

BBA 77376

## TRANSFERT DU GALACTOSE DANS LES MEMBRANES DES GLOBULES LIPIDIQUES DU LAIT HUMAIN

M. B. MARTEL et R. GOT

*Biochimie des Membranes, Université Claude Bernard, Lyon I, 69621, Villeurbanne (France)*

(Reçu le 8 décembre, 1975)

### SUMMARY

#### *Galactose transfer in the membranes of human milk fat globules*

Galactosyltransferase which catalyzes the transfer from UDP-galactose to either endogeneous glycoproteins, free *N*-acetylglucosamine or *N*-acetylglucosaminyl residues in the carbohydrate portion of glycoproteins, or to glucose when  $\alpha$ -lactalbumin is added, occurs in human milk fat globule membranes. Various treatments (washing of membranes, freezing and thawing) did not affect this activity. In the presence of Triton X-100, the enzyme shows appreciable latency. This detergent was then used to solubilize the enzyme and to study its main characteristics. A competition and a heat stability experiment show that only one enzyme acts on two substrates (free *N*-acetylglucosamine or desialyzed and degalactosylated fetuin). UDP-galactose hydrolase activities were very low compared to those of the bovine milk fat globule membranes. Other characteristic enzymes of Golgi vesicles were found in human milk fat globules membranes. It is of interest to find out whether this is the result of contamination with cytoplasmic particles or whether it reflects the participation of Golgi vesicles in human milk fat globule secretion.

---

### INTRODUCTION

La galactosyltransférase (EC 2.4.1.38) catalyse le transfert de galactose, à partir d'UDP-galactose, à une *N*-acétylglucosamine libre ou située en position terminale dans une chaîne oligosaccharidique d'une molécule glycoprotéique. Cette activité enzymatique, présente dans de nombreux tissus [1], est localisée dans l'appareil de Golgi [2–5]. Elle existe également, sous forme soluble, dans le lait [6, 7] et proviendrait alors de l'appareil de Golgi de la glande mammaire lactante [1, 8].

Dans un travail antérieur [9], nous avons montré que les membranes des globules lipidiques du lait humain possédaient une activité de transfert de galactose aussi bien sur accepteur glycoprotéique endogène que sur *N*-acétylglucosamine ou sur

---

Abréviations: UDP-gal, uridine diphospho-galactose; CMP-AcNeu, cytidine-5'-monophospho-*N*-acétyl-neuraminic-acid; MES, acide morpholino-éthane sulfonique; EDTA, éthylène diamine tétraacétique acide.

glucose en présence d' $\alpha$ -lactalbumine. Parallèlement à cette activité, on détectait également dans les membranes des globules lipidiques humains, une thiamine pyrophosphatase, ce qui permettait d'envisager la présence d'éléments golgiens dans ces membranes, hypothèse qui a d'ailleurs reçu confirmation [10].

Il nous a donc semblé intéressant de préciser les caractéristiques du transfert de galactose par les membranes des globules lipidiques humains, après avoir vérifié qu'il ne s'agissait pas d'une contamination par la phase soluble du lait. De plus, nous avons solubilisé cette activité et comparé ses propriétés à celles de la protéine A de la lactose synthétase soluble humaine [11, 12].

## MATERIEL ET METHODES

Les membranes sont préparées extemporanément, selon une méthode précédemment décrite [13], à partir de laits colostraux prélevés stérilement entre le 3<sup>e</sup> et le 8<sup>e</sup> jour après la parturition.

L'UDP-[U-<sup>14</sup>C]galactose (radioactivité spécifique 297 Ci/mol et le CMP-*N*-acétyl-(neuraminique-4,5,6,7,8,9-<sup>14</sup>C) acide (radioactivité spécifique 262 Ci/mol) proviennent du Radiochemical Centre (Amersham). Un accepteur glycoprotéique exogène est préparé à partir de fétuine (Calbiochem): l'acide sialique est libéré par hydrolyse acide ménagée, puis le galactose est éliminé par oxydation périodique [14]. On obtient ainsi 0.26  $\mu$ mol de site accepteur pour l'acide sialique et 0.24  $\mu$ mol pour le galactose, par mg de protéine.

Le transfert de galactose sur fétuine est réalisé dans un milieu d'incubation constitué, pour un volume final de 260  $\mu$ l de tampon pipérazine-glycylglycine pH 6.7 (concentration finale 0.028 M), MnCl<sub>2</sub> (8 mM), UDP-galactose (13  $\mu$ M) contenant 0.015  $\mu$ Ci du substrat radioactif, fétuine désialylée et dégalactosylée (300  $\mu$ g, soit 0.26 mM en site accepteur) et préparation enzymatique (50–150  $\mu$ g de protéines membranaires ou 10–30  $\mu$ g de protéines solubles). Après 30 min d'incubation à 32 °C, on ajoute 1.5 ml d'acide trichloracétique à 10 % et on laisse la précipitation s'accomplir 16 h à 0 °C. L'activité est déterminée en dosant la radioactivité du précipité retenu sur filtre Whatman (GF/B) après lavage par un mélange méthylal/méthanol (4 : 1). Dans le cas du transfert sur *N*-acétylglucosamine, un milieu similaire est utilisé, mais contenant, pour un volume final de 100  $\mu$ l, la *N*-acétylglucosamine (6 mM) à la place de la fétuine et une concentration plus élevée en UDP-galactose (110  $\mu$ M et 0.05  $\mu$ Ci). Après 40 min d'incubation à 32 °C, 20  $\mu$ l du milieu sont soumis à une électrophorèse à haut voltage (60 V/cm) à pH 6.5 durant 60 min et la radioactivité restant au point de départ est déterminée.

La sialyltransférase (EC 2.4.99.1) est dosée dans un milieu d'incubation constitué, pour un volume final de 100  $\mu$ l, de tampon MES, pH 6, (concentration finale, 20 mM), MnCl<sub>2</sub> (5 mM), CMP-AcNeu (10  $\mu$ M) contenant 0.2  $\mu$ Ci du substrat radioactif, fétuine désialylée (300  $\mu$ g, soit 0.8 mM en site accepteur) et préparation enzymatique (100–200  $\mu$ g de protéines membranaires). Après 45 min à 30 °C, la réaction est arrêtée par addition de 0.1 ml d'acide phosphotungstique à 2 % dans HCl 1 M. Le précipité obtenu est recueilli sur filtre Whatman (GF/B). La radioactivité est déterminée après lavage du filtre par l'acide trichloracétique à 10 %, puis par un mélange éthanol/éther (2 : 1).

L'activité  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) est recherchée à pH 4.6 et à pH 8 en utilisant comme substrat, soit l'*o*-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside et en dosant à 410 nm l'*o*-nitrophénol libéré, soit l'UDP- $^{14}\text{C}$ galactose ou la fétuine préalablement marquée au  $^{14}\text{C}$ -galactose et en séparant alors le galactose libéré par chromatographie sur papier [15].

L'activité nucléotide-sucres pyrophosphatase est mise en évidence dans un milieu identique à celui du transfert de galactose sur *N*-acétylglucosamine, moins l'accepteur exogène. La réaction est arrêtée par addition d'EDTA (concentration finale 17 mM); 20  $\mu\text{l}$  du milieu sont déposés sur papier Whatman N° 3, préalablement imprégné par une solution d'EDTA (10 mM, pH 7) et séché. Après 21 h de migration en chromatographie descendante dans le solvant éthanol/acétate de sodium 1 M, pH 3.8 (5 : 2), la séparation d'UDP-galactose, de galactose-1-*P* et de galactose est obtenue [16]. La radioactivité correspondant à chacun de ces composés est déterminée.

Plusieurs traitements sont appliqués aux membranes des globules lipidiques humains. (1) Elles sont suspendues dans l'eau distillée (1 mg de protéine dans 2 ml), incubées 15 min à 30 °C, puis centrifugées à  $140\,000 \times g$  pendant 45 min. Les culots sont remis en suspension, à 0 °C, dans un tampon Tris  $\cdot$  HCl 0.15 M, pH 8.0 et recentrifugés dans les mêmes conditions. Ces lavages éliminent les protéines non membranaires faiblement liées [17]. (2) Les membranes des globules lipidiques sont suspendues, à 0 °C, dans NaCl 1 M, puis centrifugées comme ci-dessus. Cette opération est répétée deux fois, puis elles sont lavées avec  $\text{NaHCO}_3$ , 0.1 M/ $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.1 M et recentrifugées. Ce traitement élimine l'essentiel des protéines adsorbées ou incluses dans les vésicules, sans altérer les membranes [18]. (3) Des culots membranaires fraîchement préparés sont congelés dans l'azote liquide. Après décongélation, ils sont remis en suspension dans du NaCl 0.15 M et centrifugés comme ci-dessus. (4) Les membranes des globules lipidiques humains sont mises en suspension dans un tampon Tris  $\cdot$  HCl 10 mM, pH 7.2, à la concentration de 0.6 mg de protéine par ml. On ajoute alors du Triton X-100 pour obtenir des concentrations finales en détergent variant de 0 à 1 % (v/v). Après 3 min à 0 °C, on centrifuge 1 h à  $190\,000 \times g$ .

Les chromatographies sur gel sont effectuées à +4 °C sur colonne (2  $\times$  34 cm) d'Ultrogel AcA 44 (LKB, poids moléculaire d'exclusion 130 000) équilibré contre un tampon pipérazine/glycylglycine 50 mM, pH 6.7, contenant 0.3 % (v/v) de Triton X-100.

## RESULTATS

### *Action de divers traitements sur l'activité galactosyltransférase des membranes des globules lipidiques humains*

Les résultats obtenus dans une expérience-type sont rapportés dans le Tableau I. Les activités de transfert de galactose aux deux accepteurs exogènes sont dosées sur les membranes ayant subi les traitements décrits ci-dessus, ainsi que le taux de protéines restant. Le contrôle correspond aux membranes n'ayant pas été traitées.

Le lavage 1 (eau distillée, puis tampon Tris  $\cdot$  HCl, pH 8) ne libère que 10 % environ des protéines et n'entraîne aucune perte d'activité. Le lavage 2 (NaCl 1 M puis carbonate-bicarbonate de sodium) s'avère plus efficace puisqu'il libère environ 24 % des protéines initialement présentes; de plus, non seulement les activités de

TABLEAU I

## ACTION DE DIVERS TRAITEMENTS SUR L'ACTIVITE DE TRANSFERT DE GALACTOSE PRESENTE DANS LES MEMBRANES DES GLOBULES LIPIDIQUES HUMAINS

L'activité est exprimée en pmol de galactose transférées par min d'incubation, et par mg de protéines pour l'activité spécifique. Les différents traitements appliqués sont indiqués dans la section Matériel et Méthodes et correspondent à un traitement par l'eau distillée puis le tampon Tris · HCl 0.15 M, pH 8, pour le lavage (1), et à un traitement par NaCl 1 M et le bicarbonate-carbonate de sodium, 0.1 M, pour le lavage (2).

Traitements	Protéines (mg)	Activité de transfert de galactose			
		Sur <i>N</i> -acétylglucosamine		Sur fêtuine désialylée et dégalactosylée	
		Totale	Spécifique	Totale	Spécifique
Contrôle	4.4	932	212	211	48
Lavage (1)	4	1172	293	224	56
Lavage (2)	3.4	1220	359	238	70
Congélation-décongélation	4.2	892	212	214	51

transfert sont maintenues, mais on observe une nette activation, aussi bien sur fêtuine que sur *N*-acétylglucosamine. D'ailleurs, cette activation existe déjà, mais à un degré moindre après le lavage 1.

Quant à la congélation-décongélation, elle ne libère que quelques pourcents de protéines et n'entraîne pratiquement aucune perte d'activité. D'ailleurs, après ce traitement comme après les deux précédents, au maximum 10 % de l'activité furent décelés dans les surnageants obtenus.

Des résultats absolument similaires étaient observés avec 4 laits différents, les variations individuelles portant uniquement sur les valeurs absolues des activités de transfert.

*Action du Triton X-100 sur l'activité galactosyltransférase des membranes des globules lipidiques humains*

Dans une première expérience, on traite les membranes par le détergent, à des concentrations croissantes et on dose les activités de transfert de galactose directement dans la suspension. Les résultats obtenus sont présentés sur la Fig. 1. A partir des concentrations supérieures à 0.1 % (v/v), pour des quantités de protéines dans les milieux d'incubation respectifs de 54  $\mu$ g dans le cas de la fêtuine désialylée et dégalactosylée et 22  $\mu$ g dans le cas de la *N*-acétylglucosamine, le Triton permet de multiplier le transfert de galactose présent sans détergent, respectivement par 2 sur la *N*-acétylglucosamine et par 2.8 sur la fêtuine désialylée et dégalactosylée.

Dans un deuxième temps, nous avons recherché si le Triton permettrait de solubiliser l'activité de transfert. La première ligne du Tableau II donne les activités initiales dans les membranes. Après addition de Triton X-100 (0.3 %, v/v) et centrifugation, les activités galactosyltransférases se retrouvent dans le surnageant, avec une activation considérable; le culot membranaire ne conserve qu'un pourcentage limité des activités totales. Ainsi la galactosyltransférase des membranes des globules lipidiques humains présente une latence importante qui est définie de la façon suivante:

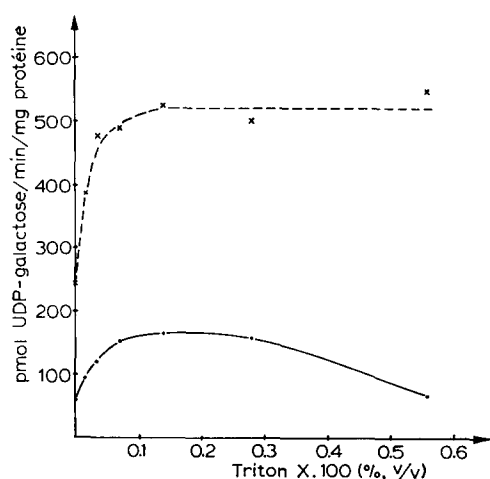


Fig. 1. Activation par le Triton X-100 du transfert de l'UDP-galactose à la fétuine désialylée et dégalactosylée (●-●) et à la *N*-acétylglucosamine (+---+) dans les membranes des globules lipidiques humains. L'activité est exprimée en pmol d'UDP-galactose libérées par min et pour 1 mg de protéine. La concentration en Triton est exprimée en pourcentage (v/v) dans les volumes d'incubation.

$$100 \times \frac{\text{activité en présence de détergent} - \text{activité sans détergent}}{\text{activité en présence de détergent}}$$

(Elle est déterminée pour la concentration optimale en détergent). La latence est d'environ 70 % sur la fétuine désialylée et dégalactosylée et 50 % sur la *N*-acétylglucosamine. En l'absence de Triton, une part importante de l'activité ne se manifeste pas, sans doute en raison de difficultés d'accessibilité des substrats, comme le montre le fait que la latence est beaucoup plus importante pour le substrat macromoléculaire.

Le Triton permet à cette activité de s'exprimer en même temps qu'il la libère des structures membranaires.

TABLEAU II

SOLUBILISATION PAR LE TRITON X-100 DE L'ACTIVITE DE TRANSFERT DE GALACTOSE DES MEMBRANES DES GLOBULES LIPIDIQUES HUMAINS

Fractions	Activité de transfert de galactose (pmol/min)	
	Sur <i>N</i> -acétylglucosamine	Sur fétuine désialylée et dégalactosylée
Suspension membranaire sans Triton (contrôle)	270	63
+ Triton X-100	550	170
Culot membranaire (après action du détergent et centrifugation)	84	23
Surnageant	448	175

*Activités de dégradation des substrats présentes dans les membranes des globules lipidiques humains*

Aucune activité  $\beta$ -galactosidase n'a pu être mise en évidence par le dosage colorimétrique de l'*o*-nitrophénol libéré. En utilisant les substrats radioactifs, moins de 0.5 % du galactose lié apparaît à l'état libre après 40 min d'incubation.

Par contre, une légère activité nucléotide-sucres pyrophosphatase se manifeste dans les conditions où l'on effectue le transfert, puisqu'environ 2 % de la radioactivité, initialement présente dans l'UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]-galactose, est retrouvée sous forme de galactose-1-phosphate. Là encore, il n'apparaît pratiquement pas de [ $^{14}\text{C}$ ]-galactose libre.

*Activité sialyltransférase*

Dans les conditions expérimentales précisées plus haut, 0.6 pmol d'acide sialique sont transférées sur fétuine désialylée par min d'incubation et par mg de protéines membranaires.

*Paramètres cinétiques du transfert de galactose*

Certaines conditions de fonctionnement (optimum 6.5–7 pour le pH et 32–36 °C pour la température; nécessité absolue d'un cation divalent, le manganèse (aucune activité en présence d'EDTA, ni avec du magnésium); cinétique linéaire pendant plus de 60 min) se retrouvent, que l'enzyme reste membranaire ou soit solubilisé par le Triton et quel que soit l'accepteur.

Pour l'enzyme soluble, des différences significatives apparaissent dans les valeurs des  $K_m$  apparents vis-à-vis du  $\text{Mn}^{2+}$ , de l'UDP-gal et des sites accepteurs, suivant que l'on transfère le galactose à la *N*-acétylglucosamine ou à la fétuine désialylée et dégalactosylée (Tableau III).

TABLEAU III

CONSTANTES DE MICHAELIS APPARENTES DE LA GALACTOSYLTRANSFERASE SOLUBILISÉE À PARTIR DES MEMBRANES DES GLOBULES LIPIDIQUES HUMAINS

Substrats	Accepteur	
	<i>N</i> -acétylglucosamine	Fétuine désialylée et dégalactosylée
$\text{Mn}^{2+}$	0.11 mM	0.38 mM
UDP-gal	17 $\mu\text{M}$	3.5 $\mu\text{M}$
Accepteur	5.5 mM	0.13 mM

La présence d'une activité endogène non négligeable et l'existence de la latence signalée plus haut ont empêché la détermination précise de ces constantes sur l'enzyme membranaire. En effet, une partie seulement de l'activité se manifestait alors et il y avait toujours compétition entre l'accepteur endogène et les accepteurs exogènes. Cependant, des différences similaires ont pu être observées, les  $K_m$  apparents de l'enzyme membranaire vis-à-vis de l'UDP-galactose étant approximativement de 17  $\mu\text{M}$  et 5.6  $\mu\text{M}$ , selon que l'on effectue le transfert respectivement sur *N*-acétylglucosamine et sur fétuine désialylée et dégalactosylée.

### Compétition entre les substrats accepteurs

Ces résultats amènent à envisager la présence, dans les membranes des globules lipidiques humains, de deux galactosyltransférases; elles catalyseraient le transfert du galactose à partir du même donneur, l'UDP-galactose, mais l'une à l'accepteur monosaccharidique, la *N*-acétylglucosamine, l'autre à l'accepteur glycoprotéique, la fétuine désialylée et dégalactosylée.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mis en compétition les deux accepteurs, en restant à des concentrations qui ne sont pas trop éloignées des  $K_m$  (Tableau IV). Ainsi, à une concentration constante en fétuine désialylée et dégalactosylée, des quantités croissantes de *N*-acétylglucosamine ont été ajoutées et le transfert de galactose à la fétuine a été déterminé. Dans ces conditions (concentration en UDP-gal, 13  $\mu$ M), une compétition importante apparaît, puisqu'on ne retrouve que 40 % de l'activité, en présence d'une concentration 6 mM en *N*-acétylglucosamine.

TABLEAU IV

EFFET DE LA COMPETITION ENTRE LES DEUX SUBSTRATS ACCEPTEURS, LA *N*-ACÉTYLGLUCOSAMINE ET LA FETUINE DESIALYLEE ET DEGALACTOSYLEE, SUR L'ACTIVITE DE TRANSFERT DE GALACTOSE SOLUBILISEE A PARTIR DES MEMBRANES DES GLOBULES LIPIDIQUES HUMAINS

Concentration en substrats accepteurs (mM)		Activité de transfert de galactose (pmol/min par mg de protéines)	
<i>N</i> -Acétylglucosamine	Fétuine désialylée et dégalactosylée	Sur <i>N</i> -acétylglucosamine	Sur fétuine désialylée et dégalactosylée
0	0.225		171
1	0.225		160
2	0.225		142
4	0.225		114
6	0.225		76
6	0	433	
6	0.055	400	
6	0.11	433	
6	0.22	391	
6	0.45	374	

L'expérience inverse, c'est-à dire concentration fixe en *N*-acétylglucosamine, dosage du transfert de galactose à cet accepteur en présence de concentrations croissantes en fétuine désialylée et dégalactosylée (concentration en UDP-gal, 110  $\mu$ M), montre une inhibition faible de l'ordre de 14 %.

Mais, il faut noter que dans ce cas les concentrations en glycoprotéine, exprimées en site accepteur, restent faibles par rapport à celles du substrat testé, la *N*-acétylglucosamine, bien qu'elles atteignent une valeur égale à quatre fois le  $K_m$ .

### Denaturation thermique

Des expériences d'inactivation par la température apportent un argument supplémentaire à l'unicité de la galactosyltransférase solubilisée. En effet une préincubation à 39 °C entraîne une perte d'activité identique pour le transfert de galactose sur l'un ou l'autre accepteur (Fig. 2).

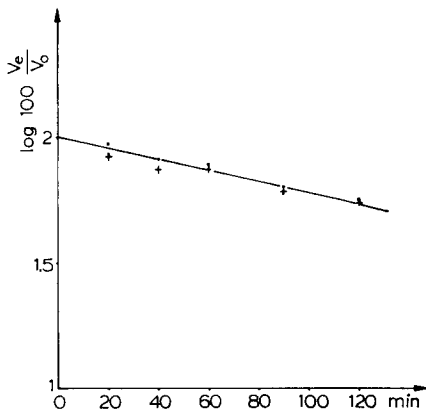


Fig. 2. Courbe de dénaturation thermique de la galactosyltransférase des membranes des globules lipidiques humains solubilisée par le Triton X-100 (voir Matériel et Méthodes). Des parties aliquotes de la solution enzymatique, maintenue à 39 ° C pendant le temps indiqué sont prélevées et dosées dans les conditions habituelles sur fétuine désialylée et dégalactosylée (●) et sur *N*-acétylglucosamine (+). On portera en ordonnées le logarithme du pourcentage d'activité restant ( $V_e/V_0$ ).

#### Chromatographie d'exclusion-diffusion

La courbe de filtration sur Ultrogel (Fig. 3) montre la présence de deux pics d'activité de transfert de galactose correspondants à des poids moléculaires apparents de 49 000 et 90 000. Là encore, on ne peut dissocier les deux activités de transfert solubilisées par le Triton puisqu'elles donnent des courbes d'élution similaires, leur rapport restant sensiblement constant dans chaque fraction.

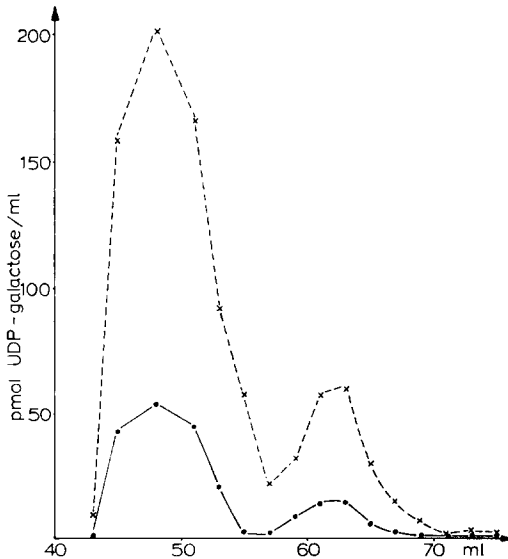


Fig. 3. Filtration sur Ultrogel ACA 44 de la galactosyltransférase des membranes des globules lipidiques humains solubilisée par le Triton X-100 (voir Matériel et Méthodes). Débit 40 ml/h. Fractions de 1 ml. Les dosages du transfert sur fétuine désialylée et dégalactosylée (—●) et sur la *N*-acétylglucosamine (+ --- +) ont été effectués sur des fractions aliquotes. Une courbe de calibration a été obtenue par filtration de protéines de poids moléculaires connus.



## DISCUSSION

Les divers lavages appliqués aux membranes des globules lipidiques humains sont connus pour éliminer des préparations membranaires les protéines solubles adsorbées, contenues à l'intérieur des vésicules formées au cours de l'homogénéisation ou liées à la membrane par des interactions ioniques. Ces traitements sont sans effet sur l'activité galactosyltransférase qui reste particulière. Il est ainsi confirmé que cette activité n'est pas due à une contamination par la galactosyltransférase soluble du lactosérum.

Comme la galactosyltransférase du foie de rat [19], l'enzyme reste entièrement membranaire après congélation-décongélation, ce qui permet de supposer qu'il est probablement implanté dans la couche bilipidique. Cette observation est corroborée par l'action du Triton, la mise en évidence d'une latence importante caractéristique des enzymes membranaires et le fait que l'activité n'est libérée totalement des membranes des globules lipidiques humains qu'à une concentration en détergent de 0.15 %, très supérieure à la concentration micellaire critique, 0.015 % [20].

Ainsi apparaît une différence fondamentale entre les membranes des globules lipidiques du lait humain et celles du lait bovin. Ces dernières sont, en effet, dépourvues d'activité de transfert de galactose, alors qu'elles contiennent une nette activité galactosidase [21]. Dans les mêmes conditions, les membranes des globules lipidiques humains ne possèdent pratiquement pas d'activité d'hydrolyse de galactosides; il est à noter qu'elles présentent une activité pyrophosphatase. Cette activité, signalée récemment dans des microsomes de foie de rat [22], avait été également mise en évidence dans la glande mammaire de rat [23]. Elle ne semble pas avoir été recherchée dans les membranes des globules lipidiques du lait bovin. Sa présence éventuelle pourrait expliquer l'absence apparente de galactosyltransférase, par suite de l'hydrolyse du substrat donneur, l'UDP-galactose.

Quels sont les rapports existants entre la galactosyltransférase des membranes des globules lipidiques humains et l'enzyme soluble du lait humain? Un article très approfondi est paru récemment sur les propriétés cinétiques de ce dernier enzyme [24]. Malheureusement, il ne nous a pas été possible de purifier, à partir des membranes des globules lipidiques humains, une quantité suffisante de galactosyltransférase solubilisée pour effectuer un tel travail. Nous avons simplement cherché à préciser quelques paramètres de fonctionnement de l'enzyme membranaire, en comparant plus particulièrement le transfert à la *N*-acétylglucosamine et le transfert à une glycoprotéine acceptrice; puisqu'il s'agit d'un enzyme membranaire, un rôle physiologique de cet enzyme dans la biosynthèse des chaînes polysaccharidiques des glycoprotéines peut être évoqué, à côté du rôle joué dans la biosynthèse du lactose.

Dans la synthèse de *N*-acétyl-lactosamine, les  $K_m$  apparents vis-à-vis de l'UDP-galactose ou de la *N*-acétylglucosamine sont du même ordre de grandeur que ceux trouvés dans la littérature, dans des conditions expérimentales similaires, pour l'enzyme soluble du lait humain [24, 25] ou du lait bovin [26]. Toutefois, l'intérêt de ces comparaisons reste limité et il n'est pas possible d'en tirer des conclusions définitives.

Un fait peut être noté: les valeurs des  $K_m$  apparents sont beaucoup plus faibles, lorsqu'il s'agit du transfert à une glycoprotéine. Les résultats suggèrent l'existence de deux galactosyltransférases différentes catalysant le transfert de galactose respectivement à un accepteur monosaccharidique et à un accepteur macromoléculaire. Les

expériences de compétition et de dénaturation thermique permettent d'éliminer cette hypothèse.

Par contre, la filtration sur gel montre que la galactosyltransférase des membranes des globules lipidiques humains existe sous deux formes moléculaires ne présentant pas de spécificité particulière vis-à-vis des dimensions de l'accepteur. Des résultats similaires ont été observés par filtration sur Biogel P-150 dans le colostrum bovin, porcin et le lait humain [27]. Les deux galactosyltransférases mises ainsi en évidence ont des poids moléculaires de 51 000 et 100 000, valeurs confirmées par électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate, 50 000 et 96 000 [24], et voisines de celles que nous avons obtenues. Ces espèces moléculaires, considérées comme étant un monomère et un dimère correspondraient à la forme polypeptidique présente dans les membranes golgiennes [27]. Cette hypothèse nous semble tout-à-fait plausible: le dimère, que nous avons toujours trouvé en plus forte concentration alors qu'il n'apparaît qu'en faible proportion dans la phase soluble du lait, pourrait représenter une espèce plus spécifiquement membranaire.

Les membranes des globules lipidiques humains contiennent donc plusieurs enzymes considérés comme caractéristiques de l'appareil de Golgi : la thiamine pyrophosphatase [9], la galactosyltransférase dont le caractère membranaire vient d'être confirmé, et la sialyltransférase mise en évidence dans ce travail.

Certes, il peut s'agir d'une simple contamination cytoplasmique dont on admet qu'elle peut atteindre 10 % des protéines totales dans les membranes des globules lipidiques [28]; mais, la présence d'éléments golgiens pourrait aussi n'être pas fortuite et dépendre étroitement du processus de sécrétion des lipides. Par des observations en microscopie électronique, Wooding [29] prétend que les membranes des globules lipidiques du lait caprin sont formées à partir des vésicules golgiennes seules. Ces conclusions sont controversées par Patton et Keenan [28] qui pensent que les globules lipidiques sont enveloppés par les membranes plasmiques au moment de leur décharge dans la lumière alvéolaire. L'absence d'enzymes marqueurs de l'appareil de Golgi dans les membranes du lait bovin supporte cette opinion.

Il est certain que la sécrétion des globules lipidiques est un phénomène encore mal connu. Dans le cas des membranes des globules lipidiques humains, il n'est pas exclu que le mécanisme de sécrétion mette en jeu l'appareil de Golgi et les membranes plasmiques puisque les activités enzymatiques caractéristiques de ces deux types de membranes y coexistent. Un fractionnement des membranes des globules lipidiques humains permettrait peut-être d'apporter des éclaircissements: par exemple, si les deux types d'activités enzymatiques ne pouvaient être dissociées, on pourrait en tirer argument en faveur d'une participation directe de l'appareil de Golgi à la sécrétion des globules lipidiques. Des recherches dans ce sens sont en cours au Laboratoire.

## RÉSUMÉ

Une galactosyltransférase catalysant le transfert de l'UDP-galactose à un accepteur glycoprotéique endogène, à la *N*-acétylglucosamine libre ou terminant les chaînes polysaccharidiques des glycoprotéines, ou à du glucose en présence d' $\alpha$ -lactalbumine, a été mise en évidence dans les membranes des globules lipidiques du lait humain. Divers traitements (lavage des membranes, congélation-décongélation) destinés à mettre en évidence le caractère membranaire de cet enzyme ont été employés.

L'action du Triton X-100 indique une latence importante de l'enzyme. Ce détergent a alors été employé pour la solubilisation de la galactosyltransférase et l'étude de ses principales caractéristiques. La compétition entre les substrats accepteurs et la courbe de dénaturation thermique indique la présence d'un seul enzyme catalysant le transfert sur la *N*-acétylglucosamine et sur la fétuine désialylée et dégalactosylée. Les activités de dégradation du substrat UDP-galactose sont très faibles par rapport aux membranes des globules lipidiques bovins. Plusieurs enzymes caractéristiques de l'appareil de Golgi se retrouvent dans les membranes des globules lipidiques humains. Le problème est de savoir si ces enzymes sont le reflet d'une contamination cytoplasmique ou, si la présence d'éléments golgiens n'est pas fortuite, dépendent du processus de sécrétion des lipides.

#### REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié de l'aide financière de la D.G.R.S.T. (Convention n° 74.7.0192).

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 Fitzgerald, D. K., McKenzie, L. et Ebner, K. E. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 235, 425-428
- 2 Coffey, R. G. et Reithel, J. F. (1968) *Biochem. J.* 109, 169-176
- 3 Morre, D. J., Merlin, L. M. et Keenan, T. W. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 813-819
- 4 Schachter, H., Jabbal, I., Hudgin, R. L., Pinteric, L., McGuire, E. J. et Roseman, S. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 1090-1100
- 5 Fleischer, B. et Fleischer, S. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 219, 301-319
- 6 Badad, H. et Hassid, N. Z. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 2672-2678
- 7 Brodbeck, U., Denton, W. L., Tanahashi, N. et Ebner, K. E. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 1391-1397
- 8 Brew, K. (1970) dans *Essays in Biochemistry* (Campbell, P. N. et Dickens, F. eds.) Vol. 6, pp. 93-118, Academic Press, London
- 9 Martel-Pradal, M. B. et Got, R. (1970) *FEBS Lett.* 21, 220-222
- 10 Plantz, P. E. et Patton, S. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 291, 51-60
- 11 Andrews, P. (1969) *Biochem. J.* 111, 14p-15p
- 12 Nagasawa, T., Kiyosawa, I. et Tanahashi, N. (1970) *J. Dairy Sci.* 54, 835-841
- 13 Martel-Pradal, M. B., Dubois, P. et Got, R. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 311, 565-575
- 14 Spiro, R. G. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 567-573
- 15 Keenan, T. W. et Huang, C. M. (1972) *J. Dairy Sci.* 55, 1013-1015
- 16 Freilich, L. S., Richmond, M. E., Reppucci, A. C. et Silbert, J. E. (1975) *Biochem. J.* 146, 741-743
- 17 Larsen, C., Dallner, G. et Ernster, L. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 1300-1306
- 18 Weihing, R. R., Manganiello, V. C., Chiu, R. et Philips, A. H. (1972) *Biochemistry* 11, 3128-3135
- 19 Berthillier, G., Coleman, R. et Walker, D. G. (1975) *Biochem. J.* (sous presse)
- 20 Helenius, A. et Simons, K. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 415, 29-79
- 21 Keenan, T. W. et Huang, C. M. (1972) *J. Dairy Sci.* 55, 1013-1015
- 22 Mookerjee, S. et Yung, J. W. M. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 166, 223-236
- 23 Palmiter, R. D. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 178, 34-46
- 24 Khatra, S. B., Herries, D. G. et Brew, K. (1974) *Eur. J. Biochem.* 44, 537-560
- 25 Kitchen, B. J. et Andrews, P. (1972) *FEBS Lett.* 26, 333-335
- 26 Schanbacher, F. L. et Ebner, K. E. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 5057-5061
- 27 Powell, J. T. et Brew, K. (1974) *Eur. J. Biochem.* 48, 217-228
- 28 Patton, S. et Keenan, T. W. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 415, 273-309
- 29 Wooding, F. B. P. (1973) *J. Cell. Sci.* 13, 221-235