

BBA 3998

**COLOSTRUM HUMAIN. CHROMATOGRAPHIE SUR
DEAE-CELLULOSE DE LA FRACTION
GLYCOPEPTIDIQUE SOLUBLE DANS L'ÉTHANOL À 50 %**

R. GOT, J. FONT, R. BOURRILLON ET P. CORNILLOT

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté de Médecine, Paris (France)

(Reçu le 10 septembre, 1962)

SUMMARY

*Human colostrum. Chromatography on DEAE-cellulose of
the glycopeptide fraction soluble in 50 % ethanol*

A glycopeptidic fraction from human colostrum is prepared by dialysis and protein precipitation in 50 % ethanol. This fraction is chromatographed on DEAE-cellulose in pyridine-acetate buffer (pH 5.3) using discontinuous elution. Elution peaks are analysed by electrophoresis on paper and ultracentrifugation, and the carbohydrate and amino acid composition is determined.

A try of preliminary fractionation on Sephadex G-25 is also effectuated.

INTRODUCTION

Les glucides du lait humain ont été l'objet de nombreux travaux^{1,2} et la structure d'une certain nombre d'oligosaccharides est maintenant parfaitement connue. Plusieurs de ces polyosides contiennent de l'acide *N*-acétylneuraminique: ce sont les lactaminy-lactoses³⁻⁵ et les trois pentasaccharides isolés récemment par KUHN ET GAUHE (cités par MONTREUIL⁶).

D'autre part, MONTREUIL ET MULLET⁷ ayant étudié la composition de la fraction adialysable des laits colostraux, ont mis en évidence leur richesse en "lactomucoïdes" et leur appauvrissement progressif en ces substances au cours du post-partum. Toutefois, leur fraction était un adialysable total et contenait toutes les glycoprotéines du lait, en plus des polyosides supérieurs à acide sialique, dont ZILIKEN, BRAUN ET GYORGYI⁸ avaient pressenti l'existence.

Il nous a donc paru intéressant de rechercher la présence dans les laits colostraux, de glycopeptides que l'on pourrait considérer comme des intermédiaires entre les glycoprotéines et les polyosides connus.

Le premier temps de cette étude est un fractionnement fondé sur la teneur en acide sialique de ces substances, c'est à dire, mettant en jeu une chromatographie sur un échangeur d'anions, la DEAE-cellulose.

MODE OPÉRATOIRE

Préparation de la fraction glycopeptidique

Le colostrum utilisé est un mélange de laits colostraux provenant de plusieurs mères et recueillis entre le premier et le dixième jour après l'accouchement. Après avoir été écrémé par centrifugation, le colostrum est ajusté à pH 4.5 par l'acide acétique; un volume d'alcool est alors ajouté à —10°. Le précipité protéique est centrifugé, le surnageant est concentré sous vide à 25°, jusqu'à élimination de l'alcool, puis mis en dialyse contre 8 vol. d'eau distillée, avec agitation, sous toluène. Après 48 h de dialyse à 4° et renouvellement du liquide extérieur, la fraction adialysable—que nous appellerons en abrégé S₅₀A—est lyophilisée.

Méthodes analytiques

Cette fraction S₅₀A, ainsi que toutes les substances obtenues au cours des fractionnements, sont analysées par les méthodes colorimétriques classiques, contre les étalons appropriés: les hexoses⁹ contre un mélange équimoléculaire galactose/glucose, les hexosamines¹⁰ contre le chlorhydrate de glucosamine, les 6-désoxyhexoses¹¹ contre le fucose, l'acide sialique libre¹² et total¹³ contre l'acide N-acétylneuraminique et une glycoprotéine servant d'étalon auxiliaire, les peptides¹⁴ contre la sérumalbumine bovine, les acides uroniques¹⁵ contre le glycuronate de sodium et les acides aminés¹⁶ contre la leucine (ce dosage a été effectué sans hydrolyse préalable, c'est à dire que seuls les groupements α -aminés libres sont dosés).

Chromatographie sur DEAE-cellulose et Sephadex G-25

Une quantité de DEAE-cellulose (Whatman), égale à 5 fois le poids de substance à fractionner, est lavée par la soude 1 N, par l'eau et reprise par le tampon acétate de pyridine 0.2 M (pH 5.3) (ce tampon est utilisé en raison de sa volatilité qui permet d'éviter les dialyses après chromatographie).

La colonne, formée en laissant sédentifier librement une suspension dans le tampon de molarité 0.002 M, est lavée par ce tampon jusqu'à ce que l'effluent ait la même conductivité que le tampon lui-même. Le produit à chromatographier est repris dans un volume suffisamment important du tampon 0.001 M pour que la conductivité de la solution obtenue soit proche de celle du tampon 0.002 M.

L'élution est effectuée en augmentant par palier la molarité du tampon; cette méthode étant préférable au gradient pour un premier fractionnement.

Les hexoses, l'acide sialique et les peptides ou les acides aminés sont dosés dans les fractions de l'éluat.

Dans une expérience, S₅₀A est remis en solution aqueuse, puis passé directement sur une colonne contenant 30 fois son poids de Sephadex G-25 (Lot No. To 8491 C, Gros) dans l'eau. En plus des dosages cités ci-dessus, on détermine alors la conductivité de chaque fraction recueillie à la sortie de la colonne.

Ultracentrifugations

Les ultracentrifugations sont effectuées à la Station Centrale du CNRS, dans l'ultracentrifugeuse Spinco, à 59870 rév./min, à 20°, en frontière préformée, dans une solution 0.08 M de chlorure de sodium, tamponnée à pH 7 par un tampon phosphate 0.02 M. La concentration est de 1% pour toutes les fractions analysées.

Électrophorèse

Les électrophorèses sur papier (Schleicher et Schüll 2043b) sont effectuées à pH 3.5 et 6.3 en tampon acétate de pyridine, et à pH 8.6 en tampon véronal sodique; sous 10 V/cm; *I*, 0.1. Les feuilles sont révélées par l'amidoschwartz, le réactif de Schiff après oxydation périodique et la ninhydrine.

Chromatographie sur papier

La chromatographie sur papier des oses neutres et aminés (après hydrolyse par HCl 1 N, 4 h à 100°) est effectuée selon la technique de BOURRILLON ET MICHON¹⁷.

Cette technique est appliquée à l'étude des acides sialiques (après hydrolyse par HCl à pH 2, 1 h à 100°), révélés par la méthode de WARREN¹⁸, et d'autre part, des acides aminés (après hydrolyse par HCl 6 N, 16 h à 100°), qui sont également analysés sur papier Whatman No. 1, dans le solvant butanol - acide acétique - eau (4:1:5, v/v).

RÉSULTATS

Préparation de S₅₀A

La fraction adialysable du colostrum soluble dans l'éthanol à 50 %, S₅₀A, représente environ 3 g/l. La dialyse doit être assez poussée afin d'éliminer totalement le lactose et les glucides dialysables dont la concentration est très élevée dans le colostrum⁷.

La composition de cette fraction est donnée dans le Tableau I.

TABLEAU I

COMPOSITION DES FRACTIONS GLYCOPEPTIDIQUES DU COLOSTRUM
APRÈS CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE

Entre parenthèses dans la première colonne: molarités d'élution, tampon acétate de pyridine (pH 5.3).

Fractions	Poids (mg)	Hexoses (%)	Hexosamines (%)	6-Désoxyhexoses (%)	Acide sialique (%)	Peptides (%)	Hexoses/acide sialique
S ₅₀ A	3000	43	15	9	10	22	4.3
S ₅₀ A ₂	1500	44.5	16	10	10.6	17	4.2
I (0.002 M)	685	47	18	12.7	5.2	16.5	9
II (0.01 M)	240	50	18.6	9	20	2	2.5
III (0.05 M)	370	40	15	7	20	13	2
III (0.05 M)	45	30	15	4	23	22	1.3
IV (0.1 M)	190	21.7	10.8	2.6	11.1	36	2
V (0.5 M)	45	17	10	2	10	50	1.7

Dans un essai, la dialyse a été poursuivie durant 4 jours, avec renouvellement du liquide extérieur tous les jours: il ne restait plus que 1500 mg de S₅₀A par litre de colostrum. Ce résultat n'est pas surprenant, car cette fraction glycopeptidique est formée de substances dont le poids moléculaire ne doit pas excéder 4000, ainsi que le montre l'ultracentrifugation. Ces substances sont donc à la limite de la perméabilité des membranes de dialyse; c'est pour cette raison que l'emploi d'un tampon volatil s'impose au cours des chromatographies, d'autant plus que la vitesse de dialyse semble s'accroître pour les fractions purifiées.

D'ailleurs, il est intéressant de noter que S₅₀A n'est pas modifié qualitativement par une dialyse poussée (*cf.* S₅₀A₂ dans le Tableau I).

Chromatographie sur DEAE-cellulose

La Fig. 1 représente les diagrammes d'élution de la colonne de DEAE-cellulose. 3 g de S₅₀A ont été utilisés. Les fractions correspondant aux clochers du diagramme sont réunies, concentrées sous vide et lyophilisées. Leur composition est donnée dans le Tableau I.

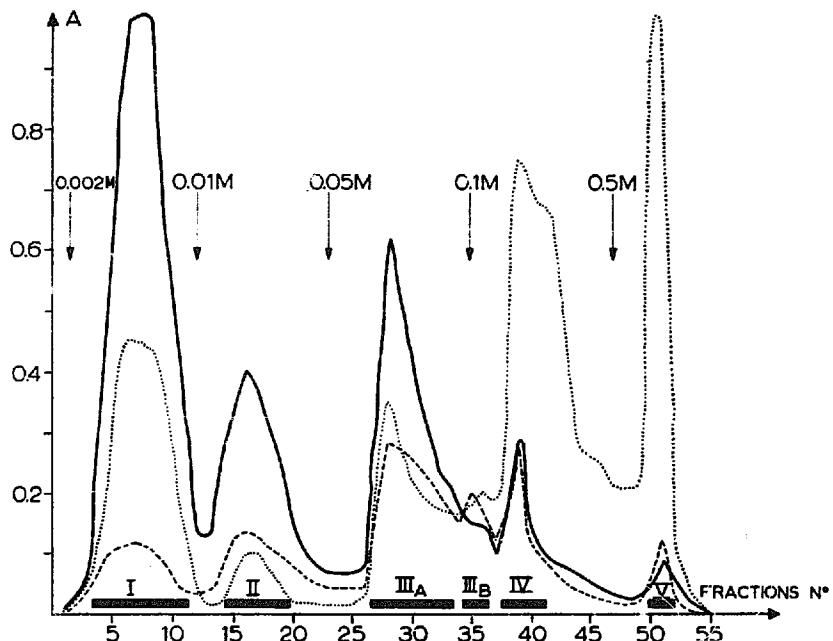


Fig. 1. Chromatographie sur DEAE-cellulose de 3000 mg de la fraction adialysable du colostrum soluble dans l'éthanol à 50 %. Colonne 16 × 4 cm. Tampon acétate de pyridine (pH 5.3). Élution discontinue par les molarités indiquées au dessus des flèches. Courbe en trait continu: hexoses; courbe en trait discontinu: acide sialique; courbe en pointillé: peptides. Les barres horizontales indiquent la réunion des tubes d'un même pic (50 ml par tube). La composition des fractions obtenues (I-V) est donnée dans le Tableau I.

Remarquons l'évolution du rapport hexose/acide sialique qui est de 4.3 dans le total, de 9 dans la fraction qui ne s'adsorbe pas sur l'échangeur, et qui diminue considérablement lorsque la molarité du tampon éluant augmente. Ceci confirme le rôle prépondérant que joue l'acide sialique dans l'adsorption des glycopeptides sur échangeur d'anion.

La chromatographie sur papier montre la présence, dans les fractions DEAE I, II et III, de galactose et de glucose (le galactose étant le plus important), de glucosamine, de galactosamine en faible quantité, et de fucose. La fraction DEAE IV ne contiendrait que la glucosamine et le galactose. L'acide sialique est l'acide N-acétyl-neuraminique.

Remarquons l'absence certaine de mannose et d'acides uroniques, ces diverses fractions possédant ainsi les mêmes glucides que les polysaccharides déjà connus dans le lait.

On trouve, en faible quantité, de nombreux amino acides, mais, l'acide glutamique, la valine et la proline sont en proportion importante.

Le poids moléculaire de ces fractions est relativement élevé puisque leur constante de sémination est voisine de 0.84 S, excepté pour la fraction DEAE I, plus légère, dont la constante est 0.59 S.

L'électrophorèse sur papier est assez peu résolutive aux pH 6.3 et 8.6. Au contraire, à pH 3.5, si l'amidoschwarz ne révèle que des zones diffuses très légères, au point de départ ou migrant vers la cathode, la révélation par le réactif de Schiff (Fig. 2) met en évidence des bandes nettement séparées migrant vers l'anode: la Fraction I présente 2 bandes, les Fractions II et IV, une seule; quant à la Fraction III, elle possède 3 bandes.

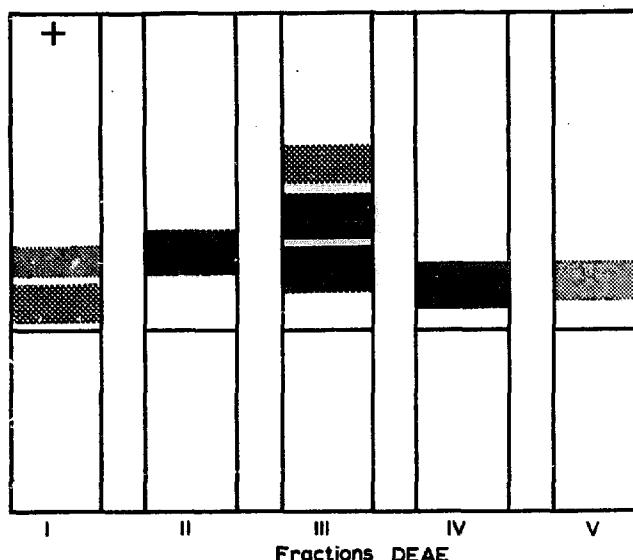


Fig. 2. Schéma du glucidogramme obtenu après électrophorèse sur papier des Fractions I-V provenant de la chromatographie sur DEAE-cellulose de la fraction adialysable du colostrum soluble dans l'éthanol à 50 %. Tampon acétate de pyridine de 2.2 % (pH 3.5); 10 V/cm durant 7 h.

Chromatographie sur Sephadex G-25, puis sur DEAE-cellulose

La Fig. 3 représente le diagramme du passage de S₅₀A (1100 mg) sur Sephadex G-25. Les glycopeptides sont exclus de la colonne sans rétention; ce résultat confirme l'ultracentrifugation qui donnait à ces substances un poids moléculaire de 3500-4000. Le pic unique obtenu par le dosage des hexoses, est séparable en deux fractions (Sephadex I et II), l'une contenant l'essentiel des acides aminés, l'autre le pic d'acide sialique. La composition de ces 2 fractions est rapportée dans le Tableau II.

L'électrophorèse sur papier, à pH 3.5, de ces fractions montre, après révélation des glucides, une bande migrant peu pour la Fraction I et plusieurs bandes pour la Fraction II.

Cette Fraction II du Sephadex, la plus riche en acide sialique, est alors soumise à une chromatographie sur DEAE-cellulose (Fig. 4). Le diagramme est beaucoup plus simple que celui obtenu directement de S₅₀A. Il est intéressant de constater que, parmi les substances ne s'adsorbant pas sur la colonne à la molarité 0.002 M, une partie passe sans retard et ne contient pas d'acide sialique, alors qu'une autre partie est légèrement retenue et contient 15.8 % d'acide sialique (Tableau II). De plus, aucune substance n'est élue à la molarité 0.01 M; puis après la troisième fraction élue pour 0.04 M, plus rien n'est désorbé de la colonne, alors que, dans l'essai précédent, des substances glycopeptidiques apparaissaient encore dans l'éluat 0.2 M. Le rendement de ces chromatographies sur DEAE-cellulose était d'ailleurs assez médiocre (inférieur à 60 %), aussi bien pondéralement que pour chacun des consti-

tuants glucidiques dosés. (Le rendement du passage sur Sephadex est voisin de 100 %.)

L'électrophorèse sur papier à pH 3.5 de ces trois fractions présente une grande similitude avec celle des fractions correspondantes de la chromatographie directe sur DEAE-cellulose. Les sucres neutres et aminés sont également identiques. Seule la Fraction I contient des amino acides: la valine, la proline et l'acide glutamique, avec des traces d'arginine et d'acide aspartique.

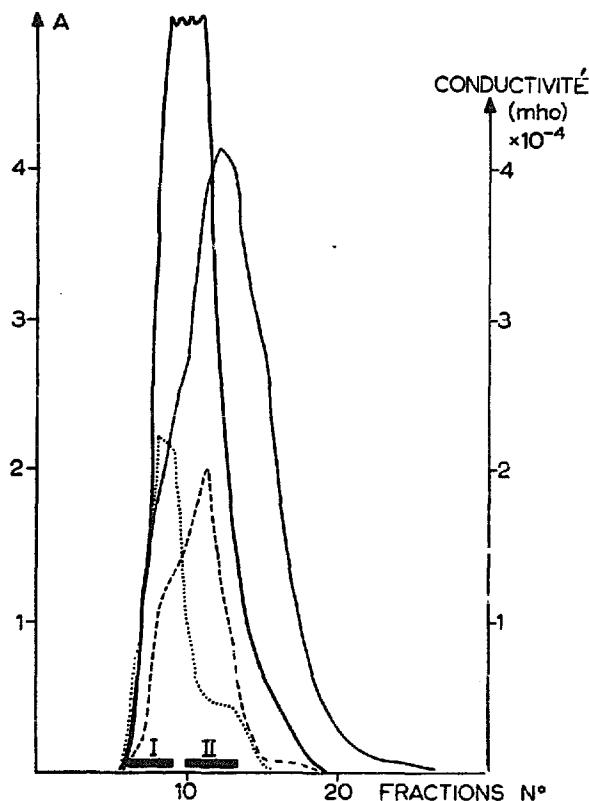


Fig. 3. Passage sur colonne (20×2.5 cm) de Sephadex G-25 dans l'eau de 1100 mg de la fraction adialysable du colostrum soluble dans l'éthanol à 50 %. Courbe en trait continu épais: hexoses; courbe en trait discontinu: acide sialique; courbe en pointillé: groupements α -aminés libres (ninhydrine); courbe en trait continu fin: conductivité. Les barres horizontales indiquent la réunion des tubes d'une fraction (10 ml par tube). La composition des fractions obtenues (Sephadex I et II) est donnée dans le Tableau II.

TABLEAU II

COMPOSITION DES FRACTIONS OBTENUES APRÈS PASSAGE DE 110 mg DE $S_{50}A$ SUR SEPHADEX G-25 ET DES FRACTIONS OBTENUES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-CELLULOSE DE LA FRACTION II DU SEPHADEX

Entre parenthèses dans la première colonne: molarités d'élution, tampon acétate de pyridine (pH 5.3).

Fractions	Poids (mg)	Hexoses (%)	Hexosamines (%)	% Désoxyhexoses (%)	Acide sialique (%)	Acides aminés* (μ mole)	Hexoses/acide sialique
Sephadex I (6-9)	490	38.5	13.4	8	6.7	0.21	5.7
Sephadex II (10-13)	600	47.7	16.8	10	15.8	0.12	3
S _I DEAE I (0.002 M)	165	57	20.5	16.5	0	0.06	—
S _I DEAE II (0.01 M)	72	58	16.5	10	15.8	0.04	3.6
S _I DEAE III (0.04 M)	120	44	17	5	30	0.03	1.5

* Dosage des groupements α -aminés libres.

DISCUSSION

Une fraction non dialysable du lait humain a été étudiée par ZILIKEN *et al.*⁸: cette fraction, précipitée entre 67 et 87 % d'éthanol contenait 17-25 % d'un acide sialique dont la caractérisation était le but essentiel de leur recherche.

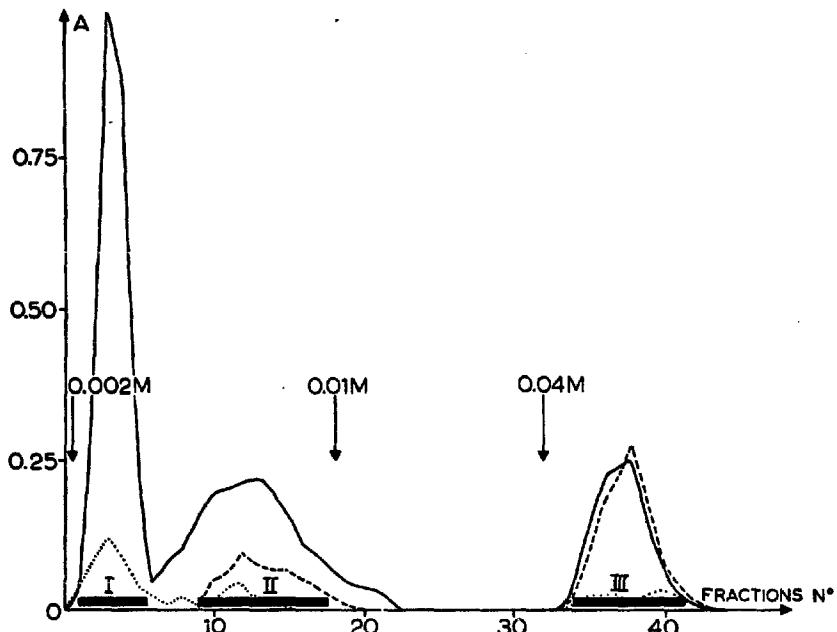


Fig. 4. Chromatographie sur DEAE-cellulose de la Fraction II (600 mg) obtenue après passage sur Sephadex G-25 de la fraction adialysable du colostrum soluble dans l'éthanol à 50 %. Colonne 12 × 2.5 cm. Courbe en trait continu: hexoses; courbe en trait discontinu: acide sialique; courbe en pointillé: peptides. Tampon acétate de pyridine (pH 5.3). Élution discontinue par les molarités indiquées au dessus des flèches. Les barres horizontales indiquent la réunion des tubes d'un même pic (25 ml par tube). La composition des fractions obtenues (S_{II}DEAE I, S_{II}DEAE II, S_{II}DEAE III) est donnée dans le Tableau II.

Toutefois, ces mêmes chercheurs avaient montré que cette fraction non dialysable contenait, en plus des polyosides neutres ou aminés, au moins deux oligosaccharides acides composés de galactose, glucose, fucose, acétylglucosamine et acide N-acétylneuraminique. ZILIKEN ET WHITEHOUSE¹⁹ considéraient d'ailleurs, que le lactaminyl-lactose n'était que le numéro un d'une série d'oligosaccharides produits par la glande mammaire, pouvant dériver de plus hauts polysaccharides par fragmentation. Il est évident que la caractérisation récente des pentasaccharides à acide sialique⁶ est en accord avec cette hypothèse.

Quant à la fraction adialysable étudiée par MONTREUIL ET MULLET⁷, c'était un adialysable total, non déprotéinisé.

Ainsi, les polyosides ou les hétérosaccharides adialysables du lait humain—ou mieux, du colostrum, plus riche en glucides—n'ont pas encore été l'objet d'un fractionnement, et, cependant, la mise en évidence, puis la caractérisation de hauts polysaccharides ou de glycopeptides, peuvent apporter des éclaircissements dans le métabolisme soit du lactose, soit des glycoprotéines du lait.

Les polyosides de faible poids moléculaire étant éliminés par la dialyse et le passage sur Sephadex, nous avons montré l'existence, dans le colostrum, de polysaccharides neutres ou acides et de glycopeptides de poids moléculaires voisins de

3500. La chromatographie sur DEAE-cellulose en tampon volatil et l'électrophorèse sur papier à pH 3.5 des fractions obtenues prouvent que les laits colostraux humains contiennent, non pas deux, mais plusieurs polysaccharides acides supérieurs. De plus, la caractérisation de certains acides aminés (valine, proline, acide glutamique) dans plusieurs de ces fractions, permet d'affirmer la présence de glycopeptides.

Bien que totalement dépourvus de mannose, ces glycopeptides naturels peuvent être rapprochés, par leur composition, de ceux obtenus précédemment dans l'urine humaine normale²⁰.

Actuellement, de nombreux travaux portent sur la structure des glycoprotéines, et le premier stade de ces recherches consiste généralement à obtenir, par hydrolyse enzymatique, des glycopeptides artificiels, ou, parfois même, des polysaccharides dépourvus d'amino acides.

Cette fraction adialysable du colostrum a donc un intérêt métabolique certain; ce travail n'est que le premier temps de son étude, le deuxième consistant à caractériser les fractions dont l'homogénéité aura été confirmée.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier Madame BERTRAND, Chef du Laboratoire du Lactarium de l'École de Puériculture, qui leur a fourni les laits colostraux.

RÉSUMÉ

Après précipitation des protéines par l'éthanol à 50 %, la fraction adialysable du colostrum humain est chromatographié sur DEAE-cellulose en tampon volatil de pH 5.3. Par cette technique, plusieurs glycopeptides ou polysaccharides à acide sialique sont mis en évidence. Ces substances sont analysées par les méthodes colorimétriques classiques, par électrophorèse sur papier et par chromatographie sur papier. L'ultracentrifugation permet de leur attribuer un poids moléculaire voisin de 3500. Un passage sur Sephadex G-25, suivi d'une chromatographie sur DEAE-cellulose confirme ces résultats.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ R. KUHN, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 40 (1958) 297.
- ² J. MONTREUIL, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 42 (1960) 1399.
- ³ R. CAPUTTO ET R. E. TRUCCO, *Nature*, 169 (1952) 1051.
- ⁴ J. HOOVER, G. A. BRAUN ET P. GYORGYI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 47 (1953) 216.
- ⁵ R. KUHN ET R. BROSSMER, *Angew. Chem.*, 70 (1958) 25.
- ⁶ J. MONTREUIL, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 42 (1960) 1399.
- ⁷ J. MONTREUIL ET S. MULLET, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 42 (1960) 365.
- ⁸ F. ZILIKEN, G. A. BRAUN ET P. GYORGYI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 54 (1955) 564; 63 (1956) 394.
- ⁹ M. SORENSEN ET G. HAUGAARD, *Biochem. Z.*, 260 (1933) 247.
- ¹⁰ L. A. ELSON ET W. T. J. MORGAN, *Biochem. J.*, 27 (1933) 1824.
- ¹¹ Z. DISCHE ET L. B. SHETTLES, *J. Biol. Chem.*, 175 (1948) 595.
- ¹² L. WARREN, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 1971.
- ¹³ J. WERNER ET L. ODIN, *Acta Soc. Med. Upsaliens.*, 57 (1952) 230.
- ¹⁴ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- ¹⁵ P. CORNILLOT, *Clin. Chim. Acta*, 7 (1962) 42.
- ¹⁶ A. SAIFER, S. GERSTENFELD ET A. F. HARRIS, *Clin. Chim. Acta*, 5 (1960) 131.
- ¹⁷ R. BOURRILLON ET J. MICHON, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 41 (1959) 267.
- ¹⁸ L. WARREN, *Nature*, 186 (1960) 237.
- ¹⁹ F. ZILIKEN ET M. W. WHITEHOUSE, in M. L. WOLFROM, *Advances in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 13, Academic Press, New York, 1958, p. 237.
- ²⁰ R. BOURRILLON, P. CORNILLOT ET R. GOT, *Clin. Chim. Acta*, 7 (1962) 506.