

Institut National de la Recherche Agronomique
Jouy en Josas (Seine-et-Oise)
FRANCE

Les nucleotides acido solubles des laits de brebis, vache, chevre et truie *

par

R. Denamur, G. Fauconneau et G. Guntz

L'étude des composés puriques et pyrimidiques du lait et de la glande mammaire, nous a conduit à analyser les nucléotides acido-solubles des laits de différentes espèces. Ce travail souligne l'originalité de la composition nucléotidique du lait de vache par rapport aux autres laits étudiés.

Matériels et méthodes

Le lait de la traite complète (ou une fraction représentative dans le cas du lait de Vache), est refroidi immédiatement à 0° et soumis à quatre extractions par l'acide trichloracétique 10 % à 0-2°. Ce dernier est rapidement éliminé par agitation avec de l'éther froid (-5°) (quatre extractions v/v sont nécessaires). Une partie des extraits (2000 à 3000 D. O. pondérées à 260m μ) est soumise à l'analyse chromatographique (0-2°) sur colonne de Dowex-1 (1,7 x 30 cm) selon HURLBERT et coll. Le contrôle de la température est nécessaire afin d'éviter les hydrolyses sur colonne des composés labiles, ce qui entraînerait des artefacts dans de nombreux sommets (DENAMUR et coll., 1958). Une autre fraction de l'extrait est hydrolysé par l'acide chlor-

* Comunicación 6-2 a las V Jornadas Bioquímicas Latinas, Barcelona, mayo, 1959.

hydrique (pH 2) (45 min. 95°) pour éliminer les composés liés aux nucléotides, ce qui conduit à des histogrammes plus simples, permettant une meilleure estimation des bases.

Les sommets obtenus au cours des fractionnements primaires (cf. histogrammes 1-2-3-4) sont souvent complexes. Afin d'identifier les différents constituants qui les composent, les sommets sont débarrassés de l'acide formique par agitation avec de l'éther refroidi, et désalifiés (ion ammonium) avec un échangeur de cations sous forme H⁺ (permutite 50). Ils sont ensuite analysés soit par fractionnement secondaire sur colonne de Dowex 1, à l'aide d'un gradient formate d'ammonium, soit par chromatographie sur papier effectuée à 0-2° dans différents solvants : éthanol 95 %, acétate d'ammonium M (75 v/30, v, pH 7,5) -propanol ammoniacal (6 v/ 3 v/ 1 v) -acide isobutyrique ammoniacal 0,5N 10v/6v.

Les composés glucidiques liés aux nucléotides sont libérés par hydrolyse chlorhydrique (pH 2, 45 minutes, 95°). Nous avons contrôlé par chromatographie sur colonne de l'hydrolysat que ces conditions conduisent à la libération complète des composés liés dans le cas des U.D.P. Acétyl hexosamines, U.D.P. sucres, G.D.P. sucres.

Les bases puriques contenues dans les nucléotides ont été identifiées par chromatographie sur papier en isopropanol, acide chlorhydrique, eau (678 v/176 v/146 v), après hydrolyse par l'acide chlorhydrique normal à 100° pendant 1 heure. Le rendement des colonnes de Dowex 1 (exprimé en densités optiques pondérées) excède toujours 95 %. Pour le calcul des proportions des différents composés identifiés, nous avons utilisé les coefficients d'extinction molaire suivants à 260 mμ : adénosine 14,6 ; uridine 9,89 ; cytidine 7 ; guanosine 11,6 ; D.P.N. 18 ; acide orotique 4,2 ; inosine 7.

Resultats

Les histogrammes des fractionnement sur Dowex 1 représentent sensiblement les mêmes composés pour les laits de Brebis, de Chèvre et de Truie.

- A — le C.M.P. 5'
- B — le D.P.N.
- C — L'.A.M.P.5' et un composé à base de cystosine
- C' et C'' — des composés à base d'adénine
- E — le G.M.P. 5'
- E'' — l'I.M.P. 5'
- F — l'U.M.P. 5'

- F' — l'A.D.P. 5'
 G — l'acide orotique
 H — le G.D.P. mannose et le G.D.P. X1
 H' — le G.D.P. fucose et le D.D.P. X2 (X1 X2 sont des sucres ou oligosaccharides non identifiés, qui sont abondants dans les laits de Truie, de Chèvre et dans le colostrum de Brebis).
 K — l'U.D.P. acétyl glucosamine et l'U.D.P. acétyl galactosamine
 L — l'U.D.P. glucose et l'U.D.P. galactose
 L' — un composé à base d'adénine
 L'' — le G.D.P. 5'
 M — l'U.D.P. hexuronique
 N — l'U.D.P. 5'

TABLEAU I

Composition nucleotidique du lait de differentes espèces

	$\frac{\text{D.O. pondérée à 260}}{\text{D.O. p. totale à 260}} \times 100$			
	brebis (38è jour)	chèvre (fin lactation)	truie (mélange 30-45 j)	vache (30è jour)
C. M. P.	0,46	1,42	0,52	4,08
D. P. N.	1,45	1,345	2,08	
Dérivé Orotique	0,235	1,065		19,19
A. M. P.	8,74	7,44	1,05	3,18
A X 1	0,37		3,35	
G. M. P.	0,01	0,68	0,90	4,0 *
I. M. P.	0,27	1,61		
U. M. P.	2,25	1,61	6,20	
A. D. P.	0,10		0,30	5,0 *
Acide Orotique	0,515	3,10		36,85
G. D. P. mannose	3,27	7,59	2,70	
G. D. P. fucose	4,02	7,45	11,35	
U. D. P. Acetyl hexosamines	20,30	17,98	20,15	2,50 *
U. D. P. Sucres	48,96	39,11	0,39	2,31 *
G. D. P	1,39		39,0	
A X 5	2,33		3,50	
U.D.P.				
U.D.P. hexuronique	1,97	4,39	5,70	2,50 *

L'histogramme de l'extrait acido-soluble du lait de Vache ne montre que quelques composés communs avec les autres laits: A-B'-C-E-F'-G. Le lait de Vache est très pauvre en nucléotides

liés à des sucres ou à d'autres dérivés (H-H'-K-L-M), par contre il contient un composé non identifié (B') qui est sans doute un dérive orotique (spectre U.V., absence de phosphore).

TABLEAU II

Repartition des bases contenues dans les nucleotides acido-solubles des laits de differentes especes

		Brebis 38 ^e mejour de lactation	Chèvre fin de lactation	Vache 30 ^e me jour de lactation	Truie mélange 30-45 ^e me jour de lactation
Micromolécules Totales dans 100 cc de lait		340	121	48	309
% micromolécules totales	Adénine	97	6,2	6,55	3,7
	Guanine	8	13,5	2,4	16,7
	Uracil	77	66	4,5	77,3
	Cytosine	1	2,3	5,3	1
	Hypoxanthine	0,4	2,3	0	—
	Acide-orotique et dérivés	3,7	9,0	81,2	0
	D P N	0,83	0,73	0,12	1,2

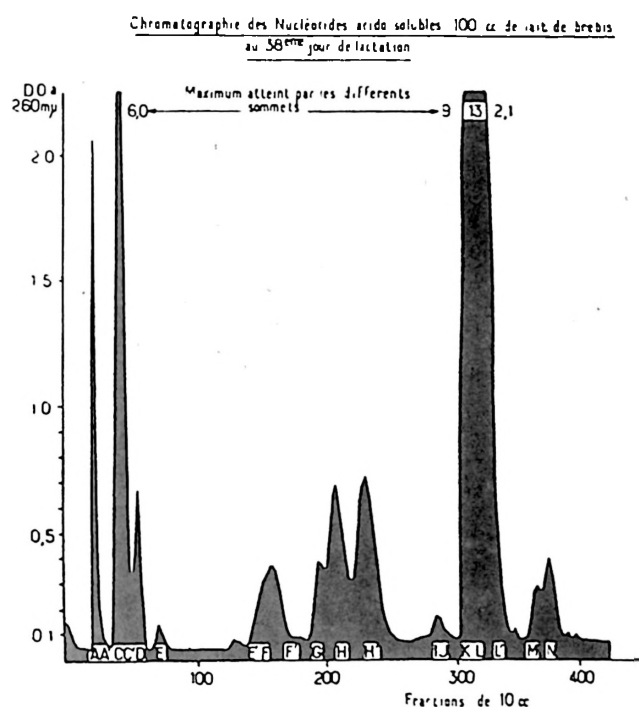
Les résultats de l'analyse quantitative des extraits acido-solubles sont résumés dans les tableaux I et II (chaque résultat représente la moyenne de 3 estimations). La quantité de nucléotides totaux trouvée dans les laits de Brebis, Chèvre et Truie représente 120 à 380 micro-molécules par 100 cc de lait. La teneur en nucléotides acido-solubles varie avec le stade de lactation chez la Brebis (DENAMUR et coll., 1958). Par contre la lait de Vache est beaucoup plus pauvre que celui des autres espèces (48 micro-molécules par 100 cc au maximum de la lactation).

Les laits de Brebis, Chèvre et Truie sont particulièrement riches en pyro-phosphate A de l'uridine, liés à divers composés glucidiques :

— Les uridines diphosphates -glucose et -galactose représentent respectivement, dans les 3 espèces : 49, 39, 39 % des densités optiques pondérées totales des nucléotides identifiés. L'U.D.P. galactose est le plus abondant et le rapport U.D.P. galactose/U.D.P. glucose est 2 - 1,48 - 2,88.

— Les uridines diphosphates acétyl hexosamines contiennent les deux sucres aminés glucosamine et galactosamine et correspondent à 20,3-18,0-20,0 % des densités optiques pondérées totales.

— Les uridines diphosphates hexuroniques sont présents dans les trois laits mais ils sont difficiles à séparer quantitativement de l'U.D.P. par suite de leur labilité au cours de la chromatographie sur papier.



— Au total, l'ensemble des composés U.D.P. liés à des dérivés glucidiques représente plus de 60 % des densités optiques pondérées totales.

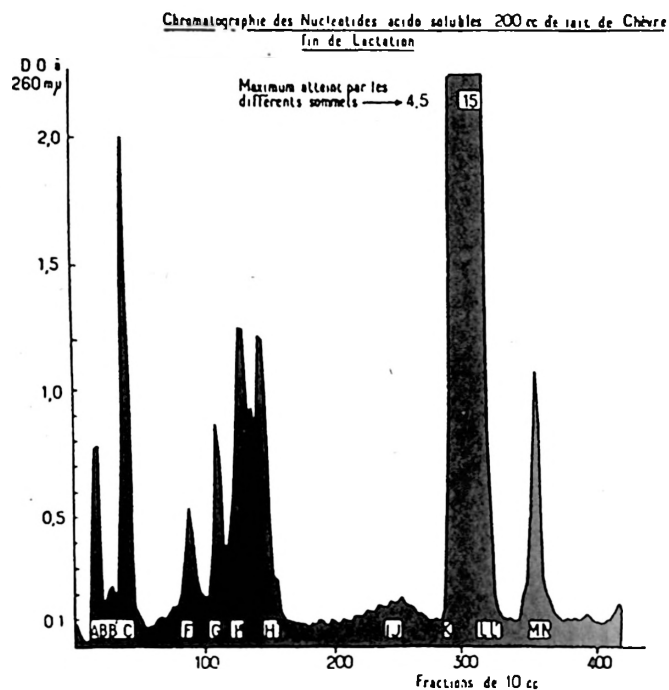
Les laits de Brebis, Chèvre et Truie contiennent en outre des pyrophosphates de la guanosine liés à des sucres :

— la guanosine diphosphate mannose est particulièrement abondante dans le lait de Chèvre (7,6 % contre 3,2 et 2,7 % dans les laits de Brebis et de Truie) ;

— le guanosine diphosphate fucose dont le lait de Truie est très riche (11,3 % contre 4,0 et 7,6 %).

Nous avons cependant montré que les teneurs en G.D.P.

Fucose du lait de Brebis sont fonction de l'activité sécrétoire de la glande (DENAMUR et coll., 1958, Vienne) et que le lait de Brebis en fin de lactation contient 11 % de G.D.P. fucose.



Graphique II

Les uridines et guanosines monophosphates et diphosphates libres sont peu abondants dans les trois laits étudiés. Nous n'avons pas pu mettre en évidence des nucléotides triphosphates.

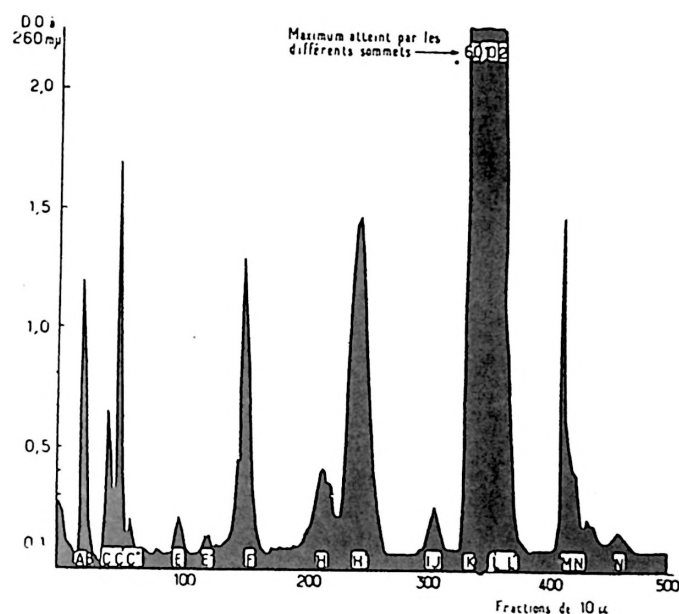
Les nucléotides de l'adénosine sont surtout représentés par l'A.M.P. 5' dans les laits de Brebis et de Chèvre (8,7 et 7,4 % contre 1,0 % dans le lait de Truie). Un autre dérivé non identifié, à base d'adénine C' (3,35 %) est important dans le lait de Truie et le lait de Brebis au maximum de la lactation contient des quantités assez importantes d'un composé L' à base d'adénine (2,3 %).

Il existe peu de nucléotides contenant de la cytosine dans les laits de toutes les espèces étudiées. Le C.M.P. 5' est le plus important.

L'inosine 5' monophosphate a été identifié dans le lait des 3 espèces, mais il est surtout abondant dans celui de Chèvre (1,6 %).

L'acide orotique n'a pas été mis en évidence dans le lait de Truie, mais il existe en faible quantité dans les laits de Brebis et de Chèvre (1,5 et 3,1 %) ; cependant il constitue la plus grande partie des composés identifiés dans le lait de Vache (36,8 %). Celui-ci contient en outre un autre dérivé orotique B' (19,2 %). La somme de ces deux composés représente 81 % des micro-molécules totales des composés trouvées dans le lait de Vache. Les autres constituants identifiés sont le C.M.P. 5'

Chromatographie des Nucléotides acido solubles 100 cc de lait de truie



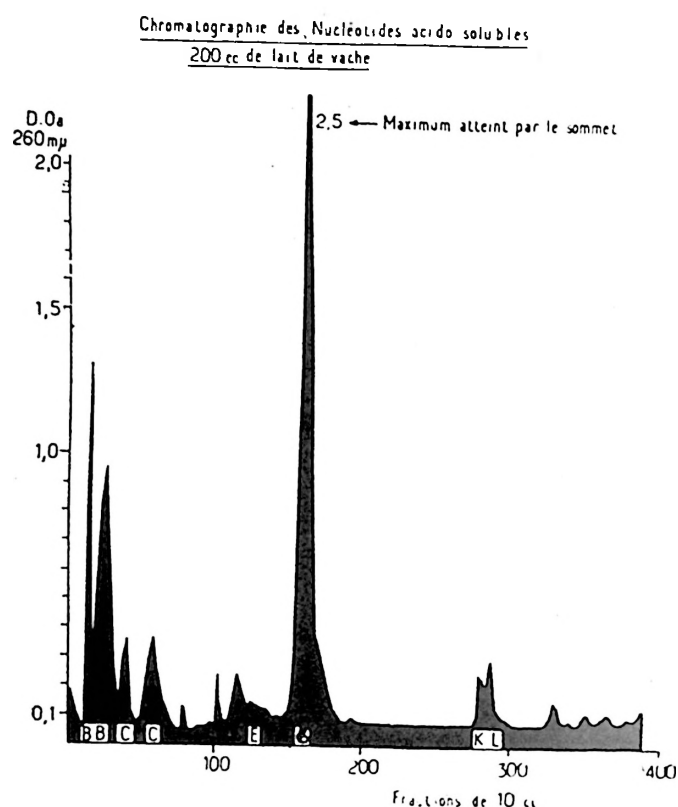
Graphique III

(4,08 %), le D.P.N. (0,39 %) et l'A.M.P. 5' (3,18 %). Les autres composés isolés n'ont pu être identifiés avec certitude (tableau I).

Nous avons montré que les laits de Brebis, Chèvre et Truie contiennent principalement des diphosphates de l'uridine et de la guanosine liés à des dérivés glucidiques (70-75 % D.O. totales). Tous ces composés ont été identifiés dans la glande mammaire de Brebis en lactation (DENAMUR et coll., 1959) où leur proportion est cependant beaucoup plus faible que dans le lait (12 % contre 70 %).

L'originalité de la composition nucléotidique du lait de Vache est difficilement interprétable car les constituants nucléotidiques de la glande mammaire de Vache ne paraissent pas très diffé-

rents de ceux de Chèvre (MANSON, 1956 ou de Brebis (DENAMUR et coll., 1959). Les différences fondamentales trouvées dans les laits de ces espèces pourraient être liées à la nature des phénomènes sécrétoires de chaque espèce ou, à des évolutions d'origine enzymatique du contenu nucléotidique des laits au



Graphique IV

cours de leur stockage dans la glande mammaire. Cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée chez la Brebis. Les laits obtenus par traites répétées à l'ocytocine ont des contenus nucléotidiques peu différents de ceux du lait de la traite normale bien qu'ils se rapprochent légèrement de la composition nucléotidique de la glande mammaire. Le D.P.N. est plus abondant (3,6 contre 1,3 %) et les proportions de l'uridine diphosphate glucose sont plus grandes que celles de l'U.D.P. galactose ; cependant les teneurs en diphosphates de l'uridine et de la guanosine liées à des composés glucidiques restants très importants, (65 %).

Resume

Les nucléotides acido solubles sont isolés par fractionnement à 0-2° C. sur colonne Dowex 1. L'identification des différents sommets est basée sur les techniques habituelles de la chimie des nucléotides. Les glucides liés aux nucléotides sont identifiés après hydrolyses acides, chromatographie sur papier et inophorèse.

Les laits de Brebis, Chèvres et Truies présentent une absorption ultra-violet totale à 260 m μ de 1.500 à 4.000 densité optique pondérée par 100 c. c. de lait. Le spectre ultra-violet du lait de Vache est différent de celui des laits des autres espèces étudiées et l'absorption ultraviolette totale n'atteint en moyenne que 700 densité optique pondérée à 260 m μ par 100 c. c.

Les laits de Brebis (38ème jour de lactation), Chèvre (fin de lactation) et Truie (30-45ème jour de lactation) contiennent principalement des pyrophosphates de l'uridine (77 %, 66 %, 77,3 % des micromolécules totales). Le lait de Vache, au contraire, est très pauvre en nucléotides de l'uridine (4,5 %), par contre, l'acide orotique et des dérivés non identifiés de ce dernier, représentent 81,2 % des micromolécules totales.

La teneur en nucléotides de la cytidine (principalement le CMP 5') est élevée dans le lait de Vache (5,3 %), les laits de Chèvre, de Brebis et de Truie n'en contiennent que 3,9 %, 1 % et 1 %.

Les nucléotides de la guanosine sont abondamment représentés dans les laits de Brebis, de Truie et de Chèvre (8 %, 16,7 %, 13,5 %) le lait de Vache n'en referme que 2,4 %.

Enfin, le lait de Truie paraît plus pauvre en nucléotides de l'adénosine (3,7 %) que les laits de Brebis (9,5 %), Chèvre (6,2 %) Vache (6,5 %). L'IMP est surtout présent dans le lait de Chèvre (2,3 %). Le DPN représente dans les laits de Truie, de Vache et de Chèvre : 1,2 %, 0,12 %, 0,73 % des micromolécules totales.

Les nucléotides liés à des sucres que nous avons identifiés dans les laits de Brebis, Chèvre et Truies, sont les suivants :

—L'Uridine diphosphate glucose et l'Uridine diphosphate galactose dont la somme représente 48 %, 39 %, 39 % des densités optiques totales. Le rapport galactose sur glucose est de 2, 1,48, 2,88.

—Les Uridines diphosphates hexosamines : 20,3 %, 17,98 %, 20,15 %.

—Les Uridines diphosphates hexuroniques : 0,67 %, 4,39 %, 5,7 %.

—Le Guanosine diphosphate mannose : 3,7 %, 7,59 %, 2,7 %.

—Le Guanosine diphosphate fucose : 4,02 %, 7,45 %, 11,35 %.

—Enfin, les sommets de Guanosine diphosphate mannose et de Guanosine diphosphate fucose dans les colostrum de Brebis et dans les laits de Chèvres et de Truies, contiennent plusieurs autres sucres et oligosaccharides, en cours d'identification.

Summary

Acid-soluble nucleotides of ewe's, cow's, goat's and sow's milks

The acid-soluble nucleotides are separated by partition at 0-2° on Dowex 1 column. Identification of different peaks is based on usual techniques of the chemistry of nucleotides. The

nucleotide linked carbohydrates are identified after acid hydrolysis, paper chromatography, and ionophoresis.

Ewe's, goat's and sow's milks give a total ultra-violet absorption at 260 m μ from 1.500 to 4.000 of weighted optical density per 1.000 cm³ of milk. The ultra-violet spectrum of cow's milk is different from the spectra of milks of other studied species and its total absorption amounts only to 700 of weighted optical density at 260 m μ per 100 cm³.

Milks from the ewe (38 th day of lactation) from the goat (end of lactation) and from the sow (30th 45 th day of lactation) contain mostly uridine-pyrophosphates linked to carbohydrate-derivatives (77 %, 66 %, 77,3 % of total micromolécules). Milk from the cow on the contrary is very poor in uridine nucleotides (4,5 %) ; but, inversely, orotic acid and its some non-identified derivatives represent 81,2 % of the total micromolecules.

Bibliographie

- HURLBERT, R. B., SCHMITZ, H. BRUMM, A. F. et POTTER, V. R. : *J. Biol. Chem.*, **209**, 23, 1954.
- DENAMUR, R., FAUCONNEAU, G. et GUNTZ, G. : *C. R. Acad. Sci.*, **246**, 492, 1958.
- DENAMUR, R., FAUCONNEAU, G. et GUNTZ, G. : *C. R. Acad. Sci.*, **246**, 652, 1958.
- DENAMUR, R., FAUCONNEAU, G., et GUNTZ, G. : *C. R. Acad. Sci.*, **246**, 2.820, 1958.
- DENAMUR, R., FAUCONNEAU, G. et GUNTZ, G. : *Cong. Int. Biochimie*, Vienne, 1958.
- MANSON, W., *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, 398, 1956.
- DENAMUR, R., FAUCONNEAU, G. et GUNTZ, G. : *C. R. Acad. Sci.*, **248**, 2.531, 1959.