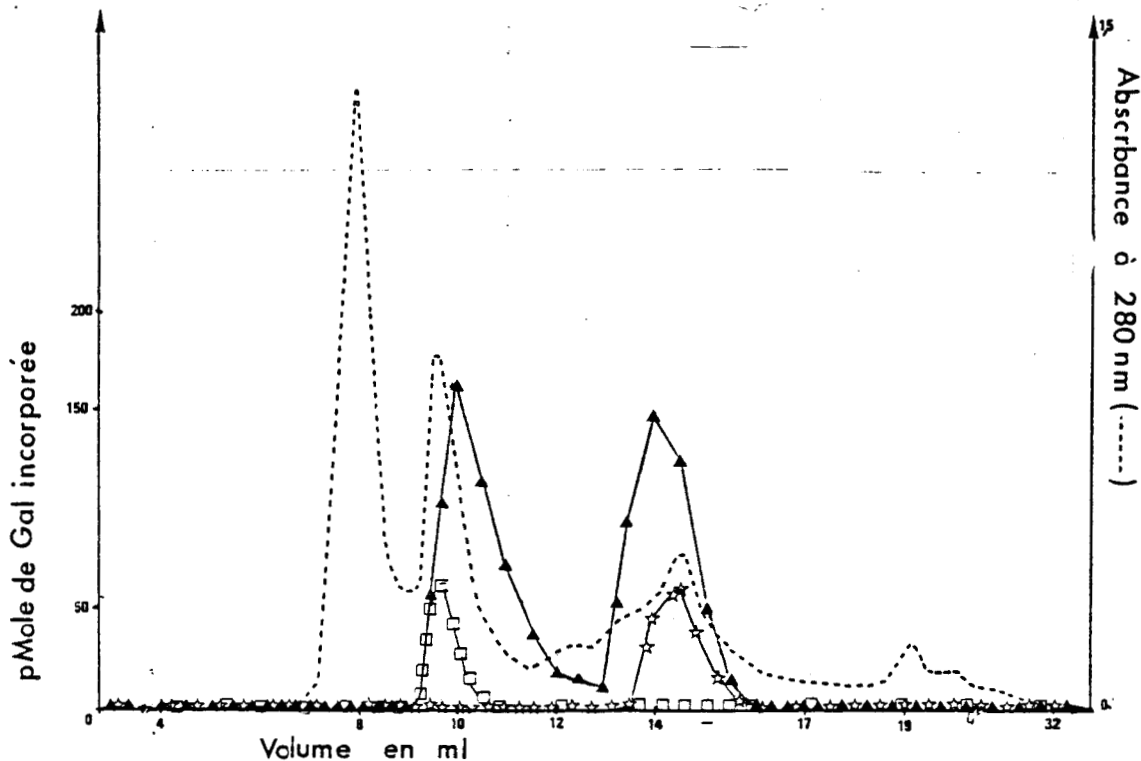


Figure 32 : Tamisage moléculaire en FPLC sur Supérose 12 des extraits bruts de cellules BHK. 5mg de protéines sont injectés sur la colonne dans un tampon cacodylate (25mM), $MgCl_2$ (5mM), β mercaptoéthanol (0,5mM), Triton X-100 (0,2%) et NaCl (1M). L'absorbance à 280 nm est mesurée en continue (----) et les activités galactosyltransférasiques sont testées selon les conditions décrites dans le Matériel et Méthodes (2H30 d'incubation et 30 μ l des différentes fractions à tester) avec la N-acétyllactosamine (*) et la mucine sous maxillaire de mouton (\square) comme accepteurs ou avec la N-acétylglucosamine (\blacktriangle), pendant 1H d'incubation

Compte tenu, d'une part des résultats obtenus à partir du lait humain et des cellules BHK et, d'autre part en s'appuyant sur les remarques établies par différents auteurs au cours des purifications des galactosyltransférases et des résultats de clonage de l'enzyme du lait de Vache, nous pensons que le problème général posé par ces études est à la fois le choix de l'accepteur et la taille moléculaire de l'enzyme.

In vivo, la spécificité d'action des enzymes est liée à la concentration variable de l'accepteur et à la protéolyse probable affectant les molécules enzymatiques. Pour étudier *in vitro* les galactosyltransférases nous proposons de purifier les enzymes en mesurant les activités avec une large gamme d'accepteurs et de suivre le comportement des enzymes par des compétitions de substrats afin de détecter le nombre de sites d'action par activité.

CONCLUSION

Le travail préliminaire que nous avons mené sur les extraits bruts de cellules BHK nous a permis de mettre en évidence trois types de transfert de galactose :

- 1 - sur le glycopeptide β de l'ovomucoïde et la N-acétylglucosamine
- 2 - sur la mucine sous-maxillaire de mouton désialylée
- 3 - sur la N-acétyllactosamine et le glycopeptide de l'orosomucoïde désialylé.

Ces trois activités sont distinctes. Les deux premières ont été caractérisées par Gleeson *et al.* (66). Il s'agit de la N-acétylglucosamine (β 1-4) galactosyltransférase et de la N-acétylgalactosamine (β 1-3) galactosyltransférase.

La troisième activité n'a jamais été détectée dans les cellules BHK, elle transfère du galactose sur un accepteur à N-acétyllactosamine en position terminale non réductrice, dépendant de la concentration en accepteur des ions Mn^{2+} de l'UDP-Gal et est activée par le Triton X100. Cette activité galactosyltransférase semble présente dans plusieurs cellules ou tissus comme dans le thymus de Veau (Blanken *et al.* - 18 -) dans les cellules de tumeur d'Ascites d'Ehrlich (Elices *et al.* - 47 -)

ou les cellules teratocarcinoma de Souris (Cummings *et al.*- 34 bis -). En confrontant nos résultats avec ceux des auteurs cités, nous pensons qu'il s'agit de la α -D-galactosyl- α 1,3-galactosyltransférase. Cette enzyme pourrait être responsable du branchement en α 1,3 du galactose sur le galactose du glycopeptide isolé des membranes des cellules BHK (Plancke et Montreuil - 150 -).

Selon nos premiers essais de purification et d'études enzymatiques, nous suggérons :

a - de purifier, en une première étape, les extraits cellulaires de BHK par tamisage moléculaire et de tester systématiquement les activités galactosyltransféra-siques en réalisant des compétitions d'accepteurs, ceci afin de déterminer le nombre de sites présents par pic d'activité.

Les étapes suivantes pourraient être la chromatographie d'affinité en immobilisant le glycopeptide isolé des membranes des cellules BHK par Plancke et Montreuil (-150-).

b - Les fractions enzymatiques semi-purifiées, débarrassées des galactosidases ou hexo-saminidases, pourraient enfin servir de catalyseurs à la synthèse d'une molécule nouvelle permettant ainsi de caractériser le type liaison formé (liaison Gal (α 1-3) Gal en particulier). Cette étape de synthèse ne peut être réalisée qu'après avoir précisé quelques paramètres enzymatiques complémentaires.

c - d'étudier l'ensemble des galactosyltransférases des cellules BHK en caractérisant la taille des enzymes et la spécificité d'action au cours d'une protéolyse. En purifiant les enzymes, des compétitions de substrats seraient enfin réalisées. Cela devrait permettre de fixer le nombre de site d'action par liaison formée et d'être un peu plus renseigné sur l'existence ou non d'une famille de galactosyltransférases acquérant leur spécificité d'action par augmentation ou diminution de leur masse moléculaire. Ces études seront complémentaires au clonage des enzymes.

CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION

Dans le lait, nous savons qu'il existe une activité galactosyltransférasique capable de synthétiser du lactose et de transférer du galactose sur des accepteurs possédant une N-acétylglucosamine en position terminale non réductrice. Des expériences de compétition de substrats nous indiquent la présence d'un seul site enzymatique.

Par un tamisage moléculaire et une élution des protéines calquée sur les techniques de chromatographie d'affinité, nous obtenons 3 pics d'activité galactosyltransférasique. Grâce aux expériences parallèles, nous déduisons que l'enzyme possède des masses moléculaires différentes. L'origine est commune (arguments immunologiques) mais la forme est hétérogène induisant des spécificités d'action différentes.

Grâce aux différents résultats acquis, nous pouvons comprendre l'existence des 3 pics d'activités obtenus après tamisage moléculaire sur Ultrogel AcA 54, correspondant à un état différent de la galactosyltransférase du lait.

1 - Le pic 1 d'activité enzymatique serait constitué de complexes enzymatiques non dissociés, élués au volume mort de la colonne. L'analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant, indique la présence de la majorité des protéines de la fraction de départ avec très peu d' α -lactalbumine. Ce pic d'activité ne nous permet pas de caractériser la galactosyltransférase. Ces complexes se dissocient plus facilement après un second passage

sur le support chromatographique. Les protéines de ces fractions sont sensibles à la dégradation protéolytique endogène induite par une préincubation de la fraction P₂ de départ. La dissociation des complexes génère le pic 2 d'activité enzymatique.

2 - Le second pic d'activité galactosyltransférase obtenu par gel filtration, concentre également l' α -lactalbumine. L'activité est effective sur tous les accepteurs de la fraction P₂ de départ. L'analyse des protéines de certaines fractions nous renseigne en partie sur la taille de l'enzyme. Il peut s'agir d'une masse de 67 kDa, 40 kDa ou 14 kDa. La technique de l'électrotransfert des protéines suivi d'une réaction enzymatique donne la faveur aux masses 40 et 14 kDa. Cette dernière masse est très faible et pourrait correspondre au site actif de l'enzyme. Seul Berger *et al.* (-12-) avaient annoncé son existence (la taille étant de 18 kDa environ) mais aucun auteur n'avait détecté son activité. Cette protéine est éluée avec l' α -lactalbumine et leur séparation n'a pas été possible par chromatographie d'affinité. C'est peut-être la raison pour laquelle les auteurs utilisant cette technique n'ont jamais pu la caractériser.

3 - Enfin l'addition de NaCl 1M dans une partie du tampon de tamisage moléculaire, à la manière de l'éluion de la galactosyltransférase des chromatographies d'affinité, nous a permis de détecter un 3ème pic d'activité. L'analyse des protéines révèle la présence dans certaines fractions d'une seule bande en gel de polyacrylamide. La masse de cette protéine est estimée à 83 kDa. Dans les autres fractions, elle s'associe à une protéine de masse 110 kDa. Par immunoelectrophorèse, l'unique arc de précipitation obtenu révèle l'origine commune de ces deux protéines. Ces fractions transfèrent du galactose uniquement sur la N-acétylglucosamine et sur le glycopeptide β

de l'ovomucoïde. La synthèse du lactose est négligeable. Ces protéines de haute masse moléculaire ont été observées par différents auteurs (résultats discutés p. 68), mais elles n'avaient pas été isolées seules. A caractère particulièrement hydrophobe, elles pourraient constituer la masse la plus élevée de la galactosyltransférase du lait dont l'origine serait l'enzyme des Glandes Mammaires.

En diminuant la force ionique du tampon de chromatographie, les protéines pouvant s'adsorber sur le support sont plus nombreuses. Caractérisées par électrophorèse, les protéines de 110 et 83 kDa sont éluées avec des protéines de 67, 40 à 55, 20 à 30 kDa. Par immunoelectrophorèse et électrotransfert suivi d'une réaction enzymatique, nous pouvons affirmer que l'origine de ces protéines est unique et qu'il s'agit d'une galactosyltransférase. Nous pensons que ces protéines sont issues de l'action protéolytique active dans le lait. Ce liquide doit, en effet, posséder les protéases permettant de solubiliser la galactosyltransférase des Glandes Mammaires.

Pour tenter de comprendre le comportement de la galactosyltransférase vis-à-vis de ses accepteurs, nous nous sommes intéressés aux galactosyltransférases intégrées dans les membranes de cellules afin de les comparer avec celle retrouvée dans les liquides biologiques. Pour cela, nous avons pris comme modèle les cellules de reins de Hamster cultivées au laboratoire (cellules BHK).

Notre étude préliminaire nous a permis de détecter 3 types d'activité enzymatique supposée, réaliser les liaisons :

- (1) Gal β 1-4 - GlcNAc
- (2) Gal β 1-3 - GalNAc
- (3) Gal α 1-3 - Gal (β 1-4) GlcNAc)

Cette dernière activité (3) n'a jamais été détectée dans les cellules BHK. Nous l'avons mise en évidence dans les extraits bruts en utilisant la Nacétyllactosamine et les glycopeptides d'orosomucoïde désialylés pour qui l'enzyme révèle des constantes d'affinité de 1,38 mM et 0,97 mM respectivement.

L'activité α -galactosyltransférase est fonction de la concentration en protéine, en accepteur et dépend de l'UDP-Gal et des ions Mn^{2+} .

Les premiers essais de purification enzymatique par tamisage moléculaire permettent de séparer les activités (2) et (3) et révèlent deux pics d'activité pour le cas (1).

Placé dans un contexte général, l'ensemble de nos travaux nous permet de conclure que la spécificité d'action des galactosyltransférases peut évoluer en fonction de la taille de l'enzyme et de l'accepteur. Ainsi, pour compléter ces recherches, nous suggérons de purifier les galactosyltransférases en corrélant masse moléculaire enzymatique - sites d'action et spécificité de substrats. Ainsi, des éléments enzymatiques pourraient être apportés aux études de clonage des galactosyltransférases qui nous renseignent sur l'origine multigénique ou non de ces enzymes.

BIBLIOGRAPHIE

	REFERENCES	PAGES
ANDERSON G., ERICKSSON L.C., J. Biol. Chem., 256(1981) 9633-9369	1	54
ANDREE P.J., BERLINER L.J., Biochem., 19(1980) 929-934	2	46
ANDREWS Febs Letters, 9(1970) 297-300	3	62-69
APPERT H.E., RUTHERFORD T.J., TARR G.E., THOMFORD N.R., McCORQUODALE D.J., Biochem. Biophys. Res. Commun. 138, (1986) 224-229	3bis	55-57
APPERT H.E., RUTHERFORD T.J., TARR E.G. WIEST J.S., THOMFORD N.R., McCORQUODALE D.J. Biochem. Biophys. Res. Commun. 139(1986) 163-168	3ter	56
ARCE A., MACCIONI H.J., CAPUTTO R. Biochem. J. 121 (1971) 483-493	4	35
ASHWELL G., MORELL A.G. Adv. Enzymol. 41 (1974) 99-128	5	22
BAEZINGER J., KORNFIELD S. J. Biol. Chem. 249 (1974) 7260-7280	6	14
BARKER R., OLSEN K., SHAPER J., HILL R. J. Biol. Chem. 247 (1972) 7135-7147	7	62-69
BASU M., CHON H.C., BROWN T., BASU S. in Proc. 7th Int. Sym. Glycoconjugates LUND-RONNEBY- (1983) 772	8	37
BEHRENS N.H., CARMINATTI H., STANELONI R.J., LELOIR L.F., CANTARELLA A.I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70 (1973) 3390-3394	9	25
BELLA A., WHITEHEAD J.S., KIM. Y.S. Biochem. J. 167 (1977) 622-628	10	63-69-70
BERGER E.G., KOZDROWSKI I., WEISER M.M., VAN DEN EIJNDEN H., SCHIPHORST W.E.C.M. Eur. J. Biochem. 90 (1978) 213-222	11	65-72-74
BERGER E., VERDON B., MANDEL T., FEY H., STROUS G. Enzyme, 29 (1983) 175-182	12	55-68-74- 170
BERGER E.C., HESFORD F.J. Proc. Natl. Acad. Sci., 82 (1985) 4736-4730	13	54-136

	REFERENCES	PAGES
BERLINER L., ROBINSON R., Biochemistry, 24 (1982) 6340	14a	44
BERMAN E., JAMES T.L. Carbohydr. Res., 113 (1983) 141-150	14b	53
BEYER T.A., REARICK J.I., PAULSON J.C., PRIEELS J.P., SADLER J.E., HILL R.L. J. Biol. Chem., 254 (1979) 12531-12541	15	30
BISCHOFF J., KORNFELD R., J. Biol. Chem., 258 (1983) 7907-7910	16	29
BLANKEN W., HOOGHWINKEL G.J.M., VAN DEN EIJNDEN H. Eur. J. Biochem., 127 (1982) 547-552	17a	63
BLANKEN W., VAN VLIET A., VAN DEN EIJNDEN H. J. Biol. Chem., 259 (1984) 15131-15135	17b	50-51-53
BLANKEN W., VAN DEN EIJNDEN H. J. Biol. Chem., 260 (1985) 12927-12934	18	39-48-51-65-69 73-154-158-165
BLANKEN W. University of AMSTERDAM, UTRECHT, (1985)	19	31-36-52 135
BRETZ R., BREZT H., PALADE G.E. J. Cell. Biol., 84 (1980) 87	20	54
BREW K., VANAMAN T.C., HILL R.L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 59 (1968) 491	21	58
BRISSEON J.R., CARVER J.P., Biochemistry, 22 (1983) 3680-3686	22	53
BROCKHAUSSEN I., WILLIAMS D., ORR J., SCHACHTER H. Can. J. Biochem., (1984)	23	29
BUCK C.A., GLICK M.C., WARREN L. Biochemistry, 9 (1970) 4567-4576	24	41
BUTLER W.T. in the Glycoconjugates, Vol. II, HOROWITZ M., PIGMAN W. (eds), Academic Press, NEW YORK, (1978) 79-85	25	10
BUTTERS T.D., HUGHES R.C. Biochim. Biophys. Acta., 640 (1981) 655-671	26	
CALLAGHAN R.M., VOTER W.A., SAGE H., BROWN C.F., KAUFMAN B. J. Biol. Chem., 259 (1984) 3167-3172	27	20
CHAPMAN A., KORNFELD R. J. Biol. Chem., 254 (1979) 816-828	28	13-16

	REFERENCES	PAGES
CHAPMAN A., LI E., KORNFELD S. J. Biol. Chem., 254 (1979) 10243-10249	29	25
CHATTERJEE S.K., BHATTACHARYA M., BARLOW J. J. NCl., 75 (1985) 237-248	30	48-56-65
CHERON A., FOURNET B., SPIK G., MONTREUIL J. Biochimie, 58 (1976) 927-942	31	14
CONCHIE J., STRACHAN I. Carbohydr. Res., 63 (1978) 193-213	32	13
CRETEL A., PAMBLANCO M., EGGE H., STRECKER G., MONTREUIL J., SPIK G. in the Proc. of the Vth Int. Sym. on Glycoconjugates, SHAUER R., BOER P., BUDECKE E., KRAMER M.F., VLIEGENTHART J.F.G., WIEGAND A. (Eds) GEORG THIEME PUBLISCHER (1979) 250-251	33	8
CUMAR F.A., TALMAN J.F., BRADY R.O. J. Biol. Chem., 247 (1972) 2322-2327	34	37
CUMMING R.D., MATTOX S.A. J. Biol. Chem., 263 (1988) 511-519	34bis	154-168
DAHR W., VHLENBRUCK G., GUNSON H.H., VAN DER HART M. Vox. Sang., 28 (1975) 249-252	35	8
DAVEY R., HARVIE R., CAHILL J. Biochem. Intern., 8(1984) 687-696	36	50
DEBRAY H. Bull. Cancer (PARIS), 66 (1979) 353-372	37	23
DEBRAY H., DELANNOY P., DEBEIRE P., MONTREUIL J. Eur. J. Biochem., (1985)	38	23
DESCAMPS J. Thèse d'état- USTL-FLANDRES ARTOIS (LILLE) N°294(1974)	39	86-87
DEN H., KAUFMAN B., Mc GUIRE E.J., ROSEMAN S. J. Biol. Chem., 250 (1975) 739-746	40	35
DICESAR J.L., DAIN J.A., J. Neurochem., 19 (1972) 403-410	41	37
DIXON M., WEBB E.C. Enzymes(2nd Eds), LONGMANS, LONDON (1964) 84-87	42	108
DUKSIN D., BORNSTEIN P. J. Biol. Chem., 252 (1979) 955-962	43	22
EBERT W., ROELCKE D., WEICKER H. Eur. J. Biochem., 53 (1975) 505-515	44	21
EBNER K.E. J. Dairy Sci., 54 (1971) 1229-1233	45	55

	REFERENCES	PAGES
EBNER K.E. in the Enzymes (P.D.BOYER Ed),3rd Ed, Academic Press, NEW YORK, 9 (1973) 363-377	46	58
ELICES M., BLAKE D., GOLDSTEIN I., J. Biol. Chem., 261 (1986) 6064-6073	47	66-73-154- 160-165
ENDO Y., YAMASHITA K., TACHIBANA Y., TOJO S., KOBATA A., J. Biol. Chem., 85 (1979) 669	48	19
FINNE J. Biochim. Biophys. Acta., 412 (1975) 317-325	49	8
FISHER F.G., NEBEL G.G. Z. Physiol. Chem., 302 (1955) 10-18	50	83-117
FISHMAN P.H., Chem. Phys. Lipids, 13 (1974) 305-324	51	35
FISHMAN P.H., MOSS J., MANGANIELLO V.C. Biochem., 16 (1977) 1871-1875	52	37
FLEISCHER B., SMIGEL M., J. Biol. Chem., 253 (1978) 1632-1638	53	48
FOURNET B., MONTREUIL J., STRECKER G., DORLAND L., HAVERKAMP J., VLIEGENHART J.F.G., BINETTE J.P., SCHMID K., Biochem.,17 (1978) 5202-5214	54	15
FOURNET B., STRECKER G., LEROY Y., MONTREUIL J. Anal. Biochem., 116 (1981) 489-502	55	15
FRANCOIS GERARD C., PIERCE-CRETEIL A., ANDRE A., DORLAND L., VAN HABEEK H., VLIEGENTHART J.F.G., MONTREUIL J., SPIK G. in the Proc. of VIIth Int. Sym. on Glycoconjugates CHESTER A., HEINEGARD D., LUNDBLAD A., SVENSSON S.(Eds) LUND-RONNEBY, (1983) 169-170	56	15
FRASER I.H., MOOKERJEA S. Biochem. J., 156 (1976) 347-355	57	45-48-55- 64-72-102
FRASER I.H., MOOKERJEA S. Biochem. J., 164 (1977) 541-547	58	48-65-69- 72
FUJITA-YAMAGUCHI, YOSHIDA A. J. Biol. Chem., 256 (1981) 2701-2706	59	47-64-69-70
FURUKAWA K., ROTH S. Eur. J. Biochem., 150 (1985) 175-189	60	56-120
FURUKAWA K., ROTH S. Biochem. J., 227 (1985) 573-582	61	65-69-72 74-78
GERBER A.C., KOZDROWSKI I., WYSS S.R., BERGER E.G. Eur. J. Biochem., 93 (1979) 453-460	62	63-69-117 136

	REFERENCES	PAGES
GEREN C., MAGEE S., EBNER K. Arch. Biochem. Biophys., 172 (1976) 149-155	63	47-62
GIBSON R., KORNFELD S., SCHLESINGER S. J. Biol. Chem., 256 (1980) 456-462	64	20
GIST FARQUHAR M., PALADE G. J. Cell. Biol., 91 (1981) 77s-103s	65	54
GLEESON P.A., FEENEY J., MILLS G., HUGUES R.C. Eur. J. Biochem., 144 (1984) 143-150	66	65-72-73 74-77-154 158-165
GMEINER B.M. Biochem. Biophys. Acta., 829 (1985) 76-82	67	55-71-72- 125
GODELAINE D., SPIRO J.M., SPIRO R.G. J. Biol. chem., 256 (1981) 10161-10168	68	29
GOTTSCHALK A., GRAHAM E.R.B. Biochem. Biophys. Acta., 34 (1959) 380-391	69	4
GRUNWALD J., DHAWAL S., BERLINER J. Int. J. Biol. Macromol., 4 (1982) 371-374	70	47
HANDA S., BURDON R.M. Lipids, 4 (1969) 589-598	71	37
HANOVER J.A., LENNARZ W.J. Arch. Biochem. Biophys., 211 (1981) 1-19	72	29
HARPAZ N., SCHACHTER H. J. Biol. Chem., 255 (1980) 4895-4902	74	27
HASCALL V.C. Carbohydr., GINSBURGT, ROBBINS P.(Eds), J. WILLEY and Sons, NEW YORK, (1981) 1-49	75	6-9
HASHIMOTO C., COHEN R.E., ZHANG W.J., BALLOU C.E. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 (1981) 2244-2248	76	13
HASILIK A., TANNER W. Eur. J. Biochem., 91 (1978) 567-575	77	22
HASILIK A., KLEIN U., WAHEED A., STRECKER G., VON FIGURA K. Proc. Natl. Acad. Sci., 77 (1980) 7074-7078	78	22
HICKMAN S., KULCZYCKI A., LYNCH R.C., KORNFELD S. J. Biol. Chem., 252 (1977) 4402-4408	79	22
HOFACK B., DEBEIRE P., CACAN R., MONTREUIL J., VERBERT A. Eur. J. Biochem., 124 (1982) 527-531	80	27
HUANG C.C., MAYER J.H.E., MONTGOMORY R. Carbohydr. Res., 13 (1970) 127	81	18
HUDGIN R.L., PRICER W.E., ASHWELL G., STOCKERT R.J., MORELL A.G. J. Biol. Chem., 249 (1974) 5536-5543	82	22

	REFERENCES	PAGES
HUGUES R.C., MEAGER A., NAIRN R. Eur. J. Biochem., 72 (1977) 265-273	83	22
IWASKI M., INOUE S., NOMOTO H., INOUE Y. Biochem., 23 (1984) 305-331	84	8
JOHNSON D.R., LAMBRIGHT D.G., WONG S.S. Biochim. Biophys. Acta., 832 (1985) 373-377	85	59
JOZIASSE D.H., BERGH M.L.E., HART H.G.J., KOPPEN P.T., HOOGHWINKEL G.J.M., VAN DEN EIJNDEN H. J. Biol; Chem., 260 (1985) 4941-4951	86	
KANFER J.N., HAKOMORI S.I. in Handbook of lipid Reseach- Sphingolipid Biochemistry, Penum Press-NEW YORK and LONDON, 3 (1983)	87	34
KAPLAN A., ACHORD D.T., SLY W.S. Proc. Natl. Acad. Sci., 74 (1977) 2026-2030	88I	22
KAPLAN F., HECHTMAN P. J. Biol. Chem., 258 (1983) 770-776	88II	53-65-73
KAPLAN F., HECHTMAN P. Biochem., 217 (1984) 353-364	89	39-46
KHATRA B.S., HERRIES D.G., BREW K. Eur. J. Biochem., 44 (1974) 537-560	90	46-58-62 68-69-117
KIM Y.S., PERDOMO J., WHITEHEAD J.S., CURTIS K.J. J. Clin. Invest., 51 (1972) 2033	91	135 71
KORNFELD R., KORNFELD S. Annu. Rev. Biochem., 45 (1976) 217-237	92	6
KORNFELD R., KORNFELD S. Annu. Rev. Biochem., 54 (1985) 631-634	93	6-25
KORNFELD R., KORNFELD S. in the Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans Lennarz W. ed.(1980) Plenum Press NEW YORK 1-34	94	25
LAEMMLI U.K. Nature, 227 (1970) 680-685	95	90
LAMBRIGHT D.G., LEE T.K., WONG S.S. Biochem., 24 (1985) 910-914	96	59-61
LAURELL C.B. Anal. Biochem., 15 (1966) 45	97	95
LEAVITT R., SCHLESINGER S., KORNFELD S. J. Biol. Chem., 252 (1977) 9018-9023	98	20
LEE T.K., WONG L.J., WONG S.S. J. Biol. Chem., 258 (1983) 13166-13171	99	59

	REFERENCES	PAGES
LEHMAN E., HUDSON B., EBNER K. Febs Letters, 54 (1975) 65-69	100	56
LIANG C.J., YAMASHITA K., MUELLENBERG C.G. SICHI H., KOBATA A. J. Biol. Chem., 254 (1975) 6414-6418	101	16
LIJNEN H.R., VAN HOEF B., COLLEN D. Eur. J. Biochem., 120 (1981) 149-154	102	20
LISOWSKA E. Eur. J. Biochem., 10 (1969) 574	103	21
LLOYD K.O., KABAT E.A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61 (1968) 1470	104	7
LOH Y.P., GAINER H., Febs Letters, 96 (1978) 269-272	105	20
LOPEZ L.C., BAYNA E.M., LITOFF D., SHAPER N, SHAPER J., SHUR B.D. J. Cell. Biol., 101 (1985) 1501-1510	106	54
MACCIONI H.J., ARCE A., LANDA C., CAPUTTO R. Biochem. J., 138 (1974) 291-298	107	35
MAGEE .C., MAWAL R., EBNER K.E. J. Biol. Chem., 248 (1973) 7565-7569	108	68
MAGEE C., MAWAL R., EBNER K.E. Biochemistry NY., 13 (1974) 99-102	109	67
MARISSEY J.H. Anal. Biochem., 117 (1981) 307-310	110	91
Mc GUIRE E.J., ROSEMAN S.J. J. Biol. Chem., 242 (1967) 3745-3747	111	29
MELCHERS F. Biochemistry, 12 (1973) 1471-1476	112	22
MILLER F. Immunochemistry, 9 (1972) 217-228	113	16-17
MITRANIC M.M., MOSCARELLO M.A. Can. J. Biochem., 58 (1980) 809-814	114	48
MITRANIC M.M., BOGGS J.M., MOSCARELLO M.A. J. Biol. Chem., 258 (1983) 8630-8636	115	49
MIZUOCHI T., KOBATA A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 97 (1980) 772	116	19
MIZUOCHI T., FUJIKAWA K., TITANI K., KOBATA A. in the Glycoconjugates, YAMAKAWA T., OSAWA T., HANDA S. (Eds), Jap.Sci. Soc. Press, TOKYO, (1981) 267	117	19
MIZUOCHI T., TANIGUCHI T., FUJIKAWA K., TITANI K., KOBATA A. J. Biol. Chem., 258 (1983) 6020-6025	118	74

	REFERENCES	PAGES
MONTREUIL J., CHOSSON A., HAVEZ R., MULLET S. C.R. Soc. Biol., 154 (1960) 732	119	86
MONTREUIL J. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 37 (1980) 157-233	120	17-51
MONTREUIL J. Compr. Biochem., 19B part II (1982) 1-188	121	4-6-24-25 29
MORGAN P.J., JACOBES H.G., SEGREST J.P., CUNNINGHAM L.N. J. Biol. Chem., 245 (1979) 5042-5048	122	10
MORRISON J.F., EBNER K.E. J. Biol. Chem., 246 (1971) 3977-3984	123	46
MOSCARELLO M.A., MITRANIC M.M., DEBER C.M. Carbohydr. Res., 149 (1986) 47-58	124	49
NAGAI M., DAVE V., MUERSCH H., YOSHIDA A. J. Biol. Chem., 258 (1978) 380	125	65-71-73
NAKAJIMA T., BALLOU C.E. J. Biol. Chem., 249 (1974) 7679-7684	126	7-9
NARASIMHAN S., FREED J.C., SCHACHTER H. Biochemistry, 24 (1985) 1694-1700	127	51-53
NARIMATSU H., SINHA S., BREW K., OKAYAMA H., QASBA P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 (1986) 4720-4724	128	70-75-76 153
NASIR- UD-DIN, JEANLOZ R.W., VERCELOTTI J.R., Mc ARTHUR J.W. Biochim. Biophys. Acta., 678 (1981) 483-496	129	20
NAVARATNAM N., WARD S., FISHER C., KHUN N.J., KEEN N.J., FINDLAY J.B.C. Eur. J. Biochem., 171 (1988) 623-629	130	56-57
NG S.S., DAIN J.A. J. Neurochem., 29 (1977) 1075-1083	131	39
NILSSON B., NORDEN M.E., SVENSSON S. J. Biol. Chem., 254 (1979) 4545-4553	132	14
OATES M.D., ROSBOTTOM A.C., SCHRAGER J. Carbohydr. Res., 34 (1974) 115	133	7
OLDEN K.M., PRATT R.M., YAMADA K.M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 (1979) 3343-3347	134	20
O'KEEFEE E.T., MORDICK T., BELL J.E. Biochemistry, 19 (1980) 4954-4962	135	45
O'KEEFEE E.T., MORDICK T., BELL J.E. Biochemistry, 19 (1980) 4962-4965	136	59-60-61
ONISHI H.R., TKACZ J.S., LAMPEN J.O. J. Biol. Chem., 254 (1979) 11943-11949	137	22

	REFERENCES	PAGES
OPHEIM D.H., TOUTER O. J. Biol. Chem., 254 (1978) 1017-1023	138	27
PACUSZKA T., DUFFARD R.O., NISHIMURA R.U., BRADY R.O., FISHMAN P.H. J. Biol. Chem., 253 (1978) 5839-5846	139	35
PAQUET M.R., MOSCARELLO M.A. Biochem. J., 218 (1984) 745-751	140	55-64-72 74
PAQUET M.R.M., NARASIMHAM S., SCHACHTER H., MOSCARELLO M.A. J. Biol. Chem., 259 (1984) 4716-4721	141	51
PAULSON J.C., REARICK J.I., HILL R.L. J. Biol. Chem., 252 (1977) 2363	142	50-73
PAULSON J.C., PRIEELS J.P., GLASGOW L.R., HILL R.L. J. Biol. Chem., 253 (1978) 5617-5624	143	50
PETERSON G.L. Anal. Biochem., 83 (1977) 346-356	144	96
PERTSOUNIS D. Thèse de 3ème cycle, Université de LILLE(USTL) N° 1129 (1983)	145	109-120 136
PESTALOZZ D.M., HESS M., BERGER E.C. J. Histochem. Cytochem., 30 (1982) 1146-1152	146	54
PIERCE-CRETEIL A., PABLANCO M., STRECKER G., MONTREUIL J. Eur. J. Biochem., 125 (1982) 383-388	147	14
PIERCE M., TURLEY E., ROTH S. Int. Rev. Cytolgy., 65 (1980) 1-47	148	42-54
PILLER F., CARTRON J.P. J. Biol. Chem., 258 (1983) 12293-12299	149	39
PLANCKE Y., MONTREUIL J. in the Proc. of the VIIth Int. Sym., DAVIDSON E.A., WILLIAMS J.C., DI FERRANTE N.M. (Eds) 1 (1986) 91	150	15-165- 168
PLESS D.D., LENNARZ W.J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 134-138	151	27
PODOLSKI D.K., WEISER M.M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 65 (1975) 545	152	40
PODOLSKI D.K., WEISER M.M. J. Biol. Chem., 254 (1979) 3983-3990	153	64-71
POWELL J.T., BREW K. Eur. J. Biochem., 48 (1974) 217-228	154	45-68-72 136
POWELL J.T., BREW K. J. Biol. Chem., 251 (1976) 3645-3652	155	45-50

	REFERENCES	PAGES
PRIEELS J.P., MAES E., DOLMANS M., LEONIS J. Eur. J. Biochem., 60 (1975) 525-531	156	67-124
RAO A.K., GARVER J., MENDICINO J. Biochemistry, 15 (1976) 5001-5009	157	65-69-74
RAO A.K., MENDICINO J. Biochemistry, 17 (1978) 5632-5638	158	50-53
RAY J., SHINNICK T., LERNER R.A. Nature, 279 (1979) 215-221	159	21
REARICK J.I., SADLER J.E., PAULSON J.C., HILL J.C. J. Biol. Chem., 254 (1979) 4444-4451	159 bis	29
RICHARDSON R.H., BREW K. J. Biol. Chem., 255 (1980) 3377-3385	160.	58
ROSEMAN S. Chem. Phys. Lipids, 5 (1970) 270-297	161	35-40
ROSEN S.D., CHANG C.M., BARONDES S.H. Dev. Biol., 61 (1977) 203-213	162	21
SCHACHTER H., ROSEMAN S. in the Biochemistry of Glycoconjugates and Proteoglycans, LÄNNARZ W.J. (Eds), Plenum Press NEW YORK, (1980) 85-160	163	24
SCHACHTER H., Mc GUIRE E.J., ROSEMAN S. J. Biol. Chem., 246 (1971) 5321-5328	164	30-39
SCHACHTER H., RODEN L. in Metabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis, FISHMAN W.H. (Eds), Academic Press NEW YORK, (1973) 1-149	165	54
SCHACHTER H., NARASIMHAN S., GLEESON P., VELLA G. Can. J. Biochem. Cell. Biol., 61 (1983) 1049	166	28
SCHEIDEGGER J.J. Intern. Arch. Allergy. Appl. Immunol., 7 (1955) 103	167	95
SCHWARTZ R.T., DATEMA R. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 40 (1982) 287-379	168	20
SHAPER N.L., SHAPER J.H., MEUTH J.L., FOX J.L., CHANG H., KIRSCH I.R., HOLLIS G.F. Proc. Natl.Acad. Sci. USA, 83 (1986) 1573-1577	169	76
SHEARES B.T., CARLSON D.M. J. Biol. Chem., 259 (1984) 8045-8047	170	66-73-77
SCHEWALE J.G., SINHA S.H., BREW K. J. Biol. Chem., 259 (1984) 4947-4956	171	58

	REFERENCES	PAGES
SHUR B.D., HALL G. J. Cell. Biol., 95 (1982) 567-573	172	54
SHUR B.D. J. Biol. Chem., 257 (1982) 6871-6878	173	54
SHUR B.D. Dev. Biol. 99 (1983) 360-372	174	54
SINHA S.K., BREW K. J. Biol. Chem., 256 (1981) 4193-4204	175	58
SLOMIANY A., SLOMIANY B.C. J. Biol. Chem., 253 (1978) 7301-7306	176	8
SMETS C.A., VAN BEEK W.P., VAN ROOIJ H. Int. J. Cancer, 18 (1976) 462-468	177	23
SMITH C., BREW K. J. Biol. Chem., 252 (1977) 7294-7299	178	63-69-72
SPIK G., BAYARD B., FOURNET B., STRECKER G., MONTREUIL J. Febs Letters, 50 (1975) 296-299	179	14
SPIK G., FOURNET B., MONTREUIL J. C.R. Acad. Sci. PARIS, 288D (1979) 1018-1023	180	15
SPIK G., DEBRUYNE V., MONTREUIL J. in Structural Carbohydrate, in the liver Falk Symposium 34, POPPER H., REUTTER W., GUDAT F., KOTTGEN E. (Eds), MTP Press Limited, LANCASTER (1983) 477-483	181	41
SPIRO R.G. Meth. Enzymol., 28 (1972) 3	182	6
SPIRO R.G., SPIRO M.J., BHOYROO V.D. J. Biol. Chem., 254 (1979) 7659-7667	183	25
SPIRO R.G., BHOYROO V.D. J. Biol. Chem., 255 (1980) 5347-5354	184	7-9
STANELONI R.J., UGALDE R.A., LELOIR L.F. Eur. J. Biochem., 105 (1980) 275-278	185	25
STRUCK P.K., SUITA P.B., LANE M.D., LENNARZ W.J. J. Biol. Chem., 253 (1978) 5332-5337	186	22
STRUCK D.K., LENNARZ W.J., BREW K. J. Biol. Chem., 253 (1978) 5786-5794	187	27
SUGIURA M., KAWASAKI T., YAMASHIMA I. J. Biol. Chem., 257 (1982) 9501-9507	188	29
SWAMINATHAN N., BAHL O.P. Biochem. Biophys. Res. Commun., 40 (1970) 422	189	19

	REFERENCES	PAGES
TAI T., ITO S., YAMASHITA K., MURAMATSU T., KOBATA A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 65 (1975) 968	190	50
TAKASAKI S., IKERSHIRA H., KOBATA A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 92 (1980) 735-742	191	41-69
TAKASE K., EBNER K.E. J. Biol. Chem., 256 (1981) 7269-7276	192	58
TANIGUCHI N., YANAGISAWA K., MARIKA A., NAIKI M. J. Biol. Chem., 260 (1985) 4908-4913	193	45-43-65-73
TARENTINO A.L., PLUMMER T.H., MALEY F. J. Biol. Chem., 245 (1970) 4150	194	18
TASHEVA B., DESSEV G. Anal. Biochem., 129 (1983) 98-102	194 bis	18-128
THOMAS D.B., WINZLER R.J. J. Biol. Chem., 244 (1969) 5943-5946	195	8
TONEGAWA Y., DOI T. in the Proc. of the VIIth Int. Sym. on Glycoconjugates, CHESTER A., HEINEGARD D., LUNDBLAD A., SVENSSON S.(Eds), LUND-RONNEBY (1983) 608-609	196	21
TRAYER I., HILL R. J. Biol. Chem., 246 (1971) 6666-6675	197	55-56-57 62-69
TSPANAKIS A., HERRIS D.G. Biochem. Biophys. Res. Commun., 68 (1976) 1102-1108	198	46
TSUJI T., TSUNEHISA S., YAMAMOTO K., OSAWAX T. in the Proc. of the VIIth Int. Sym. on Glycoconjugates, CHESTER A., HEINEGARD D., LUNBLAD A., SVENSSON S.(Eds), LUND-RONNEBY, (1983) 188-189	199	8
TURCO J., HEATH E.C. Arch. Biochem. Biophys., 176 (1976) 352-357	200	63-69-72 74
ULRICH J.T., SHENCK J.R., RITTENHOUSE H.G., SHAPER N.L., SHAPER J.H. J. Biol. Chem., 261 (1986) 7975-7981	201	70
VAN BEEK W.P., SMET L.A., EMMELOT P. Cancer Res., 33 (1973) 2913-2922	202	41
VAN BEEK W.P., SMET L.A., EMMELOT P., Nature, 253 (1975) 457-460	203	41
VAN HALBECK H., DORLAND L., Vliegenthart J.E.G., SPIK G., CHERCN A., MONTREUIL J. Biochem. Biophys. Acta., 675 (1981) 293-296	204	13
WESSEL D., FLUGGE U.I. Anal. Biochem., 138 (1984) 141-143	205	97

WILLIAMS D., SCHACHTER H. J. Biol.Chem., 255 (1980) 11247-11252	206	29
WILSON J.R., WEISER M.M., ALBANI B., SCHENCK J.R., RITTENHOUSE H.G., HIRATA A.A., BERGER E.G. Biochem. Biophys. Res. Commun., 105 (1982) 737-744	207	64-71-102
WINZLER R.J. in Blood in Tissue Antigen, AMINOFF D.(Eds) Academic Press, NEW YORK, LONDON (1970) 117-126	208	21
WONG S.S., MALONE T.E., LEE T.K. Biochem. Biophys. Acta, 745 (1983) 90-96	209	56-59
YAMASHITA K., TACHIBANA Y., KOBATA A. J. Biol. Chem., 253 (1978) 3862-3869	210	16
YAMASHITA K., KAMERLING J.P., KOBATA A. J. Biol. Chem., 258 (1983) 3099-3106	211	13-15-82
YAMASHITA K., LIEDA M., KOBATA A. J. Biol. Chem., 258 (1983) 14144-14147	212	16
YOSHIMA H., TAKASAKI S., KOBATA A. J. Biol. Chem., 255 (1980) 10793-10804	213	15

