



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE DE NANCY I, FACULTE DES SCIENCES**  
**U.F.R. : SCIENCES ET TECHNIQUES BIOLOGIQUES**  
**G.F.D. DE BIOLOGIE ET BIOCHIMIE STRUCTURALES,**  
**METABOLIQUES, MOLECULAIRES ET NUTRITIONNELLES**

---



## **THESE**

**présentée devant**  
**L'UNIVERSITE DE NANCY I**  
**pour obtenir le titre de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY I**  
**EN BIOCHIMIE APPLIQUEE**

**par**

**Jean-Michel GIRARDET**

**sujet :**

**LE COMPOSANT-3 DES PROTEOSE-PEPTONES DU LAIT BOVIN :**  
**OBTENTION, ORIGINE, ETUDE DE SA PARTIE**  
**GLYCANNIQUE, ROLE DANS LA LIPOLYSE**

**soutenue publiquement le 19 Juin 1992**

**devant la commission d'examen composée de :**

**Monsieur G. BRANLANT (Président et Rapporteur)**  
**Monsieur D. LORIENT (Rapporteur)**  
**Monsieur B. RIBADEAU-DUMAS (Rapporteur)**  
**Monsieur G. LINDEN (Directeur de la Recherche)**  
**Monsieur D. PAQUET (Examinateur)**  
**Madame G. SPIK (Examinatrice)**

## AVANT-PROPOS

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biochimie Appliquée associé à l'INRA de l'Université de Nancy I. Je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance à Messieurs les Professeurs G. LINDEN et J.Y. LE DEAUT pour m'avoir accueilli dans leur Laboratoire.*

*Je tiens à remercier sincèrement Monsieur le Professeur G. LINDEN pour avoir suivi et orienté ce travail et pour m'avoir permis d'acquérir ma formation de chercheur. C'est également avec lui que j'ai réalisé mes "premiers pas" dans le domaine de la biochimie, car il a été mon Professeur à l'IUT (années 82-84). Je lui suis très reconnaissant pour avoir su me transmettre un peu de sa passion et pour m'avoir donné l'envie de continuer dans la recherche Agro-alimentaire.*

*Je voudrais remercier tout particulièrement Monsieur F. LE TACON, Président du Centre INRA de Nancy-Champenoux, pour le rôle de premier plan qu'il a joué dans l'obtention de la bourse d'études.*

*J'exprime toute ma gratitude aux membres de l'INRA et de la Région de Lorraine, qui l'ont gérée.*

*Une partie de ce travail a été réalisée au Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille. J'exprime ma profonde reconnaissance à Madame le Professeur G. SPIK, qui m'a accueilli dans son Laboratoire et qui m'a accordé toute sa confiance lors des deux stages que j'ai effectués.*

*Je remercie vivement B. CODDEVILLE, Ingénieur de Recherche, pour l'attention toute particulière et la grande disponibilité dont elle a fait preuve durant la réalisation de ce travail, ainsi que pour ses précieux conseils. Mes remerciements s'adressent également à J.M. WIERUZESKI, qui a réalisé l'étude RMN.*

*J'exprime toute ma gratitude à Monsieur B. RIBADEAU-DUMAS, Directeur de Recherche à l'INRA de Jouy-en-Josas, pour m'avoir accueilli dans son Laboratoire de Biochimie de la Station de Technologies Laitières, et à P. ANGLADE, Ingénieur de Recherche, pour sa collaboration étroite au niveau de la détermination de séquences d'acides aminés.*

*Je remercie Monsieur le Professeur R. VERGER, Directeur du Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire du CNRS de Marseille, qui m'a accueilli dans son Laboratoire. Ses conseils primordiaux sur l'étude de l'inhibition des lipases m'ont permis d'avancer de manière efficace dans mon travail.*

*Dans mes débuts de recherche, j'ai eu la chance d'être guidé par D. PAQUET, actuel Responsable du Laboratoire "Matières Premières" du Centre de Recherche Daniel Carasso au Plessis-Robinson. Il a été à l'origine de ce travail. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir légué son précieux héritage et j'espère m'être montré digne dans la poursuite de son œuvre.*

*Mes remerciements s'adressent également aux membres de la commission d'examen qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail :*

*-Monsieur B. RIBADEAU-DUMAS, Directeur de Recherche à l'INRA de Jouy-en-Josas ;*

*-Monsieur G. BRANLANT, Professeur à la Faculté des Sciences de Nancy I ;*

*-Madame G. SPIK, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille ;*

*-Monsieur D. LORIENT, Professeur à l'ENS.BANA de Dijon ;*

*-Monsieur D. PAQUET, Responsable Scientifique du C.I.R.D.C. du Plessis-Robinson.*

*Mes remerciements vont également à mes proches collaborateurs du groupe "protéose-peptones" A. MATI et L. ETIENNE, avec qui j'ai échangé de nombreuses idées, ainsi qu'à C. PASQUIER et S. LOYE qui ont réalisé leur stage de formation au sein de notre groupe.*

*Pour leur aide précieuse au niveau de la dactylographie, des figures et tableaux réalisés sur ordinateur, je suis reconnaissant à C. ANTOINE et L. DIEZ. Pour son assistance technique et ses photographies de qualité, je remercie M. PRUD'HOMME.*

*J'associe à mes remerciements tous les membres du Laboratoire pour leurs aides, conseils et encouragements.*

*Enfin, j'exprime toute ma gratitude à mes parents et beaux-parents pour leurs soutiens et encouragements, et plus particulièrement à Evelyne et Amélie, qui m'ont plus encore motivé dans ce travail et à qui je dédie cette thèse.*

## Abréviations

A 280 nm	: absorption à 280 nm
ADNc	: acide désoxyribonucléique complémentaire
AGL	: Acides Gras Libres
ANS	: acide 8-anilino-naphtalène sulfonique
Apo-CII	: apoprotéine CII
C	: rapport en pourcentage de la masse de bisacrylamide sur la masse d'acrylamide + bisacrylamide
CCM	: chromatographie sur couche mince
CIH	: chromatographie d'interactions hydrophobes
CPG	: chromatographie en phase gazeuse
ConA	: concanavaline A
2D	: bidimensionnelle
E/S	: rapport enzyme sur substrat
FH	: fraction hydrophobe
F <sub>max</sub>	: fluorescence maximale
F(N)HPP	: fraction (non) hydrophobe des protéose-peptones
FPLC	: <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
Fuc	: fucose
Gal	: galactose
GalNAc	: N-acétylgalactosamine
GC	: acide glycocholique
Glc	: glucose
GlcNAc	: N-acétylglucosamine
HDL	: <i>High Density Lipoprotein</i>
HPEC	: <i>High Performance Electrophoresis Chromatography</i>
HPLC	: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<sup>1</sup> H-RMN	: résonance magnétique nucléaire du proton
I <sub>50</sub>	: concentration protéique provoquant 50% d'inhibition de l'enzyme
IEF	: isoélectrofocalisation
K <sub>d</sub>	: constante de dissociation
K <sub>I</sub>	: constante d'inhibition
K <sub>M</sub>	: constante de Michaelis
λ <sub>EM</sub> et λ <sub>EX</sub>	: longueur d'onde d'émission et longueur d'onde d'excitation
LGH	: lipase gastrique humaine

LPP	: lipase pancréatique porcine
LPL	: lipoprotéine lipase
LSSB	: lipase stimulée par les sels biliaires
Man	: mannose
MDS	: modèle de déplacement stoechiométrique
Méso	: méso-inositol
MGG	: membrane de globules gras
NeuAc	: acide N-acétylneuraminique
PAGE	: <i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
PAS	: <i>Periodic Acid Schiff</i>
pHi	: pH isoélectrique
PIL	: protéines (de soja) inhibant la lipase
PNA	: <i>PeaNut Agglutinin</i>
PNPA	: paranitrophénylacétate
PNPB	: paranitrophénylbutyrate
PPA	: précipité de phase aqueuse
PPT	: protéose-peptones totales
PVDF	: difluorure de polyvinyldène
RET	: rétentat de lactosérum acide diafiltré à 100 kDa
R <sub>f</sub>	: rapport frontal
SAB	: sérumalbumine bovine
SDS	: sodium dodécylsulfate
SL	: surnageant de lavage
SPA	: surnageant de phase aqueuse
T	: rapport en pourcentage de la masse d'acrylamide + bisacrylamide sur le volume de gel
TC	: acide taurocholique
TCA	: acide trichloroacétique
TDC	: acide taurodéoxycholique
TFA	: acide trifluoroacétique
t <sub>R</sub>	: temps de rétention
Tris	: trihydroxy-méthyl-amino-méthane
U.A.	: unités arbitraires
U.E.	: unités enzymatiques
V <sub>M</sub>	: vitesse enzymatique maximale
WGA	: <i>Wheat Germ Agglutinin</i>
XO	: xanthine oxydase

## SOMMAIRE

### INTRODUCTION GENERALE : Les protéose-peptones du lait.

1- Les protéose-peptones du lait bovin.....	1
1.1- Les composants-5, 8f et 8s. ....	2
1.2- Le composant-3. ....	3
1.2.1- Connaissances jusqu'en 1989.....	3
1.2.2- Les connaissances récentes.....	5
2- La fraction protéose-peptones du lait d'autres espèces.....	7
3- Objectifs du travail.....	8

### MATERIEL ET METHODES.

1- Matériel.....	9
2-Réactifs .....	9
3- Préparation de fractions protéiques à partir de lait frais.....	10
3.1- Préparation de protéines lactosériques.....	10
3.2- Préparation des protéose-peptones totales (PPT).....	10
3.3- Préparation des protéines de membranes de globules gras.....	11
4-Electrophorèse et techniques attenantes.....	11
4.1- Electrophorèse en gel de polyacrylamide et en conditions natives (PAGE-native).....	11
4.2- Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée 4 M (PAGE-urée).....	11
4.3- Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS 0,1% (PAGE-SDS).....	12
4.4- Isoélectrofocalisation (IEF).....	12
4.5- Electrophorèse bidimensionnelle (PAGE-2D). ....	13
4.6- Révélation des gels d'électrophorèse. ....	13
4.7- Le transfert de protéines séparées par PAGE-2D ( <i>Western-Blot</i> ).....	14
4.8- Révélation aux lectines couplées à la peroxydase.....	15
4.9- Electroélution de protéines d'un gel de PAGE-SDS.....	15
4.10- Electrophorèse micropréparative HPEC ( <i>High Performance Electrophoresis Chromatography</i> ).....	16

4.11-	Traitement des composants purifiés par HPEC-SDS.....	17
5-	Chromatographie liquide.....	18
5.1-	Chromatographie d'interactions hydrophobes. ....	18
5.2-	FPLC d'interactions hydrophobes analytique et préparative (FPLC-IH) ..	18
5.3-	FPLC et HPLC d'échange d'ions.....	19
5.4-	FPLC de filtration sur gel.....	19
5.5-	HPLC en phase inverse.....	19
5.6-	Chromatographie d'affinité sur concanavoline A (ConA).....	19
5.7-	Chromatographie de filtration sur gel sur Séphadex G-25.....	20
5.8-	Chromatographie de filtration sur gel sur Biogel P2.....	20
5.9-	Chromatographie chélatante sur Chelex 100.....	20
6-	Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	20
7-	Chromatographie sur couche mince (CCM).....	21
8-	Hydrolyses enzymatiques et chimiques et clivage par CNBr.....	21
8.1-	Hydrolyse par la neuraminidase immobilisée sur agarose.....	21
8.2-	Hydrolyse pronasique.....	21
8.3-	$\beta$ -élimination en milieu alcalin réducteur.....	22
8.4-	Micro-méthanolyse et préparation des échantillons pour le dosage des glycanes par CPG.....	22
8.6-	Clivage des protéines par le bromure de cyanogène (CNBr).....	23
9-	Séquençage d'acides aminés.....	23
10-	Résonance magnétique nucléaire du proton ( $^1\text{H}$ -RMN).....	24
11-	Spectrofluorescence : détermination de l'hydrophobicité de surface des protéines.....	24
12-	Ultrafiltration à flux tangentiel et à volume constant (diafiltration).....	25
13-	Influence des protéose-peptones sur l'activité lipolytique : études modélisées. .	26
13.1-	Etude enzymatique en milieu hétérogène.....	26
13.2-	Etude enzymatique en milieu homogène.....	27
14-	Spectrométrie U.V. des fractions issues de la FPLC.....	27
15-	Détermination de la solubilité des PPT en fonction de la molarité en $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .....	28
16-	Dosage des acides aminés.....	28
17-	Dosage des protéines et de l'azote.....	28

**CHAPITRE 1 : Fractionnement des protéose-peptones par FPLC d'interactions hydrophobes et caractérisation par électrophorèse bidimensionnelle.**

1- Introduction : la chromatographie d'interactions hydrophobes.....	29
2- Résultats.....	32
2.1- FPLC d'interactions hydrophobes analytique : mise au point.....	32
2.2- FPLC d'interactions hydrophobes semi-préparative.....	32
2.3- Caractérisation physico-chimique et chimique des fractions issues de la FPLC.....	33
3- Discussion.....	37
3.1- FPLC d'interactions hydrophobes (FPLC-IH).....	37
3.2- Caractérisations physico-chimique et chimique des fractions issues de la FPLC.....	40
4- Conclusion.....	46

**CHAPITRE 2 : Etude de la partie glycanique du composant-3.**

1- Introduction.....	47
1.1- Les chaînes glycaniques : structures et microhétérogénéité.....	47
1.1.1- Profil de ramification.....	47
1.1.2- Microhétérogénéité.....	49
1.2- Les glycoprotéines : relation glycanne-apoprotéine.....	51
1.2.1- Les antennes des N-glycosylprotéines.....	51
1.2.2- Le core interne des N-glycosylprotéines.....	52
1.2.3- Les O-glycosylprotéines.....	52
1.3- Rôle des glycanes dans la spécificité des lectines.....	53
1.4- But de l'étude.....	54
2- Résultats.....	54
2.1- Désialylation de FH1 par la neuraminidase immobilisée.....	54
2.2- Chromatographie d'affinité sur concanavaleine A.....	55
2.3- Etude de l'affinité des fractions FH1 <sup>-</sup> et FH1 <sup>+</sup> pour différentes lectines.....	55
2.4- Séparation des sous-unités B1, B2 et B3 par HPEC-SDS.....	56
2.5- Composition glycanique de différentes fractions étudiées.....	56
2.6- Préparation des échantillons et analyses RMN.....	57

3- Discussion.....	58
3.1- Rôle des acides sialiques.....	58
3.2- Séparation par HPEC-SDS.....	61
3.3- Affinité aux lectines et composition glycanique.....	62
3.4- Analyse structurale par RMN.....	66
4- Conclusion.....	68

**CHAPITRE 3 : Relation composant-3 - glycoprotéines des membranes de globules gras.**

1- Introduction : les protéines des membranes de globules gras du lait (MGG). ....	70
1.1- Composition et structure de la MGG.....	70
1.2- Les glycoprotéines des MGG humaines.....	71
1.3- Les protéines et glycoprotéines des MGG bovine et d'autres espèces.....	71
1.3.1- La glycoprotéine PAS-I. ....	72
1.3.2- La xanthine oxydase (XO).....	73
1.3.3- Les glycoprotéines GP80 et GP55. ....	73
1.3.4- La butyrophiline.....	74
1.4- But du travail.....	78
2- Résultats et discussion. ....	78
2.1- Isolement des sous-unités 19 et 29 kDa du composant-3 à partir d'un lait non chauffé.....	78
2.2- Préparation des protéines des membranes de globules gras.....	80
2.3- Relation composant-3 - glycoprotéines de MGG.....	82
3- Conclusion.....	85

**CHAPITRE 4 : Etude modélisée du mécanisme de l'inhibition de la lipolyse par le composant-3.**

1- Introduction.....	87
1.1- Les mécanismes d'action de la lipoprotéine lipase.....	87
1.1.1- La lipolyse spontanée dans le lait bovin due à la lipoprotéine lipase.....	87
1.1.2- La lipolyse spontanée et induite du lait d'autres espèces animales. ....	93

1.2- Etude du mécanisme lipolytique avec d'autres lipases. ....	94
1.2.1- Les lipases pancréatiques.....	94
1.2.2- Inhibition et activation des lipases aux interfaces substrat/eau.	96
1.2.3- Stéréosélectivité des lipases hydrolysant les triglycérides.....	98
1.2.4- Les réactions de synthèse (estérification) catalysées par les lipases.....	99
1 3- But de l'étude. ....	100
2- Résultats-Discussion.....	100
2.1- Activité lipolytique de la LPP en phase hétérogène : étude du méca- -nisme inhibiteur par la fraction hydrophobe des protéose-peptones.....	100
2.2- Activité estérasique de la LPP en phase homogène : influence de la fraction hydrophobe des protéose-peptones.....	106
3- Conclusion.....	108
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>109</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>111</b>

# **INTRODUCTION GENERALE**

**Les protéose-peptones du lait**

---

## 1- Les protéose-peptones du lait bovin.

La fraction protéose-peptones est la fraction protéique mineure thermostable du lait de vache. Elle représente environ 10% des protéines du lactosérum. Elle a été isolée pour la première fois par ROWLAND (1937) en chauffant le lait à 95°C pendant 10 à 20 minutes et en ajustant le pH à 4,7.

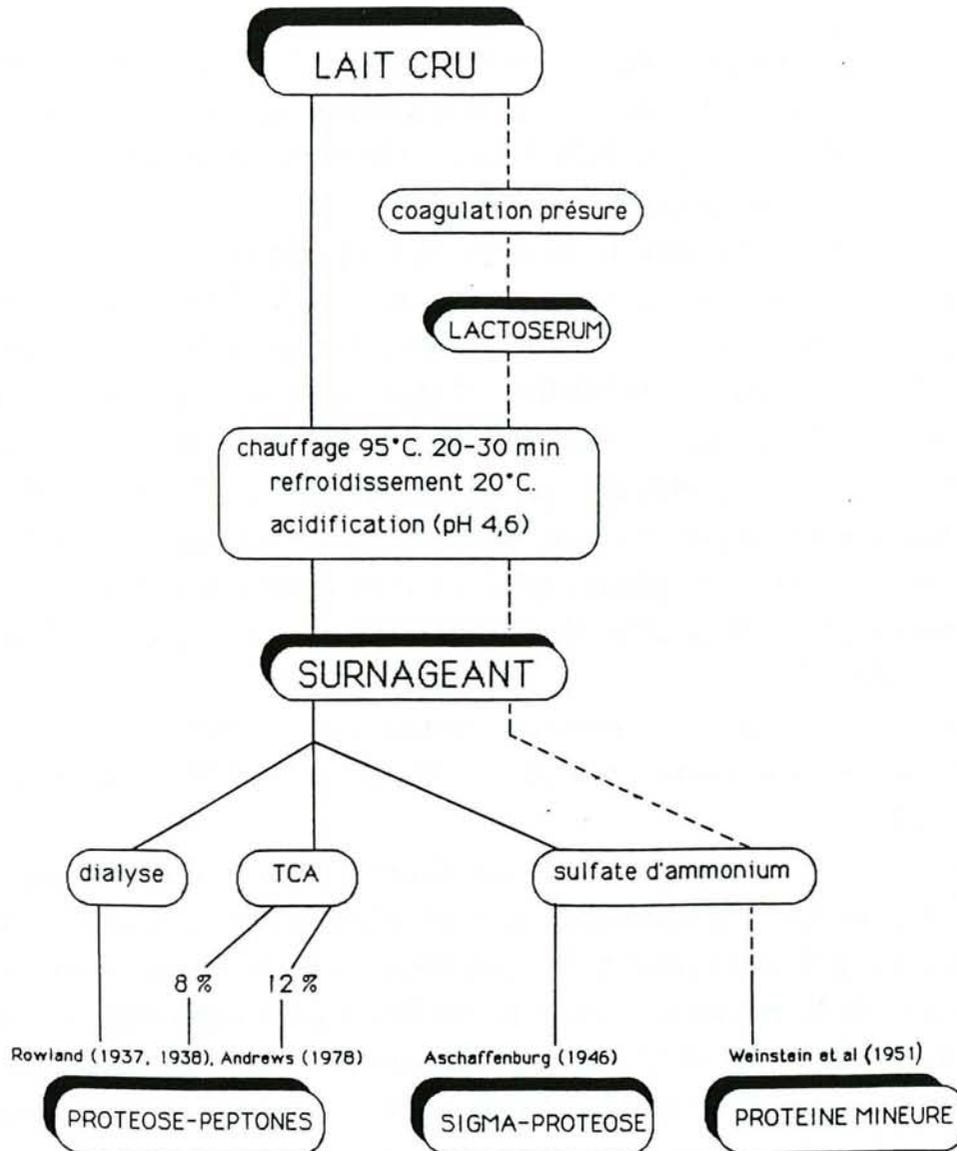
Quelques années plus tard, la fraction sigma-protéose aux propriétés tensio-actives intéressantes, responsable du moussage du lait (ASCHAFFENBURG, 1946), et la fraction "protéine mineure" photosensible, responsable de la modification indésirable de la flaveur du lait (WEINSTEIN *et al*, 1951) ont fait l'objet d'une étude comparative par BRUNNER et THOMSON (1961). Ces deux fractions présentent une grande similitude avec les protéose-peptones isolées par ROWLAND (1938) (figure 1). Cette similitude est marquée par une faible proportion d'azote (10 à 14%), un taux relativement important de phosphore (0,6 à 1,1%) et la présence d'hexose et d'acide N-acétylneuraminique. Les profils électrophorétiques sont également similaires (PAQUET et ALAIS, 1982).

L'extraction de la fraction protéose-peptones sans traitement thermique a également été mise en pratique (KOLAR et BRUNNER, 1969 ; NG *et al*, 1970 ; NEJJAR *et al*, 1990).

La teneur en protéose-peptones du lait dépend des méthodes employées ; elle varie de 0,5 à 3 g/l de lait selon plusieurs auteurs répertoriés par PAQUET (1989). La teneur peut varier également selon l'état génétique ou physiologique de l'animal. En fonction du stade de lactation, elle diminue au début pour augmenter en milieu de lactation (HAGRASS *et al*, 1983). Elle est supérieure dans les laits contenant le génotype BB de la  $\beta$ -lactoglobuline (SCHAAR, 1985). La teneur en protéose-peptones s'accroît dans le lait des animaux atteints de mammite (RANDOLPH *et al*, 1974) ainsi que dans les laits contaminés par les bactéries psychrotrophes (PAQUET *et al*, 1987).

La plupart des 38 bandes observées sur le profil électrophorétique en gel de polyacrylamide des protéose-peptones est retrouvée sur le profil d'un hydrolysât obtenu *in vitro* par action de la plasmine sur les caséines  $\alpha_s$  et  $\beta$  (ANDREWS et ALICHANIDIS, 1983).

LARSON et ROLLERI (1955) ont montré l'existence de quatre composants majeurs appelés PP3, PP5, PP8s (*slow*) et PP8f (*fast*) en fonction de leur mobilité électrophorétique. Ils peuvent être regroupés en deux classes en fonction de leur origine (PAQUET, 1989) : d'une part les produits d'hydrolyse qui comprennent les composants-5, 8s et 8f ainsi que de nombreux polypeptides résultant de l'hydrolyse



**Figure 1.** Protocoles de préparation de la fraction protéose-peptones (d'après PAQUET, 1989).

des caséines par la plasmine et d'autre part les polypeptides à caractères hydrophobe et glycoprotéique formant le composant-3.

En plus de ces composants, et malgré l'intensité du traitement thermique appliqué au lait pour extraire la fraction protéose-peptones, on peut retrouver à l'état soluble, après acidification à pH 4,6, des traces de  $\beta$ -lactoglobuline,  $\alpha$ -lactalbumine et de caséines  $\alpha_s$  et  $\beta$  (ANDREWS et ALICHANIDIS, 1983) ou des traces de sérumalbumine (NEJJAR *et al*, 1986).

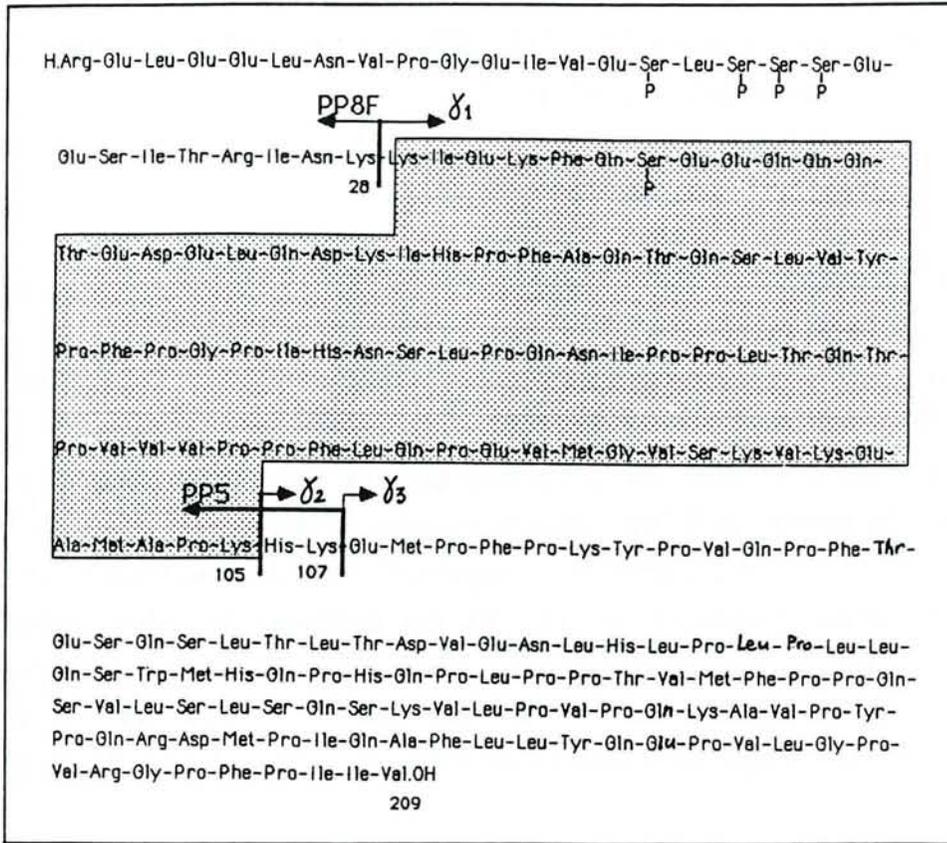
### 1.1- Les composants-5, 8f et 8s.

KOLAR et BRUNNER (1970) montrent que le PP5 présente en électrophorèse en gel d'amidon en présence d'urée deux bandes très rapprochées, correspondant à une phosphoglycoprotéine de masse moléculaire comprise entre 11 500 et 14 300 Da. ANDREWS (1979) montre cependant que cette molécule ne possède pas de groupement glycanique. Elle ne présente pas la coloration spécifique des glycoprotéines par le réactif de Schiff après oxydation à l'acide periodique (KESTER et BRUNNER, 1982 ; PAQUET, 1986). Sa composition est riche en proline et pauvre en acides aminés aromatiques et la cystéine est absente. De plus, l'étude des séquences N- et C-terminales (ANDREWS, 1978a) permet de penser que cette protéine est identique aux fragments N-terminaux 1-105 et 1-107 de la caséine  $\beta$  (les fragments C-terminaux complémentaires sont respectivement les caséines  $\gamma_2$  et  $\gamma_3$ ) (figure 2).

Cette hypothèse est confirmée par EIGEL (1981) qui a hydrolysé la caséine  $\beta$  par la plasmine bovine et obtient un polypeptide possédant les mêmes caractéristiques électrophorétiques que le PP5. Le comité sur la nomenclature et la méthodologie des protéines du lait (EIGEL *et al*, 1984) a proposé le terme  $\beta$ -CN-5P pour nommer PP5, signifiant "fragment de la caséine  $\beta$  possédant cinq phosphates".

Les composants-8s et 8f ont respectivement des masses moléculaires voisines de 9 000 Da (KOLAR et BRUNNER, 1970 ; EIGEL et KEENAN, 1979) et de 4 000 Da (KOLAR et BRUNNER, 1970 ; ANDREWS, 1979). Ils proviennent, comme le PP5, de l'hydrolyse plasminique de la caséine  $\beta$  (ANDREWS, 1978b), dont PP8f est identique au fragment N-terminal 1-28. Il est dénommé  $\beta$ -CN-4P par EIGEL *et al* (1984).

Selon EIGEL et KEENAN (1979), le PP8s correspond aux fragments 29-105 et 29-107 de la caséine  $\beta$ . Cependant, ce résultat est contesté par ANDREWS et ALICHANIDIS (1983) qui, par hydrolyse *in vitro* de la caséine  $\beta$  ou du PP5, ne détectent pas, dans l'image électrophorétique de l'hydrolysate, le PP8s qui est censé avoir une mobilité relative légèrement supérieure au PP5. Mais, l'un des produits



**Figure 2.** Protéolyse de la caséine  $\beta$  A1 par la plasmine. PP8F correspond au fragment  $\beta$ -CN-4P (f1-28) et PP5 au fragment  $\beta$ -CN-5P (f28-105 ou 28-107). Les peptides C-terminaux complémentaires correspondent aux caséines  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  et  $\gamma_3$ . La zone grisée correspond au fragment  $\beta$ -CN-1P (f28-105 ou 28-107) (d'après PAQUET, 1989).

de l'hydrolysate, isolé par chromatographie sur colonne DE-52, a une masse moléculaire comprise entre 8 000 et 8 900 Da et présente un aminogramme similaire à celui du peptide 29-105 de la caséine  $\beta$ . Ce peptide a, selon ANDREWS et ALICHANIDIS (1983), une mobilité électrophorétique plus lente que le PP5, mais sa localisation exacte sur un gel de polyacrylamide n'est pas pour l'heure déterminée. Ainsi, le PP8s et le peptide 29-105, dénommé alors  $\beta$ -CN-1P (EIGEL *et al*, 1984) sont deux entités distinctes (figure 3).

Ces peptides principaux possèdent quelques propriétés fonctionnelles. Ainsi, les composants-8f et 8s sont susceptibles de provoquer la précipitation des caséines dans les boissons à base de lait fermenté, alors qu'au contraire le composant-3 a un effet stabilisant (TAKAMIZAWA *et al*, 1978). Le composant-5 et peut-être les composants 8f et 8s ont un effet dépressur sur le volume du pain (JENNESS, 1959). Selon VOLPE et ZABIK (1975), ces peptides relierait entre elles les molécules du gluten par des ponts hydrogènes ou hydrophobes. En comprimant ainsi la structure réticulée de la pâte, elles provoqueraient la perte du volume.

Il est à noter que le composant-5 pourrait être un allergène potentiel responsable de l'allergie au lait (PAQUET, 1989), car il contient une grande partie des sites antigéniques de la caséine  $\beta$  principalement localisés dans la région N-terminale de la protéine (OTANI *et al*, 1987).

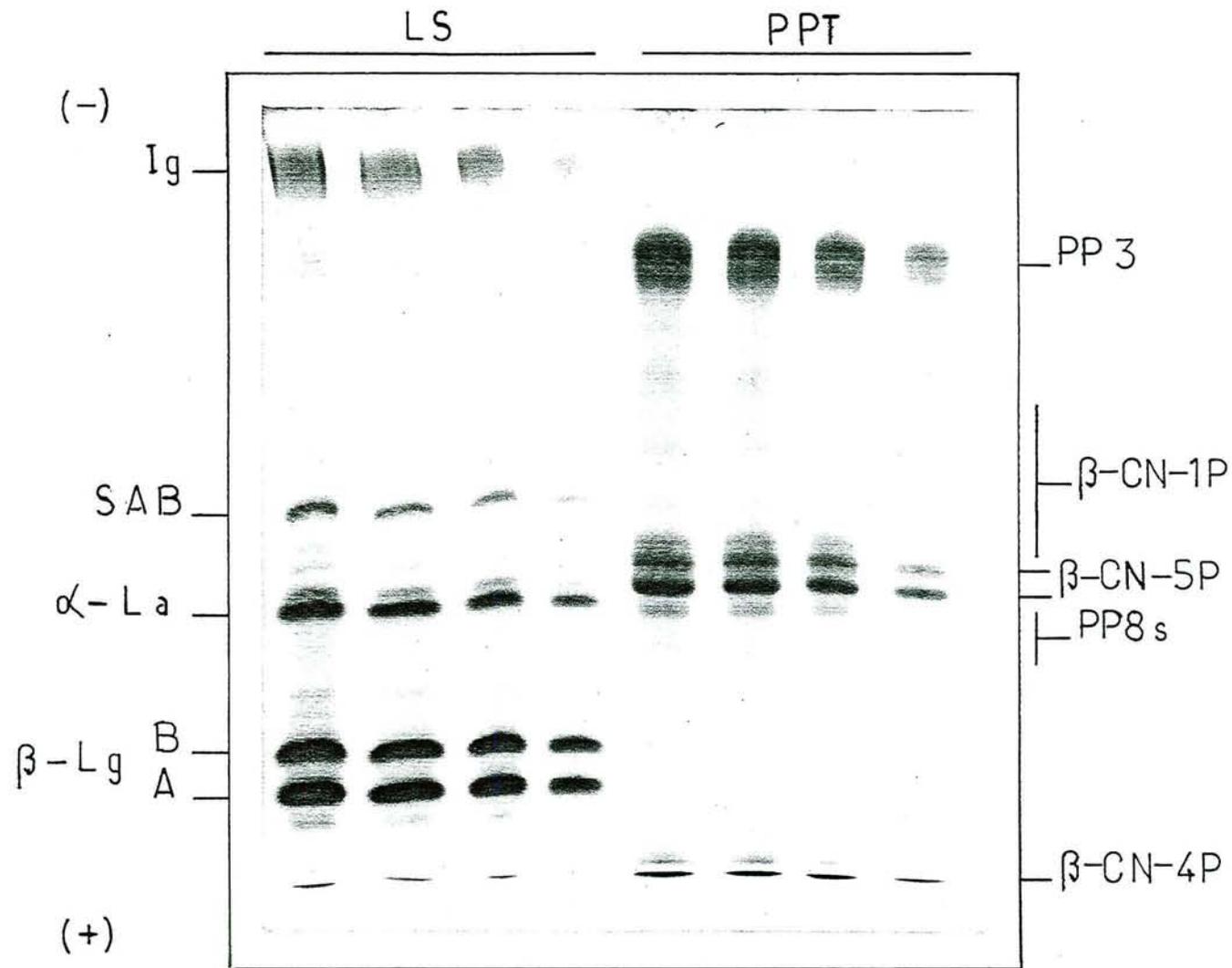
Dans la suite de nos travaux, nous utiliserons la nomenclature proposée par EIGEL *et al* (1984) pour dénommer les principaux peptides issus de l'hydrolyse de la caséine  $\beta$ .

## 1.2- Le composant-3.

### 1.2.1- Connaissances jusqu'en 1989.

Le composant-3 est présent uniquement dans le lactosérum (KOLAR et BRUNNER, 1970 ; ANDREWS et ALICHANIDIS, 1983). C'est une fraction protéique hétérogène caractérisée par une faible concentration en acides aminés aromatiques et soufrés, mais par une proportion élevée de glucides de 17,3% (NG *et al*, 1970 ; KESTER et BRUNNER, 1982 ; PAQUET et ALAIS, 1982 ; PAQUET, 1986). On note également la présence de 1,1% de phosphore (PAQUET et ALAIS, 1982).

La masse moléculaire minimale du composant-3, calculée à partir de la composition en acides aminés, avec la tyrosine comme acide aminé limitant, est de 22 kDa (NG *et al*, 1970). Cependant, selon ces auteurs, le composant-3 forme des complexes de masses moléculaires apparentes de 163 kDa (ultracentrifugation en tampon véronal à pH 8,6). L'association diminue fortement en présence de guanidine 5 M et la masse moléculaire devient 40 kDa. Par la suite, KESTER et



**Figure 3.** PAGE-native des protéines majeures du lactosera (LS) et des protéose-peptones totales (PPT). On note la différence entre  $\beta$ -CN-1P et PP8s.

Ig : immunoglobulines ; SAB : serumalbumine bovine ;  $\alpha$ -La :  $\alpha$ -lactalbumine ;  $\beta$ -Lg B et A :  $\beta$ -lactoglobuline B et A ;  $\beta$ -CN-XP : fragment de la caséine  $\beta$  contenant X phosphosérines.

BRUNNER (1982) révèlent, par électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) en présence de sodium dodécylsulfate (SDS), deux zones principales de 18 à 21 kDa et de 24,6 à 33,4 kDa pour la fraction glycoprotéique des protéose-peptones.

Après séparation des protéose-peptones totales (PPT) par chromatographie d'interactions hydrophobes, l'extraction de la fraction hydrophobe montre que le composant-3 représente environ 25% des PPT éluées (PAQUET *et al*, 1985). L'électrofocalisation de la fraction hydrophobe dans un gradient de pH de 2,5 à 10 présente de nombreuses bandes entre pH 3 et 6 (PAQUET, 1989).

Les travaux d'immunochimie réalisés sur des préparations enrichies en composant-3 mettent en évidence une identité antigénique entre le composant-3 et les protéines des membranes des globules gras (KANNO et YAMAUCHI, 1978 ; KANNO et OHTAKE, 1981 ; KESTER et BRUNNER, 1982 ; NEJJAR *et al*, 1986). L'ensemble de ces résultats permet de formuler plusieurs hypothèses concernant l'origine du composant-3. Nous citons PAQUET (1989) :

- "- fragments protéiques de la membrane des cellules sécrétrices constituant l'enveloppe des globules gras au moment de l'excrétion dans le lumen ;
- protéines du réticulum endoplasmique enveloppant les gouttelettes lipidiques au cours de leur migration vers le pôle apical de la cellule sécrétrice ;
- protéines synthétisées dans le sang et traversant les cellules de la glande mammaire.

Vu sa nature hétérogène, l'origine du composant-3 pourrait correspondre à une ou plusieurs de ces hypothèses."

Cependant, la dernière hypothèse est controversée. Formulée suite aux travaux de BEZKOROVAINY (1967), qui a isolé du lait de vache la glycoprotéine M1 originaire du sérum sanguin, l'hypothèse a été discutée par KANNO et OHTAKE (1981), car le composant-3 ne présentait pas de réaction antigénique avec un antisérum sanguin bovin.

La fraction hydrophobe présente des propriétés fonctionnelles et biologiques intéressantes. Elle possède un pouvoir tensio-actif supérieur à celui de la fraction PPT (PAQUET, 1986) et serait donc fortement impliquée dans les propriétés moussantes des protéose-peptones, comparables à celles du blanc d'oeuf (JELEN, 1973). Les PPT inhibent la lipolyse spontanée dans le lait de vache (ANDERSON, 1981) et dans le lait de chèvre (CHILLIARD *et al*, 1984) et ce rôle semble être attribué au composant-3 (PAQUET, 1986). De même, la fraction glycoprotéique soluble isolée de la membrane des globules gras inhibe la lipolyse dans le lait (SHIMIZU *et al*, 1982). Ce résultat rejoint l'hypothèse de l'origine membranaire du composant-3.

Au contraire, des préparations riches en composant-5, comme la fraction non hydrophobe des protéose-peptones non retenue dans une colonne Phényl-Sepharose,

**Tableau 1 : Modes de préparation de fractions contenant le composant-3 en fonction de ses propriétés physico-chimiques et chimiques**

Auteurs	Propriétés physico-chimiques du composant-3	Principe de préparation	Nom donné aux fractions purifiées
NG <i>et al</i> (1970)	Différence de solubilité entre le composant-3 et les hydrolysats de caséine	Relargages successifs au sulfate d'ammonium jusqu'à 55% de saturation et électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide	Composant-3
KESTER <i>et</i> BRUNNER (1982)	Nature glycoprotéique	Chromatographie d'affinité sur concanavaleine A	"PP-glycoprotein fraction"
PAQUET <i>et al</i> (1988)	- Propriété hydrophobe - Nature phosphoprotéique	- Chromatographie d'interactions hydrophobes sur Phényl-Sepharose - Chromatographie d'adsorption sur hydroxyapatite	FHPP (fraction hydrophobe des protéose-peptones)
NEJJAR <i>et al</i> (1990)	- Différence de solubilité - Nature phosphoprotéique	- A partir d'un lait non chauffé - Relargages successifs au sulfate d'ammonium - Chromatographie d'adsorption sur hydroxyapatite	-
KANNO (1989a)	Réactivité contre les anticorps antiglycoprotéines des membranes des globules gras	Chromatographies successives d'échange d'ions (DEAE-cellulose à pH 7,7), de filtration sur gel (Sephadex G-100 puis Bio-Gel A15m) et encore d'échange d'ions (DEAE-cellulose à pH 8,6)	Lactophorine

ont une action stimulante sur la lipolyse spontanée (CARTIER et CHILLIARD, 1986 ; PAQUET, 1986).

### 1.2.2- Les connaissances récentes.

Le tableau 1 résume les différents modes de préparation du composant-3 en fonction de ses propriétés physico-chimiques.

Récemment, le composant-3 a été isolé par chromatographie d'interactions hydrophobes et d'hydroxyapatite, soit à partir d'un lait chauffé (PAQUET *et al*, 1988) soit à partir d'un lait non chauffé (NEJJAR *et al*, 1990). Ces auteurs ont caractérisé le composant-3 par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS. Ils ont montré que cette molécule est composée de trois sous-unités principales :

- une glycoprotéine de masse moléculaire de 30 kDa ;
- une glycoprotéine hautement hydrophobe de 18 kDa ;
- un polypeptide hydrophobe de 7 kDa, apparemment non glycosylé.

Le composant-3, formé par agrégation possible de ces sous-unités, possède des propriétés très hydrophobes, qu'il soit extrait d'un lait chauffé ou non chauffé. Ceci montre que ces propriétés ne sont pas induites par un traitement thermique, mais qu'elles sont bien inhérentes au composant-3 natif.

KANNO (1989a) utilise la réactivité du composant-3 vis à vis des anticorps antiglycoprotéines de membranes de globules gras (MGG) pour purifier, à partir d'une fraction enrichie en composant-3 (préparée selon NG *et al*, 1970), une molécule réagissant avec les anticorps, qu'il baptise "lactophorine". Bien que l'auteur ne précise pas l'origine de ce nom, nous pensons qu'il a été attribué après comparaison avec les glycophorines du sang, dont la racine grecque de ce nom signifie "porteur ou transporteur de glucides".

La glycophorine A est le constituant majeur de la membrane des érythrocytes humains (TOMITA *et al*, 1978 ; PELMONT, 1989). La protéine humaine renferme une seule chaîne de 131 acides aminés (31 kDa), dont une partie établit une hélice très hydrophobe qui présente une affinité pour les phospholipides et le cholestérol (TAMPE *et al*, 1989 ; ARVINTE *et al*, 1989). Cette séquence de 20 à 25 acides aminés traverse en grande partie la membrane. La région externe N-terminale est fortement glycosylée et contient 15 liaisons O-glycosidiques et une liaison N-glycosidique. Les chaînes glycaniques possèdent des acides sialiques terminaux. La protéine porte les déterminants antigéniques ABO et MN des groupes sanguins. L'auteur a sans doute réalisé un rapprochement entre la glycophorine et la lactophorine du fait des similitudes observées entre les deux molécules concernant leur nature glycoprotéique et hydrophobe, leur origine membranaire, sans oublier

leur masse moléculaire voisine (28,6 kDa pour la sous-unité principale de la lactophorine et 31 kDa pour la glycophorine) et la présence d'acide sialique dans les deux cas.

La lactophorine se divise en sept formes ayant des groupes antigéniques communs dirigés contre les anticorps antiglycoprotéines des MGG mais qui possèdent des mobilités différentes en immunoélectrophorèse (KANNO, 1989a). Par PAGE-SDS, deux composés majeurs ont des masses moléculaires comprises entre 18 et 21 kDa et entre 25 et 33 kDa (KANNO, 1989b). Ce résultat rejoint ceux de KESTER et BRUNNER (1982) et de NEJJAR *et al* (1990). Les compositions en acides aminés présentent quelques variations entre chacune des sept formes au niveau des résidus Thr, Gly, Ile, Lys et Arg. La lactophorine contient environ 18% de glucides. La teneur en acides sialiques varie d'une forme à l'autre. KANNO (1989b) émet l'hypothèse de la présence simultanée de liaisons N- et O-glycosidiques au niveau de la lactophorine, du fait de la richesse en mannose, N-acétylglucosamine ainsi qu'en N-acétylgalactosamine.

KANNO et OGAWA (1989a) montrent, qu'après incubation de lait écrémé non chauffé à 37°C pendant 6 jours, la lactophorine disparaît car elle n'est pas détectée par les anticorps antiglycoprotéines des MGG. Lorsque le lait écrémé est préalablement chauffé (95°C, 30 min), la teneur en lactophorine ne varie pas pendant la durée d'incubation. Les deux laits écrémés contiennent du chloroforme, du toluène de l'azide de sodium ainsi que de la pénicilline pour éviter la contamination microbienne. Ainsi, les auteurs concluent que la lactophorine est susceptible à l'hydrolyse par le système protéolytique endogène du lait.

Il avait déjà été montré que les protéose-peptones majeures ( $\beta$ -CN-5P et composant-3) étaient dégradées par les protéases des germes psychrotrophes du lait stocké au froid (PAQUET *et al*, 1987).

Une étude plus poussée de l'hydrolyse de la lactophorine par la plasmine ou la trypsine (KANNO et OGAWA, 1989b) tend à montrer que le polypeptide de 17 kDa serait un intermédiaire dans l'hydrolyse du polypeptide de 25 kDa par les protéases.

Récemment, les propriétés émulsifiantes des protéose-peptones ont été étudiées en les incubant avec de l'huile de soja et en émulsifiant le milieu au Polytron PT-20 (SHIMIZU *et al*, 1989). Les protéose-peptones présentent une activité émulsifiante et procurent une stabilité de l'émulsion supérieure à celle obtenue avec les protéines lactosériques totales. Après extraction des protéines adsorbées à la surface des gouttelettes d'huile, l'analyse par HPLC en phase inverse montre que c'est la sous-unité glycoprotéique de 30 kDa du composant-3, qui s'adsorbe préférentiellement à la surface lipidique.

Par ailleurs, les travaux récents de CARTIER *et al* (1990) mettent clairement en évidence l'action inhibitrice de la fraction hydrophobe des protéose-peptones (FHPP) contenant le composant-3 sur la lipolyse spontanée du lait et sur l'activité de la lipoprotéine lipase purifiée, hydrolysant une émulsion d'huile de soja (Intralipide). Le mécanisme de l'inhibition n'a cependant pas été étudié.

## 2- La fraction protéose-peptones du lait d'autres espèces.

Les connaissances des protéose-peptones d'autres espèces rapportées par la littérature sont succinctes. Dans le lait humain, la fraction protéose-peptones (2 g/l) contient 45% de glucides (BEZKOROVAINY *et al*, 1976). Elle contient quatre composants majeurs de masse moléculaire 13 kDa ( $\alpha$ -lactalbumine), 30 kDa (galactothermine), 70 et 100 kDa, dont les deux derniers sont de nature glycoprotéique. La fraction protéose-peptones du lait humain active la croissance de *Bifidobacterium bifidum* var. b, bactérie présente dans la flore intestinale du nourrisson.

Peu de travaux ont été réalisés sur les protéose-peptones des laits ovin et caprin (RAMOS *et al*, 1988 ; KHATOON et JOSHI, 1989 ; ALICHANIDIS et MICHAELIDOU, 1990 ; MATI *et al*, 1991). Par PAGE-SDS, les auteurs retrouvent les bandes caractéristiques du composant-3 avec des masses moléculaires de 18 et 28 kDa (MATI *et al*, 1991) et 15,2 ; 18,3 ; 23,5 et 25,3 kDa pour l'espèce ovine (ALICHANIDIS et MICHAELIDOU, 1990). Pour les trois espèces bovine, ovine et caprine, il existe une forte analogie de structure et de comportement :

- analogie électrophorétique avec cependant une plus faible mobilité de la bande correspondant au composant-3 chez la chèvre et la brebis ;
- analogie dans la composition en acides aminés bien que les FHPP des laits ovin et caprin aient des teneurs plus élevées en lysine et en sérine que les fractions homologues du lait de vache ;
- enfin, la FHPP du lait de chèvre est un peu plus riche en glucides (12%) que celle des laits de vache (9,5%) et brebis (10%) (MATI *et al*, 1991).

Les protéose-peptones du lait de buflesse semblent présenter également des analogies avec les protéose-peptones de lait bovin (RAM et JOSHI, 1989), puisque les auteurs distinguent les composants-3, 5 et 8 chez la buflesse. Ces trois composants semblent inhiber la lipolyse dans le lait de buflesse avec un effet plus fort pour le composant-3.

### 3- Objectifs du travail.

De cette étude bibliographique, il en ressort que le composant-3 est d'une grande complexité (hétérogénéité chimique et physico-chimique). De plus, son origine n'est pas encore élucidée de façon précise. Son rôle dans l'inhibition de la lipolyse du lait et des dérivés du lait peut devenir d'un grand intérêt technologique et économique.

Afin de valoriser ultérieurement ce produit dérivé de la transformation industrielle du lait, il nous paraît important de mieux appréhender la complexité du composant-3, elle-même dépendant du "passé" de ce composant (problème de l'origine). Il nous paraît également essentiel de déterminer le mécanisme de l'inhibition de la lipolyse par le composant-3 mise en évidence récemment.

Notre travail se divise en quatre parties :

-Mise au point d'un fractionnement des protéose-peptones par FPLC d'interactions hydrophobes et isolement de la fraction hydrophobe contenant le composant-3. Caractérisation chimique et physicochimique des fractions collectées et établissement d'une cartographie des composants majeurs des protéose-peptones par électrophorèse bidimensionnelle.

-Etude de la partie prosthétique glucidique du composant-3. Composition et structure glycanique et relation avec l'hétérogénéité du composant-3. Cette partie a été réalisée en collaboration avec B. CODDEVILLE, J.-M. WIERUSZESKI et le Professeur G. SPIK du Laboratoire de Chimie Biologique (Université-CNRS) à Villeneuve d'Ascq.

-Etude de l'origine membranaire du composant-3. Etude comparative des structures primaires d'un peptide isolé du composant-3 et des glycoprotéines des membranes de globules gras. Cette partie a été réalisée en collaboration avec P. ANGLADE et le Professeur B. RIBADEAU-DUMAS du Laboratoire de Biochimie de la Station de Technologies Laitières (INRA) à Jouy-en-Josas.

-Etude du mécanisme inhibiteur du composant-3 en systèmes modèles. Cette partie a été élaborée en collaboration avec le Professeur R. VERGER du Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire (CNRS) à Marseille.

**MATERIEL  
ET  
METHODES**

## 1- Matériel

- Unité d'électrophorèse verticale 2001 et horizontale Multiphor 2117, cryostat Multitemp II, alimentation Macrodrive 5 (*L.K.B., Bromma, Suède*);
- unité de transfert de gel Transphor TE 50 (*Hæfer Scientific Instruments, San Francisco, USA*) et membranes Immobilon-P (*Millipore Corporation, Bedford, USA*);
- unité d'électro-élution 1750 (*Isco, Lincoln, USA*);
- Système HPEC 230 A (*Applied Biosystems, Foster City, USA*);
- unité FPLC et colonnes MonoQ HR 5/5 et Superose 12 HR 10/30 (*Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suède*);
- unité HPLC L 6200, intégrateur D-2000, injecteur automatique 655 A-40, détecteur L-3000 et colonne LichroCart C18 (*Merck, Darmstadt, Allemagne*);
- Unité HPLC DIONEX-BIOLC et colonne Carbopax PA1 39686 (*Dionex, Sunnyvale, USA*);
- colonnes DeltaPack C4, 30 nm, TSK-Phenyl 5PW analytique (7,5 x 75 mm) et préparative (21,5 x 150 mm) (*Waters, Milford, USA*);
- séquenceur d'acides aminés 477 A (*Applied Biosystems, Foster City, USA*);
- analyseur d'acides aminés Biotronik LC 3000 (*Braun Sciencetec, Melsungen, Allemagne*);
- analyseur d'acides aminés Picotag (*Waters, Milford, USA*);
- système de chromatographie en phase gazeuse Girdel 300 (*Girdel, France*);
- spectromètre de résonance magnétique nucléaire HX 500 (*Bruker, Wissenbourg, France*);
- spectrofluorimètre RF 5000 et Spectrophotomètre UV 2100 (*Shimadzu, Kyoto, Japon*);
- système de dialyse-concentration Ultrafree CL 5 000 Da et système d'ultra-filtration Minitan avec membranes PTHK en polysulfone 100 kDa (*Millipore Corporation, Bedford, USA*);
- appareil pH-Stat Titralab (*Radiometer, Copenhagen, Danemark*);
- distillateur pour dosage d'azote Vapodest 3S (*Gerhardt, Bonn, Allemagne*);
- évaporateur Speed-Vac RC 1010 (*Jouan, Saint-Herblain, France*).

## 2-Réactifs

- Phases stationnaires pour chromatographie liquide : Bio-gel P2 et Chelex 100 (*Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA*), concanavaline A-Sepharose, Phenyl-Sepharose CL 4B et Séphadex G25 (*Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suède*);

- phase stationnaire pour chromatographie sur couche mince : Kieselgel 60 (*Merck, Darmstadt, Allemagne*) ;
- acrylamide et N,N'-méthylène bisacrylamide (*B.D.H. Chemicals, Poole, Grande-Bretagne*) ;
- ampholytes (*Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suède*) ;
- Bleu de Coomassie R250 et G250, acide 8-anilino-naphtalène-1-sulfonique (ANS) et méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (*Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Allemagne*) ;
- Réactif de Schiff (*Merck, Darmstadt, Allemagne*) ;
- $\alpha$ -naphtol (*Prolabo, Paris, France*) ;
- coffret de protéines étalons MW-SDS-70L, colipase de pancréas de porc, acides taurodéoxycholique, taurocholique et glycocholique, paranitrophénylacétate (PNPA), paranitrophénylbutyrate (PNPB) et tributyrine (*Sigma Chemical Compagny, Saint-Louis, USA*) ;
- lectines marquées à la peroxydase : concanavaleine A (ConA) de *Concanavalia ensiformis*, agglutinine de germe de blé (*Wheat Germ Agglutinin* ; WGA) de *Triticum vulgare* et agglutinine d'arachide (*Peanut Agglutinin* ; PNA) de *Arachis hypogaea* (*Sigma Chemical Compagny, Saint-Louis, USA*) ;
- enzymes : neuraminidase (E.C. 3.2.1.18.) de *Vibrio cholerae* (*Calbiochem, San Diego, USA*), neuraminidase immobilisée de *Clostridium perfringens*, type VI-A (*Sigma Chemical Compagny, Saint-Louis, USA*), pronase E (E.C. 3.4.24.4.) de *Streptomyces griseus* (*Merck, Darmstadt, Allemagne*) et lipase pancréatique porcine (LPP ; E.C. 3.1.1.3.) (*Bæhringer Mannheim France S.A., Meylan*).

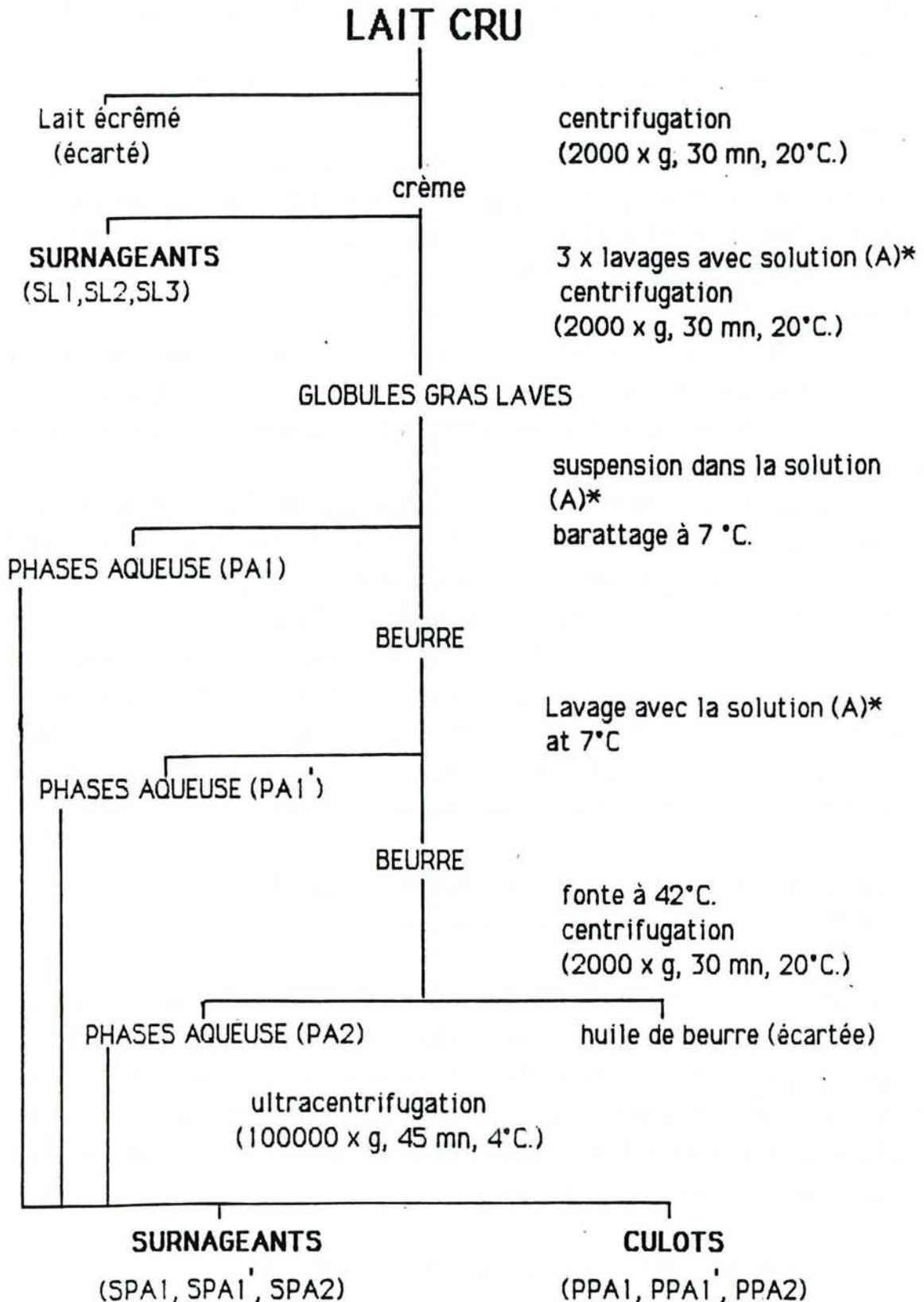
### **3- Préparation de fractions protéiques à partir de lait frais.**

#### **3.1- Préparation de protéines lactosériques.**

Le lait écrémé (provenant d'un troupeau de vaches Holstein) est acidifié à pH 4,6 avec HCl concentré. Le tout est centrifugé à 4 000 g pendant 45 min. Le surnageant est additionné de sulfate d'ammonium à 760 g/l pour flocculer les protéines. Le précipité, séparé par centrifugation à 4 000 g pendant 60 min, est lavé au sulfate d'ammonium à 760 g/l puis solubilisé dans l'eau pure. Après dialyse de 48 h, la solution est congelée et lyophilisée.

#### **3.2- Préparation des protéose-peptones totales (PPT).**

Les PPT sont préparées selon ASCHAFFENBURG (1946). Le lait écrémé est chauffé à 95°C pendant 30 min. Afin que la température soit homogène, le lait écrémé est réparti dans des tubes en verre plongés dans un bain d'huile. Après



\*(A): tampon TRIS-HCl 0,1 M, pH 7,2, MgCl<sub>2</sub>, saccharose 0,25 M.

**Figure 4.** Protocole d'isolement des membranes de globules gras (d'après PAQUET, 1986).

refroidissement à 20°C, le lait est acidifié à pH 4,6 avec HCl concentré pour précipiter les protéines dénaturées (protéines lactosériques majeures et caséines). Les PPT constituent alors la fraction protéique mineure du lait stable à 95°C, 30 min et après acidification à pH 4,6.

Elles sont floculées par le sulfate d'ammonium à 380 g/l. Le précipité, séparé par centrifugation à 4 000 pendant 60 min, est lavé au sulfate d'ammonium à 380 g/l puis solubilisé dans l'eau pure. Après dialyse de 48 h, la solution est congelée et lyophilisée. A partir de 5 l de lait frais entier, on obtient entre 4,5 et 5 g de PPT.

### **3.3- Préparation des protéines de membranes de globules gras.**

Pour l'extraction des membranes de globules gras (MGG), la méthode de MATHER *et al* (1977) complétée par PAQUET (1986) a été reprise. Parmi les nombreuses méthodes décrites dans la littérature (Mac PHERSON et KITCHEN, 1983), cette dernière a été choisie, car elle fait appel à une solution tamponnée isotonique comme milieu d'extraction ; ce milieu permet de minimiser les pertes en composants membranaires en conservant la stabilité des globules gras. Le protocole est représenté dans la figure 4.

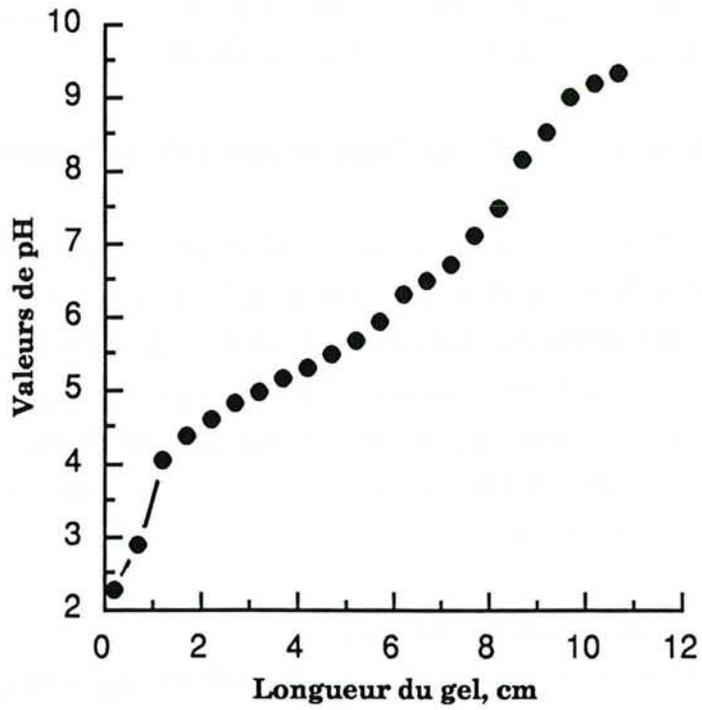
## **4-Electrophorèse et techniques attenantes.**

### **4.1- Electrophorèse en gel de polyacrylamide et en conditions natives (PAGE-native).**

La méthode de HILLIER (1976) a été adaptée par PAQUET (1986) à un système de plaques verticales avec un gel (T : 9,25% ; C : 3,84%) d'épaisseur 1,5 mm. Le tampon de gel est constitué de Tris-HCl 0,38 M, pH 8,9. Le tampon d'électrodes contient du Tris 0,005 M, de la glycine 0,07 M, pH 8,3. La migration électrophorétique est effectuée avec un courant de 60 mA, 30 W, 500 V pour un gel pendant 2 h 30 min environ. Les échantillons (2 mg/ml) sont dissous dans le tampon Tris-HCl 0,38 M, pH 8,9 contenant 10% (v/v) de glycérol et du bleu de bromophénol.

### **4.2- Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée 4 M (PAGE-urée).**

La méthode de NG-KWAI-HANG et KROECKER (1984) a été adaptée par SANOGO (1988) à un système de plaques verticales avec un gel (T : 8,2% ; C : 2,8%) en tampon Tris-HCl 0,075 M, pH 8,9, contenant 4 M d'urée. Le tampon d'électrodes et les conditions de migration sont identiques à ceux de la PAGE-native. Les



**Figure 5.** Mesure du gradient de pH dans le gel d'IEF.

échantillons (2 mg/ml) sont dissous dans le même mélange que celui de la PAGE-native mais contenant en plus 4 M d'urée.

#### **4.3- Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS 0,1% (PAGE-SDS).**

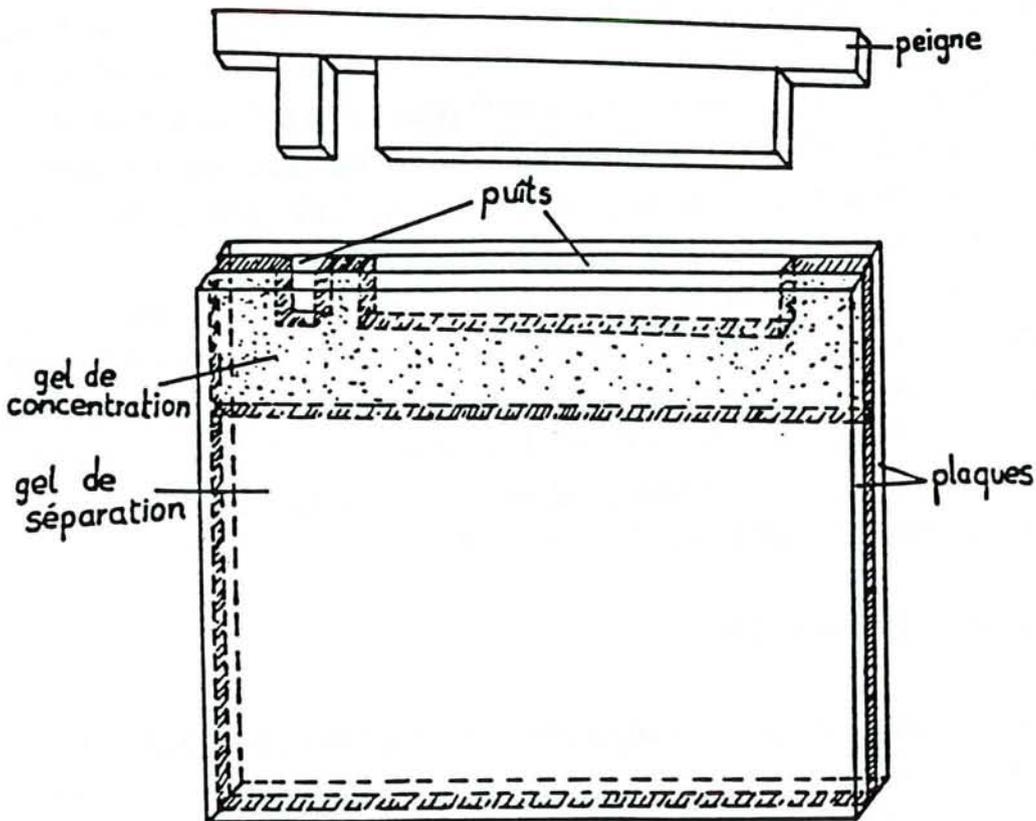
La méthode en tampons discontinus de LAEMMLI et FAVRE (1973) est utilisée. Le gel est formé d'un gel de séparation (T : 15,4% ; C : 2,7%) en tampon Tris-HCl 0,38 M, pH 8,8 contenant 0,1% (p/v) de sodium dodécylsulfate (SDS) et d'un gel de concentration (T : 4,9% ; C : 2,7%) en tampon Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 contenant 0,03% (p/v) de SDS. Les échantillons (2 mg/ml) sont dissous dans un tampon Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 contenant 2% (p/v) de SDS et 5% (v/v) de 2-mercaptoéthanol. Ils subissent un chauffage à 100°C pendant 3 min avant addition d'un cinquième de glycérol 50% (v/v) contenant du bleu de bromophénol. Le tampon d'électrodes contient du Tris 0,05 M, de la glycine 0,4 M et 0,1% (p/v) de SDS. Des conditions électriques de 60 mA, 500 V, 30 W sont appliquées par gel.

Les marqueurs de masses moléculaires sont issus soit d'un mélange de cytochrome C (12,3 kDa),  $\beta$ -lactoglobuline (18,8 kDa), anhydrase carbonique (29 kDa), ovalbumine (45 kDa) et sérumalbumine bovine (SAB ; 68 kDa), soit d'un mélange commercial prêt à l'emploi d' $\alpha$ -lactalbumine (14,2 kDa), inhibiteur trypsique (20,1 kDa), trypsinogène (24 kDa), anhydrase carbonique, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (36 kDa), ovalbumine et SAB.

#### **4.4- Isoélectrofocalisation (IEF).**

La méthode mise au point pour la séparation des caséines (SANOGO, 1988 ; SANOGO *et al*, 1990) a été utilisée pour nos fractions de protéose-peptones. Le gel horizontal est constitué de 25 ml d'une solution d'acrylamide (T : 5% ; C : 5%) contenant de l'urée 7 M, un mélange de Pharmalytes 3-10 ; 2,5-5 ; 4-6 à raison de 2% (v/v). Après dégazage, 3  $\mu$ l de TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine) et 40  $\mu$ l de persulfate d'ammonium à 10% (p/v) sont ajoutés. Le mélange est coulé entre deux plaques de verre séparées par un joint de 1 mm. Le gel est déposé sur une plaque horizontale de réfrigération (4°C). Les électrodes de papiers imbibées d'éthanolamine 0,66 M (cathode) et de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,36 M (anode) sont mises en place.

Après 1 h de préfocalisation à 0,35 W/cm<sup>3</sup> de gel, les échantillons (4 mg/ml), solubilisés dans une solution d'urée 7 M et de 2-mercaptoéthanol 5% (v/v), sont déposés du côté de l'anode et la focalisation est réalisée pendant 3 h.



**Figure 6.** Système de préparation du gel de polyacrylamide pour la deuxième dimension (PAGE-2D). Le peigne spécial permet l'incorporation de la bande de gel d'IEF au niveau du gel de concentration (d'après SANOGO, 1988).

Afin de déterminer la zone des points isoélectriques apparents (pHi) des différentes protéines, 22 morceaux de gel de dimensions 1 cm x 0,5 cm sont découpés sur toute la largeur du gel, puis mis en suspension par broyage dans des tubes contenant 0,5 ml de KCl 0,025 M. Après une heure de repos pour une bonne diffusion des Pharmalytes, le pH de chaque échantillon est mesuré au pH-mètre afin de déterminer la courbe du gradient de pH (figure 5).

#### 4.5- Electrophorèse bidimensionnelle (PAGE-2D).

La PAGE-2D est réalisée par combinaison des méthodes de séparation par IEF (première dimension) et par PAGE-SDS (deuxième dimension) selon la procédure de TRIEU-CUOT et GRIPON (1981). Le gel de PAGE-SDS est préparé comme décrit ci-dessus, mais un peigne dont la forme permet l'insertion de la bande de gel d'IEF est placé à la surface du gel de concentration avant polymérisation (figure 6).

Après l'IEF, une bande de gel de 1 cm de large est découpée et immergée quelques secondes dans une solution de Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 contenant du SDS 0,1% (p/v). La bande est ensuite placée au sommet du gel de concentration et scellée avec une solution d'agarose 1% (p/v) contenant 0,1% (p/v) de SDS. La deuxième dimension (PAGE-SDS) est ensuite réalisée.

#### 4.6- Révélation des gels d'électrophorèse.

Les gels issus des techniques PAGE-native, PAGE-urée, PAGE-SDS et PAGE-2D sont fixés dans l'acide trichloroacétique (TCA) à 12% (p/v) pendant 30 min, puis colorés pendant 1 h au Bleu de Coomassie R250 (ou G250) à 0,1% (p/v) dissous dans un mélange de méthanol 50% (v/v) et TCA 2% (p/v). La décoloration a lieu pendant une nuit dans une solution de méthanol 30% (v/v) et d'acide acétique 7,5% (v/v).

La révélation des gels d'IEF a nécessité une mise au point. En effet, la technique décrite par BLAKESLEY et BOEZI (1977) et habituellement utilisée pour ce type de gel (SANOGO *et al*, 1990) est faiblement résolutive pour révéler les glycoprotéines. Ainsi, nous avons utilisé la méthode suivante : Après IEF, le gel est lavé trois fois dans le TCA 12% (p/v) pendant 1 h puis immergé une nuit dans la solution de BLAKESLEY et BOEZI (1977), qui est composée de 100 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M, 11,1 ml de KOH 10 M et 15,15 ml de TCA 100% (p/v), mais qui est exempte, dans notre cas, de Bleu de Coomassie. Cette solution permet la diffusion des Pharmalytes pendant la nuit sans que le gel ne se fragilise et sans que certaines protéines ne se solubilisent, comme cela est le cas lorsque le gel est immergé une nuit dans le TCA

12% (p/v). Ensuite, le gel est coloré 5 min avec la solution d'ANDREWS (1981), qui contient le Bleu de Coomassie G250 à 0,25% (p/v) dissous dans le mélange TCA 12% (p/v) et méthanol 50% (v/v). Le gel est ensuite décoloré en 1 h avec la solution de décoloration classique.

La révélation des glycoprotéines par le réactif de Schiff se fait selon la méthode de KAPITANY et ZEBROWSKI (1973). Après oxydation des glycoprotéines (séparées par PAGE-SDS ou PAGE-2D) par l'acide periodique 1% (p/v) pendant 1 h, le gel est lavé 1 h par l'acide acétique 15% (v/v) puis révélé par le réactif de Schiff pendant 1 h, à l'obscurité et à 4°C. Après plusieurs lavages à l'acide acétique 7,5% (v/v), le gel est séché entre deux feuilles de Cellophane.

#### 4.7- Le transfert de protéines séparées par PAGE-2D (*Western-Blot*).

La technique de PAGE-2D, étant hautement résolutive, est d'un grand intérêt, car, associée à la technique de transfert des protéines du gel à la surface d'une membrane de PVDF, elle permet de corrélérer l'activité d'une protéine avec un spot particulier dans le gel. Dans notre étude, nous voulons étudier l'affinité des glycoprotéines vis-à-vis de certaines lectines.

Pour réaliser le transfert, la membrane Immobilon-P en PVDF est préalablement équilibrée dans les solutions suivantes : 2 sec dans le méthanol 100% (v/v), 2 min dans H<sub>2</sub>O et 10 min dans le tampon de transfert de TOWBIN *et al* (1979) contenant du Tris 0,025 M, de la glycine 0,192 M et du méthanol à 20% (v/v).

Après migration électrophorétique par PAGE-2D, le gel est équilibré 10 min dans le tampon de transfert puis disposé sur la membrane Immobilon-P en veillant à ce qu'il n'y ait pas de bulle d'air entre le gel et la membrane. L'ensemble est comprimé légèrement entre deux blocs de Scotch-Brite et le tout est placé dans une cuve verticale contenant le tampon de transfert. L'orientation du système est telle que le gel est disposé côté cathode et la membrane côté anode. La migration des spots du gel vers la membrane est réalisée sous un courant de 0,5 A pendant 7 h. La membrane est ensuite lavée 5 min dans H<sub>2</sub>O. Elle est ensuite soit utilisée pour l'étude de l'affinité aux lectines, soit révélée par le Bleu de Coomassie 0,1% (p/v) dissous dans le mélange méthanol 50% (v/v) et acide acétique 10% (v/v) pendant 5 min puis décolorée par le même mélange ne contenant pas le colorant (BENJAMIN *et al*, 1989).

#### 4.8- Révélation aux lectines couplées à la peroxydase.

Nous avons adapté la méthode décrite par MOROI et JUNG (1984) à notre étude. Nous avons notamment changé le substrat de la peroxydase pour utiliser l' $\alpha$ -naphthol, qui donne des produits de réaction stables permettant de conserver les membranes révélées en vue d'examen et comparaisons rétrospectives éventuelles (COSTA *et al*, 1987).

Les lectines utilisées (ConA, WGA, PNA) ont été classées selon leurs affinités pour les oligosaccharides (WU et HERP, 1985). Le protocole est variable selon le type de lectine. Les tampons utilisés sont les suivants :

- tampon 1 :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,01 M ; NaCl 0,14 M ; pH 7,4 avec 0,05% (v/v) de Tween 20 ;
- tampon 2 : Tris-HCl 0,05 M ; NaCl 0,2 M ; pH 7,4 ;
- tampon 3 :  $\text{CH}_3\text{COONa}$  0,1 M ; NaCl 0,14 M ;  $\text{CaCl}_2$  0,001 M ; SAB 0,5% (p/v) ; pH 5,6.

*Révélation avec ConA* : la membrane Immobilon-P est lavée quatre fois avec le tampon 1 puis incubée deux jours à température ambiante avec ConA (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) dans le tampon 1 contenant en plus de la SAB 0,5% (p/v),  $\text{MgCl}_2$  0,001 M et  $\text{CaCl}_2$  20  $\mu\text{M}$ . Ensuite, la membrane est lavée cinq fois avec le tampon 1 simple puis incubée 15 à 30 min avec la solution à l' $\alpha$ -naphthol préparée comme suit. L' $\alpha$ -naphthol est dissous à raison de 0,24% (p/v) final dans 100 ml de méthanol puis additionné de 500 ml de tampon 2 et de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 0,075% (v/v).

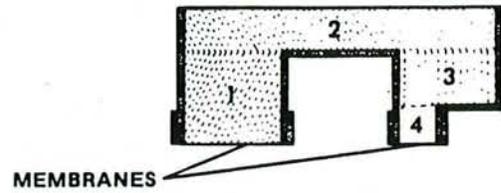
*Révélation avec PNA* : La membrane est lavée quatre fois avec le tampon 1 puis incubée avec la neuraminidase de *Vibrio cholerae* solubilisée dans le tampon 3 à raison de 0,3 unités/ml. Ce traitement permet d'éliminer les acides sialiques des glycoprotéines et d'amplifier la réaction d'affinité avec PNA. Après lavage quatre fois avec le tampon 1, la membrane est incubée deux jours à température ambiante avec PNA (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) dans le tampon 1 contenant la SAB 0,5% (p/v). La suite est identique à celle décrite pour ConA.

*Révélation avec WGA* : La membrane est lavée quatre fois avec le tampon 1 puis incubée 2 h à température ambiante avec WGA (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) dans le tampon 1 contenant la SAB 0,5% (p/v). La suite est identique à celle décrite pour ConA.

#### 4.9- Electroélution de protéines d'un gel de PAGE-SDS.

Cette technique préparative, décrite par ALLINGTON *et al* (1978), permet d'extraire du gel une protéine déterminée séparée par PAGE, en vue d'analyses ultérieures.

A



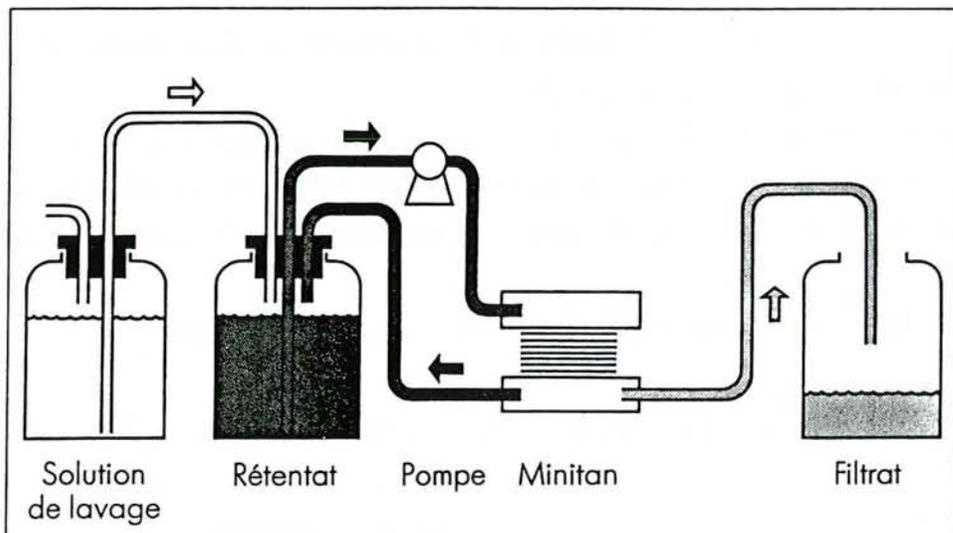
MEMBRANES

FRACTION 1		VOL = 3.1 ml	3		VOL = 1.7 ml
FRACTION 2		VOL = 5 ml	4		VOL = .2 ml

B



C



**Figure 7.** Systèmes à membranes de concentration d'échantillons protéiques.  
 A : système d'électroélution ; B : système Ultrafree ; C : système de diafiltration Minitan.

Dans un premier temps, on réalise une PAGE-SDS en apportant une modification au tampon d'électrodes (SHAGGER *et al*, 1988). La concentration en SDS passe de 0,1% (p/v) à 0,05% (p/v) dans le tampon d'électrodes supérieur (en contact avec la cathode). De plus, on y ajoute 25 mg/l de Bleu de Coomassie G250. Le tampon d'électrodes inférieur (en contact avec l'anode) reste inchangé. Ainsi, on visualise directement pendant la migration les bandes colorées légèrement par le Bleu de Coomassie. La diminution de la concentration en SDS permet de renforcer la fixation du colorant sur les protéines.

Dans un second temps, après la migration électrophorétique, des morceaux de gel contenant les bandes colorées sont découpés et disposés dans des cupules du système d'électroélution (figure 7 A).

La cupule est formée de quatre compartiments, les morceaux de gel étant déposés dans le compartiment 1. La cupule est déposée dans une cuve de telle façon que le courant chemine obligatoirement par la cupule, le compartiment 1 étant orienté côté cathode et le compartiment 4, côté anode. Le tampon d'électrodes est identique à celui utilisé en PAGE-SDS. L'électroélution a lieu à puissance constante de 3 W pendant 5 h. Le volume de 0,2 ml du compartiment 4 est récupéré quantitativement, après élimination des volumes des autres compartiments. Une électrophorèse de contrôle montre que seul le compartiment 4 contient des protéines après 5 h de migration. L'échantillon récupéré est ensuite dialysé, puis un dosage de protéines selon LOWRY *et al* (1951) est réalisé avant sa congélation.

#### **4.10- Electrophorèse micropréparative : HPEC (*High Performance Electrophoresis Chromatography*).**

L'appareillage HPEC a été récemment mis sur le marché et permet de préparer rapidement une centaine de microgrammes d'une protéine séparée dans un champ électrique. Le principe est le suivant : l'échantillon est déposé au sommet d'un gel de polyacrylamide en colonne et un champ électrique est appliqué. Les protéines séparées sont exclues du gel en sortie de colonne et entraînées par un tampon d'élution au travers d'un détecteur à 280 nm puis "divisées" en petites fractions dans un collecteur (figure 8). Alors que le mode de séparation est électrophorétique, le mode de collecte est identique à celui de la chromatographie liquide à haute performance, ce qui justifie le nom anglais de "*High Performance Electrophoresis Chromatography*" pour désigner ce type d'appareillage.

La colonne utilisée pour couler le gel d'acrylamide est longue soit de 5 cm, soit de 10 cm pour un diamètre identique de 2,5 mm. Le gel contient soit 5% (p/v) d'acrylamide, soit 10% (p/v) selon l'étude. Le tampon de gel Tris-HCl 0,38 M, pH 8,8

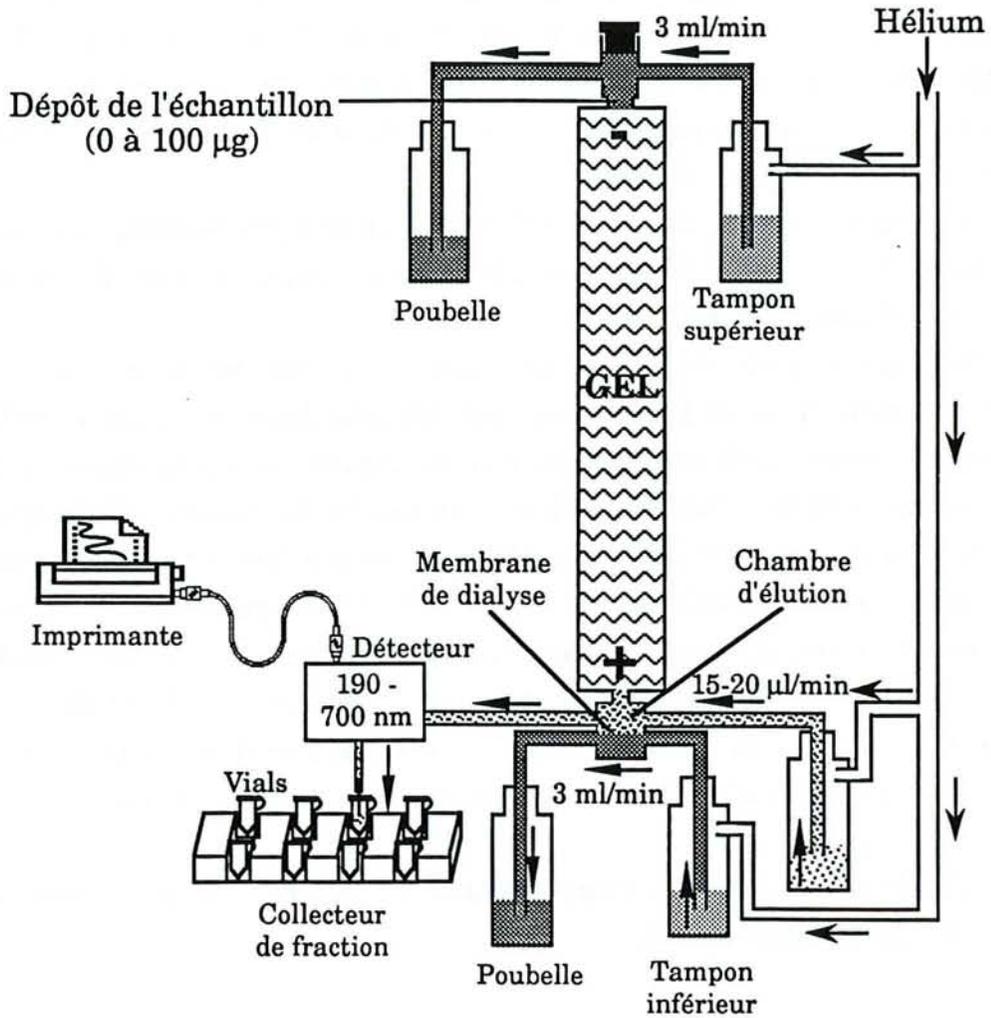


Figure 8. Schéma général de l'appareillage HPEC.

est presque identique au tampon de gel de séparation utilisé en PAGE-SDS, mais ne contient pas de SDS. Dans cette méthode, on ne coule pas de gel de concentration en haut de la colonne. Le tampon d'électrodes se divise en tampon supérieur (en contact avec la cathode), de composition identique au tampon d'électrodes utilisé en PAGE-SDS, et un tampon inférieur (en contact avec l'anode), contenant simplement du Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3. Le bas de la colonne est en contact avec le tampon d'élution, lui-même séparé du tampon inférieur par une membrane de dialyse. Le tampon d'élution est également le tampon Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3.

Les tampons supérieur et inférieur sont continuellement renouvelés pour éviter le phénomène d'électrolyse avec apparition de bulles d'hydrogène à la cathode et d'oxygène à l'anode et également pour garder constant le nombre de charges des tampons. Le débit appliqué est de 3 ml/min. Le débit du tampon d'élution, qui entraîne les protéines exclues du gel, doit être compris entre 15 et 20  $\mu$ l/min. Un débit plus faible ne permettrait pas d'entraîner les protéines alors plaquées sur la membrane de dialyse, car la force d'attraction électrique serait supérieure à la force du flux du tampon d'élution. Un débit supérieur diminuerait la résolution et augmenterait les volumes de collecte.

Une pré-électrophorèse est réalisée à ampérage constant (0,9 mA) et à 10°C après avoir déposé au sommet de la colonne un échantillon de bleu de bromophénol solubilisé dans le tampon Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contenant 3% (p/v) de SDS, 10% (v/v) de glycérol et 0,2% (v/v) de 2-mercaptoéthanol.

L'échantillon est alors déposé à raison de 0,5 mg de protéines environ. Il a été préalablement traité comme en PAGE-SDS ; cependant, lorsque la purification d'une protéine est suivie d'un séquençage d'acides aminés, l'échantillon n'est pas chauffé pour éviter de bloquer éventuellement le groupement aminé libre terminal. Le traitement thermique est alors remplacé par un traitement aux ultra-sons pendant 10 min.

La migration est réalisée à ampérage constant de 0,9 mA. Un même gel peut être utilisé trois à quatre fois ; au-delà, le voltage atteint la limite supérieure de 500 V et la résolution de la séparation est notablement diminuée.

#### **4.11- Traitement des composants purifiés par HPEC-SDS.**

Les fractions purifiées par HPEC-SDS destinées à l'étude de la composition molaire glycanique sont concentrées et dialysées par centrifugation au moyen du système Ultrafree contenant une membrane de cellulose à faible adsorption protéique de seuil de coupure 5 kDa (figure 7 B). Les fractions sont déposées dans le compartiment supérieur et, après centrifugation 10 min à 1 000 g, le filtrat est

éliminé. Cinq lavages successifs du rétentat par H<sub>2</sub>O sont réalisés de la même manière. Une aliquote du rétentat est ensuite prélevée afin d'effectuer un dosage de protéines selon LOWRY *et al* (1951). Le reste est lyophilisé. Nous avons montré par ailleurs que les membranes de seuil de coupure 10 kDa laissent passer dans le filtrat une petite proportion de protéose-peptones. Avec les membranes à 5 kDa, ce problème était évité. Les valeurs de seuil de coupure données par le fabricant ne sont en fait qu'une indication approchée de la sélectivité des membranes.

Les fractions purifiées par HPEC-SDS destinées à un séquençage d'acides aminés sont décontaminées par HPLC en phase inverse (présence de traces résiduelles de Tris, SDS, glycine, ...). Le système d'éluion est composé d'un mélange A contenant H<sub>2</sub>O + TFA 0,1% (v/v) (acide trifluoroacétique) et d'un mélange B acétonitrile + TFA 0,1% (v/v). La fraction protéique purifiée par HPLC est collectée et séchée à 40°C sous vide avec un système Speed-Vac RC1010.

## **5- Chromatographie liquide.**

### **5.1- Chromatographie d'interactions hydrophobes.**

La méthode de PAQUET *et al* (1988) est utilisée pour préparer, d'une part, la fraction non hydrophobe des protéose-peptones (FNHPP) et, d'autre part, la fraction hydrophobe des protéose-peptones (FHPP). Le support utilisé est le Phényl-Sepharose CL4B dans une colonne (2,6 x 20 cm) en tampon phosphate de sodium 0,01 M, pH 6,8. FHPP est adsorbée dans la colonne en présence de sulfate d'ammonium 0,35 M puis éluee après remplacement du sulfate d'ammonium par de l'éthylène glycol 50% (v/v). Le débit est de l'ordre de 35 ml/h et la durée du fractionnement de 10 h environ. La détection est réalisée à 280 nm.

### **5.2- FPLC d'interactions hydrophobes analytique et préparative (FPLC-IH).**

Le fractionnement est réalisé avec la colonne analytique TSK-Phényl 5PW (7,5 x 75 mm) ou avec la colonne préparative TSK-Phényl 5PW (21,5 x 150 mm). Cette technique a fait l'objet d'une mise au point qui est présentée dans le premier chapitre. La détection est réalisée à 280 nm.

Après fractionnement préparatif, les fractions collectées FB, FH1, FH2 sont concentrées d'un facteur 10 à l'évaporateur rotatif. Cependant, la fraction FA contenant 1 M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ne peut être concentrée, car elle cristallise rapidement. Nous avons mis au point un système de dialyse en continu, où la fraction FA est entraînée par une pompe péristaltique dans un boudin de dialyse immergé dans un grand volume d'eau pure. La fraction FA ainsi dialysée retourne ensuite dans son

réceptacle d'origine. Le débit de la pompe est ajusté afin d'avoir un temps renouvellement du volume de la fraction de 2 h. Après 10 h de dialyse continue en circuit fermé, FA peut être concentrée d'un facteur 10 et une nouvelle dialyse est réalisée comme pour les autres fractions.

### **5.3- FPLC et HPLC d'échange d'ions.**

FPLC (*Pharmacia*) : la colonne MonoQ est utilisée et la phase mobile est constituée du tampon Tris-HCl 0,02 M, pH 8 en présence ou non d'urée 4,5 M. Le gradient de force ionique est réalisé avec NaCl et croît linéairement de 0 à 0,35 M. Le débit appliqué est de 1 ml/min. La détection est réalisée à 280 nm.

HPLC (*Dionex*) : la séparation des oligosaccharides a lieu à pH élevé dans une colonne Carboxypax PA1 préparative et les constituants sont élués en gradient NaOH 0,1 M (A)/acétate de sodium 0,3 M dans NaOH 0,1 M (B). Le débit est de 1 ml/min et la détection est réalisée par ampérométrie en champs pulsée.

### **5.4- FPLC de filtration sur gel.**

La colonne Superose 12 est utilisée en conditions isocratiques avec le tampon Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 8 et un débit de 0,25 ml/min. L'étalonnage des masses moléculaires en fonction des temps de rétention a été réalisé avec les protéines suivantes : SAB (68 kDa), ovalbumine (45 kDa),  $\beta$ -lactoglobuline dimérique (36,6 kDa), anhydrase carbonique (29 kDa) et cytochrome C (12,3 kDa). Le bleu dextran permet d'évaluer le volume mort à 30 min. La détection est réalisée à 280 nm.

### **5.5- HPLC en phase inverse.**

La colonne Deltapack C4 est utilisée avec un gradient 20-55% d'acétonitrile en présence d'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1% (v/v). Le débit appliqué est de 1 ml/min et la détection est réalisée simultanément à 215 et 280 nm.

### **5.6- Chromatographie d'affinité sur concanavaleine A (ConA).**

La lectine ConA est fixée sur Sepharose. Environ 30 mg d'échantillon sont déposés au sommet de la colonne (1,5 x 15 cm) et les glycoprotéines ayant une affinité pour ConA sont retenues. La phase mobile contient de l'acétate de sodium 5 mM, pH 6,8 avec CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaCl 1 M et NaN<sub>3</sub>

0,02% (p/v). Certaines lectines, comme c'est le cas pour ConA, possèdent des sites de fixation d'ions métalliques et la présence de ces ions à une concentration de 1 mM permet d'induire une conformation propre de la lectine nécessaire à la reconnaissance spécifique des chaînes glycaniques (DULANEY, 1979 ; MONTREUIL *et al*, 1987). La force ionique élevée (NaCl 1 M) permet d'éviter les interactions non spécifiques . L'élution des fractions affines est réalisée en présence de méthyl- $\alpha$ -D-glucopyrannoside 0,5 M. Le débit appliqué est de 10 ml/h et la détection est réalisée à 280 nm.

### **5.7- Chromatographie de filtration sur gel sur Séphadex G-25.**

Les fractions collectées à la sortie de la chromatographie sur ConA sont dialysées, lyophilisées puis ressolubilisées dans un tampon Tris-HCl 0,02 M, pH 7 et déposées au sommet d'une colonne (3 x 53 cm) de Séphadex G-25. Cette étape chromatographique permet d'éliminer les traces de méthyl- $\alpha$ -D-glucopyrannoside, qui sont susceptibles d'interférer avec le dosage ultérieur des glycanes dans les fractions. Le débit est de 10 ml/h et la détection est réalisée à 280 nm. En sortie de colonne, les fractions exemptes d'ose méthylé sont dialysées pour éliminer les molécules de Tris puis lyophilisées.

### **5.8- Chromatographie de filtration sur gel sur Biogel P2.**

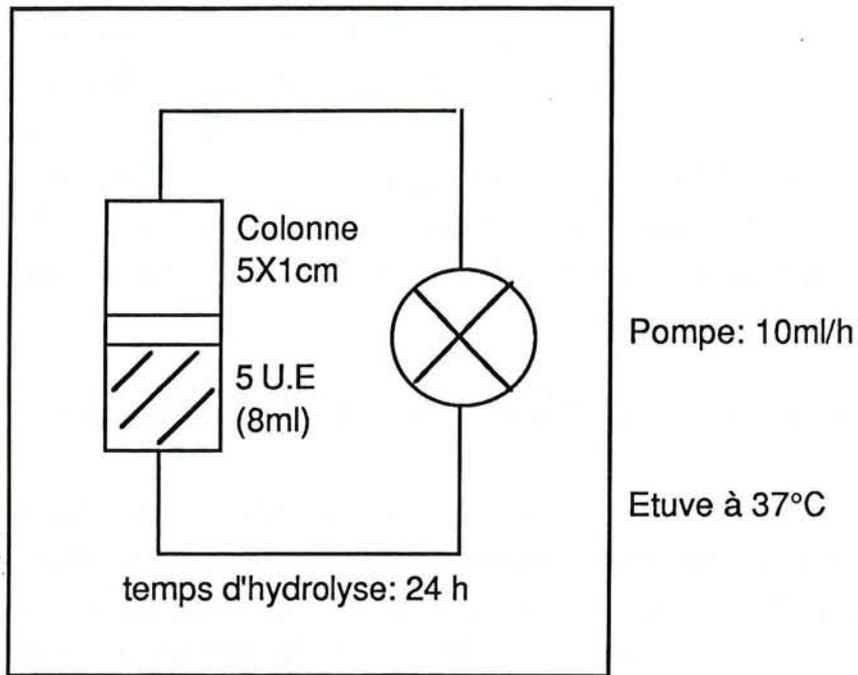
La porosité du support Biogel P2, constitué de polyacrylamide, permet de séparer les constituants dans une gamme de masses moléculaires de 100 à 1 800 Da. La phase mobile (H<sub>2</sub>O) traverse la colonne (1,6 x 65 cm) avec un débit de 5,4 ml/h et la détection est réalisée à 206 nm, afin de détecter les oligosaccharides.

### **5.9- Chromatographie chélatante sur Chelex 100.**

Afin d'éliminer les traces d'ions métalliques divalents contenues dans certaines fractions, ces dernières sont déposées sur une résine Chelex 100 chélatant les ions divalents lourds, et compactée dans une petite colonne (0,8 x 4 cm). La phase mobile est constituée par H<sub>2</sub>O.

## **6- Chromatographie en phase gazeuse (CPG).**

Une quantité de 1  $\mu$ l de solution contenant les glycanes triméthylsilylés extraits des fractions glycoprotéiques par microméthanolyse est injectée dans une colonne capillaire remplie de silicone OV 101 (0,2 mm de diamètre et 25 m de long).

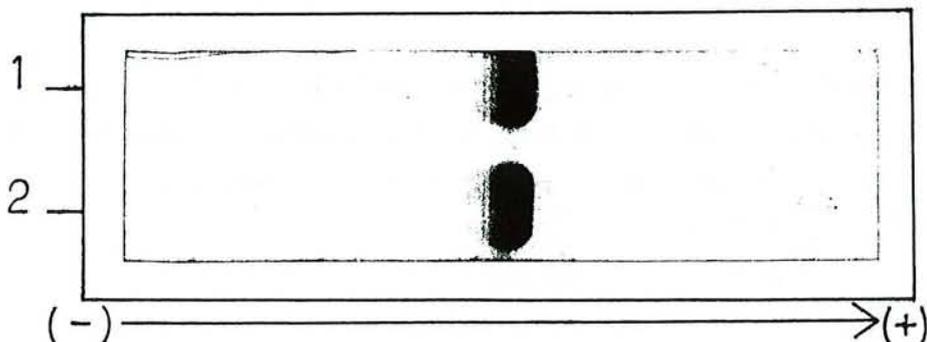


Enzyme : neuraminidase VI A (EC.3.2.1.18) immobilisée sur agarose (préparée à partir du *Clostridium perfringens*)

Substrat : FH1 = 10 mg

Tampon : citrate-phosphate 0,1M, pH 5,6.

Par chromatographie en phase gazeuse, on montre, qu'après 24h d'hydrolyse, on ne détecte plus d'acides sialiques.



**Figure 9.** Protocole expérimental de la désialylation enzymatique. Les profils de PAGE-SDS de la  $\beta$ -lactoglobuline (1) et de la  $\beta$ -lactoglobuline traitée par la neuraminidase (2) montrent qu'il n'y a pas de protéolyse pendant l'opération de désialylation.

La montée en température est programmée de 120 à 240°C à raison de 2°C/min et le débit du gaz vecteur (hélium) est de 1 ml/min. La pression d'entrée est de 0,6 bars. La détection est réalisée par ionisation de flamme.

## **7- Chromatographie sur couche mince (CCM).**

Les dépôts sont effectués sur le support Kieselgel 60. La migration est réalisée avec le solvant n-butanol/éthanol/H<sub>2</sub>O/acide acétique/pyridine dans le rapport 10/100/30/3/10 pendant 4 à 5 h. Après séchage de la couche mince, une deuxième migration du solvant est réalisée de la même manière.

Les oses neutres sont révélés par pulvérisation d'orcinol (3,5 dihydroxy toluol) à 0,2% (p/v) dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% (v/v), à 80°C pendant 5 min. Les acides aminés sont révélés à 80°C pendant 2 min par pulvérisation de ninhydrine (5 g dans 500 ml d'acétone additionné de 0,5 g d'acétate de cadmium préalablement dissous dans le mélange 25 ml d'acide acétique + 50 ml H<sub>2</sub>O).

## **8- Hydrolyses enzymatiques et chimiques et clivage par CNBr.**

### **8.1- Hydrolyse par la neuraminidase immobilisée sur agarose.**

La méthode décrite par CODDEVILLE *et al* (1989) est utilisée. Une quantité de 10 mg d'échantillon est solubilisée en tampon citrate 0,1 M, pH 5,5, contenant du NaN<sub>3</sub> 0,01% (p/v). La désialylation a lieu pendant 24 h, à 37°C en circuit fermé (débit de 10 ml/h). Les fractions collectées (environ 0,5 ml par fraction) qui absorbent à 280 nm sont rassemblées pour être dialysées et lyophilisées (figure 9).

Un témoin de  $\beta$ -lactoglobuline a été traité par la neuraminidase. La PAGE-SDS de contrôle montre qu'il n'y a pas de protéolyse pendant la réaction de désialylation.

### **8.2- Hydrolyse pronasique.**

La méthode utilisée est décrite par MONTREUIL *et al* (1987). La fraction affine pour ConA immobilisée (20,3 mg de protéines) est solubilisée dans 2 à 3 ml du tampon acétate de calcium 0,01 M, pH 8. La pronase E commerciale est ajoutée dans un rapport E/S (enzyme sur substrat) de 1/50, soit 0,4 mg de pronase. La réaction a lieu à 37°C. Au bout de 6 h environ, le pH est réajusté aux environs de 8 avec NaOH et 0,4 mg de pronase sont encore ajoutés. L'opération est répétée une nouvelle fois encore. Ensuite, la réaction est stoppée par acidification à l'acide acétique jusqu'à pH 4-5 et le milieu réactionnel est concentré à l'évaporateur rotatif. Neuf volumes

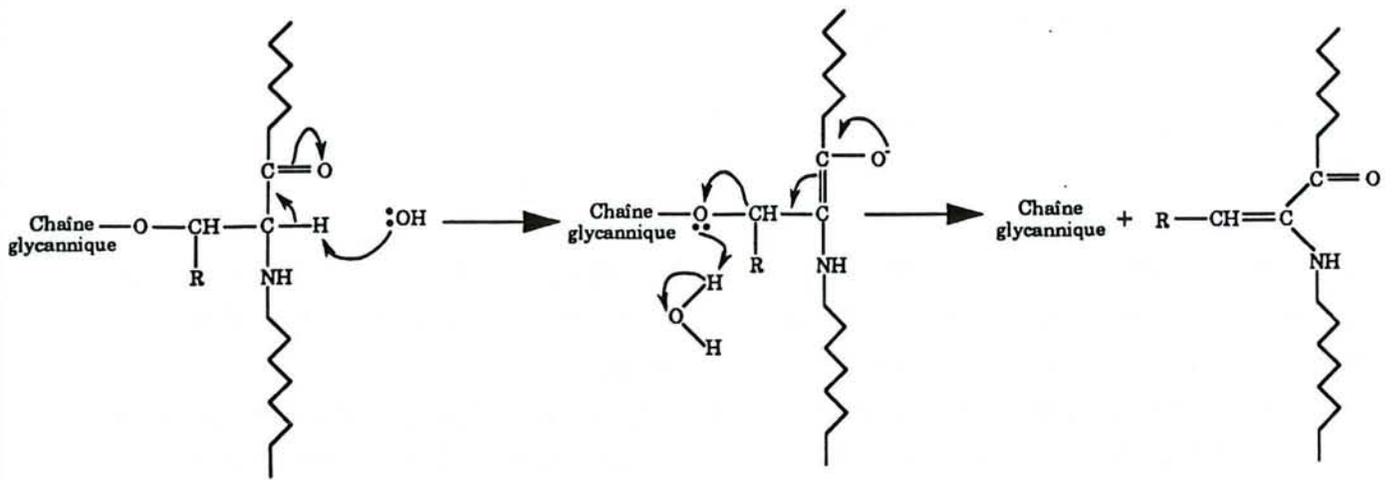


Figure 10 a.  $\beta$ -élimination en milieu alcalin réducteur et libération des chaînes O-glycosidiques (AMINOFF *et al*, 1980).

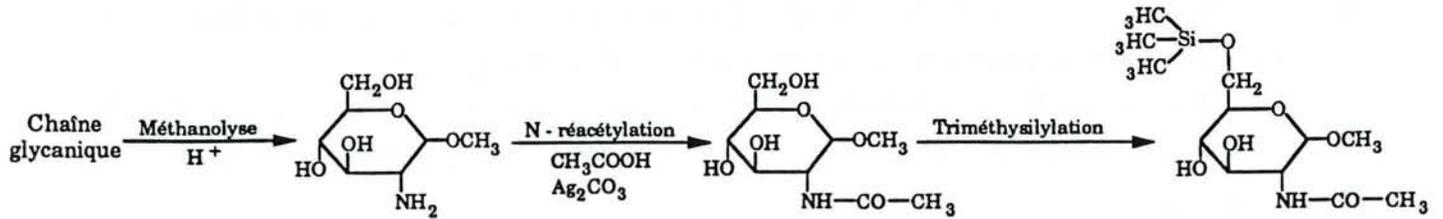


Figure 10 b. Microméthanolysse des chaînes glycaniques et silylation des unités libérées en vue de leur séparation par CPG (KAMERLING *et al*, 1975).

d'éthanol froid sont ajoutés. Au bout de 30 min, les glycopeptides précipités sont récupérés par centrifugation à 4 000 g pendant 5 min puis ressolubilisés dans 2 à 3 ml de tampon acétate de calcium 0,01 M, pH 8.

La pronase est ajoutée en trois étapes comme décrit ci-dessus pour un deuxième cycle d'hydrolyse. Après extraction des glycopeptides, un troisième cycle d'hydrolyse est encore réalisé. Finalement, les glycopeptides extraits sont dissous dans H<sub>2</sub>O puis du TCA 10% (p/v) est ajouté afin de précipiter la pronase contaminante. Après centrifugation et récupération du surnageant, le pH est remonté à 7 avec NaOH et la solution de glycopeptides est déposée directement sur une colonne de Biogel P2.

Une aliquote des fractions collectées est séparée par CCM. L'opération est réalisée en double afin de révéler les spots à l'orcinol et à la ninhydrine.

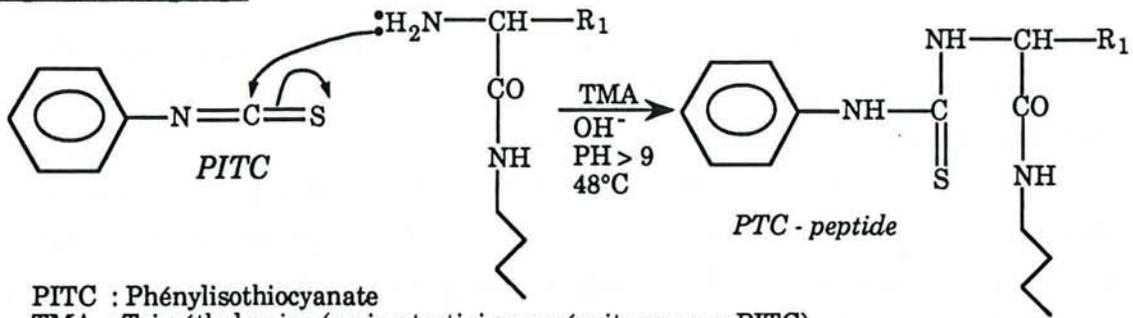
### 8.3- $\beta$ -élimination en milieu alcalin réducteur.

Cette technique, décrite par AMINOFF *et al* (1980), permet de cliver sélectivement les chaînes glycaniques O-glycosidiquement liés à la chaîne polypeptidique (figure 10 a). On peut donc doser séparément les glycannes impliqués dans ce type de liaison. La présence de BH<sub>4</sub>K permet de stabiliser l'extrémité réductrice des oligosaccharides alditols libérés et aussi d'éviter la formation de composés furanosiques (chromogène de Kuhn).

A 10 mg d'échantillon environ est ajouté 1 ml de solution BH<sub>4</sub>K 1 M/NaOH 0,1 M. La  $\beta$ -élimination est réalisée à 37°C pendant 48 h dans un ballon sur lequel un système de serpentins réfrigérant est adapté afin d'éviter l'évaporation. Au bout de 48 h, la réaction est arrêtée par addition d'acide acétique concentré en diminuant le pH à 5. Après 15 min de repos, la neutralisation est effectuée avec NaOH 0,1 M. Le mélange réactionnel est ensuite déposé directement sur une colonne de Biogel P2 afin de purifier les oligosaccharides alditols. Une aliquote des fractions collectées (1 ml par fraction) est séparée par CCM et les spots sont révélés à l'orcinol. Les fractions positives à l'orcinol sont réunies.

### 8.4- Micro-méthanolyse et préparation des échantillons pour le dosage des glycannes par CPG.

La méthode de KAMERLING *et al* (1975) est utilisée. Les échantillons sont exempts de sel, d'oses libres contaminants et leur teneur protéique est connue. Ils

**Etape 1 : couplage**

PITC : Phénylthiocyanate

TMA : Triméthylamine (amine tertiaire ne réagit pas avec PITC)

PTC : Dérivé Phénylthiocarbamyle (non stable)

Réactions parallèles :

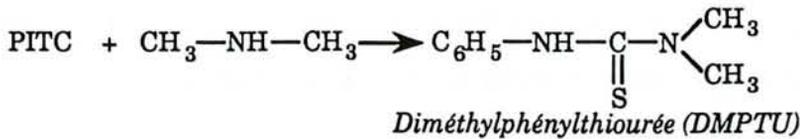
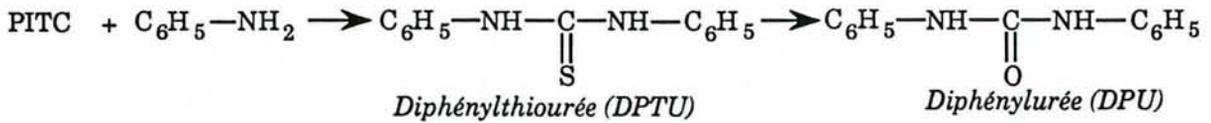
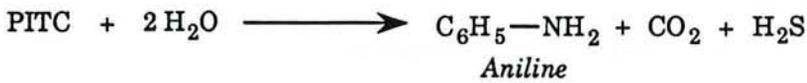
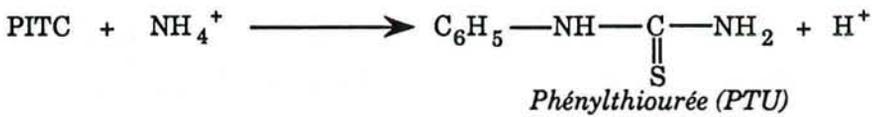
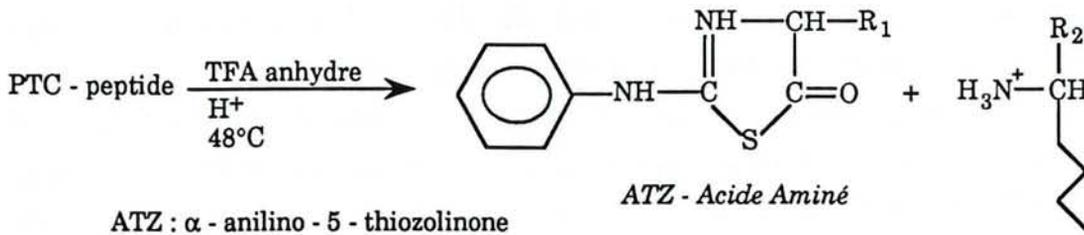
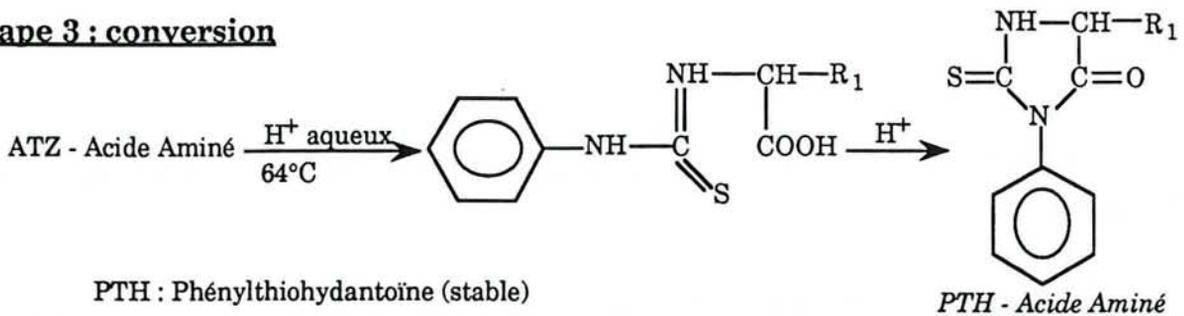
**Etape 2 : clivage****Etape 3 : conversion**

Figure 11. Réactions de dégradation récurrente selon Edman (TARR, 1982).

contiennent un étalon interne de méso-inositol (1 $\mu$ g) et sont sous forme lyophilisée, car la micro-méthanolyse doit se faire en absence d'eau (figure 10 b).

-*Micro-méthanolyse* : à chaque échantillon, entre 0,5 et 1 ml de la solution méthanol/HCl 0,5 M est ajouté. La réaction a lieu dans un tube hermétiquement fermé à 80°C pendant 24 h maximum. Au delà de cette limite, les glycanes se dégradent rapidement et notamment les acides sialiques.

-*N-réacétylation* : au volume réactionnel, on ajoute une pointe de spatule de catalyseur (carbonate d'argent) jusqu'à atteindre un pH de 5 à 6. Après addition de 20  $\mu$ l d'anhydride acétique, la réaction a lieu à l'obscurité, à température ambiante une nuit.

-*Extraction des acides gras et protéines* : après centrifugation, le surnageant est délipidé et déprotéinisé à l'heptane. Après élimination de la phase "heptane", la phase "méthanol/HCl" qui contient les glycanes est séchée sous azote.

-*Triméthylsilylation* : le résidu sec est repris avec 30  $\mu$ l de pyridine et 30  $\mu$ l de bis-silyltrifluoroacétamide (BSTFA). La réaction dure environ 90 min. L'échantillon est ensuite directement injecté dans l'appareillage de CPG.

### **8.6- Clivage des protéines par le bromure de cyanogène (CNBr).**

L'hydrolyse est réalisée par l'équipe du professeur RIBADEAU-DUMAS du Laboratoire de Biochimie de la Station de Technologies Laitières de l'INRA de Jouy-en-Josas. Le CNBr coupe spécifiquement les chaînes polypeptidiques après les résidus Met. La protéine solubilisée dans le TFA est incubée en présence de CNBr avec un rapport CNBr/Met = 100. Les peptides sont séparés par HPLC en phase inverse et un peptide est sélectionné pour être séquencé.

### **9- Séquençage d'acides aminés.**

Le séquençage est réalisé par l'équipe citée ci-dessus.

Les échantillons issus de la séparation par HPEC puis de la purification complémentaire par HPLC en phase inverse (avec ou sans clivage au CNBr) sont repris par le TFA anhydre et séquencés automatiquement dans le séquenceur 477 A (figure 11). Le principe du séquençage d'acides aminés repose sur la dégradation récurrente selon Edman (TARR, 1982) et sur la séparation des dérivés PTH-acides aminés (PTH = phénylthiohydantoïne) par HPLC en phase inverse sur colonne C18 selon un gradient d'acétonitrile 10-30% pendant 30 min. La détection est réalisée à 270 nm.

-*Problèmes rencontrés* :

- la lysine donne deux sortes de dérivés :  $\alpha$ -PTH-Lys et  $\epsilon$ -PTC-Lys ;
- les acides aminés Asn et Gln peuvent être partiellement désamidés pour donner par exemple le mélange PTH-Asp et PTH-Asn ;
- Ser, Thr et Cys se décomposent durant la conversion. Notamment, la formation de dérivés PTH-Cys est impossible, car très instable ;
- avec la proline, le clivage est souvent incomplet ;
- en milieu acide, la glutamine peut se cycliser en acide pyroglutamique, ce qui bloque la dégradation d'Edman ;
- le résidu Asn peut se retrouver lié à l'acide aminé suivant par  $\beta$ -carbonylation ( $\alpha$ - $\beta$ -shift). La liaison  $\beta$ -aspartyle ne se clive pas et la réaction récurrente est bloquée.

#### 10- Résonance magnétique nucléaire du proton ( $^1\text{H}$ -RMN).

Le protocole d'obtention des fractions oligosaccharidiques en vue de leur analyse par RMN est présenté dans la figure 42 (voir chapitre 2).

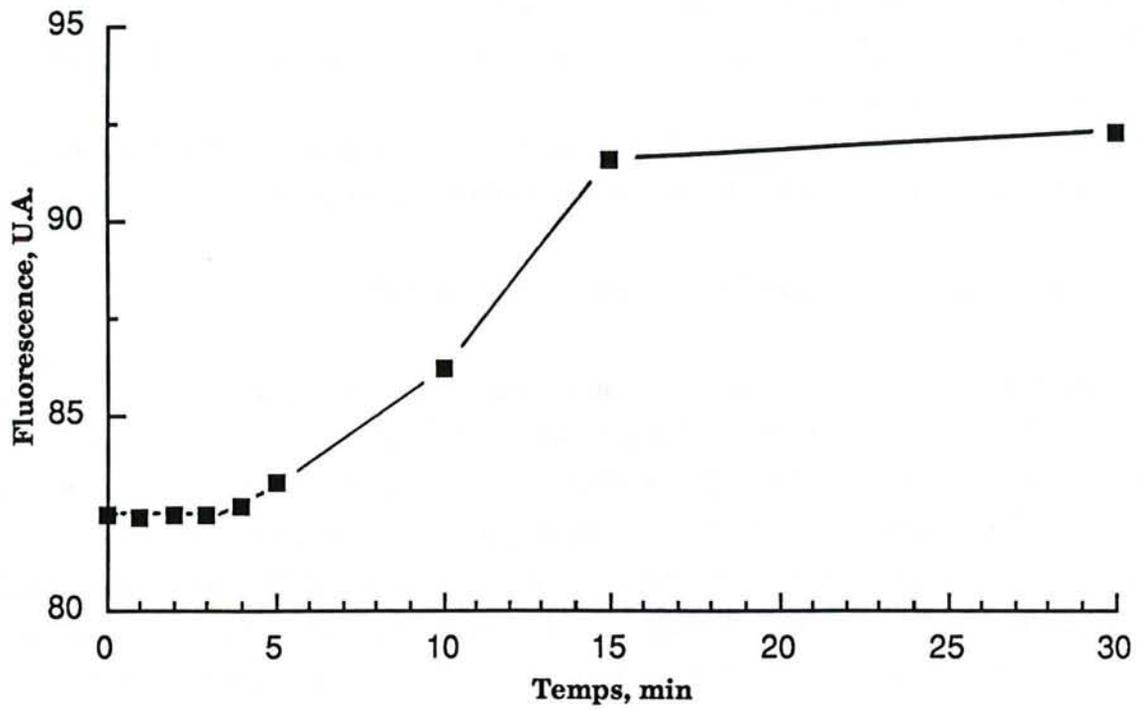
Les analyses en  $^1\text{H}$ -RMN des composés ont été réalisées par Monsieur WIERUSZESKI au Laboratoire de Chimie Biologique à Villeneuve d'Ascq.

La RMN est réalisée sur les glycopeptides préalablement traités à l'eau lourde à 27°C de manière à obtenir un échange des hydrogènes mobiles. Les analyses sont effectuées sur un appareil Bruker HX500 à 500 MHz opérant en transformée de Fourier.

#### 11- Spectrofluorescence : détermination de l'hydrophobicité de surface des protéines.

La méthode spectrofluorimétrique utilisée par BONOMI *et al* (1988) pour déterminer l'hydrophobicité de surface des protéines du lait après traitements thermiques a été adaptée aux lactosérums industriels (SAULNIER *et al*, 1991) ainsi qu'à notre étude. Le principe de la méthode est basé sur la mesure de l'affinité des sites hydrophobes à la surface des protéines vis à vis d'un marqueur fluorescent, l'ANS (acide 1-anilino-8-naphtalène sulfonique).

Pour la détermination de l'hydrophobicité de surface de la fraction FH1 avant et après désialylation (FH1d), les fractions sont tout d'abord standardisées à 8,66  $\mu\text{g}$  de protéines/ml. Le tampon utilisé est  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,05 M, pH 6,8. La cuve de lecture de la fluorescence contient 1,5 ml de solution protéique et 1,5 ml de tampon. Des quantités croissantes d'ANS 1,66 mM sont ajoutées dans la cuve. Lorsque l'on excite le fluorophore à une longueur d'onde  $\lambda_{\text{EX}} = 280 \text{ nm}$ , l'ANS lié aux protéines émet une fluorescence avec un maximum d'intensité à une longueur d'onde  $\lambda_{\text{EM}} = 460 \text{ nm}$ . La largeur de la bande passante est de 5 nm en émission et en excitation.



**Figure 12.** Dénaturation des protéines par l'ANS au cours du temps.

Afin d'éviter tout effet dénaturant du fluorophore, la lecture de la fluorescence est effectuée immédiatement après l'ajout de l'ANS. Au-delà de 4 min, nous observons une augmentation notable de la fluorescence, suite à un déplissement protéique démasquant d'autres sites hydrophobes (figure 12).

Pour l'étude de l'interaction entre la lipase pancréatique porcine et FH1 ou FH1d, la molarité en ANS est divisée par dix (solution à 0,166 mM) et les longueurs d'onde sont modifiées et discutées dans le chapitre 4. La cuve de lecture contient 15 µg de lipase et 13 µg de FH1 (ou de FH1d).

A partir des données analytiques, nous déterminons deux paramètres essentiels :

1- la fluorescence maximale ( $F_{\max}$ ), exprimée en unités arbitraires par µg de protéines de l'échantillon. Ce paramètre est fonction du nombre de sites hydrophobes de surface accessibles à l'ANS.

2- la constante de dissociation apparente du complexe "protéine-ANS" ( $K_d$ ), exprimée en µM d'ANS. Cette constante est l'inverse de l'affinité de l'ANS pour les protéines et dépend du type, de la densité et de la position des sites hydrophobes sur les molécules protéiques.

Ainsi, on peut également définir le rapport  $F_{\max}/K_d$ , qui est l'indice d'hydrophobicité effective des protéines.

## **12- Ultrafiltration à flux tangentiel et à volume constant (diafiltration).**

Le système Minitan est un appareil à flux tangentiel utilisant des membranes d'ultrafiltration (figure 7 C). Une pompe péristaltique prélève le liquide à traiter d'un réservoir non pressurisé et l'envoie sous pression dans la cellule Minitan à un débit de 100 à 1 000 ml/min. La diminution du volume du rétentat est compensée par un apport d'eau. Le vide partiel créé par l'abaissement du niveau du rétentat dans le récipient fermé hermétiquement suffit à le remplir avec la solution de lavage (H<sub>2</sub>O) au même débit que celui du filtrat à la sortie de la cellule Minitan. Les plaques membranaires sont empilées, conduisant à un passage du rétentat "en série". Ce système permet d'obtenir une action de balayage de la surface de la membrane à grande vitesse, que ce soit pour une plaque (60 cm<sup>2</sup>) ou pour 10 plaques (600 cm<sup>2</sup>).

Dans notre étude, 500 ml de lactosérum acide sont ultrafiltrés à volume constant. Les conditions initiales sont un débit de 800 ml/min, une pression de 0,2 bar et une surface membranaire de 240 cm<sup>2</sup>. Les membranes PTHK utilisées ont un seuil de coupure de 100 000 Da. La diafiltration est stoppée lorsque le volume du filtrat atteint environ 2,5 l (cinq fois le volume du rétentat). Le rétentat (RET) est

concentré à l'évaporateur rotatif sous vide, puis dialysé et lyophilisé. La fraction RET est ensuite séparée par chromatographie d'affinité sur ConA.

### **13- Influence des protéose-peptones sur l'activité lipolytique : études modélisées.**

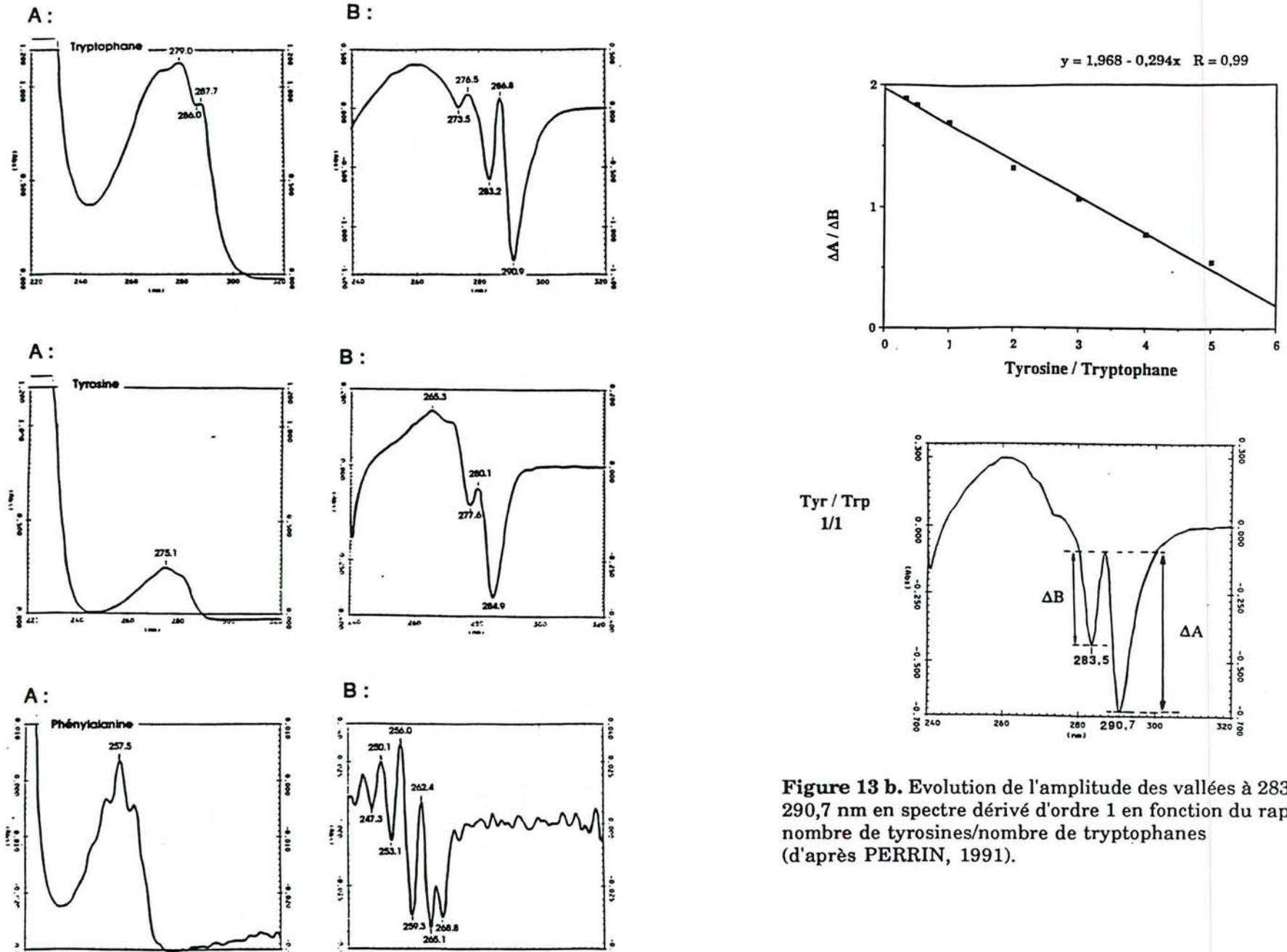
#### **13.1- Etude enzymatique en milieu hétérogène.**

La méthode optimisée par GARGOURI *et al* (1984) est utilisée. 0,25 ml de tributyrine est ajoutée à 19 ml de tampon Tris-HCl 1mM, pH 8 contenant 4 mM de CaCl<sub>2</sub> et 10 mM de NaCl. La tributyrine est émulsifiée par agitation vive et constante pendant toute la durée de la cinétique. Les acides gras (acide butyrique) libérés sont titrés à pH 8 constant avec NaOH 0,05 M et à 25°C au moyen d'un pH-Stat.

L'étude de l'effet des protéines sur la vitesse d'hydrolyse de la tributyrine est réalisée avec 1 µg/ml de lipase pancréatique porcine (LPP) ajouté après incubation des protéines avec l'émulsion pendant 4 min.

Les sels biliaires testés sont l'acide taurodéoxycholique (TDC), l'acide taurocholique (TC) et l'acide glycocholique (GC). Lorsque les sels biliaires sont présents dans le milieu, on ajoute 2,5 µg/ml de colipase en même temps que la LPP (rapport colipase/lipase de 10 mole/mole).

L'activité enzymatique est exprimée en unités enzymatiques (U.E.). Une unité enzymatique correspond à la libération d'un micro-équivalent d'acide gras par minute.



**Figure 13 a.** Spectres U.V. (A) et dérivées premières (B) des trois acides aminés aromatiques dans un mélange acétonitrile/eau 10/90 avec 0,1% (v/v) de TFA (d'après PERRIN, 1991).

**Figure 13 b.** Evolution de l'amplitude des vallées à 283,5 et 290,7 nm en spectre dérivé d'ordre 1 en fonction du rapport nombre de tyrosines/nombre de tryptophanes (d'après PERRIN, 1991).

### 13.2- Etude enzymatique en milieu homogène.

Nous avons adapté le protocole de QUINN *et al* (1982), repris par CHOUKRI (1991). Le principe repose sur l'hydrolyse d'une liaison ester d'un substrat soluble par la LPP, libérant un chromophore. La réaction peut être suivie par spectrophotométrie.

L'essai enzymatique contient 1,5 ml de tampon barbital 0,08 M, pH 7,6 et 10 µg/ml de LPP. Des quantités croissantes de protéines sont ajoutées et le tout est incubé 5 min à 37°C. Le substrat paranitrophénylbutyrate (PNPB) est alors ajouté à raison de 0,83 mM par essai (rapport E/S de 1/4 300 mole/mole). L'apparition de paranitrophénol (PNP) au cours du temps est suivie à 420 nm.

Dans le cas de la détermination des constantes  $K_M$ ,  $V_M$  et  $K_I$ , la solution mère de PNPB est diluée par cinq et des quantités croissantes sont ajoutées dans l'essai enzymatique.

L'hydrolyse du PNPB ou du PNPA (paranitrophénylacétate) par la SAB est réalisée avec 66,6 µg/ml de SAB.

La vitesse initiale  $V_i$  de la réaction enzymatique est calculée à partir de la pente à l'origine de la droite  $A_{420 \text{ nm}} = f(t)$  selon l'équation utilisée par QUINN *et al* (1982):

$$V_i (\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ LPP}) = (A_{420/\text{min}} \times V_{\text{essai}} \times 10^6) / (\epsilon_{\text{PNP}} \times \text{mg LPP})$$

où  $A_{420/\text{min}}$  représente la pente à l'origine de la droite,  $V_{\text{essai}}$  le volume total de l'essai en litre et  $\epsilon_{\text{PNP}}$  le coefficient d'extinction moléculaire du PNP exprimé en  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  et déterminé par la loi de Beer-Lambert. Dans nos conditions expérimentales, il est évalué à  $15\,740 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

### 14- Spectrométrie U.V. des fractions issues de la FPLC.

La méthode de MICLO *et al* (1991) a été appliquée à nos fractions FPLC, afin de mettre en évidence la présence d'acides aminés aromatiques. Les fractions sont dialysées, lyophilisées, puis reprises dans le mélange acétonitrile/eau (10/90) contenant 0,1% (v/v) de TFA, afin de se placer dans les mêmes conditions d'analyse que MICLO *et al* (1991). Un spectre U.V. dans la zone 200 à 300 nm est réalisé contre le mélange acétonitrile/eau/TFA à 20°C. La dérivée première du spectre est automatiquement calculée par le spectrophotomètre UV2100.

Les spectres U.V. et leur dérivées premières des trois acides aminés aromatiques libres solubilisés dans le même mélange sont différents (figure 13 a). En effet, Tyr présente un maximum d'absorption molaire de  $1\,550 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  à 275,1 nm, Trp un maximum d'absorption molaire de  $5\,500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  à 279,0 nm, tandis

que Phe présente un maximum d'absorption molaire de  $195 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  à 257,5 nm. De plus, le spectre de Trp possède un épaulement caractéristique à 287,7 nm. Il a été montré que si l'on mélange Tyr et Trp, il existe une proportionnalité entre le rapport de l'amplitude des vallées à 283,5 nm ( $\Delta B$ ) et 290,7 nm ( $\Delta A$ ) mesurée à partir de la dérivée première et le rapport Tyr/Trp (figure 13 b). Il en est de même pour le mélange Phe/Tyr, dont l'équation de la droite est :

$$\text{Phe/Tyr} = 0,207 + 3,518 \Delta A/\Delta B$$

où  $\Delta A$  est l'amplitude de la vallée à 260 nm et  $\Delta B$  l'amplitude de la vallée à 284 nm. La détermination des rapports Tyr/Trp et Phe/Tyr dans nos fractions va donc nous permettre de quantifier l'analyse spectrale.

#### **15- Détermination de la solubilité des PPT en fonction de la molarité en $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .**

Les PPT sont dissoutes à raison de 0,5% (p/v) dans un tampon  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,8 de molarité croissante de 0 à 2 M. Après agitation pendant 1 h, les échantillons sont filtrés sur des filtres de porosité 0,2  $\mu\text{m}$ . L'azote est dosé par méthode micro-Kjeldahl. La teneur en azote des filtrats est exprimée en pourcentage d'azote soluble.

#### **16- Dosage des acides aminés.**

La composition en acides aminés des fractions de protéose-peptones issues de la FPLC ou des protéines purifiées par HPEC a été déterminée selon la méthode de MOORE et STEIN (1963). Les protéines sont hydrolysées en milieu HCl 6 M à 120°C pendant 24 h. Après séparation par chromatographie d'échange d'ions par paliers de pH, les acides aminés sont dérivés par la ninhydrine pour être détectés à 570 nm (analyseur d'acides aminés Biotronik LC 3000).

#### **17- Dosage des protéines et de l'azote.**

Les protéines sont dosées par la méthode de LOWRY *et al* (1951) en utilisant une courbe étalon de SAB (0 à 100  $\mu\text{g/ml}$ ).

L'azote est dosé par la technique de micro-Kjeldahl (FIL-IDF 20, 1962) avec le distillateur semi-automatique Vapodest 3S.

## 1- Introduction : la chromatographie d'interactions hydrophobes.

Le choix de la technique chromatographique pour purifier une macromolécule dépend essentiellement des propriétés biologiques et physico-chimiques de cette dernière. Ainsi, dans le cas de la fraction composant-3 des protéose-peptones, la chromatographie d'interactions hydrophobes (CIH) semble être toute indiquée. Cette technique est actuellement sous-utilisée ; il nous semble utile de rappeler succinctement le principe.

L'interaction hydrophobe est le résultat de l'adhérence de deux groupes non polaires. Sur le plan thermodynamique, la valeur d'énergie libre  $\Delta G$  de ce phénomène en milieu aqueux est fonction de l'enthalpie  $\Delta H$  et de l'entropie  $\Delta S$  selon l'équation  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ . Comme la variation d'enthalpie est très faible dans ce type d'interaction, le processus est essentiellement déterminé par le changement de l'entropie. Le modèle proposé par OCHOA (1978) montre bien l'augmentation du degré de désordre ( $+\Delta S$ ) des molécules d'eau (figure 14 a). Selon ce modèle, les molécules d'eau liées aux entités hydrophobes et situées au niveau de la zone de contact sont exclues lors de l'interaction et vont adopter un état moins ordonné, se traduisant par une augmentation de l'entropie.

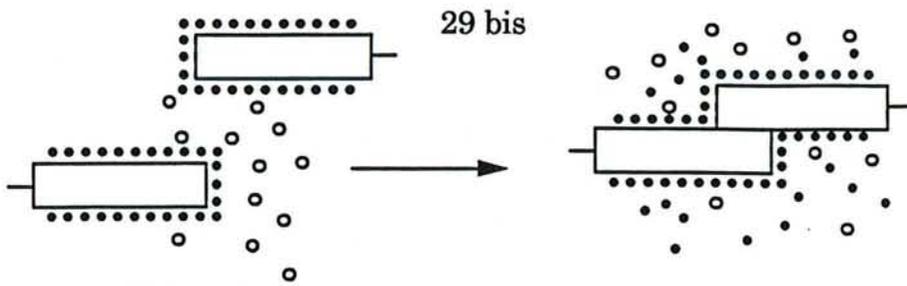
GENG *et al* (1990) ont formalisé le mécanisme de rétention des protéines en CIH et proposent le "modèle de déplacement stoechiométrique" (MDS), mettant à contribution les ions salins, l'hydratation des protéines ainsi que leurs changements conformationnels. Une molécule protéique adopte une conformation différente selon qu'elle se trouve dans la phase mobile ou adsorbée au ligand hydrophobe. Le changement de conformation modifie ainsi le nombre de molécules d'eau liées à la protéine. Le déplacement de l'eau liée dans le processus d'adsorption/désorption est régi par l'équilibre stoechiométrique suivant :



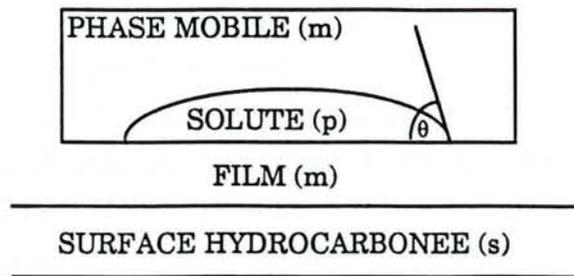
où  $P_a$  est le complexe protéine-ligands (on considère que plusieurs ligands sont impliqués dans l'interaction d'une protéine),  $P_h$ , la protéine hydratée dans la phase mobile,  $Z$  est le nombre de molécules d'eau nécessaire pour déplacer une protéine adsorbée,  $L_h$  est le ligand hydraté et  $n$  le nombre de ligands interagissant avec la molécule protéique.

La constante d'équilibre s'exprime par :

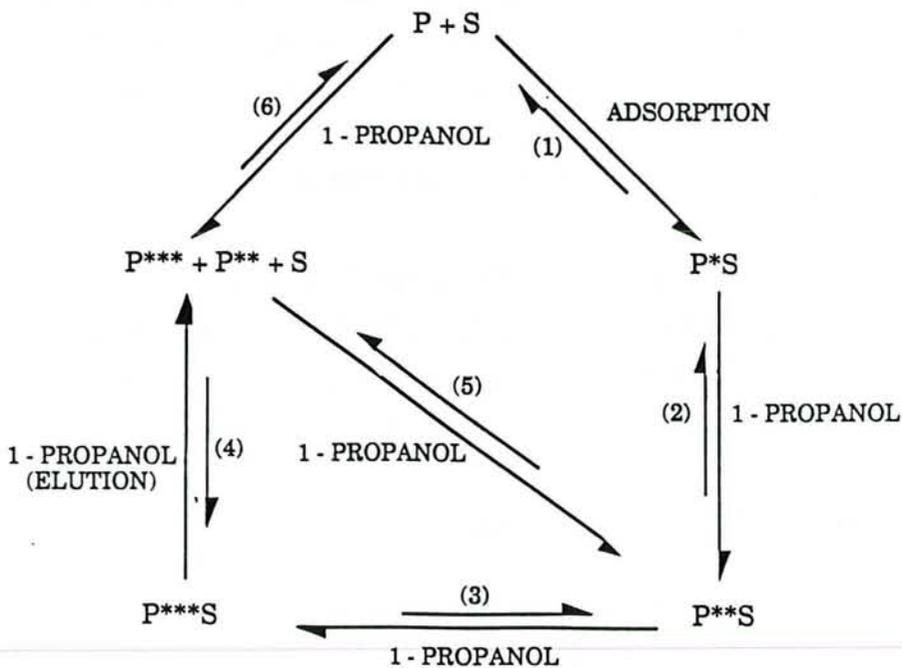
$$K = \frac{[P_a]}{[P_h].[L_h]^n.[H_2O]^z}$$



**Figure 14 a.** Mécanisme de l'interaction hydrophobe. Les molécules d'eau liées aux entités hydrophobes sont en cercles pleins et les molécules d'eau libres en cercles vides. Lors de l'interaction, on observe une augmentation du degré de désordre ( $+\Delta S$ ) des molécules d'eau (d'après OCHOA, 1978).



**Figure 14 b.** Représentation schématique de l'interaction d'une protéine (p) à l'interface phase mobile (m)/phase stationnaire (s). L'angle de contact  $\theta$  entre la gouttelette protéique et la surface hydrophobe est corrélée à la tension de surface (d'après BARFORD *et al*, 1982).



**Figure 14 c.** Modèle proposé des équilibres conformationnels impliqués dans l'adsorption et l'élué des protéines de la colonne de silice alkylée en C8. P : protéine native ; P\* : conformation initiale de la protéine adsorbée ; P\*\* : conformation intermédiaire ; P\*\*\* : conformation hélicoïdale de la protéine éluée ( d'après KATZENSTEIN *et al*, 1986).

# **CHAPITRE 1**

**Fractionnement des protéose-peptones par  
FPLC d'interactions hydrophobes et  
caractérisation par électrophorèse  
bidimensionnelle**

---

Pour un système chromatographique donné, quand la nature des ions salins, du ligand et la température sont fixées,  $Z$  est une constante caractéristique d'une protéine. GENG *et al* (1990) ont montré que  $Z$  peut être déterminé expérimentalement et ont confirmé la validité du modèle MDS.

Les ions salins ont un rôle complexe. Ils ne sont pas des agents déplaçants, puisque ce sont les molécules d'eau qui accomplissent cette fonction, mais ils ont plusieurs autres rôles dont le plus important est l'effet diluant des molécules d'eau (tableau 2). Cet effet dépend de la nature des ions. Le sulfate d'ammonium est le meilleur diluant, ce qui explique sa large utilisation en CIH (GENG *et al*, 1990).

Les sels affectent la constante d'équilibre thermodynamique  $K$  et la concentration d'eau sur la surface de la phase stationnaire ainsi que le nombre  $n$ . L'équilibre est déplacé vers la gauche, favorisant le phénomène d'adsorption.

Les ions salins vont modifier l'affinité des protéines pour les ligands en induisant des changements conformationnels et en diminuant le taux d'hydratation. Le phénomène d'adsorption d'une protéine est donc contrôlé tant par la concentration saline que par l'hydrophobicité de la phase stationnaire.

Ces ions, dit de relargage ou "*salting-out*", sont utilisés pour renforcer l'adhérence des protéines sur la matrice hydrophobe, car ils augmentent le nombre de zones de contact.

Une forte concentration en sels a pour effet également d'augmenter considérablement la tension de surface à l'interface protéine-surface hydrophobe de la matrice, favorisant les forces d'adhérence (REGNIER, 1987).

Pour éluer ensuite les protéines, plusieurs solutions existent. La plus simple consiste à diminuer graduellement la force ionique. Dans le cas d'interactions fortes, les ions dits "*salting-in*" ou chaotropiques (ou encore ions dissolvants) peuvent être utilisés, car ils induisent des changements structuraux importants aux protéines, mais peuvent cependant provoquer des dénaturations irréversibles.

Des modifications du pH de la phase mobile peuvent être envisagées pour désorber une protéine, qui a son adsorption hydrophobe maximale lorsque le pH est proche de son pH isoélectrique (OCHOA, 1978).

La température est un facteur qui peut être important dans le processus d'élution en chromatographie CIH, car son augmentation améliore la solvatation des protéines (OCHOA, 1978) et diminue la tension de surface favorisant le phénomène de désorption (BARFORD *et al*, 1982).

Le modèle de BARFORD *et al* (1982), illustrant l'interface phase mobile/phase stationnaire dans le cas d'une HPLC en phase inverse, montre qu'une baisse de la tension de surface favorise l'élution des protéines. Selon ces auteurs, la rétention

**Tableau 2 : Variation de la concentration molaire d'H<sub>2</sub>O dans des solutions salines à 1M (d'après GENG *et al*, 1990)**

<i>Paramètre</i>	<i>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	<i>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	<i>NaCl</i>	<i>KCl</i>	<i>NaBr</i>	<i>NH<sub>4</sub>Cl</i>
M <sub>H<sub>2</sub>O</sub>	54,02	52,16	54,45	53,88	54,09	53,39
ΔH <sub>2</sub> O	1,54	3,40	1,11	1,68	1,47	2,17

des protéines sur des gels de silices alkylés s'explique non seulement par l'adhérence hydrophobe, mais aussi par des interactions de type Van der Waals, qui dépendent de la tension de surface de la phase mobile.

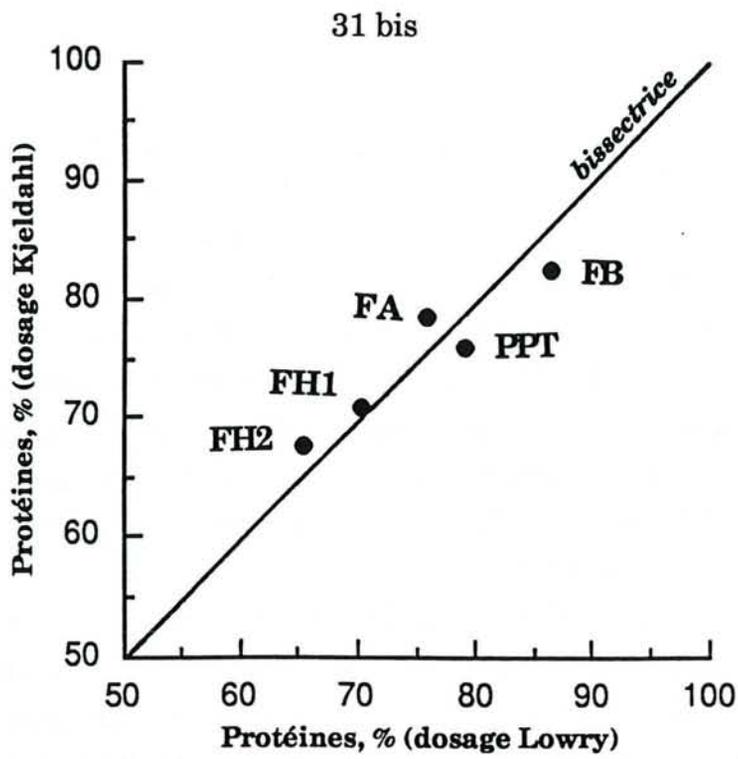
La mesure par goniométrie de l'angle de contact  $\theta$  entre une gouttelette contenant la protéine et la surface hydrophobe est corrélée à la tension de surface (figure 14 b). L'addition de solvants organiques comme l'isopropanol ou l'éthanol a pour effet de diminuer cette tension de surface et de désorber les protéines.

Ces alcools sont également connus pour être des agents dénaturant les protéines (BARFORD *et al*, 1982). Il en est de même pour l'éthylène glycol plutôt utilisé en CIH (CHAPLIN, 1986).

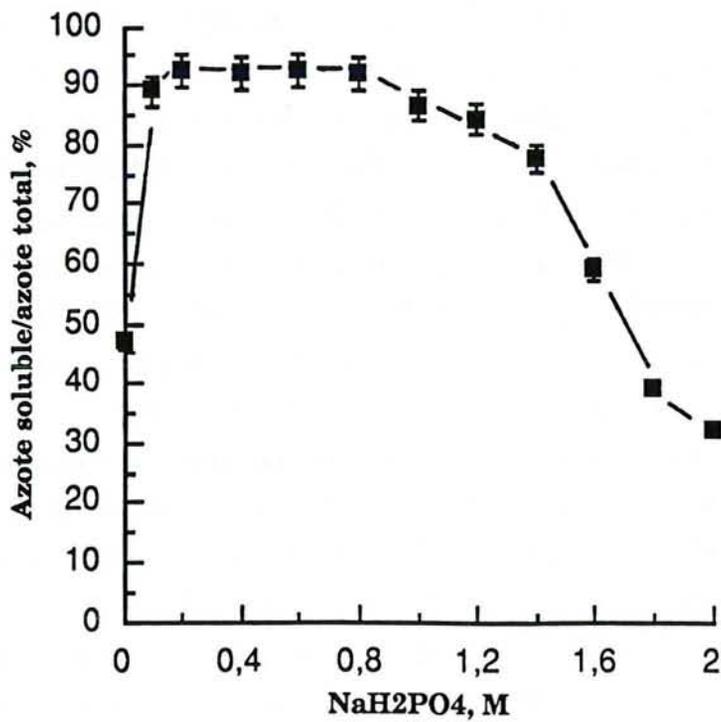
KATZENSTEIN *et al* (1986) ont proposé un modèle d'équilibre conformationnel impliqué dans la fixation et l'éluion des protéines dans une colonne C8 en HPLC en phase inverse (figure 14 c). L'addition croissante de 1-propanol modifie la fluorescence intrinsèque maximale des protéines adsorbées sur la matrice octylée, traduisant un changement conformationnel. Pour chaque protéine étudiée, ces auteurs montrent une excellente corrélation ( $r = 0,96$ ) entre le pourcentage de propanol nécessaire à l'éluion d'une protéine et le pourcentage de propanol induisant la moitié du changement spectral suivi par spectrofluorimétrie. Cependant, KATZENSTEIN *et al* (1986) concluent que la structure des protéines éluées est significativement altérée par cette procédure chromatographique.

Pour conclure cette partie, il est important de noter que l'ordre d'éluion, qui donne l'ordre d'hydrophobicité effective des protéines en CIH, n'est pas corrélé comme attendu avec leurs valeurs d'hydrophobicité théorique (nombre de Bigelow). Ceci a été montré notamment par CHAPLIN (1986) en fractionnant les caséines et les protéines lactosériques bovines par FPLC d'interactions hydrophobes. Par contre, il existe une corrélation étroite avec le processus de "salting-out". En effet, BERKOWITZ et HENRY (1987) montrent que l'ordre d'éluion de sept protéines différentes est l'inverse de l'ordre dans lequel les protéines en solution précipitent lorsque la concentration en sulfate d'ammonium augmente.

Dans le cas des protéose-peptones, on observe une différence de solubilité entre les constituants, notamment entre les composant-5 et 3 (NG *et al*, 1970). NEJJAR *et al* (1990) ont utilisé cette particularité comme point de départ à la préparation d'une fraction contenant le composant-3 par relargages successifs au sulfate d'ammonium. Dans notre étude, nous nous proposons d'optimiser le fractionnement des divers constituants par FPLC d'interactions hydrophobes en exploitant essentiellement leurs différences de comportement dans le processus de "salting-out".



**Figure 15 a.** Corrélation entre le dosage des protéines selon LOWRY *et al* (1951) et le dosage d'azote par micro-Kjeldahl corrigé par les facteurs de conversion azote-protéine de 6,54 pour PPT, FA, FB et 6,55 pour FH1 et FH2.



**Figure 15 b.** Solubilité des protéose-peptones en fonction de la molarité en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

## 2- Résultats.

### 2.1- FPLC d'interactions hydrophobes analytique : mise au point.

**Solubilité des protéose-peptones en fonction de la molarité en  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$**  : la solubilité est mesurée dans des solutions de molarité croissante allant de 0 à 2 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (figure 15 b). Dans l'eau pure, le pourcentage de solubilité n'est que de 47%. Ce taux augmente à 89% dans une solution à 0,1 M. La solubilité maximale (92%) est obtenue dans des conditions allant de 0,2 à 0,8 M. Elle chute ensuite entre 0,8 et 2 M pour atteindre finalement 32%.

**Mise au point de la séparation** : le pH (6,8), la température (25°C) et la nature de la phase mobile (ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) sont maintenus constants et seule la force ionique est un paramètre variable. Différents gradients linéaires en  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  sont mis à l'étude. Dans un premier temps, plusieurs séparations sont réalisées avec des conditions initiales d'équilibrage de la colonne allant de 0,05 à 1,2 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ; la fin du gradient est toujours fixée à 0,01 M. Dans un deuxième temps, l'expérience est répétée mais avec une fin de gradient fixée à 0 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

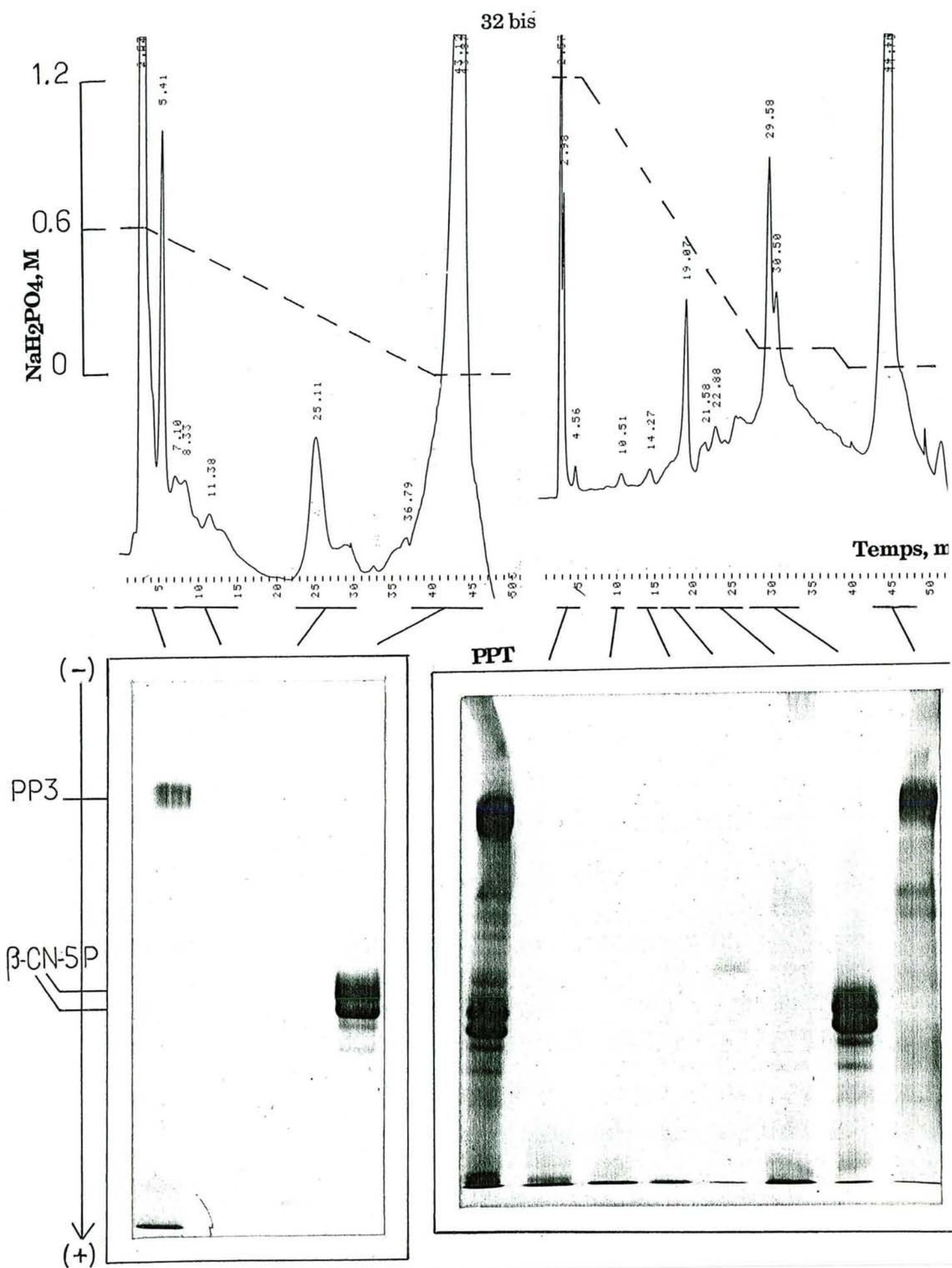
Une augmentation de la force ionique initiale permet de retenir plus de constituants sur la colonne TSK-Phényl. Cependant, une force ionique nulle en fin de gradient est nécessaire pour éluer la majeure partie des constituants adsorbés. Le peptide  $\beta\text{-CN-5P}$  n'est adsorbé dans la colonne que pour des molarités initiales supérieures à 0,6 M. Cependant, à cette valeur, on observe après contrôle électrophorétique, que le composant-3 n'est pas retenu dans la colonne. Pour ce faire, les conditions initiales doivent être fixées au minimum à 0,8 M (figure 16).

Une résolution optimale est obtenue lorsque la colonne est équilibrée à 1,2 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Avec un tel gradient, tout le composant-3 est retenu dans la colonne et sera élué à 0 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  avec les composés hydrophobes absorbant fortement à 280 nm.

De plus, le gradient peut comporter une étape isocratique afin de bien résoudre la séparation entre les deux pics correspondant à  $\beta\text{-CN-5P}$  et au composant-3.

### 2.2- FPLC d'interactions hydrophobes semi-préparative.

**Séparation des différents constituants des protéose-peptones** : compte-tenu de la courbe de solubilité et de la résolution de la séparation obtenue par FPLC analytique, nous choisissons une valeur initiale de molarité de 1 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .



**Figure 16.** Optimisation de la séparation analytique des protéose-peptides par FPLC d'interactions hydrophobes (colonne TSK-Phényl). La PAGE-native de contrôle des fractions montre que l'ordre d'éluion du composant-3 et du peptide  $\beta$ -CN-5P est inversé lorsque les conditions initiales de force ionique passent de 0,6 à 1,2 M.

Cette valeur est un compromis permettant d'avoir une solubilité proche du maximum de 92% et d'obtenir un profil avec une bonne résolution.

Après transfert de la technique analytique à une échelle semi-préparative, un gradient de 56 min de 1-0 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  à pH 6,8 est appliqué avec un débit de 6 ml/min. Sous ces conditions, le profil obtenu avec la colonne semi-préparative est similaire au profil réalisé sous les conditions analytiques (figure 17).

Une étape isocratique d'une force ionique de 0,1 M est appliquée localement afin d'améliorer la séparation du dernier pic.

Le profil peut être divisé en cinq groupes de pics, notés de FI à FV, eux-mêmes sub-divisés en dix fractions, numérotées de F1 à F10. Après chaque passage sur la colonne, une injection de 2,5 ml de NaOH 0,2 M permet de collecter un sixième groupe de pics (FVI).

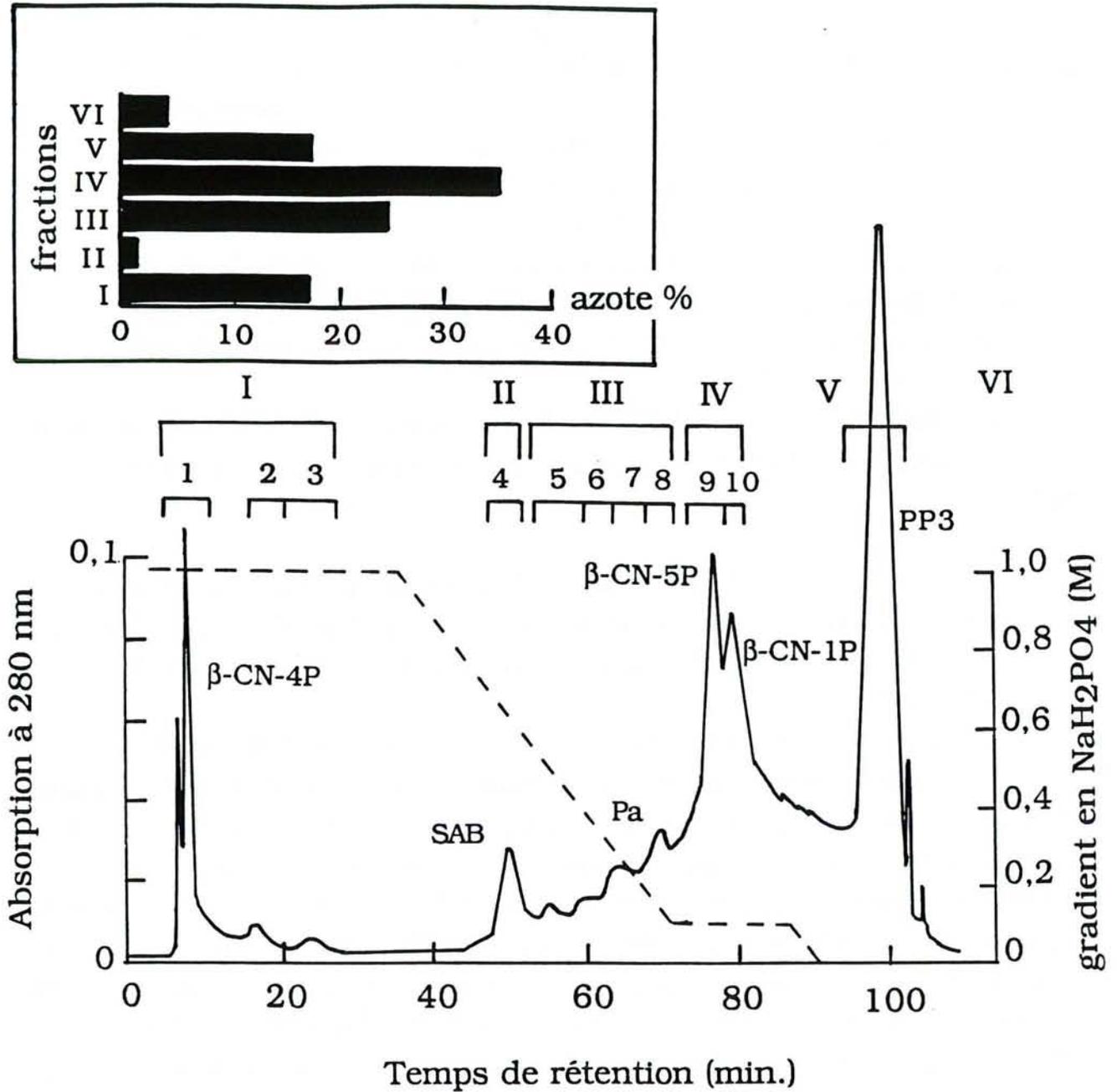
Une étape isocratique locale à 0,2 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  peut également être incluse dans le gradient afin d'améliorer la résolution entre les pics correspondant à F9 et F10.

***Préparation rapide de la fraction hydrophobe des protéose-peptones :*** à partir de la méthode en gradient linéaire utilisée pour séparer les différents constituants, une méthode de gradient par paliers est optimisée afin d'obtenir rapidement la fraction hydrophobe (figure 18).

Une première étape consiste à équilibrer la colonne à 1 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  afin de favoriser l'adsorption des constituants hydrophobes sur la matrice. Une première fraction non retenue, appelée FA, est collectée et correspond à FI obtenue avec la méthode précédente. Pour éluer tous les polypeptides faiblement adsorbés dans la colonne, une force ionique constante de 0,1 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  est alors appliquée. La fraction FB collectée est similaire aux fractions FII, FIII, FIV réunies. Afin de désorber les constituants hydrophobes, une force ionique nulle est appliquée dans une troisième étape. On obtient alors la fraction hydrophobe FH1, qui correspond à FV. Après lavage de la colonne par NaOH 0,2 M, FH2 est collectée et est similaire à FVI.

### **2.3- Caractérisation physico-chimique et chimique des fractions issues de la FPLC.**

***Caractérisation des fractions par PAGE-native et PAGE-SDS :*** Le profil obtenu par PAGE-native montre que le premier groupe de pics représente des peptides ou polypeptides non retenus dans la colonne (figure 19 B). Parmi ces peptides,  $\beta$ -CN-4P est le plus connu pour avoir une mobilité électrophorétique élevée en PAGE-native.



**Figure 17.** Séparation préparative des protéose-peptones par FPLC d'interactions hydrophobes en gradient linéaire de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1-0 M, pH 6,8. La fraction FVI correspond à la fraction de lavage de la colonne TSK-Phényl par injection de 2,5 ml de  $\text{NaOH}$  0,2 M.

Dans la fraction FII, la bande de mobilité relative  $R_f = 0,5$  correspond à la SAB ( $R_f = 0,51$  sur le profil des protéines lactosériques, figure 3). La SAB est obtenue avec une grande pureté et représente 1,6% de l'azote total élué déterminé par dosage micro-Kjeldahl.

Dans le groupe III, un polypeptide à forte mobilité électrophorétique, nommé Pa est élué simultanément avec une partie de composant-3, appelée PP3a. Le peptide  $\beta$ -CN-5P est entièrement concentré dans la fraction FIV et est contaminé par PP3b.

Les fractions FV et FVI absorbent fortement à 280 nm et ce fait n'est pas corrélé à la teneur en azote de ces fractions. De plus, FVI a un aspect opalescent.

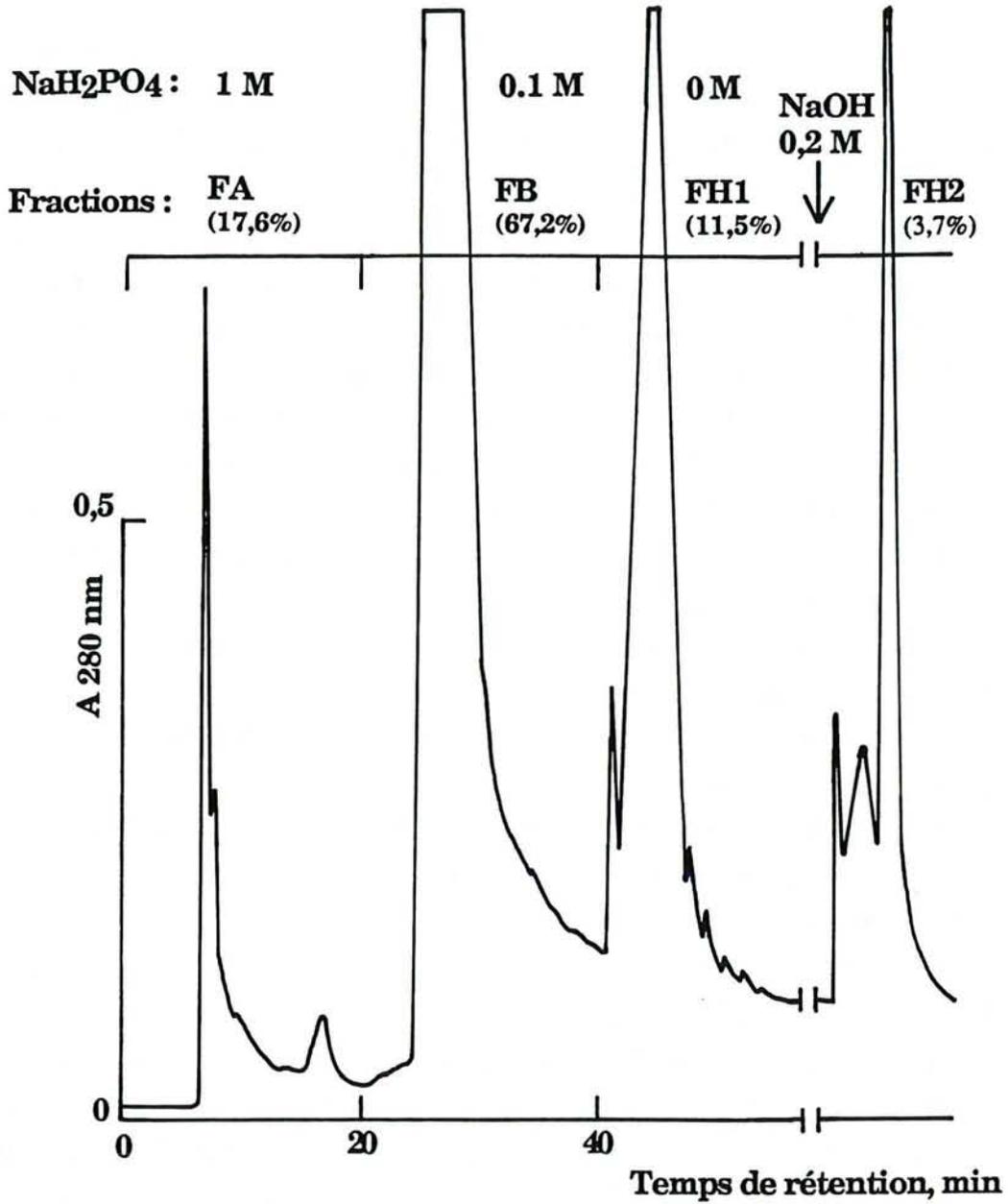
Sur le profil des protéose-peptones totales (PPT) obtenu par PAGE-SDS, on distingue trois zones correspondant à des masses moléculaires de 28, 18 et 11 kDa en moyenne (figure 19 A). Essentiellement les bandes 18 et 28 kDa sont révélées par le réactif de Schiff après oxydation par l'acide periodique (réaction PAS<sup>+</sup>).

L'hétérogénéité des trois bandes est mise en évidence avec les profils des fractions FPLC. Ainsi, la bande 18 kDa peut être distinguée en trois groupes principaux. Dans la fraction FI, elle correspond à une protéine qui n'est pas retenue dans la colonne à une force ionique de 1 M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Cette bande n'est pas révélée par le réactif de Schiff (réaction PAS<sup>-</sup>). Dans la fraction F9, la bande 18 kDa et PAS<sup>-</sup> correspond à  $\beta$ -CN-5P. Dans la fraction FV, la bande est cette fois PAS<sup>+</sup> et correspond à un composant hydrophobe.

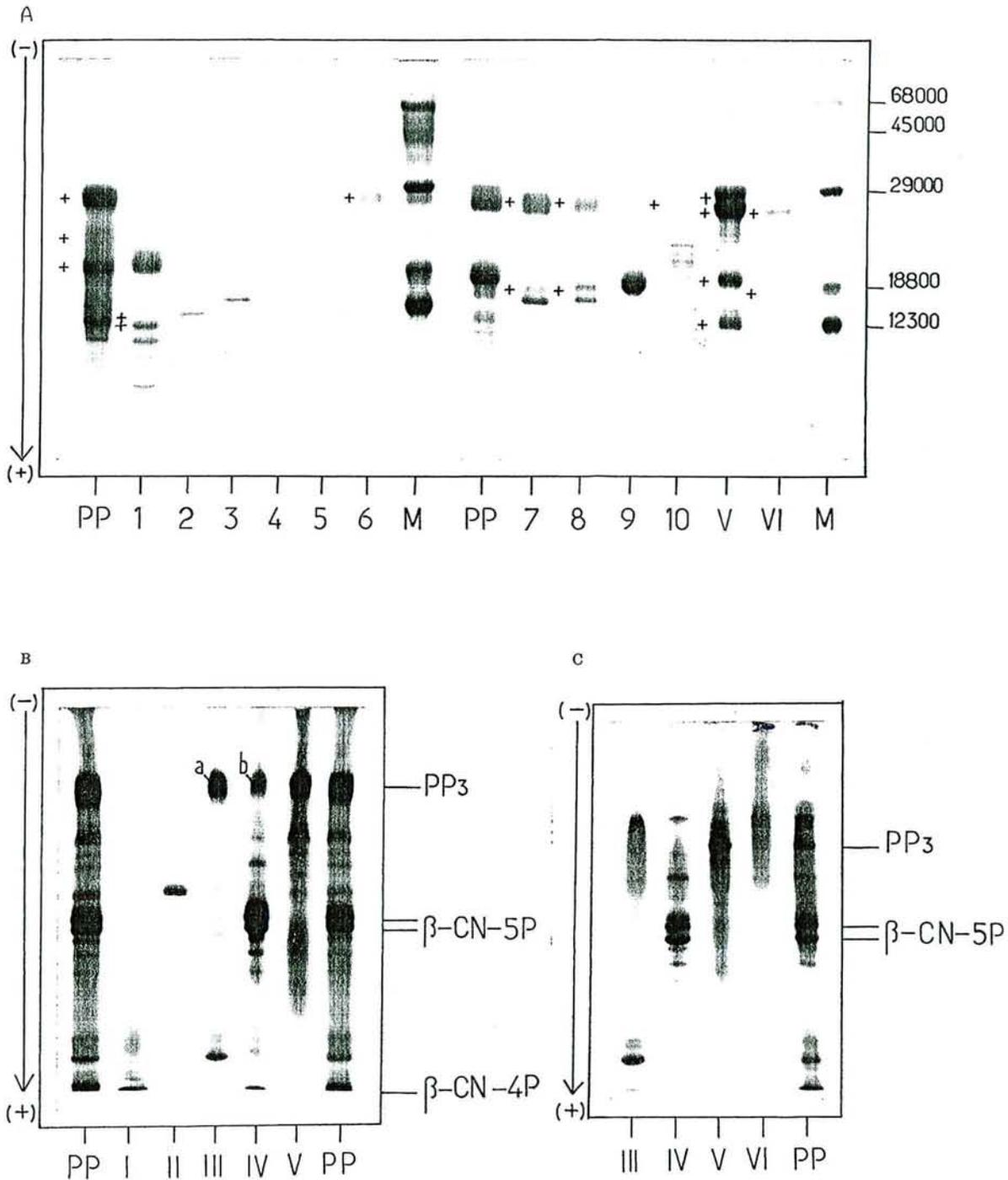
Dans toutes les fractions où la bande 28 kDa est présente, la réaction PAS est toujours positive. Les glycoprotéines de 28 kDa peuvent cependant être différenciées par leur hydrophobicité effective dans la colonne TSK-Phényl.

La fraction F1, outre la bande 18 kDa évoquée ci-dessus, contient un ensemble de peptides et de glycopeptides mineurs. Cette fraction semble contenir  $\beta$ -CN-4P, qui migre probablement près du front de migration. Dans la fraction F4, la SAB présente une bande à 68 kDa. Les fractions F7 et F8, avec des profils similaires, montrent deux zones PAS<sup>+</sup>, la principale, correspondant à PP3a (28 kDa). La seconde est faiblement réactive (17-18 kDa). De plus, ces fractions contiennent le polypeptide Pa, qui est PAS<sup>-</sup> et qui possède une masse moléculaire apparente de 16 kDa. Le fragment  $\beta$ -CN-5P est obtenu avec une bonne pureté dans la fraction F9. La bande PAS<sup>+</sup> à 28 kDa, correspondant à PP3b, est essentiellement présente dans la fraction F10.

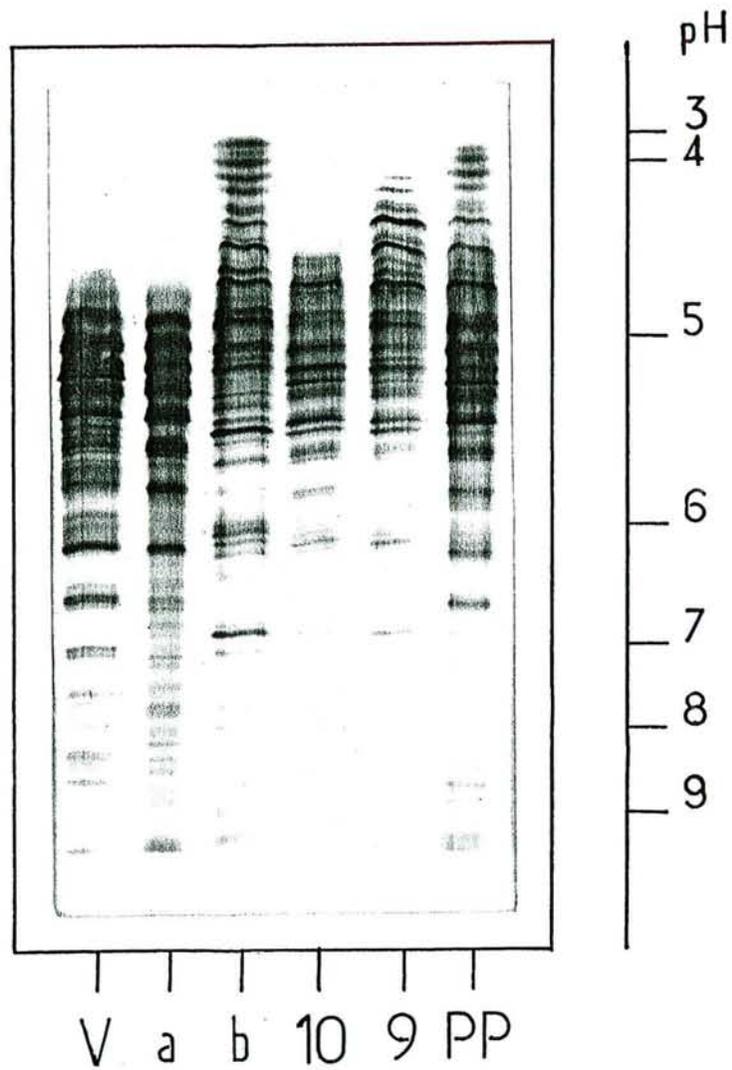
La fraction hydrophobe FV est composée de trois à quatre bandes principales, toutes PAS<sup>+</sup>, localisées à 30-28, 19 et 11 kDa. La fraction FVI est composée d'une bande PAS<sup>+</sup> à 28 kDa et d'une zone diffuse entre 18 et 15 kDa, qui réagit faiblement avec le Bleu de Coomassie mais fortement avec le réactif de Schiff.



**Figure 18.** Préparation rapide de la fraction hydrophobe des protéose-peptones (FH1) par FPLC d'interactions hydrophobes en gradient par paliers de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (colonne TSK-Phényl). Les teneurs en azote de chaque fraction par rapport à l'azote total élué sont données en pourcentages.



**Figure 19.** PAGE-SDS (A), PAGE-native (B) et PAGE-urée (C) des fractions préparées par FPLC-IH en gradient linéaire. PP : protéose-  
peptones ; M : étalons de masses moléculaires ; + : bandes révélées par  
le réactif de Schiff.



**Figure 20.** IEF des fractions PP (protéose-peptones), F9, F10 et FV et comparaison avec les fractions a (FHPP) et b (FNHPP) préparées selon la méthode classique (PAQUET *et al*, 1988).

**Analogies des fractions FV et FHPP par électrophorèse :** Le profil de FV, réalisé par PAGE-native (figure 19 B), est similaire à celui de la fraction FHPP préparée par CIH classique (PAQUET *et al*, 1988). Les fractions F9, F10 et FV sont analysées par IEF et comparées aux fractions FHPP et FNHPP que nous avons préparées classiquement (figure 20). Le profil des PPT permet de dénombrer au moins 40 bandes distribuées entre pH 3 et pH 9. Le profil de la fraction FV montre huit bandes principales entre pH 5 et 6 parmi les 34 bandes observées.

**Teneur protéique et facteur de conversion azote-protéine :** afin de déterminer la teneur en protéines des fractions obtenues par la technique du gradient par paliers, la méthode de LOWRY *et al* (1951) et la méthode de dosage d'azote par micro-Kjeldahl ont été utilisées puis corrélées entre-elles. Les facteurs de conversion azote-protéine utilisés ont été déterminés théoriquement par KARMAN et Van BOEKEL (1986) pour les protéose-peptones de lait de vache Holstein. Ils sont de 6,54 pour  $\beta$ -CN-5P,  $\beta$ -CN-4P et  $\beta$ -CN-1P, donc pour les fractions FA et FB, et 6,55 pour le composant-3, donc pour les fractions FH1 et FH2.

Il existe ainsi une bonne correspondance entre le taux protéique déterminé selon la méthode de LOWRY *et al* (1951) et celui déterminé par micro-Kjeldahl (figure 15 a).

**Analyse de la composition en acides aminés :** les différentes fractions obtenues par la technique FPLC-IH en gradient par paliers de force ionique ont été analysées (tableau 3). On remarque tout d'abord que le résidu Met ne résiste pas à nos conditions d'hydrolyse acide et est dégradé.

Les fractions PPT, FA et FB sont pauvres en Tyr, Cys et Met. Par contre, elles sont riches en Glx (Glu + Gln) avec une valeur d'environ 17%. Le résidu Pro est surtout retrouvé dans FB (7,5%), tandis que FA est riche en Ser (8,9%) et Asx (8,4%).

En ce qui concerne les fractions glycosylées FH1 et FH2, elles sont pauvres en acides aminés soufrés, mais elles contiennent cependant plus de Tyr que les fractions précédentes (environ 2%).

**Etude des spectres U.V. et dérivées premières :** à partir des spectres U.V. de mélanges étalons de Phe, Tyr et Trp, on peut déterminer le rapport de ces trois acides aminés dans des peptides purs. Nous avons donc tenté d'appliquer cette méthode à certaines de nos fractions de protéose-peptones (figure 21).

Tout d'abord, la fraction F9 contient  $\beta$ -CN-5P. Ce peptide possède 4 Phe, 1 Tyr et 1 Trp. Le rapport Phe/Tyr déterminé par l'analyse de la dérivée première du spectre de F9 est de 3. L'absence de "vallée" à 291 nm sur la dérivée montre qu'il n'y

**Tableau 3 : Teneur en acides aminés des fractions FPLC et comparaison des fractions contenant le composant-3 préparées selon différents protocoles (en mol/100 mol).**

Acides aminés	PPT	FA	FB	FH1	FH2	FGP2	LP3	FHPP4
Asx	6,9	8,4	5,6	6,7	6,0	9,4	8,7	9,7
Thr	5,7	5,0	4,6	5,8	7,7	10,6	9,5	7,1
Ser	6,9	8,9	5,7	5,9	5,6	12,9	10,2	7,5
Glx	17,8	17,1	16,0	13,6	14,3	15,3	16,0	14,5
Pro	7,9	3,9	7,5	7,2	6,5	5,2	2,7	8,6
Gly	2,6	1,7	2,6	2,6	2,4	3,2	3,3	3,7
Ala	2,3	2,9	2,4	3,6	3,8	4,7	4,7	4,1
Cys	traces <sup>1</sup>	-	-	traces	traces	0,6	0,3	1,7
Val	5,4	4,0	4,9	4,9	5,2	4,4	3,7	5,0
Met	traces	-	traces	traces	traces	1,8	2,3	2,7
Ile	6,1	7,0	4,8	5,2	4,6	6,4	6,4	5,3
Leu	8,1	6,5	6,7	7,7	7,8	11,3	11,7	11,0
Tyr	0,9	-	0,7	1,7	2,7	1,1	1,5	1,9
Phe	3,2	1,3	2,9	2,8	3,0	2,4	2,7	3,8
His	4,4	2,6	3,5	4,8	4,6	2,4	4,9	3,0
Lys	7,0	5,2	5,6	5,7	9,0	5,6	8,8	7,9
Arg	2,0	3,4	2,1	2,4	3,1	2,5	4,1	2,3

1 traces : inférieures à 0,5 mol/100mol

2 FGP : fraction glycoprotéique de KESTER et BRUNNER (1982)

3 LP : lactophorine de KANNO (1989b)

4 FHPP : fraction hydrophobe des protéose-peptones de PAQUET *et al* (1989)

a pas de Trp dans cette fraction. Les spectres de F9 et FB sont superposables. FB contient également le peptide  $\beta$ -CN-5P. Pour F10, les rapports sont plus difficiles à estimer, mais on constate que, pour 1 Trp, on trouve beaucoup de Phe et au moins 2 Tyr. La fraction FH1 contient les trois acides aminés aromatiques. Pour 1 Trp, on compte 4 Tyr et au moins 5 Phe. La fraction FI, qui contient  $\beta$ -CN-4P, ne présente aucune absorption caractéristique des trois acides aminés dans la zone de longueurs d'onde de 260 à 320 nm. La fraction totale PPT contient pour 1 Trp, 6 Tyr et au moins 8 Phe.

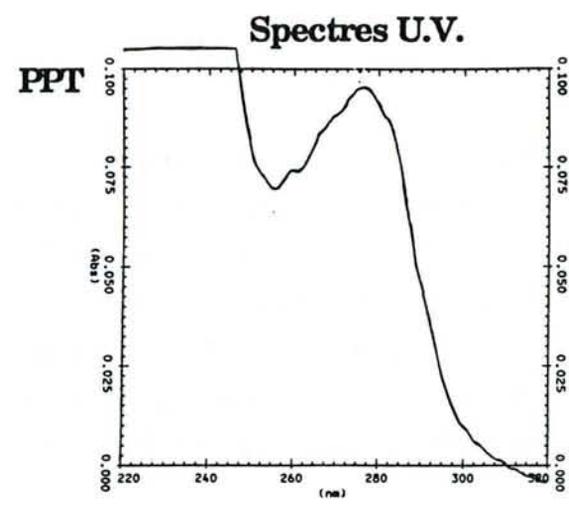
***Mise en évidence de la microhétérogénéité des glycoprotéines de FH1 par l'emploi d'urée dans deux techniques séparatives :*** Les fractions FIII, FIV, FV et FVI ont été analysées par PAGE-urée (figure 19 C). Les résultats présentent des différences par rapport à ceux obtenus par PAGE-native. La large bande de PP3a devient très diffuse lorsque l'on ajoute de l'urée, tandis que PP3b donne une zone plus claire avec une bande bien focalisée. Le profil de FV présente une bande principale focalisée ( $R_f = 0,33$ ) de mobilité relative légèrement supérieure à celle de la bande large sur le profil de PAGE-native ( $R_f = 0,22$ ). Cette bande n'est pas présente pour FIII, FIV et FVI.

En ce qui concerne les bandes  $PAS^-$ , correspondant entre-autre à  $\beta$ -CN-5P et au peptide Pa, l'urée n'a pas d'influence sur leur mobilité relative.

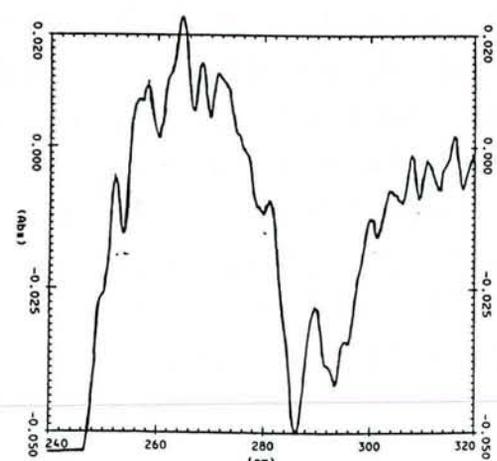
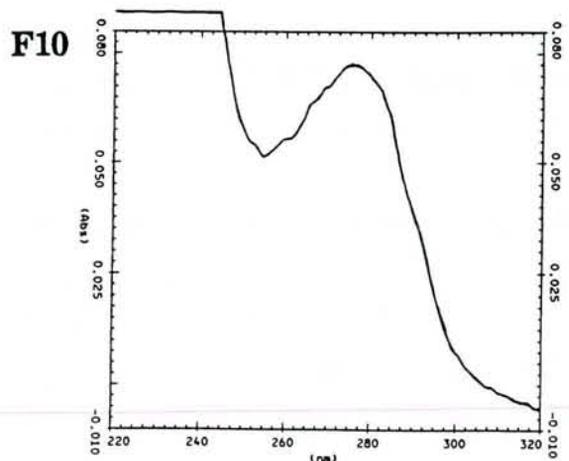
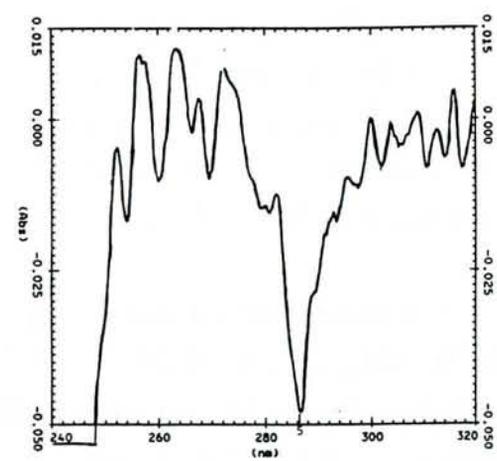
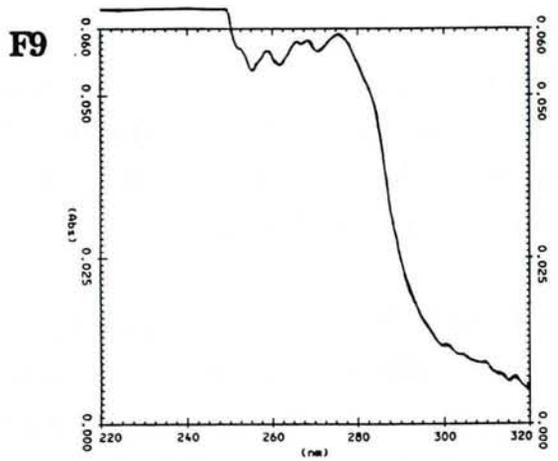
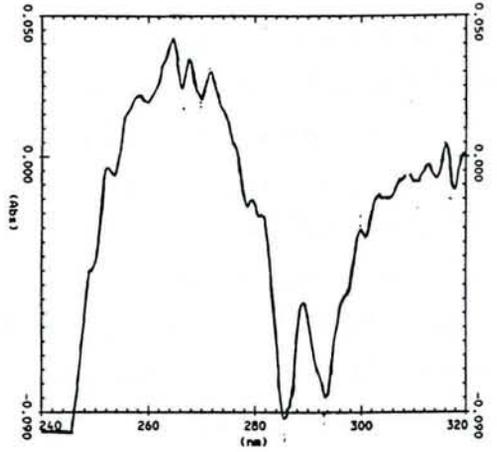
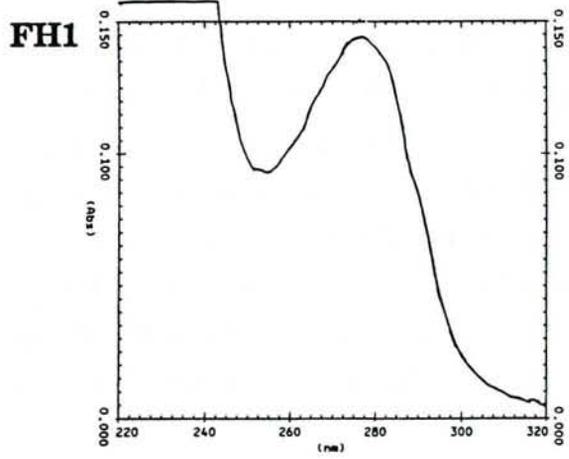
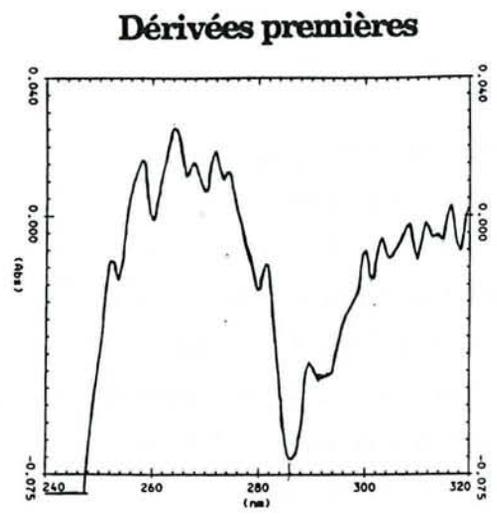
La séparation de la fraction FH1 par FPLC d'échange d'ions en présence d'urée 4,5 M permet de distinguer une dizaine de pics (figure 22). Les sous-unités 19 et 11 kDa sont co-éluées entre 20 et 30 min, alors que la sous-unité 29 kDa, plus fortement adsorbée, est répartie sur le reste du profil entre 30 et 60 min.

***Caractérisation des fractions FPLC par PAGE-2D :*** lorsque l'on combine les deux techniques IEF et PAGE-SDS, on accroît considérablement la résolution de la séparation des protéose-peptones (figure 23). Ainsi, au moins 45 spots ont pu être localisés entre pH 3 et 7 pour la fraction PPT. On retrouve sur le profil les trois groupes à 30-28, 18 et 11 kDa. Le profil de la fraction F8 est divisé en deux zones. La première contient 4 spots  $PAS^+$  de 29 kDa et répartis entre pH 4,9 et 5,1. Cette zone correspond à PP3a. La deuxième contient essentiellement le spot du polypeptide Pa de pH isoélectrique fortement acide localisé à pH 4.

Dans la fraction F9,  $\beta$ -CN-5P est représenté par 3 spots à 18 kDa. Les points isoélectriques ( $pHi$ ) correspondent aux pH 4,7 ; 5,0 et 5,1. Sur le profil, on retrouve en faible quantité 4 spots  $PAS^+$  à 29 kDa de PP3b, dont les  $pHi$  sont compris entre 5,1 et 5,9. PP3b est surtout présent dans la fraction F10, qui regroupe également 2 spots majeurs à 9 kDa et avec des  $pHi$  de 5,1 et 5,3.



36 bis



**Figure 21.** Spectres U.V. et dérivées premières des fractions PPT, FH1, F9 et F10 dans le mélange acétonitrile/eau 10/90 + TFA 0,1% (v/v).

Sur le profil de la fraction hydrophobe FV, on retrouve les trois groupes 30-28, 19 et 11 kDa respectivement composés d'au moins 13, 4 et 2 spots avec des pHi distribués entre 4,9 et 6,1. Les spots réagissent tous avec le réactif de Schiff, à l'exception du spot de coordonnées 11 kDa et pH 5,0. La fraction FVI est composée de deux polypeptides principaux PAS<sup>-</sup> de masse moléculaire 28 kDa, avec des pHi basiques de 6,1 et 6,3. On note également la présence de composants PAS<sup>+</sup> formant une zone diffuse entre pH 5 et pH 6.

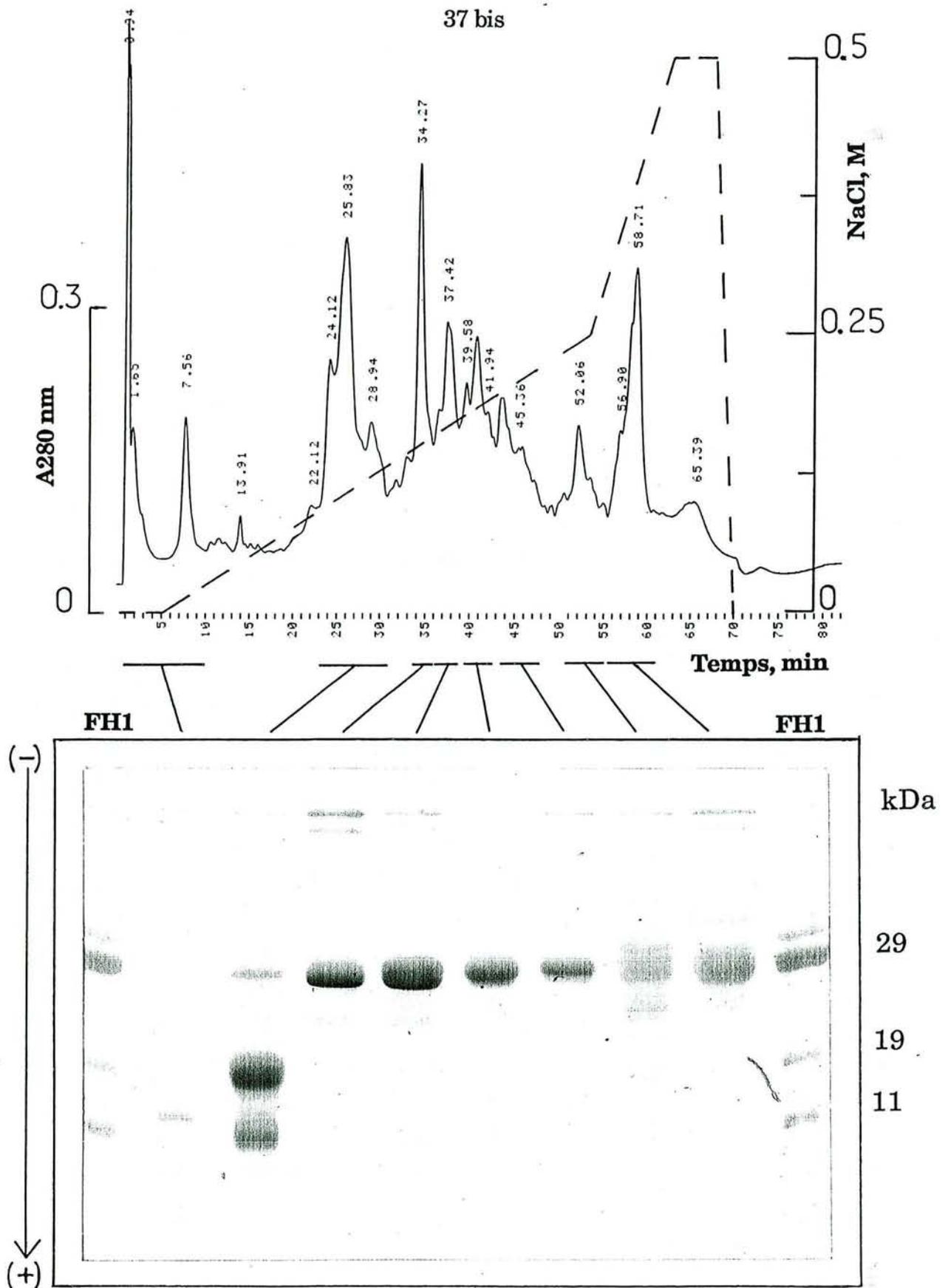
### 3- Discussion.

#### 3.1- FPLC d'interactions hydrophobes (FPLC-IH).

**FPLC-IH analytique** : l'optimisation de la séparation par FPLC-IH repose essentiellement sur l'effet "salting out" des constituants des protéose-peptones.

La quantité de protéines adsorbées dans la colonne augmente lorsque la force ionique initiale d'équilibrage de la colonne augmente également. Ce fait est en accord avec les théories de la chromatographie d'interactions hydrophobes exposées dans l'introduction. Plus la concentration saline est élevée et plus les interactions hydrophobes entre les protéines et le support sont favorisées.

Il est intéressant de noter la différence de comportement entre  $\beta$ -CN-5P et le composant-3 (tableau 4). Lorsque la force ionique initiale est fixée à 0,6 M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  $\beta$ -CN-5P s'adsorbe sur la matrice alors que le composant-3 n'est pas retenu. L'ordre d'hydrophobicité inverse est observé lorsque la molarité initiale est supérieure à 0,8 M. On ne peut donc pas corrélérer l'ordre d'élution des constituants avec leur valeur d'hydrophobicité théorique (nombre de Bigelow) calculée à partir de la composition en acides aminés. Avec cette valeur initiale de 0,8 M, on constate également que la corrélation de BERKOWITZ et HENRY (1987) n'est pas applicable pour le peptide  $\beta$ -CN-5P et le composant-3. En effet, l'ordre d'élution est le même que l'ordre de précipitation au sulfate d'ammonium et non l'inverse. Dans le processus de "salting out", il faut considérer le paramètre "nature chimique", qui a une forte influence. Le composant  $\beta$ -CN-5P est de nature peptidique, alors que le composant-3 est de nature glycoprotéique et appartient à la classe des globulines, qui regroupent entre-autre les hétéroprotéines peu solubles dans l'eau pure. En fait, la corrélation de BERKOWITZ et HENRY (1987) se vérifie pour un mélange de protéines standards globulaires, mais ces auteurs montrent qu'elle n'est pas vérifiée dans le cas dans un mélange de glycoprotéines et d'albumine provenant d'un fluide d'ascite de souris.



**Figure 22.** FPLC d'échange d'ions (colonne MonoQ) de la fraction FH1 à pH 8 et en présence de 4,5 M d'urée. La PAGE-SDS de contrôle montre la variabilité du nombre de charges de la sous-unité 29 kDa.

**FPLC-IH préparative** : afin de favoriser l'équilibre thermodynamique lent de l'interaction hydrophobe entre la matrice et les protéines, un débit faible de 6 ml/min est appliqué (OCHOA, 1978). Une température de 25°C, légèrement supérieure à la température ambiante, permet d'abaisser la pression dans la colonne.

Par rapport à la méthode classique (PAQUET *et al*, 1988), la technique FPLC est plus facile à mettre en œuvre. La durée d'un fractionnement est réduite de 600 min à 100 min environ (figure 17). L'étape de purification par chromatographie d'hydroxyapatite était nécessaire pour clarifier la fraction hydrophobe des protéose-peptones (FHPP) devenant alors la fraction HA2. Cette étape est supprimée dans notre système, car la fraction FVI opalescente (équivalente à HA1) est séparée de la fraction FV (équivalente à HA2) pendant la seule étape de FPLC-IH.

L'approche analytique du fractionnement des protéose-peptones a permis d'éliminer l'utilisation de 50% (v/v) d'éthylène glycol, qui est un facteur augmentant la pression dans la colonne ainsi qu'un agent de dénaturation des protéines (CHAPLIN, 1986 ; KATZENSTEIN *et al*, 1990).

Le sulfate d'ammonium n'est pas non plus nécessaire dans notre méthode, car des conditions initiales de 1 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  sont suffisantes pour adsorber la fraction hydrophobe sur la matrice.

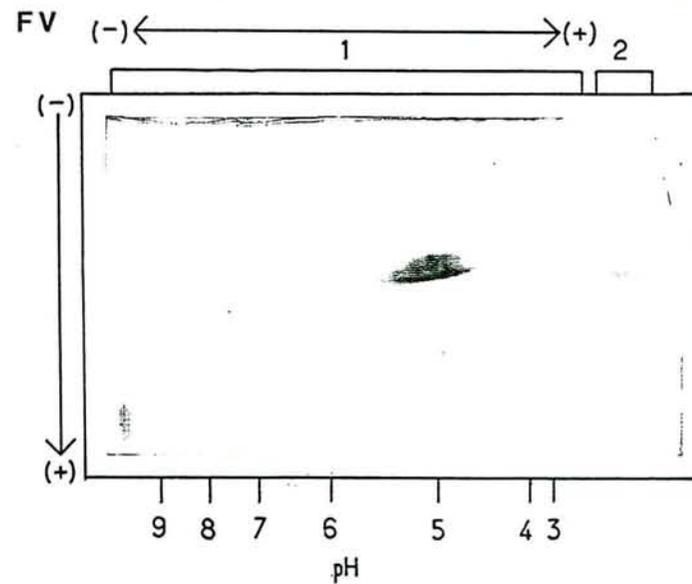
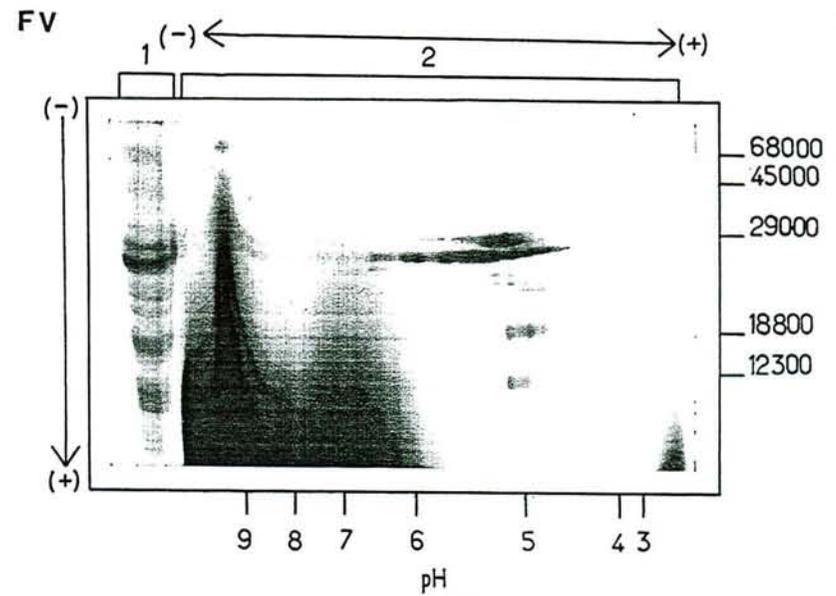
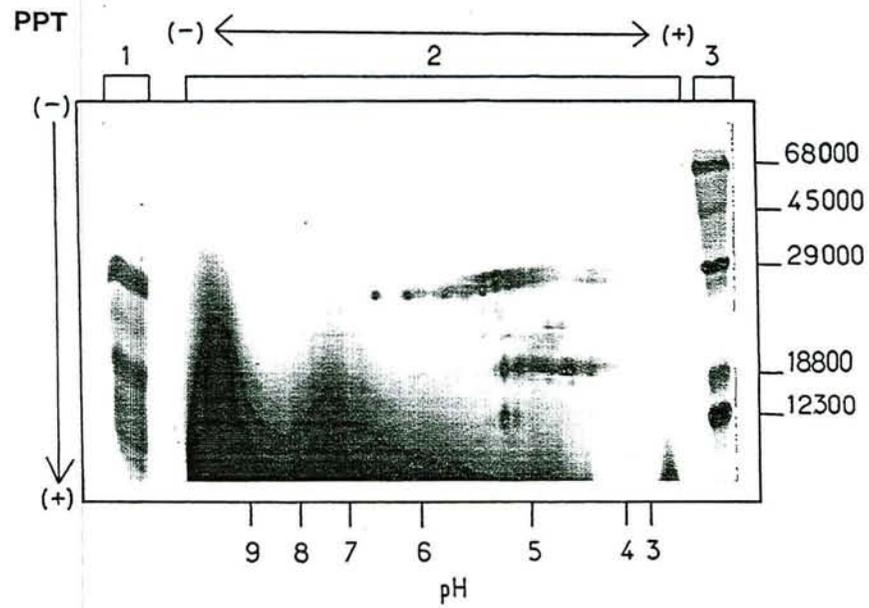
Le transfert de la méthode classique à la FPLC permet de passer d'un système à trois tampons à un système à un tampon. Cependant le sulfate d'ammonium ne peut pas être supprimé dans certains cas. Si CHAPLIN (1986) peut séparer par FPLC les caséines bovines avec un gradient 0,8-0 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 6 (en présence d'urée 6 M), il ne peut se passer d'un gradient 1,5-0 M de sulfate d'ammonium pour fractionner les protéines lactosériques.

De même, le procédé de YOSHIDA (1989), qui consiste à préparer de la lactoferrine par chromatographie classique d'interactions hydrophobes, nécessite l'emploi de 1,8 M de sulfate d'ammonium pour retenir les protéines lactosériques dans une colonne Butyl-Toyopearl 650M et 0,25 M d'acide acétique pour éluer la lactoferrine.

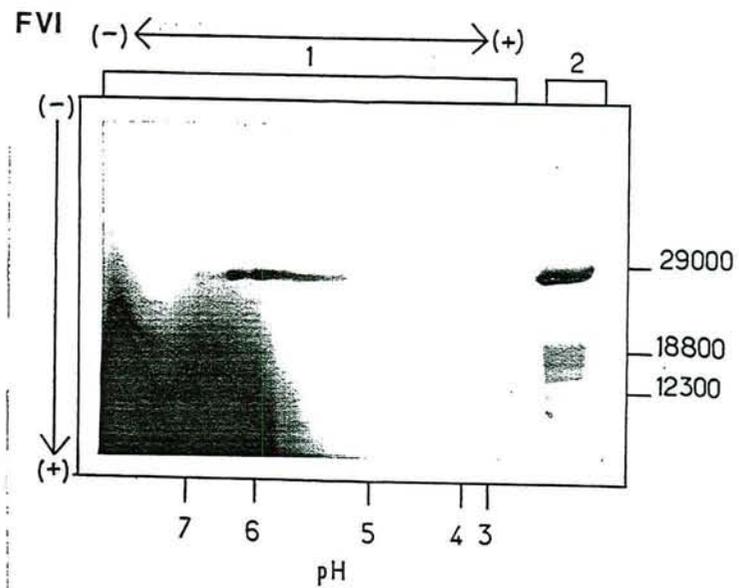
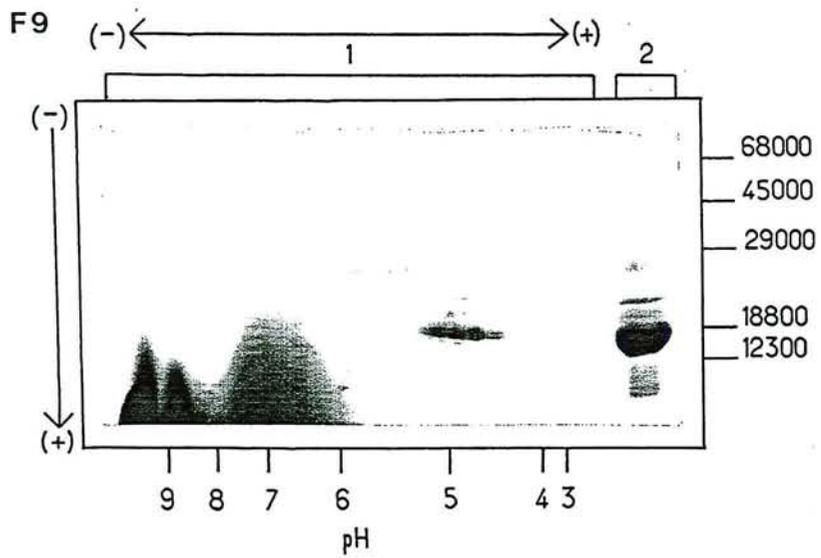
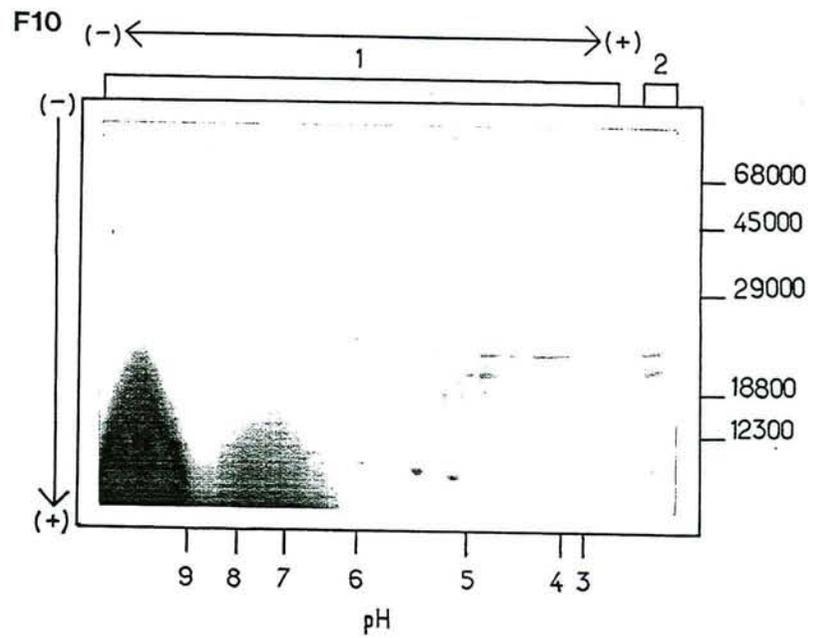
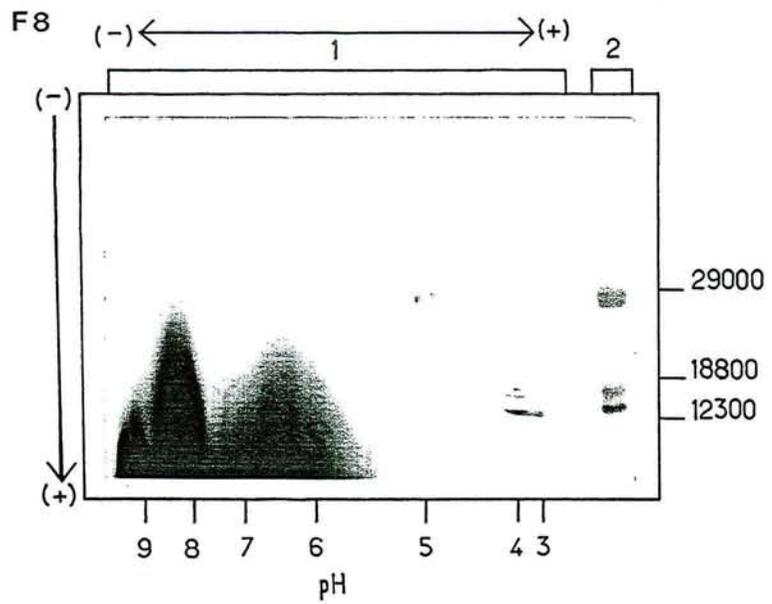
La méthode FPLC-IH permet de classer les protéines selon leur hydrophobicité effective, l'ordre d'élution étant  $\beta\text{-CN-4P} < \text{SAB} < \beta\text{-CN-5P} < \beta\text{-CN-1P} < \text{glycoprotéines de FV}$ .

La présence de 7 Glu et 4 Ser phosphorylées (PAQUET, 1989) donne un caractère hydrophile marqué à  $\beta\text{-CN-4P}$ , qui n'est pas retenu dans la colonne. De plus ce peptide ne possède pas d'acide aminé aromatique.

La présence de SAB dans la fraction protéose-peptones a déjà été constatée (NEJJAR *et al*, 1986). Sa capacité à fixer certains acides gras la protège d'une



**Figure 23.** PAGE-2D des fractions PPT, FV (révélée par le Bleu de Coomassie G250 et par le réactif de Schiff), F8, F9, F10 et FVI.



dénaturation thermique, notamment du chauffage du lait à 95°C pendant 30 min. HSIA *et al* (1984) ont localisé sur son segment N-terminal un site spécifique de fixation des acides gras à longues chaînes. La SAB est éluée au début du gradient de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , ce qui correspond à une faible hydrophobicité effective. Ce résultat est corrélé avec le fait que la SAB est fortement adsorbée dans une colonne d'échange d'ions MonoQ (ANDREWS *et al*, 1985), car les deux méthodes basées l'une sur l'interaction hydrophobe et l'autre, sur l'échange d'ions, sont d'une façon générale antagonistes.

De plus, il est intéressant d'éliminer la SAB par FPLC-IH. Cette protéine contamine la fraction FHPP préparée classiquement, et ceci est un inconvénient lorsque l'on veut produire des anticorps anti-FHPP. NEJJAR *et al* (1986) ont testé leur anti-sérum anti-FHPP contre les protéines lactosériques et montrent une réaction de précipitation avec la SAB (mais pas avec les autres protéines). La chromatographie d'affinité, employée par ces auteurs pour séparer l'anti-FHPP de l'anti-SAB, n'aurait sans doute pas été nécessaire, si FHPP avait été préparée au préalable par FPLC-IH.

Le peptide  $\beta$ -CN-1P (f 29-105 ou 29-107) est élué très proche du peptide  $\beta$ -CN-5P (f 1-105 ou 1-107), bien que ce dernier possède la partie N-terminale (f 1-28) fortement hydrophile. Le comportement hydrophobe semblable entre ces deux peptides témoigne du rôle mineur joué par les acides aminés hydrophiles dans ce type de chromatographie. Le temps de rétention de  $\beta$ -CN-5P, plus faible que celui de  $\beta$ -CN-1P, peut s'expliquer par le masquage de certaines zones hydrophobes par la partie N-terminale de  $\beta$ -CN-5P et également par le phénomène de tamisage moléculaire, qui est dû à la porosité du gel d'agarose de la matrice.

Notre méthode peut donc servir de point de départ à d'éventuelles investigations de chaque composant séparé en une seule étape.

Afin de préparer rapidement la fraction hydrophobe (FH1), l'adaptation d'une méthode par paliers de force ionique a permis de réduire la durée de 100 min à 50 min environ (figure 18). Une économie importante de tampon  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 M est réalisée, puisque seulement pendant les 18 premières minutes, on utilise 100% de tampon, avant de se placer à 10% puis à 0%. De plus, la fraction FH1, éluée dans l'eau pure, est facilement concentrée et dialysée sans que le problème de cristallisation de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ne se pose, comme dans le cas de la fraction FA.

**Tableau 4 : Conditions de force ionique pour l'adsorption et l'élution de  $\beta$ -CN-5P et du composant-3 dans la colonne TSK Phényl-5PW. Relation avec le relargage au sulfate d'ammonium.**

	$\beta$ -CN-5P	Composant-3
<b>Adsorption (M)</b>	C.I.* $\geq 0,6$	C.I. $\geq 0,8$
<b>Elution (M)</b>	C.I. = 0,6M	0,6
	C.I. = 1M	0
<b>Précipitation** au sulfate d'ammonium (g/l)</b>	209	351

\* C.I. : Conditions Initiales de force ionique exprimées en M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

\*\* : d'après Ng *et al* (1970)

**Tableau 5 : Mobilité relative ( $R_f^a$ ) de différents constituants de la fraction protéose-peptones**

	Glycosylation	PAGE-native	Page-urée
$\beta$ -CN-5P	Bande 1	PAS <sup>-</sup>	0,54 <sup>b</sup>
	Bande 2	PAS <sup>-</sup>	0,55
Peptide Pa	PAS <sup>-</sup>	0,58	0,59
Composant-3	PAS <sup>-</sup>	0,92	0,92
	PAS <sup>+</sup>	0,18 < $R_f$ < 0,27	0,33

a : valeurs de  $R_f$  calculées sur les profils des protéose-peptones totales des figures 3 et 19c

b : l'écart-type est de  $\pm 0,02$

### 3.2- Caractérisations physico-chimique et chimique des fractions issues de la FPLC.

**Teneur protéique et coefficient de conversion azote-protéine** : notre méthode FPLC-IH permet de séparer les protéose-peptones en deux groupes ; d'une part les peptides issus de l'hydrolyse plasminique des caséines (contenus dans FA et FB), et, d'autre part, les glycoprotéines hydrophobes (contenues dans FH1 et FH2). Ainsi, pour chacun des groupes, nous pouvons confirmer les valeurs des coefficients de conversion de KARMAN et Van BOEKEL (1986), à savoir 6,54 pour FA et FB et 6,55 pour FH1 et FH2. Ces auteurs considéraient le coefficient appliqué au composant-3 comme hypothétique.

Les taux protéiques les plus faibles coïncident avec les fractions glycoprotéiques FH1 et FH2 (figure 15 a). Il faut évidemment tenir compte dans la masse totale de la partie glycanique des constituants, dont la structure n'est pas pour l'instant élucidée.

**Composition en acides aminés** : la fraction FA semble contenir le fragment  $\beta$ -CN-4P (f 1-28), comme en témoigne les forts pourcentages de Glx et Ser (tableau 3). Le peptide  $\beta$ -CN-4P contient en effet 7 Glu et 5 Ser (dont 4 sont phosphorylées). Par contre, la structure primaire de ce peptide ne contient pas de Cys, Met et Tyr, ce qui est corrélé aux faibles teneurs déterminées dans FA pour ces acides aminés. Cependant, la présence de Phe et la bonne proportion de Asx montrent que  $\beta$ -CN-4P n'est pas à l'état pur dans cette fraction.

La fraction FB contient  $\beta$ -CN-5P. Ce fragment de la caséine  $\beta$  est très riche en Glu et Gln (respectivement 14 et 10 résidus), ce qui donne un fort pourcentage en Glx dans FB. La présence importante de 13 résidus Pro dans la structure primaire est également responsable des 7,5% de Pro.

La fraction FH1 est comparée à la lactophorine (KANNO, 1989b), à FHPP (PAQUET *et al*, 1988) et à la fraction glycoprotéique préparée par KESTER et BRUNNER (1982). On constate que les tendances dans les compositions en acides aminés sont similaires pour toutes ces fractions, et ce, malgré les modes différents de préparation. Notamment, la richesse de FH1 en Glx est retrouvée dans tous les cas. La richesse en Asx, Ser et Thr dans les fractions FH1 et FH2 pourrait témoigner (sous réserve que Asx représente essentiellement Asn) de la présence de séquences signales de N-glycosylation Asn-X-Ser/Thr. Les rapports acides aminés apolaires sur acides aminés totaux montrent le caractère hydrophobe de FH1 et de FH2 (respectivement 44% et 42%).

**Etude des spectres U.V. :** la méthode utilisée a été mise au point par MICLO *et al* (1991) pour identifier certains peptides purifiés par HPLC en phase inverse à partir d'un hydrolysate tryptique de la caséine  $\alpha_{S1}$ .

Les spectres U.V. et dérivées premières de nos fractions FPLC apportent de précieuses indications (figure 21). Notamment, nous mettons en évidence la présence de Trp dans FH1, et ce dans un rapport de 1 Trp pour 4 Tyr. Actuellement, la littérature ne donne pas de résultat quant à la présence ou l'absence de Trp dans le composant-3 des protéose-peptones. De plus, on remarque que la Phe est en quantité très importante dans cette fraction.

Le rapport déterminé de 3 Phe pour 1 Tyr de la fraction F9 est légèrement plus faible que le rapport théorique de 4 Phe pour 1 Tyr dans la structure primaire de  $\beta$ -CN-5P. Ceci pourrait avoir au moins deux explications, plus ou moins liées :

-la droite étalon Phe/Tyr en fonction de  $\Delta A/\Delta B$  est réalisée avec des acides aminés libres en solution et un facteur de correction doit être appliqué lorsque l'on analyse des peptides ;

-à cause du nombre important de résidus dans  $\beta$ -CN-5P (f 1-105 ou 1-107), le masquage probable de certains acides aminés (notamment de la Phe), lors du repliement secondaire puis tertiaire de la chaîne polypeptidique, provoque une baisse de l'absorption spectrale.

La similitude des spectres des fractions F9 et FB permet de dire que, par l'analyse des spectres et dérivées, on peut déceler la présence ou non d'un peptide aromatique majeur ( $\beta$ -CN-5P) dans un mélange. Il faut cependant rester prudent dans l'interprétation quantitative des résultats.

La fraction F10, après analyse de son spectre, contient les trois acides aminés et la Phe est prédominante. Ceci est en accord avec la présence de  $\beta$ -CN-1P et de PP3b.

L'absence d'absorption caractéristique entre 260 et 320 nm de FA montre que cette fraction ne contient pas ou peu d'acides aminés aromatiques. Le fait que FA contienne  $\beta$ -CN-4P et que cette fraction ne soit pas hydrophobe va dans le sens de ce résultat.

La fraction PPT, qui regroupe l'ensemble de ces fractions, contient tout naturellement les trois acides aminés, et notamment la Phe, qui est fortement représentée dans les deux constituants principaux des protéose-peptones, à savoir  $\beta$ -CN-5P et le composant-3.

***Microhétérogénéité des glycoprotéines de FH1 montrée par l'emploi d'urée :***

Lors de la PAGE-native, les glycoprotéines forment des liaisons hydrogènes avec la matrice de polyacrylamide par l'intermédiaire de leurs chaînes glycaniques, ce

qui interfère avec leur migration. Ce phénomène peut même être observé en présence de SDS (EDGE et SPIRO, 1987). L'urée, de par sa nature chimique, rompt les liaisons hydrogènes entre les glycoprotéines et le gel, en plus de son rôle dissociant des agrégats interprotéiques. Ainsi, nous pouvons mettre en évidence une forme d'hétérogénéité électrophorétique du composant-3 due probablement à une microhétérogénéité dans sa partie glycanique. De plus, les peptides Pa et  $\beta$ -CN-5P, qui ne sont ni sous une forme agrégée ni glycosylés, ne sont pas influencés dans leur mobilité relative par la présence d'urée (tableau 5).

Par séparation FPLC d'échange d'ions, la microhétérogénéité des glycoprotéines est montrée de façon plus claire, surtout pour la sous-unité 29 kDa (figure 22).

Un phénomène semblable a été observé pour une famille de glycoprotéines (appelées PZP3) de masse moléculaire moyenne de 36,5 kDa, extraites de la zone pellucide d'oocytes chez le porc (NAKANO *et al*, 1990). Les auteurs démontrent que l'hétérogénéité de la charge des glycoprotéines de PZP3 est due à la différence dans la composition des chaînes glycaniques. Les facteurs de variabilité sont principalement les taux d'acides sialiques, de sulfate fixé sur les résidus glycaniques, et également la longueur des chaînes glycaniques. La composition en acides aminés des 9 fractions collectées, après séparation par HPLC d'échange d'ions en présence d'urée 8 M, est identique dans tous les cas. Il en est de même pour les 9 profils électrophorétiques, où l'on retrouve la même bande à 36,5 kDa. Après déglycosylation chimique de PZP3, le chromatogramme se réduit alors à un seul pic correspondant à un composé plus homogène.

Des résultats similaires ont été obtenus lors du fractionnement par échange d'ions de certaines mucines associées au cancer du colon (SHIMAMOTO *et al*, 1989). Les auteurs isolent 7 "espèces" présentant des différences de charges. Cependant, les teneurs variables en acides sialiques des différentes espèces n'expliquent pas tout, car il faut également tenir compte de la nature et du nombre de résidus des chaînes glycaniques et de la structure des mucines.

Ainsi, dans nos travaux, nous dénombrons au moins 7 "espèces" distinctes pour la sous-unité de 29 kDa. Cependant, les composants 11 et 18 kDa sont rapidement élués à une molarité faible de NaCl et on ne peut montrer aisément leur différences de charge, si toutefois elles existent.

**Caractérisation par PAGE-SDS :** l'analyse par PAGE-SDS montre une analogie entre les profils des fractions renfermant le composant-3 préparées par différentes méthodes. Notre fraction FV possède sur son profil trois zones PAS<sup>+</sup> à des valeurs moyennes de 29, 19 et 11 kDa (figure 19 A). La fraction glycoprotéique

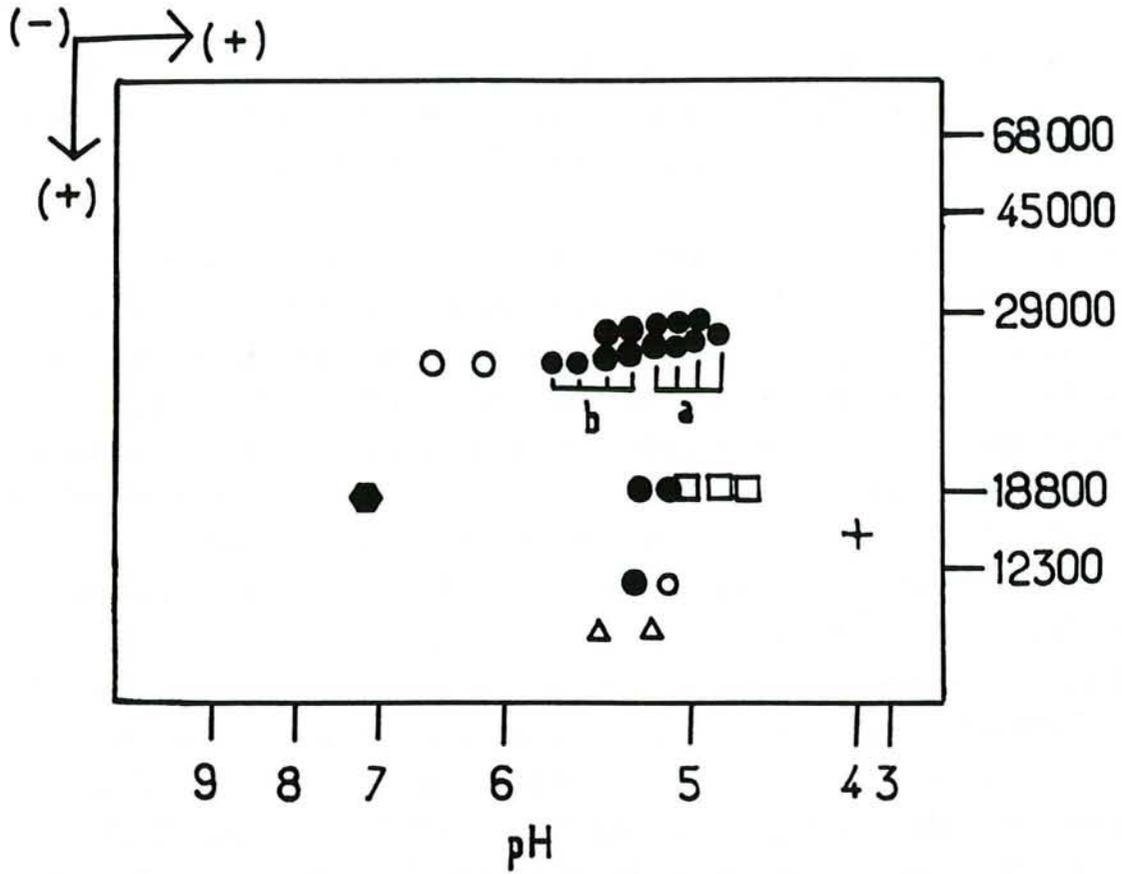
isolée par chromatographie d'affinité sur concanavoline A (KESTER et BRUNNER, 1982) présente deux zones principales PAS<sup>+</sup> entre 39,4 et 24,6 kDa et entre 20,9 et 17,7 kDa. Ces deux zones sont probablement similaires à nos bandes 29 et 19 kDa. Selon KESTER et BRUNNER (1982), c'est essentiellement le composant 19 kDa qui présente une spécificité antigénique commune avec les glycoprotéines solubles des membranes des globules gras.

La lactophorine présente des bandes communes avec les glycoprotéines solubles membranaires (KANNO, 1989b). Ces bandes sont PAS<sup>+</sup> et correspondent à des constituants de 17 et 25 kDa, qui sont probablement présents dans notre fraction FV.

De plus, la bande 11 kDa semble correspondre au composé P2 de 7 kDa mis en évidence par PAQUET *et al* (1988). Cependant, le peptide P2 ne semble pas réagir au réactif de Schiff. Peut-être y-a-t-il un problème de sensibilité de la réaction, car notre bande 11 kDa réagit faiblement en intensité ? Ni KESTER et BRUNNER (1982), ni KANNO (1989b) ne révèlent la présence de composés de masses moléculaires inférieures à 17 kDa. Ces auteurs utilisent des gels de polyacrylamide faiblement réticulés (T : 10%), qui donnent par conséquent de faibles résolutions pour les séparations de molécules de masses moléculaires inférieures à 14,4 kDa (l' $\alpha$ -lactalbumine migre en effet presque au front de migration).

Il faut noter que la détermination des masses moléculaires de glycoprotéines par PAGE-SDS est souvent sur-estimée, car ce type de composants a une migration retardée. En effet, le faible taux de fixation de molécules de SDS sur les glycoprotéines réduit le rapport charge/masse (FRANK et RODBARD, 1975). PODUSLO (1981) propose le tampon Tris-borate-EDTA à la place du tampon Tris-glycine communément utilisé en électrophorèse. Ainsi, les ions borate réagissent avec les unités glycaniques neutres, les transformant en complexes chargés à pH basique. La réaction augmente la charge nette négative des glycoprotéines ainsi que leur migration électrophorétique. Ainsi, on peut corréler la masse moléculaire avec la mobilité relative avec plus de précision. Cependant, nous avons préféré l'emploi du tampon Tris-glycine afin de pouvoir comparer nos résultats avec ceux des autres auteurs.

La masse moléculaire déterminée à 18 kDa pour  $\beta$ -CN-5P est sur-estimée, comparée à la valeur de 13,5 kDa suggérée par ANDREWS (1978a). Cette différence est probablement due à la conformation lâche de ce polypeptide riche en résidu Pro (13 Pro). Le volume spécifique important de la molécule retarde sa migration dans la matrice de polyacrylamide (ANDREWS, 1978a).



**Figure 24.** Cartographie bidimensionnelle des protéose-peptones obtenue par superposition des profils de PAGE-2D des fractions FPLC. □ :  $\beta$ -CN-5P ;  
 △ :  $\beta$ -CN-1P ; + : peptide Pa ; ● : spots PAS<sup>+</sup> du composant-3 ;  
 ○ : spots PAS<sup>-</sup> du composant-3 ; ◆ : constituants PAS<sup>+</sup> et BC<sup>-</sup> (Bleu de Coomassie) de FH2 ; a : PP3a ; b : PP3b.

Le doublet de bandes de 66 kDa environ, que l'on retrouve fréquemment sur les profils de PAGE-SDS est en fait un artefact dû à la présence de 2-mercaptoéthanol (BEIS et LAZOU, 1990).

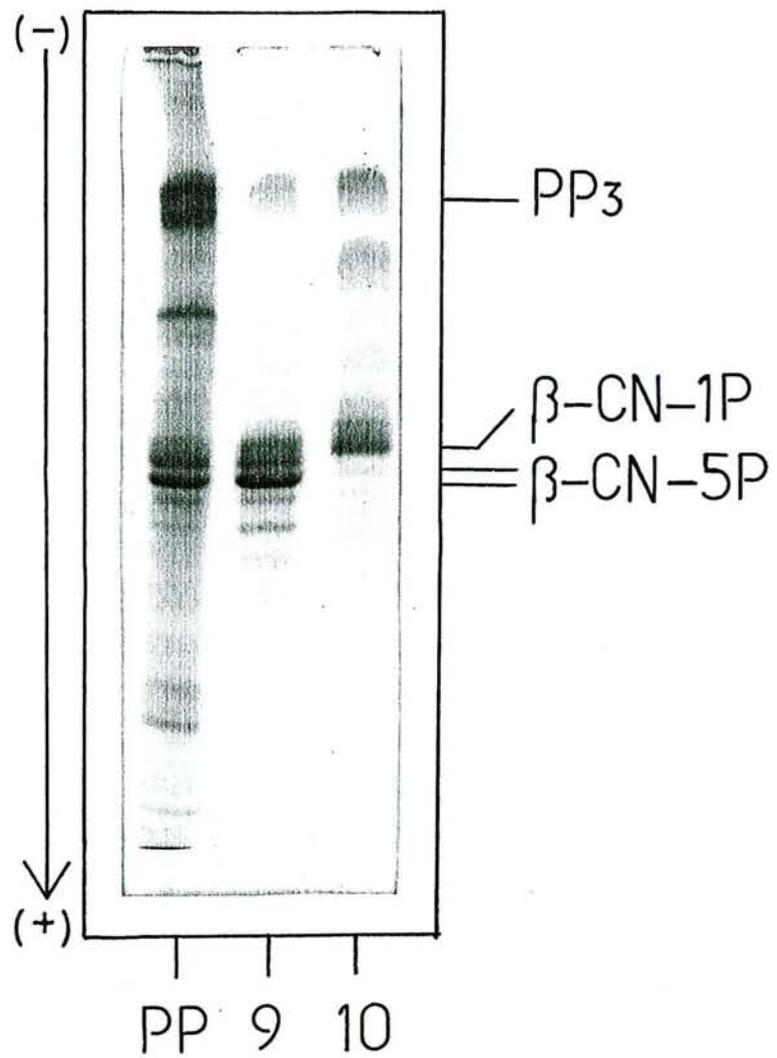
**Caractérisation par IEF :** cette technique a jusque-là été peu utilisée pour analyser les protéose-peptones du fait des faibles résolutions obtenues (KASPER et BRUNNER, 1978 ; PAQUET et ALAIS, 1982). Récemment, une optimisation de la technique par SANOGO *et al* (1990) nous a permis de bien séparer les divers constituants dans une gamme de pH large de 3 à 10 (figure 20). Nous avons également optimisé la révélation au Bleu de Coomassie G250 (voir matériel et méthodes), car la méthode classiquement utilisée (BLAKESLEY et BOEZI, 1977) est peu sensible pour les glycoprotéines.

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence la forte similitude entre les profils de FH1 et de la fraction FHPP. La même constatation est faite lorsque l'on compare le profil de la fraction non hydrophobe (FNHPP) avec les profils superposés de F9 et F10.

**Caractérisation par PAGE-2D :** à partir des profils des fractions FPLC obtenus par PAGE-2D, nous avons construit une cartographie bidimensionnelle des protéose-peptones (figure 24). Pour chacun des composants, on visualise ainsi sa masse moléculaire apparente, son pH isoélectrique apparent, sa nature glycosylée ou non. Ainsi, différents résultats peuvent être tirés de cette cartographie :

- le peptide  $\beta$ -CN-5P présente 3 spots, alors que 2 fragments sont actuellement connus. Le spot supplémentaire peut s'expliquer soit par une variabilité dans le taux de phosphorylation des résidus Ser, soit par le polymorphisme génétique de la caséine  $\beta$ . Dans cette deuxième hypothèse, les variants  $\beta$ -CN A1 et  $\beta$ -CN A2 représentent respectivement 56,1 et 42,1% de la caséine  $\beta$  du lait de vaches Holstein (NG-KWAI-HANG *et al*, 1984). Pour chacun des variants, KARMAN et Van BOEKEL (1986) distinguent théoriquement quatre formes de  $\beta$ -CN-5P, qui sont  $\beta$ -CNA1-5P (f 1-105 ou 1-107) et  $\beta$ -CNA2-5P (f 1-105 ou 1-107). Il est donc possible que  $\beta$ -CN-5P soit représenté par plus de deux spots ;

- les 2 spots localisés à 9 kDa et de pHi 5,1 et 5,3 semblent représenter  $\beta$ -CN-1P, majoritaire dans la fraction F10. Par déduction, on peut localiser la position de ce peptide sur le profil obtenu par PAGE-native (figure 25). Actuellement, dans la littérature sa localisation exacte n'a pas été déterminée. Nos résultats apportent des précisions aux travaux de ANDREWS et ALICHANIDIS (1983), qui montraient que les peptides principaux issus de l'hydrolyse de la caséine  $\beta$  par la plasmine



**Figure 25.** PAGE-native des fractions F9 et F10 et localisation de  $\beta$ -CN-1P sur le profil des protéose-peptones (PP).

migraient plus lentement que  $\beta$ -CN-5P. La présence de  $\beta$ -CN-1P dans F10 est renforcée par l'analyse du spectre U.V. de la fraction ;

-Le polypeptide Pa est un composé majeur des protéose-peptones caractérisé par une masse moléculaire apparente de 16 kDa et par le pH isoélectrique le plus acide (pHi 4) déterminé jusque-là (Pa voulant signifier "peptide acide") ;

-les glycoprotéines de la fraction FV ont des points isoélectriques acides compris entre 4,9 et 6,1. La teneur élevée en acides sialiques (proche de 4% selon KESTER et BRUNNER (1982)) leur confère un caractère acide. Dans d'autres travaux, les variants isoélectriques du lactogène placentaire bovin riche en acides sialiques sont séparés par PAGE-2D (SHIMOMURA et BREMEL, 1988). On constate une augmentation générale des pHi des variants après déglycosylation enzymatique ;

-la sous-unité 29 kDa présente une microhétérogénéité mise en évidence par PAGE-2D (au moins 7 variants isoélectriques), mais également par FPLC-IH (élution successive de PP3a et PP3b par exemple) ;

-présente dans la fraction FVI, la zone diffuse (fortement révélée par le réactif de Schiff mais faiblement par le Bleu de Coomassie) correspond vraisemblablement à des glycopeptides fortement glycosylés (SHIMIZU *et al*, 1976). Ces composés seraient responsables de l'aspect opalescent de FVI, fraction que PAQUET *et al* (1988) éliminaient par chromatographie d'hydroxyapatite ;

-une corrélation entre l'hydrophobicité effective des glycoprotéines et leur pH isoélectrique peut être établie. En effet, les différents composants sont élués dans l'ordre croissant de leur pHi, à savoir PP3a ( $4,9 < \text{pHi} < 5,1$ ) < PP3b ( $5,1 < \text{pHi} < 5,9$ ) < FV ( $4,9 < \text{pHi} < 6,1$ ) < FVI ( $7,1 < \text{pHi} < 7,2$ ). Cette constatation rejoint la théorie sur la chromatographie d'interactions hydrophobes annonçant qu'une protéine a son adsorption maximale lorsque le pH (de la phase mobile) est proche de son pH isoélectrique (OCHOA, 1978). De même, les deux peptides non glycosylés de la fraction FVI, qui ont des pHi élevés de 6,1 et 6,3 proches du pH 6,8 de la phase mobile, sont fortement adsorbés dans la colonne.

#### **4- Conclusion.**

La combinaison des deux techniques séparatives et hautement résolutive, FPLC-IH et PAGE-2D, a permis, en association avec d'autres techniques usuelles, de séparer les composants majeurs des protéose-peptones et de déterminer certains paramètres physico-chimiques jusque-là mal définis dans la littérature.

Notamment, les méthodes d'analyses ont montré la complexité de la fraction hydrophobe contenant le composant-3. La difficulté de sa caractérisation réside principalement dans l'existence d'une microhétérogénéité des chaînes glycaniques des glycoprotéines.

Afin de résoudre partiellement cette difficulté, il est donc nécessaire d'apporter des éclaircissements quant à la nature chimique et la structure de ces groupements glycaniques.

## **CHAPITRE 2**

**Etude de la partie glycanique du composant-3**

## 1- Introduction.

### 1.1- Les chaînes glycaniques : structures et microhétérogénéité.

La glycosylation d'un grand nombre de protéines représente la principale des modifications post-traductionnelles, du fait de l'universalité du phénomène. Les glycoprotéines sont largement distribuées chez les animaux et les végétaux et elles ont été récemment observées chez les procaryotes (LEE *et al*, 1990). La partie glycanique joue de nombreux rôles importants (MONTREUIL *et al*, 1987 ; SCHACHTER, 1986), notamment au niveau de :

- la protection d'une chaîne peptidique contre l'attaque protéolytique ;
- l'induction et la stabilisation de la conformation d'une protéine dans une forme biologiquement active ;
- la diminution de l'immunogénicité des protéines ;
- la reconnaissance et l'association avec des virus, enzymes et lectines ;
- l'insertion des glycoprotéines dans les membranes cellulaires ;
- la reconnaissance et l'adhésion intercellulaires ;
- le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire.

De plus, la structure glycanique des glycoprotéines membranaires des cellules est profondément altérée lorsque celles-ci deviennent cancéreuses. SHIMAMOTO *et al* (1989) formulent l'hypothèse que les mucines associées au cancer du colon seraient incomplètement glycosylées et auraient des chaînes glycaniques plus courtes que dans le cas normal. Cette transformation moléculaire pourrait être un facteur d'induction du cancer.

Ainsi, et d'une façon générale, il est nécessaire de déterminer la structure primaire et la conformation des chaînes glycaniques afin de comprendre les rôles biologiques joués par les glycoprotéines. Les complexes glycaniques ont deux propriétés structurales qui les distinguent des deux autres classes de macromolécules biologiques (protéines et acides nucléiques) : le profil de ramification et la microhétérogénéité (SCHACHTER, 1986).

#### 1.1.1- Profil de ramification.

Dans les glycoprotéines, la liaison covalente entre le résidu glucidique et l'acide aminé peut être soit de nature N-glycosidique (GlcNAc( $\beta$ 1-N)Asn) soit de nature O-glycosidique (GalNAc( $\alpha$ 1-3)Ser/Thr dans les glycoprotéines de type mucine) (tableau 6). Dans ce dernier cas, plusieurs types de liaisons existent selon la nature des deux résidus glucidique et acide aminé.

**Tableau 6 : Classification des glycoprotéines  
(d'après MONTREUIL, 1984)**

Type de glycoprotéines	Types de liaisons	
	Monosaccharide	Acides aminés
<i>N - glycosylprotéines</i>	GlcNAc	Asn
<i>O - Glycosylprotéines</i>		
Type Mucine	GalNAc	Ser, Thr
Type Protéoglycane	Xyl	Ser
Type Collagène	Gal	OH - Lys
Type Extensine	Ara	OH - Pro

Xyl : xylose ; Ara : arabinose

La structure primaire des glycanes est construite d'un core interne sur lequel se ramifient des antennes. Dans le cas des O-glycosylprotéines de type mucine, on remarque l'absence d'une spécificité structurale (figure 26). En réalité, ces structures très diverses sont trouvées dans des glycoprotéines d'origines très différentes. Elles peuvent être considérées comme des structures jouant un rôle physico-chimique en modulant la conformation de la chaîne peptidique (MONTREUIL, 1984). Ce type de glycanne est en effet souvent localisé dans des domaines stratégiques de la partie protéique, par exemple dans la zone charnière des immunoglobulines. Dans le cas des IgA sécrétoires, on trouve 23 chaînes O-glycosylées qui possèdent un core interne commun Gal( $\beta$ 1-3)[GlcNAc( $\beta$ 1-6)]GalNAc-ol et qui se différencient lors de leur élongation (PIERCE-CRETEL *et al*, 1989).

Les N-glycosylprotéines peuvent être divisées en trois familles selon la nature des glycanes :

- les glycanes de type oligomannosidique (figure 27b). Ils sont largement distribués chez les animaux et les végétaux. Ils peuvent être considérés comme des métabolites intermédiaires dans le processus de maturation des glycanes de type N-acétyllactosaminique. Cependant, ces structures oligomannosidiques peuvent avoir un rôle biologique, comme par exemple dans l'adhésion d'*Escherichia coli* sur les cellules épithéliales humaines par l'intermédiaire d'une lectine présente dans les *pili* des bactéries et qui a une spécificité pour les oligomannosides (MONTREUIL, 1984) ;
- les glycanes de type complexe (figure 27c). Ils proviennent de l'addition sur le core interne d'unités N-acétyllactosamines (Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc). Ils contiennent également en quantités variables et en positions externes des acides sialiques et du fucose. Ces structures offrent une diversité large. Elles jouent un rôle de signaux de reconnaissance. Parfois, la glycosylation est incomplète du fait de la déficience d'une glycosyltransférase ou dans certains cas pathologiques (SHIMAMOTO *et al*, 1989) ;
- les glycanes de type hybride. Ils contiennent à la fois des structures oligomannosidiques et N-acétyllactosaminiques. Ils sont actuellement considérés comme des intermédiaires dans la biosynthèse des glycanes de type N-acétyllactosaminique.

Ainsi, les substitutions sur les chaînes glycaniques répondent à des mécanismes enzymatiques spécifiques, impliquant la nature du résidu glucidique et le type de son branchement. La biosynthèse des glycanes est régie par le concept de : "une liaison glycosidique-une glycosyltransférase" (MONTREUIL, 1984).

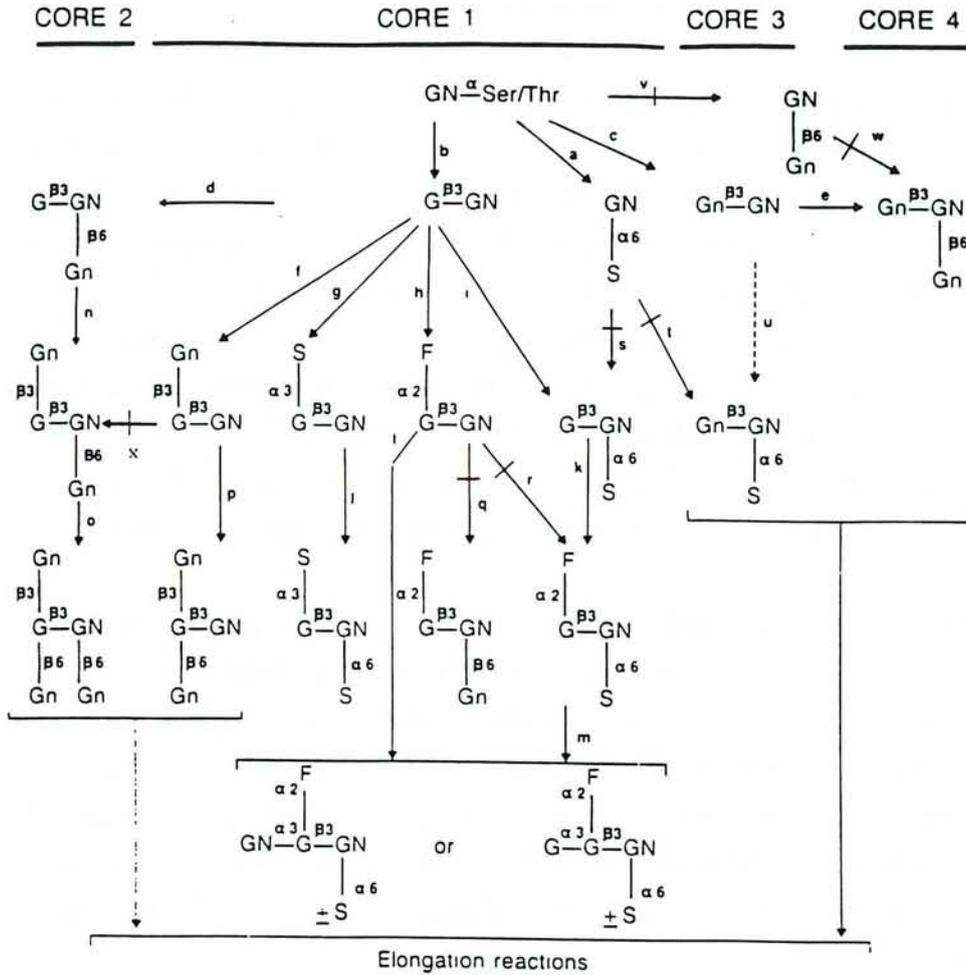


Figure 26 a. Biosynthèse des chaînes glycaniques O-glycosidiquement liées aux protéines. GN : GalNAc ; Gn : GlcNAc ; G : Gal ; S : NeuAc ; F : Fuc (d'après SCHACHTER, 1986).



Figure 26 b. Quelques exemples de structures glycaniques O-glycosidiquement conjuguées aux protéines par une liaison GalNAc(α1-3)Ser/Thr (d'après MONTREUIL, 1984).

### 1.1.2- Microhétérogénéité.

Ce concept de spécificité énoncé ci-dessus ne suffit pas à expliquer la grande variété des glycanes. La sérotransferrine de rat présente au moins six variants qui diffèrent seulement dans leur structure glycanique complexe biantennée (SPIK *et al*, 1991). Il existe donc de nombreux facteurs responsables de la microhétérogénéité des structures (SCHACHTER, 1986) :

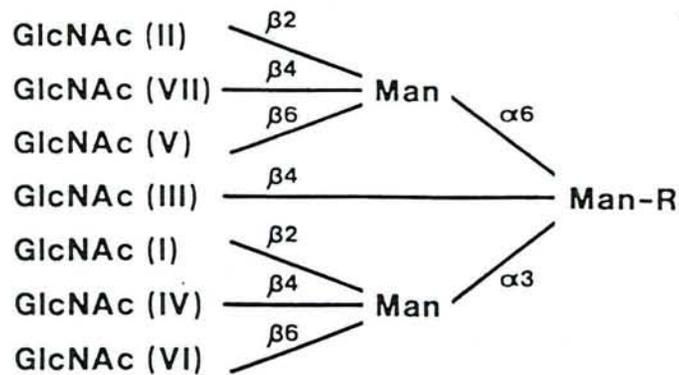
(i) La compétition entre plusieurs enzymes pour un même substrat est le premier phénomène responsable de la variabilité des glycanes. Par exemple, le core interne de type 1 Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc( $\alpha$ 1-3)Ser/Thr peut être sous l'action de plusieurs enzymes différentes pour donner finalement des glycanes hétérogènes branchés sur le même acide aminé de la chaîne polypeptidique.

(ii) L'effet GO-NO GO et NO GO-GO. L'insertion d'un résidu glucidique critique (X) dans la structure glycanique peut la convertir d'un état de substrat à un état de non-substrat (effet GO-NO GO). Par exemple, l'activité de la GlcNAc-transférase II peut être bloquée si le substrat contient une unité GlcNAc bissectrice (GlcNAc III) ou une unité Gal( $\beta$ 1-4) liée à GlcNAc IV. Cette enzyme a un site de reconnaissance GlcNAc( $\beta$ 1-2)Man( $\alpha$ 1-3)Man( $\beta$ 1-4) distinct du site catalytique. Les résidus GlcNAc III ou Gal provoquent alors un encombrement stérique au niveau du site de reconnaissance. A l'inverse, dans l'effet NO GO-GO, l'insertion d'un résidu glucidique critique (Y) convertit un non-substrat en un substrat.

(iii) Spécificité des types de branchements. Certaines glycosyltransférases ont une action préférentielle sur un bras particulier de la chaîne glycanique. Par exemple, l'élongation de glycanes complexes biantennés par la  $\beta$ 4-Gal-transférase est réalisée de préférence sur le bras initié par le résidu Man $\alpha$ 3 alors que l' $\alpha$ 3-Gal-transférase agit plutôt sur le bras Man $\alpha$ 6.

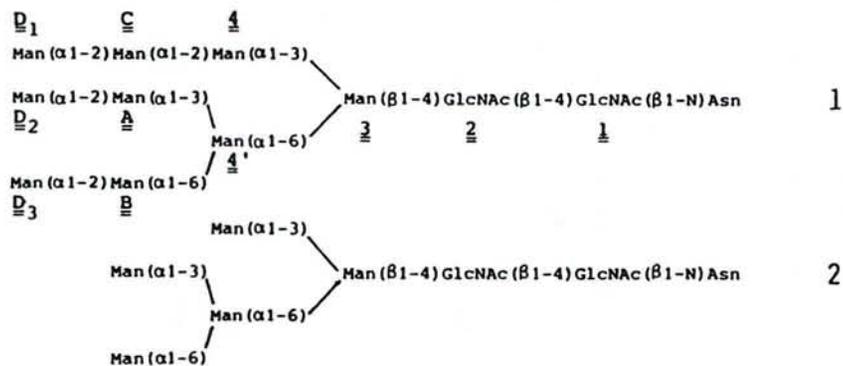
(iv) Le rôle du polypeptide. Une étude modélisée *in vitro* concernant la maturation d'une chaîne oligomannosidique biotinylée montre des différences de structure glycanique selon que le glycanne biotinylé est libre ou relié à l'avidine (YET *et al*, 1988). La matrice protéique joue donc un rôle non négligeable dans le contrôle de la biosynthèse des glycanes.

Une étude récente montre également que des peptides contenant la séquence consensus de N-glycosylation Asn-X-Thr doivent posséder en plus une structure secondaire "consensus" afin d'être glycosylés par une oligosaccharyltransférase

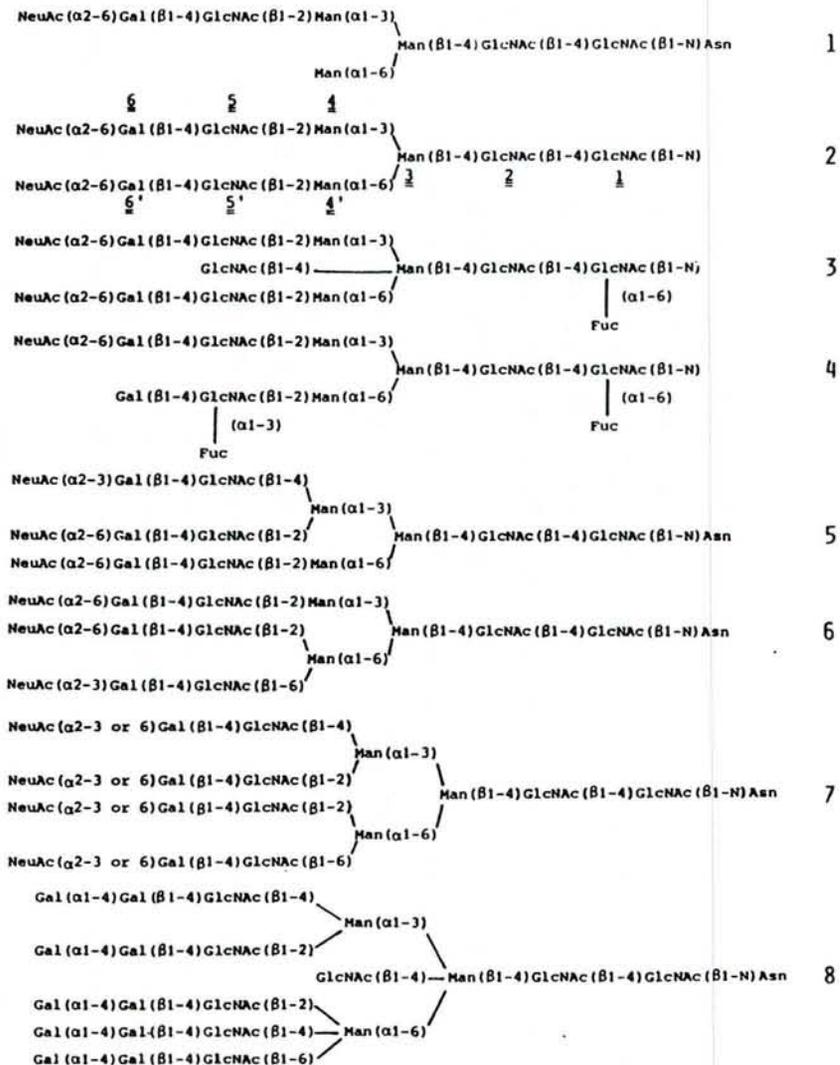


**Figure 27 a.** Structure hypothétique illustrant toutes les ramifications possibles initiées par des résidus GlcNAc. Ces derniers ont été numérotés arbitrairement (d'après SCHACHTER, 1986).

49 bis



**Figure 27 b.** Structures de type oligomannosidique (d'après MONTREUIL, 1984).



**Figure 27 c.** Structures de type N-acétyllactosaminidique ou type complexe (d'après MONTREUIL, 1984).

(IMPERIALI et SHANNON, 1991). Les peptides ne possédant pas le motif structural secondaire ne sont pas glycosylés.

(v) L'appareil de Golgi est hautement compartimentalisé et peut être comparé à une chaîne de fabrication où les transférases et glycosidases sont disposées dans les endomembranes dans l'ordre où elles doivent intervenir dans la biosynthèse des glycoprotéines (figure 28). Ce sont donc les substrats en cours de synthèse qui exercent les divers contrôles sur le processus enzymatique d'assemblage.

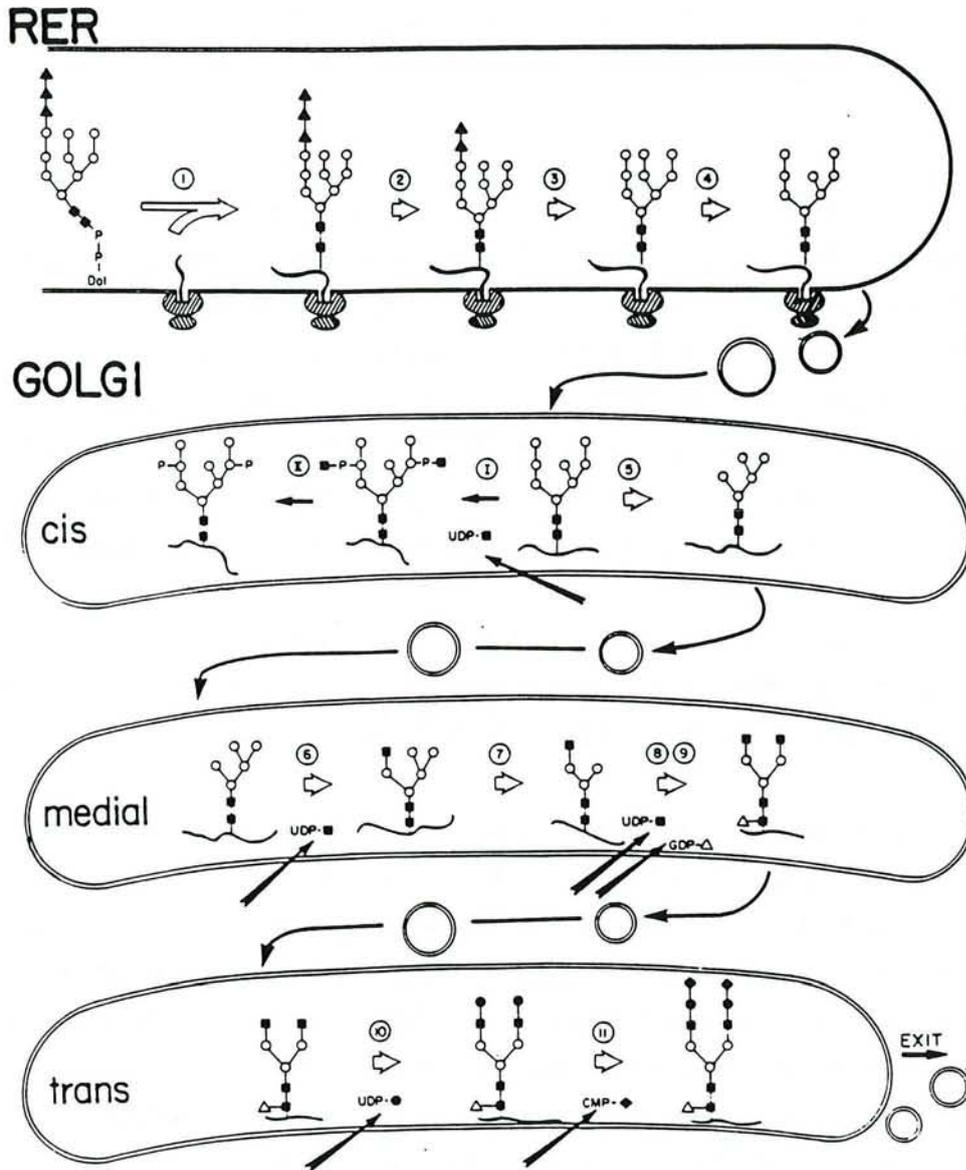
Il existe des protéines de transport membranaire qui apportent les unités glucidiques sous forme associées à un nucléotide. Ces protéines jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la synthèse glycanique et sont un facteur supplémentaire susceptible d'augmenter la microhétérogénéité, notamment en cas de déficience de ces transporteurs.

Finalement, il faut ajouter à la liste une variété de facteurs environnementaux, comme le pH du compartiment luminal, la présence de cations, de pyrophosphatases dans l'appareil de Golgi.

(vi) Le polymorphisme génétique au niveau de la synthèse des glycosyltransférases a un rôle indirect sur la microhétérogénéité des glycanes. Le meilleur exemple est celui des antigènes des groupes sanguins humains ABO et Lewis. Les gènes responsables de ces différents groupes codent pour une série de glycosyltransférases :  $\alpha$ 3-GalNAc-transférase A-dépendante,  $\alpha$ 3-Gal-transférase B-dépendante,  $\alpha$ 2-Fuc-transférase H-dépendante (SCHACHTER, 1986).

Le polymorphisme génétique peut être un système de régulation du taux de glycosylation. L'exemple des O-glycosylprotéines de type mucine des membranes de globules gras (lait humain et bovin) possédant des séquences tandem répétées riches en Ser et Thr est décrit dans le chapitre 3.

Dans le domaine laitier, la caséine  $\kappa$  est une bonne illustration de la microhétérogénéité des glycoprotéines. Sa structure glycanique est actuellement bien connue. La caséine  $\kappa$  est constituée d'une chaîne polypeptidique de 169 acides aminés comportant trois à six sites de O-glycosylation (FIAT et JOLLES, 1989). La fraction de caséine  $\kappa$  du lait bovin est constituée de 34% de caséine  $\kappa$  non glycosylée, 30% de caséine  $\kappa$  contenant un GalNAc et deux NeuAc (acide N-acétylneuraminique), 18% contenant trois ou quatre NeuAc et deux GalNAc et 6% contenant cinq à sept NeuAc et trois GalNAc. Selon les auteurs, la glycosylation répond à un mécanisme aléatoire.



**Figure 28.** Biosynthèse d'une chaîne glycanique N-glycosidique de type complexe biantennée. Enzymes intervenant : (1) transfert de Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> du dérivé de dolichol pyrophosphate au peptide en cours de synthèse lié au ribosome ; (2) α-glucosidase I ; (3) α-glucosidase II ; (4) α2-mannosidase ; (5) α-mannosidase I ; (6) GlcNAc-transferase I ; (7) α-mannosidase II ; (8) GlcNAc-transferase II ; (9) α6-fucosyltransferase ; (10) Gal-transferase ; (11) sialyltransferase ; (I) N-acétylglucosaminyl phosphotransferase (d'après SCHACHTER, 1986).

■ GlcNAc; ○ Man; ▲ Glc; △ Fuc; ● Gal; ● NeuAc.

De plus, la microhétérogénéité varie selon les conditions physiologiques de l'animal. Dans le colostrum, neuf structures glycaniques ont été caractérisées contre quatre structures dans le cas de la caséine  $\kappa$  native du lait (figure 29). Le rôle biologique des glycanes est actuellement mal connu et a fait l'objet de beaucoup de controverses. Cependant, on sait que ces composés ont un rôle important lors de la formation des micelles de caséine et dans leur stabilisation.

Il apparaît donc que de nombreux facteurs de variabilité entrent en jeu dans la construction des structures glycaniques, et leur connaissance permettra de mieux comprendre la fonctionnalité des groupements glucidiques. Mais pour ce faire, d'autres études doivent être entreprises concernant l'aspect tridimensionnel de l'interaction protéine-glycane. Actuellement, ce genre d'étude commence à se développer.

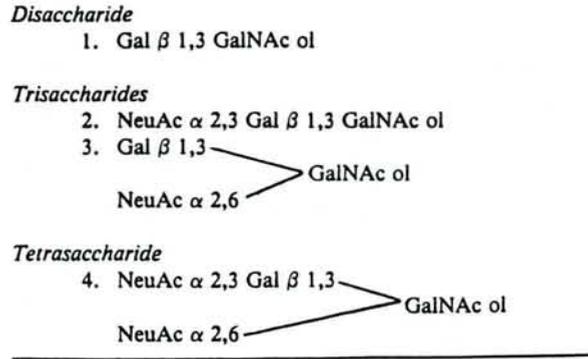
## **1.2- Les glycoprotéines : relation glycane-apoprotéine.**

### **1.2.1- Les antennes des N-glycosylprotéines.**

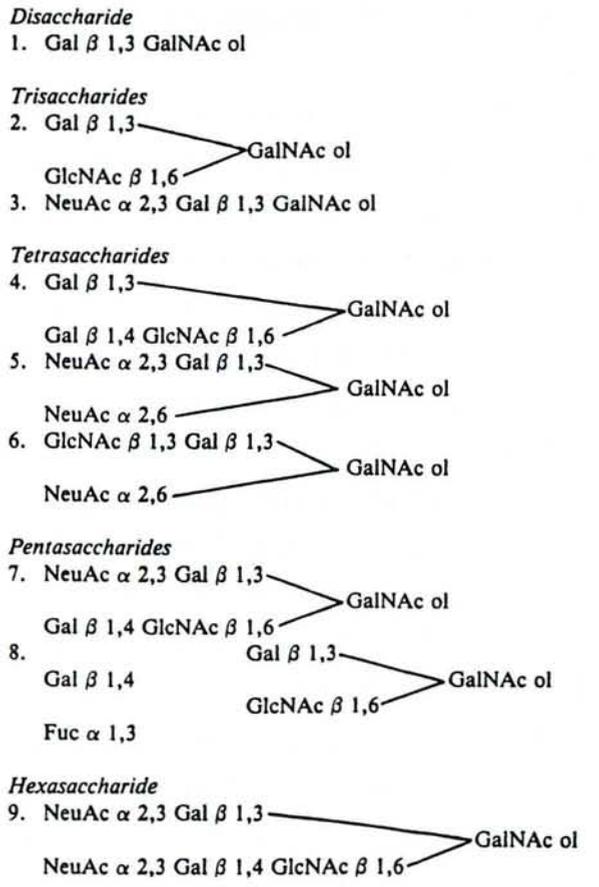
La construction de modèles moléculaires a permis d'appréhender une vue spatiale de certaines structures glycaniques, comme la chaîne biantennée de la sérotransferrine humaine. Plusieurs modèles sont actuellement proposés (figure 30a ; MONTREUIL, 1984). La configuration en Y peut être divisée en deux parties. La première est compacte et correspond au core interne dont la rigidité est assurée par des liaisons hydrogènes. La seconde est plus lâche et est constituée par les deux antennes porteuses de l'activité biologique. Dans la structure en T, l'antenne  $\alpha$ 1-3 est disposée perpendiculairement à l'antenne  $\alpha$ 1-6, tandis que dans la structure en forme d'oiseau, les deux antennes sont encore plus éloignées l'une de l'autre par rotation autour de la liaison  $\alpha$ 1-6 du mannose. Enfin, la structure en forme d'aile brisée montre un repliement de l'antenne  $\alpha$ 1-6 le long du core interne. Cette conformation semble favorable à la présence d'une bissectrice (GlcNAc III lié à l'hydroxyle en position C4 du résidu  $\beta$ -Man).

Pour les structures complexes tétraantennées, MONTREUIL (1984) propose le modèle du parapluie (figure 30b). La conformation "parapluie ouvert" est plus favorable que la conformation "parapluie fermé" lorsque les antennes possèdent des charges négatives apportées par la présence d'acides sialiques terminaux. Ces charges peuvent maintenir fermement la conformation en interagissant avec les charges positives des acides aminés de la chaîne polypeptidique. Le clivage des résidus d'acides sialiques rend les antennes plus libres et plus mobiles et l'effet protecteur des glycanes est aboli ; il en résulte une plus grande susceptibilité des

A



B



**Figure 29.** Structures des chaînes O-glycosidiques de la caséine  $\kappa$  bovine mises en évidence dans le lait (A) et dans le colostrum (B) (d'après FIAT et JOLLES, 1989).

glycoprotéines à la dégradation protéolytique (MONTREUIL, 1984). Tous ces modèles de conformation spatiale sont appuyés par de nombreuses études de RMN, de diffraction aux rayons X, ou des techniques de dispersion des neutrons.

Les chaînes glycaniques ont donc un double caractère avec un core interne rigide et des antennes flexibles et cela peut jouer un rôle essentiel dans la fonction biologique des glycoprotéines.

### 1.2.2- Le core interne des N-glycosylprotéines.

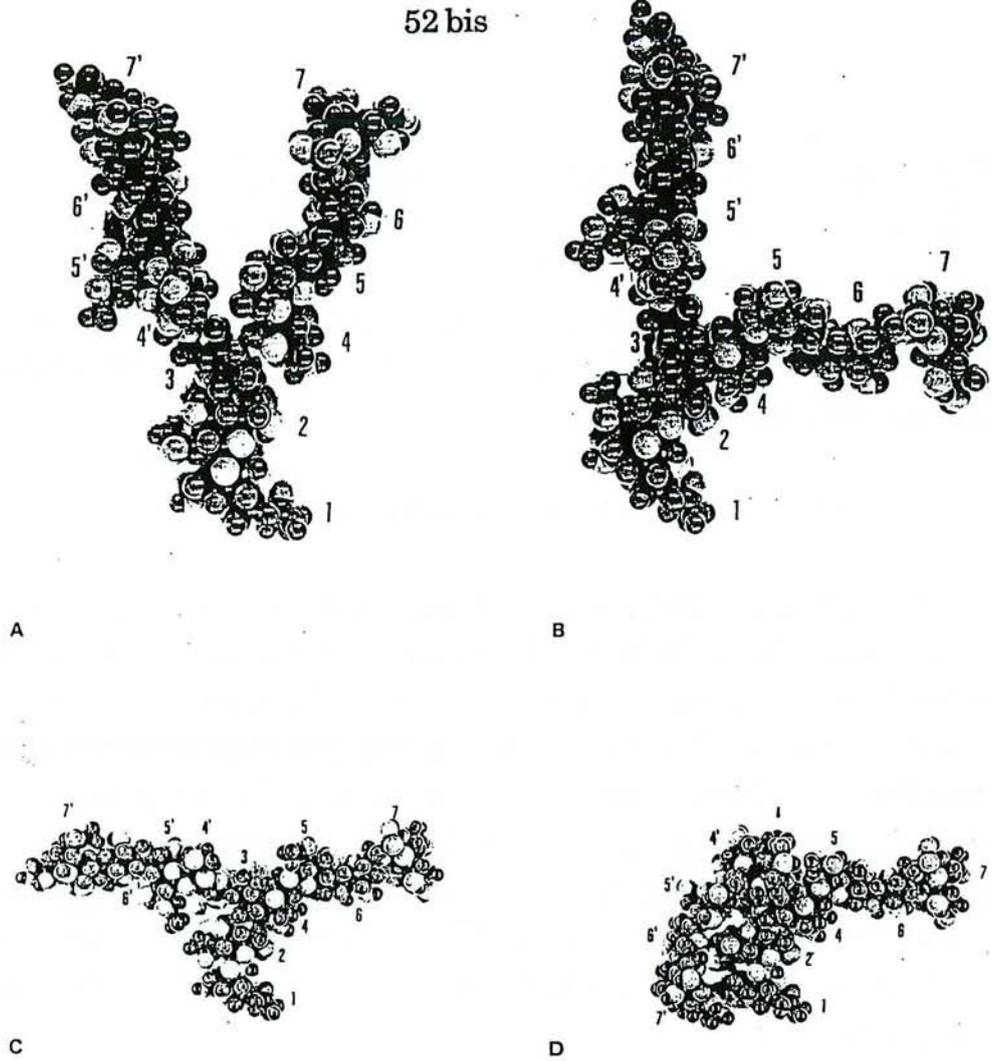
On peut dire, d'une façon globale, que le core interne stabilise plutôt la structure secondaire de la protéine alors que les antennes interagissent surtout avec les structures tertiaire et quaternaire de la protéine. Le rôle du core interne est mis en évidence dans les travaux de WALSH *et al* (1990) concernant la glycoprotéine  $\beta 2$  purifiée du plasma humain. Cette macromolécule possède cinq sites de N-glycosylation sur lesquels sont fixés des glycannes complexes biantennés et triantennés. La chaîne polypeptidique (326 résidus) est riche en Pro et en Cys (respectivement 31 et 22 résidus), qui lui imposent des contraintes structurales (formation de " $\beta$ -turn", de ponts disulfures) à l'origine de la structure secondaire de la glycoprotéine.

L'hydrolyse des glycannes par six exoglycosidases qui procèdent par récurrence montre que, à chaque étape du clivage, la structure secondaire n'est pas significativement altérée lorsque les antennes sont dégradées jusqu'aux Man( $\alpha 1-3$ ) et Man( $\alpha 1-6$ ) ; c'est seulement lorsque l'on attaque le core interne (hydrolyse jusqu'au Man( $\beta 1-4$ ) ou hydrolyse totale par l'endoglycosidase D) que la structure secondaire est sérieusement modifiée (figure 31b).

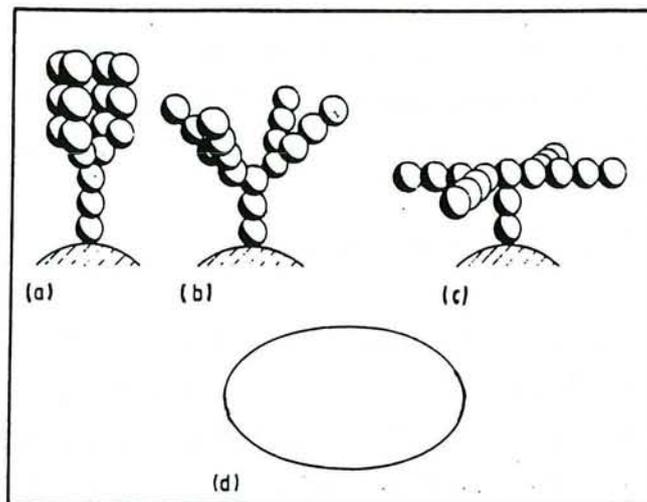
Ainsi, il est raisonnable de penser que, dans le processus de biosynthèse, l'hydrolyse des oligomannosides lors de la maturation des chaînes glycaniques permet d'assurer la conformation secondaire propre de la glycoprotéine. Ensuite, l'addition des antennes permet à la glycoprotéine d'acquérir sa fonction biologique.

### 1.2.3- Les O-glycosylprotéines.

Les mucines ont une masse moléculaire généralement très élevée ( $> 10^5$  Da) et sont fortement O-glycosylées, ce qui confère des propriétés visco-élastiques aux sécrétions muco-sales (GERKEN *et al*, 1989). La partie polypeptidique est surtout composée d'une structure secondaire non ordonnée. L'étude par RMN des mucines sous-maxillaires chez les ovins met en évidence que la structure très lâche des mucines est régie par des interactions stériques entre les acides aminés proches du



**Figure 30 a.** Conformations spatiales d'une chaîne de type complexe biantennée. A : conformation en "Y" ; B : conformation en "T" ; C : conformation en "forme d'oiseau" ; D : conformation en "forme d'aile brisée" (d'après MONTREUIL, 1984).



**Figure 30 b.** (a), (b) et (c) Conformations spatiales en parapluie (fermé ou ouvert) de la chaîne glycanique tétraantennée de l'ovomucoïde. (d) L'ellipse de dimensions 5,3 x 3,1 nm correspond à l'apoprotéine (MONTREUIL, 1984).

site de glycosylation et les résidus GalNAc, et, à un degré plus faible, les résidus d'acides sialiques. Lors de la glycosylation des mucines, les résidus GalNAc induisent une augmentation des dimensions des mucines d'un facteur 2 et l'addition des acides sialiques sur les résidus GalNAc augmente encore les dimensions par un facteur 1,5.

Les travaux modélisés de HOLLOSI *et al* (1990) montrent qu'il existe des "glyco-turn" (analogues aux " $\beta$ -turn" des polypeptides) de différents types entre Ser et la molécule 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- $\beta$ -D-galactopyrannoside (figure 31a). Ces "glyco-turn" sont stabilisés par des liaisons hydrogènes, qui rendent l'acide aminé Ser rigide. Si de telles structures existent naturellement dans les mucines, elles pourraient donc être en partie responsable du déplissement de ces glycoprotéines.

### 1.3- Rôle des glycannes dans la spécificité des lectines.

Les lectines sont des protéines ou glycoprotéines, d'origines bactérienne, végétale ou animale, non synthétisées par un système immunitaire, dépourvues d'activité enzymatique, capable de se lier spécifiquement à des glucides simples ou des chaînes glycaniques sans les modifier. Grâce à leur spécificité de reconnaissance des structures glycaniques, les lectines ont été utilisées comme ligands en chromatographie d'affinité pour la purification d'enzymes glycosylées ou d'autres glycoprotéines (DULANEY, 1979).

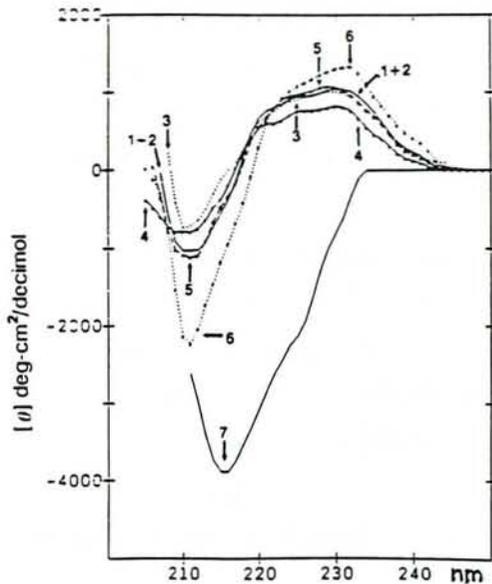
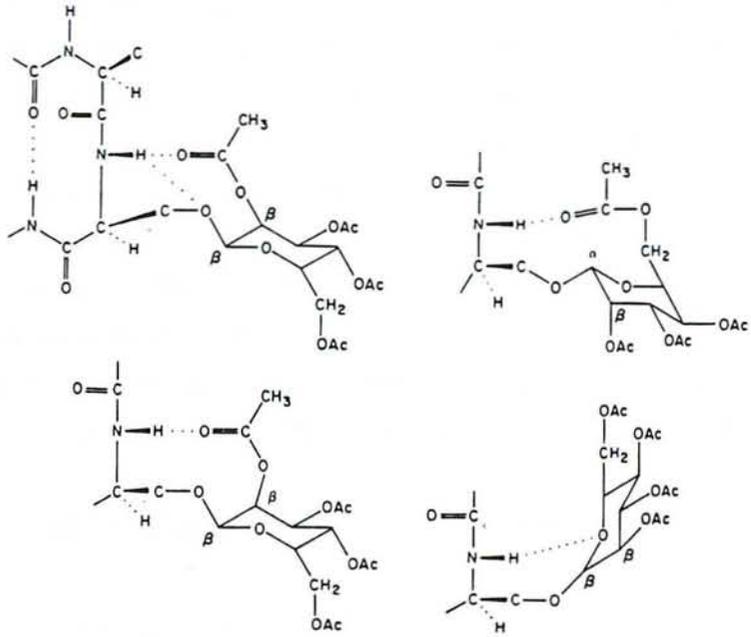
Les lectines ont au moins deux sites de fixation des glycannes, car elles sont capables de précipiter les glycoconjugués et d'agglutiner les cellules.

Dans le processus biologique de reconnaissance, les chaînes glycaniques des glycoprotéines interagissent par des liaisons hydrogènes avec les chaînes polypeptidiques des lectines (BHATTACHARYYA et BREWER, 1988).

Récemment, une étude structurale aux rayons X de l'interaction entre le glycanne Man( $\alpha$ 1-3)Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc et l'isolectine I, dont la structure cristalline est similaire à celle de la concanavoline A, met en évidence le rôle majeur des molécules d'eau qui forment un véritable canal entre les deux entités (figure 31c ; BOURNE *et al*, 1990).

La conformation spatiale des glycannes joue un rôle important dans l'interaction avec les lectines (DÉBRAY et MONTREUIL, 1991). Ainsi, la lectine LCA de *Lens culinaris* présente une plus forte affinité pour les glycopeptides que pour les glycannes séparés de ces N-glycosylpeptides par hydrazinolyse. Ceci peut s'expliquer par le fait que la liaison des glycannes à la chaîne peptidique rend la séquence du core interne Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N)Asn rigide et plus à même d'interagir avec LCA.

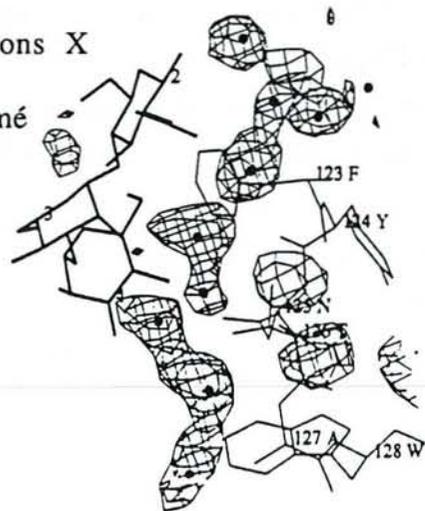
**Figure 31 a.** Représentation schématique des différents types possibles de "glyco-turn" (d'après HOLLOSI *et al*, 1990).

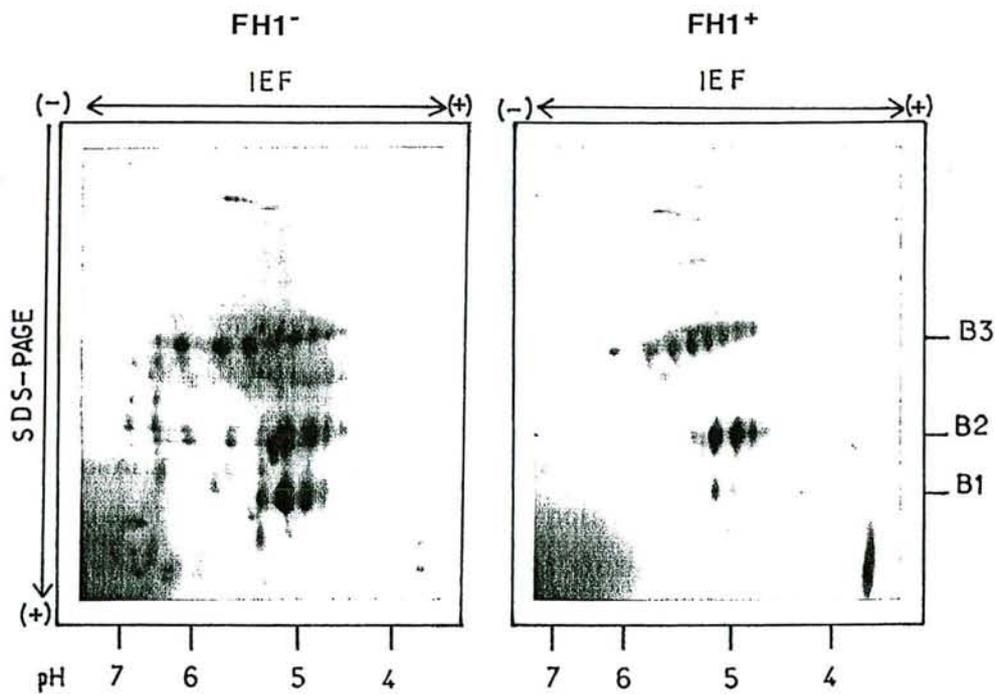
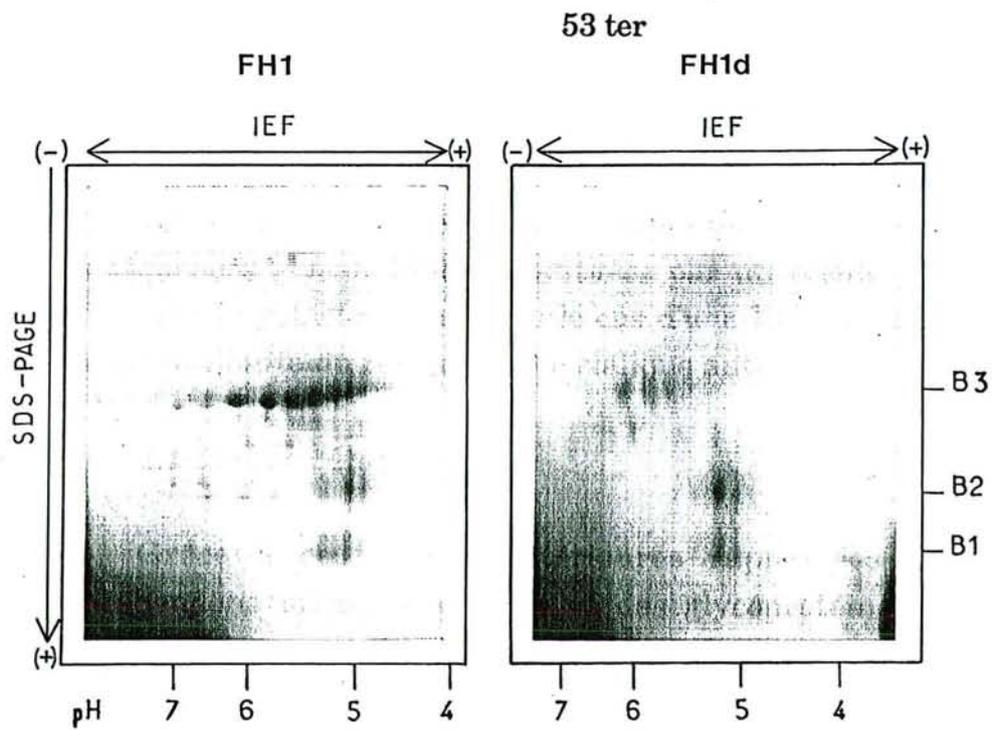


**Figure 31 b.** Spectre de dichroïsme circulaire de la glycoprotéine  $\beta 2$  native et de ses dérivés partiellement déglycosylés.

1 : glycoprotéine native ; 2 : dérivé asialo ;  
3 : dérivé agalacto ; 4 : dérivé  $\alpha$ -N-acétyl-  
glucosaminido ; 5 : dérivé  $\alpha$ -mannosido ;  
6 : dérivé  $\alpha$ - $\beta$ -mannosido ; 7 : dérivé obtenu  
par hydrolyse à l'endoglycosidase D  
(d'après WALSH *et al*, 1990).

**Figure 31 c.** Structure déduite de l'analyse aux rayons X de l'interaction entre l'isolectine I et le triose  $\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ , montrant le canal formé par les molécules d'eau liées aux atomes de  $\text{Man}_3$  et  $\text{GlcNAc}_2$  (d'après BOURNE *et al*, 1990).





**Figure 32.** PAGE-2D des fractions FH1, FH1d, FH1-, FH1+.

La lectine RCA I de *Ricinus communis* présente une plus forte affinité pour les structures primaires glycaniques substituées par un résidu d'acide sialique en position ( $\alpha$ 2-6) sur le galactose que dans le cas d'une liaison ( $\alpha$ 2-3). Ceci peut être dû à la grande flexibilité du résidu d'acide sialique autour de la liaison ( $\alpha$ 2-6).

#### **1.4- But de l'étude.**

Grâce à ces études antérieures rapportées par la littérature, nous appréhendons mieux la complexité des glycoprotéines. En nous basant sur les connaissances actuelles dans ce domaine, nous nous proposons d'analyser la nature et la structure des glycannes des constituants de la fraction hydrophobe, afin d'apporter des éclaircissements sur la relation entre la microhétérogénéité et la complexité de la fraction.

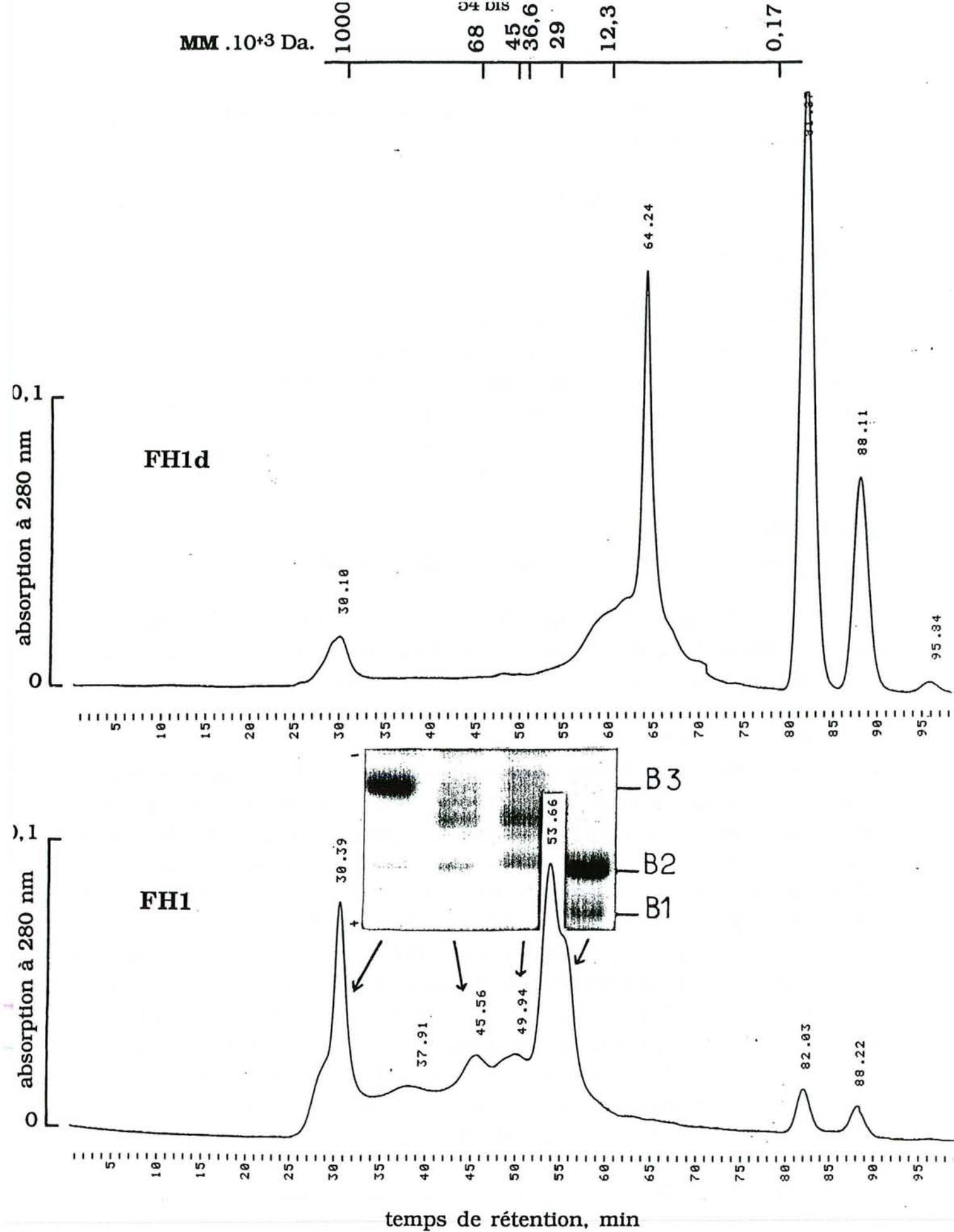
### **2- Résultats.**

#### **2.1- Désialylation de FH1 par la neuraminidase immobilisée.**

Après un cycle de 24 h d'hydrolyse, nous montrons par chromatographie en phase gazeuse (CPG), que la totalité des acides sialiques a été hydrolysée (tableau 9). L'effet de ces unités chargées négativement sur les propriétés physico-chimiques des sous-unités glycoprotéiques a été étudié par PAGE-2D, chromatographie liquide et spectrofluorimétrie.

Par PAGE-2D, la désialylation se traduit par une disparition d'au moins 4 spots correspondant à la sous-unité 29 kDa, qui présente la plus importante variabilité (figure 32). D'une façon générale, les spots principaux sont "déplacés" de 0,1 unité pH environ vers des valeurs de pH plus basiques après désialylation. Cependant, pour chacune des trois sous-unités, le profil ne se singularise pas à un seul spot, car on observe encore 3 spots à 29 kDa, 2 spots à 18 et 11 kDa.

Les chromatogrammes obtenus par FPLC de filtration sur gel (colonne SUPEROSE 12) des deux fractions FH1 et FH1d sont différents (figure 33). L'aire du pic d'exclusion observé pour FH1 (temps de rétention  $t_R = 30$  min), correspondant à des masses moléculaires apparentes supérieures ou égales à 500-1000 kDa, est fortement diminué dans le cas de FH1d. Dans le volume d'exclusion, on retrouve essentiellement la sous-unité B3 (29 kDa), qui forme vraisemblablement des agrégats de masses moléculaires élevées. Le second pic majeur ( $t_R = 53$  min) de FH1 est flanqué d'un épaulement de  $t_R = 55$  min et correspond aux sous-unités B2 (19 kDa) et B1 (11 kDa). Dans le cas de FH1d, on ne retrouve plus ce pic, mais un autre



**Figure 33.** FPLC de filtration sur gel (colonne Superose 12) des fractions FH1 et FH1d. Contrôle par PAGE-SDS de fractions collectées dans le cas de FH1. MM : masse moléculaire.

de  $t_R = 64$  min. De plus, les aires des deux pics de temps de rétention élevés ( $t_R = 82$  et  $88$  min) sont nettement augmentées.

L'analyse spectrofluorimétrique montre également des différences au niveau des constantes  $K_d$  et  $F_{max}$  (figure 34). Pour FH1,  $K_d = 4,35 \mu M$  d'ANS et  $F_{max} = 3,7$  U.A./ $\mu g$  de protéines et pour FH1d,  $K_d = 3,57 \mu M$  d'ANS et  $F_{max} = 2,6$  U.A./ $\mu g$  de protéines. Le nombre des sites hydrophobes accessibles à l'ANS (traduit par  $F_{max}$ ) diminue après désialylation, tandis que l'affinité de l'ANS pour ces sites (inverse de  $K_d$ ) augmente.

## 2.2- Chromatographie d'affinité sur concanavaleine A.

Les constituants de la fraction FH1 sont séparés selon leur affinité pour la concanavaleine A (ConA). On obtient ainsi deux sous-fractions : FH1<sup>-</sup>, qui n'est pas retenue dans la colonne et FH1<sup>+</sup>, dont les constituants présentent une affinité pour la lectine (figure 35).

Les densitogrammes obtenus par PAGE-SDS des fractions FH1<sup>-</sup> et FH1<sup>+</sup> montrent que la sous-unité B1 est essentiellement concentrée dans la fraction FH1<sup>-</sup> et ne présente pas d'affinité pour la ConA. Les deux autres constituants sont partagés entre les deux fractions (figure 36).

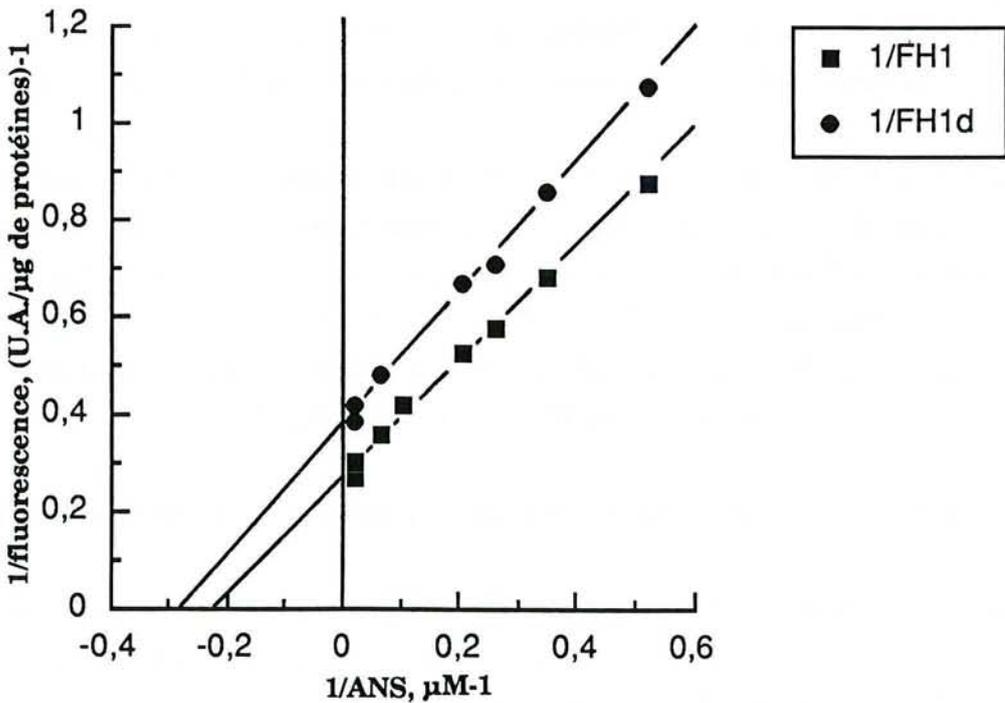
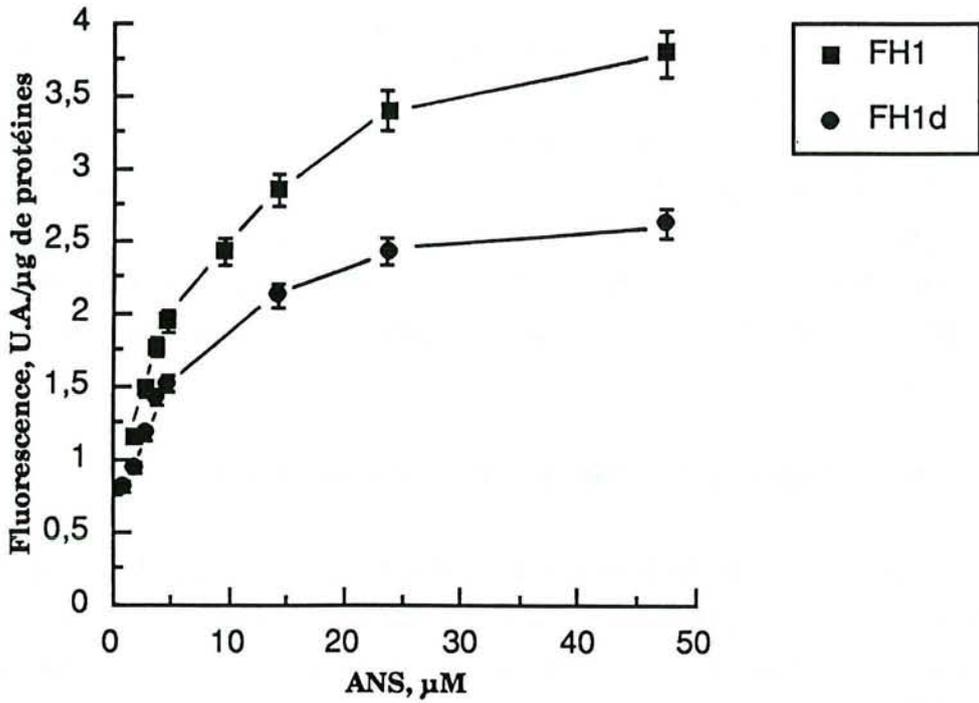
Les profils obtenus en PAGE-2D montrent clairement l'importance de B2 dans FH1<sup>+</sup> et montrent que les deux spots principaux de B1 sont presque totalement retrouvés dans FH1<sup>-</sup>.

Les chromatogrammes des deux fractions obtenus par FPLC de filtration sur gel présentent des différences (figure 37). Notamment, le pic d'exclusion est le pic principal pour la fraction FH1<sup>+</sup> et est presque inexistant dans la fraction FH1<sup>-</sup>. Le pic de  $t_R = 53$  min dans le cas de FH1<sup>+</sup> ne constitue que l'épaule du pic de  $t_R = 55$  min dans le cas de FH1<sup>-</sup>. Les molécules aux temps de rétentions élevés ( $t_R = 81$  et  $88$  min) sont plus concentrées dans FH1<sup>-</sup> que dans FH1<sup>+</sup>.

## 2.3- Etude de l'affinité des fractions FH1<sup>-</sup> et FH1<sup>+</sup> pour différentes lectines.

Après transfert des spots des constituants de FH1<sup>-</sup> et FH1<sup>+</sup> obtenus par PAGE-2D, les membranes Immobilon P sont incubées en présence de trois lectines couplées à la peroxydase : ConA, WGA et PNA (figure 38 ; tableau 7).

On constate que FH1<sup>-</sup> ne réagit pas avec ConA et que seule la sous-unité B2<sup>+</sup> de la fraction FH1<sup>+</sup> est affine pour ConA, les spots de B3<sup>+</sup> étant faiblement révélés après ajout de l' $\alpha$ -naphthol.



**Figure 34.** Dosage de l'hydrophobicité effective de la fraction hydrophobe avant (FH1) et après désialylation (FH1d). Détermination des constantes  $K_d$  et  $F_{max}$  :  $K_d(\text{FH1}) = 4,35 \mu\text{M ANS}$  ;  $F_{max}(\text{FH1}) = 3,7 \text{ U.A./}\mu\text{g FH1}$  ;  $K_d(\text{FH1d}) = 3,57 \mu\text{M ANS}$  ;  $F_{max}(\text{FH1d}) = 2,6 \text{ U.A./}\mu\text{g FH1d}$ .

Quant à l'affinité pour WGA, la fraction FH1<sup>+</sup> réagit fortement. Dans la fraction FH1<sup>-</sup>, seule la sous-unité B2 est affine. Dans le cas de la lectine PNA, aucune réaction n'est observée.

#### **2.4- Séparation des sous-unités B1, B2 et B3 par HPEC-SDS.**

L'électrophorèse micro-préparative HPEC a tout d'abord nécessité une optimisation. La figure 39 montre les différences de la résolution de la séparation des constituants de FH1 en fonction de la longueur et de la porosité du gel. L'ampérage constant est de 0,9 mA. Sous ces conditions, la meilleure résolution est obtenue pour une longueur de gel de 10 cm et une porosité déterminée avec 10% d'acrylamide dans le gel. De plus, la quantité d'échantillon à déposer doit être inférieure à 0,5 mg afin de ne pas affecter la résolution de la séparation.

Après collecte de fractions correspondant aux sommets des pics, la PAGE-SDS de contrôle (figure 39) montre que, dans les limites de notre système de détection, chacun des trois constituants est obtenu avec une excellente pureté. Il en est de même pour les fractions FH1<sup>-</sup> et FH1<sup>+</sup> séparées par HPEC-SDS (figure 40).

Les constituants purifiés sont ensuite totalement dessalés grâce au système Ultrafree utilisant des membranes de cellulose à faible adsorption protéique.

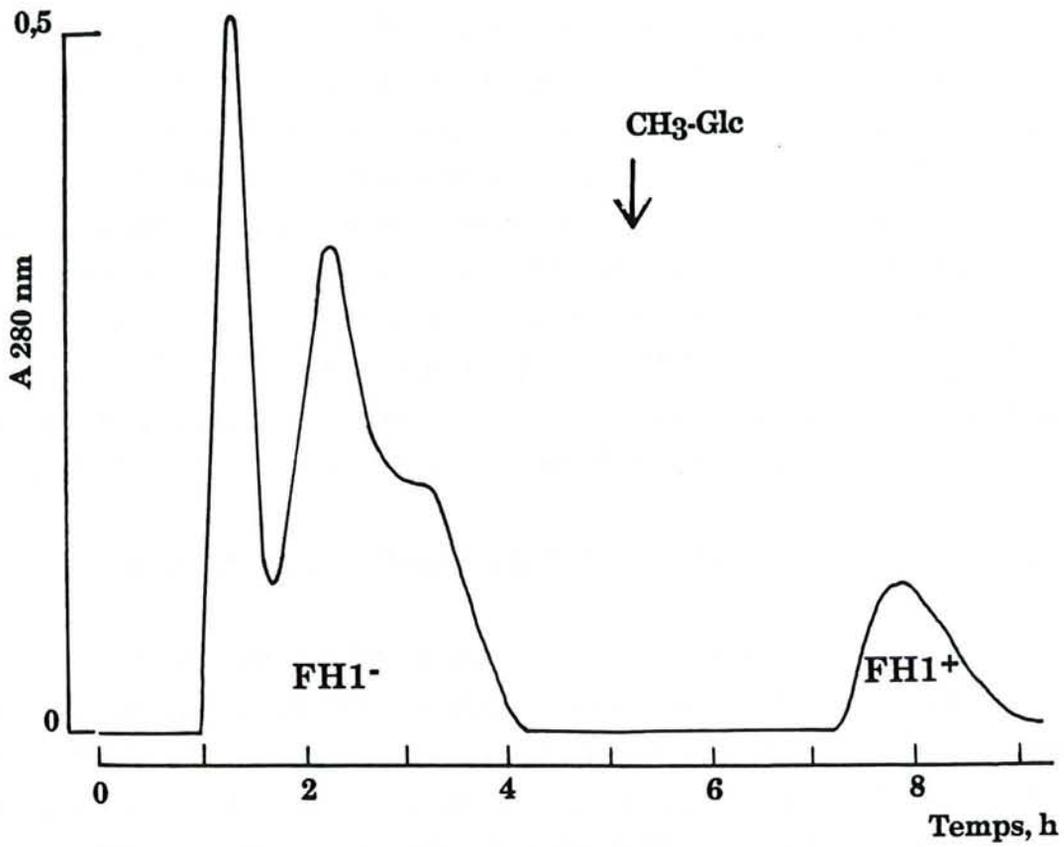
#### **2.5- Composition glycanique de différentes fractions étudiées.**

L'analyse par CPG montre que FH1 et FH2 contiennent une quantité équivalente d'environ 17% de glycannes (figure 41 ; tableaux 8 et 9). Cependant, les pourcentages diminuent pour les fractions purifiées par chromatographie sur ConA et par HPEC puisqu'ils sont compris dans une fourchette de 12,6 à 15,1%.

Les différentes fractions analysées contiennent toutes du galactose (Gal), du mannose (Man), plus ou moins de fucose (Fuc), de la N-acétylgalactosamine (GalNAc), de la N-acétylglucosamine (GlcNAc) et des acides sialiques (NeuAc). Le résidu Fuc de FH1 est uniquement retrouvé dans les fractions affines pour la ConA (FH1<sup>+</sup>, B2<sup>+</sup> et B3<sup>+</sup>).

Les rapports molaires des glycannes sont calculés sur la base de 3 résidus Man pour les fractions FH1, FH1<sup>+</sup>, B2<sup>+</sup>, B3<sup>+</sup> et FH2. On note, dans ces fractions, la quantité non négligeable de GalNAc, qui, présente simultanément avec le résidu Man, reflète une certaine hétérogénéité structurale des chaînes glycaniques.

Le résidu GlcNAc est surtout concentré dans les fractions affines pour la ConA (environ 3 à 4 résidus pour B2<sup>+</sup> et B3<sup>+</sup>), ce qui est cohérent avec la présence de 3 Man dans ces fractions.



**Figure 35.** Chromatographie d'affinité sur ConA de FH1. La fraction non retenue est appelée FH1<sup>-</sup> et la fraction adsorbée puis éluée par le méthyl- $\alpha$ -Glc (CH<sub>3</sub>-Glc) est nommé FH1<sup>+</sup>.

Quant aux fractions FH1<sup>-</sup>, B1<sup>-</sup>, B2<sup>-</sup> et B3<sup>-</sup>, on ne retrouve pas de grandes quantités de Man, lorsque les rapports molaires sont déterminés sur la base de 2 résidus Gal (ou 1 résidu GalNAc dans le cas de FH1<sup>-</sup>).

Toutes les fractions analysées contiennent des acides sialiques. Le plus faible pourcentage est trouvé pour B2<sup>+</sup> (1,8% environ).

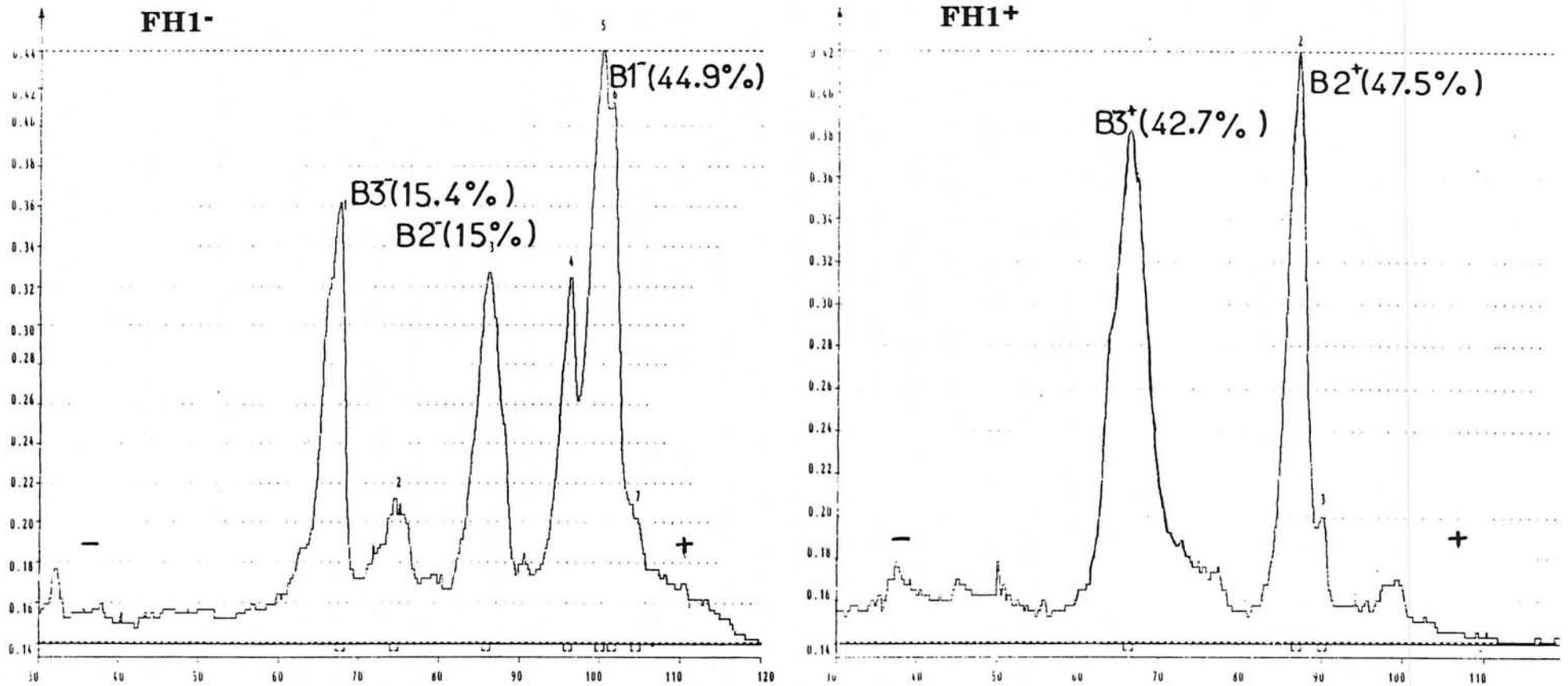
## 2.6- Préparation des échantillons et analyses RMN.

Afin d'obtenir des quantités d'échantillons suffisantes pour réaliser l'analyse RMN, nous sommes partis de 185 mg de FH1 (obtenus à partir de 937 mg de PPT séparés par FPLC-IH). Après chromatographie sur ConA et élimination du méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside par chromatographie de filtration sur gel (Séphadex G25), FH1<sup>-</sup> représente les 2/3 environ des protéines éluées (39,2 mg de FH1<sup>-</sup> et 20,4 mg de FH1<sup>+</sup>). Ensuite, les traitements de ces deux fractions diffèrent, puisque FH1<sup>-</sup> est soumis à une  $\beta$ -élimination en milieu alcalin réducteur et FH1<sup>+</sup> à une hydrolyse pronasique (figure 42).

**La fraction FH1<sup>-</sup>**  $\beta$ -éliminée est dessalée par chromatographie de filtration sur gel (Biogel P2) et deux pics sont obtenus. Le premier (pic 1) représente 3,8 mg de lyophilisat et correspond à des oligosaccharides. En effet, après chromatographie sur couche mince (CCM), la révélation à l'orcinol est positive et à la ninhydrine négative. Quant au second pic mineur (pic 2), qui constitue en fait un épaulement du pic 1, il correspond à des N-glycopeptides, puisque, d'une part, les deux sortes de révélations sur couche mince sont positives et, d'autre part, la composition glycanique est riche en Man (tableau 10). Cependant, de trop petites quantités de produits ont été recueillies pour être analysées par RMN.

La fraction correspondant au pic 1 est encore purifiée par chromatographie sur Chelex 100 et sur Biogel P2. On obtient alors la fraction FH1<sup>-</sup> $\beta$ . Cette dernière, après analyse du spectre de RMN, montre une hétérogénéité structurale importante et les interprétations sont rendues difficiles. D'autres étapes de purification de FH1<sup>-</sup> $\beta$  sont actuellement à l'étude afin d'obtenir des signaux de RMN plus interprétables.

**La fraction FH1<sup>+</sup>**, après hydrolyse pronasique et dessalage sur Biogel P2, est révélée sur CCM par l'orcinol et, à un degré moindre, par la ninhydrine. La chromatographie sur Chelex 100 permet d'obtenir deux pics principaux correspondant aux fractions FH1<sup>+</sup>p (1,5 mg) et P2 (300  $\mu$ g). Ces dernières ont été analysées par RMN. FH1<sup>+</sup>p est hétérogène ; cependant, on observe sur son spectre



**Figure 36.** Densitogrammes des fractions FH1<sup>-</sup> et FH1<sup>+</sup> séparées par PAGE-SDS et proportion de chaque sous-unité dans ces fractions.

que 40% des signaux correspondent à une structure N-glycannique (signaux GlcNAc et Man du core interne) de type N-acétyllactosaminique (figure 44). Les autres signaux du spectre correspondent à des oligosaccharides libres.

Notamment, la fraction P2 contient le fucosyl-lacto-N-tétraose à l'état pur (figure 44), dont la structure est  $\text{Fuc}(\alpha 1-2)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$ . La composition glycannique de P2 correspond également à cette structure (tableau 10).

Le résidu GalNAc n'est pas retrouvé dans la structure du fucosyl-lacto-N-tétraose. D'après la composition glycannique de FH1<sup>+</sup>p, il semblerait donc que GalNAc provienne des N-glycannes (tableau 10).

La composition en acides aminés de la fraction FH1<sup>+</sup>p est donnée sur la base d'un résidu Asp (tableau 11). Les quatre résidus les plus fortement représentés, mis à part Asp, sont Thr (1,1), Glu (0,9), Pro (0,7) et Ser (0,6). Il semble donc exister une séquence consensus de N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr avec X différent de Pro) qui est conservée même après hydrolyse par la pronase. Les séquences (Asn)-(Glu/Gln)-(Thr/Ser) semblent être les plus probables.

Afin d'éliminer les oligosaccharides présents dans FH1<sup>+</sup>p, cette fraction est séparée par chromatographie d'échange d'ions (colonne Carbopax PA1) en huit groupes de pics (pic d'injection et pics Carbopax 1 à 7). Chacun de ces groupes est dessalé sur Biogel P2. Le pic d'injection est alors subdivisé en deux pics appelés pic a (ou FH1<sup>+</sup>pa) et pic b (figure 43).

D'après la composition glycannique des fractions obtenues, il en résulte que FH1<sup>+</sup>pa et la fraction "pic Carbopax 3" sont celles qui contiennent la structure N-glycannique. Cependant, le spectre de RMN de FH1<sup>+</sup>pa est encore hétérogène et n'apporte pas de renseignements supplémentaires par rapport au spectre de FH1<sup>+</sup>p. La fraction "pic Carbopax 3" est en trop faible quantité pour être analysée par RMN. La fraction "pic Carbopax 5", qui correspond au pic principal ne contient pas de glycanne.

### 3- Discussion.

#### 3.1- Rôle des acides sialiques.

Le clivage des acides sialiques a deux effets sur les composés de FH1, d'une part au niveau de la microhétérogénéité des sous-unités glycoprotéiques et d'autre part au niveau de la structure quaternaire du composant-3.

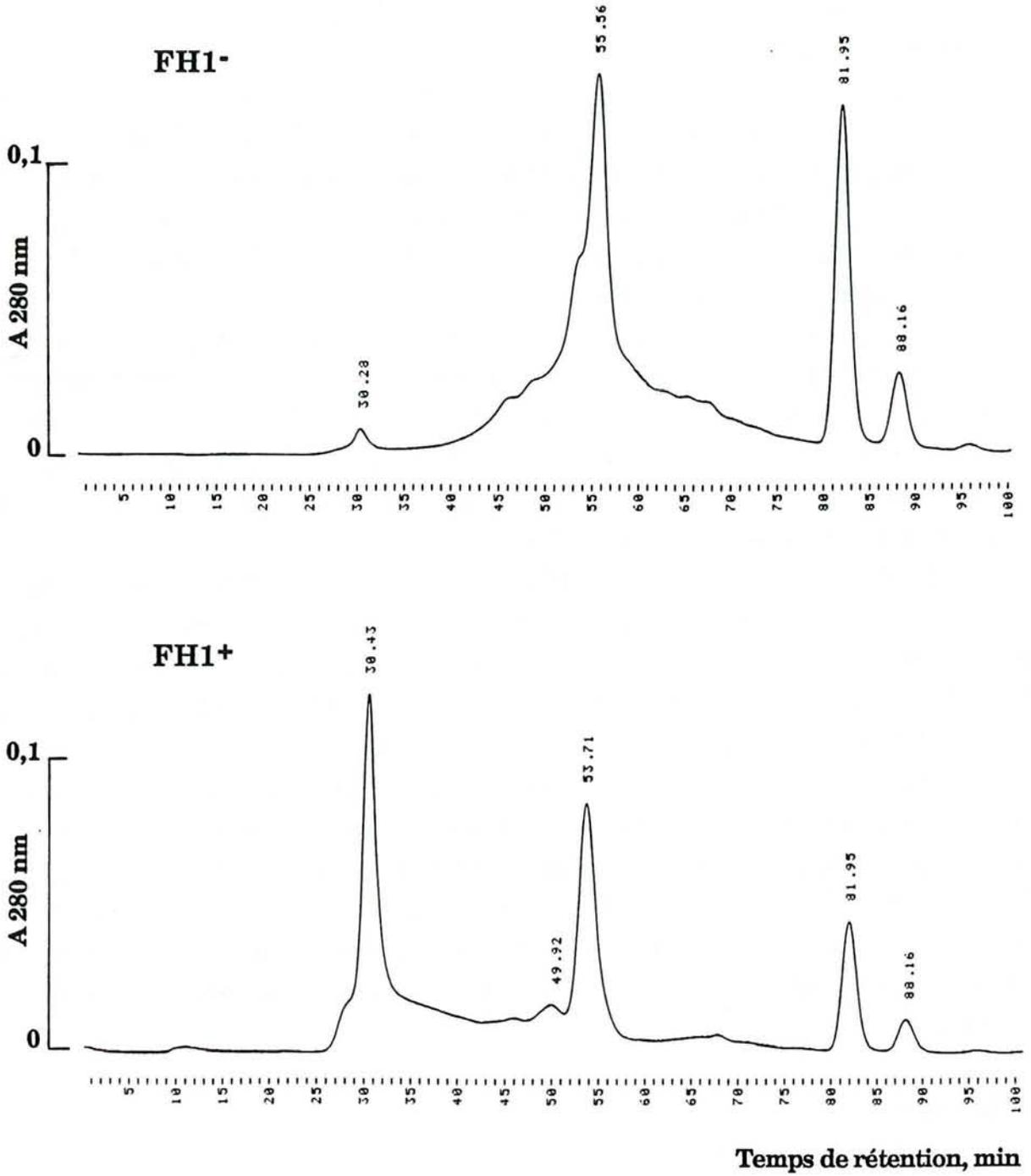


Figure 37. FPLC de filtration sur gel des fractions FH1<sup>-</sup> et FH1<sup>+</sup>.

**PAGE-2D** : l'augmentation du pHi observée de 0,1 unité pH est due à la disparition des groupes carboxyliques des acides sialiques clivés.

Des travaux de même type ont été réalisés sur l'orosomucoïde (glycoprotéine acide du sérum humain de 40 kDa). Ce constituant montre au moins 7 variants isoélectriques par IEF de pHi compris entre 3,4 et 3,8 (ARNAUD *et al*, 1980). L'orosomucoïde possède 7,9 +/- 0,5 résidus d'acides sialiques par molécule de protéine. Après désialylation complète, l'analyse par IEF montre que chaque résidu est responsable d'une différence de 0,1 unité pH, puisque la différence de charge observée est de 0,9 unités pH après désialylation.

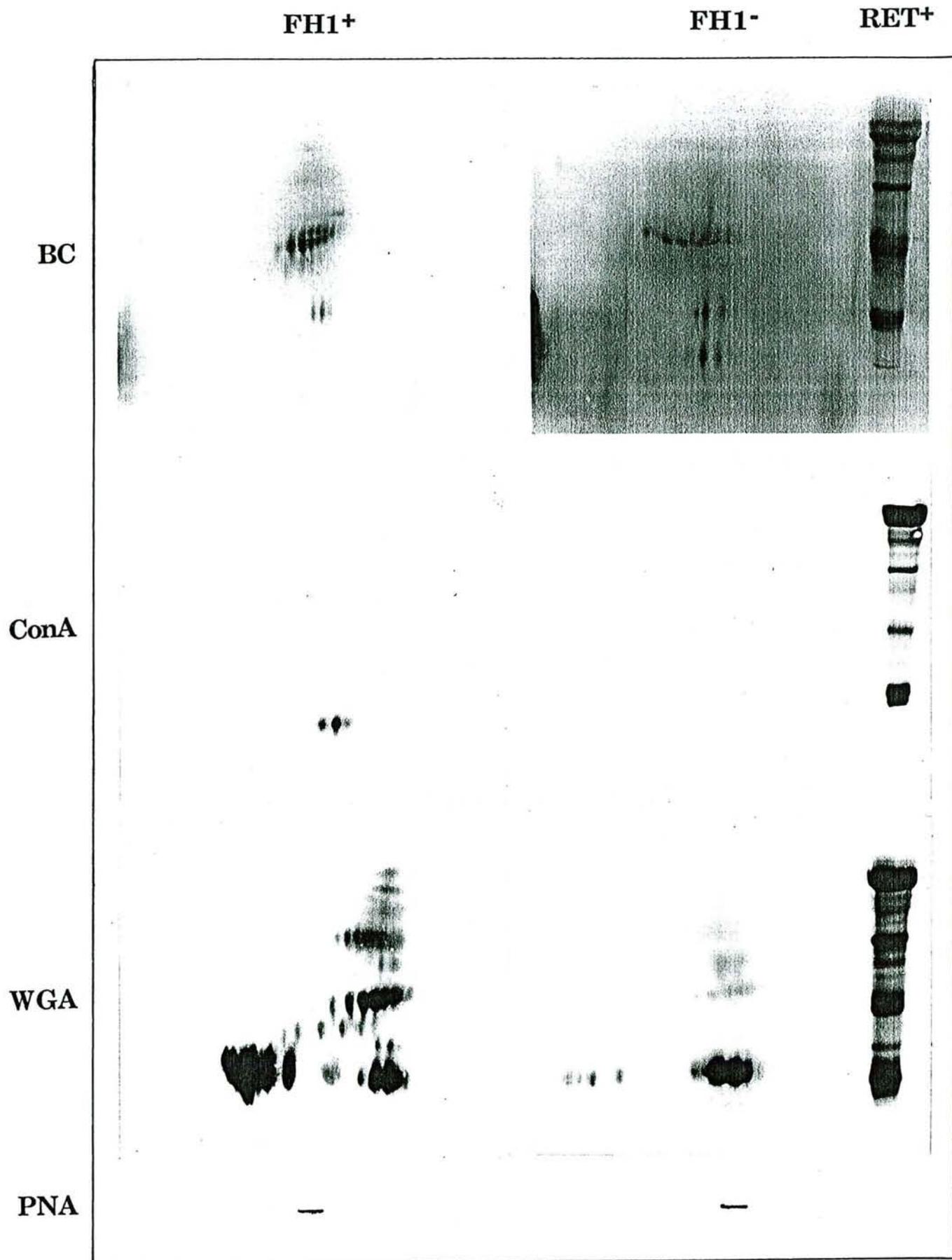
Cependant, la microhétérogénéité ne disparaît pas totalement. D'autres mécanismes sont impliqués dans la différence de charges. Ils peuvent correspondre à des modifications post-traductionnelles, telles que des acétylations, déamidations ou des différences au niveau des chaînes glycaniques. FOURNET *et al* (1978) ont en effet montré des différences au niveau de la structure glycanique de l'orosomucoïde.

De même, dans notre étude, ces modifications post-traductionnelles peuvent exister et être responsables de la microhétérogénéité "résiduelle" après désialylation. Des différences au niveau du taux de phosphorylation du composant-3 peuvent également être impliquées.

Par ailleurs, la microhétérogénéité peut résulter du polymorphisme génétique du composant-3. Ce polymorphisme est très important au niveau des glycoprotéines des membranes des globules gras (voir chapitre 3) et peut donc être influant au niveau du composant-3. En ce qui concerne l'orosomucoïde, 22 mutations d'acides aminés au moins ont été observées (ARNAUD *et al*, 1980).

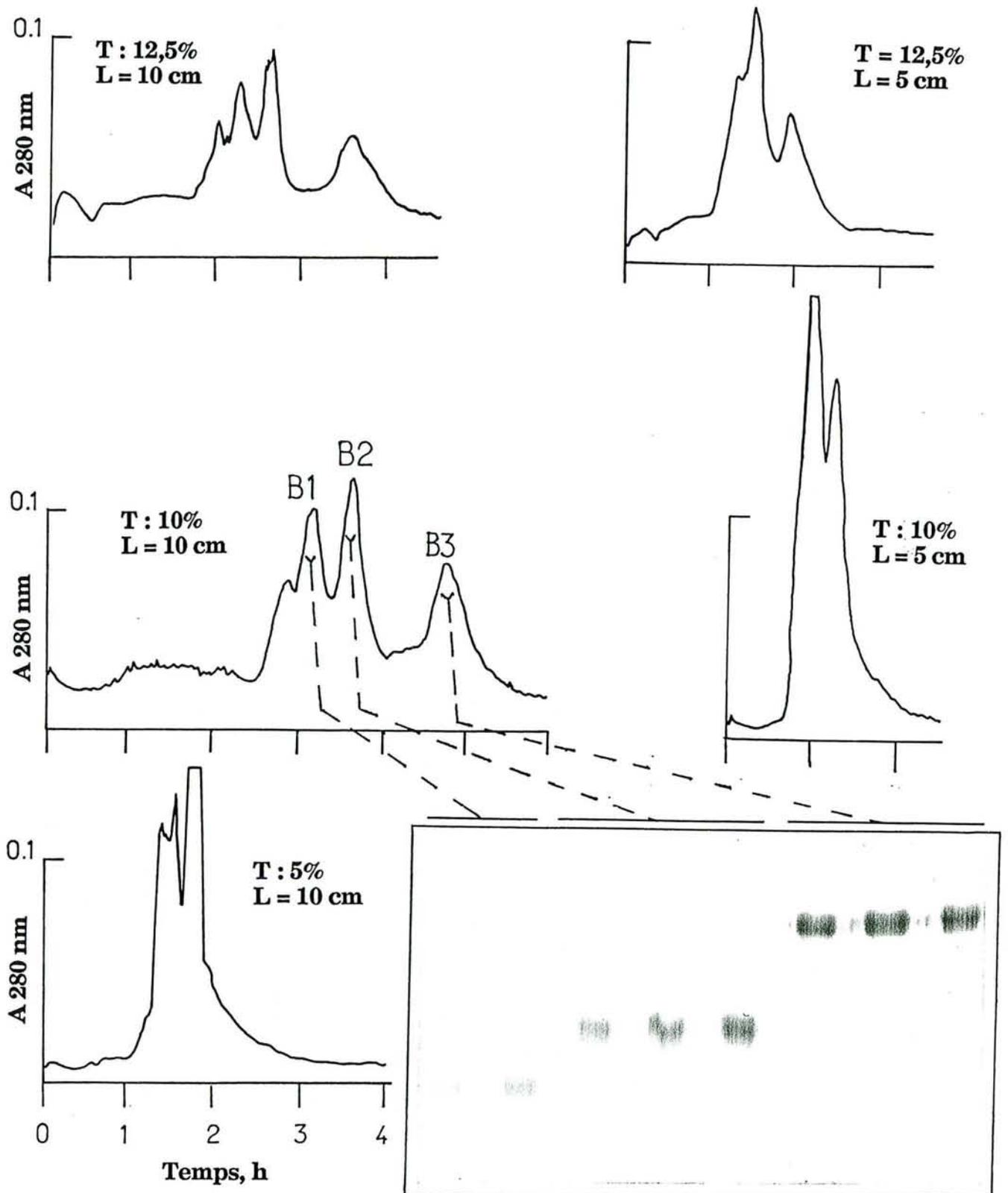
Dans un autre exemple, la teneur en acides sialiques de la caséine  $\kappa$  varie dans une fourchette de 23 à 166  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . La variation dépend de la période de lactation de la vache, du phénotype de la caséine  $\kappa$  (le variant B est plus glycosylé que le variant A). La présence d'au moins 200 000 cellules somatiques par ml de lait est signe d'une infection (mammite). Dans un lait mammiteux, le taux d'acides sialiques de la caséine  $\kappa$  augmente significativement (ROBITAILLE *et al*, 1991).

**FPLC de filtration sur gel** : les acides sialiques sont impliqués dans la stabilisation de la structure quaternaire du composant-3. Notamment, par filtration sur gel, on observe une perte des agrégats après désialylation de FH1. Ces derniers semblent formés d'une part par la glycoprotéine B3 et d'autre part par des glycopeptides ou oligosaccharides retardés dans la colonne de filtration sur gel ( $t_R$  élevés) et absorbant fortement à 280 nm. De telles molécules semblent être présentes



**Figure 38.** Révélation des spots, obtenus par PAGE-2D puis transférés sur membranes Immobilon P, par différentes lectines couplées à la peroxydase. Le substrat est l' $\alpha$ -naphthol. La fraction RET<sup>+</sup> est étudiée au chapitre 3.  
BC : révélation au Bleu de Coomassie.





**Figure 39.** Influence de la longueur de la colonne (L) et du pourcentage d'acrylamide dans le gel (T) sur la résolution de la séparation de FH1 par HPEC à courant constant de 0,9 mA. Contrôle de pureté par PAGE-SDS de fractions collectées dans le cas T : 10% et L = 10 cm.

dans FH2 d'aspect opalescent, et qui absorbe aussi fortement à 280 nm. Elles ne sont pas détectables par PAGE-SDS après coloration au Bleu de Coomassie.

**Utilisation de la spectrofluorimétrie pour visualiser des changements conformationnels de protéines :** les protéines, qui possèdent des sites hydrophobes de surface jouant un rôle biologique, fixent fortement l'ANS. L'apomyoglobine forme un complexe avec l'ANS selon une stoechiométrie 1:1. Par contre, en présence de l'hème, la myoglobine perd son affinité pour l'ANS (DODIUK *et al*, 1979). Selon ces auteurs, la sonde fluorescente interagit avec l'apomyoglobine au niveau du site de reconnaissance de l'hème.

La SAB, qui joue un rôle dans le transport des acides gras, possède des sites hydrophobes de surface (HSIA *et al*, 1984). L'ANS interagit fortement avec cette protéine au niveau de ces sites (SHIMIZU *et al*, 1986 ; SAULNIER *et al*, 1991).

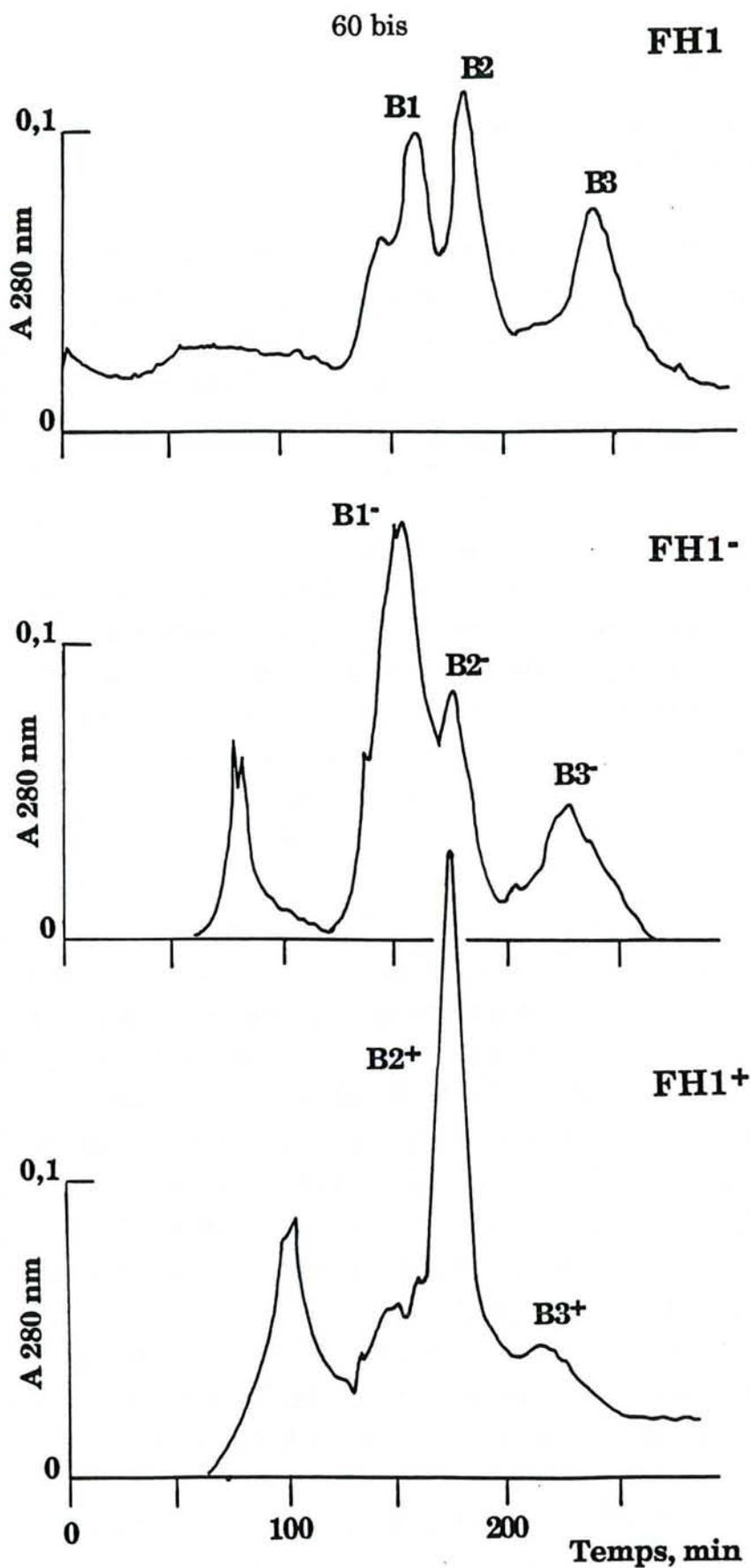
Cette méthode spectrofluorimétrique permet également de suivre un changement conformationnel d'une protéine (structure tertiaire, agrégation). Par exemple, la fixation d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  sur l' $\alpha$ -lactalbumine diminue l'affinité de cette protéine pour le bis-ANS d'un facteur 10 (MUSCI et BERLINER, 1985). Les ions divalents jouent donc un rôle dans la stabilisation de la structure tertiaire de l' $\alpha$ -lactalbumine.

Dans un autre exemple, MILLS et CREAMER (1975) montrent qu'il existe pour la  $\beta$ -lactoglobuline une région apolaire enfouie dans la structure tertiaire et quaternaire de la protéine (principalement dimérique à pH 6,5). Cette région n'est pas accessible au solvant et donc à l'ANS. Elle contient en outre deux tryptophanes, qui se retrouvent à la surface de la  $\beta$ -lactoglobuline suite au changement conformationnel induit par une baisse du pH (jusqu'à pH 2). Cette région hydrophobe fixe alors l'ANS et il en résulte une augmentation de la fluorescence.

Un mécanisme analogue semble être observé lorsque la SAB est soumise à un foisonnement et qu'elle se déplisse à l'interface eau/air (CLARK *et al*, 1988).

Dans un domaine plus appliqué, la méthode spectrofluorimétrique utilisant l'ANS permet d'estimer le degré de dénaturation protéique de laits pasteurisés, "Ultra-Haute-Température" ou autoclavés (BONOMI *et al*, 1988 ; PAGLIARINI *et al*, 1990) ou de lactosérums industriels (SAULNIER *et al*, 1991). Ce dernier point a été développé dans notre Laboratoire.

La spectrofluorimétrie est également une méthode d'approche de l'étude du mécanisme de la coagulation enzymatique des caséines (PERI *et al*, 1990).



**Figure 40.** Séparation des fractions FH1, FH1<sup>-</sup> et FH1<sup>+</sup> par HPEC. Conditions expérimentales : 0,9 mA, colonne 10 cm, gel à 10% d'acrylamide.

**Hydrophobicité effective de FH1 et rôle des acides sialiques** : après désialylation, la diminution de l'hydrophobicité effective de FH1 est observée par spectrofluorimétrie.

La désialylation semble induire un changement conformationnel associé à une redistribution des sites hydrophobes entre la surface et la partie interne de la protéine, et à une désagrégation des polymères formés. La diminution du nombre des sites hydrophobes et l'augmentation de leur affinité pour l'ANS va dans le sens de cette redistribution qualitative et quantitative des régions hydrophobes.

Les acides sialiques ont donc un rôle au niveau de la stabilité spatiale du composant-3. Ce rôle stabilisateur a déjà été montré avec les structures complexes tétraantennées en forme de parapluie (figure 30b) de l'ovomucoïde (voir introduction ; MONTREUIL, 1984). Les acides sialiques interagissent avec les charges positives des acides aminés de la chaîne polypeptidique. L'importance du rôle stabilisateur joué par les acides sialiques a été également mise en évidence dans les O-glycosylprotéines de type mucine (voir introduction ; GERKEN *et al*, 1989).

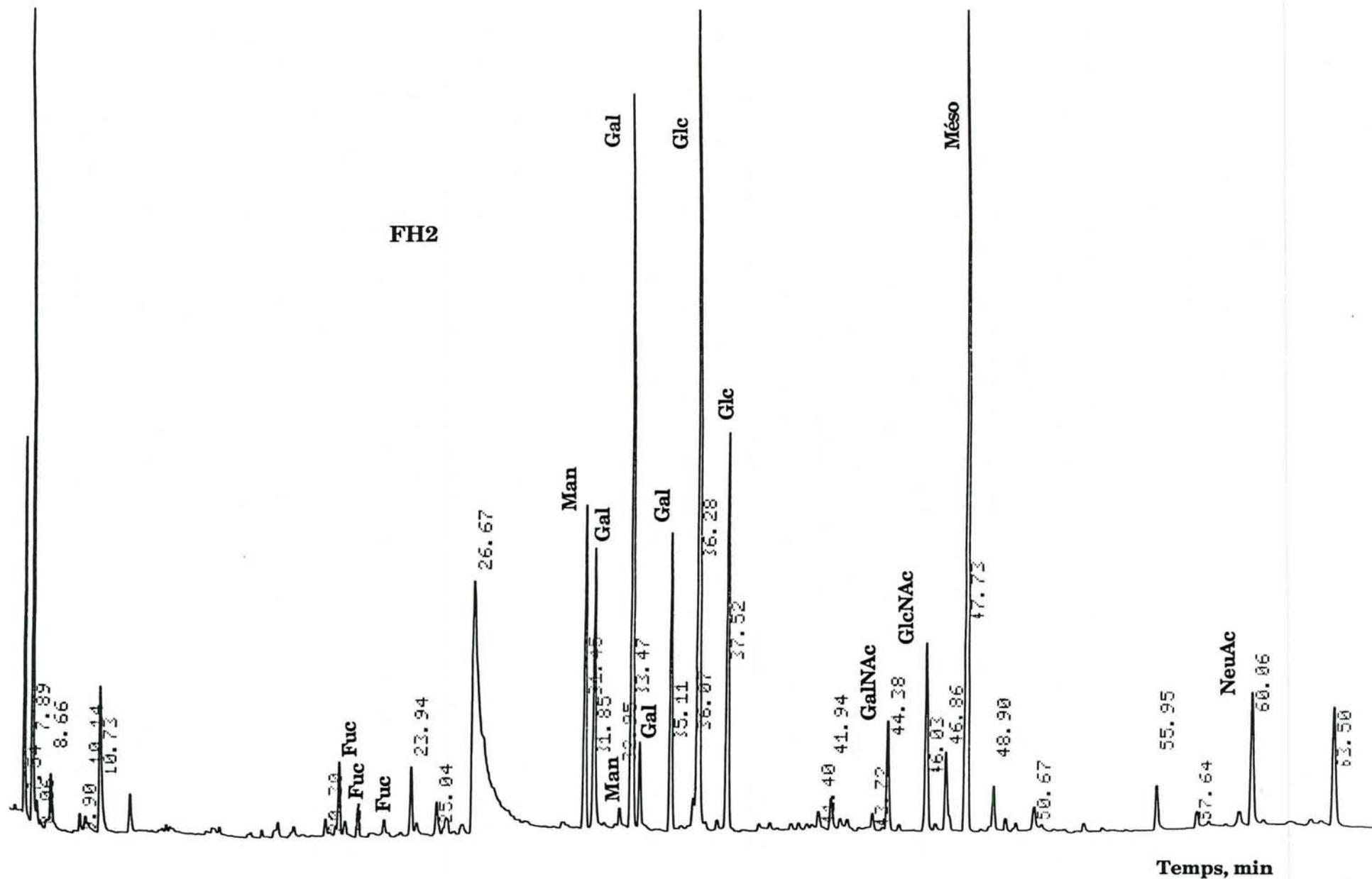
### 3.2- Séparation par HPEC-SDS.

La résolution de la séparation des protéines par HPEC-SDS dépend de différents paramètres, dont voici les principaux :

- la longueur du gel (5 ou 10 cm). Son augmentation provoque une augmentation de la durée de l'électrophorèse, l'élargissement des pics correspondant à une diffusion des protéines de masses moléculaires élevées dans le gel, mais une amélioration de la séparation pour les protéines de faibles masses moléculaires ;
- la porosité du gel (5 ou 10 ou 12,5% d'acrylamide). Sa diminution a les mêmes conséquences qu'une augmentation de la longueur du gel ;
- le diamètre du gel (1 ou 2,5 ou 3,5 mm). Son augmentation permet des dépôts plus importants mais diminue le taux de récupération de l'échantillon ;
- l'ampérage (entre 0,7 et 1,2 mA). Son augmentation provoque une diminution du temps d'analyse, une diminution de la largeur des pics, mais une augmentation des risques de formation de bulles au niveau de la chambre d'élution et une diminution de la durée de vie d'une colonne accompagnée d'une augmentation du voltage.

L'influence de ces paramètres sur la résolution de la séparation est illustrée avec la fraction FH1 comme échantillon à séparer.

Pour obtenir chaque constituant avec une bonne pureté, il est nécessaire de collecter les fractions correspondant au maximum de chaque pic. La figure 45 montre comment collecter deux fractions A et B avec un maximum de pureté dans



**Figure 41.** Exemple de profil obtenu par chromatographie en phase gazeuse des dérivés glycaniques triméthylsilylés extraits de la fraction FH2.

le cas de deux pics faiblement résolus. Tout récemment, le fabricant fournit avec l'appareillage HPEC un logiciel permettant d'évaluer par calcul le pourcentage de pureté de chaque fraction collectée, à la manière de l'exemple de la figure 45.

Afin de vérifier la pureté des constituants isolés, ROSENBLUM (1991) propose d'utiliser l'électrophorèse capillaire plus sensible et plus rapide qu'une analyse par PAGE-SDS, et qui permet surtout de ne tester qu'un tout petit volume d'échantillon (0,06  $\mu$ l au lieu de 20  $\mu$ l en PAGE-SDS).

### **3.3- Affinité aux lectines et composition glycanique.**

Dans la littérature, différentes méthodes ont été développées afin de mettre en évidence l'affinité des glycoprotéines des membranes de globules gras pour les lectines. Dans l'étude histochimique, les lectines marquées par une molécule fluorescente et fixées sur les membranes des globules gras sont visualisées au microscope à fluorescence (WELSCH *et al*, 1988).

L'interaction peut également être quantifiée en titrant sous microscope l'agglutination des globules gras en suspension dans un tampon phosphate, pH 7,3 et en présence d'une lectine donnée (FARRAR *et al*, 1980).

Des techniques de fractionnement sont également utilisées, comme la PAGE-SDS suivie d'un transfert sur membranes (WELSCH *et al*, 1988). Les glycoprotéines des membranes de globules gras interagissent avec des lectines couplées à la peroxydase. La réaction est alors visualisée après ajout d'un substrat de la peroxydase.

La chromatographie d'affinité utilisant des lectines immobilisées (ConA-Sepharose et WGA-Sepharose) a été employée en présence de SDS pour caractériser ces glycoprotéines (KANNO, 1986).

Afin d'étudier l'affinité des composants de FH1 pour les lectines, nous avons utilisé la chromatographie sur ConA d'une part, et, d'autre part, la technique de PAGE-2D suivie d'un transfert et d'une révélation aux lectines marquées à la peroxydase (ConA, WGA et PNA).

**Affinité à ConA :** la chromatographie sur ConA a déjà été employée pour séparer le composant-3 à partir de la fraction protéose-peptones totales (KESTER et BRUNNER, 1982). Nous montrons en fait que cette méthode séparative ne retient qu'une partie seulement des glycoprotéines de FH1.

La force d'interaction entre les glycoprotéines et ConA immobilisée dépend de plusieurs facteurs (DULANEY, 1979). Il est conseillé de réaliser la chromatographie à une température proche de la température ambiante, à un pH

**Tableau 8 : Composition centésimale en oses des différentes fractions analysées**

Fractions analysées	Oses neutres %	Osamines %	Acides sialiques %	Total %
FH1	4,90	7,20	4,90	17,00
FH2	5,30	9,10	3,20	17,60
B1 <sup>-</sup>	5,14	5,98	1,97	13,09
B2 <sup>-</sup>	4,49	4,04	4,07	12,60
B3 <sup>-</sup>	5,38	6,35	3,38	15,11
B2 <sup>+</sup>	5,96	6,20	1,79	13,95
B3 <sup>+</sup>	4,22	6,55	2,74	13,51

**Tableau 9 : Rapport molaire des glycanes dans les différentes fractions analysées**

Fractions analysées	Fuc	Gal	Man	GalNAc	GlcNAc	NeuAc
FH1	0,70	4,30	<b>3,00</b>	4,10	4,50	3,00
FH1d	0,70	4,60	<b>3,00</b>	3,60	4,10	-
FH1 <sup>-</sup>	-	3,40	0,94	<b>1,00</b>	1,12	0,56
FH1 <sup>+</sup>	0,47	4,20	<b>3,00</b>	3,04	3,52	2,00
B1 <sup>-</sup>	-	<b>2,00</b>	0,80	1,22	1,44	0,62
B2 <sup>-</sup>	-	<b>2,00</b>	0,84	1,24	1,00	1,64
B3 <sup>-</sup>	-	<b>2,00</b>	0,21	1,20	1,26	0,90
B2 <sup>+</sup>	0,36	2,05	<b>3,00</b>	1,25	3,33	0,95
B3 <sup>+</sup>	0,64	4,14	<b>3,00</b>	2,87	4,14	2,71
FH2	0,50	4,30	<b>3,00</b>	6,00	5,00	2,70

Rapport molaire calculé sur la base de 3 Man pour FH1, FH1d, FH1<sup>+</sup>, B2<sup>+</sup>, B3<sup>+</sup> et FH2, sur la base de 2 Gal pour B1<sup>-</sup>, B2<sup>-</sup> et B3<sup>-</sup> et sur la base de 1 GalNAc pour FH1<sup>-</sup>.

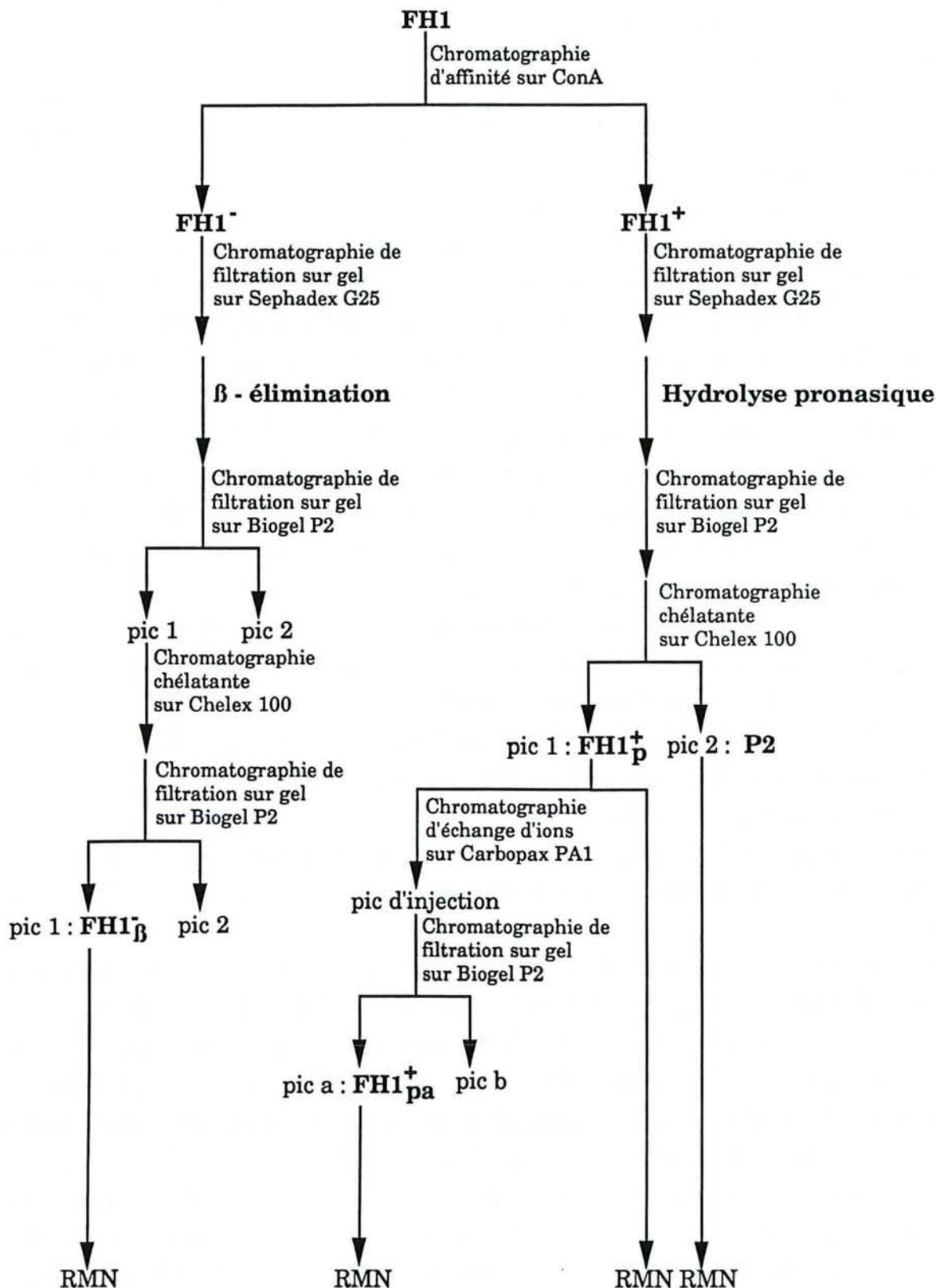
proche de la neutralité, à une force ionique élevée de 1 M de NaCl, qui supprime les interactions non spécifiques. De plus, la capacité d'adsorption de la ConA est optimale en présence de cations  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$  à des concentrations de 1 mM. Pour l'éluion des glycoprotéines, il est conseillé d'utiliser soit le méthyl- $\alpha$ -Glc, soit le méthyl- $\alpha$ -Man, qui sont les ligands les plus efficaces pour déplacer les glycoprotéines fixées.

L'analyse par FPLC de filtration sur gel des fractions FH1, FH1<sup>-</sup> et FH1<sup>+</sup> montre que le pic de  $t_R = 55$  min correspond sans doute à la sous-unité B1, que l'on retrouve presque exclusivement dans FH1<sup>-</sup>. Le pic de  $t_R = 53$  min correspondrait donc à B2. La sous-unité B3, principalement sous forme agrégée dans FH1, l'est également dans le cas de FH1<sup>+</sup>, mais l'est beaucoup moins dans le cas de FH1<sup>-</sup>. Comme observé pour FH1d, la diminution de l'aire du pic d'exclusion est corrélée à l'augmentation des aires des pics de  $t_R = 81$  et 88 min. Il semble donc que les agrégats adsorbent des molécules de petites tailles, non dialysables et fortement retardées dans la colonne de Superose 12. La chromatographie sur ConA aurait un effet déstabilisant au niveau de la structure quaternaire du composant-3, notamment dans la sous-fraction FH1<sup>-</sup> non affiné pour la lectine.

Les lectines ont été classées selon leur spécificité de reconnaissance des oligosaccharides (WU et HERP, 1985). Ainsi, cinq groupes se distinguent en fonction des résidus glycaniques reconnus par les lectines :

- lectines reconnaissant les résidus D Gal et/ou D GalNAc (exemple : PNA) ;
- lectines reconnaissant les résidus D GlcNAc (exemple : WGA) ;
- lectines reconnaissant les résidus D Man et D GlcNAc (exemple : ConA) ;
- lectines reconnaissant les résidus L Fuc (exemple : LTA de *Lotus tetragonolobus*) ;
- lectines reconnaissant les résidus NeuAc (exemple : LPA de *Limulus polyphemus*).

Cependant, le mécanisme de reconnaissance des lectines est plus complexe, car celles-ci reconnaissent en fait des structures glycaniques. Ainsi, ConA reconnaît les motifs à base des trois résidus Man fondamentaux, principalement les structures biantennées (figure 46 ; DEBRAY et MONTREUIL, 1991). La présence de groupements N-acétyllactosaminiques sialylés diminue cependant légèrement l'affinité (différence entre n°2 et n°3, figure 46). Le contraire est observé avec la lectine LCA de *Lens culinaris*. La présence de Fuc ne modifie pas l'affinité pour ConA, mais augmente l'affinité pour LCA. Selon DEBRAY et MONTREUIL (1991), les glycopeptides de type N-acétyllactosaminiques tri- ou tétraantenné, ou de type biantenné avec bissectrice (GlcNAc III) ne sont pas retenus dans une colonne de ConA-Sepharose.



**Figure 42.** Etapes successives de préparation des échantillons destinés à l'analyse par RMN.

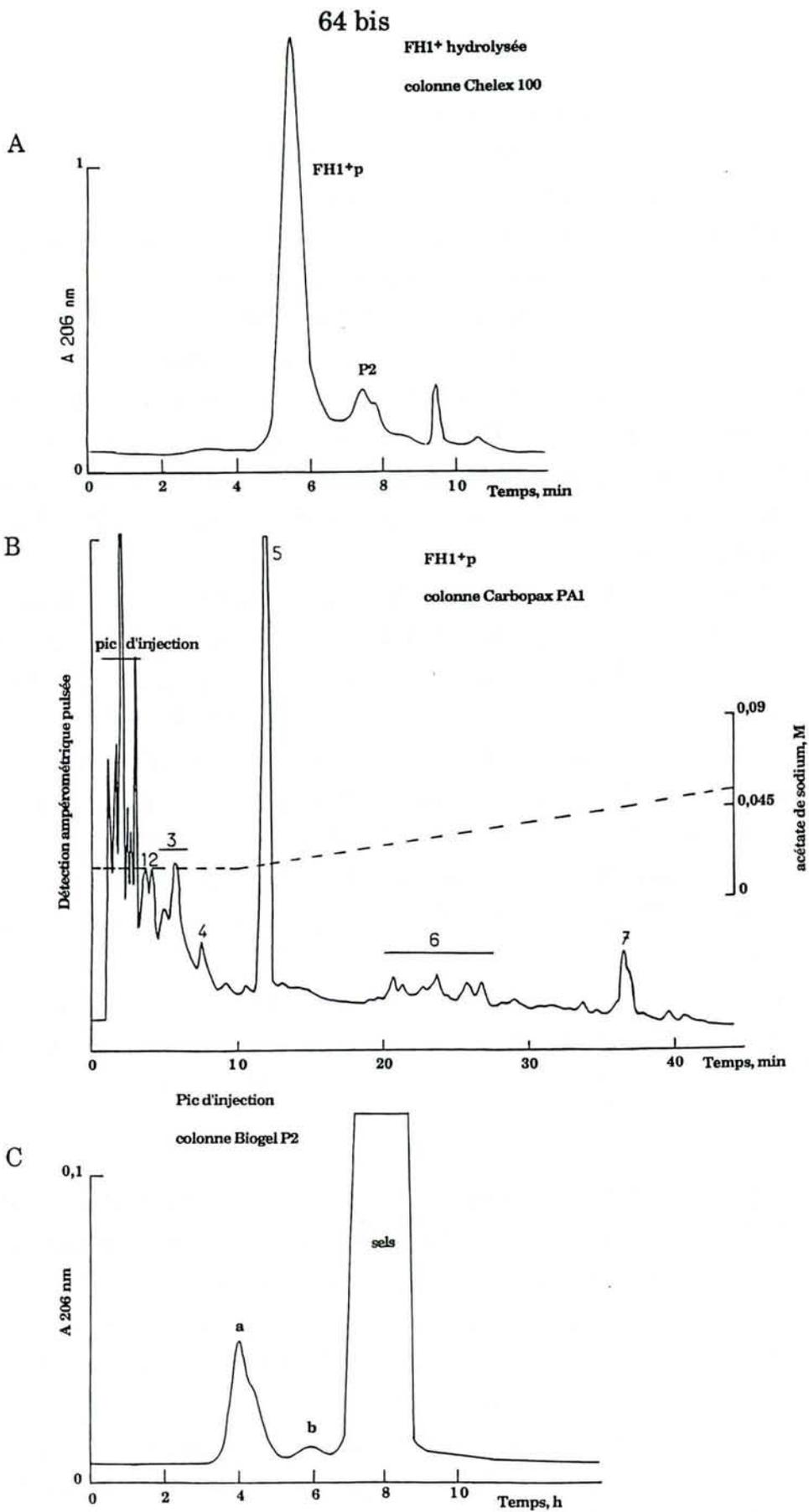
La présence simultanée des résidus Man et GalNAc dans FH1 montre l'hétérogénéité de la fraction. En effet, le résidu Man est témoin de la présence de liaisons N-glycosidiques, tandis que le résidu GalNAc est retrouvé dans les structures glycaniques liées O-glycosidiquement à la chaîne polypeptidique (MONTREUIL, 1984). La présence de N-glycosylprotéines est compatible avec l'affinité de certains constituants de FH1 pour les lectines ConA et WGA. La sous-unité B2<sup>+</sup>, notamment, est affine pour ConA et sa composition molaire est compatible avec une structure complexe biantennée. Cependant, le résidu GalNAc est présent en faible quantité. Il ne faut pas exclure le fait que ce résidu puisse être incorporé dans la structure glycanique à la place d'un résidu GlcNAc. En effet, ce cas rare a déjà été observé pour la lactotransferrine bovine (CODDEVILLE *et al*, accepté pour publication).

La sous-unité B2<sup>+</sup>, qui est la plus homogène au niveau de sa composition glycanique, est la seule qui réagit avec la lectine ConA couplée à la peroxydase. La sous-unité B3<sup>+</sup>, qui semble également posséder une structure N-glycosidique d'après sa composition glycanique, est retenue dans la colonne de ConA-Sepharose, soit par des liaisons faibles, soit en interagissant avec B2<sup>+</sup>, elle-même fortement adsorbée. Il semble exister une relation entre l'hétérogénéité de B3<sup>+</sup> et sa non-réactivité (ou très faible réactivité) avec ConA couplée à la peroxydase. La sous-unité B3<sup>+</sup> est riche en acides sialiques. Ces derniers pourraient donc interférer avec la reconnaissance de B3<sup>+</sup> pour ConA, soit par encombrement stérique, soit par des répulsions de charges.

Les composants de FH1<sup>-</sup> sont hétérogènes et contiennent peu de Man. Ils ne réagissent pas avec ConA couplée à la peroxydase. La présence éventuelle de structures N-glycosidiquement liées est plus difficile à mettre en évidence dans cette fraction.

**Affinité pour WGA :** la séquence GlcNAc(β1-4)Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn représente le déterminant structural reconnu par la lectine WGA (DEBRAY et MONTREUIL, 1991). Des glycanes de type poly-N-acétyllactosaminique se fixent avec une forte affinité dans une colonne de WGA immobilisée. La structure du core interne N,N'-diacétylchitobiose-Asn (GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn) est reconnue par la lectine.

Cependant, WGA est capable d'interagir spécifiquement avec les résidus NeuAc des glycoprotéines ou autres glycoconjugués, à cause de la configuration similaire entre les résidus GlcNAc et NeuAc au niveau de leur groupe acétamido. Les glycoconjugués riches en GlcNAc et NeuAc vont donc interagir fortement avec WGA.



**Figure 43.** Etapes chromatographiques successives de purification de fractions oligosaccharidiques ou glycopeptidiques issues de FH1+ traitée par la pronase et dessalée par chromatographie sur Biogel P2.



Tableau 10 : Composition glycanique des fractions pronasiques et  $\beta$ -éliminées.

Fractions	Fuc	Gal	Man	Glc*	GalNAc	GlcNAc	NeuAc
Témoin							
Sérotransferrine	-	2,2	<b>3,0</b>	-	-	4,1	1,8
Fractions pronasiques							
FH1+p	0,8	2,7	<b>3,0</b>	-	1,5	3,7	0,8
P2	1,0	<b>2,0</b>	-	3,0	-	1,0	-
FH1+pa	1,2	1,9	<b>3,0</b>	-	1,2	4,3	0,6
pic b	0,7	<b>2,0</b>	0,5	3,5	0,2	1,0	-
pic Carbopax 2	-	2,7	<b>3,0</b>	bcp	2,0	2,8	-
pic Carbopax 3	-	2,7	<b>3,0</b>	-	0,6	3,8	0,9
pic Carbopax 7	0,5	<b>2,0</b>	0,5	4,7	0,4	1,3	0,7
Fractions $\beta$ -éliminées							
FH1- $\beta$	-	3,1	<b>3,0</b>	2,8	0,7	1,6	1,5
pic 2	-	2,4	<b>3,0</b>	3,0	0,4	1,7	0,4
pic 2'	-	1,7	<b>3,0</b>	bcp	traces	2,1	0,4

Les rapports molaires sont calculés soit sur la base de 3 Man, soit de 2 Gal (valeurs en caractères gras).

\* Le résidu Glc, toujours détecté en CPG, n'est considéré que lorsqu'il est en quantité importante.

bcp : beaucoup

que celles citées ci-dessus, à savoir : NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-3)[NeuAc( $\alpha$ 2-6)]GalNAc( $\alpha$ 1-3)Ser/Thr.

Dans notre étude, la réaction avec PNA couplée à la peroxydase est négative dans tous les cas, même après désialylation. Les différentes sous-unités ne possèderaient donc pas le motif structural Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc( $\alpha$ 1-3)Ser/Thr. Cependant, cette expérience ne permet pas de dire s'il existe ou non d'autres structures plus complexes O-glycosidiquement liées aux sous-unités.

### 3.4- Analyse structurale par RMN.

Dans notre stratégie de préparation des échantillons destinés à l'analyse RMN, les fractions FH1<sup>-</sup> et FH1<sup>+</sup> suivent deux voies différentes. FH1<sup>-</sup>, non affine pour ConA, est traité chimiquement de façon à cliver des O-glycannes éventuellement présents et responsables de l'hétérogénéité de la composition glycanique de FH1. La fraction FH1<sup>+</sup>, affine pour ConA, est hydrolysée par la pronase de façon à obtenir des N-glycopeptides (éventuellement présents) contenant un minimum d'acides aminés.

Le spectre de RMN de la fraction FH1<sup>-</sup> $\beta$  montre des signaux correspondant à des oligosaccharides libres. La présence de Man dans la composition glycanique de cette fraction montre que FH1<sup>-</sup> $\beta$  est contaminée par des N-glycannes principalement élués dans la fraction "pic 2". La mise en évidence de structures O-glycanniques ou N-glycanniques ne peut cependant se faire dans cette fraction très hétérogène.

L'analyse RMN des échantillons issus de FH1<sup>+</sup> apporte par contre des renseignements structuraux très intéressants. La fraction FH1<sup>+</sup><sub>p</sub> contient des N-glycannes biantennés. La forte affinité de la sous-unité B2<sup>+</sup> de 19 kDa pour ConA et WGA montre que cette sous-unité contient la structure N-acétyllactosaminique. Il est cependant difficile de déterminer d'après le spectre de RMN si les résidus NeuAc appartiennent au N-glycane ou non. Les renseignements obtenus par désialylation enzymatique de FH1 tendent à montrer qu'une partie au moins des acides sialiques est comprise dans la structure, et ce à des taux variables.

FH1<sup>+</sup><sub>p</sub> contient également des oligosaccharides dont une structure a été isolée à l'état pur dans la fraction P2 (le fucosyl-lacto-N-tétraose). La présence de ce constituant dans FH1<sup>+</sup> expliquerait en partie pourquoi FH1<sup>+</sup> est fortement affine pour WGA. Cette structure est en effet similaire à une des deux branches de la structure du sialyllacto-N-néohexose isolé par chromatographie sur WGA (TARAGO *et al*, 1988).

Tableau 11 : Composition d'acides aminés de la fraction FH1<sup>+</sup>p.

Résidus d'acides aminés *	Picomoles/ $\mu$ l	Nombres de résidus calculés sur la base de 1 Asp
Asp	28,9	1,0
Glu	27,0	0,9
Ser	16,7	0,6
Gly	11,8	0,4
Thr	31,4	1,1
Ala	14,4	0,5
Pro	19,6	0,7
Tyr	3,4	0,1
Val	2,7	0,1
Leu	3,9	0,1

\* le tryptophane n'est pas dosé

Le fucose est un ose neutre hydrophobe. Il ne possède en effet pas de groupement hydroxyle sur le carbone 6. Dans les glycoprotéines, il interagit avec les acides aminés hydrophobes. La présence d'un résidu Fuc sur la chaîne oligosaccharidique renforce donc probablement son interaction avec le composant-3 hydrophobe.

La présence d'oligosaccharides libres a été mise en évidence surtout dans le lait humain. Actuellement, de nouvelles structures continuent à être identifiées (GRONBERG *et al*, 1990 ; KITAGAWA *et al*, 1991). Au moins une vingtaine de structures différentes a été élucidée dans le lait humain. Elles ont toutes en commun une molécule de lactose (Gal( $\beta$ 1-4)Glc), qui sert de matrice lors de la synthèse de structures complexes par addition de résidus Gal, Fuc, GlcNAc et NeuAc (GRONBERG *et al*, 1990).

Dans le lait bovin, les oligosaccharides existent en très faible quantité. La diversité des structures est probablement beaucoup moins conséquente que dans le lait humain. Selon NEESER *et al* (1991), le neuraminyllactose serait le seul oligosaccharide libre présent dans le lait bovin. Cependant, GRIMMONPREZ (1977) fait état de six structures glycaniques présentes à l'état libre dans le lait bovin. Ce sont le lacto-N-tétraose, le 3'-lactaminyllactose, le 3-lactaminylgalactose le 3-(N-glycolyl-neuraminyl)-lactose, le dilactaminyllactose et la 6'-lactaminyllactosamine. L'ensemble des oligosaccharides libres du lait moins le lactose sont regroupés sous le terme de "gynolactose". A cette liste, nous pouvons ajouter le dérivé fucosylé du lacto-N-tétraose mis en évidence par RMN dans notre fraction P2.

Les oligosaccharides libres n'ont pas une origine glycoprotéique comme en témoignent l'absence de Glc et la présence de Man ou de GalNAc dans les glycoprotéines. Le problème de l'origine de ces substances glucidiques n'est pas pour l'heure résolu.

Quant au rôle biologique joué par le gynolactose du lait humain, nous citons GRIMMONPREZ (1977) :

"le seul rôle connu des oligosaccharides est celui de facteur de croissance du *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus*. Actuellement, on admet que le *Lactobacillus bifidus* (var. *infantis*) intervient dans la protection de la muqueuse intestinale en inhibant le développement des germes pathogènes responsables des diarrhées, conjointement avec les immunoglobulines IgA, la lactotransferrine, le facteur  $\alpha$ -1 antitrypsique et le lysozyme. Les immunoglobulines agiraient, d'une part, en tant qu'anticorps contre certains germes pathogènes, d'autre part, en se conjuguant aux mucines et en renforçant le rôle protecteur de ces dernières. La lactotransferrine jouerait le rôle de chélateur du fer, métal indispensable aux microorganismes. Il est possible que dans ce mécanisme de défense les

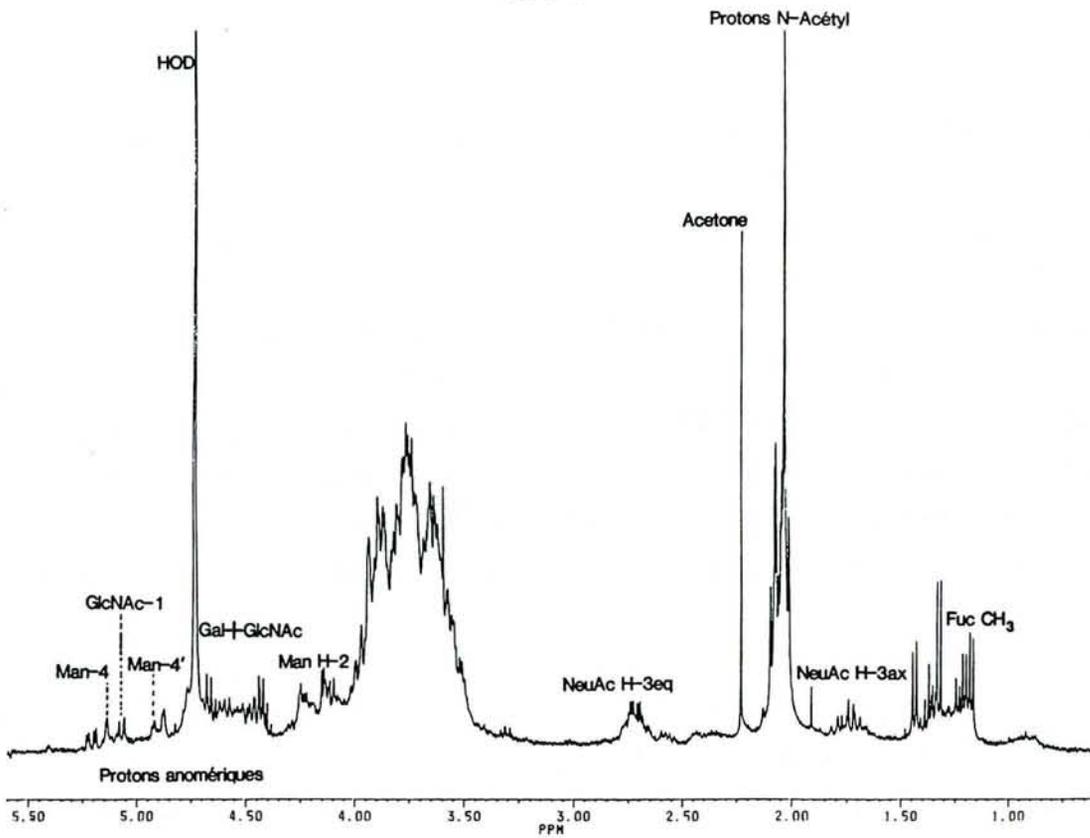


Figure 44 a. Spectre RMN du proton de la fraction FH1+p à 400 MHz.

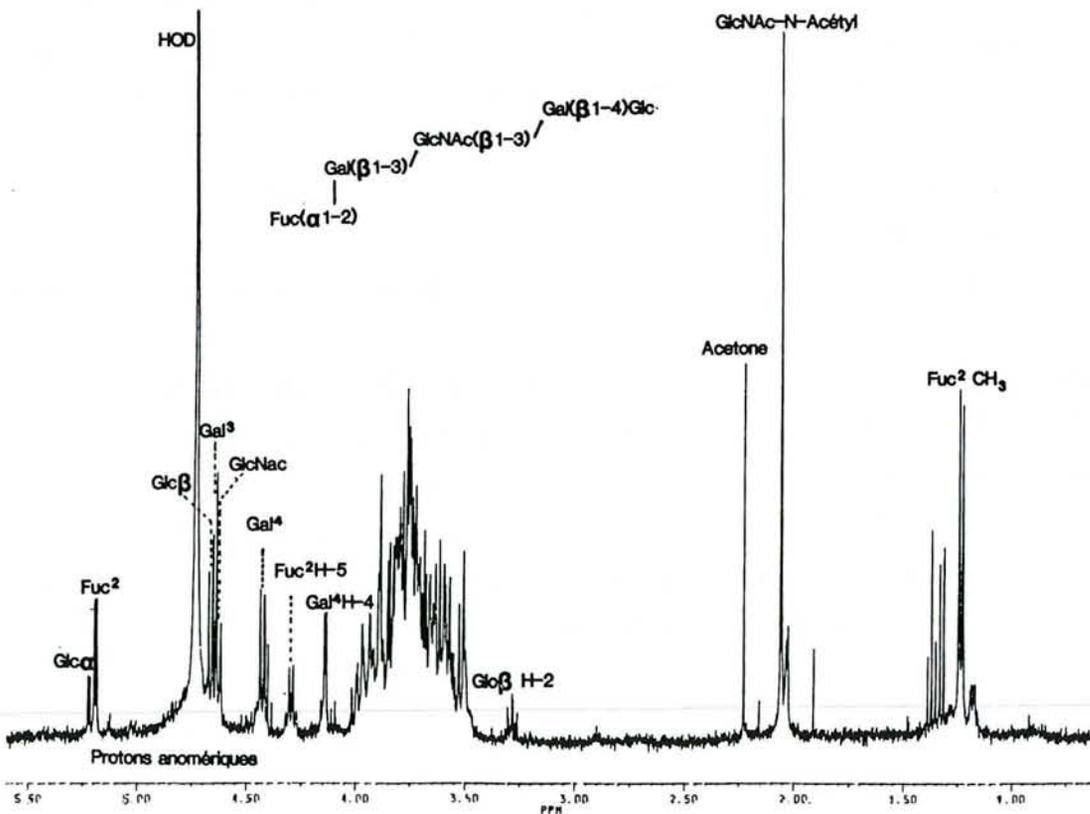


Figure 44 b. Spectre RMN du proton de la fraction P2 à 400 MHz.

oligosaccharides et glycopeptides interviennent en s'associant aux protéines précédentes, mais il s'agit là d'une simple hypothèse."

L'hypothèse émise par GRIMMONPREZ (1977) est à rapprocher de nos travaux, où les oligosaccharides s'associent fortement aux sous-unités glycoprotéiques de FH1. Les étapes de purification n'ont pas permis de dissocier ces deux groupes de molécules. Il semble donc que l'association oligosaccharides/glycoprotéines a une signification particulière.

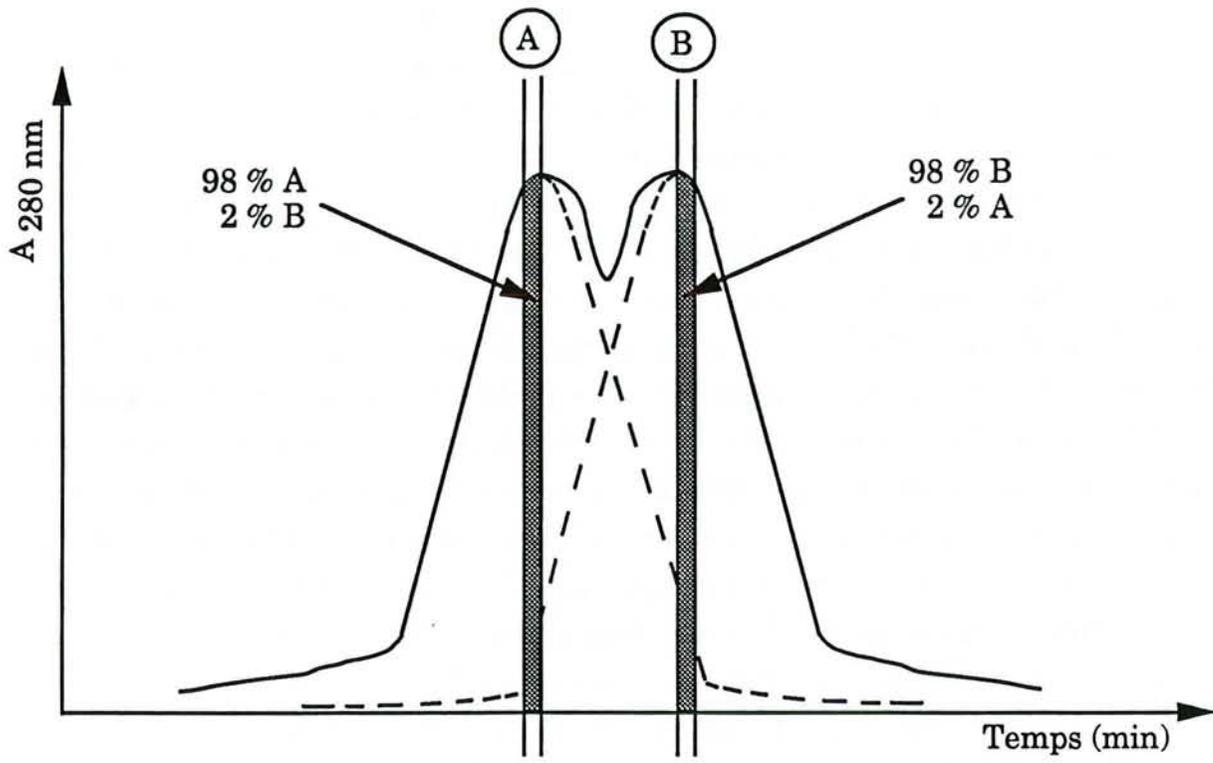
La présence des oligosaccharides libres dans FH1 est responsable du taux relativement élevé de glycannes dans cette fraction (17% ; tableau 8). Les N-glycoprotéines ont habituellement des teneurs beaucoup plus faibles (autour de 5% de glycannes). Des taux élevés de glycannes ont également été déterminé pour la fraction PP3 de NG *et al* (1970), la fraction glycoprotéique des protéose-peptones de KESTER et BRUNNER (1982) et la lactophorine (KANNO, 1989b), respectivement de 17,3%, 18,7% et 18,0%. Il semble donc que ces fractions contiennent également des oligosaccharides. La teneur de ces molécules ne dépend apparemment pas du mode de préparation du composant-3 et la reproductibilité des pourcentages est un indice supplémentaire qui permet de penser que les oligosaccharides font partie du "complexe moléculaire composant-3" et ne sont pas des contaminants.

L'hypothèse de KANNO (1989b), concernant la présence simultanée de liaisons N- et O-glycosidiques sur la lactophorine du fait de la teneur élevée en Man, GlcNAc et GalNAc, n'est donc pas confirmée par nos travaux, car nous n'avons pas pour l'heure mis en évidence de structure O-glycannique.

#### 4- Conclusion.

Les différentes analyses de la partie glycannique de FH1 nous ont apporté plusieurs renseignements fondamentaux :

- mise en évidence d'une structure N-lactosaminique biantennée contenant probablement un résidu GalNAc. La sous-unité B2<sup>+</sup> de 19 kDa, fortement affine pour ConA et WGA, est une N-glycoprotéine ;
- mise en évidence d'oligosaccharides fortement adsorbés aux glycoprotéines de FH1, et en particulier du fucosyl-lacto-N-tétraose, qui existe dans le lait humain mais qui n'avait pas été jusque-là identifié dans le lait bovin ;
- l'hétérogénéité des constituants de FH1 semble en grande partie due à la présence d'oligosaccharides adsorbés aux glycoprotéines ;
- les acides sialiques jouent un rôle dans la stabilité de la conformation du composant-3 et sont en grande partie responsables des différences de charges de la sous-unité B3, observées par PAGE-2D et FPLC d'échange d'ions (voir chapitre 1) ;



**Figure 45.** Pureté des fractions collectées dans le cas de deux pics peu résolus.

- la déstabilisation de l'agrégation (observée dans le cas du fractionnement de FH1d ou FH1- par FPLC de filtration sur gel) est corrélée avec la libération des oligosaccharides. Les groupements carboxyliques des acides sialiques semblent essentiels à la cohésion du complexe moléculaire.

Afin d'obtenir un spectre de RMN caractéristique d'une structure N-glycannique pure, il est nécessaire d'éliminer les oligosaccharides. Dans cette optique, il serait intéressant de réaliser le fractionnement des protéose-peptones par FPLC-IH en présence de détergent, comme par exemple le SDS.

Une bonne connaissance de la nature de la partie glycannique nous permettra dans un avenir proche de mettre au point une stratégie efficace de déglycosylation totale du composant-3. L'élimination des glucides de la fraction FH1 est en effet une étape nécessaire si l'on veut déterminer la structure primaire de la partie apoprotéique du composant-3.



# **CHAPITRE 3**

**Relation composant-3 - glycoprotéines de  
membranes de globules gras**

## 1- Introduction : les protéines des membranes de globules gras du lait (MGG).

### 1.1- Composition et structure de la MGG.

Le lait bovin contient un peu moins de 5% de matière grasse (constituée elle-même de 99% de triglycérides) organisée en globules dont le diamètre peut aller de 0,1 à 10  $\mu\text{m}$ . Ces globules sont entourés d'une membrane (10 nm environ d'épaisseur) composée de protéines, glycoprotéines, enzymes, phospholipides, triglycérides et de cholestérol. Cette membrane est un agent émulsifiant naturel, qui permet aux globules gras de rester dispersés dans la phase aqueuse du lait (Mac PHERSON et KITCHEN, 1983). Une hydrolyse ménagée des glycoprotéines associées à la surface des MGG par la papaïne résulte en une baisse notable de la stabilité de l'émulsion. L'effet déstabilisant est cependant faible lorsque l'on utilise de la trypsine ou de la chymotrypsine au lieu de la papaïne (SHIMIZU *et al*, 1980).

La MGG est originaire de la membrane plasmique apicale des cellules de la glande mammaire en lactation. Elle est également composée en partie de matériel membranaire de vésicules sécrétatoires de l'appareil de Golgi. De même, il faut remarquer qu'une certaine proportion de globules gras inclut du matériel cytoplasmique de cellules en lactation (figure 47c ; HUSTON et PATTON, 1990). Ce phénomène s'observe davantage avec une population de globules gras de lait humain (10% en moyenne possèdent un croissant de cytoplasme) qu'avec une population de l'espèce bovine (environ 1% des globules gras possède un croissant cytoplasmique). Le phénomène de sécrétion des globules gras et plus particulièrement de synthèse de la MGG n'est pas encore totalement élucidé. Cependant, l'étude des protéines et glycoprotéines membranaires permet d'apporter de nombreux éléments indispensables à la compréhension de l'organisation dynamique des MGG.

La morphologie de la surface des globules gras de lait humain, étudiée par microscopie électronique, révèle la présence de nombreux filaments formant un manteau, le glycocalyx, riche en composés glycoconjugués (figure 47a ; BUCHHEIM, 1986). Le même phénomène est observé chez la jument (WELSCH *et al*, 1988), mais le cas est différent dans l'espèce bovine, où l'on observe une structure granulaire, variable dans la taille et le nombre des granules (figure 47b). Celle-ci est constituée de glycoprotéines. On notera que l'aspect "plaqué" des filaments ou des granules contre la surface du globule gras est la conséquence du traitement de sublimation de l'eau effectué sur les globules avant leur examen par microscopie électronique.

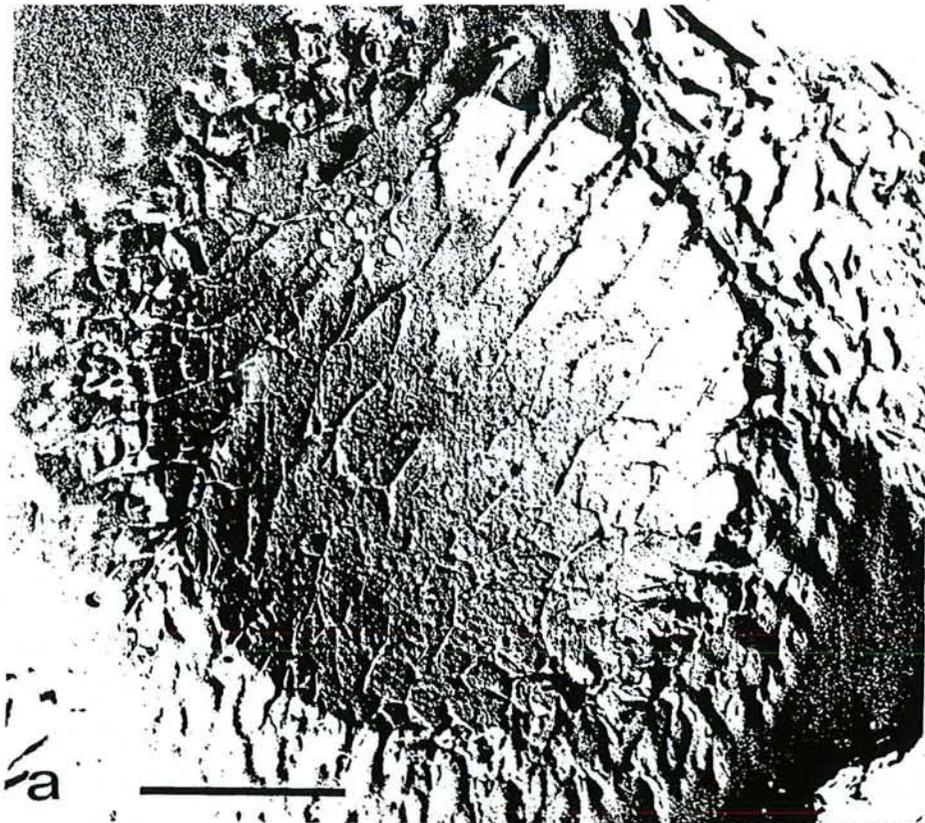


Figure 47 a. Vue de la surface externe d'un globule gras du lait humain par microscopie électronique. Trait = 1  $\mu$ m (d'après BUCHHEIM, 1986).

Figure 47 b. Vue de la surface externe d'un globule gras du lait bovin par microscopie électronique. Trait = 1  $\mu$ m (d'après BUCHHEIM, 1986).

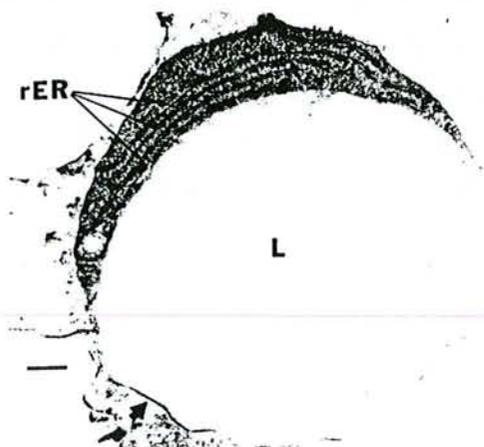
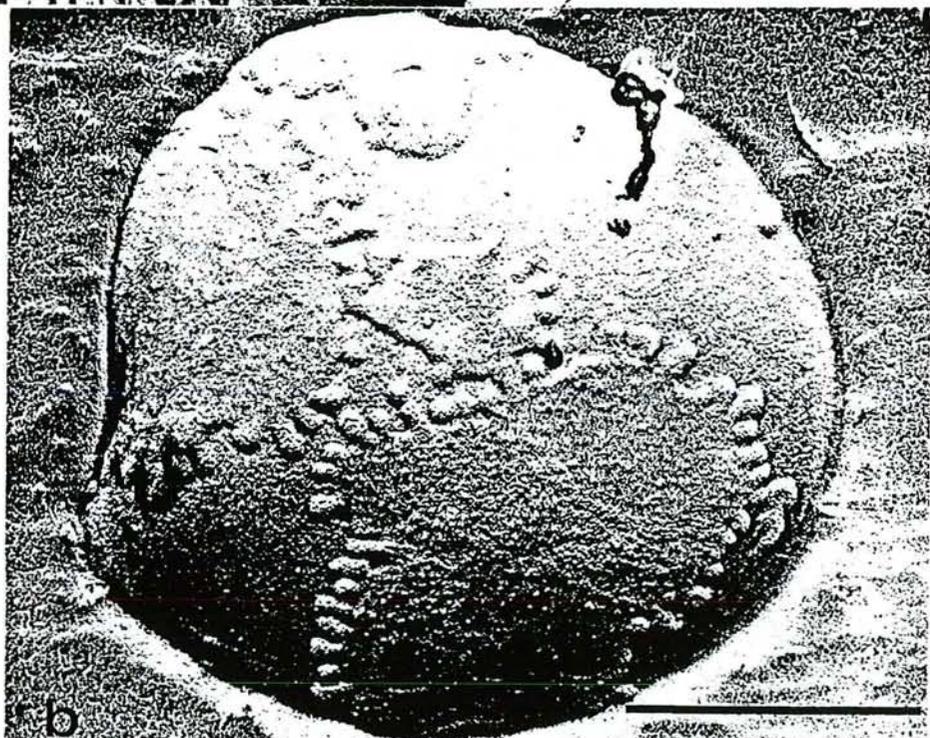


Figure 47 c. Photomicrographie électronique d'un globule gras du lait humain contenant un croissant de cytoplasme. Le reticulum endoplasmique (rER) est bien conservé ainsi que la membrane (flèche en bas à gauche) contenant la gouttelette lipidique et le cytoplasme. Trait = 0,5  $\mu$ m (d'après HUSTON et PATTON, 1990).

L'étude réalisée sur les globules gras humains montre qu'un traitement thermique de 80°C pendant 10 min libère les filaments de la surface du glycocalyx (BUCHHEIM, 1986).

La raison de l'absence de l'aspect filamenteux du glycocalyx dans l'espèce bovine est due, d'une part à la faible quantité de glycoprotéines sur le globule bovin, et d'autre part aux faibles masses moléculaires et teneurs en glycannes de ces glycoprotéines bovines.

### **1.2- Les glycoprotéines des MGG humaines.**

Certaines glycoprotéines de MGG humaines sont de type mucine (de plusieurs centaines de kDa), comme la glycoprotéine PAS-0 (appelée aussi HM-glycoprotéine C par SHIMIZU *et al*, 1986), qui contient environ 50% de glycannes liés O-glycosidiquement à la matrice polypeptidique (SHIMIZU et YAMAUCHI, 1982). La molécule PAS-0 est porteuse de l'antigène des membranes épithéliales EMA et est hautement exprimée dans les cellules tumorales. Les anticorps anti-EMA sont des marqueurs utilisés dans le diagnostic des pathologies tumorales. Ils sont la base de la méthode de détection des micrométastases lors de biopsies (ORMEROD *et al*, 1985 ; GENDLER *et al*, 1987).

De plus, il a été montré récemment que PAS-0 inhibait la croissance des cellules 3T3 (SHIMIZU *et al*, 1990).

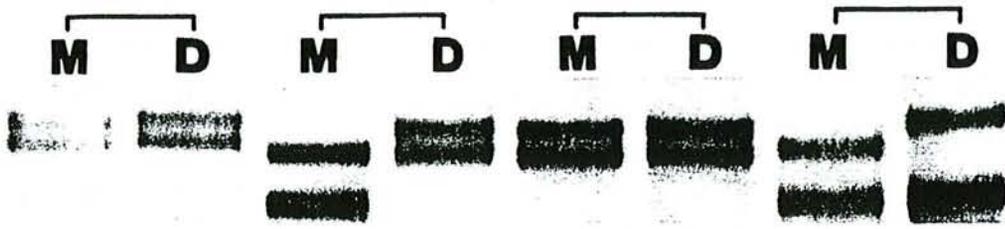
La HM-glycoprotéine A est également de type mucine et sa proportion en glycannes est de 65-80% (SHIMIZU *et al*, 1986).

Il a été également mis en évidence d'autres glycoprotéines contenant des proportions plus faibles en glycannes. La présence importante de mannose dans la composition glycannique est le témoin probable de la nature N-glycosidique de ces constituants. Ainsi, IMAN *et al* (1981 et 1982) isolent trois glycoprotéines appelées EMGP-70, EMGP-155 et EMGP-39 contenant respectivement 13,5% ; 21% et 7% de glycannes. EMGP signifie "*Epithelial Membrane Glycoprotein*" et le nombre qui suit exprime la masse moléculaire en kDa.

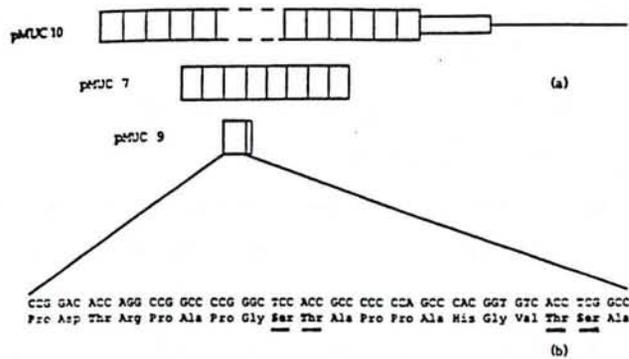
Notons également que les glycoprotéines de MGG humaines possèdent des quantités importantes d'acides sialiques.

### **1.3- Les protéines et glycoprotéines des MGG bovine et d'autres espèces.**

Dans le lait bovin, il a été dénombré sept composés solubles (dans la gamme 10 à 88 kDa) réagissant au réactif de Schiff (SHIMIZU *et al*, 1976). Cependant, les six composés (PAS-II à PAS-VII) sont difficiles à détecter, car ils sont en très faible



**Figure 48 a.** Partie d'un gel de PAGE-SDS à 6% d'acrylamide montrant les bandes de PAS-I de quatre vaches mères (M) et de leurs filles (D). Pour chacun des cas, il y a au moins une bande commune entre M et D (d'après PATTON et PATTON, 1990).



**Figure 48 b.** (a) Représentation schématique de la structure tandem répétée de trois clones de gènes codant pour la mucine humaine PEM ("*polymorphic epithelial mucine*") exprimée dans les cellules de glandes mammaires cancéreuses et analogue à PAS-0. (b) Séquence nucléotidique et séquence d'acides aminés déduite d'une unité répétée. Les sites potentiels de O-glycosylation sont soulignés (d'après GENDLER *et al*, 1988).

concentration dans la fraction protéique membranaire. Ces composés seraient des glycopeptides issus d'une protéolyse de glycoprotéines membranaires natives. Ainsi, les travaux de HOFMANN *et al* (1979) mettent en évidence une activité protéolytique des MGG due à l'association du système plasminogène/plasmine avec les membranes. Le composant majeur de 70 kDa est rapidement dégradé, tandis que les composants 155 et 34 kDa sont lentement protéolysés. Les produits de dégradation obtenus ont des masses moléculaires de 92 ; 20 ; 18 ; 12 et 8,5 kDa.

Les travaux de ces dix dernières années ont permis de mieux définir les protéines principales des MGG, notamment chez la vache et chez le cobaye.

### 1.3.1- La glycoprotéine PAS-I.

C'est une molécule hydrophile qui possède une masse moléculaire apparente élevée d'environ 200 kDa. Elle réagit fortement avec le réactif de Schiff mais peu avec le Bleu de Coomassie après migration par PAGE-SDS (JOHNSON *et al*, 1988). Sa composition chimique a été caractérisée chez le cobaye. Les résidus Ser et Thr représentent 30% des acides aminés et les glycanes détectés (30 à 50% de la molécule) sont les suivants : Gal, GalNAc, GlcNAc, Man et NeuAc. Les acides sialiques représentent à eux seuls 60% des glycanes. Le pH isoélectrique (pHi) est inférieur à 4 mais n'a pas pu être déterminé précisément. Après désialylation enzymatique, PAS-I fixe spécifiquement la lectine PNA, qui reconnaît les motifs  $\beta$ -D-Gal( $\beta$ 1-3)-D-GalNAc. La glycoprotéine PAS-I est similaire à PAS-0 du lait humain (PATTON *et al*, 1989).

L'analyse PAGE-SDS avec un gel d'acrylamide à 6% montre que, dans l'espèce bovine, PAS-I présente un polymorphisme génétique plus important encore que celui des protéines principales du lait (caséine,  $\beta$ -lactoglobuline,  $\alpha$ -lactalbumine). Il consiste en une paire de bandes de mobilités variables selon les individus (figure 48a ; PATTON et PATTON, 1990). La première génération de descendants d'une vache présente toujours au moins une bande électrophorétique commune avec la vache mère. Des individus jumeaux-vrais ont un profil identique concernant PAS-I. Le polymorphisme génétique de PAS-I semble similaire à celui de la glycoprotéine humaine PAS-0 (SWALLOW *et al*, 1987). Les fortes teneurs en Ser et Thr, comme dans le cas de PAS-0 (figure 48b ; GENDLER *et al*, 1988), sont un indice de séquences tandem répétées, glycosylées et de masses moléculaires proches de 4 000 Da (pour PAS-0). La plus grande différence de masses moléculaires observées par PAGE-SDS entre les deux bandes de PAS-I d'un individu est de 30 kDa, ce qui montre la présence d'au moins sept à huit allèles différents, responsables de la variation du nombre de séquences tandem répétées. L'addition de

telles séquences sur une glycoprotéine est un remarquable mécanisme d'amplification de la glycosylation, et notamment de la sialylation. Les acides sialiques portés par les glycoprotéines membranaires jouent un rôle important, car ils contribuent à la stabilité de la dispersion des globules gras dans le lait natif et permettent d'éviter les phénomènes de floculation ou de coalescence des globules (SHIMIZU *et al*, 1980).

### 1.3.2- La xanthine oxydase (XO).

La XO de vache présente une forte homologie immunologique avec celle de cobaye. De même, les cartes peptidiques des hydrolysats obtenus par action de la protéase V8 de *Staphylococcus aureus* sont similaires (JOHNSON *et al*, 1985). Par électrophorèse bidimensionnelle, elle présente trois variants isoélectriques de pHI compris entre 6,7 et 7,0. Sa masse moléculaire est de 155 kDa et la XO ne réagit pas avec le réactif de Schiff.

La XO est présente sous forme soluble dans le cytoplasme des cellules mammaires sécrétantes. Après sa synthèse, l'enzyme soluble est incorporée dans les MGG, soit par association à la surface des gouttelettes lipidiques intracellulaires, soit par intégration directe sur la face cytoplasmique de la membrane apicale plasmatisque (MATHER *et al*, 1984).

La XO est l'enzyme la plus abondante dans le lait de vache (RIBADEAU-DUMAS, 1991). Elle est formée d'un dimère réunissant deux sous-unités de 155 kDa. Chaque sous-unité contient comme cofacteurs une molybdoptérine, une molécule de FAD et possède deux sites de fixation du fer et du soufre. La XO appartient à la famille des hydroxylases à molybdoptérine (WOOTTON *et al*, 1991). Ces enzymes présentent des homologies de structures primaires, et notamment la région fixant le cofacteur molybdoptérique est bien conservée. Il n'existe aucune homologie de structure entre les procaryotes et les eucaryotes. Actuellement, la XO n'a pas encore été séquencée (WOOTTON *et al*, 1991).

La fonction *in vivo* principale de la XO est de catalyser l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique. Ces produits de dégradation sont en fait issus du catabolisme de l'adénine et de la guanine.

### 1.3.3- Les glycoprotéines GP80 et GP55.

Elles présentent chacune quatre variants isoélectriques chez le cobaye localisés dans un intervalle de pH de 6,8 à 7,8 (JOHNSON *et al*, 1985). Très hydrophobes, elles nécessitent l'apport de 0,1% de Triton X114 pour leur

GAAATCCGCATCAGAGCGCGTGGACCTTTTCCCGCGTCCCGCAGC Met Gln Val Ser Arg Val Leu Ala  
 ATG CAG GTC TCC CGT GTC CTS GCC  
 ---  
 14 Ala Leu Cys Gly Met Leu Leu Cys Ala Ser Gly Leu Phe Ala Ala Ser Gly Asp Phe Cys  
 GCG CTS TGC GGC ATG CTA CTC TGC GCC TCT GGC CTC TTC GCC GCG TCT GGT GAC TTC TGT  
 ---  
 7 Asp Ser Ser Leu Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Leu Thr Gly Gln Asp Asn Asp Ile Tyr  
 GAC TCC AGC CTS TGC CTS AAC GGT GGC ACC TGC TTG ACG GGC CAA GAC AAT GAC ATC TAC  
 ---  
 27 Cys Leu Cys Pro Glu Gly Phe Thr Gly Leu Val Cys Asn Glu Thr Glu Arg Gly Pro Cys  
 TGC CTC TGC CCG GAA GGC TTC ACA GGC CTT GTG TGC AAT GAG ACT GAG AGA GSA CCA TGC  
 ---  
 47 Ser Pro Asn Pro Cys Tyr Asn Asp Ala Lys Cys Leu Val Thr Leu Asp Thr Gln Arg Gly  
 TCC CCA AAC CCG TGC TAC AAT GAT GCC AAA TGT CTS GTG ACT TTS GAC ACA CAG CCG GGG  
 ---  
 67 Asp Ile Phe Thr Glu Tyr Ile Cys Gln Cys Pro Val Gly Tyr Ser Gly Ile His Cys Glu  
 GAC ATC TTC ACC GAA TAC ATC TGC CAG TGC CCT GTG GGC TAC TCG GGC ATC CAC TGT GAA  
 ---  
 67 Thr Glu Thr Asn Tyr Tyr Asn Leu Asp Gly Glu Tyr Met Phe Thr Thr Ala Val: Pro Asn  
 ACC GAG ACC AAC TAC TAC AAC CTG GAT GGA GAA TAC ATG TTC ACC ACA GCC GTC CCC AAT  
 ---  
 107 Thr Ala Val: Pro Thr Pro Ala Pro Thr Pro Asp Leu Ser Asn Asn Leu Ala Ser Arg Cys  
 ACT GCC CTG CCC ACC CGC GCC CCC ACC CCC GAT CTT TCC AAC AAC CTA GCC TCC CCG TGT  
 ---  
 127 Ser Thr Gln Leu Gly Met Glu Gly Gly Ala Ile Ala: Asp Ser Gln Ile Ser Ala Ser Tyr  
 TCT ACA CAG CTS GGC ATG GAA GGG GGC GCC ATT GCT GAT TCA CAG ATT TCC GCC TCG TAT  
 ---  
 147 Val Tyr Met Gly Phe Met Gly Leu Gln Arg Trp Gly Pro Glu Leu Ala Arg Leu Tyr Arg  
 GTG TAT ATG GGT TTC ATG GGC TTG CAG CCG TGG GGC CCG GAG CTG GCT CGT CAG CCG  
 ---  
 167 Thr Gly Ile Val Asn Ala Trp His Ala Ser Asn Tyr Asp Ser Lys Pro Trp Ile Gln Val  
 ACA GGG ATC GTC AAT GCC TGG CAC GCC AGC AAC TAT GAT AGC AAG CCC TGG ATC CAG GTG  
 ---  
 167 Asn Leu Leu Arg Lys Met Arg Val Ser Gly Val Met Thr Gln Gly Ala Ser Arg Ala Gly  
 AAC CTT CAG CCG AAG ATG CCG GTA TCA GGT GTG ATG ACG CAG GGT GCC GCG CCG GGG  
 ---  
 207 Arg Ala Glu Tyr Leu Lys Thr Phe Lys Val Ala Tyr Ser Leu: Asp Gly Arg Lys Phe Glu  
 AGG GCG GAG TAC CTS AAG ACC TTC AAG GTG GCT TAC AGC CTC GAC GSA CCG AAG TTT GAG  
 ---  
 227 Phe Ile Gln Asp Glu Ser Gly Gly Asp Lys Glu Phe Leu Gly Asn Leu Asp Asn Asn Ser  
 TTC ATC CAG GAT GAA AGC GGT GGA GAC AAG GAG TTT TTG GGT AAC CTG GAC AAC AAC AGC  
 ---  
 247 Leu Lys Val Asn Met Phe Asn Pro Thr Leu Glu Ala Gln Tyr Ile Arg Leu Tyr Pro Val  
 CTS AAG GTT AAC ATG TTC AAC CCG ACT CTS GAG GCA CAG TAC ATA AGG CTS TAC CCT GTT  
 ---  
 267 Ser Cys His Arg Gly Cys Thr Leu Arg Phe Glu Leu Leu Gly Cys: Glu Leu His Gly Cys  
 TCG TGC CAC CCG GGC TGC ACC CTC CCG TTC GAG CTC CTG GGC TGT GAG TTG GAG CAG TGT  
 ---  
 267 Leu Glu Pro Leu Gly Leu Lys Asn Asn Thr Ile Pro: Asp Ser Gln Met Ser Ala Ser Ser  
 CTC GAG CCC CTS GGC CTS AAG AAT AAC ACA ATT CCT GAC AGC CAG ATG TCA GCC TCC AGC  
 ---  
 307 Ser Tyr Lys Thr Trp Asn Leu Arg Ala Phe Gly Trp Tyr Pro His Leu Gly Arg Leu Asp  
 ASC TAC AAG ACA TGG AAC CTC CCG TTT GGC TGG TAC CCC CAC TTG GSA AGG CTG GAT  
 ---  
 327 Asn Gln Gly Lys Ile Asn Ala Trp Thr Ala Gln Ser Asn Ser Ala Lys Glu Trp Leu Gln  
 AAT CAG GGC AAG ATC AAT GCC TGG ACG GCT CAG GCG AAC AGT GCC AAG GAA TGG CTG CAG  
 ---  
 347 Val Asp Leu Gly Thr Gln Arg Gln Val Thr Gly Ile Ile Thr Gln Gly Ala Arg Asp Phe  
 GTT GAC CTS GGC ACT CAG AGG CAA GTG ACA GGA ATC ATC ACC CAG GGG GCC CGT GAC TTT  
 ---  
 367 Gly His Ile Gln Tyr Val Glu Ser Tyr Lys Val Ala His Ser: Asp Asp Gly Val Gln Trp  
 GGC CAC ATC CAG TAT GTG GAG TCC TAC AAG GTA GCC CAC AGT GAT GAT GGT GTG CAG TGG  
 ---  
 367 Thr Val Tyr Glu Glu Gln Gly Ser Ser Lys Val Phe Gln Gly Asn Leu Asp Asn Asn Ser  
 ACT GTA TAT GAG GAG CAA GGA AGC AGC AAG GTC TTC CAG GGC AAC TTG GAC AAC AAC TCC  
 ---  
 407 His Lys Lys Asn Ile Phe Glu Lys Pro Phe Met Ala Arg Tyr Val Arg Val Leu Pro Val  
 CAC AAG AAG AAC ATC TTC GAG AAA CCC TTC ATG GCT CGC TAC GTS CGT GTC CTT CCA GTG  
 ---  
 427 Ser Trp His Asn Arg Ile Thr Leu Arg Leu Glu Leu Leu Gly Cys: DC  
 TCC TGG CAT AAC CCG ATC ACC CTS CCG CTS GAG CTG CTG GGC TGT TAA TGCTCAGTCTCTGCCA  
 ---  
 GCCCAACGATGAGGATGGCCAGAGGCTGAGGGGSCCTCCTGSCCCTGCCCTCCAGGCCCTGCTGCTCTCTGGCTGAC  
 GACCTTCTGSCCCTTCCCTCTGATGTACTGSGGCTGGAGGCAGGAGGGCCAGGGAATTTCAGAGTTGCCCTTCCACC  
 CTTTCCCTCACCCTGAGCCCCACAGGCTCCTGCTAGCCCTCTCTCAGGSCATCTGGGGGATTTGGACAGGCTCT  
 SAGATGAGATGAGAGAGAGAGTGAAGTTGGGGTATGTGGGCTATCTGTACCAACCCACCCCAAGTCTTAAACTTCTGCG  
 ASGGCTGACTCAGGACTSAGGSGAGCCCTGACTGCCCATCCCTCTCTGCACACCCACATCTCTCATTTCCATCTG  
 CBBGAAGGAGAGAGGCCACGTCGGCTTGGCTGCCCTTGGGTCACCAAGTCTGCTGCTCTATCTCTGAGACGCTCTG  
 CCTTGGGACTGGGCTCAGTTGACAGGAGACTGGCGGGCTGGAGAGGTCGGTGGCTCTGGGTTGGAGGTTGG  
 CTGTGGGACCTCTGCTGGCTTGCACCCCAAGTAAACAAGCAGATTCCAAAATACATCTGTGTTCTCCACTGSAAAAAA  
 AAAAAAAGGAGTTCT

**Figure 49.** Séquence nucléotidique de l'ADNc codant pour la glycoprotéine GP55 de souris et séquence d'acides aminés déduite. Trait pointillé : région riche en Cys ; trait plein : séquence répétée (fragments 139-281 et 299-441) ; groupe des cinq encadrés : région riche en Pro (d'après STUBBS *et al*, 1990).

solubilisation. Les molécules de GP80 sont similaires dans les deux espèces humaine et bovine. La nature hydrophobe de GP80 de l'espèce bovine a été confirmée par l'analyse de sa composition en acides aminés (tableau 12 ; GREENWALT et MATHER, 1985).

Quant à GP55, l'analyse de la carte peptidique après hydrolyse trypsique montre des similitudes pour les deux espèces vache et cobaye (JOHNSON *et al*, 1985). Cette glycoprotéine est synthétisée dans les cellules de glandes mammaires sous une forme liée aux membranes. Pendant le processus intracellulaire, une partie de GP55 devient soluble et, lors de la sécrétion du lait, on retrouve la molécule de GP55 associée aux MGG mais également sous forme soluble dans le lait écrémé (MATHER *et al*, 1984).

Récemment, la structure primaire de GP55, chez la souris, a été déduite à partir de l'ADNc (figure 49 ; STUBBS *et al*, 1990). La chaîne polypeptidique est constituée de 441 acides aminés pour une masse moléculaire calculée de 51,473 kDa. Les 86 premiers acides aminés, côté N-terminal, forment un domaine riche en cystéine dont le motif tenant compte de l'espacement entre les résidus Cys est répété en double (séquence tandem) : Cys-X<sub>4</sub>-Cys-X<sub>5</sub>-Cys-X<sub>n</sub>-Cys-X<sub>1</sub>-Cys-X<sub>8</sub>-Cys. Cette région de 86 acides aminés est suivie d'un domaine riche en proline (le fragment 105-116 contient cinq prolines). Le domaine N-terminal riche en Cys présente de fortes homologues avec les structures primaires des facteurs de croissance épithéliaux EGF, avec le domaine "EGF-like" de la protéine Notch-1 de *Drosophila*. Le rôle de ces domaines riches en Cys n'est pour l'heure pas élucidé. STUBBS *et al* (1990) proposent de nommer cette glycoprotéine MFG-E8 pour "Milk Fat Globule - EGF factor 8".

La structure primaire de GP55 contient également une séquence répétée en tandem (fragments 139-281 et 299-441) riche en Ser et Thr. Il est à noter également que plusieurs sites potentiels de N- et O-glycosylations existent sur la chaîne polypeptidique.

La région C-terminale est similaire aux régions C-terminales des facteurs V et VIII humains de la coagulation sanguine. La fonction de ces domaines C-terminaux serait de permettre la fixation aux phospholipides anioniques à la surface des plaquettes ou des cellules épithéliales dans le cas de GP55.

#### 1.3.4- La butyrophiline.

Elle est la glycoprotéine majeure de la MGG bovine. Elle est également présente chez de nombreuses autres espèces comme l'espèce humaine, la chèvre, la brebis, la truie, la rate et le cobaye (HEID *et al*, 1983).

**Tableau 12 : Composition en acides aminés de PAS-IV (ou GP80) (d'après GREENWALT et MATHER, 1985)**

Acides aminés	Nombre de résidus (76 kDa)	Proportion relative (%)
Alanine	49,5	7,9
Glycine	67,8	10,9
Isoleucine	47,5	7,6
Leucine	55,0	8,8
Méthionine	5,1	0,8
Phénylalanine	30,4	4,9
Proline	34,3	5,5
Tryptophane	-	-
Valine	61,7	9,9
Cystéine	11,3	1,8
Sérine	52,8	8,5
Thréonine	53,6	8,6
Tyrosine	15,9	2,5
Acide Aspartique + Asparagine	44,0	7,1
Acide Glutamique + Glutamine	17,6	2,8
Arginine	11,8	1,9
Histidine	24,5	3,9
Lysine	39,5	6,3
<b>TOTAL</b>	<b>622</b>	<b>100</b>

Son nom a été proposé la première fois par FRANKE *et al* (1981) et signifie "qui a une affinité pour la matière grasse du lait". Chez la vache, sa masse moléculaire est de 67 kDa. La butyrophiline présente quatre variants isoélectriques de pHi 5,30 ; 5,27 ; 5,24 et 5,22 réagissant tous avec le réactif de Schiff. Cependant, chez le cobaye, sa masse moléculaire est de 63 kDa et les pHi des quatre variants isoélectriques sont compris dans un intervalle de pH de 5,7 à 6,15 (JOHNSON *et al*, 1985).

Les anticorps anti-butyrophiline de cobaye présentent des réactions croisées avec les espèces vache et chèvre. Cependant, la réaction est négative avec les espèces humaine et de rat (FRANKE *et al*, 1981). Dans le cas de l'espèce humaine, l'équivalent de la butyrophiline est dénommé EMGP-70 (IMAM *et al*, 1981).

La butyrophiline est un marqueur spécifique du cortex apical de la cellule épithéliale en lactation. Elle est absente dans les cellules épithéliales non sécrétantes. Elle est spécifiquement localisée dans la région apicale, car absente dans la région basale ou latérale de la cellule. De plus, elle est spécifique des cellules de glande mammaire. La révélation sous microscope par immunofluorescence est négative pour les cellules tissulaires du foie, de l'épiderme de museau, du thymus du veau et de l'intestin grêle (FRANKE *et al*, 1981). Dans le dernier cas cité, il existe sur la bordure en brosse de l'épithélium intestinal une protéine majeure spécifique de la région apicale appelée fimbrine dont la masse moléculaire est de 68 kDa. Cependant, elle est différente de la butyrophiline, car elle ne présente pas de réaction avec les anticorps anti-butyrophiline.

Chez le cobaye, les anticorps monoclonaux préparés contre PAS-I, GP55 et la butyrophiline montrent également que ces trois glycoprotéines sont localisées exclusivement dans le pôle apical des cellules épithéliales sécrétrices du lait (JOHNSON et MATHER, 1985).

Dans l'espèce bovine, la révélation par immunofluorescence se fait essentiellement sur la face de la membrane apicale orientée vers le cytoplasme. Ainsi, deux hypothèses en découlent :

- la butyrophiline est localisée sur la face cytoplasmique de la membrane apicale, ce qui est très inhabituel et fort improbable pour une glycoprotéine, les chaînes glycaniques étant exposées à la surface extérieure. Cependant, récemment, il a été trouvé une glycoprotéine dont les chaînes glycaniques sont orientées vers le cytoplasme (PEDEMONTE *et al*, 1990). Cette première hypothèse n'est donc pas totalement irréaliste ;
- la butyrophiline est une glycoprotéine transmembranaire, dont les chaînes glycaniques sont orientées vers l'extérieur et la majeure partie de la chaîne polypeptidique du côté cytoplasmique. Cette deuxième hypothèse a été confirmée par

la suite par l'analyse de la structure primaire de la butyrophiline (JACK et MATHER, 1990).

Chez le cobaye, la synthèse de la butyrophiline se fait sous forme liée aux membranes et est similaire à celle de GP55 (et différente de celle de la XO, synthétisée sous forme soluble). La butyrophiline reste fortement fixée aux MGG après lavage avec des solutions de force ionique élevées ou des détergents non ioniques, alors que GP55 est partiellement libéré (MATHER *et al*, 1984). Ainsi, la synthèse des MGG implique l'incorporation de protéines solubles (XO) et membranaires (butyrophiline, GP55) ainsi que le relargage partiel de certains composants (GP55).

La butyrophiline possède au moins deux types de modifications post-traductionnelles : elle fixe de manière covalente d'une part des acides gras (KEENAN *et al*, 1982) et d'autre part des chaînes glycaniques liées N-glycosidiquement (VALIVULLAH et KEENAN, 1989).

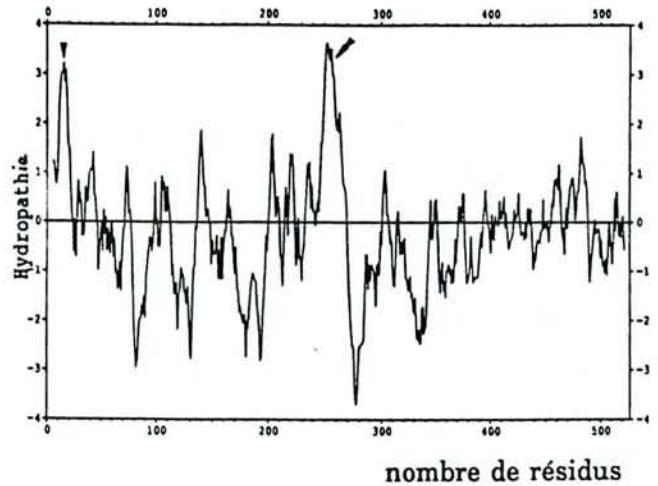
L'acylation de glycoprotéines par des acides gras a déjà été montrée dans d'autres cas, comme par exemple celui d'une glycoprotéine virale (SCHMIDT et SCHLESINGER, 1979). La butyrophiline contient 22 nmoles d'acides gras liés par mg de protéine chez la vache et 11 nmoles/mg chez la chèvre. Pour l'espèce bovine, les acides gras liés sont les suivants : acide palmitique (C16:0 ; 6 nmoles), acide stéarique (C18:0 ; 5 nmoles), acide oléique (C18:1 ; 4 nmoles) et acide docasanoïque (C22:0 ; traces).

L'acylation des acides gras sur les glycoprotéines, et notamment sur la butyrophiline, serait essentielle pour favoriser l'interaction entre les glycoprotéines et la membrane plasmique. L'acylation est en relation avec un changement local des propriétés de la membrane, qui a lieu lors de l'exocytose (sécrétion des globules gras dans la lumière alvéolaire) (KEENAN *et al*, 1982).

Une faible teneur anormale en acides gras liés à la butyrophiline serait un facteur important lors de la formation de ces croissants cytoplasmiques dans les globules gras fraîchement sécrétés (HUSTON et PATTON, 1990). Les auteurs ont constaté de faibles quantités de XO et de butyrophiline sur les globules gras contenant des croissants cytoplasmiques. La sécrétion des globules gras est en partie régulée par la teneur en XO et en butyrophiline ainsi que par le taux d'acides gras fixés sur la butyrophiline. La présence de croissants cytoplasmiques dans les globules gras résulterait d'un défaut du mécanisme d'exocytose.

Ces deux protéines membranaires, qui ont une action commune sur le mécanisme de sécrétion, ont une forte affinité l'une pour l'autre (VALIVULLAH et KEENAN, 1989). Le réactif bifonctionnel DTBP (diméthyl 3,3'-dithiobispropionimide), incubé avec des MGG en suspension dans un tampon

CGAGCGGCACGAGGCTGAAGTTCGCCACAACCTCGAGCCACCCAGCATCTTGGTGCACAGAAAGTTGGAG	GCCA	4
ATG GCA GTC TTT CCA AAC TCC TGC CTC GCG GGG TGT CTG CTC ATT TTC ATT CTC	129	75
Met Ala Val Phe Pro Asn Ser Cys Leu Ala Gly Cys Leu Leu Ile Phe Ile Leu	18	
CTC CAG CTG CCC AAG CTG GAT TCT GCT CCC TTT GAC GTG ATC GGA CCC CAG GAG	183	
Leu Gln Leu Pro Lys Leu Asp Ser Ala Pro Phe Asp Val Ile Gly Pro Gln Glu	36	
CCC ATC CTG GCG GTG GTG GGT GAA GAT GCA GAG CTG CCC TGT CGT CTG TCC CCC	237	
Phe Ile Leu Ala Val Val Gly Glu Asp Ala Glu Leu Pro Cys Arg Leu Ser Pro	54	
AAC GFG AGC GGC AAG GGC ATG GAG CTG GCG TGG TTC CGG GAG AAG GTC TCG CCT	291	
Asn Val Ser Ala Lys Gly Met Glu Leu Arg Trp Phe Arg Glu Lys Val Ser Pro	72	
GCG GTG TTC GTG AGC CGC GAA GGG CAA GAG CAG GAG GGC GAG GAG ATG GCT GAA	345	
Ala Val Phe Val Ser Arg Glu Gly Gln Glu Gln Glu Gly Glu Glu Met Ala Glu	90	
TAC CGG GSA AGA GTG TCG CTG GTG GAG GAC CAC ATC GCC GAG GGC AGC GTC GCT	399	
Tyr Arg Gly Arg Val Ser Leu Val Glu Asp His Ile Ala Glu Gly Ser Val Ala	108	
GTG AGG ATA CAG GAG GTC AAA GCC TCT GAT GAT GGG GAG TAC CGA TGC TTT TTC	453	
Val Arg Ile Gln Glu Val Lys Ala Ser Asp Asp Gly Glu Tyr Arg Cys Phe Phe	126	
AGS CAG GAC GAA AAC TAC GAA GAG GCC ATT GTG CAT CTG AAG GTG GCT GCT CTG	507	
Arg Gln Asp Glu Asn Tyr Glu Glu Ala Ile Val His Leu Lys Val Ala Ala Leu	144	
GCC TCT GAT CCT CAC ATC AGT ATG AAA GTT CAA GAG AGT GGA GAG ATC CAG CTG	561	
Gly Ser Asp Pro His Ile Ser Met Lys Val Gln Glu Ser Gly Ile Gln Leu	162	
GAG TGT ACC TCA GTG GGA TGG TAC CCA GAG CCC CAA GTA CAG TGG CGA ACT CAC	615	
Glu Cys Thr Ser Val Gly Trp Tyr Pro Glu Pro Gln Val Gln Trp Arg Thr His	180	
AGS GAA GAG TTT CCA TCC ATG TCA GAG TCC AGG AAT CCT GAT GAA GAA GGT	669	
Arg Gly Glu Glu Phe Pro Ser Met Ser Glu Ser Arg Asn Pro Asp Glu Glu Gly	198	
TTG TTT ACT GTG AGA GCT TCA GTG ATC ATC AGG GAC AGC TCT ATG AAG AAT GTG	723	
Leu Phe Thr Val Arg Ala Ser Val Ile Ile Arg Asp Ser Ser Met Lys Asn Val	216	
TCC TGC TGC ATC CGG AAC CTC CTT CTT GGC CAG GAG AAA GAT GTA GAG GTT TCC	777	
Ser Cys Cys Ile Arg Asn Leu Leu Leu Gly Gln Glu Lys Asp Val Glu Val Ser	234	
ATA CCA GCC TCC TTC TTC CCA AGG CTG ACT CCC TGG ATG GTG GCT GTG GCT CTC	831	
Ile Pro Ala Ser Phe Phe Pro Arg Leu Thr Pro Trp Met Val Ala Val Ala Val	252	
ATC TTG GTG GTC CTA GGA CTT CTC ACA ATT GGG TCC ATA TTT TTT ACC TGG AGA	885	
Ile Leu Val Val Leu Glu Leu Thr Ile Gly Ser Ile Phe Phe Thr Trp Arg	270	
CTA TAC AAG GAA AGA TCC AGA CAG AGG AGG AAT GAA TTC AGC TCT AAA GAG AAA	939	
Leu Tyr Lys Glu Arg Ser Arg Gln Arg Arg Asn Glu Phe Ser Ser Lys Glu Lys	288	
CTC CTG GAA GAG CTC AAA TGG AAA AGG GCT ACA TTG CAT GCA GTG GAT GTG ACT	993	
Leu Leu Glu Glu Leu Lys Trp Lys Arg Ala Thr Leu His Ala Val Asp Val Thr	306	
CTG GAT CCA GAT ACT GCC CAC CCC CAC CTC TTT CTG TAC GAA GAT TCA AAA TCT	1047	
Leu Asp Tyr Asp Thr Ala His Pro His Leu Phe Leu Tyr Glu Asp Ser Lys Ser	324	
GTC CGA CTG GAA GAT TCA CGT CAG AAA CTT CCT GAG AAA CCA GAG AGA TTT GAC	1101	
Val Arg Leu Glu Asp Ser Arg Gln Lys Leu Pro Glu Lys Pro Glu Arg Phe Asp	342	
TCC TGG CCC TGT GTG ATG GGT GGT GAG GCC TTC ACC TGG GGG AGA CAT TAC TGG	1155	
Ser Trp Pro Cys Val Met Gly Arg Glu Ala Phe Thr Ser Gly Arg His Tyr Trp	360	
GAG GTG GAG GTG GGA GAC AGG ACG GAC TGG GCA ATT GGG GTG TGT AGG GAG AAT	1209	
Glu Val Glu Val Gly Asp Arg Thr Asp Trp Ala Ile Gly Val Cys Arg Glu Asn	378	
GTG ATG AAG AAA GGA TTT GAC CCC ATG ACT CCC GAG AAT GGG TTC TGG GCT GTG	1263	
Val Met Lys Lys Lys Gly Phe Asp Pro Met Thr Pro Glu Asn Gly Phe Trp Ala Val	396	
GAG CTC TAT GSA AAT GGG TAC TGG GCT CTC ACC CCA CTG CGG ACC CCT CTC CCA	1317	
Glu Leu Tyr Gly Asn Gly Tyr Trp Ala Leu Thr Pro Leu Arg Thr Pro Leu Pro	414	
CTG GCT GGA CCC CCC CGC CGG GTT GGG GTC TTC CTT GAC TAT GAA TCA GGA GAC	1371	
Leu Ala Gly Pro Pro Arg Arg Val Gly Val Phe Leu Asp Tyr Glu Ser Gly Asp	432	
ATC TTC TTC TAC AAC ATG ACT GAT GGA TCC CAT ATC TAT ACT TTC TCC AAG GCC	1425	
Ile Phe Phe Tyr Asn Met Thr Asp Gly Ser His Ile Tyr Thr Phe Ser Lys Ala	450	
TCT TTC TCT GGC CCC CTC CGG CCC TTC TTC TGC TGG TGG TCC TGT GGT AAA AAG	1479	
Ser Phe Ser Gly Pro Leu Arg Pro Phe Phe Cys Leu Trp Ser Cys Gly Lys Lys	468	
CCC CTG ACT ATC TGC CCA GTC ACT GAT GGG CTT GAG GGA GTC ATG GTA GTT GCT	1533	
Pro Leu Thr Ile Cys Pro Val Thr Asp Gly Leu Glu Gly Val Met Val Val Ala	486	
GAT GCC AAG GAC ATT TCA AAG GAG ATC CCA CTG TCC CCC ATG GGG GAG GAC TCT	1587	
Asp Ala Lys Asp Ile Ser Lys Glu Ile Pro Leu Ser Pro Met Gly Glu Asp Ser	504	
GCC TCC GGG GAT ATA GAA ACC CTC CAT TCT AAA CTA ATC CCT CTA CAG CCC AGC	1641	
Ala Ser Gly Asp Ile Glu Thr Leu His Ser Lys Leu Ile Pro Leu Gln Pro Ser	522	
CAA GGG GTG CCT TAAGAAATACTCCAGCTCAGCTCTTCCCTCTACTCTAACCCCCCTTCCACCCT	1708	
Gln Gly Val Pro	526	
CCCAGGGCTTCATCTGCCAGCTTTACTCAGCCCTGTTCCTCTGTGGGTAGGGATTAATTAATCTTGA	1779	
GAAGGTTGTGTTGCTGCTGATAGAGTGTAGGAATAGGCCCTTCCCTAATCTGTTTCGGTAACAATAGTCAA	1850	
GGGGCAGGGAGGTGACTCAGACTGCTCTTGTGGTCTCCATCCAGAGGGCAAATCCTCTAGGGAGGGAA	1921	
TTGCAGTTGGGATCAGATGGAGTTAGGTGGGATGGGTTATGACAGAAACATCTTGGTGTCCAGGAT	1992	
AGGGGTATAGAGGAACAGGTTTAACTAAGCAAAAACCCAAAGGTTCTGGAAAGGGAAACCGGTG	2063	
CTGAAATCCCAAAAGAACTTGGAGGGAACATCAATAGAGGAAATGAGTGAATCAAGGCAATGATA	2134	
AACATCTGACTTGTCCCTAGAGCTTAGGGCCATGTCTCAGATTTCTAAGTCAATTCATACAGGGTGGATC	2205	
TGAGCAATGGCAAGGGAGTAAAGAAAGTGGAGGTCAGATAGAATGAAAGAGGAJAGAAATTTAAACA	2276	
AAATGCAAGGGCTCTTTCACACCTCAATTTGTGATTCACAAAGTGGCTGTGCTCTCTCTCTCTCTCT	2347	
TAGAAATCTCCACTTTAGAGGCAATTTTCAGGCATCTTTTCAGTGATACACCACTTCAATGGCCATTG	2418	
TCTCATGCCAATGGCCACGCTCTCCACCACATATGGTTTAAAACCTGCTCAACCACACCTTTAATAGCTTTA	2489	
AACACCATCTCTCCCATACTGAGCCACGAATCACTCCACACCCAGCTTTTCGTACATGCTGCTCTCTCA	2560	
GGGTCCCTGAAAGCTGATCATTTGCTGCTCAGCACAGCTAGATGATGCACTTGTGTTGATTTGCAATTT	2631	
CTGTATATGTTGCTTATCCAGGCTCCACCTTCCATTTCCATTTGGGTTTCCAGGGTCAATGTTGCC	2702	
ATGGCTGTCGGCAAT	2719	



**Figure 50 b.** Profil d'hydropathie de la séquence primaire de la butyrophiline. Les positions indiquées d'une flèche correspondent respectivement au peptide signal et à la région hydrophobe transmembranaire (d'après JACK et MATHER, 1990).

**Figure 50 a.** Séquence nucléotidique de l'ADNc codant pour la butyrophiline bovine et séquence d'acides aminés déduite. Trait fin : peptide signal ; double trait : partie N-terminale de la butyrophiline qui a été séquencée selon la méthode d'EDMAN ; trait épais : région hydrophobe transmembranaire ; encadrés : sites potentiels de N-glycosylation (d'après JACK et MATHER, 1990).

phosphate, forme un pont covalent entre la XO et la butyrophiline, montrant la relation de "plus proche voisin" entre ces deux protéines dans la structure membranaire. Ainsi, la butyrophiline fortement fixée dans la membrane serait un point d'ancrage pour la XO soluble, afin de la maintenir adsorbée. L'enzyme est concentrée sur la face cytoplasmique de la membrane apicale de la cellule et n'est pas une protéine transmembranaire.

Concernant la deuxième modification post-traductionnelle, la butyrophiline est N-glycosylée (VALIVULLAH et KEENAN, 1989), car les chaînes glycaniques sont libérées par la N-glycanase (qui hydrolyse les liaisons GlcNAc-Asn) mais pas par la O-glycanase (qui hydrolyse les liaisons GalNAc-Ser/Thr). De plus, la butyrophiline, qui contient environ 5% de glycannes, est riche en GlcNAc, Man, Gal et Glc et pauvre en Fuc et NeuAc (HEID *et al*, 1983).

Récemment, la structure primaire de la butyrophiline bovine a été déduite de celle de l'ADNc (figure 50a ; JACK et MATHER, 1990). Elle est composée de 526 acides aminés et la masse moléculaire calculée est de 56,460 kDa. Son pHi théorique est de 4,96. Le profil d'hydropathie montre que, mis à part la présence du peptide signal hydrophobe de 26 acides aminés, la butyrophiline possède dans sa structure primaire une zone centrale hydrophobe (fragment 217-243) qui correspond à l'unique zone d'ancrage de la butyrophiline transmembranaire dans la membrane. La partie N-terminale possède deux séquences consensus de N-glycosylation (Asn-Val-Ser) et la partie C-terminale une séquence Asn-Met-Thr (figure 50b).

Les 222 acides aminés de la partie C-terminale présentent 47,7% d'homologie avec la partie C-terminale de la protéine rfp ("*ret-finger-protein* "). Le gène de cette dernière est exprimé dans un variant d'une lignée cellulaire tumorale, dans les tissus de testicules de souris et dans les tissus embryonnaires. Ces trois groupes tissulaires, tout comme les cellules de glande mammaire, nécessitent des périodes rapides de division cellulaire. Il semblerait exister une famille de gènes codant pour des protéines ayant des domaines C-terminaux homologues. Cette famille serait présente dans les tissus à réponse hormonale.

Ainsi, la butyrophiline serait primordiale dans le mécanisme de sécrétion des globules gras des cellules en lactation (JACK et MATHER, 1990).

La comparaison des structures primaires des butyrophilines de vache et de cobaye montre qu'il existe en fait une famille de butyrophilines, regroupant des glycoprotéines similaires mais non identiques dans les différents ordres de mammifères (NEIRA et MATHER, 1990). Les structures primaires N-terminales des 20 premiers acides aminés des butyrophilines de vache et de cobaye présentent 77,8% d'homologie et les compositions en acides aminés sont similaires.

## 1.4- But du travail.

La dernière étude, par voie immunologique, concernant l'origine du composant-3 des protéose-peptones au niveau des MGG date de 1986 (NEJJAR *et al*, 1986). Depuis, la somme des connaissances concernant les protéines de MGG s'est fortement accrue et il est maintenant possible d'apporter de nouvelles hypothèses quant à l'origine et la nature du composant-3. Nous nous proposons donc de compléter notre étude physico-chimique et chimique de la fraction FH1 par l'analyse des acides aminés des sous-unités 19 et 29 kDa (préalablement purifiées par HPEC) et de rapprocher nos résultats avec les connaissances nouvellement acquises sur les protéines de MGG.

## 2- Résultats et discussion.

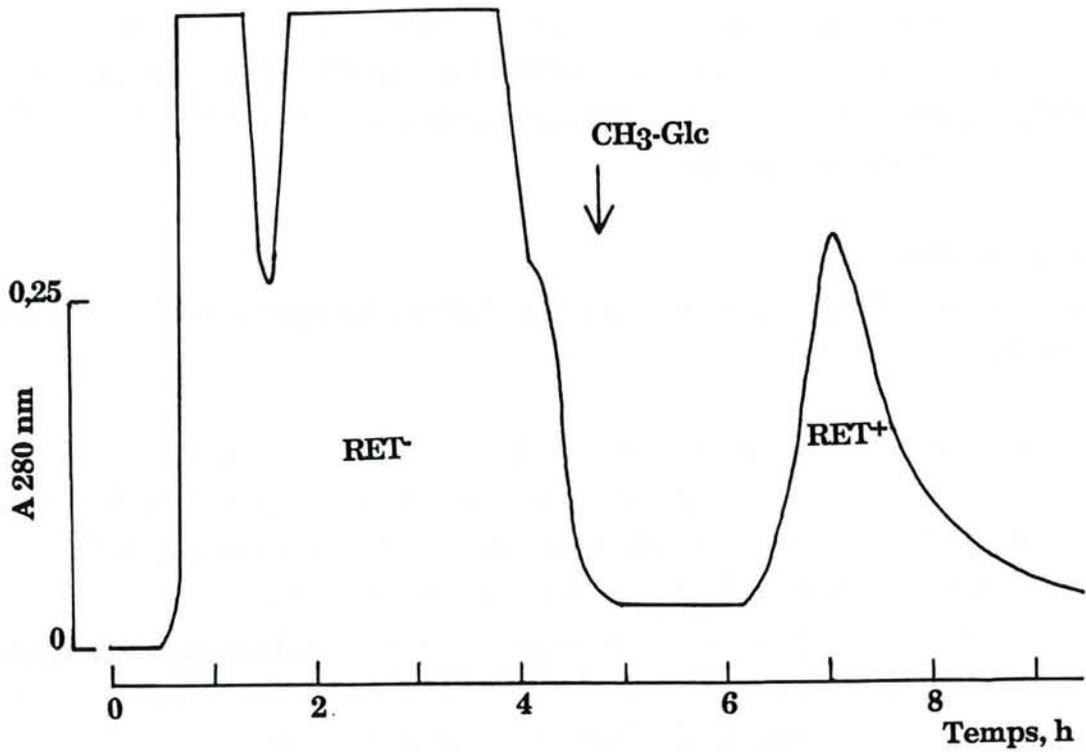
### 2.1- Isolement des sous-unités 19 et 29 kDa du composant-3 à partir d'un lait non chauffé.

La technique HPEC-SDS s'est montrée efficace pour isoler les trois sous-unités du composant-3 (B1, B2 et B3) avec une excellente pureté (voir chapitre 2). Notre but est d'utiliser cette méthode pour purifier ces glycoprotéines afin d'étudier leur composition en acides aminés et de les séquencer partiellement. La technique HPEC permet de collecter dans un volume faible des fractions contenant un minimum de contaminants (traces de SDS, de Tris, de glycine, etc...). La technique d'électroélution est beaucoup moins "propre" et plus diluante.

Il existe également une autre méthode de préparation des glycoprotéines, que nous avons développée dans le chapitre 2 : les sous-unités, séparées par PAGE-2D, sont transférées sur des membranes Immobilon P, puis les spots sont découpés et directement séquencés. Cependant, selon BENJAMIN *et al* (1989), cette technique fait appel à de nombreux réactifs, qui doivent être très purs. Même sous cette condition, ces auteurs n'ont pu déterminer que 4 séquences N-terminales sur 9 glycoprotéines transférées. Cette voie nous a donc semblé présenter un risque important de bloquer les groupements amines terminaux des glycoprotéines.

En amont de la purification par HPEC, les étapes de préparation du composant-3 doivent également être réalisées sous des conditions "douces" afin d'éviter ce blocage éventuel.

Ainsi, un lactosérum, obtenu par acidification à pH 4,6 d'un lait frais non chauffé, est fractionné par ultrafiltration tangentielle à volume constant (diafiltration). Après optimisation de la technique, les membranes de seuil de



**Figure 51.** Chromatographie d'affinité sur ConA du rétentat obtenu par diafiltration à 100 kDa d'un lactosérum acide. La fraction non retenue est appelée RET<sup>-</sup> et la fraction éluée avec le méthyl- $\alpha$ -D-Glc (CH<sub>3</sub>-Glc) est nommée RET<sup>+</sup>.

coupure 100 kDa se sont révélées être les plus efficaces afin de retenir le composant-3 (sous forme agrégée) et de filtrer la majeure partie des protéines sériques.

La nature agrégée du composant-3 préparé à partir d'un lait chauffé a été mise en évidence par FPLC de filtration sur gel (voir chapitre 2). Cependant, nous montrons, grâce à la diafiltration du lactosérum non chauffé, que l'agrégation est une propriété du complexe glycoprotéique natif. Ce dernier est en effet totalement retrouvé dans le rétentat. Il présente donc une masse moléculaire supérieure à 100 kDa, ce qui rejoint notre étude par FPLC de filtration sur gel. Ce fait confirme également l'hypothèse de NEJJAR *et al* (1990). Ces auteurs ont préparé une fraction enrichie en composant-3 à partir d'un lait non chauffé.

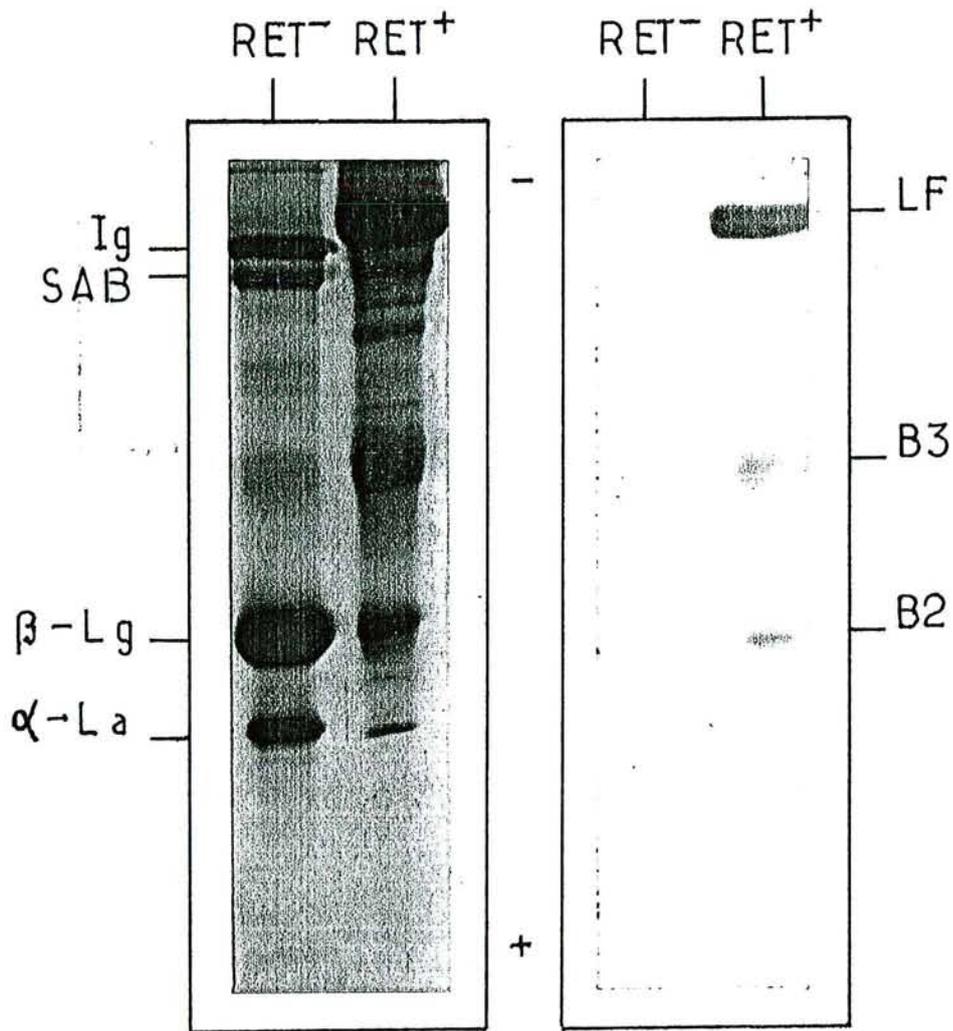
L'ultrafiltration présente un intérêt supplémentaire : cette technique est largement utilisée en industrie laitière et le coût de son utilisation est faible comparé à un fractionnement chromatographique.

Nous avons développé récemment des essais de purification du composant-3 par ultrafiltration semi-industrielle au Laboratoire de Technologie Laitière de l'ENSAIA (ETIENNE, 1990). Un lait de grand mélange chauffé industriellement (lait autoclavé à 120°C pendant 20 min) a été acidifié à pH 4,6. Le lactosérum obtenu a été fractionné sur des membranes de seuil de coupure de 20 kDa (valeur indicative). Les glycoprotéines du composant-3 ont été retrouvées dans le rétentat.

Nos investigations se portent actuellement sur la purification du composant-3 à partir de jus lactosé industriel ultrafiltré. Ce sous-produit de l'industrie du lactosérum est peu valorisé actuellement. Il contient essentiellement du lactose, des protéose-peptones et de petites molécules (minéraux, vitamines, etc...).

Ainsi nos travaux concernant l'ultrafiltration ont deux objectifs. Le premier est d'optimiser en laboratoire la méthode en vue de son transfert à l'échelle industrielle, et le second, qui concerne plus directement nos travaux rapportés dans ce chapitre, est de préparer le composant-3 en évitant de chauffer le lait de départ.

Le rétentat que nous obtenons (seuil de coupure 100 kDa) contient encore des protéines sériques majeures en plus du composant-3. En se basant sur l'affinité de ce dernier pour la concanavaleine A, on réalise une étape de chromatographie sur ConA, qui permet de séparer le rétentat en une fraction non affine (RET<sup>-</sup>) et en une fraction affine (RET<sup>+</sup>) retenue dans la colonne (figure 51). La fraction RET<sup>-</sup> contient les protéines majeures non glycosylées ainsi que les immunoglobulines non affines pour la lectine. La fraction RET<sup>+</sup> contient trois bandes principales qui réagissent fortement avec le réactif de Schiff (figure 52). Elles correspondent à la lactoferrine et aux deux sous-unités B3 (29 kDa) et B2 (19 kDa) du composant-3. La lactoferrine, tout comme B2, présente une forte affinité pour ConA ainsi que pour WGA (figure 38, chapitre 2). Dans l'espèce humaine, des études récentes de cristallographie



**Figure 52.** PAGE-SDS des fractions RET<sup>-</sup> et RET<sup>+</sup>. Les bandes ont été révélées par le Bleu de Coomassie G250 et par le réactif de Schiff. Ig : immunoglobulines ; SAB : sérumalbumine bovine ; α-La : α-lactalbumine ; β-Lg : β-lactoglobuline ; LF : lactoferrine ; B2 : sous-unité du composant-3 de 19 kDa ; B3 : sous-unité du composant-3 de 29 kDa.

(ANDERSON *et al*, 1989) ont montré que la structure tertiaire de la lactoferrine, composée de 691 acides aminés, est divisée en deux lobes. Ces derniers correspondent aux moitiés N- et C-terminales et contiennent chacun un site de N-glycosylation (Asn137 et Asn478).

Quant à la sous-unité B3, compte-tenu de sa concentration dans la fraction RET<sup>+</sup>, elle réagit faiblement avec ConA couplée à la peroxydase. La glycoprotéine de 29 kDa possède donc une structure N-glycannique faiblement affine pour la lectine. Cette reconnaissance est cependant masquée dans le cas de B3<sup>+</sup>. Ceci peut être dû aux conditions expérimentales de PAGE-2D ou au traitement thermique du lait, qui altérerait la structure glycannique.

La lactoferrine contamine également la fraction enrichie en composant-3 préparée par NEJJAR *et al* (1990) à partir d'un lait non chauffé. Les différentes étapes de fractionnement utilisées par ces auteurs (précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographies d'hydroxyapatite et d'interactions hydrophobes) n'ont pas permis d'éliminer totalement la lactoferrine.

Cependant, l'utilisation de la technique HPEC-SDS appliquée à la fraction RET<sup>+</sup> permet de purifier les deux sous-unités de 19 et 29 kDa (figure 53). Le gel à 10% d'acrylamide ne permet pas à la lactoferrine de traverser la colonne de 10 cm de long en moins de 4 heures.

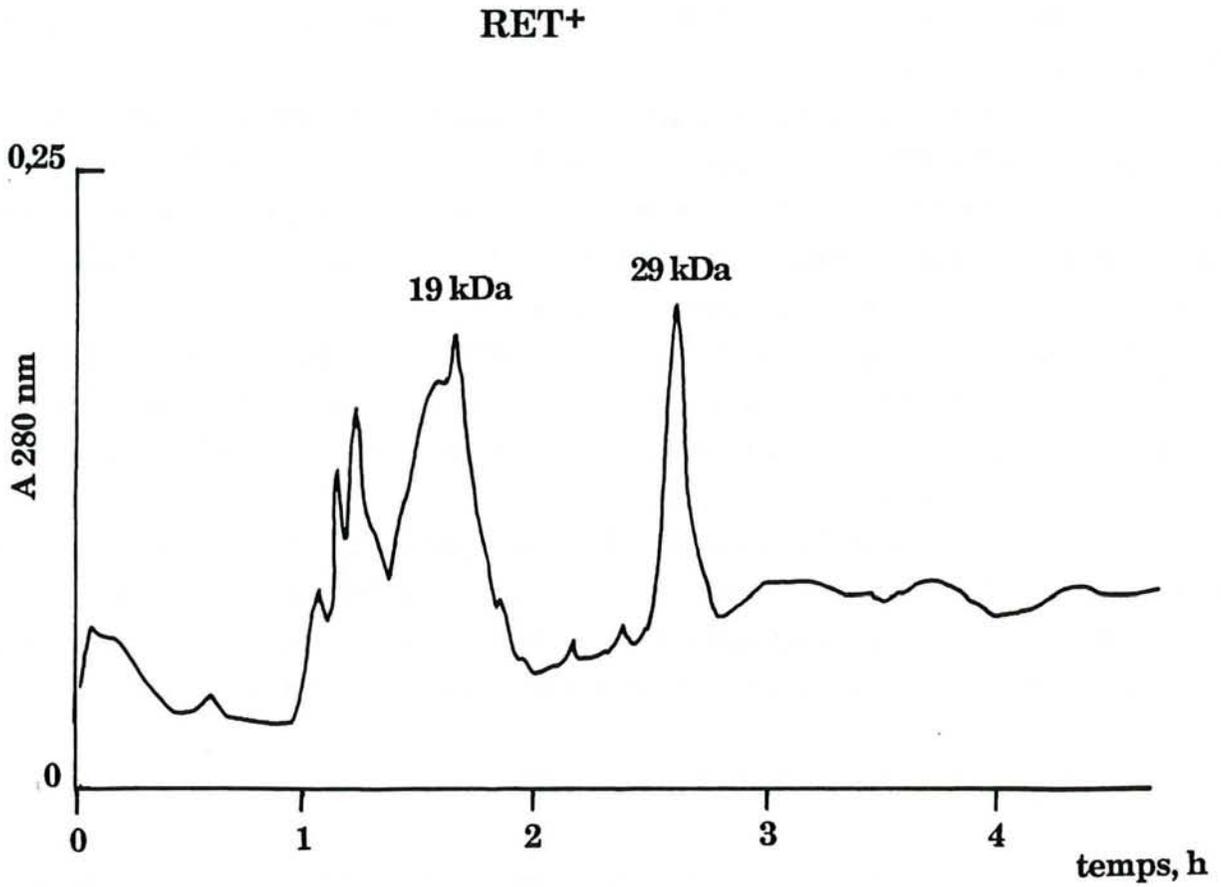
Les deux sous-unités sont ensuite dessalées par HPLC en phase inverse. Des impuretés, absorbant à 215 nm mais peu à 280 nm, sont éliminées (figure 54).

Les glycoprotéines sont ensuite séchées par centrifugation sous vide et destinées à une analyse de la composition en acides aminés et à un séquençage.

## **2.2- Préparation des protéines des membranes de globules gras.**

La méthode utilisée permet d'obtenir, après trois étapes d'ultracentrifugation successives, trois fractions solubles (SPA1, SPA1', SPA2) et trois fractions insolubles (PPA1, PPA1', PPA2) (figure 4, matériel et méthodes).

Les fractions solubles ont une composition similaire sur le plan qualitatif (figure 55). On retrouve surtout de la  $\beta$ -lactoglobuline, de la caséine et de l' $\alpha$ -lactalbumine. La présence de ces protéines n'est pas surprenante. Grâce à leurs propriétés fonctionnelles intéressantes, elles ont la capacité de s'adsorber à la surface membranaire des globules gras. Cette capacité dépend du pH (LORIENT *et al*, 1991). A pH 7, les concentrations relatives des protéines principales adsorbées sont 46,1% de  $\beta$ -lactoglobuline, 31,3% de caséine + immunoglobulines et 11,0% d' $\alpha$ -lactalbumine. On trouve également de la sérumalbumine, de la transferrine et de la lactoferrine.



**Figure 53.** Préparation des sous-unités 19 et 29 kDa de RET<sup>+</sup> par HPEC. Conditions expérimentales : 0,9 mA, longueur de colonne 10 cm, gel à 10% d'acrylamide.

Les fractions insolubles sont constituées pour l'essentiel par les glycoprotéines butyrophiline, GP55 et GP80 et par la xanthine oxydase (XO). La glycoprotéine de type mucine PAS-I traverse le gel de concentration mais ne peut pénétrer le gel de séparation à 15% d'acrylamide. Des gels à 6% d'acrylamide sont conseillés afin de visualiser PAS-I sur le profil (PATTON et PATTON, 1990). Cependant, un tel gel ne permet pas de séparer convenablement les autres protéines de masses moléculaires plus modestes.

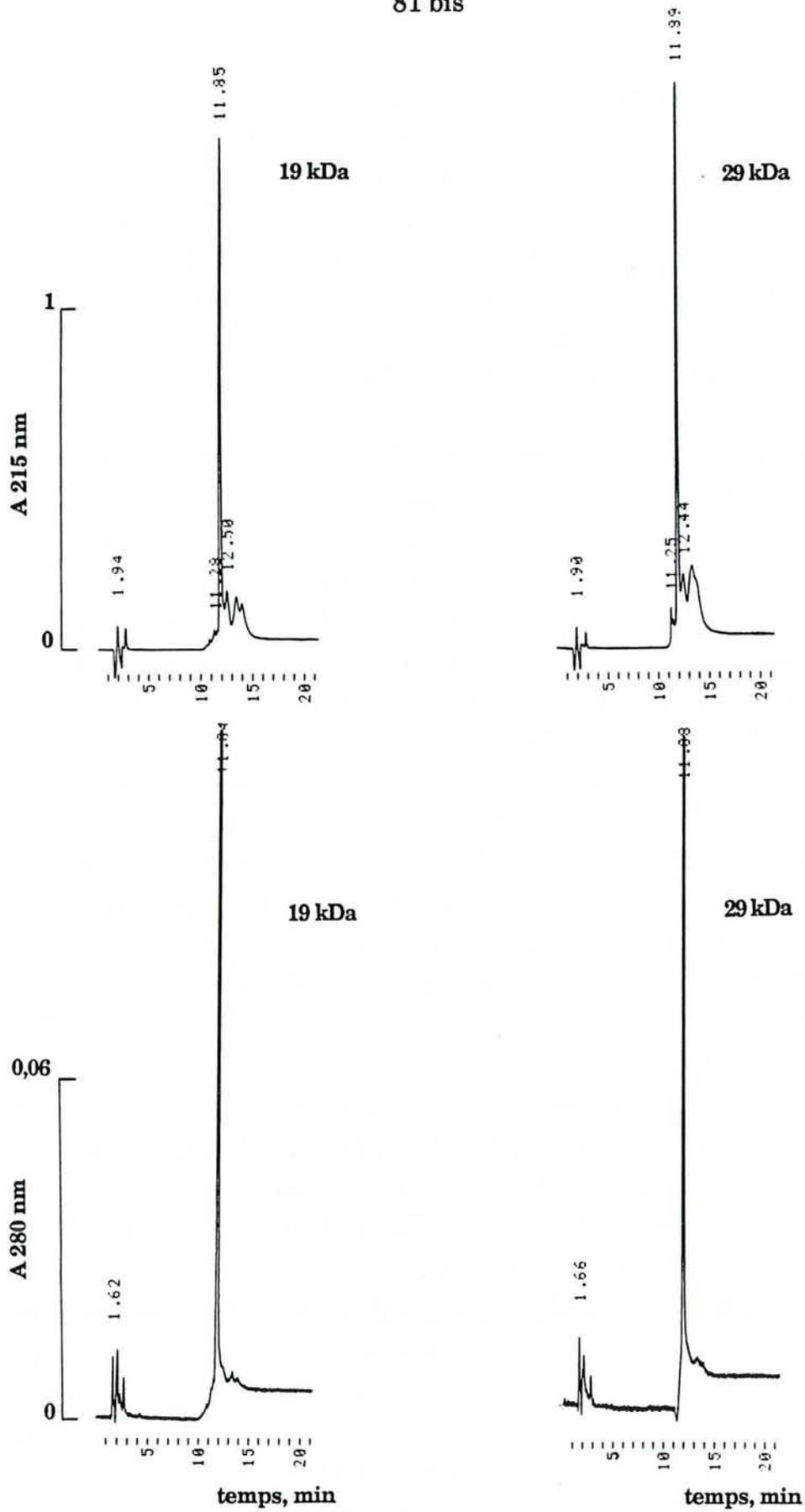
On constate que certains constituants des fractions insolubles sont retrouvés en faible concentration dans les fractions solubles. GP55 est plutôt retrouvé dans SPA2, tandis que la xanthine oxydase est visualisée sur les profils de toutes les fractions. Cette enzyme soluble est fortement associée à la butyrophiline dans les MGG (VALIVULLAH et KEENAN, 1989). Ceci explique sans doute pourquoi elle est essentiellement retrouvée dans les fractions insolubles contenant la butyrophiline. La glycoprotéine GP55 est partiellement relarguée lors de la synthèse des MGG (MATHER *et al*, 1984). On peut donc la trouver à l'état soluble. La butyrophiline existe également en faible concentration dans les fractions solubles.

La révélation par le réactif de Schiff met en évidence dans les fractions insolubles la nature glycosylée de PAS-I, de la butyrophiline et de GP55. La xanthine oxydase n'est pas révélée par le réactif de Schiff. Quant aux fractions solubles, aucune bande ne réagit à la coloration spécifique des glucides.

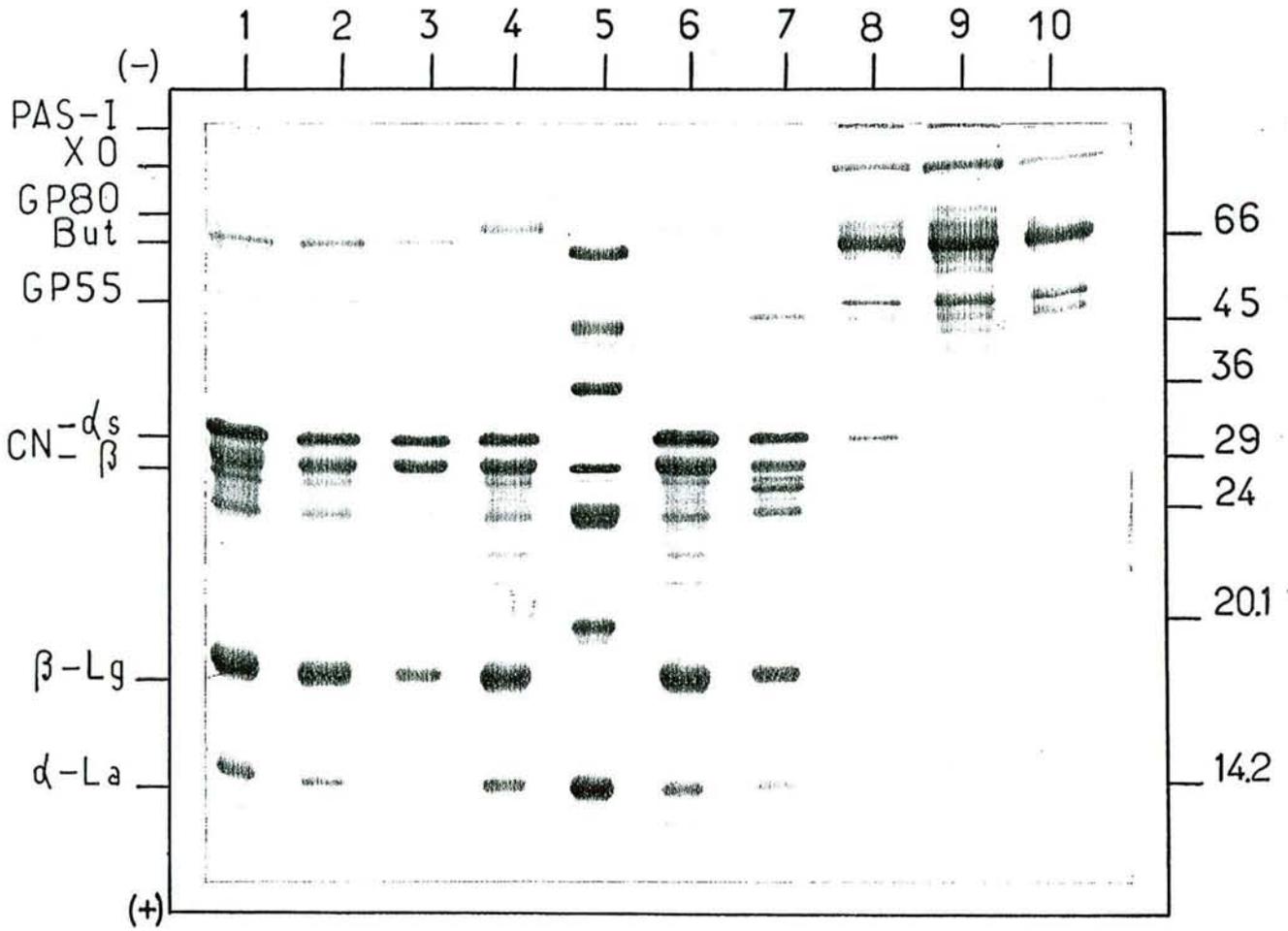
Afin de déterminer la composition glycanique de la butyrophiline et de GP55, la purification de ces deux glycoprotéines a été envisagée par HPEC-SDS. La fraction PPA2 est cependant faiblement séparée par cette technique, même lorsque le pourcentage d'acrylamide est diminué à 5% et les conditions d'ampérage constant à 0,7 mA (figure 56).

Pour purifier ces glycoprotéines, nous avons donc utilisé la technique d'électroélution de bandes obtenues par PAGE-SDS de la fraction PPA2 avec un gel de 15% d'acrylamide. Ainsi, la butyrophiline est obtenue avec une excellente pureté (bien qu'en faible quantité) et la fraction GP55 contient le doublet de bandes observé sur le profil de PPA2 (résultats non rapportés).

Les rapports molaires en glycannes des deux glycoprotéines sont calculés sur la base de 3 résidus Man (tableau 14). Les résultats ainsi obtenus sont indicatifs de la présence probable de N-glycannes dans les structures de la butyrophiline et de GP55. Il a déjà été montré que la butyrophiline est une N-glycoprotéine (VALIVULLAH et KEENAN, 1989). Chez la souris, il existe dans la structure primaire de GP55 plusieurs sites potentiels de N-glycosylation mais également de nombreux sites d'O-glycosylation (STUBBS *et al*, 1990).



**Figure 54.** HPLC en phase inverse (colonne DeltaPak C4) des sous-unités 19 et 29 kDa préparées par HPEC. De 0 à 10 min : acétonitrile 5% (v/v) + TFA 0,1% (v/v) ; de 10 à 25 min : acétonitrile 40% (v/v) + TFA 0,1% (v/v).



**Figure 55.** PAGE-SDS des fractions obtenues lors de la préparation des membranes de globules gras (voir matériel et méthodes). 1 : SL1 ; 2 : SL2 ; 3 : SL3 ; 4 : SPA1 ; 5 : étalons de masses moléculaires ; 6 : SPA1' ; 7 : SPA2 ; 8 : PPA1 ; 9 : PPA1' ; 10 : PPA2 ; XO : xanthine oxydase ; But : butyrophiline ; CN : caséine ;  $\beta$ -Lg :  $\beta$ -lactoglobuline ;  $\alpha$ -La :  $\alpha$ -lactalbumine.

Comme dans le cas du composant-3, on trouve des résidus GalNAc dans PPA2 et dans les deux protéines. Cependant, le profil obtenu par CPG des glycannes extraits de la butyrophiline contient plusieurs pics non identifiés, dont un interférant avec la mesure de l'aire du pic de GalNAc. Nous pensons que ces pics "artéfacts" peuvent correspondre aux acides gras liés de façon covalente à la chaîne protéique de la butyrophiline (KEENAN *et al*, 1982). De tels pics sont observés sur le profil de GP55 mais à un degré moindre.

La présence importante de GalNAc dans la fraction PPA2 est probablement due pour l'essentiel à PAS-I qui est affine pour la lectine PNA (JOHNSON *et al*, 1988). On trouve également des résidus de Fuc dans cette fraction PPA2. L'hypothèse de la présence d'oligosaccharides adsorbés à la surface des MGG, notamment du fucosyl-lacto-N-tétraose, ne doit pas être écartée.

### **2.3- Relation composant-3 - glycoprotéines de MGG.**

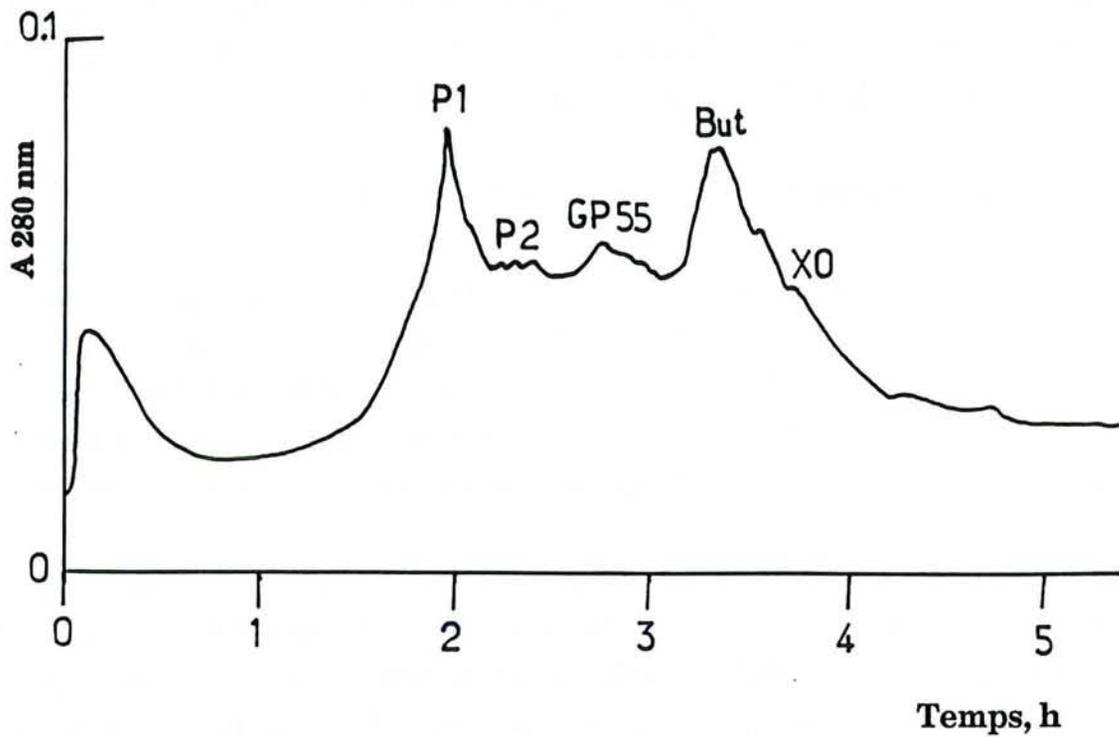
L'identité antigénique commune entre le composant-3 et les glycoprotéines de MGG a été mise en évidence par plusieurs reprises (KANNO et YAMAUCHI, 1978 ; KANNO et OHTAKE, 1981 ; KESTER et BRUNNER, 1982 ; NEJJAR *et al*, 1986).

Selon l'hypothèse émise par PAQUET (1989) et citée dans notre introduction générale, les sous-unités du composant-3 pourraient être des fragments glycoprotéiques de MGG.

Plusieurs travaux mettent en évidence une activité protéolytique dans les MGG. SHIMIZU *et al* (1976) séparent les glycoprotéines de MGG en une fraction insoluble et une fraction soluble. Cette dernière contient six composés en faible concentration qui correspondent, selon ces auteurs, à des glycopeptides issus d'une protéolyse de glycoprotéines membranaires natives. Peu après, HOFMANN *et al* (1979) montrent que le système plasminogène/plasmine est responsable de l'activité protéolytique des MGG. Selon ces auteurs, la bande principale de 70 kDa (qui correspond vraisemblablement à la butyrophiline) est rapidement dégradée. La protéine de 155 kDa (qui correspond à la xanthine oxydase) ainsi qu'un composé de 34 kDa sont lentement protéolysés.

On trouve des similitudes entre les masses moléculaires des produits d'hydrolyse et celles des sous-unités du composant-3, notamment les masses moléculaires 20, 18 et 12 kDa sont voisines de celles de B2 (19 kDa) et B1 (11 kDa). On ne retrouve cependant pas la sous-unité de 29 kDa (peut-être est-ce le composant de 34 kDa ?). Les travaux de KANNO et OGAWA (1989b) tendent à montrer que B2 (17 kDa selon ces auteurs) est un fragment de B3 (25 kDa) obtenu par hydrolyse du composant-3 par la plasmine.

## Protéines de MGG



**Figure 56.** Profil obtenu par HPEC de la fraction PPA2. MGG : membranes des globules gras ; P1 et P2 : polypeptides ; But : butyrophiline ; XO : xanthine oxydase. Conditions expérimentales : 0,7 mA, longueur de colonne 10 cm, gel à 5% d'acrylamide.

D'après des études récentes effectuées dans notre Laboratoire, MATI (1992) montre que, lors de l'hydrolyse du composant-3 par la plasmine (E/S = 1/40) en fonction du temps, la sous-unité de plus grande masse moléculaire (B3) disparaît la première en 15 min, suivie de B2 qui est totalement hydrolysée en 6 h. B1 semble plus résistante à la protéolyse. Cette étude tend à conforter les conclusions de KANNO et OGAWA (1989b).

L'hydrolyse des fractions membranaires solubles par la plasmine (ou la trypsine) libère deux fragments mis en évidence par PAGE-SDS à 18 kDa et 12 kDa. Les deux bandes correspondantes réagissent avec le réactif de Schiff (MATI, 1992).

Les fractions membranaires solubles de MATI (1992) sont similaires à nos fractions SPA1, SPA1' et SPA2, car il utilise la même méthode de préparation que la nôtre.

Nous avons montré que les glycoprotéines majeures des MGG existent à l'état soluble en faible concentration. Elles pourraient donc être protéolysées et générer les fragments de 18 et 12 kDa qui réagissent avec le réactif de Schiff.

Si l'on compare les glycoprotéines principales de MGG avec le composant-3, plusieurs hypothèses peuvent être émises.

La glycoprotéine PAS-I est très riche en résidus Ser, Thr et en NeuAc ; elle est fortement O-glycosylée et fixe spécifiquement la lectine PNA (voir introduction ; JOHNSON *et al*, 1988). PAS-I ne semble donc pas être à l'origine du composant-3.

Il en est de même pour la xanthine oxydase qui n'est pas glycosylée.

Quant à GP80, peu d'éléments sont actuellement donnés par la littérature. Cependant, la composition en acides aminés de cette glycoprotéine nous apporte quelques éléments de discussion (tableau 12 ; GREENWALT et MATHER, 1985). GP80 est riche en Asx, Ser et Thr (ainsi que B2 et B3 ; tableau 13), ce qui augmente la probabilité d'avoir une séquence consensus de N-glycosylation. Cependant, GP80 peut également être O-glycosylée. Tout comme les sous-unités B2 et B3, GP80 est riche en résidus apolaires Gly, Ala, Ile, Leu et Val (cependant B2 et B3 sont pauvres en Ile). Les deux acides aminés aromatiques Phe et Tyr ont des teneurs relatives similaires dans GP80, B2 et B3. Il en est de même pour les acides aminés soufrés Met et Cys et pour le résidu Pro. L'ordre des acides aminés basiques selon la quantité est le même dans les trois cas, à savoir Lys > His > Arg. La teneur en Glx semble être la seule différence significative entre GP80 (2,8%) et B2 et B3

**Tableau 13 : Comparaison des compositions en acides aminés de B2 et B3 avec respectivement les fragments 1-127 et 1-216 de la butyrophiline**

	B2	Fragment 1-127 de la butyrophiline	B3	Fragment 1-216 de la butyrophiline
Cys	4 <sup>1</sup> (3,3) <sup>2</sup>	2 <sup>3</sup>	7 (3,3)	5
Asx	9 (7,2)	9	13 (6,0)	15
Thr	8 (6,0)	0	10 (4,5)	3
Ser	11 (8,9)	9	15 (6,7)	20
Glx	10 (8,1)	23	16 (7,3)	39
Pro	7 (5,6)	7	11 (4,9)	13
Gly	13 (10,5)	9	18 (8,6)	14
Ala	9 (7,1)	12	16 (7,4)	14
Val	11 (8,4)	14	16 (7,4)	22
Met	0,5 (0,3)	3	0,5 (0,2)	5
Ile	4 (3,1)	6	6 (2,9)	11
Leu	8 (6,5)	7	12 (5,7)	12
Tyr	0,5 (0,2)	3	0,5 (0,3)	4
Phe	4 (3,0)	5	9 (4,3)	9
His	8 (6,8)	3	23 (10,5)	4
Lys	14 (11,0)	5	22 (10,4)	7
Arg	6 (4,4)	9	20 (7,4)	16
Trp	-	1	-	3
Total	127 (100)	127	216 (100)	216

<sup>1</sup> Le nombre de résidus est obtenu en multipliant le total (127 ou 216) par le pourcentage entre parenthèses.

<sup>2</sup> Entre parenthèses, les compositions relatives en acides aminés sont exprimées en pourcentage.

<sup>3</sup> Le nombre de résidus est donné par la séquence primaire de la butyrophiline (d'après JACK et MATHER, 1990)

(respectivement 8,1% et 7.3%). Cependant, les pourcentages donnés ne tiennent pas compte de la distribution des acides aminés sur la chaîne polypeptidique de GP80. Ainsi, la composition en acides aminés de GP80 est un résultat compatible avec l'hypothèse de l'origine possible du composant-3 au niveau de GP80. Cependant, il manque à l'heure actuelle de nombreux éléments pour appuyer cette hypothèse.

De même, la glycoprotéine GP55 pourrait-elle être à l'origine du composant-3 ? GP55 semble être N-glycosylée et, chez la souris, elle possède une séquence consensus  $^{39}\text{Asn-Glu-Thr}^{41}$  (figure 49) correspondant à une des séquences consensus les plus probables du composant-3 (voir chapitre 2). Cependant, cette séquence  $^{39}\text{Asn-Glu-Thr}^{41}$  est localisée dans la région N-terminale riche en Cys. Si on considère que la structure primaire est bien conservée dans l'espèce bovine, il est peu probable que cette région existe dans le composant-3, qui est pauvre en Cys. Dans le cas de l'hydrolyse de GP55 par la plasmine, on devrait retrouver un fragment riche en Cys dans la fraction protéose-peptones, ce qui n'est pas le cas.

L'origine la plus probable du composant-3 nous semble liée à la butyrophiline. En effet, il existe des analogies entre sa partie N-terminale et les sous-unités du composant-3. La butyrophiline est la N-glycosylprotéine majeure des MGG ; elle semble pouvoir être rapidement hydrolysée par la plasmine (HOFMANN *et al*, 1979).

Si l'on suppose que la plasmine hydrolyse la butyrophiline au niveau du résidu Arg216, qui serait accessible à l'enzyme (résidu ayant une position stratégique juste avant la séquence transmembranaire ; figure 50a), on génère un fragment de 216 acides aminés et de masse moléculaire d'environ 24 kDa (masse moléculaire moyenne d'un résidu = 110 Da). Cette valeur de 24 kDa ne tient pas compte de la (ou des) chaînes glycaniques éventuellement présentes. La masse moléculaire du fragment 1-216 (sous-estimée) est proche de la masse moléculaire de 29 kDa de B3 (sur-estimée par PAGE-SDS).

Si l'on suppose encore que la plasmine hydrolyse le fragment au niveau de Lys127, on génère alors un fragment 1-127 possédant un site potentiel de N-glycosylation et une masse moléculaire de 14 kDa environ, proche de celle de B2 (19 kDa). Le fragment 127-216, qui possède également un site potentiel de N-glycosylation, a une masse moléculaire de 10 kDa, voisine de celle de B1 (11 kDa).

Nous avons tenté de séquencer les parties N-terminales de B2 et B3 afin de les comparer à la partie N-terminale de la butyrophiline. Cependant, les résultats obtenus montrent que les groupements amines terminaux de ces deux sous-unités sont bloqués.

La détermination de la structure d'un petit fragment de B2 et de B3 (5 à 6 résidus séquencés par exemple) serait suffisante pour définir si ces sous-unités sont

**Tableau 14 : Rapport molaire des glycanes de la fraction protéique membranaire PPA2 et des protéines électroéluées (butyrophiline et GP55)**

	Fuc	Gal	Man	GalNAc	GlcNAc	NeuAc
PPA2	0,3	3,1	<b>3,0</b>	3,5	11,8	0,6
butyrophiline	-	1,4	<b>3,0</b>	N.D.	2,7	0,6
GP55	-	1,2	<b>3,0</b>	0,9	3,0	0,4

N.D. : non déterminé

des hydrolysats de la butyrophiline ou non. Aussi, nous sommes actuellement en train de séquencer des fragments peptidiques obtenus par traitement chimique au CNBr de B3 (B2 est en trop faible quantité pour être exploité par cette voie). Le bromure de cyanogène est spécifique des résidus Met. L'avantage de ce réactif est de ne libérer qu'un nombre limité de peptides, la méthionine étant généralement en faible quantité dans les protéines. Les peptides obtenus sont séparés par HPLC en phase inverse avant d'être séquencés.

Pour l'heure, nous ne disposons que de la composition en acides aminés de B2 et de B3. A partir des concentrations relatives, nous déterminons le nombre de chaque résidu pour B2 et pour B3 en supposant que B2 contienne 127 acides aminés et B3 216 acides aminés (tableau 13).

Ainsi, des similitudes peuvent être observées pour la majorité des acides aminés entre B2 et le fragment 1-127 de la butyrophiline d'une part, et entre B3 et le fragment 1-216 d'autre part.

Les faibles teneurs en Glx, Met et Tyr peuvent s'expliquer par un faible rendement lors de l'hydrolyse (cependant, le rendement est toujours bon pour Glu) ou par une dégradation rapide de l'acide aminé (notamment de la Met). Les résidus Thr, His et Lys sont fortement représentés dans B2 et B3 par rapport aux fragments 1-127 et 1-216. Ils peuvent provenir d'une contamination, car la fraction FH1 ne contient pas de quantités de Thr, His et Lys significativement élevées.

Ainsi, les comparaisons entre B2, B3 et les fragments 1-127 et 1-216 de la butyrophiline aux niveaux de la composition en acides aminés, la masse moléculaire, la possibilité aux fragments d'être N-glycosylés nous apparaissent être des indices favorables à notre hypothèse. Seuls, les séquençages partiels de B2 et B3 nous apporteront la réponse à la question : le composant-3 est-il un hydrolysat plasminique de la butyrophiline comme les composants 5 et 8f sont des hydrolysats de la caséine  $\beta$  ?

### **3- Conclusion.**

Nous avons préparé les sous-unités 19 et 29 kDa en utilisant la méthode HPEC, qui est actuellement la seule technique qui nous a permis d'obtenir ces deux constituants avec une excellente pureté. De plus, l'utilisation de l'ultrafiltration couplée à la chromatographie d'affinité sur ConA permet de préparer le composant-3 à partir d'un lait non chauffé ; ceci est un avantage, car le traitement thermique à 95°C pendant 30 min habituellement utilisé peut entraîner une dégradation de certains acides aminés, ce qui rend difficile leur identification lors du séquençage de B2 ou B3.

Nos projets se portent sur le séquençage complet des sous-unités de 19 et 29 kDa. Du fait du problème du groupement amine terminal bloqué, il nous sera nécessaire de cliver chaque sous-unité, soit par CNBr, soit par la trypsine et de séquencer chaque fragment purifié. Les fragments correspondant aux parties N-terminales de B2 et B3 pourront être identifiés par spectrométrie de masse, qui est une technique complémentaire à la dégradation chimique d'Edman. La spectrométrie de masse pourra également nous permettre de déterminer de façon précise la masse moléculaire de B2 et B3, afin de pouvoir vérifier si les séquences d'acides aminés déterminées ne comportent pas d'erreurs.

Cependant, il nous semble nécessaire au préalable de simplifier l'étude en partant d'un lait non chauffé provenant d'une seule vache phénotypée. Le composant-3 devra également être totalement déglycosylé (hydrolyse enzymatique des chaînes N-glycosidiques et élimination des oligosaccharides adsorbés).

Pour l'heure, les connaissances acquises d'une part sur les glycoprotéines de MGG, et d'autre part sur le composant-3 nous permettent de formuler l'hypothèse suivante : B2 et B3 seraient des fragments de N-glycosylprotéines membranaires obtenus par action de la plasmine à la surface des MGG. La N-glycosylprotéine qui semble être le substrat de la plasmine le plus probable est la butyrophiline. La détermination de la structure primaire d'un fragment de B2 ou B3 nous permettra de vérifier cette hypothèse. Actuellement, nos travaux se poursuivent dans ce sens.

## **CHAPITRE 4**

**Etude modélisée du mécanisme de l'inhibition  
de la lipolyse par le composant-3**

## 1- Introduction.

### 1.1- Les mécanismes d'action de la lipoprotéine lipase.

#### 1.1.1- La lipolyse spontanée dans le lait bovin due à la lipoprotéine lipase.

**Position du problème et importance de la lipolyse :** les conditions de travail actuelles font que le délai écoulé entre la traite à la ferme et la pasteurisation du lait précédant sa transformation en industrie laitière est au minimum de trois jours.

Durant cette période, le lait est stocké à 4°C afin de prévenir le développement de la flore microbienne. Cependant, le refroidissement du lait et son maintien à basse température pendant plusieurs jours sont à l'origine de diverses modifications résultant de l'action des enzymes protéolytiques, lipolytiques ou d'oxydations catalysées par la lumière ou certains métaux lourds.

La matière grasse du lait fraîchement sécrété est constituée pour 98% de triglycérides et pour moins de 0,5% d'acides gras libres (AGL). L'hydrolyse enzymatique des triglycérides par les lipases se traduit par l'augmentation de la teneur en AGL, qui entraîne l'apparition de mauvais goûts de rance ou de savon lorsque leur teneur atteint environ 2 mmoles/100 g de matière grasse dans le lait, et 1,5 mmoles/100 g de matière grasse dans la crème (CHILLIARD et LAMBERET, 1984). Ce sont essentiellement des AGL en C4 et C12 qui sont responsables de ces mauvais goûts. De plus, les AGL insaturés sont plus sensibles à l'oxydation que les acides gras estérifiés et ils peuvent même la catalyser. Les glycérides partiels (mono et diglycérides), autres produits de la réaction, peuvent aussi donner des mauvais goûts comme l'amertume.

Le phénomène de lipolyse du lait et des dérivés du lait est important. En effet, il représentait une perte financière équivalente à 0,6% de la collecte du lait en 1980. Le contrôle des beurres pasteurisés montre que 20% des échantillons (correspondant à environ 7% du tonnage), dépassent les normes fixées à 1,5 mmoles AGL/100 g de matière grasse fixées par l'administration française (CHILLIARD et LAMBERET, 1984). Les méthodes d'évaluation du degré de lipolyse (mesure le résultat de l'activité des lipases sur les triglycérides) ou de l'activité lipasique sont nombreuses et variées. Les plus utilisées sont résumées dans le tableau 15 (CHOUKRI, 1991).

Ainsi la recherche d'inhibiteurs de la lipolyse devient d'un grand intérêt pour la stabilisation du lait et de ses dérivés, et, pour ce faire, il est nécessaire de bien connaître le mécanisme lipolytique impliqué.

Tableau 15 : Principales méthodes de détermination de l'activité lipasique (d'après CHOUKRI, 1991)

METHODES	REFERENCES
Titration acidimétrique de la matière grasse ou après extraction des AGL à l'aide de solvants	CASTBERG et SOLBERG (1975)
Détermination des AGL par la méthode d'extraction au savon de cuivre	SHIPE <i>et al</i> (1980)
Test de diffusion radiale	LAW <i>et al</i> (1976)
Détermination des AGL par chromatographie en phase gazeuse	WOO et LINDSAY (1982)
Méthode fluorimétrique	STEAD (1983)
Mesure de la tension superficielle	Méthode citée par KUZDZAL-SAVOIE (1980)
Titration automatique des AGL issus de la lipolyse	CARTIER <i>et al</i> (1984)

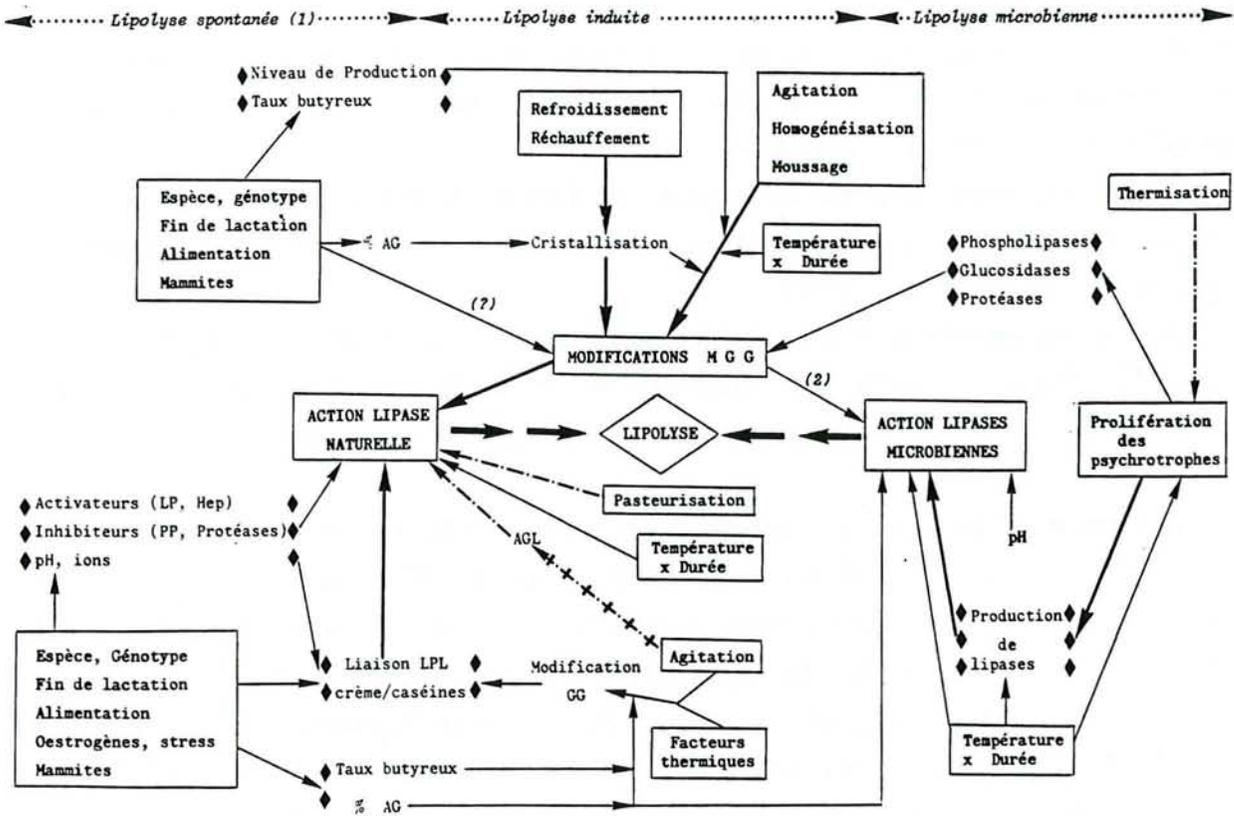
**Les trois types de lipolyses dans le lait** : la figure 57 (CHILLIARD et LAMBERET, 1984) résume les principaux facteurs physico-chimiques et biochimiques impliqués dans les différents types de lipolyse du lait dont nous donnons les définitions :

- la lipolyse induite résulte de l'action de la lipoprotéine lipase sécrétée par la mamelle sur les globules gras du lait, après que ceux-ci aient été endommagés par des chocs thermiques (refroidissements, réchauffements) et mécaniques (turbulences, moussage) ;
- la lipolyse spontanée, définie comme l'apparition d'AGL dans le lait en absence de toute agitation, serait déclenchée uniquement par le refroidissement et dépendrait essentiellement des facteurs liés à l'animal ;
- la lipolyse microbienne résulte de l'action des lipases sécrétées essentiellement par les germes psychrotrophes. Ce type de lipolyse est négligeable pendant au moins les trois jours qui suivent la sécrétion.

Ainsi la lipoprotéine lipase (EC 3.1.1.34), qui est la seule lipase endogène du lait (CASTBERG *et al*, 1975), est responsable de l'hydrolyse des triglycérides des globules gras, que la catalyse enzymatique soit induite ou spontanée.

**La lipoprotéine lipase : étude moléculaire** : tout récemment, un modèle structural de la lipoprotéine lipase a été proposé par YANG *et al* (1989), qui résume et synthétise bien les connaissances actuelles sur cette enzyme (figure 58). La lipoprotéine lipase bovine est une glycoprotéine dimérique dont chaque monomère est constitué de 450 résidus d'acides aminés. Sa masse moléculaire estimée est de 55 kDa (KINNUNEN *et al*, 1976) et le pH isoélectrique calculé de 8,91 (YANG *et al*, 1989). Il contient 10 cystéines formant cinq ponts disulfures. Deux sites de N-glycosylation ont été identifiés au niveau de Asn44 et Asn361. Par mutagenèse dirigée réalisée avec la lipoprotéine lipase (LPL) humaine clonée, SEMENKOVICH *et al* (1990) montrent que le résidu Asn43 du site de glycosylation est essentiel pour l'activité de l'enzyme et pour sa sécrétion extracellulaire.

La structure primaire est hautement conservée lorsque l'on compare les espèces humaine, vache, souris et cobaye (tableaux 16 et 17 ; PERSSON *et al*, 1989 ; ZECHNER, 1990). Notamment, des anticorps dirigés contre la LPL bovine réagissent de façon croisée avec la LPL humaine (HAYASHI *et al*, 1986). Cependant, la réaction est faible et cela est dû essentiellement aux différences dans la composition glycanique entre les deux enzymes. De fortes homologies structurales apparaissent également entre la lipoprotéine lipase, la lipase pancréatique et la lipase hépatique qui peuvent alors être regroupées dans une même famille de lipases (tableau 17 ; PERSSON *et al*, 1989).



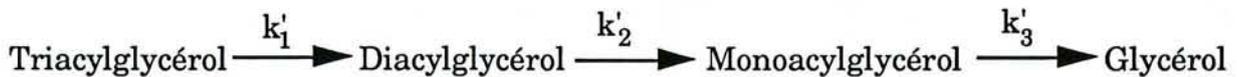
**Figure 57.** Principaux mécanismes pouvant intervenir dans la lipolyse du lait. (1) ou "facteur animal" ; (2) certaines lipases agissent sans modification préalable des MGG ; % AG : composition en acides gras des matières grasses ; GG : globules gras ; MGG : membranes des globules gras ; Hep : héparinoïdes ; LP : lipoprotéines ; PP : protéose-peptones ; -----> inhibition ; +++++> levée d'inhibition ; -----> influence positive ou négative (d'après CHILLIARD et LAMBERET, 1984).

La lipoprotéine lipase est thermolabile (dénaturée en 10 sec à 85°C), son pH optimum est alcalin (8-9) (CHILLIARD et LAMBERET, 1984) et est très proche de son pH isoélectrique calculé par YANG *et al* (1989).

Elle joue un rôle biologique central dans le métabolisme des lipides cardiovasculaires. Sa tâche biologique première est l'hydrolyse des liaisons esters en position sn-1 et sn-3 des triacylglycérols (réaction lipolytique) qui sont transportés dans la circulation sanguine par les lipoprotéines (essentiellement les VLDL et les chylomicrons ; QUINN, 1985). La LPL bovine ne semble pas présenter de spécificité d'acides gras, quels que soient la longueur de chaîne ou le degré d'insaturation (MORLEY et KURSIS, 1977).

L'enzyme s'apparente aux enzymes à sérine (tableau 18 ; YANG *et al*, 1989 ; WINKLER *et al*, 1990). Le mécanisme catalytique peut se diviser en deux étapes, la formation de l'acyl-enzyme avec déplacement d'un proton du site actif et le clivage de ce complexe faisant intervenir une molécule d'eau (figure 59 ; QUINN, 1985).

La lipoprotéine lipase bovine hydrolyse séquentiellement les liaisons esters des triacylglycérols selon les réactions consécutives suivantes (WANG *et al*, 1990) :

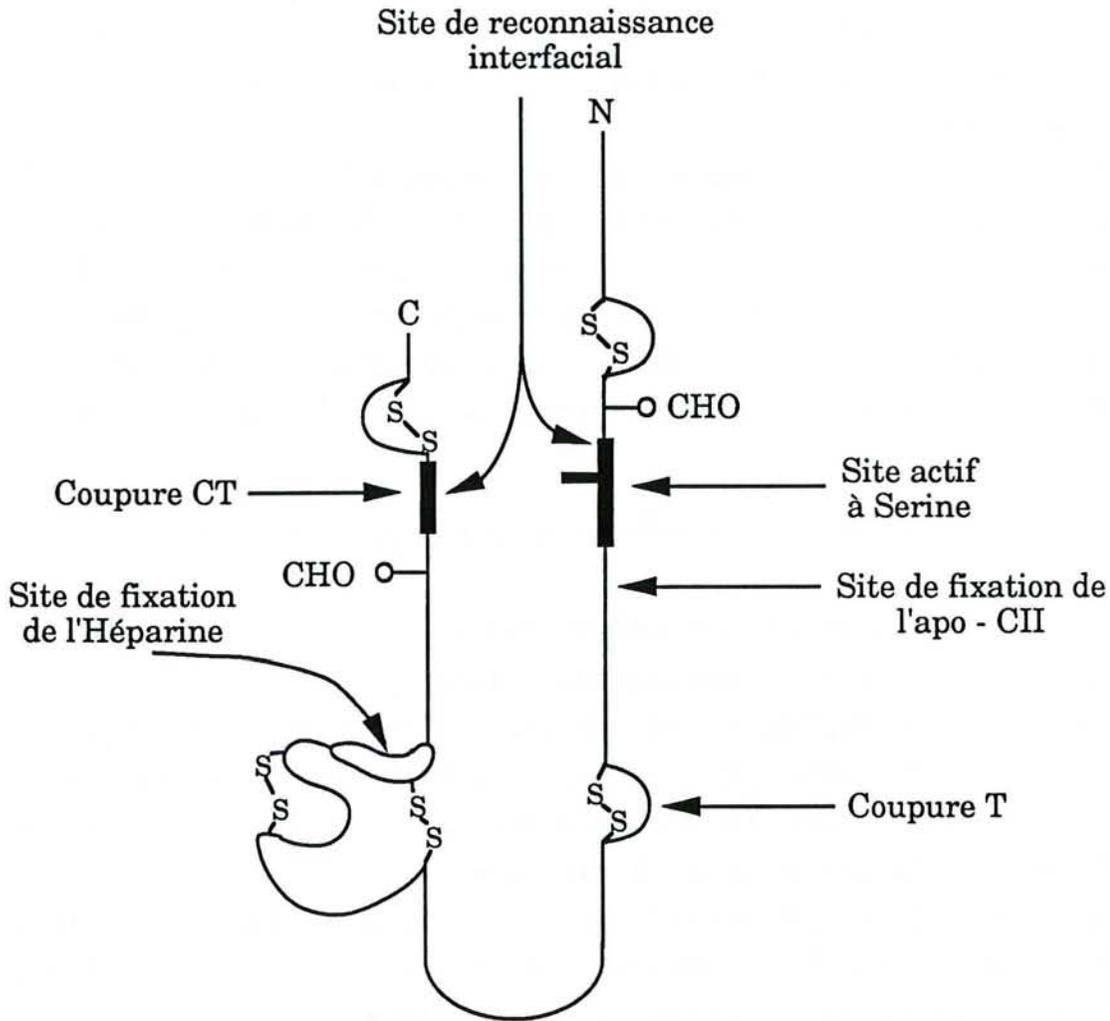


où  $k'_1$ ,  $k'_2$ ,  $k'_3$  sont les constantes cinétiques des vitesses de premier ordre. Le caractère dimérique de l'enzyme est important dans la mesure où chacune des deux sous-unités serait impliquée successivement dans le processus séquentiel (IVERIUS et OSTLUND-LINDQVIST, 1976). Les valeurs des constantes peuvent être calculées, car les concentrations des glycérides partiels produits par la réaction sont déterminées par chromatographie en phase gazeuse.

Lorsque la trioléine est utilisée comme substrat, WANG *et al* (1990) déterminent un rapport élevé  $k'_2/k'_1$  compris entre 16 et 23. Cette fourchette indique que l'enzyme a une plus grande réactivité avec le dioléylglycérol.

Le clivage du complexe acyl-enzyme ne représente pas l'étape limitante de la réaction, car la présence d'hydroxylamine n'augmente pas la vitesse de réaction. Son rôle est de rompre les liaisons ester des acyl-enzymes plus facilement que H<sub>2</sub>O (WANG *et al*, 1990). L'étape limitante est en fait la formation de l'acyl-enzyme.

**Les activateurs de la lipoprotéine lipase :** l'activité lipolytique de la lipoprotéine lipase est renforcée lorsque le milieu réactionnel contient des accepteurs d'AGL. Ces produits de la réaction, peu solubles dans l'eau, tendent à inhiber l'enzyme lors de leur accumulation à l'interface. La sérumalbumine bovine (SAB), accepteur physiologique d'AGL, permet de lever cette inhibition (WANG *et*



**Figure 58.** Modèle structural de la lipoprotéine lipase. CHO : chaîne glycanne ; coupure T : région hypersensible à l'hydrolyse trypsique ; coupure CT : région hypersensible à l'hydrolyse chymotrypsique (d'après YANG *et al*, 1989).

*al*, 1990). Cependant, un fort excès de SAB diminue l'aire interfaciale du substrat par adsorption non spécifique et donc a tendance à inhiber l'enzyme (SCOW et OLIVECRONA, 1977).

Les ions calcium sont également des accepteurs d'AGL et activent l'enzyme. Cependant, de récents travaux montrent que les ions calcium ont un rôle plus important, car ils contribuent à stabiliser la forme active de la LPL à 37°C. Les sites de fixation des ions calcium ne sont pas encore connus (GOLDMAN, 1990).

La LPL possède une forte affinité pour l'héparine, molécule polyanionique de type glycosaminoglycane. *In vivo*, l'héparine libère l'enzyme de son site de fixation endothélial dans la circulation sanguine. *In vitro*, l'activité lipolytique est augmentée en présence d'héparine, qui est un ligand capable de stabiliser l'enzyme et de favoriser l'interaction LPL-triglycéride (IVERIUS *et al*, 1972). Le site de fixation de l'héparine sur l'enzyme correspond au domaine 278-306 de la protéine et contient une forte proportion d'acides aminés basiques Lys et Arg (YANG *et al*, 1989).

De plus, il existe une convergence structurale fonctionnelle au niveau des régions fixant les polyanions (figure 60 a). Ainsi, des similitudes sont observées entre la LPL humaine et le récepteur des glucocorticoïdes qui fixe l'ADN. On constate également le rôle structural important des ponts disulfures dans ces régions basiques (PERSSON *et al*, 1989).

Par contre, il est intéressant de noter que contrairement au cas de la LPL porcine, l'héparine est un inhibiteur pour la phospholipase A<sub>2</sub> pancréatique (DICCIANNI *et al*, 1991). L'héparine se fixe sur la partie N-terminale de l'enzyme qui est en fait son site de reconnaissance interfaciale et empêche la fixation de la phospholipase A<sub>2</sub> sur les micelles phospholipidiques.

Le critère de distinction de l'activité LPL de celle des autres lipases est essentiellement l'activation par l'apoprotéine CII, dont le mécanisme est en train d'être élucidé (CHENG *et al*, 1990). Le térapeptide C-terminal de l'Apo-CII <sup>76</sup>Lys-Gly-Glu-Glu<sup>79</sup> interagit par pont ionique avec la LPL et induit une conformation de l'enzyme correcte afin de permettre au domaine activateur de l'Apo-CII d'être en contact à son tour avec le site activateur de la LPL. La partie N-terminale du cofacteur est le domaine de fixation secondaire et contribue à stabiliser l'interaction Apo-CII-LPL (figure 60 b).

Le changement conformationnel induit par le térapeptide C-terminal de l'Apo-CII n'est pas favorable à la catalyse, car on assiste à une inhibition compétitive de la lipolyse ; la région 56-60 de l'Apo-CII est indispensable pour activer l'enzyme. Le domaine de fixation de l'Apo-CII sur la LPL est plus difficile à définir (YANG *et al*, 1989). Il doit se trouver près du site actif (contenant Ser134), où

**Tableau 16 : Comparaison des séquences N-terminales de la LPL du lait humain avec les séquences déduites de l'ADNc d'autres espèces (ZECHNER, 1990)**

LPL de lait humain	X	Asp	Gln	X	Arg	Asp	Phe	Ile	Asp	Ile	Glu	Ser	Lys	Phe	Ala	Leu	Arg		
LPL humaine	Ala	Asp	Gln	Arg	Arg	Asp	Phe	Ile	Asp	Ile	Glu	Ser	Lys	Phe	Ala	Leu	Arg		
LPL bovine	Asp	Arg	Ile	Thr	Gly	Gly	Lys	Asp	Phe	Arg	Asp	Ile	Glu	Ser	Lys	Phe	Ala	Leu	Arg
LPL de souris	Ala	Asp	Ala	Gly	Arg	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Glu	Ser	Lys	Phe	Ala	Leu	Arg		
LPL de cobaye	Ala	Asn	Cys	Glu	Lys	Asp	Tyr	Thr	Asp	Ile	Glu	Ser	Lys	Phe	Ala	Arg	Arg		

**Tableau 17 : Pourcentages d'homologies de séquences des différents types de lipases (d'après PERSSON *et al*, 1989)**

Structures comparées	Proportion de résidus identiques (%)
Lipoprotéines lipases d'espèces différentes *	85 - 94
Famille lipoprotéine lipase / lipase hépatique / lipase pancréatique	
fragment 105-209 de la LPL	42 - 56
protéine entière	27 - 45

\* Les espèces sont l'homme, la vache, la souris et le cobaye.

**Tableau 18 : Homologie de séquence du site actif de la LPL avec d'autres enzymes de type serine (d'après YANG *et al*, 1989)**

Classe	Protéine	Séquence																		
Lipase	lipoprotéine lipase bovine	H	L	L	G	Y	S	L	G	A	H	A	A							
	lipase pancréatique porcine	H	V	I	G	H	S	L	G	S	H	A	A							
	lipase hépatique humaine	H	L	I	G	Y	S	L	G	A	H	V	S							
Transférase	LCAT humaine *	F	L	I	G	H	S	L	G	C	L	H	L							
	S-acyl thioesterase **	A	F	F	G	H	S	F	G	S	Y	I	A							
Protéase	plasmine humaine	S	C	Q	G	D	S	G	G	P	L	V	C							
	trypsine bovine	S	C	Q	G	D	S	G	G	P	V	V	C							

\* lécithine cholestérol acyl transférase

\*\* de glande mammaire de ratte

une seule possibilité s'offre pour former un pont ionique entre les résidus C-terminaux <sup>78</sup>Glu-Glu<sup>79</sup> de l'Apo-CII et les résidus <sup>149</sup>Lys-Lys<sup>150</sup> de la LPL selon YANG *et al* (1989).

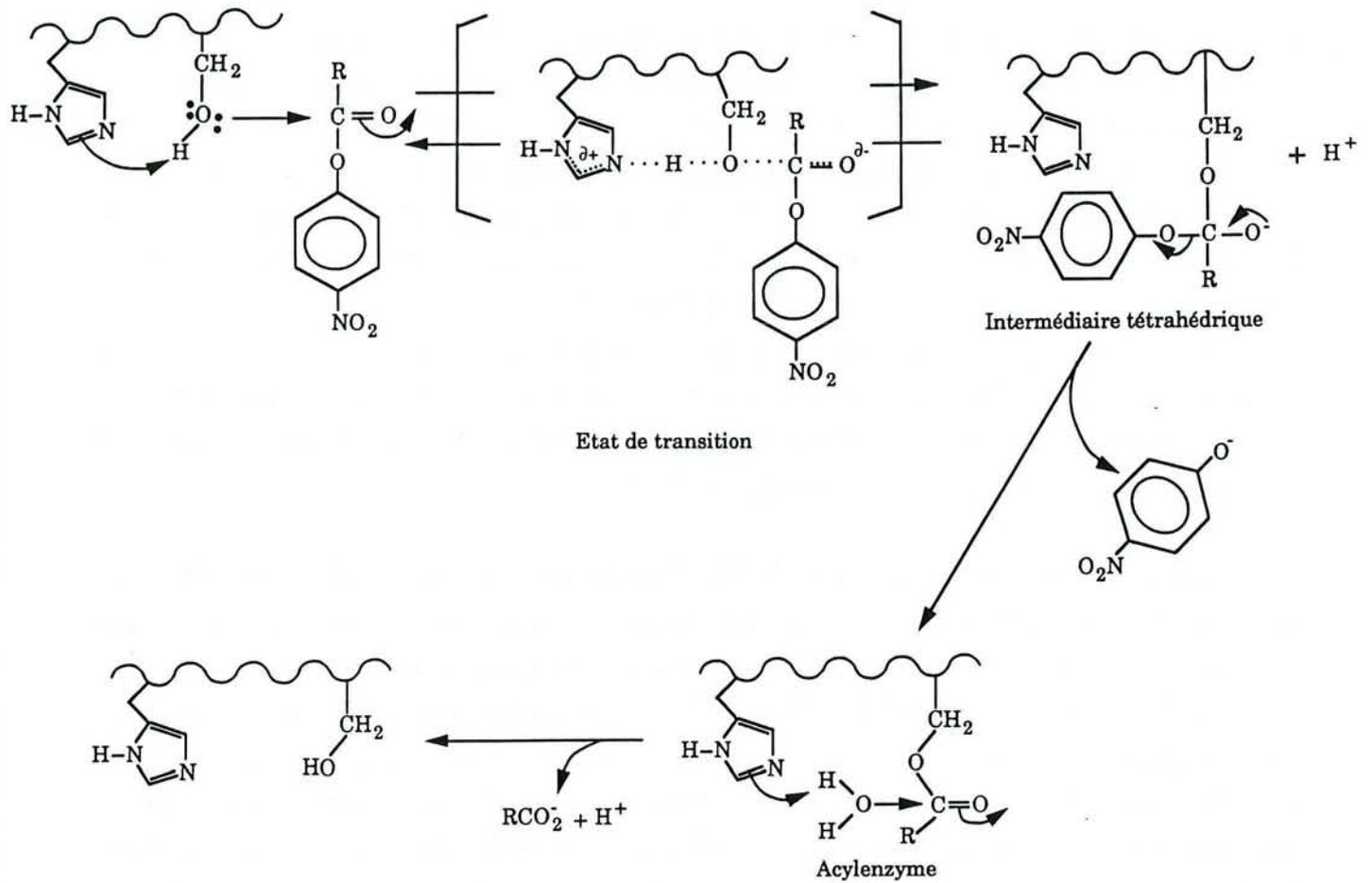
Cependant, l'activité et l'activation de la LPL bovine sont régulées par les acides gras libérés en excès lors de la réaction. En présence d'un excès d'acide oléique par rapport à la SAB, on observe une baisse des interactions LPL-héparine(agarose) et Apo-CII-LPL(Sepharose) (SAXENA et GOLDBERG, 1990). Les AGL interfèrent avec la formation des complexes. Les raisons majeures sont que l'Apo-CII n'est plus disponible, car fixé à l'acide oléique et que, parallèlement, l'adsorption des AGL sur la LPL altère la structure tertiaire de l'enzyme, changeant son affinité pour l'héparine et l'Apo-CII.

Il est remarquable de constater que si l'Apo-CII stimule l'activité lipolytique de la LPL, elle inhibe par contre son activité estérasique au niveau de substrats solubles comme le PNPA ou PNPB (SHIRAI *et al*, 1982). Le complexe LPL-Apo-CII n'a en effet pas d'affinité pour ces esters solubles.

***Les facteurs de variation de la lipolyse spontanée (et induite) dans le lait :***  
dans le lait bovin fraîchement sécrété, la LPL est essentiellement associée aux micelles de caséine et seulement 5% de l'activité lipolytique totale sont associés à la crème (CHILLIARD et LAMBERET, 1984). L'importance de la lipolyse spontanée ou induite dépendra donc de la migration de la LPL des micelles de caséine vers les globules gras. Cette redistribution de l'enzyme est sensible à de nombreux facteurs, notamment ceux qui altèrent la membrane des globules gras (MGG), comme l'agitation mécanique ou les changements de température. La lipolyse spontanée est en fait corrélée à la lipolyse induite et il est très difficile de mettre une frontière entre les deux phénomènes.

Lorsque les globules gras sont sensibles à la dégradation lipolytique, la lipolyse spontanée est corrélée à la présence d'activateurs de la LPL. L'ajout de sérum sanguin apporte l'Apo-CII qui stabilise le site catalytique de la LPL fixée sur les MGG (CARTIER et CHILLIARD, 1989).

Une expérience parallèle montre que l'addition d'HDL, qui apportent l'APO-CII au milieu réactionnel, induit le transfert de la LPL d'un lait écrémé non chauffé sur des globules gras chauffés (BACHMAN et WILCOX, 1990). Cependant, c'est la partie lipidique des HDL qui est indispensable à la redistribution de la LPL, car d'autres travaux montrent le rôle négligeable dans le processus des apolipoprotéines seules et notamment de l'Apo-CII dans le processus de transfert (CLEGG, 1980). Le sérum sanguin utilisé par CARTIER et CHILLIARD (1989)



**Figure 59.** Mécanisme proposé pour la catalyse enzymatique de la LPL (d'après QUINN, 1985).

comme stimulateur de la lipolyse spontanée apporte donc les HDL entières, la partie lipidique induisant le transfert de la LPL et la partie Apo-CII stimulant la catalyse.

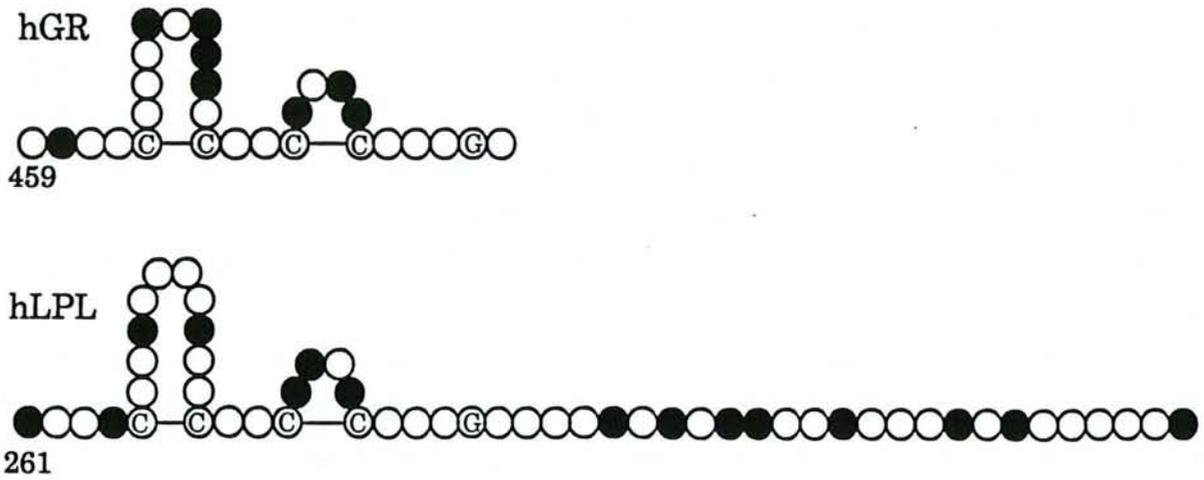
L'addition d'héparine stimule la redistribution de la LPL dans la crème (la constante catalytique est cependant seulement augmentée de 10%). Comme l'enzyme est régulée par l'accumulation des produits de la réaction (les AGL), la présence d'accepteurs d'AGL (SAB et ions calcium) ont aussi une action sur l'activité de la LPL.

Le pH du lait a également une grande influence sur la lipolyse spontanée. Des variations faibles de + 0,3 unités pH augmentent le phénomène de dégradation d'un facteur trois. Ainsi, les laits mammiteux enregistrant des hausses de pH voient leur lipolyse spontanée fortement augmentée (CARTIER *et al*, 1989).

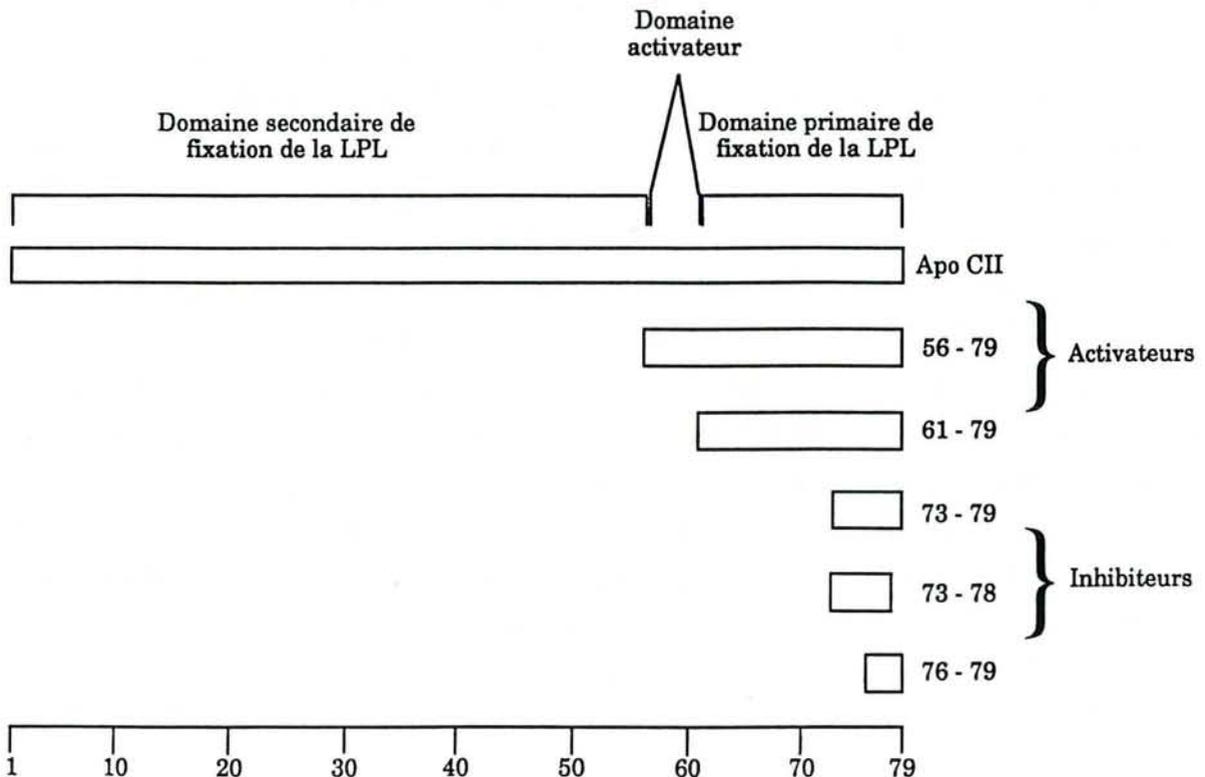
L'effet des sels minéraux sur l'activité de la LPL bovine a été également étudié *in vitro* (HANNAN *et al*, 1990). De faibles molarités en NaCl (<0,25 M) auraient tendance à augmenter l'interaction enzyme-substrat (LPL-trioléine dans cette étude), tandis que de fortes concentrations (> 0,25 M) diminueraient l'interaction, sans toutefois bloquer totalement l'activité de l'enzyme. Par contre, les ions divalents  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  ont un fort pouvoir inhibiteur, et cela à des faibles concentrations. Le calcium est un cofacteur activant la LPL lorsque l'on est dans des conditions physiologiques de 1,25 à 2,5 mM. Au-delà de cette limite, il inhibe fortement l'enzyme. Ainsi, l'intensité de l'inhibition dépend plus de la nature des ions salins que de la force ionique du milieu (HANNAN *et al*, 1990).

Les travaux de CARTIER et CHILLIARD (1986) montrent que certaines fractions de lait écrémé chauffé ont une action activatrice sur la lipolyse spontanée tandis que d'autres inhibent le processus. Les premières seraient enrichies en composant-5 des protéose-peptones ( $\beta$ -CN-5P) et les secondes en composant-3.

ANDERSON (1981) fut le premier auteur à montrer le rôle inhibiteur des protéose-peptones sur la lipolyse du lait. Les récents travaux de CARTIER *et al* (1990) mettent en évidence que l'inhibition globale par les protéose-peptones incombe au composant-3 présent dans la fraction hydrophobe. Cependant, ces auteurs restent prudents quant à la responsabilité directe du peptide  $\beta$ -CN-5P dans l'effet activateur de la fraction non hydrophobe, car celle-ci possède de nombreux autres composés mineurs dont la nature exacte n'a pas été élucidée (nature peptidique, densité de charge, ...) et qui pourraient très bien activer l'action de la LPL à la surface des globules gras.



**Figure 60 a.** Similitude des régions de fixation des polyanions de la LPL humaine (hLPL) et du récepteur des glucocorticoïdes humain (hGR). La hLPL fixe l'héparine et le hGR fixe l'ADN. Les cercles pleins correspondent aux acides aminés basiques ; C et G représentent Cys et Gly et les ponts dissulfures sont marqués d'un trait (d'après PERSSON *et al*, 1989).



Résidus d'acides aminés de l'APO CII

**Figure 60 b.** Rôle des domaines structuraux de l'apo-CII dans l'interaction apo-CII-LPL (d'après CHENG *et al*, 1990).

D'autres travaux montrent que les protéines isolées des MGG ont également un pouvoir inhibiteur sur la lipolyse spontanée (SHIMIZU *et al*, 1982 ; SUNDHEIM et BENGTSSON-OLIVECRONA, 1987a). Elles s'adsorberaient à la surface des globules gras comme le composant-3. Ce dernier, ayant une origine membranaire, est peut être impliqué dans l'inhibition de la LPL par la fraction protéique extraite de la MGG.

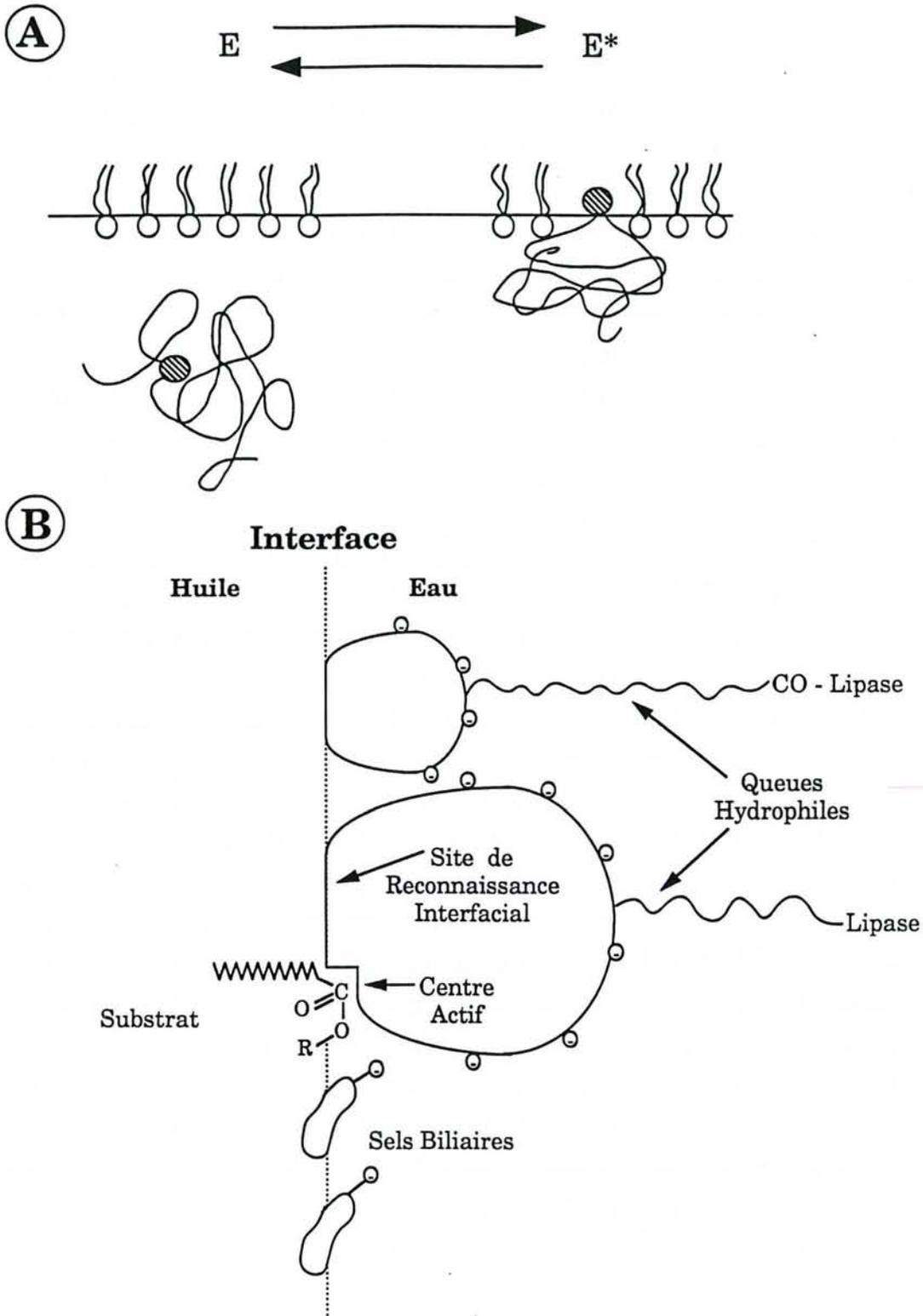
D'autres molécules inhibitrices de la LPL ont été également étudiées. Ainsi, parmi les polysaccharides de type hydrocolloïde végétal (STERN *et al*, 1988), seuls les carraghénanes, le furcellarane et l'alginate de sodium inhibent l'activité lipolytique du lait. Les deux premiers possèdent des groupes sulfates estérifiés sur des unités de galactose et le dernier consiste en unités d'acides D-mannuronique et D-guluronique. La présence de groupements négatifs semble nécessaire pour inhiber l'enzyme, car les gommes arabique et de guar, la cellulose,... ne sont pas chargées négativement et ne sont pas inhibitrices.

Le système LPS (lactoperoxydase/SCN<sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) inhibe la LPL et la lipolyse dans le lait (AHRNE et BJÖRCK, 1985). L'hypothiocyanite OSCN<sup>-</sup>, produit par ce système, est un agent antibactérien qui oxyde les groupements sulfhydryles des enzymes des microorganismes. Cependant, dans le cas de la LPL, cette oxydation n'explique pas tout, car le DTNB, réactif hautement spécifique des cystéines n'a pas d'action sur l'enzyme lipolytique. Le mécanisme reste encore obscur. Basés sur des travaux antérieurs, les auteurs pensent cependant que l'hypothiocyanite peut attaquer d'autres résidus (Tyr, Trp et His) importants pour l'activité de la LPL.

Dans un autre domaine qu'il est intéressant de signaler, celui de la poule, la vitellogénine, lorsqu'elle n'est pas déphosphorylée, inhibe la LPL et seulement en l'absence d'héparine (GRIFFIN, 1986). Il semblerait que cette protéine, précurseur de la phosvitine, interagit avec l'enzyme par ses groupements phosphates au niveau du site de reconnaissance de l'héparine et joue un rôle régulateur important dans le métabolisme des VLDL plasmatiques de la poule. La présence d'ions calcium lèverait cette inhibition en bloquant les groupes phosphates de la vitellogenine. Nous pouvons donc supposer que les polysaccharides chargés négativement (STERN *et al*, 1988) interagissent avec la région affine pour l'héparine de la LPL à la manière de la vitellogénine et diminuent par conséquent l'activité.

### **1.1.2- La lipolyse spontanée et induite du lait d'autres espèces animales.**

Il existe d'importantes variations entre espèces. La lipoprotéine lipase se trouve presque entièrement liée à la crème dans le lait frais de femme (CHILLIARD, 1982) et pour moitié dans le lait de chèvre (CHILLIARD *et al*, 1984).



**Figure 61.** Représentation de la pénétration d'une lipase dans l'interface huile/eau (A) et modèle hypothétique de l'orientation de la lipase pancréatique et de la colipase à l'interface (B) (d'après VERGER, 1984).

Dans ces deux cas, la lipolyse spontanée est par conséquent fortement corrélée à la quantité totale de lipase (CHILLIARD et LAMBERET, 1984). De ce fait, les facteurs physiologiques n'ont pas le même effet que chez la vache.

Il existe dans le lait de femme une autre lipase appelée "lipase stimulée par les sels biliaries" (LSSB). La LSSB joue un rôle important dans la digestion de la matière grasse du lait dans l'alimentation des nouveaux-nés (JENDRYCZKO *et al*, 1988). La LSSB est une enzyme à sérine tout comme la LPL. Elle est inhibée par les acides boroniques qui attaquent l'hydroxyle de la sérine du centre actif. De plus, elle hydrolyse les esters solubles (PNPA) ainsi que les triglycérides émulsifiés (ABOUAKIL et LOMBARDO, 1989). Elle a été récemment séquencée et identifiée à l'estérase carboxylique pancréatique (NILSSON *et al*, 1990). Lors de la catalyse enzymatique à l'interface huile/eau, le rôle des sels biliaries est de provoquer une sur-stabilisation des intermédiaires de l'état de transition et d'augmenter la constante catalytique. Si l'on transpose ici les travaux de WANG *et al* (1990) concernant la LPL bovine, les sels biliaries activeraient donc l'étape limitante de la réaction qui est la formation de l'acyl-enzyme. Cependant, la LSSB ne joue pas de rôle significatif dans la lipolyse spontanée du lait, car elle est peu active dans le lait frais en absence de sels biliaries (CHILLIARD, 1982).

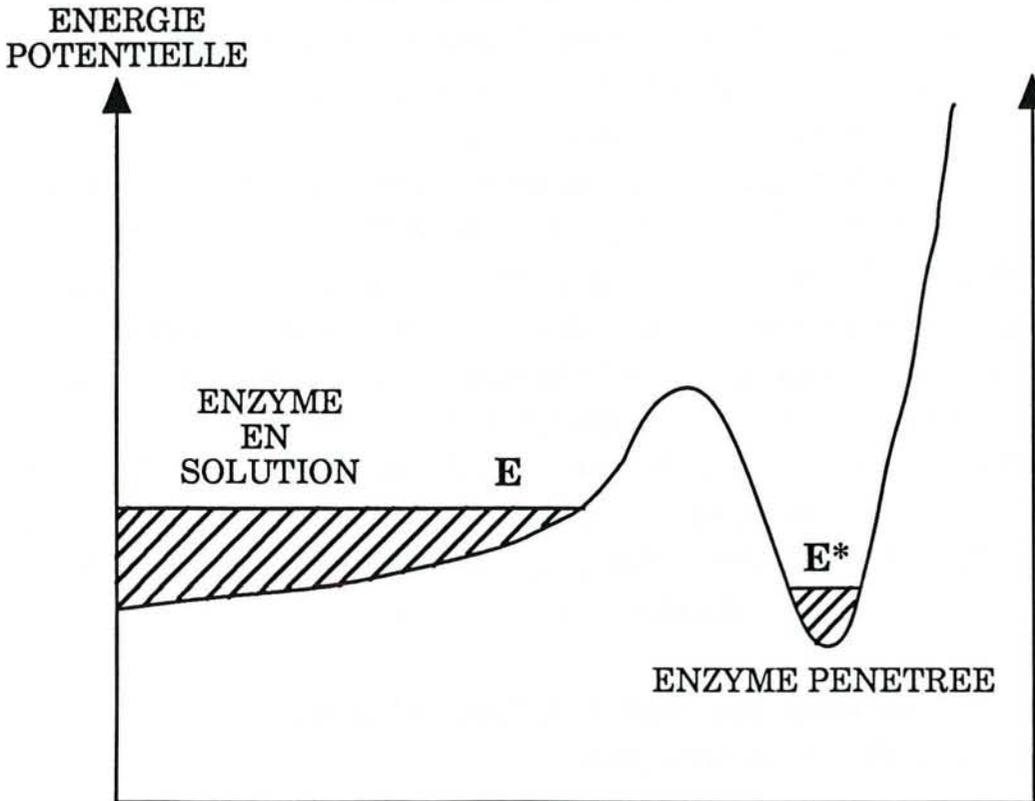
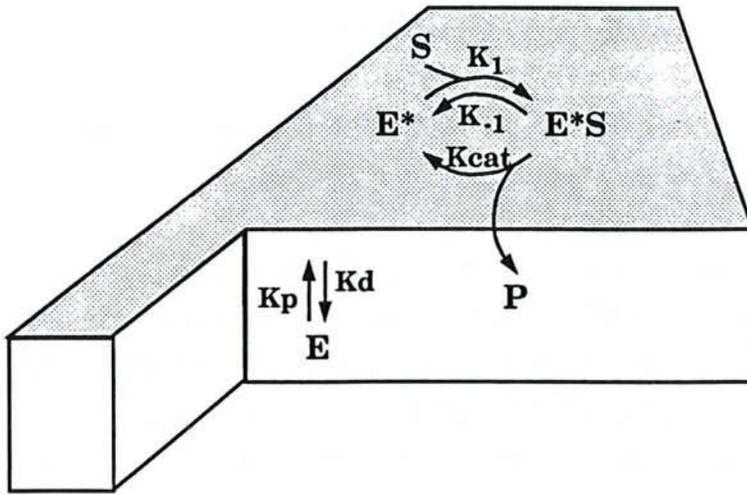
La lipolyse dans le lait de chèvre présente quelques variations avec celle du lait de vache (SUNDHEIM et BENGTSSON-OLIVECRONA, 1987b). Notamment, l'héparine n'induit pas la lipolyse du lait caprin du fait de la distribution égale de la LPL entre les micelles de caséine et les globules gras. De plus, le lait écrémé caprin cause une inhibition moins importante de la lipolyse des globules gras caprins que dans le cas bovin. La faible inhibition incomberait aux protéose-peptones caprins.

Chez d'autres espèces, peu d'études ont été réalisées. Le lait de brebis semble résistant à la lipolyse, le lait de jument est riche en LPL mais la lipolyse n'a pas été étudiée (CHILLIARD et LAMBERET, 1984). Le lait de bufflesse est plus sensible à la lipolyse que le lait bovin (BALASUBRAMANYA *et al*, 1988).

## **1.2- Etude du mécanisme lipolytique avec d'autres lipases.**

### **1.2.1- Les lipases pancréatiques.**

Les lipases pancréatiques humaines, de porc, de cheval ont essentiellement une activité lipasique (rapport phospholipase/lipase de l'ordre de  $10^{-3}$  à  $10^{-5}$ ), tandis que la lipase pancréatique de cobaye possède une activité phospholipasique importante (rapport phospholipase/lipase de 1), c'est ce qui la distingue des autres enzymes (VERGER, 1984).



**Figure 62.** Modèle proposé pour l'action d'une enzyme soluble à l'interface huile/eau (d'après VERGER et De HAAS, 1976).

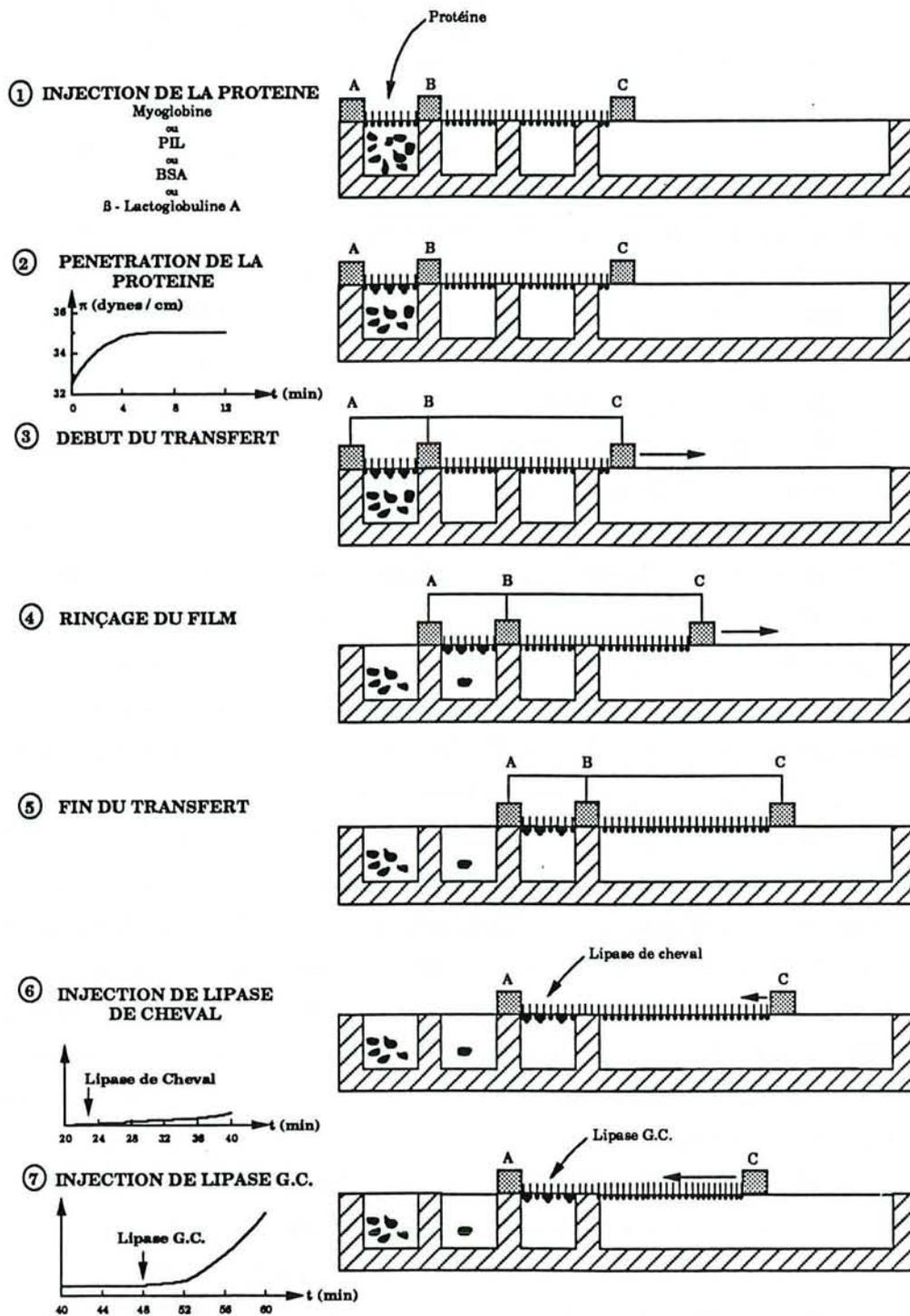
La lipase pancréatique porcine (LPP) est composée d'une seule chaîne de 449 acides aminés, dont la masse moléculaire calculée est de 49 859 Da (De CARO *et al*, 1981). Il faut ajouter à cette valeur environ 2 000 Da provenant de la partie glycanique fixée sur le résidu Asn166, ce qui donne une masse moyenne de 52 000 Da.

La sérine 161 appartient au site actif de l'enzyme (VERGER, 1984). La LPP possède six ponts disulfures et également deux groupes thiols libres. La région 285-304 de la LPP, possédant deux ponts disulfures et la séquence <sup>267</sup>Tyr-Lys-Tyr-Tyr<sup>270</sup>, est similaire au site de reconnaissance interfaciale de la colipase (activateur de la LPP). Ce dernier est lui-même composé de deux ponts disulfures et d'une séquence <sup>53</sup>Tyr-Gly-Val-Tyr-Tyr-Lys<sup>58</sup>, dont les deux résidus consécutifs Tyr56 et Tyr57 sont essentiels pour l'interaction hydrophobe avec le substrat lipidique.

Il est à noter que la colipase possède 104 acides aminés (RATHELOT *et al*, 1975a) et, malgré sa taille similaire à celle de l'Apo-CII sa structure primaire est différente (PERSSON *et al*, 1989). Elle se fixe par interactions hydrophobes sur la LPP avec une constante de dissociation de  $5 \cdot 10^{-7}$  M et avec une stoechiométrie de 1:1.

Un modèle illustrant l'adsorption de la LPP et de la colipase à l'interface substrat lipidique/eau est proposé (figure 61 ; VERGER, 1984). Cette représentation met en jeu un changement conformationnel de l'enzyme plus stable énergétiquement ( $E_{\text{libre}} \rightarrow E^*_{\text{adsorbée}}$ ) (figure 62 ; VERGER et De HAAS, 1976). La phase d'adsorption de la lipase est une étape limitante de la réaction et il en résulte un temps de latence ou d'induction de quelques minutes (VERGER *et al*, 1976 ; VERGER, 1984 ; De HAAS *et al*, 1990). Cette durée dépend également de la tension de surface. La pression critique pour laquelle l'enzyme ne peut s'adsorber à l'interface est un critère de discernement entre la LPP et la phospholipase A<sub>2</sub> (respectivement 19 dynes/cm et 26 dynes/cm d'une monocouche de didodécanylphosphatidyléthanolamine).

La nature de la couche monomoléculaire a une forte influence sur la phase de latence. La monocouche de dérivé phosphatidyléthanolamine forme une barrière électrique lorsque la densité de population de phospholipides par cm<sup>2</sup> est suffisamment élevée et empêche l'adsorption de la LPP. La phospholipase A<sub>2</sub> est plus adaptée à ce type de substrat et son temps de latence reste le même sur une large gamme de tension de surface. Lorsque la monocouche est constituée de molécules non chargées (1,2 didécanylglycérol), le temps d'induction de la LPP est court, et l'enzyme peut s'adsorber pour des valeurs de tension de surface élevées.



**Figure 63.** Etapes expérimentales successives du transfert d'un film lipidique monomoléculaire (d'après GARGOURI *et al*, 1985).

### 1.2.2- Inhibition et activation des lipases aux interfaces substrat/eau.

L'hydrolyse des substrats émulsifiés par la LPP en absence de colipase est inhibée par les sels biliaires en dessous de leur concentration micellaire critique (VERGER, 1984). La première hypothèse du mécanisme est basée sur le fait que les sels biliaires sont des composés tensio-actifs qui s'accumulent à la surface du substrat et ainsi empêchent la LPP de s'adsorber à l'interface (CANIONI *et al*, 1976).

La deuxième hypothèse repose sur la formation coopérative d'un complexe lipase-sels biliaires, qui a une affinité négligeable pour l'interface tapissée alors de sels biliaires (MOMSEN et BROCKMAN, 1976).

Cependant, les sels biliaires peuvent jouer un rôle inverse en réactivant la lipolyse sous certaines conditions. Ainsi, l'inhibition par les détergents non ioniques (Brij 35, Triton X100,...) est levée lorsque l'on ajoute dans le milieu de trioléine émulsifiée des sels biliaires. Le phénomène de réactivation s'expliquerait par la désorption des molécules de détergent de la surface du substrat par les sels biliaires et par la formation de micelles mixtes détergents/sels biliaires à une concentration inférieure à la concentration micellaire critique (GARGOURI *et al*, 1983).

Dans ces conditions, la LPP, quant à elle, reste fortement adsorbée à l'interface en présence de colipase qui lui sert de point d'ancrage. En effet, lorsque le milieu réactionnel contient uniquement le substrat émulsifié et les sels biliaires, la lipase est inhibée ; en présence de colipase l'activité lipolytique est stimulée et n'est pas du tout affectée par les sels biliaires.

D'un autre côté, la colipase associée à la "qualité interfaciale" d'une monocouche de phosphatidylglycérol jouent un rôle de régulation de l'activité lipasique (VERGER, 1984). En effet, lorsque la tension de surface est supérieure à 20 dynes/cm environ (et inférieure à 30 dynes/cm), la colipase est indispensable à l'adsorption et à l'activité de la LPP.

Grâce au système lipase/colipase/sels biliaires, le mécanisme d'inhibition des lipases par les protéines a pu être étudié de près, et cela au moyen de deux techniques différentes. La première utilise une émulsion de tributyrine et de trioléine. Après ajout de la lipase et des cofacteurs, le suivi de l'hydrolyse est réalisé à pH constant avec un appareil pH-Stat (GARGOURI *et al*, 1984). La seconde méthode est plus complexe, car la cinétique est suivie par la variation de la tension superficielle d'un film lipidique monomoléculaire (monocouche de dicaprène) au cours du temps (figure 63 ; GARGOURI *et al*, 1985).

DERVICHIAN (1971), utilisant un film monomoléculaire disposé à l'interface air/eau, décrit pour la première fois la technique de suivi de la vitesse de réaction enzymatique à tension de surface constante avec un barostat. Le film monomoléculaire formé à la surface d'une cuve est comprimé à une valeur optimale de tension superficielle par un piston relié à un système d'enregistrement. Le trajet parcouru par unité de temps par le piston, afin de maintenir la tension de surface constante au cours de l'hydrolyse, est proportionnel à l'activité de la lipase :

$$V = - 1/t \ln L/L_0$$

où  $L_0$  est la position initiale du piston,  $L$  la position du piston à l'instant  $t$  et  $V$  la vitesse initiale de la réaction.

Selon l'étude cinétique envisagée (par exemple, inhibition de la lipase par les protéines) la cuve peut avoir plusieurs compartiments reliés par des canaux où seul le film lipidique peut communiquer d'un compartiment à l'autre (figure 63 ; GARGOURI *et al*, 1985). Par ce système, les auteurs montrent que les protéines adsorbées sur le film monomoléculaire formé de dicaprine (protéine de soja inhibant la lipase PIL, SAB, myoglobine, ovalbumine, melittine,  $\beta$ -lactoglobuline) inhibent la lipase de cheval.

Cependant, l'activité des lipases de *Rhizopus arrhizus* et de *Geotrichum candidum* n'est pas affectée par la présence des protéines. Ces enzymes possèdent des propriétés tensio-actives très fortes puisque leur adsorption sur le film diminue considérablement la pression de surface, alors que la lipase de cheval et les protéines testées n'ont qu'un relativement faible effet.

Ces observations montrent que les protéines n'interagissent pas avec l'enzyme, mais leur adsorption sur le film a pour conséquence de masquer le substrat dans le cas de la lipase de cheval. Cependant, les lipases fongiques sont capables d'accéder au substrat de dicaprine malgré la présence de protéine.

Les études réalisées au moyen du pH-Stat et en milieu émulsifié aboutissent aux mêmes conclusions. Les protéines inhibent l'activité de la LPP et n'ont pas d'effet sur les lipases fongiques (GARGOURI *et al*, 1984). De plus, l'addition de sels biliaires, comme le déoxycholate permet de restaurer totalement, et cela en présence de colipase, l'activité lipolytique. Comme dans le cas des détergents non ioniques, les sels biliaires désorbent les protéines de la surface de l'émulsion tributyrine/eau (ou trioléine/eau), permettant à la LPP, bien ancrée à la surface grâce à la colipase, de retrouver son activité.

Cependant, dans les deux études au moyen du pH-Stat et au moyen du barostat, les auteurs ne trouvent pas de corrélation entre les propriétés de surface

des protéines et leur capacité inhibitrice. L'inhibition interfaciale serait plutôt corrélée aux flux de pénétration respectifs de l'enzyme et de la protéine inhibitrice. Actuellement, ces auteurs travaillent avec des molécules marquées radioactivement afin de pouvoir estimer les quantités d'enzyme et d'inhibiteur fixées sur le film lipidique.

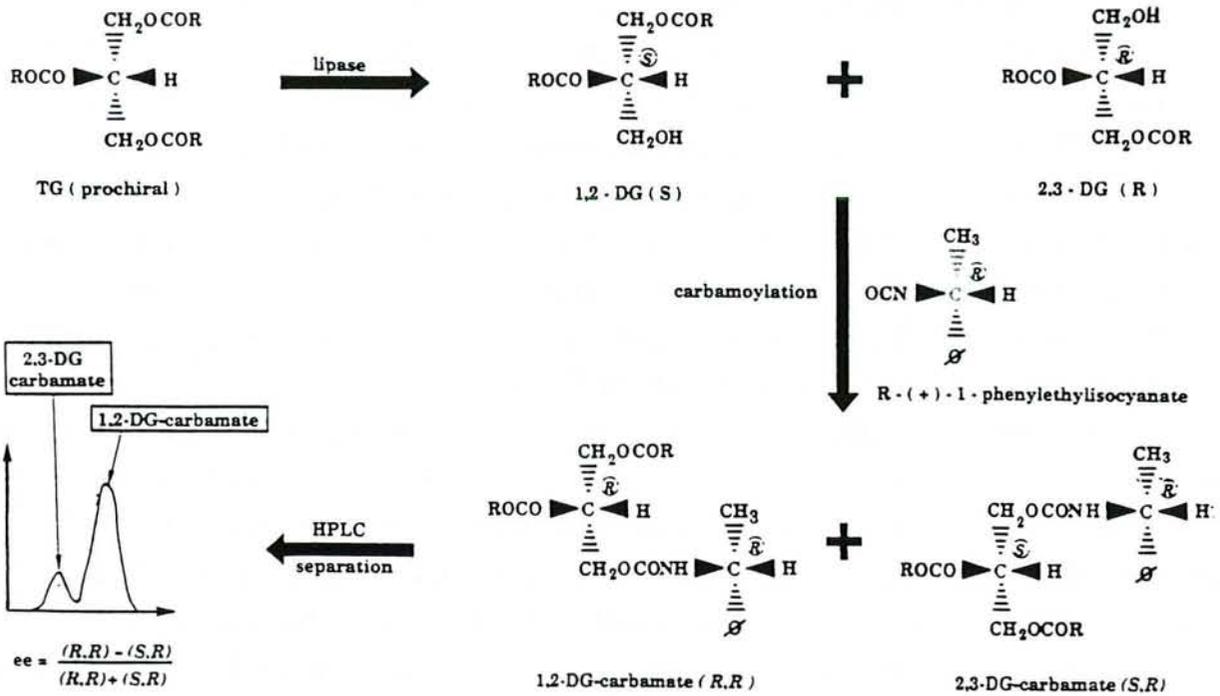
L'étude similaire au barostat réalisée avec la lipase gastrique humaine (LGH) appuie cette dernière hypothèse (GARGOURI *et al*, 1987). Rappelons que la lipase gastrique est différente de la lipase pancréatique (GARGOURI *et al*, 1989). Son pH optimum d'action est 5,4 et l'enzyme est stable entre pH 1 et 3. Sa masse moléculaire est de 43 kDa et la chaîne polypeptidique, composée de 377 acides aminés avec très peu d'homologie avec la LPP, possède un seul pont disulfure et cinq sites de glycosylation. La LGH possède également un groupement thiol essentiel dans le site actif, ce qui permet de la classer parmi les enzymes à SH. Une autre différence avec la LPP est que la LGH ne requiert pas de colipase. Alors que les sels biliaires inhibent la LPP, ils activent au contraire la LGH.

Le pouvoir de pénétration de cette enzyme gastrique dans le film monomoléculaire de dicaprine est très fort, comparé à celui de la lipase pancréatique et certaines protéines inhibant habituellement l'activité de la LPP ( $\beta$ -lactoglobuline, melittine, ovalbumine) n'ont aucun effet sur l'activité de la LGH. Seules la myoglobine, la SAB et la protéine de soja PIL inhibent cette dernière. Ainsi, la capacité d'inhibition des lipases par les protéines semble être corrélée avec le pouvoir de pénétration des protéines dans le film lipidique en compétition avec celui de la lipase utilisée (lipase pancréatique, fongique ou gastrique).

### 1.2.3- Stéréosélectivité des lipases hydrolysant les triglycérides.

Pour discerner si l'hydrolyse d'un triglycéride se fera en position sn-1 ou sn-3, les trois acides gras estérifiés sur la molécule de glycérol doivent être identiques. Mais de nombreuses études ont utilisé des triglycérides mixtes et les paramètres longueur et degré de saturation des acides gras devaient être intégrés dans l'interprétation de la stéréosélectivité d'une lipase pour un triglycéride donné. Ainsi, de nombreux résultats rapportés dans la littérature concernant la stéréosélectivité des lipases se contredisent apparemment.

Récemment, ROGALSKA *et al* (1990) ont utilisé pour leur étude de la trioctanoïne (AG à chaîne courte) et également de la trioléine (AG à chaîne longue), triglycérides homogènes et prochiraux. Les diglycérides, produits de la réaction, sont dérivés par le R-(+)-1-phényléthylisocyanate et les deux diastéréoisomères



**Figure 64.** Principe de la méthode utilisée dans l'étude de l'hydrolyse stéréosélective des triglycérides par les lipases. DG : diglycéride ; TG : triglycéride ; ee : excès énantiomérique (d'après ROGALSKA *et al*, 1990).

1,2,DG-carbamate(R,R) et 2,3,DG-carbamate(S,R) sont séparés et dosés par HPLC. Ainsi l'aspect "spécificité d'acides gras" est évité (figure 64).

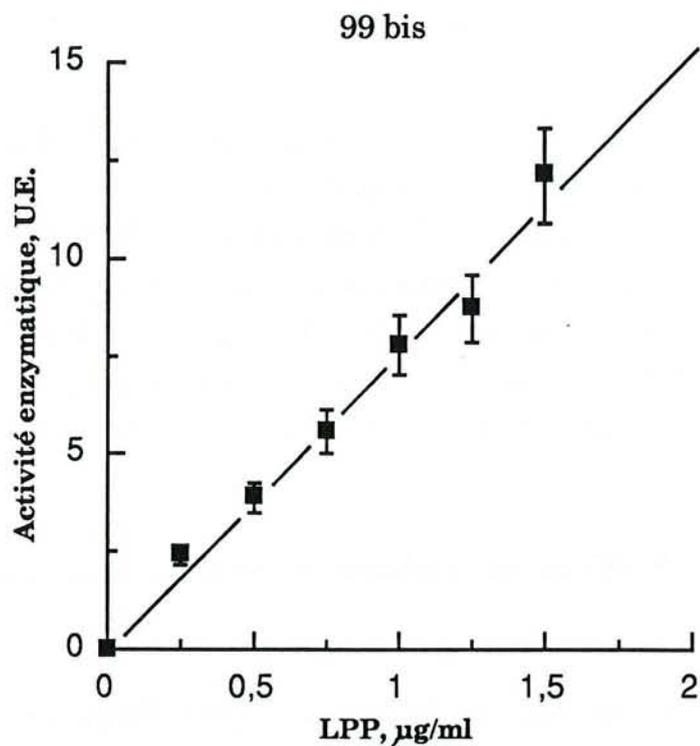
De cette étude, il ressort que les lipases gastriques humaine et de lapin ont une stéréosélectivité marquée pour la position sn-3 du triglycéride (que l'AG soit en C8 ou en C18). La lipase pancréatique porcine hydrolyse quant à elle indifféremment les positions sn-1 et sn-3. Dans les deux cas, la position sn-2 est très faiblement hydrolysée, d'autant moins que la réaction est stoppée avant apparition de monoglycérides.

#### **1.2.4- Les réactions de synthèse (estérification) catalysées par les lipases.**

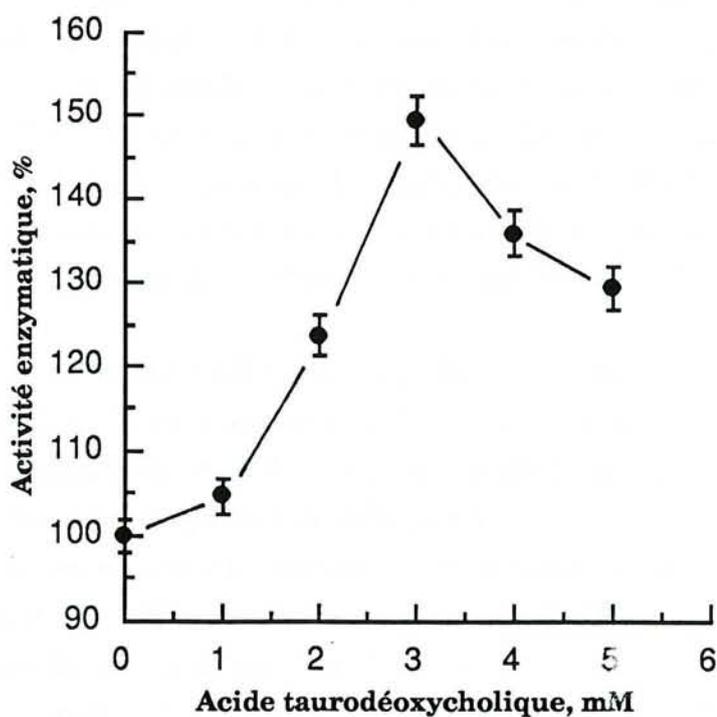
Dans certaines conditions, les lipases d'origine fongique et la LPP sont capables de réaliser des réactions d'estérification, de synthèse de glycérides (mono et diglycérides) à partir de glycérol et d'acides gras libres (HAYES et GULARI, 1990) et également des réactions de transestérification (GOLDBERG *et al*, 1990).

Pour réaliser ce dernier type de synthèse, le milieu réactionnel est une phase organique anhydre contenant de l'éthylpropionate et du nonanol selon une stoechiométrie 1:1. La lipase est fortement concentrée (30 mg/ml). Le produit de la réaction, le nonylpropionate, est dosé par chromatographie en phase gazeuse. La vitesse de synthèse augmente quand on ajoute dans le milieu des quantités croissantes d'eau (de 2 à 20 mg/ml). La lipase est peu active en milieu anhydre. Son activation requiert la formation de liaisons hydrogènes avec des molécules d'eau pour son activation. L'activité de l'eau au niveau de l'enzyme et la polarité des substrats utilisés sont des paramètres très importants à maîtriser pour réaliser une transestérification.

Pour réaliser la synthèse de triglycérides (HAYES et GULARI, 1990), les auteurs utilisent des "micelles inverses" constituées d'un surfactant anionique, l'AOT (sodium bis-(2-éthylhexyl)sulfosuccinate), d'acide dodécanoïque, de glycérol, le tout solubilisé dans l'isooctane, et d'une aliquote de lipase fongique préalablement solubilisée dans un tampon phosphate. L'enzyme hydratée est donc encapsulée dans les micelles inverses d'AOT. Après une semaine à 25°C, on détecte la synthèse de deux monoglycérides ainsi que des 1,2 diglycérides par chromatographie en phase gazeuse. La présence de triglycérides n'a pas été détectée. La conversion de synthèse des glycérides dans ces micelles inverses est inférieure à 60% et dépend fortement de la température d'incubation, des concentrations en substrats et produits (incluant l'eau).



**Figure 65 a.** Influence de la concentration de LPP sur l'activité enzymatique à l'interface de l'émulsion tributyrine/eau, à pH 8 et à 25°C.



**Figure 65 b.** Influence de la concentration en acide taurodéoxycholique sur l'activité enzymatique de la LPP (1  $\mu\text{g/ml}$ ) à l'interface de l'émulsion tributyrine/eau.

Ainsi une meilleure connaissance des mécanismes d'action des lipases a permis de transposer la méthode des micelles inverses, utilisée auparavant pour la synthèse de liaisons peptidiques par les protéases (synthèse de l'aspartame par la thermolysine, par exemple), à la synthèse de liaisons esters et de glycérides. Les lipases agissant à une interface, la réaction est plus complexe qu'avec les protéases.

### **1 3- But de l'étude.**

Récemment, le rôle inhibiteur de la fraction hydrophobe des protéose-peptones sur la lipolyse spontanée a été mis en évidence (CARTIER *et al*, 1990). Cependant, son mode d'action reste à élucider.

Les données actuelles de la littérature concernant les mécanismes lipolytiques ainsi qu'une meilleure connaissance physico-chimique et chimique du composant-3 rapportée dans les chapitres précédents vont nous permettre d'étudier de près le mécanisme d'inhibition par la fraction hydrophobe des protéose-peptones.

Le but de l'étude consiste donc à déterminer si cette fraction inhibe la lipase en interagissant directement avec un domaine structural de l'enzyme ou si son mode d'action résulte de son adsorption à l'interface huile/eau interférant avec l'activité lipolytique.

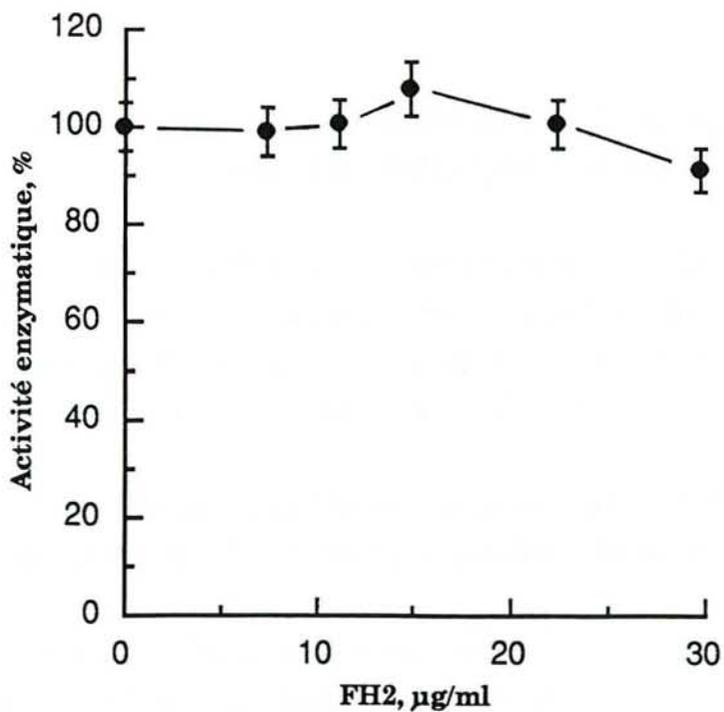
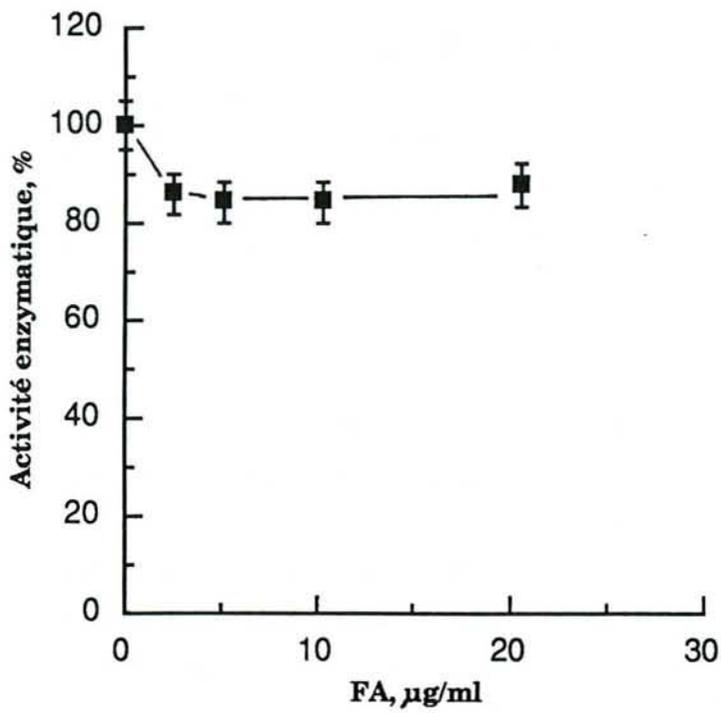
## **2- Résultats-Discussion.**

### **2.1- Activité lipolytique de la LPP en phase hétérogène : étude du mécanisme inhibiteur par la fraction hydrophobe des protéose-peptones.**

La tributyrine émulsifiée est hydrolysée par la LPP en acide butyrique et la cinétique est suivie à pH constant (pH 8) par ajout continu de NaOH 0,05 M au moyen d'un appareil pH-Stat. Le choix de ce modèle d'étude du mécanisme de l'inhibition de la lipolyse par la fraction FH1 repose essentiellement sur deux critères :

- l'étude cinétique en milieu hétérogène, où l'enzyme s'adsorbe à une interface huile/eau, reflète mieux l'activité lipolytique dans le lait, que l'étude en milieu homogène soluble ;
- ce modèle d'étude est facile à mettre en oeuvre, reproductible, et s'est montré très approprié pour expliquer le mécanisme d'inhibition de la LPP par diverses protéines à l'interface tributyrine émulsifiée/eau (GARGOURI *et al*, 1984).

Le choix de la LPP se justifie d'une part parce qu'on la trouve facilement dans le commerce et d'autre part par sa forte homologie avec la LPL du lait au niveau de



**Figure 66.** Activité enzymatique résiduelle de la LPP (1 µg/ml) à l'interface de l'émulsion tributyrine/eau en fonction de la concentration en fractions FA et FH2.

son mode d'action. Ces deux enzymes appartiennent à une même famille de lipases (voir introduction ; PERSSON *et al*, 1989).

L'activité enzymatique est proportionnelle à la quantité de LPP ajoutée dans le volume montrant que la presque totalité de la LPP s'adsorbe à l'interface huile/eau de l'émulsion (figure 65 a). La réaction enzymatique suit une cinétique d'ordre 0, car la quantité de substrat est en très large excès, le rapport de la somme des interfaces sur le volume est de l'ordre de  $10^5 \text{ cm}^{-1}$  (VERGER et De HAAS, 1976).

Dans notre étude, nous avons utilisé la  $\beta$ -lactoglobuline comme inhibiteur témoin dont le mécanisme d'action a été étudié et expliqué au moyen du pH-Stat (GARGOURI *et al*, 1984). La  $\beta$ -lactoglobuline, parmi les cinq protéines testées (myoglobine, SAB, ovalbumine, melittine et  $\beta$ -lactoglobuline), est la protéine qui provoque la plus forte inhibition. La quantité de  $\beta$ -lactoglobuline qui inhibe 50% de l'activité de la LPP ( $I_{50}$ ) est déterminée à 1,1  $\mu\text{g/ml}$  dans nos conditions d'expérience (tableau 19).

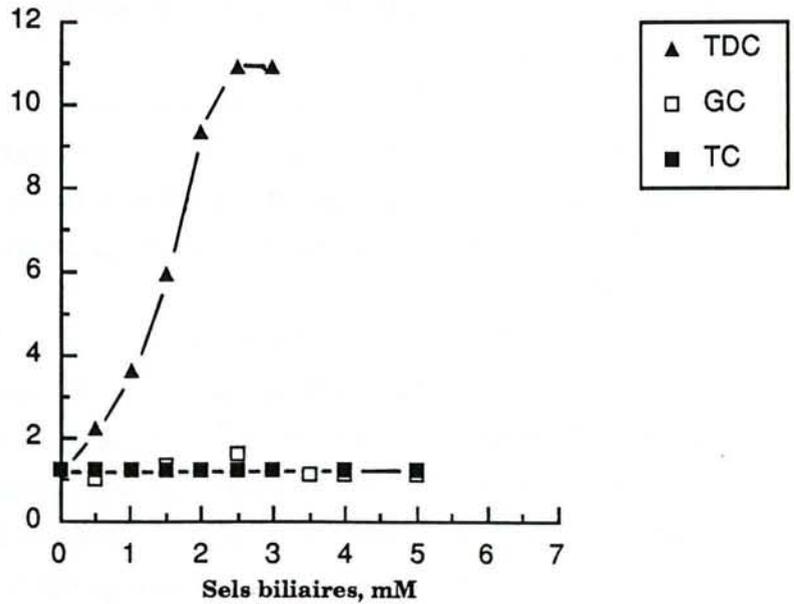
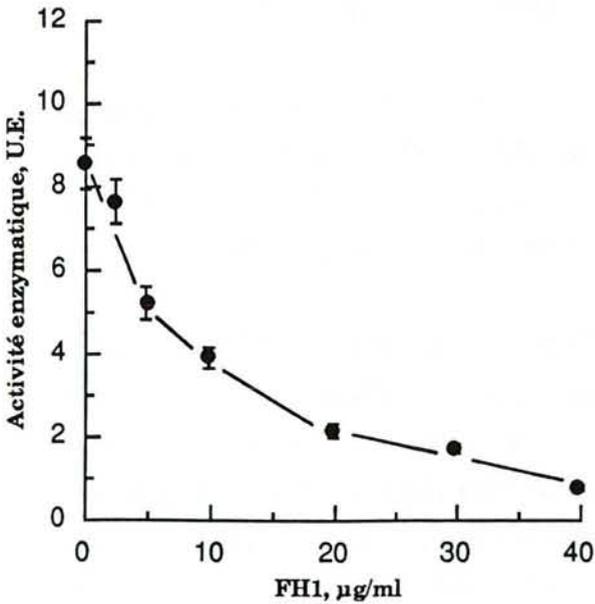
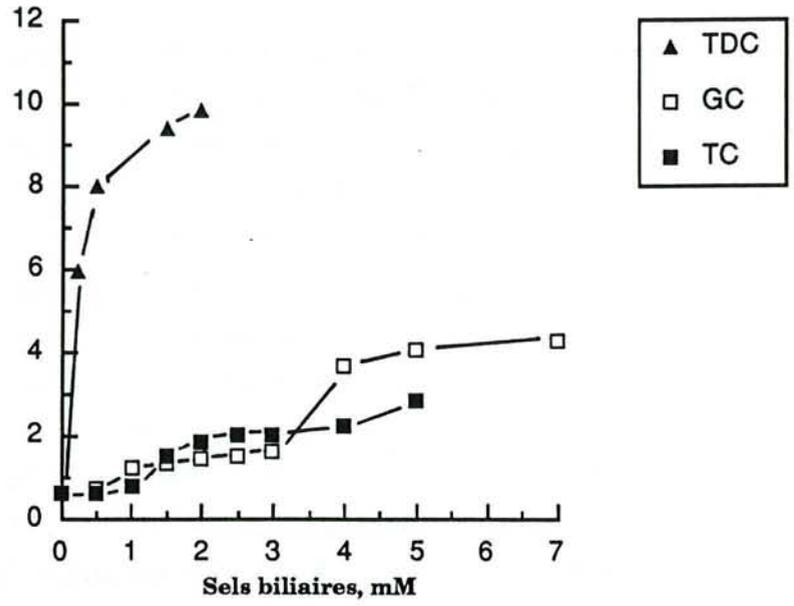
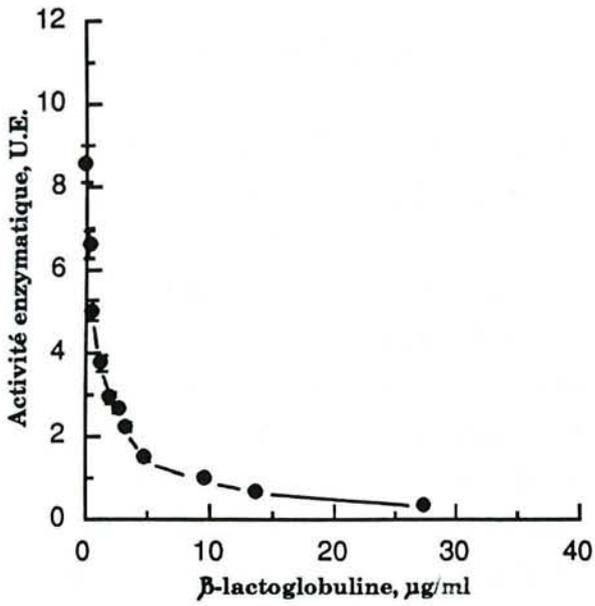
Pour obtenir un effet similaire avec les autres protéines testées par GARGOURI *et al* (1984) (réduction de 50% de l'activité lipolytique), il faut multiplier les valeurs de  $I_{50}$  (exprimées en  $\mu\text{M}$ ) d'un facteur 10 environ. Seule la melittine inhibe la réaction de façon comparable à la  $\beta$ -lactoglobuline.

Dans notre étude concernant les fractions de protéose-peptones, il nous est difficile d'exprimer les valeurs de  $I_{50}$  en molarité, car chaque fraction est caractérisée par plusieurs masses moléculaires. Nous exprimons donc les  $I_{50}$  en  $\mu\text{g}$  de protéines par ml.

Ainsi, par FPLC, en utilisant un gradient par paliers, nous obtenons quatre fractions classées en deux catégories : les fractions FA et FH2 qui ont une action négligeable sur l'activité lipolytique (figure 66) et les fractions FB et FH1 qui inhibent la LPP avec des  $I_{50}$  comparables et respectivement de 7,0 et 7,4  $\mu\text{g/ml}$  (figures 67 et 68 a ; tableau 19).

Si l'on décompose FB en sous-fractions F9 (qui contient  $\beta$ -CN-5P avec une bonne pureté) et F10 (voir chapitre 1), on constate que l'efficacité de ces deux fractions à inhiber la LPP est relativement faible ( $I_{50}$  multipliés par un facteur 3 pour F9 et par un facteur 4 pour F10 par rapport à FB) (figure 68 b). Le pouvoir inhibiteur de FB incomberait alors à la présence dans cette fraction d'une partie du composant-3, qui est principalement présente dans les fractions F5 à F8 et dénommée PP3a. La partie PP3b, qui est présente en faible quantité dans la fraction F10 pourrait jouer un rôle dans la faible inhibition de cette fraction.

Cependant  $\beta$ -CN-5P obtenu avec une bonne pureté électrophorétique n'est pas un activateur de la LPP dans nos conditions expérimentales mais agit plutôt comme un inhibiteur. Le rôle inhibiteur de la lipolyse du lait de bufflesse par une fraction



**Figure 67.** Inhibition de l'activité enzymatique de la LPP (1  $\mu\text{g/ml}$ ) à l'interface de l'émulsion tributyrine/eau par la  $\beta$ -lactoglobuline et par FH1. Effet de doses croissantes de sels biliaries sur l'activité du système LPP/colipase (1/10) en présence de 30  $\mu\text{g/ml}$  de  $\beta$ -lactoglobuline ou de 30  $\mu\text{g/ml}$  de FH1. TDC : acide taurodéoxycholique ; GC : acide glycocholique ; TC : acide taurocholique.

de  $\beta$ -CN-5P a été également mis en évidence par RAM et JOSHI (1989). Cette fraction inhibe cependant moins efficacement la lipolyse que la fraction composant-3. Il semble donc, au vu de ces observations, que l'effet activateur observé par CARTIER *et al* (1990), concernant la fraction non hydrophobe des protéose-peptones enrichie en composé  $\beta$ -CN-5P ne soit pas dû à ce dernier.

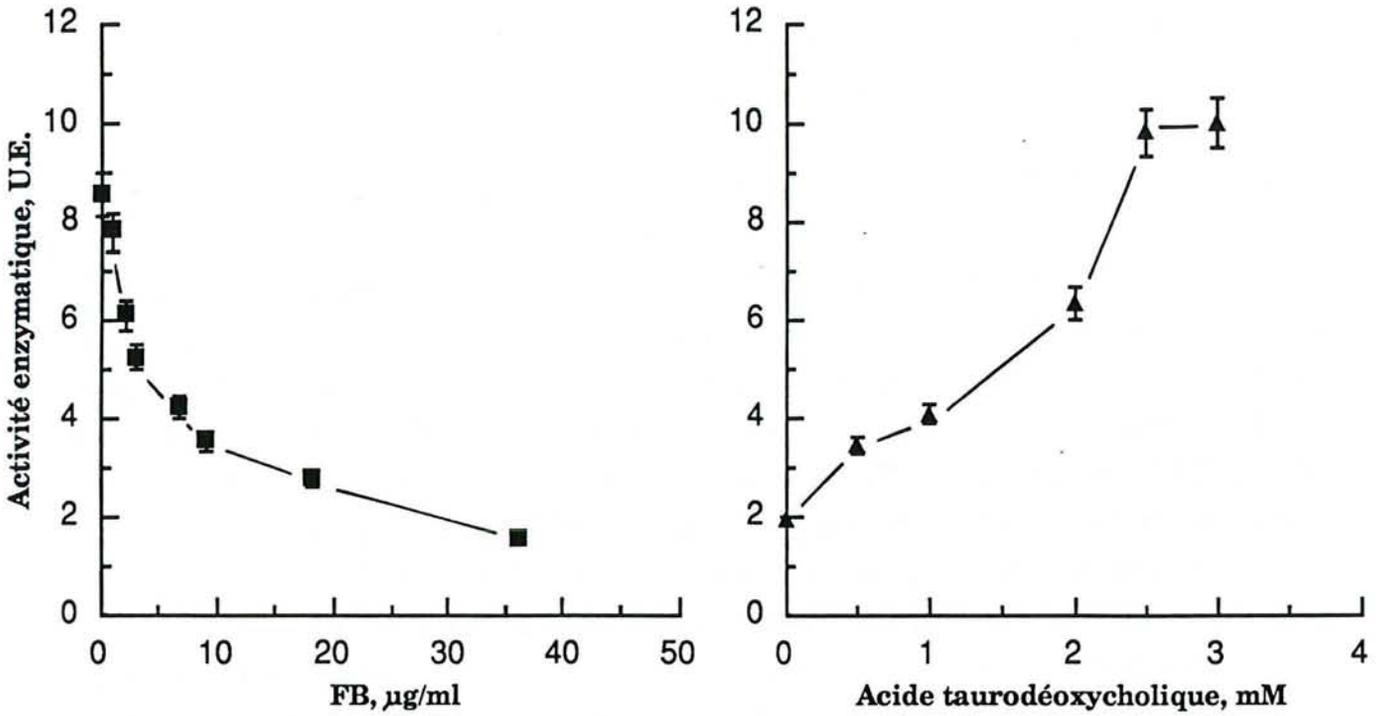
Les fractions FH1 et FH2 correspondent respectivement aux fractions de PAQUET *et al* (1988) HA2 et HA1 issues de la purification de FHPP par chromatographie d'hydroxyapatite. La fraction HA1, qui n'a pas d'affinité pour l'hydroxyapatite, n'inhibe pas l'hydrolyse d'une émulsion d'huile de soja (Intralipide) par la LPL (CARTIER *et al*, 1990), mais au contraire active la réaction. Dans nos conditions expérimentales, la fraction FH2, analogue à HA1, n'inhibe pas la LPP. Cependant, on ne constate pas d'effet stimulateur. La fraction FH1, et son analogue HA2, inhibent respectivement les activités de la LPP et de la LPL.

Il est intéressant de noter qu'une seule étape de FPLC-IH est suffisante pour préparer la fraction inhibitrice FH1, alors qu'avec la méthode classique, deux étapes de dix heures chacune environ (chromatographies d'interactions hydrophobes et d'hydroxyapatite) étaient requises pour obtenir HA2.

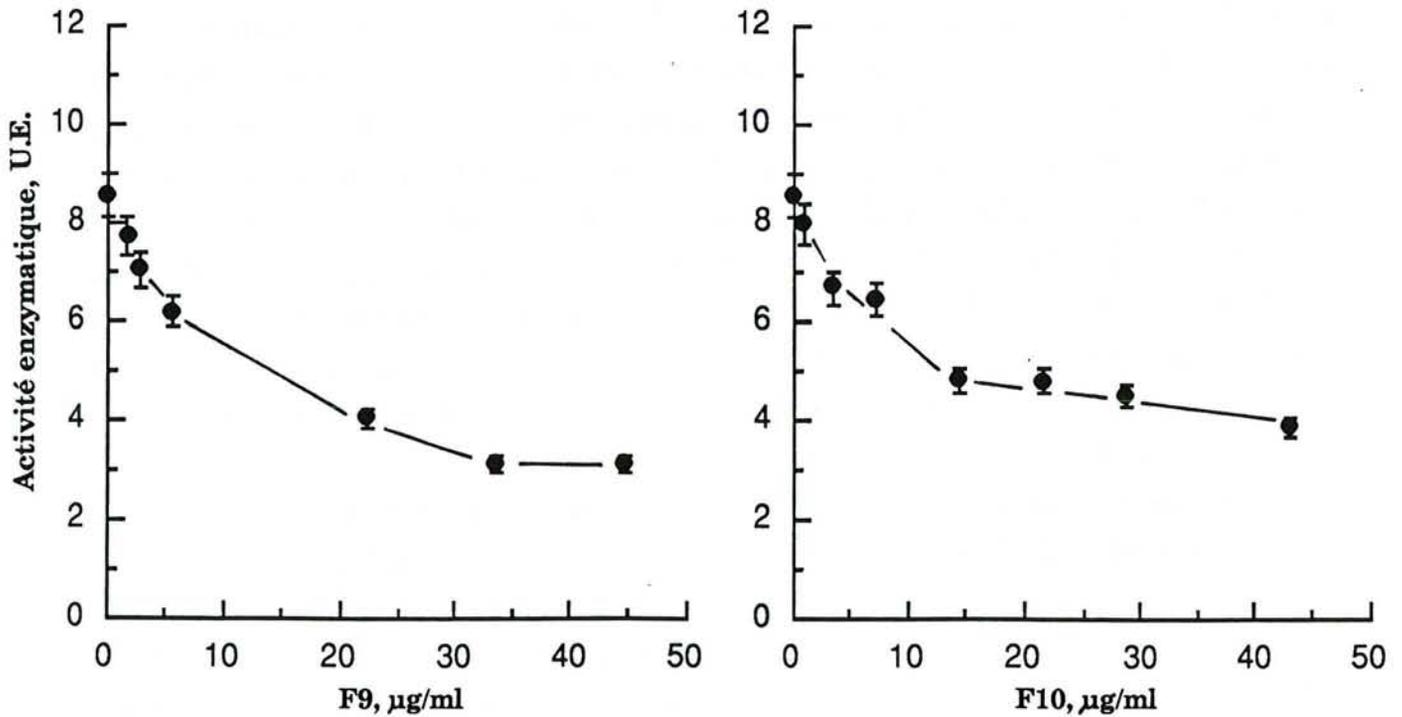
L'action inhibitrice de FH1 sur l'activité lipolytique peut être renforcée après séparation de la fraction par chromatographie d'affinité sur concanavaleine A (figure 69). Le pouvoir inhibiteur de FH1<sup>+</sup> est en effet comparable à celui de la  $\beta$ -lactoglobuline ( $I_{50} = 3,9 \mu\text{g/ml}$ ) tandis que la fraction non affine FH1<sup>-</sup> voit son action diminuer ( $I_{50} = 9,7 \mu\text{g/ml}$ ) par rapport à la fraction FH1. Il y aurait donc une relation entre le pouvoir inhibiteur et le taux et la nature des oligosaccharides de glycoprotéines de FH1. Ces oligosaccharides joueraient donc un rôle au niveau de la capacité de FH1 à pénétrer un film lipidique et à modifier la qualité interfaciale.

Après désialylation, FH1d conserve à peu près le même  $I_{50}$  puisqu'il est de  $8,2 \mu\text{g/ml}$ . Si les acides sialiques sont importants pour la stabilité de la conformation des glycoprotéines de FH1 (voir chapitre 2), leur clivage ne modifie pas significativement le pouvoir inhibiteur de FH1, ou encore le pouvoir de pénétration de FH1 à l'interface.

En l'absence de protéine inhibitrice, l'addition des deux sels biliaires tels que l'acide taurodéoxycholique (TDC) ou taurocholique (RATHELOT *et al*, 1975b), activent le système LPP-colipase. Dans nos conditions d'expérience, la stimulation est maximale avec 3 mM de TDC (augmentation de presque 150% de l'activité enzymatique) en présence de colipase en excès de dix fois (mole à mole) par rapport à la LPP (figure 65 b). Pour des molarités élevées en TDC (5 mM) le système LPP-colipase est toujours activé. Cependant, RATHELOT *et al* (1975b) montrent qu'en l'absence de colipase, l'enzyme est fortement inhibée par des concentrations de TDC



**Figure 68 a.** Inhibition de l'activité enzymatique de la LPP (1 µg/ml) à l'interface de l'émulsion tributyrine/eau par la fraction FB. Effet de doses croissantes d'acide taurodéoxycholique sur l'activité du système LPP/colipase (1/10) en présence de 30 µg/ml de FB.



**Figure 68 b.** Inhibition de l'activité enzymatique de la LPP (1 µg/ml) à l'interface de l'émulsion tributyrine/eau par les fractions F9 et F10.

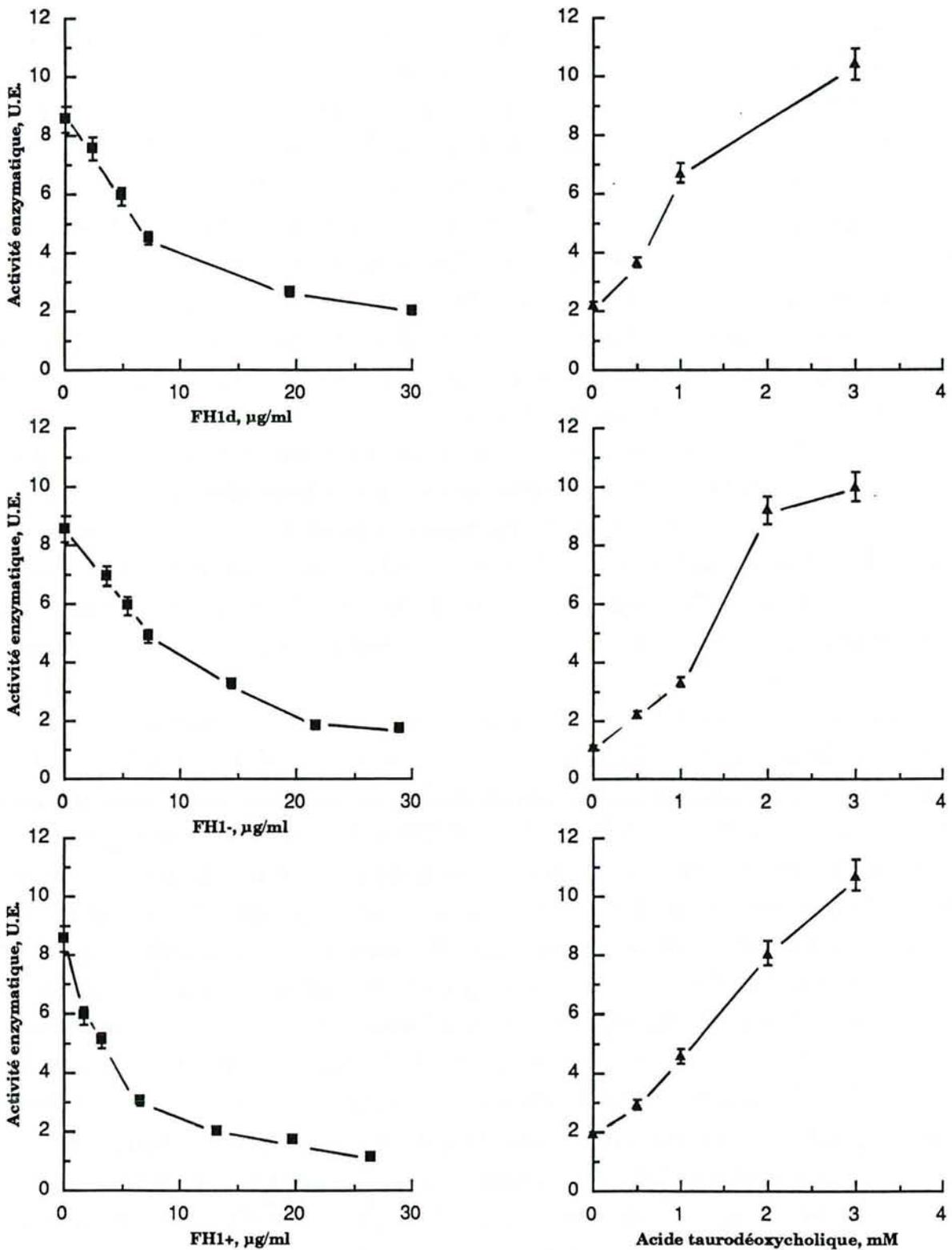
supérieures à 2 mM (voir introduction). La colipase stabilise donc la LPP à l'interface huile/eau en présence de ces agents tensio-actifs.

GARGOURI *et al* (1984) utilisent cette propriété afin de montrer le mécanisme des protéines inhibitrices. Lorsque l'enzyme est inhibée par la  $\beta$ -lactoglobuline, l'addition de colipase en excès et de quantité croissante de TDC restaure rapidement l'activité, et 1 mM de cet agent tensio-actif est suffisant pour retrouver pleinement l'activité après désorption complète de la  $\beta$ -lactoglobuline. Pour des concentrations supérieures à 1 mM, l'action catalytique de l'enzyme est même légèrement stimulée (figure 67). Cette observation rejoint notre expérience préliminaire qui montre, qu'en absence de protéine, des concentrations supérieures à 1 mM de TDC activent le système LPP-colipase.

Les expériences réalisées avec les fractions de protéose-peptones inhibitrices (FB, FH1, FH1d, FH1<sup>+</sup>, FH1<sup>-</sup>) montrent toutes une restauration de l'activité après ajout de TDC (figures 67, 68 a et 69). Cependant, l'allure des courbes de réactivation présente dans tous les cas un point d'inflexion, qui n'existait pas dans le cas de la  $\beta$ -lactoglobuline. Ceci traduit une plus grande difficulté à désorber les glycoprotéines de l'interface. L'activité est en effet pleinement retrouvée pour des concentrations supérieures à 2 mM.

Une autre expérience montre la forte affinité des glycoprotéines pour les surfaces lipidiques. Lorsque l'on remplace le TDC par l'acide taurocholique (TC) ou glycocholique (GC), agents moins tensio-actifs, on constate que, dans le cas de l'inhibition par la  $\beta$ -lactoglobuline, ces sels biliaires restaurent presque 50% de l'activité pour des concentrations élevées et supérieures à 5 mM (avec présence d'un point d'inflexion sur la courbe de réactivation), alors que dans le cas de FH1, ils n'ont aucune influence sur l'adhérence des glycoprotéines à l'interface (figure 67). Les composants de FH1 ont donc une plus forte affinité pour la surface des gouttelettes lipidiques de tributyrine que la  $\beta$ -lactoglobuline. Le fort pouvoir tensio-actif de TDC est dû seulement à l'absence d'un hydroxyle en position 7 par rapport à TC (figure 70). La nature de la fonction acide ( $\text{SO}_3^-$  et  $\text{COO}^-$ ) n'a pas d'influence notable, le pH de l'expérience (pH 8) étant très éloigné des pK de ces fonctions.

La faculté d'adsorption des composants glycoprotéiques de FH1 a déjà été mise en évidence avec une émulsion d'huile de soja (SHIMIZU *et al*, 1989). Après incubation d'une solution de protéose-peptones totales avec l'émulsion, les protéines adsorbées sont isolées et extraites avec une solution de méthanol-chloroforme (rapport 1/2, v/v) puis caractérisées par HPLC en phase inverse et par PAGE-SDS. Il ressort que c'est essentiellement la sous-unité de 30 kDa (correspondant à notre sous-unité 29 kDa) qui s'adsorbe à l'interface.



**Figure 69.** Inhibition de l'activité enzymatique de la LPP (1  $\mu\text{g/ml}$ ) à l'interface de l'émulsion tributyrine/eau par les fractions FH1d, FH1<sup>-</sup> et FH1<sup>+</sup>. Effet de doses croissantes d'acide taurodéoxycholique sur l'activité du système LPP/colipase (1/10) en présence de 30  $\mu\text{g/ml}$  de FH1d, 30  $\mu\text{g/ml}$  de FH1<sup>-</sup> et 20  $\mu\text{g/ml}$  de FH1<sup>+</sup>.

Le faible pouvoir de pénétration de la  $\beta$ -lactoglobuline est également mis en évidence dans le cas de la lipase gastrique humaine (GARGOURI *et al*, 1987). En effet, la LGH s'adsorbe très fortement à la surface d'un film lipidique de dicaprine et n'est nullement inhibée par la  $\beta$ -lactoglobuline.

De la même manière, on peut penser que le composant-3, et notamment la sous-unité 29 kDa affine pour la ConA, possède un fort pouvoir d'insertion à la surface des MGG du lait, tandis que la  $\beta$ -lactoglobuline interagit beaucoup plus faiblement avec les MGG. Cette hypothèse est renforcée d'une part par l'origine membranaire probable du composant-3 (NEJJAR *et al*, 1986), et d'autre part par les travaux de CARTIER et CHILLIARD (1986) puis de CARTIER *et al* (1990) montrant que l'inhibition de la lipolyse spontanée d'un lait par des fractions de lait écrémé chauffé (60°C, 30 min) incombe à la présence de composant-3 dans ces fractions.

Le pouvoir tensio-actif d'une protéine peut donc se dissocier en deux paramètres : la capacité d'adsorption à une interface et la modification de la qualité interfaciale (tension superficielle, compétition avec la lipase). Si la  $\beta$ -lactoglobuline inhibe un peu plus efficacement la lipolyse dans un système modèle que FH1<sup>+</sup>, son utilisation semble peu appropriée pour enrayer la lipolyse spontanée d'un lait, du fait de sa faible adsorption sur les MGG.

Afin de parfaire cette étude, il est important de montrer que les constituants de FH1 n'interagissent pas de façon directe avec la LPP. GARGOURI *et al* (1984) affirment que d'après les études par filtration sur gel, les protéines qu'ils ont testées n'interagissent pas avec la LPP en solution. Dans nos travaux, nous utilisons la spectrofluorimétrie, méthode plus sensible que la filtration sur gel, afin de déterminer si FH1 interagit avec la LPP ou non. Dans une autre étude, il a été montré que lorsque des protéines du lait s'agrègent entre elles par interactions hydrophobes suite à un traitement thermique, on observe une diminution du taux d'ANS fixé sur les agrégats comparativement au taux d'ANS fixé sur les protéines natives non agrégées (BONOMI *et al*, 1988 ; PAGLIARINI *et al*, 1990). De même, nous avons pensé appliquer cette étude à notre cas bien particulier de l'interaction entre la LPP et le composant-3.

Le principe consiste à doser les sites de la LPP accessibles à l'ANS en absence puis en présence de FH1 (ou de FH1d). Aux valeurs de longueur d'onde  $\lambda_{EX} = 280$  nm et  $\lambda_{EM} = 472$  nm, on peut considérer comme négligeable l'émission de fluorescence de l'ANS fixé sur FH1 (ou FH1d), par rapport à celle de l'ANS fixé sur la LPP (figure 71). On peut donc doser sélectivement la fluorescence émise par l'ANS lié aux sites hydrophobes accessibles de la LPP et cela en présence de FH1.

Ainsi, la courbe 1/fluorescence en fonction de 1/ANS montre que la valeur de  $F_{max}$  (4,32 U.A./ $\mu$ g LPP) reste inchangée lorsque l'enzyme est seule ou en présence

**Tableau 19 : Concentrations protéiques (I<sub>50</sub>) qui provoquent 50% d'inactivation de la lipase pancréatique porcine.**

	I <sub>50</sub> (µg/ml)
β-Lactoglobuline	1,1 ± 0,2
FH1	7,4 ± 0,4
FH1d	8,2 ± 0,4
FH1+	3,9 ± 0,3
FH1-	9,7 ± 0,4
FB	7,0 ± 0,4
F9	20,0 ± 2
F10	31,0 ± 3

de FH1d ou de FH1 (figure 72). Les valeurs des constantes de dissociation varient de façon significative. En absence d'effecteur,  $K_{dLPP}$  est de  $0,11 \mu M$ . Cette valeur augmente en présence de FH1 ( $0,24 \mu M$ ) et elle est encore plus importante en présence de FH1d ( $0,38 \mu M$ ). Ce dernier point coïncide avec le fait que FH1d a une meilleure affinité pour l'ANS que FH1 (voir chapitre 2), et donc diminue encore plus l'affinité de la LPP pour l'ANS.

Ainsi, la détermination des constantes  $F_{max}$  et  $K_d$  montre d'une part que la LPP rentre en compétition avec FH1 et FH1d pour la fixation de l'ANS, et d'autre part, que les sites hydrophobes de la LPP accessibles ne sont jamais masqués par la présence des fractions glycoprotéiques. Ainsi, nous montrons que :

- 1- les glycoprotéines de FH1 n'interagissent pas directement avec la LPP en solution ;
- 2- elles possèdent un fort pouvoir d'adsorption à une interface huile/eau ;
- 3- elles modifient la qualité de la surface et inhibent l'activité lipolytique, soit en désorbant la LPP, soit en rendant moins accessible le substrat tributyrrique au site actif de l'enzyme.

Ce dernier point reste plus délicat à déterminer. GARGOURI *et al* (1984) proposent d'utiliser la technique en film monomoléculaire et de marquer radioactivement la lipase afin de pouvoir estimer la proportion d'enzyme relarguée dans le volume après ajout d'inhibiteurs tensio-actifs.

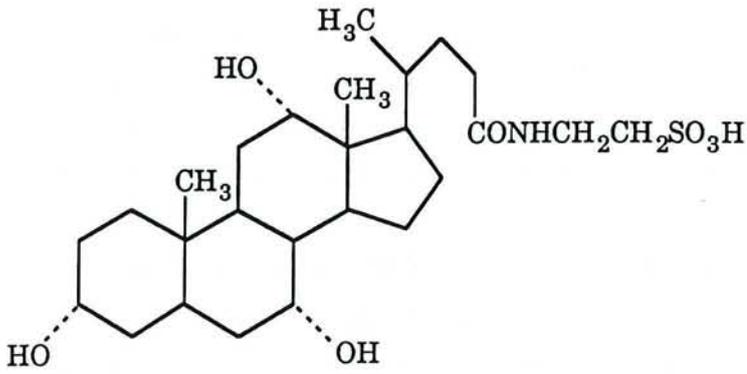
D'autres méthodes peuvent être envisagées ; nous pensons notamment à la mesure de l'anisotropie de fluorescence de la LPP qui nous permettrait de mieux appréhender l'interaction lipide-protéine (HOUBRE *et al*, 1990). L'anisotropie  $A$  est définie par la relation :

$$A = \frac{F_{\parallel} - F_{\perp}}{F_{\parallel} + 2 F_{\perp}}$$

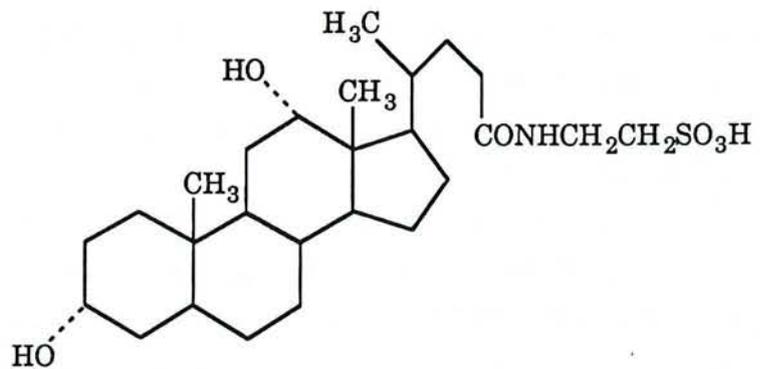
où  $F_{\parallel}$  et  $F_{\perp}$  sont respectivement les fluorescences émises par la molécule excitée parallèlement et perpendiculairement au rayon laser pulsé incident.

L'anisotropie reflète donc le degré de liberté d'une molécule et des différences seraient enregistrées entre la LPP adsorbée à l'interface et peu mobile et la LPP désorbée et en rotation libre en solution aqueuse.

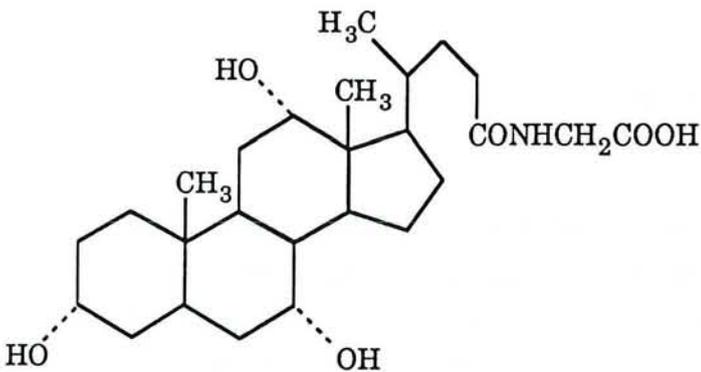
## Acide Taurocholique



## Acide Taurodéoxycholique



## Acide Glycocholique



**Figure 70.** Formules chimiques des trois sels biliaires utilisés : acide taurocholique, acide taurodéoxycholique et acide glycocholique.

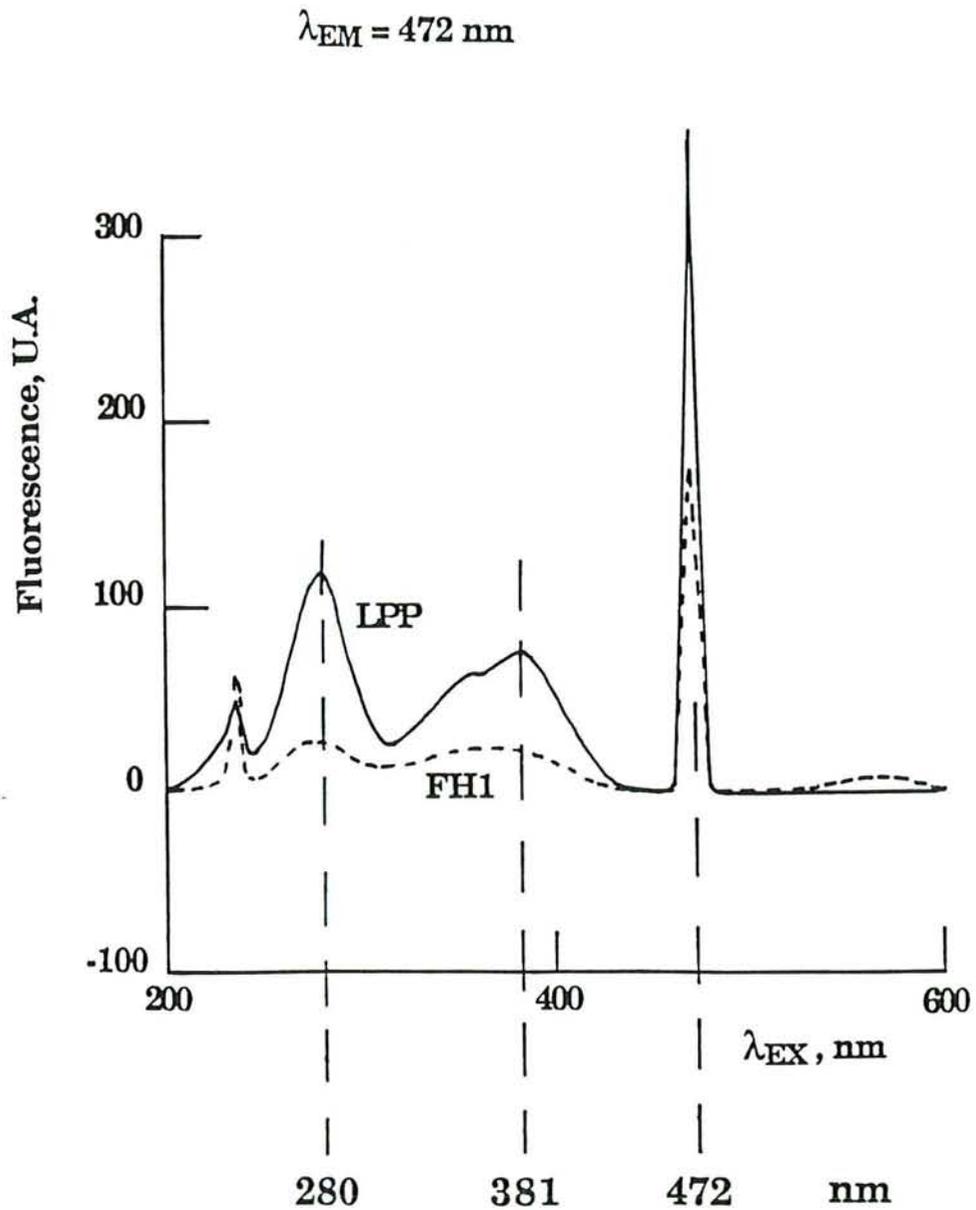
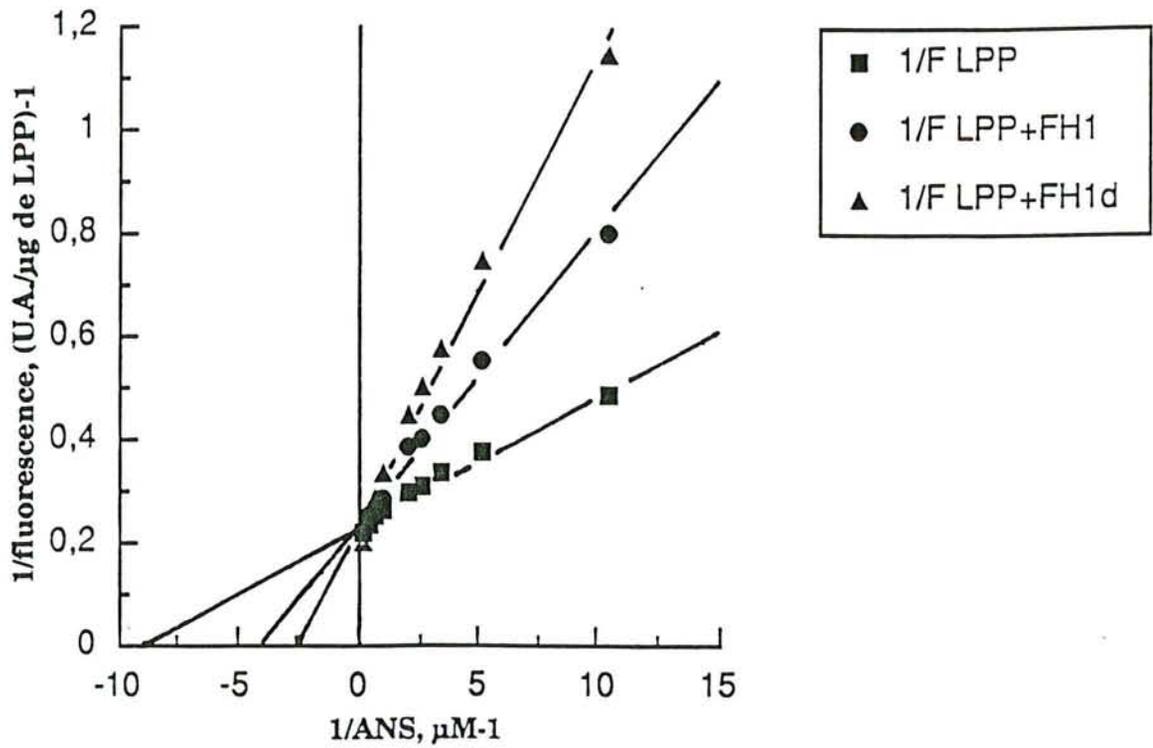


Figure 71. Spectres de fluorescence de l'ANS fixé sur la LPP ou sur les protéines de FH1 en fonction de la longueur d'onde d'excitation ( $\lambda_{EX}$ ). La longueur d'onde d'émission ( $\lambda_{EM}$ ) est fixée à 472 nm.



**Figure 72.** Détermination des constantes  $K_d$  et  $F_{max}$  de l'ANS fixé sur la LPP seule, en présence de FH1 ou de FH1d.  $F_{max} = 4,32$  U.A./ $\mu$ g LPP ;  $K_d(LPP) = 0,11$   $\mu$ M ;  $K_d(LPP+FH1) = 0,24$   $\mu$ M ;  $K_d(LPP+FH1d) = 0,38$   $\mu$ M.

## 2.2- Activité estérasique de la LPP en phase homogène : influence de la fraction hydrophobe des protéose-peptones.

Nous avons transposé la méthode de dosage de l'activité lipolytique dans le lait à notre étude (CHOUKRI, 1991). La LPL (QUINN *et al*, 1982), tout comme la LPP (De CARO *et al*, 1986), hydrolysent les esters solubles dans l'eau comme le PNPA ou le PNPB. La cinétique suit une réaction de premier ordre. Notre enzyme LPP hydrolyse le PNPB avec des constantes cinétiques  $K_M = 0,59 \text{ mM}$  et  $V_M = 0,19 \mu\text{M}$  de paranitrophénol (PNP) libéré par minute par mg de LPP (figure 74 a). La constante d'affinité est proche de celle donnée par la littérature pour la LPL ( $K_M = 0,52 \text{ mM}$  selon SHIRAI et JACKSON, 1982).

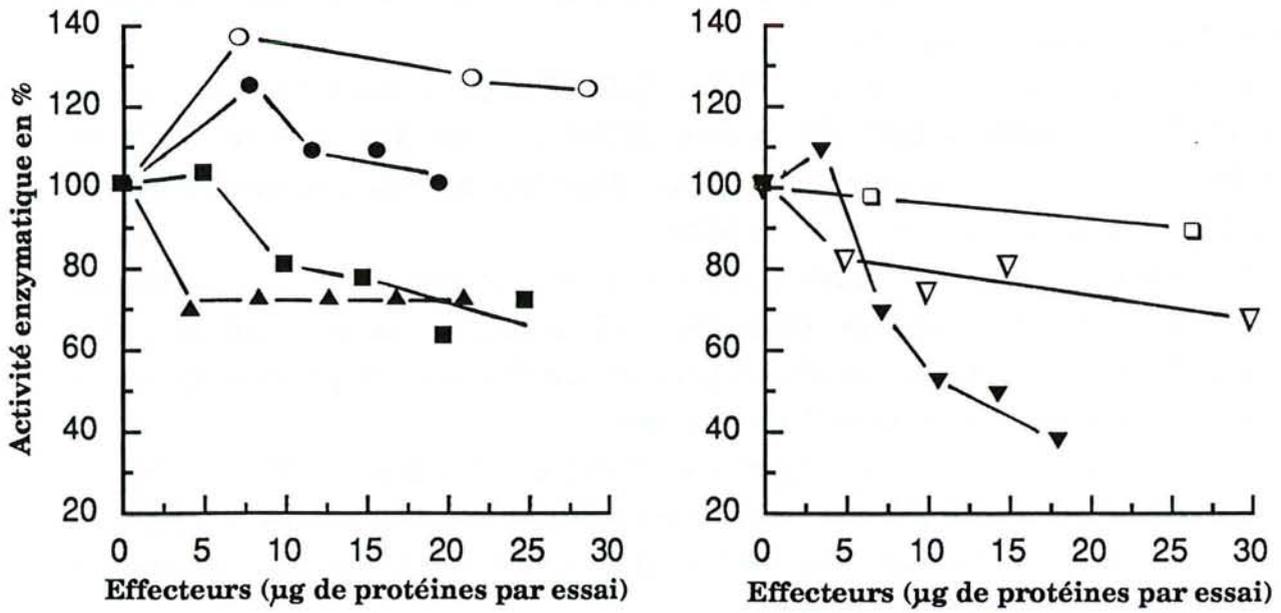
En ce qui concerne le substrat PNPA, QUINN *et al* (1982) rapportent que le  $K_M$  de la LPL est doublé ( $= 1,03 \text{ mM}$ ) et De CARO *et al* (1986) déterminent un  $K_M$  de  $0,41 \text{ mM}$  pour la LPP. Les deux enzymes ont donc une affinité presque identique pour le PNPB mais différentes pour le PNPA.

Le rapport E/S (1/4300 mole/mole) nous est en fait imposé par les conditions expérimentales. En effet, lorsque l'on augmente la concentration en substrat ( $> 1,5 \text{ mM}$ ), le milieu réactionnel se trouble en présence de fractions de protéose-peptones et la lecture au spectrophotomètre devient difficile.

Dans nos conditions ainsi optimisées, l'effet des fractions PPT, F9, FH1 et FH1d ont été testées sur l'activité de la LPP en milieu soluble, ainsi que l'effet de protéines majeures du lait (caséine, SAB et  $\beta$ -lactoglobuline). On peut distinguer trois groupes d'effecteurs (figure 73) :

- 1- la caséine et la SAB, qui activent l'hydrolyse du PNPB, avec un effet important dans le cas de la SAB ;
- 2- les fractions qui inhibent faiblement la réaction (activité résiduelle supérieure à 70%). C'est le cas des fractions PPT, F9, FH1d et de la  $\beta$ -lactoglobuline. Cette dernière n'a d'ailleurs presque pas d'influence sur l'hydrolyse du PNPB ;
- 3- la fraction FH1 qui inhibe l'apparition du PNP de façon significative (jusqu'à 80% d'inhibition pour des quantités de FH1 supérieures à  $30 \mu\text{g/essai}$ ). Les représentations graphiques selon Lineweaver et Burk (figure 74 a), d'une part, et selon Dixon (figure 74 b), d'autre part, montrent que FH1 inhibe l'hydrolyse du PNPB de manière compétitive apparente, avec une constante d'inhibition  $K_I = 10,9 \mu\text{g}$  de protéines/essai.

Le diéthyl p-nitrophénylphosphate inhibe compétitivement l'hydrolyse de la tributyrine ou trioléine émulsifiées, en se fixant sur le résidu Ser152 du site actif (MOREAU *et al*, 1991) de façon stoechiométrique (1:1). Cependant, suite aux études



**Figure 73.** Influence de quantités croissantes de fractions PPT ( ■ ), F9 ( ▲ ), FH1 ( ▼ ) et FH1d ( ▽ ) et de protéines lactières β-lactoglobuline ( □ ), SAB ( ○ ) et caséine ( ● ) sur l'activité enzymatique de la LPP (10 μg/ml). Conditions expérimentales : pH 7,6, 37°C, LPP/PNPB = 1/4300, lecture 420 nm.

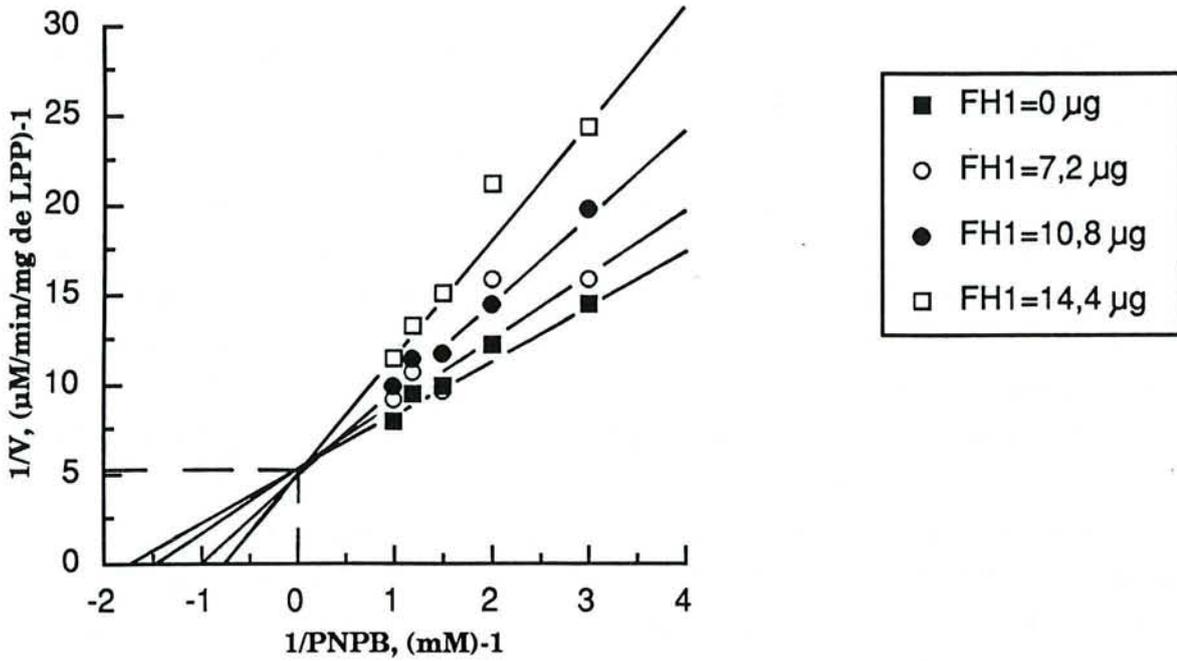
spectrofluorimétriques, on ne peut pas conclure que les constituants de FH1 interagissent avec l'enzyme au niveau du site actif.

L'hypothèse retenue serait que les constituants de FH1 entrent en compétition avec l'enzyme LPP pour l'adsorption du substrat. Le PNPB, contenant dans sa formule chimique un groupement phényle et une chaîne aliphatique (C4) hydrophobes, pourrait interagir à la manière de l'ANS avec les sites hydrophobes accessibles des constituants de FH1. Dans le cas de FH1d, le faible pouvoir inhibiteur apparent serait dû à une affinité moins grande du PNPB pour FH1d, suite à la redistribution des sites hydrophobes à la surface des constituants. Notre hypothèse est appuyée par trois constatations :

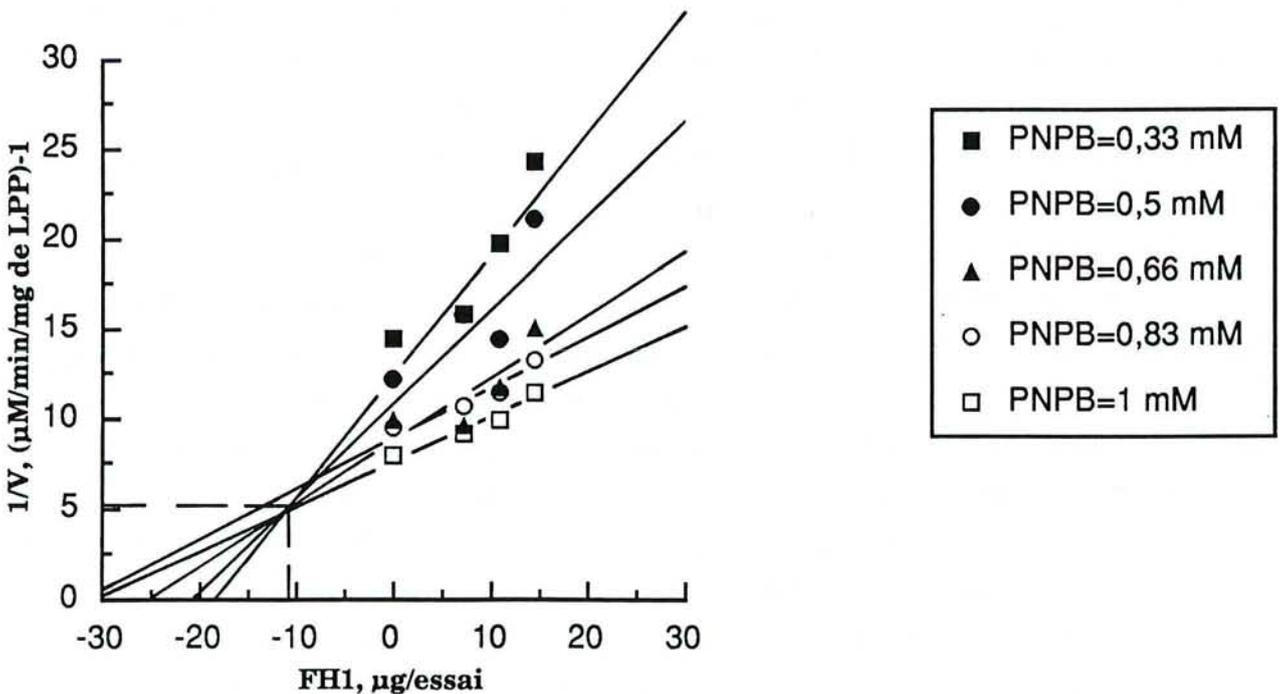
- 1- effet compétitif entre la fraction FH1 et la LPP pour le PNPB décrit ci-dessus ;
- 2- diminution de l'ANS lié à FH1 lorsque l'on ajoute du PNPB dans le milieu, traduit par une baisse légère de l'indice  $F_{\max}/K_d$  de FH1 (résultats non montrés) ;
- 3- interaction du PNPB avec d'autres protéines comme la SAB, qui est capable de l'hydrolyser.

Ce dernier point mérite d'être développé. De CARO *et al* (1986) ont constaté que la SAB avait une réactivité particulièrement élevée avec le PNPA. Ce "substrat" se fixe sur les sites hydrophobes de la protéine, qui jouent normalement un rôle dans le transport des acides gras. Il s'agit là d'un comportement inhabituel de la protéine. Nous avons voulu déterminer ce qu'il en était avec le PNPB (figure 75). Alors que les constantes d'affinité sont du même ordre de grandeur ( $K_M = 9,32$  mM pour le PNPA et  $K_M = 2,60$  mM pour le PNPB), les constantes de vitesse diffèrent d'un facteur 10 ( $V_M = 0,119$   $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  SAB pour le PNPA et  $V_M = 0,0117$   $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  SAB pour le PNPB). La SAB hydrolyse donc le PNPB mais plus difficilement que le PNPA. Ceci pourrait expliquer l'activation apparente de la LPP en présence de SAB dans notre expérience.

En ce qui concerne l'hydrolyse du PNPA par la LPP, De CARO *et al* (1986) montrent que le PNPA est en fait hydrolysé par le fragment C-terminal 336-449 de la lipase obtenu par hydrolyse chymotrypsique de l'enzyme. Ce peptide ne contient pas la triade Asp176/Ser152/His263 (WINKLER *et al*, 1990) du site catalytique. Ce fait explique pourquoi le diéthyl p-nitrophénylphosphate inhibe l'hydrolyse de la tributyrine émulsifiée par interaction avec le site actif mais pas l'hydrolyse du PNPA (pas d'interaction avec la région C-terminale) (WINKLER *et al*, 1990 ; MOREAU *et al*, 1991). Par ailleurs, le faible  $K_M$ , de l'ordre du mM, que nous avons déterminé (0,59 mM) reflète la faible affinité de la région C-terminale de la LPP par le PNPB. Une bonne affinité d'un site actif pour son substrat est généralement donnée par des valeurs de  $K_M$  de l'ordre du  $\mu\text{M}$ .



**Figure 74 a.** Représentation selon Lineweaver et Burk de l'hydrolyse du PNPB par la LPP ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) en présence de différentes quantités de FH1. Les constantes cinétiques sont  $K_M = 0,59 \text{ mM}$  et  $V_M = 0,19 \mu\text{M PNPB}/\text{min}/\text{mg LPP}$ .



**Figure 74 b.** Représentation selon Dixon de l'hydrolyse du PNPB par la LPP ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) en fonction de quantités croissantes de FH1. Les constantes cinétiques sont  $V_M = 0,19 \mu\text{M PNPB}/\text{min}/\text{mg LPP}$  et  $K_I = 10,9 \mu\text{g FH1}/\text{essai}$ .

### 3- Conclusion.

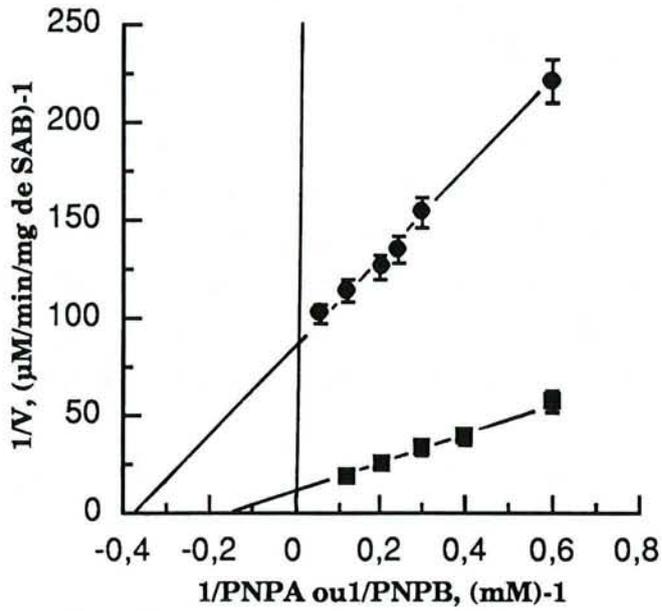
Afin d'étudier le mécanisme d'inhibition des lipases à sérine par les protéines, le choix d'un système modèle adéquat est essentiel. Nous déconseillons l'emploi d'une méthode utilisant un substrat soluble comme le PNPB. Ce composé est très instable en présence de protéines et peut être hydrolysé par un autre site que le site actif de l'enzyme (cas du PNPA). De plus, en milieu soluble, l'enzyme n'est pas sous sa conformation optimale pour hydrolyser les liaisons ester.

Nous conseillons par contre l'emploi de méthodes faisant appel à des émulsions ou des films monomoléculaires plus proches de la situation *in vivo* (c'est à dire dans le lait). Dans ces conditions, nous montrons que le composant-3 s'adsorbe à l'interface huile/eau et modifie la qualité interfaciale ; il en résulte une inhibition de la lipase, due soit à une mauvaise orientation du site actif par rapport au substrat, soit à une désorption de l'enzyme. En présence de colipase, les sels biliaires désorbent le composant-3 de la surface et l'enzyme peut retrouver toute son activité.

Le composant-3 doit sans doute posséder au moins un site de reconnaissance interfaciale à la manière de la lipase ou de la colipase (VERGER, 1984). Plusieurs constatations vont dans ce sens :

- hydrophobicité de surface importante mise en évidence par FPLC-IH, malgré la présence de glycannes ;
- origine membranaire du composant-3 ;
- forte affinité pour la surface de l'émulsion tributyrine/eau ;
- forte affinité pour le PNPB et pour l'ANS.

Afin de parfaire cette étude, il reste à vérifier que le mécanisme d'inhibition est identique avec la lipoprotéine lipase. Pour ce faire, il nous est nécessaire d'optimiser au préalable un protocole de purification de l'enzyme à partir du lait. Des travaux dans ce sens sont actuellement en cours dans notre laboratoire.



**Figure 75.** Hydrolyse du PNPA ( ■ ) et du PNPB ( ● ) par la SAB (66,6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Représentation selon Lineweaver et Burk. Les constantes cinétiques sont  $K_M(\text{PNPB}) = 2,60 \text{ mM}$  ;  $V_M(\text{PNPB}) = 0,0117 \mu\text{M PNPB}/\text{min}/\text{mg SAB}$  ;  $K_M(\text{PNPA}) = 9,32 \text{ mM}$  ;  $V_M(\text{PNPA}) = 0,119 \mu\text{M PNPA}/\text{min}/\text{mg SAB}$ .



# **CONCLUSION GENERALE**

### Conclusion générale.

Actuellement, le composant-3 des protéose-peptones n'est pas identifié de façon précise. Beaucoup d'ambigüités demeurent au niveau de ses propriétés physico-chimiques et chimiques. Nous nous sommes proposés d'approfondir les connaissances sur ce complexe glycoprotéique.

En associant les deux techniques séparatives hautement résolutive que sont la FPLC-IH et la PAGE-2D, nous avons préparé une fraction "composant-3" hydrophobe. Ce composant se révèle complexe. Il est constitué par trois sous-unités principales de masses moléculaires moyennes de 29, 19 et 11 kDa et dont les points isoélectriques sont compris dans un intervalle de pH de 4,9 à 6,1.

Les sous-unités présentent une variabilité au niveau du nombre de charges. Notamment, la sous-unité de 29 kDa est constituée d'au moins sept variants isoélectriques. Nous avons montré que les acides sialiques sont en partie responsables des différences de charge de la sous-unité de 29 kDa. Ces résidus glycaniques participent également à la stabilité de la structure du complexe glycoprotéique.

Ce complexe est formé d'agrégats de masses moléculaires supérieures à 100-200 kDa. L'agrégation est une propriété native du composant-3, que nous avons mise en évidence dans le lait non chauffé ; elle n'est pas due au traitement thermique.

L'étude de la partie glycanique du composant-3 révèle que ce dernier est porteur d'une structure lactosaminique biantennée et N-glycosidiquement liée à la chaîne polypeptidique. Cependant, le complexe glycoprotéique contient une proportion importante d'oligosaccharides non liés de façon covalente à la partie protéique. La structure du fucosyl-lacto-N-tétraose a été mise en évidence. La présence de ces oligosaccharides adsorbés est responsable de la teneur élevée en glucides du composant-3 (17%) et contribue à augmenter l'hétérogénéité de ce dernier.

La technique récente d'électrophorèse micropréparative à haute performance (HPEC) nous a permis d'isoler les sous-unités 19 et 29 kDa. Leur structure primaire est actuellement en cours de séquençage et nous permettra de répondre aux questions :

- la sous-unité de 19 kDa est-elle un produit d'hydrolyse de la sous-unité 29 kDa ?
- Ces deux sous-unités correspondent-elles à des fragments N-terminaux de la butyrophiline libérés par action du système protéolytique plasminogène/plasmine à la surface des membranes des globules gras ?

Actuellement, nos investigations structurales se poursuivent sur deux voies : la détermination précise de la structure lactosaminique de type complexe et la détermination de la structure primaire des chaînes polypeptidiques des deux sous-unités de 19 et 29 kDa.

Pour ce faire, il nous semble nécessaire de simplifier le modèle d'étude, qui présente une grande hétérogénéité. Nous proposons de procéder comme suit :

- préparation du composant-3 à partir d'un lait d'une seule vache de phénotype connu ;
- élimination des oligosaccharides adsorbés (utilisation de détergents dans les techniques préparatives) ;
- isolement des sous-unités de 19 et de 29 kDa (notamment par la technique HPEC) ;
- clivage enzymatique des structures N-glycosidiques (dans le cas de la détermination de la structure primaire en acides aminés).

Par ailleurs, nous avons montré que, dans un système émulsifié, l'inhibition de la lipolyse par le composant-3 n'était pas due à une interaction directe entre ce dernier et la lipase, mais résultait d'un changement de la qualité de l'interface huile/eau de l'émulsion provoqué par l'adsorption du composant-3. Ce changement résulte en une baisse importante de l'activité de la lipase due, soit à une orientation défavorable du site actif de l'enzyme vis-à-vis du substrat, soit à une désorption de la lipase de la surface.

Il peut être intéressant d'exploiter cette propriété du composant-3 pour stabiliser certains laits ou produits laitiers susceptibles à la dégradation spontanée de la matière grasse. Pour cela, nous cherchons à mettre au point une méthode simple de préparation industrielle d'une fraction enrichie en composant-3. A ce titre, l'ultrafiltration nous semble être une technique prometteuse, car efficace, simple et bon marché. De plus, le composant-3 peut être extrait à partir d'une matière première de faible coût (lactosérum, jus lactosé).

# **BIBLIOGRAPHIE**

**Bibliographie.**

- ABOUAKIL N. et LOMBARDO D., 1989. Inhibition of human milk bile-salts activator effect. *Biochim. Biophys. Acta*, **1004** : 215-220.
- AHRNE L. et BJORCK L., 1985. Effect of the lactoperoxidase system on lipoprotein lipase activity and lipolysis in milk. *J. Dairy Res.*, **52** : 513-520.
- ALICHANIDIS E. et MICHAELIDOU A.-M., 1990. Glycoproteins in the heat- and acid-stable fraction of ovine milk. *J. Dairy Res.*, **57** : 507-515.
- ALLINGTON W.B., CORDRY A.L., Mac CULLOUGH G.A., MITCHELL D.E. et NELSON J.W., 1978. Electrophoretic concentration of macromolecules. *Anal. Biochem.*, **85** : 188-196.
- AMINOFF D., GATHMANN W.D., Mac LEAN C. et YADOMAE T., 1980. Quantitation of oligosaccharides released by the  $\beta$ -elimination reaction. *Anal. Biochem.*, **101** : 44-53.
- ANDERSON M., 1981. Inhibition of lipolysis in bovine milk by proteose-peptone. *J. Dairy Res.*, **48** : 247-252.
- ANDERSON B.F., BAKER H.M., NORRIS G.E., RICE D.W. et BAKER E.N., 1989. Structure of human lactoferrin : crystallographic structure analysis and refinement at 2,8 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **209** : 711-734.
- ANDREWS A.T., 1978a. The composition, structure and origin of proteose-peptone component 5 of bovine milk. *Eur. J. Biochem.*, **90** : 59-65.
- ANDREWS A.T., 1978b. The composition, structure and origin of proteose-peptone component 8F of bovine milk. *Eur. J. Biochem.*, **90** : 67-71.
- ANDREWS A.T., 1979. The formation and structure of some proteose-peptone components. *J. Dairy Res.*, **46** : 215-218.
- ANDREWS A.T., 1981. Detection and measurement by the electrophoretic pattern of peptides produced by caseinolysis. In *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed, vol 5, ed H.U. Bergmeyer, New-York Academic Press, New-York, p 277-285.

- ANDREWS A.T. et ALICHANIDIS E., 1983. Proteolysis of caseins and the proteose-peptone fraction of milk. *J. Dairy Res.*, **50** : 275-290.
- ANDREWS A.T., TAYLOR M.D. et OWEN A.J., 1985. Rapid analysis of bovine milk proteins by fast protein liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **348** : 177-185.
- ARNAUD P., GIANAZZA E., RIGHETTI P.G. et FUDENBERG H.H., 1980. The role of sialic acids in the microheterogeneity of alpha-1 acid glycoprotein : study by isoelectric focusing and titration curves. In *Electrophoresis'79*, ed B.J. Radola, W. De Gruyter, Berlin, p 151-163.
- ARVINTE T., SCHULZ B., CUDD A. et NICOLAU C., 1989. Low-pH association of proteins with the membranes of intact red blood cells. I. Exogenous glycophorin and the CD4 molecule. *Biochim. Biophys. Acta*, **981** : 51-60.
- ASCHAFFENBURG R., 1946. Surface activity and proteins of milk. *J. Dairy Res.*, **14** : 316-329.
- BACHMAN K.C. et WILCOX C.J., 1990. Effect of blood and high density lipoprotein preparations upon lipase distribution and spontaneous lipolysis in bovine milk. *J. Dairy Sci.*, **73** : 3393-3401.
- BALASUBRAMANYA N.N., BHAVADASAN M.K. et NARYANAN K.M., 1988. Lipolysis of milk fat in cream. *Indian J. Dairy Sci.*, **41** : 269-273.
- BARFORD R.A., SLIWINSKI B.J., BREYER A.C. et ROTHBART H.L., 1982. Mechanism of protein retention in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **235** : 281-288.
- BEIS A. et LAZOU A., 1990. Removal of artifactual bands associated with the presence of 2-mercaptoethanol in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **190** : 57-59.
- BENJAMIN T., NIU C.-H., HUGGETT A.C., YU B., ROLLER P.P. et THORGEIRSSON S.S., 1989. Direct N-terminal sequence analysis of rat liver plasma membrane glycoproteins separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, **10** : 447-455.
- BERKOWITZ S.A. et HENRY M.P., 1987. Use of high-performance hydrophobic interaction chromatography for the determination of salting-out conditions of proteins. *J. Chromatogr.*, **389** : 317-321.

BEZKOROVAINY A., 1967. Physical and chemical properties of bovine milk and colostrum whey M-1 glycoproteins. *J. Dairy Sci.*, **50** : 1368-1375.

BEZKOROVAINY A., NICHOLS J.H. et SLY D.A., 1976. Proteose-peptone fractions of human and bovine milk. *Int. J. Biochem.*, **7** : 639-645.

BHATTACHARYYA L. et BREWER C.F., 1988. Lectin-carbohydrate interactions. Studies of the nature of hydrogen bonding between D-galactose and certain D-galactose-specific lectins, and between D-mannose and concanavaline A. *Eur. J. Biochem.*, **176** : 207-212.

BLAKESLEY R.W. et BOEZI J.A., 1977. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250. *Anal. Biochem.*, **82** : 580-582.

BONOMI F., IAMETTI S., PAGLIARINI E. et PERI C., 1988. A spectrofluorimetric approach to the estimation of the surface hydrophobicity modifications in milk proteins upon thermal treatment. *Milchwissenschaft*, **43** : 281-285.

BOURNE Y., ROUGE P. et CABBILLAU C., 1990. X-ray structure of a ( $\alpha$ -Man(1-3) $\beta$ -Man(1-4)GlcNAc)-lectin complex at 2,1-Å resolution. The role of water in sugar-lectin interaction. *J. Biol. Chem.*, **265** : 18161-18165.

BRUNNER J.R. et THOMPSON M.P., 1961. Characteristics of several minor-protein fractions isolated from bovine milk. *J. Dairy Sci.*, **44** : 1224-1237.

BUCHHEIM W., 1986. Membranes of milk fat globules - Ultrastructural biochemical and technological aspects. *Kiel. Milchwirt. Forschungs.*, **38** : 227-246.

CANIONI P., JULIEN R., RATHELOT J. et SARDA L., 1976. Inhibition of sheep pancreatic lipase activity against emulsified tributyrin by non-ionic detergents. *Biochimie*, **58** : 751-753.

CARTIER P. et CHILLIARD Y., 1986. Effects of different skim milk fractions on activity of cow milk purified lipoprotein lipase. *J. Dairy Sci.*, **69** : 951-955.

CARTIER P. et CHILLIARD Y., 1989. Lipase redistribution in cows'milk during induced lipolysis. I. Activation by agitation, temperature change, blood serum and heparin. *J. Dairy Res.*, **56** : 699-709.

CARTIER P., CHILLIARD Y. et BOUT J., 1989. Lipase redistribution in cow's milk during induced lipolysis. II. Activation by milk pH adjustment. *J. Dairy Res.*, **56** : 711-718.

CARTIER P., CHILLIARD Y. et CHAZAL M.P., 1984. Dosage de l'activité lipasique et des acides gras libres par titration automatique colorimétrique. *Lait*, **64** : 340-355.

CARTIER P., CHILLIARD Y. et PAQUET D., 1990. Inhibiting and activating effects of skim milks and proteose-peptone fractions on spontaneous lipolysis and purified lipoprotein lipase activity in bovine milk. *J. Dairy Sci.*, **73** : 1173-1177.

CASTBERG H.B. et SOLBERG P.G., 1975. Tributyrates as a substrate for the estimation of lipase activity in milk. *J. Dairy Res.*, **42** : 247-253.

CASTBERG H.B., EGELRUD T., SOLBERG P. et OLIVECRONA T., 1975. Lipases in bovine milk and the relationship between the lipoprotein lipase and tributyrates hydrolysing activities in cream and skim-milk. *J. Dairy Res.*, **42** : 255-266.

CHAPLIN L.C., 1986. Hydrophobic interaction fast protein liquid chromatography of milk proteins. *J. Chromatogr.*, **363** : 329-335.

CHENG Q., BLACKETT P., JACKSON K.W., McCONATHY W.J. et WANG C.-S., 1990. C-terminal domain of apolipoprotein CII as both activator and competitive inhibitor of lipoprotein lipase. *Biochem. J.*, **269** : 403-407.

CHILLIARD Y., 1982. Variations physiologiques des activités lipasiques et de la lipolyse spontanée dans les laits de vache, de chèvre et de femme : revue bibliographique. *Lait*, **62** : 1-31 et 126-154.

CHILLIARD Y. et LAMBERET G., 1984. La lipolyse dans le lait : les différents types, mécanismes, facteurs de variation, signification pratique. *Lait*, **64** : 554-578.

CHILLIARD Y., SELSELET-ATTOU G., BAS P. et MORAND-FEHR P., 1984. Characteristics of lipolytic system in goat milk. *J. Dairy Sci.*, **67** : 2216-2223.

CHOUKRI A., 1991. Contrôle rapide de la qualité du lait et des produits laitiers : utilisation du réactif de transparisation pour la détermination d'activités enzymatiques et l'appréciation des traitements thermiques. Thèse de Biochimie Appliquée de l'Université de Nancy I.

CLARK D.C., SMITH L.J. et WILSON D.R., 1988. A spectroscopic study of the conformational properties of foamed bovine serum albumin. *J. Colloid. Interface Sci.*, **121** : 136-147.

CLEGG R.A., 1980. Activation of milk lipase by serum proteins : possible role in the occurrence of lipolysis in raw bovine milk. *J. Dairy Res.*, **47** : 61-70.

CODDEVILLE B., STRATIL A., WIERUSZESKI J.-M., STRECKER G., MONTREUIL J. et SPIK G., 1989. Primary structure of horse serotransferrin glycans. *Eur. J. Biochem.*, **186** : 583-590.

CODDEVILLE B., STRECKER G., WIERUSZESKI J.M., SPIK G., VLIAGENTHART J.F.G., Van HALBEEK H., PETER-KATALINIC J. et EGGE H., 1992. Heterogeneity of bovine lactotransferrin glycans characterization of  $\alpha$ -Gal-(1-3)- $\beta$ -Gal and  $\alpha$ -NeuAc-(2-6)- $\beta$ -GalNAc-(1-4)- $\beta$ -GlcNAc substituted N-linked glycans. *Carbohydr. Res.*, accepté pour publication.

COSTA O., BRIOLAY J. et MONIER J.C., 1987. Improvement of light sensitive staining of immunoblots for routine analysis. *Path. Biol.*, **35** : 1095-1098.

DEBRAY H. et MONTREUIL J., 1991. Lectin affinity chromatography of glycoconjugates. In *Advances in Lectin Research*, vol 4, ed H. Franz, Verlag Gesundheit GmbH Berlin, p 51-96.

DERVICHIAN D.G., 1971. Méthode d'étude des réactions enzymatiques sur une interface. *Biochimie*, **53** : 25-34.

De CARO J., BOUDOUARD M., BONICEL J., GUIDONI A., DESNUELLE P. et ROVERY M., 1981. Porcine pancreatic lipase. Completion of the primary structure. *Biochim. Biophys. Acta*, **671** : 129-138.

De CARO J.D., ROUIMI P. et ROVERY M., 1986. Hydrolysis of p-nitrophenylacetate by the peptide chain fragment (339-449) of porcine pancreatic lipase. *Eur. J. Biochem.*, **158** : 601-607.

De HAAS G.H., DIJMAN R., RANSAC S. et VERGER R., 1990. Competitive inhibition of lipolytic enzymes. IV. Structural details of acylamino phospholipid analogues important for the potent inhibitory effects on pancreatic phospholipase A2. *Biochim. Biophys. Acta*, **1046** : 249-257.

DICCIANI M.B., LILLY-STAUDERMAN M., McLEAN L.R., BALASUBRAMANIAM A. et HARMONY J.A.K., 1991. Heparin prevents the binding of phospholipase A2 to phospholipid micelles : importance of the amino-terminus. *Biochemistry*, **30** : 9090-9097.

DODIUK H., KANETY H. et KOSOWER E.M., 1979. The apomyoglobin-arylaminonaphthalenesulfonate system. Insight into fluorescent probe responses by substituent modulation. *J. Phys. Chem.*, **83** : 515-521.

DULANEY J.T., 1979. Binding interactions of glycoproteins with lectins. *Mol. Cell. Biochem.*, **21** : 43-63.

EDGE A.S.B. et SPIRO R.G., 1987. Selective deglycosylation of the heparan sulfate proteoglycan of bovine glomerular basement membrane and identification of the core protein. *J. Biol. Chem.*, **262** : 6893-6898.

EIGEL W.N., 1981. Identification of proteose-peptone component 5 as a plasmin-derived fragment of bovine  $\beta$ -casein. *Int. J. Biochem.*, **13** : 1081-1086.

EIGEL W.N. et KEENAN T.W., 1979. Identification of proteose-peptone component 8-Slow as a plasmin-derived fragment of bovine  $\beta$ -casein. *Int. J. Biochem.*, **10** : 529-535.

EIGEL W.N., BUTLER J.E., ERNSTROM C.A., FARRELL Jr H.M., HARWALKAR V.R., JENNESS R. et Mac WHITNEY R., 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk : fifth revision. *J. Dairy Sci.*, **67** : 1599-1631.

ETIENNE L., 1990. Les protéose-peptones du lait bovin. Nouvelles techniques de fractionnement et recherche d'activité bifidigène. D.E.A. de Microbiologie-Enzymologie-Nutrition, Nancy I.

FARRAR G.H., HARRISON R. et MOHANNA N. A., 1980. Comparison of lectin receptors on the surface of human and bovine milk fat globule membranes. *Comp. Biochem. Physiol.*, **67B**, 265-270.

FIAT A.-M., JOLLES P., 1989. Caseins of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides : structural and physiological aspects. *Mol. Cell. Biochem.*, **87** : 5-30.

FOURNET B., MONTREUIL J., STRECKER G., DORLAND L., HAVERKAMP J., VLIAGENTHART J.F.G., BINETTE J.P. et SCHMID K., 1978. Determination of the primary structures of 16 asialo-carbohydrate units derived from human plasma  $\alpha_1$ -acid glycoprotein by 360-MHz  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and permethylation analysis. *Biochemistry*, **17** : 5206-5214.

FRANK R.N. et RODBARD D., 1975. Precision of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the molecular weight estimation of a membrane glycoprotein : studies on bovine rhodopsin. *Arch. Biochem. Biophys.* **171** : 1-13.

- FRANKE W.W., HEID H.W., GRUND C., WINTER S., FREUDENSTEIN C., SCHMID E., JARASCH E.-D. et KEENAN T.W., 1981. Antibodies to the major insoluble milk fat globule membrane-associated protein : specific location in apical regions of lactating epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, **89** : 485-494.
- GARGOURI Y., JULIEN R., BOIS A.G., VERGER R. et SARDA L., 1983. Studies on the detergent inhibition of pancreatic lipase activity. *J. Lipid Res.*, **24** : 1336-1342.
- GARGOURI Y., JULIEN R., SUGIHARA A., VERGER R. et SARDA L., 1984. Inhibition of pancreatic and microbial lipases by proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **795** : 326-331.
- GARGOURI Y., MOREAU H. et VERGER R., 1989. Gastric lipases : biochemical and physiological studies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1006** : 255-271.
- GARGOURI Y., PIERONI G., FERRATO F. et VERGER R., 1987. Human gastric lipase. A kinetic study with dicaprin monolayers. *Eur. J. Biochem.*, **169** : 125-129.
- GARGOURI Y., PIERONI G., RIVIERE C., SUGIHARA A., SARDA L. et VERGER R., 1985. Inhibition of lipases by proteins. *J. Biol. Chem.*, **260** : 2268-2273.
- GENDLER S.J., BURCHELL J.M., DUHIG T., LAMPORT D., WHITE R., PARKER M. and TAYLOR-PAPADIMITRIOU J., 1987. Cloning of partial cDNA encoding differentiation and tumor-associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84** : 6060-6064.
- GENDLER S.J., TAYLOR-PAPADIMITRIOU J., DUHIG T., ROTHBARD J. et BURCHELL J., 1988. A high immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats. *J. Biol. Chem.*, **263** : 12820-12823.
- GENG X., GUO L. et CHANG J., 1990. Study of the retention mechanism of proteins in hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr.*, **507** : 1-23.
- GERKEN T.A., BUTENHOF K.J. et SHOGREN R., 1989. Effects of glycosylation on the conformation and dynamics of O-linked glycoproteins : carbon-13 NMR studies of ovine submaxillary mucin. *Biochemistry*, **28** : 5536-5543.

- GOLDBERG M., THOMAS D. et LEGOY M.-D., 1990. The control of lipase-catalysed transesterification and esterification reaction rates. Effects of substrate polarity, water activity and water molecules on enzyme activity. *Eur. J. Biochem.*, **190** : 603-609.
- GOLDMAN R., 1990. Dependence on  $\text{Ca}^{2+}$  of lipoprotein lipase stability. *J. Leukocyte Biol.*, **48** : 193-199.
- GREENWALT D.E. et MATHER I.H., 1985. Characterization of an apically derived epithelial membrane glycoprotein from bovine milk, which is expressed in capillary endothelia in diverse tissues. *J. Cell. Biol.*, **100** : 397-408.
- GRIFFIN H., 1986. Does vitellogenin inhibit lipoprotein lipase in the laying hen ? *Comp. Biochem. Physiol.*, **85B** : 469-472.
- GRIMMONPREZ L., 1977. Les glucides du lait de femme. *Med. et Nut.*, **13** : 343-348.
- GRONBERG G., LIPNIUNAS P., LUNDGREN T., LINDH F. et NILSSON B., 1990. Isolation and structural analysis of three new disialylated oligosaccharides from human milk. *Arch. Biochem. Biophys.*, **278** : 297-311.
- HAGRASS A.E.A., ASKER A.A., HAFEZ S.H. et SHEHATA A.E., 1983. Some factors affecting the nitrogen distribution of Friesian cow's milk. *Ann. Agric. Sci. Ain Shams Univ.*, **28** : 1429-1444.
- HANNAN Y., Le GOFF D., FRILOUX L. et NOUVELOT A., 1990. Effets des sels minéraux sur l'activité de la lipoprotéine lipase du lait de vache in vitro. *Lait*, **70** : 45-53.
- HAYASHI R., TAJIMA S. et YAMAMOTO A., 1986. Purification and characterisation of lipoprotein lipase from human postheparin plasma and its comparison with purified bovine milk lipoprotein lipase. *J. Biochem.*, **100** : 319-331.
- HAYES D.G. et GULARI E., 1990. Esterification reactions of lipase in reverse micelles. *Biotechnol. Bioeng.*, **35** : 793-801.
- HEID H.W., WINTER S., BRUDER G., KEENAN T.W. et JARASCH E.-D., 1983. Butyrophilin, an apical plasma membrane-associated glycoprotein characteristic of lactating mammary glands of diverse species. *Biochim. Biophys. Acta*, **728** : 228-238.

- HILLIER R.M., 1976. The quantitative measurement of whey proteins using polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Res.*, **43** : 259-265.
- HOFMANN C.J., KEENAN T.W. et EIGEL W.N., 1979. Association of plasminogen with bovine milk fat globule membrane. *Int. J. Biochem.*, **10** : 909-917.
- HOLLOSI M., PERCZEL et FASMAN G.D., 1990. Cooperativity of carbohydrate moiety orientation and  $\beta$ -turn is determined by intramolecular hydrogen bonds in protected glycopeptide models. *Biopolymers*, **29** : 1549-1564.
- HOUBRE D., SCHINDLER P., TRIFILIEFF E., LUU B. et DUPORTAIL G., 1990. Selectivity of lipid-protein interaction with myelin proteolipids PLP and DM-20. A fluorescence anisotropy study. *Biochim. Biophys. Acta*, **1029** : 136-142.
- HSIA J.C., WONG L.T., TAN C.T., ER S.S., KHAROUBA S., BALASKAS E., TINKER D.O. et FELDHOFF R.C., 1984. Bovine serum albumin : characterization of a fatty acid binding site on the N-terminal peptic fragment using a new spin label. *Biochemistry*, **23** : 5930-5932.
- HUSTON G.E. et PATTON S., 1990. Factors related to the formation of cytoplasmic crescents on milk fat globules. *J. Dairy Sci.*, **73** : 2061-2066.
- IMAM A., LAURENCE D.J.R. et NEVILLE A.M., 1981. Isolation and characterization of a major glycoprotein from milk-fat-globule membrane of human breast milk. *Biochem. J.*, **193** : 47-54.
- IMAN A., LAURENCE D.J.R. et NEVILLE A.M., 1982. Isolation and characterization of two individual glycoprotein components from human milk-fat-globule membranes. *Biochem. J.*, **207** : 37-41.
- IMPERIALI B. et SHANNON K.L., 1991. Differences between Asn-Xaa-Thr-containing peptides : a comparison of solution conformation and substrate behavior with oligosaccharyltransferase. *Biochemistry*, **30** : 4374-4380.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1962. Determination of the total nitrogen content of milk by the Kjeldahl method. FIL-IDF Standard 20.
- IVERIUS P.H., LINDAHL U., EGELRUD T. et OLIVECRONA T., 1972. Effects of heparin on lipoprotein lipase from bovine milk. *J. Biol. Chem.*, **247** : 6610-6616.
- IVERIUS P.H. et OSTLUND-LINDVIST A.M., 1976. Lipoprotein lipase from bovine milk. *J. Biol. Chem.*, **251** : 7791-7795.

- JACK L.J.W. et MATHER I.H., 1990. Cloning and analysis of cDNA encoding bovine butyrophilin, an apical glycoprotein expressed in mammary tissue and secreted in association with the milk-fat globule membrane during lactation. *J. Biol. Chem.*, **265** : 14481-14486.
- JELLEN P., 1973. Whipping studies with partially delactosed cheese whey. *J. Dairy Sci.*, **56** : 1505-1511.
- JENDRYCZKO A., DROZDZ M. et SKOP B., 1988. Bile salt-stimulated lipase and lipoprotein lipase activities in human breast milk : a longitudinal study. *Rev. Roum. Biochim.*, **25** : 31-34.
- JENNESS R., 1959. Characterization of milk serum protein component 5. *J. Dairy Sci.*, **42** : 895.
- JOHNSON V.G. et MATHER I.H., 1985. Monoclonal antibodies prepared against PAS-I butyrophilin and GP-55 from guinea-pig milk-fat-globule membrane bind specifically to the apical pole of secretory-epithelial cells in lactating mammary tissue. *Exp. Cell Res.*, **156** : 144-158.
- JOHNSON V.G., GREENWALT D.E., HEID H.W., MATHER I.H. et MADARA P.J., 1985. Identification and characterization of the principal proteins of fat-globule membrane from guinea-pig milk. *Eur. J. Biochem.*, **151** : 237-244.
- JOHNSON V.G., GREENWALT D.E., MADARA P.J. et MATHER I.H., 1988. Purification and characterization of a differentiation-specific sialoglycoprotein of lactating-guinea-pig mammary tissue. *Biochem. J.*, **251** : 507-514.
- KAMERLING J.P., GERWIG G.J., Vliegenthart J.F.G. et CLAMP J.R., 1975. Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochem. J.*, **151** : 491-495.
- KANNO C., 1986. Receptor proteins for concanavalin A and wheat germ agglutinin of bovine milk fat globule membrane probed by affinity chromatography in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Agric. Biol. Chem.*, **50** : 2997-3003.
- KANNO C., 1989a. Purification and separation of multiple forms of lactophorin from bovine milk whey and their immunological and electrophoretic properties. *J. Dairy Sci.*, **72** : 883-891.
- KANNO C., 1989b. Characterization of multiple forms of lactophorin isolated from bovine milk whey. *J. Dairy Sci.*, **72** : 1732-1739.

- KANNO C. et OGAWA H., 1989a. Proteolysis of lactophorin in skim milk by bovine milk indigenous proteinases. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, **60** : 797-806.
- KANNO C. et OGAWA H., 1989b. Proteolytic degradation of lactophorin from bovine milk by plasmin and trypsin. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, **60** : 865-873.
- KANNO C. et OHTAKE Y., 1981. Immunological and electrophoretic characteristics of anti-SGP reacting protein among component -3, -5 and -8 fractions of proteose-peptone of bovine milk : evidence for the multiple forms. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, **52** : 282-296.
- KANNO C. et YAMAUCHI K., 1978. Antigenic identity between the soluble glycoprotein of milk fat globule membrane and a heat-stable protein fraction of whey. *Agric. Biol. Chem.*, **42** : 1697-1705.
- KAPITANY R.A. et ZEBROWSKI E.J., 1973. A high resolution PAS stain for polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **56** : 361-369.
- KARMAN A.H. et Van BOEKEL M.A.J.S., 1986. Evaluation of the Kjeldahl factor for conversion of the nitrogen content of milk and milk products to protein content. *Neth. Milk Dairy J.*, **40** : 315-336.
- KATZENSTEIN G.E., VRONA S.A., WECHSLER R.J., STEADMAN B.L., LEWIS R.V. et MIDDAUGH C.R., 1986. Role of conformational changes in the elution of proteins from reversed-phase HPLC columns. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83** : 4268-4272.
- KEENAN T.W., HEID H.W., STADLER J., JARASCH E.-D. et FRANKE W.W., 1982. Tight attachment of fatty acids to proteins associated with milk lipid globule membrane. *Eur. J. Cell Biol.*, **26** : 270-276.
- KESTER J.J. et BRUNNER J.R., 1982. Milk fat-globule membrane as possible origin of proteose-peptone glycoproteins. *J. Dairy Sci.*, **65** : 2241-2252.
- KHATOON J.A. et JOSHI V.K., 1989. Physico-chemical characteristics of the proteose-peptone fraction from goat milk. I. Gel electrophoretic and filtration pattern. *Milchwissenschaft*, **42** : 236-237.
- KINNUNEN P.K.J., HUTTUNEN J.K. et EHNHOLM C., 1976. Properties of purified bovine milk lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Acta*, **450** : 342-351.

- KITAGAWA H., NAKADA H., FUKUI S., FUNAKOSHI I., KAWASAKI T. et YAMASHINA I., 1991. Novel oligosaccharides with the sialyl-Le<sup>a</sup> structure in human milk. *Biochemistry*, **30** : 2869-2876.
- KOLAR C.K. et BRUNNER J.R., 1969. Proteose-peptone fraction of bovine milk : distribution in the protein system. *J. Dairy Sci.*, **52** : 1541-1546.
- KOLAR C.K. et BRUNNER J.R., 1970. Proteose-peptone fraction of bovine milk : lacteal serum component 5 and 8-casein associated glycoproteins. *J. Dairy Sci.*, **53** : 997-1008.
- KUDZAL-SAVOIE S., 1980. Dosage des acides gras libres dans le lait et les produits laitiers. *Bull. Fed. Int. Lait.*, **118** : 56-69.
- LAEMMLI U.K. et FAVRE M., 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J. Mol. Biol.*, **80** : 575-599.
- LARSON B.L. et ROLLERI G.D., 1955. Heat denaturation of the specific serum proteins in milk. *J. Dairy Sci.*, **38** : 351-360.
- LAW B.A., SHARPE M.E. et CHAPMAN H.R., 1976. The effect of Gram-negative psychotrophs in stored milk on the development of rancidity in Cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, **43** : 459-468.
- LEE K.B., LOGANATHAN D., MERCHANT Z.M. et LINHARDT R.J., 1990. Carbohydrate analysis of glycoproteins. A review. *Applied Biochem. Biotech.*, **23** : 53-80.
- LORIENT D., CLOSS B. et COURTHAUDON J.L., 1991. Connaissances nouvelles sur les propriétés fonctionnelles des protéines du lait et des dérivés. *Lait*, **71** : 141-171.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** : 265-275.
- Mac PHERSON A.V. et KITCHEN B.J., 1983. Reviews of the progress of dairy science : the bovine milk fat globule membrane - its formation, composition, structure and behaviour in milk and dairy products. *J. Dairy Res.*, **50** : 107-133.
- MATHER I.H., BRUDER G., JARASCH E.-D., HEID H.W. et JOHNSON V.G., 1984. Protein synthesis in lactating guinea-pig mammary tissue perfused in vitro. II. Biogenesis of milk-fat-globule membrane proteins. *Exp. Cell. Res.*, **151** : 277-282.

MATHER I.H., WEBER K. et KEENAN T.W., 1977. Membranes of mammary gland. XII. Loosely associated proteins and compositional heterogeneity of bovine milk fat globule membrane. *J. Dairy Sci.*, **60** : 394-402.

MATI A., 1992. Les protéose-peptones dans les laits bovin, ovin et caprin. Isolement, caractérisation, origine et évolution de la fraction hydrophobe contenant le composant-3. Thèse de l'Université de Nancy I.

MATI A., GIRARDET J.M., XENAKIS D. et LINDEN G., 1991. Isolement et caractérisation de la fraction hydrophobe des protéose-peptones des laits bovin, ovin et caprin. *Lait*, **71** : 259-273.

MICLO L., DRIOU A., MELLET M., PERRIN E. et LINDEN G., 1991. Identification rapide par spectrométrie des peptides aromatiques issus de l'hydrolyse trypsique de la caséine  $\alpha_{S1}$  bovine. Colloque de la Société Française de Microbiologie et de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Palaiseau, France.

MILLS O.E. et CREAMER L.K., 1975. A conformational change in bovine  $\beta$ -lactoglobulin at low pH. *Biochim. Biophys. Acta*, **379** : 618-626.

MOMSEN W.E. et BROCKMAN H.L., 1976. Inhibition of pancreatic lipase B activity by taurodeoxycholate and its reversal by colipase. *J. Biol. Chem.*, **251** : 384-388.

MONTREUIL J., 1984. Spatial conformation of glycans and glycoproteins. *Biol. Cell*, **51** : 115-132.

MONTREUIL J., BOUQUELET S., DEBRAY H., FOURNET B., SPIK G. et STRECKER G., 1987. Glycoproteins. In *Carbohydrate Analysis. A Practical Approach*, ed M.F. Chaplin et J.F. Kennedy, IRL Press, Washington, p 143-204.

MOORE S. et STEIN W.H., 1963. Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. In *Methods in Enzymology*, vol VI, eds S.P. Colowick et N.O. Kaplan, Academic Press, New-York, p 819.

MOREAU H., MOULIN A., GARGOURI Y., NOEL J.-P. et VERGER R., 1991. Inactivation of gastric and pancreatic lipases by diethyl p-nitrophenyl phosphate. *Biochemistry*, **30** : 1037-1041.

MORLEY N.H. et KURSIS A., 1977. Lack of fatty acid specificity in the lipolysis of oligo and polyunsaturated triacylglycerols by milk lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Acta*, **487** : 332-342.

- MOROI M. et JUNG S.M., 1984. Selective staining of human platelet glycoproteins using nitrocellulose transfer of electrophoresed proteins and peroxidase-conjugated lectins. *Biochim. Biophys. Acta*, **798** : 295-301.
- MUSCI G. et BERLINER L.J., 1985. Probing different conformational states of bovine  $\alpha$ -lactalbumin : Fluorescence studies with 4,4'-Bis[1-(phenylamino)-8-naphthalenesulfonate]. *Biochemistry*, **24** : 3852-3856.
- NAKANO M., HATANAKA Y., KOBAYASHI N., NOGUCHI S., ISHIKAWA S. et TOBITA T., 1990. Further fractionation of the glycoprotein families of porcine zona pellucida by anion-exchange HPLC and some characterization of the separated fractions. *J. Biochem.*, **107** : 144-150.
- NEESER J.-R., GOLLIARD M. et Del VEDOVO S., 1991. Quantitative determination of complex carbohydrates in bovine milk and in milk-based infant formulas. *J. Dairy Sci.*, **74** : 2860-2871.
- NEIRA L.M. et MATHER I.H., 1990. Biochemical and immunological comparison of bovine butyrophilin with a butyrophilin-like glycoprotein in guinea pig milk-fat-globule membrane. *Protoplasma*, **159** : 168-178.
- NEJJAR Y., PAQUET D., AUBERT F. et LINDEN G., 1990. The PP3 component of the proteose-peptone. Extraction from unheated skim milk. *Milchwissenschaft*, **45** : 84-87 .
- NEJJAR Y., PAQUET D., GODBILLON G. et Le DEAUT J.Y., 1986. Immunological relationship between the hydrophobic fraction of proteose-peptone and the milk fat globule membrane of bovine milk. *Int. J. Biochem.*, **18** : 893-900.
- NG W.S., BRUNNER J.R. et RHEE K.C., 1970. Proteose-peptone fraction of bovine milk : lacteum serum component 3-A whey glycoprotein. *J. Dairy Sci.*, **53** : 987-996.
- NG-KWAI-HANG K.F., et KROEKER E.M., 1984. Rapid separation and quantification of major caseins and whey proteins of bovine milk by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.*, **67** : 3052-3056.
- NG-KWAI-HANG K.F., HAYES K.F., MOXLEY J.E. et MONARDES H.G., 1984. Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat, and protein production by dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, **67** : 835-840.

- NILSSON J., BLACKBERG L., CARLSSON P. ENERBACK S., HERNELL O. et BJURSELL G., 1990. cDNA cloning of human-milk bile-salt-stimulated lipase and evidence for its identity to pancreatic carboxylic ester hydrolase. *Eur. J. Biochem.*, **192** : 543-550.
- OCHOA, J.-L., 1978. Hydrophobic (interaction) chromatography. *Biochimie*, **60** : 1-15.
- ORMEROD M.G., Mac ILHINNEY J., STEELE K. et SHIMIZU M., 1985. Glycoprotein PAS-0 from the milk fat globule membrane carries antigenic determinants for epithelial membrane antigen. *Mol. Immunol.*, **22** : 265-269.
- OTANI H., MINE Y. et HOSONO A., 1987. Studies on the antigenic structure of bovine  $\beta$ -casein. V. Antigenic activities of some peptides derived from residues 1-93. *Milchwissenschaft*, **42** : 505-508.
- PAGLIARINI E., IAMETTI S., PERI C. et BONOMI F., 1990. An analytical approach to the evaluation of heat damage in commercial milks. *J. Dairy Sci.*, **73** : 41-44.
- PAQUET D., 1986. Comportement des protéose-peptones du lait de vache : isolement, purification et propriétés d'une fraction à caractère hydrophobe. Thèse de Doctorat, Nancy.
- PAQUET D., 1989. Revue bibliographique : la fraction protéose-peptones du lait. *Lait*, **69** : 1-21.
- PAQUET D. et ALAIS C., 1982. Purification et quelques caractéristiques moléculaires du composant 3 des protéose-peptones. *Lait*, **62** : 338-349.
- PAQUET D., DRIOU A., BRACQUART P. et LINDEN G., 1987. Effect of refrigerated storage of milk on proteolysis. Relationship to the proteose-peptone content. *Neth. Milk Dairy J.*, **41** : 81-92.
- PAQUET D., NEJJAR Y. et ALAIS C., 1985. Electrophoretic and chromatographic behavior of the proteose-peptone fraction of cow's milk. *Milchwissenschaft*, **40** : 200-203.
- PAQUET D., NEJJAR Y. et LINDEN G., 1988. Study of a hydrophobic protein fraction isolated from milk proteose-peptone. *J. Dairy Sci.*, **71** : 1464-1471.
- PATTON S. et PATTON R.S., 1990. Genetic polymorphism of PAS-I, the mucin-like glycoprotein of bovine milk fat globule membrane. *J. Dairy Sci.*, **73** : 3567-3574.

PATTON S., HUSTON G.E., JENNESS R. et VAUCHER Y., 1989. Differences between individuals in high-molecular weight glycoproteins from mammary epithelia of several species. *Biochim. Biophys. Acta*, **980** : 333-338.

PEDEMONTE C.H., SACHS G. et KAPLAN J.H., 1990. An intrinsic membrane glycoprotein with cytosolically oriented N-linked sugars. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87** : 9789-9793.

PELMONT J., 1989. Les protéines et les membranes. In *Enzymes*, ed J. Pelmont, Presses Universitaires de Grenoble, p 121-147.

PERI C., PAGLIARINI E., IAMETTI S. et BONOMI F., 1990. A study of surface hydrophobicity of milk proteins during enzymic coagulation and curd hardening. *J. Dairy Res.*, **57** : 101-108.

PERRIN E., 1991. Hydrolyse chymotrypsique totale de la caséine  $\alpha_S1$  bovine. D.E.A. de Microbiologie-Enzymologie-Nutrition, Nancy I.

PERSSON B., BENGTSSON-OLIVECRONA G., ENERBACK S., OLIVECRONA T. et JORNVALL H., 1989. Structural features of lipoprotein lipase. *Eur. J. Biochem.*, **179** : 39-45.

PIERCE-CRETEL A., DECOTTIGNIES J.-P., WIERUSZESKI J.-M., STRECKER G., MONTREUIL J. et SPIK G., 1989. Primary structure of twenty three neutral and monosialylated oligosaccharides O-glycosidically linked to the human secretory immunoglobulin A hinge region determined by a combination of permethylation analysis and 400-MHz H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, **182** : 457-476.

PODUSLO J.F., 1981. Glycoprotein molecular-weight estimation using sodium dodecyl sulfate-pore gradient electrophoresis : comparison of Tris-glycine and Tris-borate-EDTA buffer systems. *Anal. Biochem.*, **114** : 131-139.

QUINN D.M., 1985. Solvent isotope effects of lipoprotein lipase catalysed hydrolysis of water-soluble p-nitrophenyl esters. *Biochemistry*, **24** : 3144-3149.

QUINN D.M., SHIRAI K., JACKSON R.L. et HARMONY J.A.K., 1982. Lipoprotein lipase catalysed hydrolysis of water-soluble p-nitrophenyl esters. Inhibition by apolipoprotein C-II. *Biochemistry*, **21** : 6872-6879.

RAM M. et JOSHI V.K., 1989. Effect of addition of proteose-peptone components-3, -5 and -8 on inhibition of lipolysis in buffalo milk. *Indian J. Dairy Sci.*, **42** : 771-774.

- RAMOS M., SANCHEZ R.M., OLANO A., SANZ J. et MARTINEZ-CASTRO I., 1988. Comparative studies on "acid-stable, heat-stable polypeptides" of ovine, caprine and bovine milks. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **186** : 22-24.
- RANDOLPH H.E., ERWIN R.E. et RICHTER R.L., 1974. Influence of mastitis on properties of milk. VII. Distribution of milk proteins. *J. Dairy Sci.*, **57** : 15-18.
- RATHELOT J., JULIEN R., CANIONI P. et SARDA L., 1975a. Isolation and partial characterization of bovine pancreatic colipase. *Biochimie*, **57** : 1123-1130.
- RATHELOT J., JULIEN R., CANIONI P., COEROLI C. et SARDA L., 1975b. Studies on the effect of bile salt and colipase on enzymatic lipolysis. Improved method for the determination of pancreatic lipase and colipase. *Biochimie*, **57** : 1117-1122.
- REGNIER F.E., 1987. The role of protein structure in chromatographic behavior. *Science*, **238** : 319-323.
- RENKONEN O., MAKINEN P., HARD K., HELIN J. et PENTILLA L., 1988. Immobilized wheat germ agglutinin separates small oligosaccharides derived from poly-N-acetyllactosaminoglycans of embryonal carcinoma cells. *Biochem. Cell Biol.*, **66** : 449-453.
- RIBADEAU-DUMAS B., 1991. Physicochimie et biochimie des protéines du lait. Données récentes. *Lait*, **71** : 133-139.
- ROBITAILLE G., NG-KWAI-HANG K.-F. et MONARDES H.G., 1991. Variation in the N-acetyl neuraminic acid content of bovine  $\kappa$ -casein. *J. Dairy Res.*, **58** : 107-114.
- ROGALSKA E., RANSAC S. et VERGER R., 1990. Stereoselectivity of lipases. II. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by gastric and pancreatic lipases. *J. Biol. Chem.*, **265** : 20271-20276.
- ROSENBLUM B.B., 1991. Rapid analysis of protein fractions from the HPEC<sup>TM</sup> using capillary electrophoresis. *J. Liquid Chromatogr.*, **14** : 1017-1024 .
- ROWLAND S.J., 1937. The soluble protein fraction of milk. *J. Dairy Res.*, **8** : 6-14.
- ROWLAND S.J., 1938. The precipitation of the proteins in milk. I. Casein. II. Total proteins. III. Globulin. IV. Albumin and proteose-peptone. *J. Dairy Res.*, **9** : 30-41.

SANOGO T., 1988. Etude de l'activité des protéases dans un milieu complexe : application au modèle caséine  $\alpha\text{S}_1$ -papaine en milieu salin. Thèse en Biochimie Appliquée de l'Université de Nancy I.

SANOGO T., PAQUET D., AUBERT F. et LINDEN G., 1990. Proteolysis of  $\alpha\text{S}_1$ -casein by papain in a complex environment. Influence of ionic strength on the reaction products. *J. Food Sci.*, **55** : 796-800.

SAULNIER F., FERRERO F., CHOUKRI A., GIRARDET J.M. et LINDEN G., 1991. Estimation de la dénaturation des protéines par spectrofluorimétrie d'absorption moléculaire : applications aux lactosérums industriels. *Lait*, **71** : 511-518.

SAXENA U. et GOLDBERG I.J., 1990. Interaction of lipoprotein lipase with glycosaminoglycans and apolipoprotein C-II : effects of free-fatty-acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1043** : 161-168.

SCHAAR J., 1985. Plasmin activity and proteose-peptone content of individual milk. *J. Dairy Res.*, **52** : 369-378.

SCHACHTER H., 1986. Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Biochem. Cell Biol.*, **64** : 163-181.

SCHAGGER H., AQUILA H. et Von JAGOW G., 1988. Coomassie Blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **173** : 201-205.

SCHMIDT M.F.G. et SCHLESINGER M.J., 1979. Fatty acid binding to vesicular stomatitis virus glycoprotein : a new type of post-translational modification of the viral glycoprotein. *Cell*, **17** : 813-819.

SCOW R.O. et OLIVECRONA T., 1977. Effect of albumin on products formed from chylomicron triacylglycerol by lipoprotein lipase in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, **487** : 472-486.

SEMENKOVICH C.F., LUO C.-C., NAKANISHI M.K., CHEN S.-H., SMITH L.C. et CHAN L., 1990. In vitro expression and site-specific mutagenesis of the cloned human lipoprotein lipase gene. *J. Biol. Chem.*, **265** : 5429-5433.

SHIMAMOTO C., DESHMUKH G.D., RIGOT W.L. et BOLAND C.R., 1989. Analysis of cancer-associated colonic mucin by ion-exchange chromatography : evidence for a mucin species of lower molecular charge and weight in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, **991** : 284-295.

SHIMIZU M. et YAMAUCHI K., 1982. Isolation and characterization of mucin-like glycoprotein in human milk fat globule membrane. *J. Biochem.*, **91** : 515-524.

SHIMIZU M., KANNO C. et YAMAUCHI K., 1976. Dissociation of the soluble glycoproteins of bovine milk fat globule membrane by sodium dodecyl sulfate. *Agric. Biol. Chem.*, **40** : 1711-1716.

SHIMIZU M., MIYAJI H. et YAMAUCHI K., 1982. Inhibition of lipolysis by milk fat globule membrane materials in model milk fat emulsion. *Agric. Biol. Chem.*, **46** : 795-799.

SHIMIZU M., SAITO M. et YAMAUCHI K., 1986. Hydrophobicity and emulsifying activity of milk proteins. *Agric. Biol. Chem.*, **50** : 791-792.

SHIMIZU M., TANIMOTO H., AZUMA N. et YAMAUCHI K., 1990. Growth inhibition of BALB/c 3T3 cells by a high-molecular-weight mucin-like glycoprotein of human milk fat globule membrane. *Biochem. Int.*, **20** : 147-154.

SHIMIZU M., YAMAUCHI K. et KANNO C., 1980. Effect of proteolytic digestion of milk fat globule membrane proteins on stability of the globules. *Milchwissenschaft*, **35** : 9-12.

SHIMIZU M., YAMAUCHI K. et SAITO M., 1989. Emulsifying properties of the proteose-peptone fraction obtained from bovine milk. *Milchwissenschaft*, **44** : 497-500.

SHIMIZU M., YAMAUCHI K., MIYAUCHI Y., SAKURAI T., TOKUGAWA K. et Mac ILHINNEY R.A.J., 1986. High-Mr glycoprotein profiles in human milk serum and fat-globule membrane. *Biochem. J.*, **233** : 725-730.

SHIMOMURA K. et BREMEL R.D., 1988. Characterization of bovine placental lactogen as a glycoprotein with N-linked and O-linked carbohydrate side chains. *Mol. Endocrinol.*, **2** : 845-853.

SHIPE W.F., SENYK G.F. et FOUNTAIN K.B., 1980. Modified copper soap solvent extraction method for measuring fatty acids in milk. *J. Dairy Sci.*, **63** : 193-198.

SHIRAI K. et JACKSON R.L., 1982. Lipoprotein lipase-catalysed hydrolysis of p-nitrophenyl butyrate. *J. Biol. Chem.*, **257** : 1253-1258.

- SHIRAI K., JACKSON R.L. et QUINN D.M., 1982. Reciprocal effect of apolipoprotein C-II on the lipoprotein lipase-catalysed hydrolysis of p-nitrophenyl butyrate and trioleoylglycerol. *J. Biol. Chem.*, **257** : 10200-10203.
- SPIK G., CODDEVILLE B., STRECKER G., MONTREUIL J., REGOECZI E., CHINDEMI P.A. et RUDOLPH J.R., 1991. Carbohydrate microheterogeneity of rat serotransferrin. *Eur. J. Biochem.*, **195** : 397-405.
- STEAD D., 1983. A fluorometric method for the determination of *Pseudomonas fluorescens* AR 11 lipases in milk. *J. Dairy Res.*, **50** : 491-502.
- STERN K.K., FOEGEDING E.A. et HANSEN A.P., 1988. Inhibition of lipolytic activity in milk by polysaccharides. *J. Dairy Sci.*, **71** : 41-45.
- STUBBS J.D., LEKUTIS C., SINGER K.L., BUI A., YUZUKI D., SRINIVASAN U. et PARRY G., 1990. cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor VIII-like sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87** : 8417-8421.
- SUNDHEIM G. et BENGTTSSON-OLIVECRONA G., 1987a. Hydrolysis of bovine milk fat globules by lipoprotein lipase : inhibition by proteins extracted from milk fat globule membrane. *J. Dairy Sci.*, **70** : 1815-1821.
- SUNDHEIM G. et BENGTTSSON-OLIVECRONA G., 1987b. Hydrolysis of bovine and caprine milk fat globules by lipoprotein lipase. Effects of heparin and of skim milk on lipase distribution and on lipolysis. *J. Dairy Sci.*, **70** : 2467-2475.
- SWALLOW D.M., GENDLER S., GRIFFITHS B., CORNEY G., TAYLOR-PAPADIMITRIOU J. et BRAMWELL M.E., 1987. The human tumor-associated epithelial mucins are coded by an expressed hypervariable gene locus PUM. *Nature*, **328** : 82-84.
- TAKAMIZAWA K., KUDO S. et MADA M., 1978. Acid precipitation of fermented milk beverages. I. Influence of milk constituents. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, **49** : 745-752.
- TAMPE R., ROBITZKI A. et GALLA H.-J., 1989. Interaction between glycoprotein and a spin-labeled cholesterol analogue in reconstituted dimyristoylphosphatidylcholine bilayer vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **982** : 41-46.

- TARAGO M.T., TUCKER K.A., Van HALBEEK H. et SMITH D.F., 1988. A novel sialylhexasaccharide from human milk : purification by affinity chromatography on immobilized wheat germ agglutinin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **267** : 353-362.
- TARR G.E., 1982. Microquantitative Edman manual sequencing partitioning method for small peptides. In *Methods in Protein Sequence Analysis*, ed M. Elzinga, Humana Press, p 233-239.
- TOMITA M., FURTHMAYR H. et MARCHESI V.T., 1978. Primary structure of human erythrocyte glycophorin A. Isolation and characterization of peptides and complete amino acid sequence. *Biochemistry*, **17** : 4756-4770.
- TOWBIN H., STAEGELIN T. et GORDON J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76** : 4350-4354.
- TRIEU-CUOT P. et GRIPON J.-C., 1981. Electrofocusing and two-dimensional electrophoresis of bovine caseins. *J. Dairy Res.*, **48** : 303-310.
- VALIVULLAH H.M. et KEENAN T.W., 1989. Butyrophilin of milk lipid globule membrane contains N-linked carbohydrates and cross-links with xanthine oxidase. *Int. J. Biochem.*, **21** : 103-107.
- VERGER R., 1984. Pancreatic lipases. In *Lipases*, eds B. Borgström et H.L. Brockman, Elsevier, Amsterdam, p 83-150.
- VERGER R. et De HAAS G.H., 1976. Interfacial enzyme kinetics of lipolysis. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **5** : 77-117.
- VERGER R., RIETSCH J., Van DAM-MIERAS M.C.E. et De HAAS G.H., 1976. Comparative studies of lipase and phospholipase A<sub>2</sub> acting on substrate monolayers. *J. Biol. Chem.*, **251** : 3128-3133.
- VOLPE T. et ZABIK M.E., 1975. A whey protein contributing to loaf volume depression. *Cereal Chem.*, **52** : 188-197.
- WALSH M.T., WATZLAWICK H., PUTNAM F.W., SCHMID K. et BROSSMER R., 1990. Effect of the carbohydrate moiety on the secondary structure of  $\beta$ 2-glycoprotein I. Implications for the biosynthesis and folding of glycoproteins. *Biochemistry*, **29** : 6250-6257.

WANG C.-S., HARTSUCK J.A., DOWNS D. et BASS H.A., 1990. Acylglycerol reactivity and reaction mechanism of bovine milk lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1043** : 143-148.

WEINSTEIN B.R., DUNCAN C.W. et TROUT G.M., 1951. The solar activated flavor of homogenized milk. IV. Isolation and characterization of a whey constituent capable of producing the solar-activated flavor. *J. Dairy Sci.*, **34** : 570-576.

WELSCH U., BUCHHEIM W., SCHUMACHER U., SCHINKO I. et PATTON S., 1988. Structural, histochemical and biochemical observations on horse milk-fat-globule membranes and casein micelles. *Histochemistry*, **88** : 357-365.

WINKLER F.K., D'ARCY A. et HUNZIKER W., 1990. Structure of human pancreatic lipase. *Nature*, **343** : 771-774.

WOO A.H. et LINDSAY R.C., 1982. Rapid method for quantitative analysis of individual cow free fatty acids in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, **65** : 1102-1109.

WOOTTON J.C., NICOLSON R.E., COCK J.M., WALTERS D.E., BURKE J.F., DOYLE W.A. et BRAY R.C., 1991. Enzymes depending on the pterin molybdenum cofactor : sequence families, spectroscopic properties of molybdenum and possible cofactor-binding domains. *Biochim. Biophys. Acta*, **1057** : 157-185.

WU A.M. et HERP A., 1985. A table of lectin carbohydrate specificities. In *Lectins. Biology, biochemistry, chemical biochemistry*, vol 4, eds T.C. Bog-Hansen et J. Breborowicz, De Gruyter, New-York, p 629-636.

YANG C.-Y., GU Z.-W., YANG H.-X., ROHDE M.F., GOTTO A.M. Jr et POWNALL H.J., 1989. Structure of bovine milk lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.*, **264** : 16822-16827.

YET M.G., SHAO M.C. et WOLD F., 1988. Effects of the protein matrix on glycan processing in glycoproteins. *FASEB J.*, **2** : 22-31.

YOSHIDA S., 1989. Preparation of lactoferrin by hydrophobic interaction chromatography from milk acid whey. *J. Dairy Sci.*, **72** : 1446-1450.

ZECHNER R., 1990. Rapid and simple isolation procedure for lipoprotein lipase from human milk. *Biochim. Biophys. Acta*, **1044** : 20-25.

Ces travaux ont fait l'objet des publications et communications suivantes :

GIRARDET J.M., PAQUET D. et LINDEN G., 1989. Effects of chromatographic parameters on the fractionation of whey proteins by anion-exchange FPLC. *Milchwissenschaft*, **44** : 692-696.

GIRARDET J.M., ETIENNE L., CHOUKRI A. et LINDEN G., 1990. Effet de la désialylation enzymatique sur les propriétés physico-chimiques et biologiques de la fraction hydrophobe des protéose-peptones du lait bovin. Communication par affiche, Colloque INRA-Protéines, INRA Versailles, 16 et 17 octobre.

GIRARDET J.M., MATI A., SANOGO T., ETIENNE L. et LINDEN G., 1991. Fast protein liquid chromatography purification of hydrophobic fraction of bovin milk proteose-peptone and characterization by bidimensional electrophoresis. *Journal of Dairy Research*, **58** : 85-98.

CLARY D. et GIRARDET J.M., 1991. HPEC (*High Performance Electrophoresis Chromatography*) : principe et applications dans le domaine des protéines du lait. Communication orale, Journée "Protéolyse", INRA Rennes, 7 mars.

MATI A., GIRARDET J.M., XENAKIS D. et LINDEN G., 1991. Isolement et caractérisation de la fraction hydrophobe des protéose-peptones des laits bovin, ovin et caprin. *Le Lait*, **71** : 259-273.

SAULNIER F., FERRERO F., CHOUKRI A., GIRARDET J.M. et LINDEN G., 1991. Estimation de la dénaturation des protéines par spectrofluorimétrie d'absorption moléculaire : applications aux lactosérums industriels. *Le Lait*, **71** : 511-518.

Un article est en cours de rédaction ; le sujet porte sur l'étude modélisée du mécanisme de l'inhibition de la lipolyse par le composant-3 des protéose-peptones.



# UNIVERSITE DE NANCY I

NOM DE L'ETUDIANT : Monsieur GIRARDET Jean-Michel

NATURE DE LA THESE : DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I  
en BIOCHIMIE APPLIQUEE

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

NANCY, le 12 JUIN 1992 n°309

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I



M. BOULANGÉ



## Résumé

Les protéose-peptones préparées par thermocoagulation du lait sont séparées par FPLC d'interactions hydrophobes. Les fractions obtenues sont alors caractérisées par électrophorèse bidimensionnelle. Le composant-3, concentré dans la fraction hydrophobe, est constitué par agrégation de trois sous-unités glycoprotéiques de 11, 19 et 29 kiloDaltons environ.

L'étude de la partie glucidique révèle que le composant-3 est N-glycosylé. La structure du N-glycane est de type lactosaminique complexe. Le fucosyl-lacto-N-tétraose a été également identifié dans la fraction hydrophobe. Il semble présenter une forte affinité pour le composant-3.

L'origine de ce dernier est liée aux protéines des membranes de globules gras du lait. Les sous-unités du composant-3 pourraient être des fragments de N-glycosylprotéines membranaires obtenus par action de la plasmine à la surface des globules gras.

Le mécanisme de l'inhibition de la lipolyse par le composant-3 est étudié dans un système modèle émulsifié. Il est montré que l'inhibition n'est pas due à une interaction directe entre la lipase et le composant-3, mais résulte d'un changement de la qualité de l'interface huile/eau de l'émulsion après adsorption du composant-3.

## Mots clés

Lait bovin / Composant-3 / Protéose-peptones / Glycoprotéines / Membrane de globules gras / Inhibition de la lipolyse / Chromatographie d'interactions hydrophobes / Electrophorèse micro-préparative