

N° d'ordre : 486

50376
1980
21

50376
1980
21

MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

Option Biochimie

par

Joël MAZURIER



RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

Présenté le 30 juin 1980 devant la Commission d'Examen

M. J. MONTREUIL Président

Mme J. YON-KAHN

Mme G. SPIK

M. G. BISERTE

M. J.M. LHOSTE Rapporteurs

M. P. JOLLES

M. C. GHELIS Examineurs



030 034087 8

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R.DEFRETIN, H.LEFEBVRE, M.PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS - 1ère Classe

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Jean	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale

M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. POUZET Pierre	Analyse Numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BOBE Bernard	Sciences Economiques
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BOIVIN Jean-Claude	Chimie Minérale
M. BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Sciences de la Terre
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M. COURBIS Bernard	Sciences Economiques
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. CRAMPON Norbert	Sciences de la Terre
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mme DACHARRY Monique	Géographie
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale

M. DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M. DEPREZ Gilbert	Physique du Solide et Cristallographie
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Physique
M. DUBRULLE Alain	Physique
M. DUEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FOCT Jacques	Génie Mécanique
M. FONTAINE Hubert	Physique
M. FONTAINE Jacques	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie Structurale
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREVET Patrick	Sciences Economiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. HOUDART René	Mathématiques
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JOURNAL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEMAIRE Jean	Physique
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Méthodologie
M. LEROY Yves	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et Biochimie Appliquée
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Organique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PETIT Francis	Chimie Organique, Minérale et Analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. PORCHET Maurice	Biologie
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RICHARD Alain	Biologie

M. RIETSCH François	Chimie
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SALAMA Pierre	Sciences Economiques
Mme SCHWARZBACH Yvette	Mathématiques
M. SCHAMPS Joël	Physique
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Biologie
M. THERY Pierre	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. VILETTE Michel	Résistance des Matériaux
M. WALLART Francis	Chimie
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
M. WERNER Georges	Informatique Fondamentale Appliquée
Mme ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

A MES PARENTS,

A CLAUDINE,

PEGGY *et* QUENTIN.

Ce travail a été réalisé sous la direction du Professeur Geneviève SPIK dans le Laboratoire de Chimie Biologique (Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 217) de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I.

MADemoiselle LE PROFESSEUR SPIK. Geneviève, tu m'as accueilli dans ton équipe et m'as confié le soin de poursuivre les recherches que toi-même avais naguère entreprises sur la lactotransferrine du lait de Femme. Tes grandes connaissances et ton ardeur au travail m'ont profondément marqué. Par tes conseils et par ta constante sollicitude, par ta patience et par ta gentillesse, tu m'as aidé tout au long de ce travail. Sois assurée de ma profonde reconnaissance et de mon amitié.

MONSIEUR LE PROFESSEUR MONTREUIL, vos qualités de meneur d'hommes et la clarté de votre enseignement ont toujours suscité mon admiration. C'est pour moi une grande joie de faire partie de ce Laboratoire que vous avez créé et que vous dirigez avec enthousiasme. Je vous suis reconnaissant des nombreux conseils que vous m'avez prodigués et du soutien que vous m'avez toujours apporté. Je tiens ici à vous exprimer ma respectueuse gratitude.

MADAME LE PROFESSEUR YON-KAHN, malgré vos nombreuses occupations, vous me faites l'honneur de bien vouloir juger cette thèse. Vous avez contribué dans une large mesure à l'évolution de ma carrière. Soyez assurée de ma reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR BISERTE, vous avez toujours suivi nos travaux avec beaucoup d'intérêt et de bienveillance. Vous m'avez fait l'honneur d'accepter d'être Rapporteur de cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

MONSIEUR LE DOCTEUR LHOSTE, vous m'avez fréquemment accueilli, et toujours avec bienveillance, dans votre Laboratoire. Vous m'avez ainsi permis de mener à bien une partie de ce travail. Soyez remercié et trouvez ici le témoignage de mon sincère attachement.

MONSIEUR LE PROFESSEUR JOLLES, votre haute compétence et votre disponibilité ont été essentielles pour la réalisation de ce travail. Vous avez accepté une collaboration qui nous permettra, j'en suis convaincu, de mener à son terme la détermination de la séquence peptidique de la lactotransferrine. Soyez remercié et croyez en mon profond respect.

MONSIEUR LE DOCTEUR GHELLIS, vos précieux conseils ont été déterminants dans la progression de mes recherches. C'est avec gratitude que je vous remercie d'avoir accepté de juger cette thèse.

C'est avec plaisir que je remercie tous ceux qui ont rendu possible ce travail :

MADAME LE DOCTEUR J. JOLLES *et* MADAME M.H. METZ-BOUTIGUE pour leur amicale et fructueuse collaboration,

MADAME LE DOCTEUR M. KRYSIEVA, MADAME LE DOCTEUR M.H. LOUCHEUX *et* MONSIEUR J.P. AUBERT qui m'ont aidé à réaliser les études de conformation,

MONSIEUR LE PROFESSEUR T. PETERS *et* MONSIEUR T. COX grâce auxquels nous avons pu découvrir le récepteur entérocytaire de la lactotransferrine.

J'adresse mes plus vifs remerciements à MESDAMES C. ALONSO, M. BEN AISSA, M. CONTEZ, R. DEBRAY *et* à MESSIEURS J.P. DECOTTIGNIES *et* Y. LEROY ainsi qu'à MESDAMES J. CELEN, J. CLERSON, B. MAHIEU *et* M. LEFEBVRE pour leur précieuse collaboration technique.

Que tous mes camarades du Laboratoire, *et* en particulier "ceux du 103", soient assurés de mon amitié.

INTRODUCTION	1
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">GENERALITES</div>	
I - <u>PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU FER</u>	5
A - GENERALITES	5
B - STRUCTURE ELECTRONIQUE ET STEREOCHIMIQUE DU FER	5
C - COMPLEXATION ET HYDROLYSE	7
II - <u>REPARTITION DU FER DANS L'ORGANISME</u>	9
A - REPARTITION PONDERALE	9
B - FORMES DE TRANSPORT	9
C - FORMES DE RESERVE	16
III - <u>PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES TRANSFERRINES</u>	20
A - MASSE MOLECULAIRE	20
B - COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE EN OSES	20
C - COMPOSITION EN ACIDES AMINES	20
IV - <u>ETUDE DES DEUX SITES DE FIXATION DU FER</u>	23
A - PROPRIETES PHYSIQUES GENERALES DU SITE METALLIQUE	25
B - LE SITE ANIONIQUE	28
C - DIFFERENCE ENTRE LES DEUX SITES DE FIXATION DU METAL	31
D - DISTANCE ENTRE LES DEUX SITES	33
E - NATURE DES LIGANDS IMPLIQUES DANS LA FIXATION DU METAL ET DE L'ANION	33
V - <u>STRUCTURE DE LA PARTIE PEPTIDIQUE DES TRANSFERRINES</u>	35
A - STRUCTURE COVALENTE	35
C - CONFORMATION DES TRANSFERRINES	40

VI - <u>STRUCTURE ET CONFORMATION DES GLYCANNES DES TRANSFERRINES</u>	45
A - STRUCTURE PRIMAIRE	45
B - CONFORMATION	52
VII - <u>ROLE DES TRANSFERRINES DANS LA REGULATION DU METABOLISME DU FER</u>	52
A - RELATION ENTRE FORMES DE RESERVES ET FORMES ACTIVES	52
B - ABSORPTION DU FER	64
VIII - <u>FER, TRANSFERRINE ET INFECTION</u>	74
A - ACTION AU NIVEAU DU METABOLISME DU FER	75
B - LIBERATION DES TRANSFERRINES AU LIEU DE L'AGRESSION	77

RESULTATS PERSONNELS

CHAPITRE I

SPECIFICITE DE RECONNAISSANCE DES CELLULES CIBLES PAR LA LACTOTRANSFERRINE ET LA SEROTRANSFERRINE

I - <u>INTRODUCTION</u>	81
II - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	82
A - PREPARATION DES CELLULES CIBLES, ENTEROCYTES ET RETICULOCYTES	83
B - INCUBATION DES CELLULES	83
C - EXPRESSION DES RESULTATS	84
III - <u>RESULTATS</u>	
A - SPECIFICITE DE RECONNAISSANCE PAR LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE D'UN RECEPTEUR MEMBRANAIRE AU NIVEAU DU RETICULOCYTE HUMAIN	85

B - SPECIFICITE DE RECONNAISSANCE PAR LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE D'UN RECEPTEUR MEMBRANAIRE AU NIVEAU DE L'ENTEROCYTE HUMAIN	87
--	----

IV - <u>CONCLUSIONS</u>	94
-------------------------	----

CHAPITRE II

ETUDE COMPAREE DE LA CONFORMATION DE LA LACTOTRANSFERRINE ET DE LA SEROTRANSFERRINE ET DES MODIFICATIONS INDUITES PAR L'ELIMINATION DU FER

I - <u>INTRODUCTION</u>	96
-------------------------	----

II - <u>ETUDE COMPAREE DES SPECTRES DICHROIQUES</u>	97
---	----

A - MATERIEL ET METHODES	97
--------------------------	----

B - RESULTATS	98
---------------	----

C - CONCLUSIONS	102
-----------------	-----

III - <u>LOCALISATION DES RESIDUS DE TYROSINE ET DE TRYPTOPHANE</u>	
---	--

A - MATERIEL ET METHODES	102
--------------------------	-----

B - RESULTATS	104
---------------	-----

C - CONCLUSIONS	106
-----------------	-----

IV - <u>ETUDE DE LA DENATURATION PAR LE CHLORYDRATE DE GUANIDINE</u>	
--	--

A - MATERIEL ET METHODES	107
--------------------------	-----

B - RESULTATS	107
---------------	-----

C - CONCLUSIONS	113
-----------------	-----

V - <u>DISCUSSION</u>	114
-----------------------	-----

CHAPITRE III
DEMONSTRATION DE LA NON IDENTITE DES SITES DE
FIXATION DU METAL DES TRANSFERRINES

I - <u>INTRODUCTION</u>	115
II - <u>DEMONSTRATION DE LA PARTICIPATION DE L'HISTIDINE DANS</u> <u>LA COORDINATION DU METAL</u>	116
A - HISTORIQUE	116
B - ACTION DE LA CARBETHOXYLATION SUR LA CAPACITE DE FIXATION DU METAL	116
C - SPECIFICITE DE LA REACTION	123
D - CINETIQUE ET STOCHIOMETRIE DE LA REACTION	127
E - LOCALISATION DU SITE MODIFIE PAR LE DIETHYL-PYROCARBONATE	134
F - CONCLUSIONS	141
III - <u>DIFFERENCE DE STABILITE DES DEUX SITES DE LA LACTOTRANS-</u> <u>FERRINE EN FONCTION DU PH ET DE LA FORCE IONIQUE</u>	141
A - ELIMINATION SEQUENTIELLE DU FER	141
B - FIXATION SEQUENTIELLE DU FER PAR LA LACTOTRANSFERRINE	150
IV - <u>CONCLUSIONS</u>	155

CHAPITRE IV
RECHERCHES SUR LA STRUCTURE PRIMAIRE DE LA
CHAINE PEPTIDIQUE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

Première partie

I - <u>INTRODUCTION</u>	156
II - <u>COUPURES ENZYMATIQUES MENAGEES</u>	157
A - INTRODUCTION	

B - ISOLEMENT DES FRAGMENTS N- ET C-TERMINAUX	158
C - PRINCIPALES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES FRAGMENTS OBTENUS	165
D - CONCLUSIONS	168
III - <u>ISOLEMENT, PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES ET REENCHAINEMENT DES FRAGMENTS BrCN DE L'APOLACTOTRANSFERRINE</u>	
A - INTRODUCTION	170
B - FRACTIONNEMENT DES FRAGMENTS BrCN DE LA FRACTION C DE L'APOLACTOTRANSFERRINE TRAITEE AU BrCN	171
C - PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES FRAGMENTS OBTENUS APRES ACTION DU BrCN ET RUPTURE DES PONTS DISULFURES DE LA LACTOTRANSFERRINE	174
D - REENCHAINEMENT DES FRAGMENTS BrCN DE LA LACTO- TRANSFERRINE	180
IV - <u>CONCLUSIONS</u>	188
<u>Deuxième partie</u>	188
I - <u>INTRODUCTION</u>	191
II - <u>SEQUENCE PEPTIDIQUE COVALENTE PARTIELLE DE LA LACTOTRANS- FERRINE HUMAINE - HOMOLOGIES AVEC LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE</u>	191
A - SEQUENCE PEPTIDIQUE PARTIELLE DES FRAGMENTS FI, FII, FIII, F IV et F V'	191
B - SEQUENCE PEPTIDIQUE N-TERMINALE DES FRAGMENTS F'V, FVI ET VB	214
III - <u>STRUCTURE SECONDAIRE DES SEQUENCES PEPTIDIQUES AU VOISINAGE DU POINT D'ATTACHE DES GLYCANNES</u>	
A - INTRODUCTION	214
B - PREDICTION DES STRUCTURES SECONDAIRES	215
C - CONCLUSIONS	217

VI - CONCLUSIONS GENERALES

218

VII - BIBLIOGRAPHIE

VIII - APPENDICE TECHNIQUE

APPENDICE TECHNIQUE

I - <u>PREPARATION DES TRANSFERRINES</u>	1
A - PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE NATIVE	1
B - PREPARATION DE L'APOLACTOTRANSFERRINE	2
C - PREPARATION DES TRANSFERRINES SATUREES EN METAL	2
II - <u>MILIEUX D'INCUBATION</u>	3
III - <u>MODIFICATIONS CHIMIQUES</u>	4
A - COUPURE DES PONTS DISULFURES	4
B - COUPURE DES LIAISONS METHIONYLES PAR LE BrCN	5
C - CARBETHOXYLATION	12
D - MARQUAGE RADIOACTIF DES TRANSFERRINES	12
IV - <u>ANALYSE CHIMIQUE</u>	13
A - DOSAGE DES METAUX	13
B - ANALYSE DE LA COMPOSITION MOLAIRE EN MONOSACCHARIDES	14
C - ANALYSE DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX	15
D - ANALYSE DES ACIDES AMINES C-TERMINAUX	18
V - <u>ANALYSE PHYSIQUE</u>	19
A - ULTRACENTRIFUGATION A L'EQUILIBRE DE SEDIMENTATION	19
B - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE	21

INTRODUCTION

La découverte de la lactotransferrine dans le lait de femme, par Montreuil et al. en 1960 (MONTREUIL et MULLET (1), MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (2)) a ouvert la voie, au laboratoire, à un ensemble de recherches qui portent, d'une part, sur l'étude structurale des transferrines, glycoprotéines impliquées dans le transport du fer et, d'autre part, sur la compréhension de divers mécanismes comme l'érythropoïèse, l'absorption intestinale du fer et la défense de l'organisme contre les agressions virales et bactériennes, mécanismes dans lesquels le rôle des transferrines s'est révélé primordial.

Les premières années qui ont suivi la découverte de la lactotransferrine ont été consacrées à la mise au point de procédés d'isolement et à l'analyse comparée des propriétés physico-chimiques de la chaîne polypeptidique, des groupements glycaniques et des sites de fixation du fer de la sérotransferrine et de la lactotransferrine humaines. Les résultats qui ont été rassemblés dans la thèse de G. SPIK (3) ont permis de démontrer que, malgré les analogies qui existent entre les 2 transferrines, la spécificité immuno-chimique de ces deux molécules reposait sur des bases physico-chimiques nettement distinctes.

Notre travail, commencé en 1973, fait suite à ces recherches et a consisté à reprendre l'étude comparative des deux transferrines. En particulier, nous nous sommes orientés, d'une part, vers la détermination de la séquence primaire de la chaîne polypeptidique de la lactotransferrine, vers l'analyse comparée de la conformation des deux transferrines, avec et sans fer, et vers l'étude comparée des sites de fixation du métal.

D'autre part, nous avons utilisé ces données pour essayer d'expliquer à l'échelle moléculaire la spécificité de reconnaissance de la lactotransferrine par des récepteurs membranaires de l'entérocyte

humain, spécificité de reconnaissance que nous avons été les premiers à mettre en évidence.

Pour réaliser notre travail, qui a fait appel à une expérimentation d'ordre aussi bien physico-chimique que biologique, nous avons bénéficié de la collaboration efficace et fructueuse des équipes des Professeurs JOLLES et PETERS, ainsi que de celles de Madame LOUCHEUX et de Monsieur LHOSTE.

Les résultats que nous avons obtenus ont permis de préciser, sur des bases moléculaires, la nature des ressemblances et des différences que présentent les deux transferrines. Ils marquent la troisième étape dans l'étude des transferrines entreprise au laboratoire et constituent un nouveau point de départ de recherches qui devraient conduire à la connaissance des structures secondaire et tertiaire de ces molécules ainsi qu'à une meilleure définition des sites d'interaction avec les récepteurs membranaires et des sites porteurs de la spécificité immunologique de la lactotransferrine et de la sérotransferrine humaines.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus ont fait l'objet des publications suivantes :

- 1 - J. MAZURIER et G. SPIK - Action du bromure de cyanogène sur la lactotransferrine humaine. Arch. Intern. Physiol. Bioch., 1974, 82, 27
- 2 - J. MAZURIER, G. SPIK and J. MONTREUIL - Isolation and characterization of the cyanogen bromide fragments from human lactotransferrin, FEBS-Letters, 1974, 48, 262-265
- 3 - M. KRISTEVA, J. MAZURIER, G. SPIK and J. MONTREUIL - Comparative study on histidine modification by diethylpyrocarbonate in human serotransferrin and lactotransferrin, FEBS-Letters, 1975, 56, 337-340
- 4 - J. MAZURIER, J.P. AUBERT, M.H. LOUCHEUX-LEFEBVRE and G. SPIK - Comparative circular dichroism studies of iron free and iron saturated forms of human sero and lactotransferrin. FEBS-Letters, 1976, 66, 238-242
- 5 - M.A. KRISTEVA, J. MAZURIER and G. SPIK - Ultraviolet difference spectral studies of human serotransferrin and lactotransferrin. Biochim. Biophys. Acta, 1976, 453, 484-493

- 6 - G. SPIK et J. MAZURIER - Comparative structural and conformational studies of polypeptide chain, carbohydrate moiety and binding sites of human serotransferrin and lactotransferrin. Proc. 3th Int. Conf. Proteins of Iron Storage, New York, 1977, 143-149
- 7 - J. MAZURIER, J.M. LHOSTE, G. SPIK and J. MONTREUIL - The two metal binding sites of human serotransferrin and lactotransferrin : differences in histidine coordination as revealed by electron-paramagnetic resonance of cupric complexes. FEBS-Letters, 1977, 81, 371-375
- 8 - A. CHERON, J. MAZURIER and B. FOURNET - Fractionnement chromatographique et études sur la microhétérogénéité de la lactotransferrine de Vache préparée par un procédé original. C.R. Acad. Sci. Paris, 1977, 284D, 585-588
- 9 - T.M. COX, J. MAZURIER, G. SPIK, J. MONTREUIL and T.J. PETERS - Iron binding proteins and influx of iron across the duodenal brush border. Evidence for specific lactotransferrin receptors in the human intestine. Biochim. Biophys. Acta, 1979, 588, 120-128
- 10 - J. MAZURIER and G. SPIK - Comparative study of the iron binding properties of human transferrins : I. Complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactotransferrin. Biochim. Biophys. Acta, 1980, 629, 399-408

En outre, nous avons publié, en collaboration avec le groupe du Professeur P.JOLLES, les mémoires suivants relatifs à la structure primaire de la lactotransferrine humaine :

- 1 - J. JOLLES, J. MAZURIER, M.H. BOUTIGUE, G. SPIK, J. MONTREUIL and P. JOLLES - The N-terminal sequence of human lactotransferrin : its close homology with the amino-terminal regions of other transferrins. FEBS-Letters, 1976, 69, 27-31

- 2 - M.H. METZ-BOUTIGUE, J. JOLLES, J. MAZURIER, G. SPIK, J. MONTREUIL and P. JOLLES - Structural studies concerning human lactotransferrin : its relatedness with human serum transferrin and evidence for internal homology. Biochimie, 1978, 60, 557-561
- 3 - M.H. METZ-BOUTIGUE, J. JOLLES and P. JOLLES and J. MAZURIER, G. SPIK and J. MONTREUIL - The glycopeptides of human lactotransferrin : aminoacid sequence, location and phylogenetic aspects. Biochim. Biophys. Acta, 1980, 622, 308-314

GENERALITES

Ce chapitre précède l'exposé de nos travaux personnels. Il est essentiellement consacré aux formes biologiques du fer, à leurs propriétés physico-chimiques, à leur métabolisme et à leur rôle dans l'organisme.

I - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU FER

A - GENERALITES

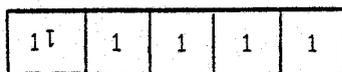
Le fer est un métal de la première série de transition qui possède le numéro atomique $A = 26$, ce qui lui donne la formule électronique $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^6$. Il est compris entre le manganèse et le cobalt. Ses propriétés chimiques sont voisines de celles du cobalt. Ses degrés d'oxydation peuvent varier de -2 à $+6$, mais les plus fréquents sont $+2$ et $+3$ (ferreux et ferrique).

Il existe 4 isotopes stables, de nombre de masse 56, 54, 57 et 58 classés par ordre d'abondance naturelle, et 6 isotopes radioactifs : 52, 53, 55, 59, 60 et 61 qui possèdent une période, respectivement de 8 h, 9 mn, 3 mn, 45 j., 10^5 ans et 100 mn.

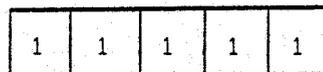
Nous avons résumé dans le tableau I (p 6) les principales propriétés physiques du fer.

B - STRUCTURE CHIMIQUE ET STEREOCHIMIQUE

Les 5 orbitales 3d des ions ferreux et ferriques sont respectivement occupées comme le montre le schéma ci-dessous :



Fe^{2+}



Fe^{3+}

par 4 et 5 électrons célibataires.

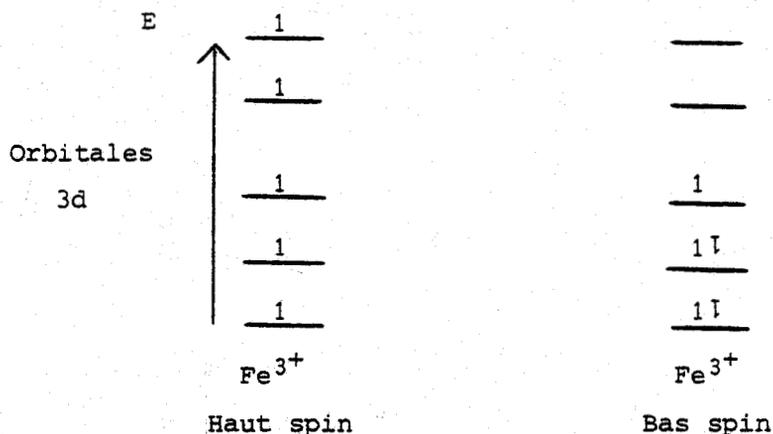
TABLEAU I

PRINCIPALES PROPRIETES PHYSIQUES DU FER

Masse atomique	55,847 ± 0,003
Masse volumique à 25°C	7,87 g / cm ³
Volume spécifique à 25°C	0,12701 cm ³ / g
Rayon covalent	1,17 Å ^o
Rayon atomique	1,26 Å ^o
Rayon ionique Fe ²⁺	0,76 Å ^o
Fe ³⁺	0,64 Å ^o



Deux états sont possibles : haut spin et bas spin, comme nous le montrons pour le cas de Fe^{3+} dans le système octaédral, dans le schéma suivant :



Un changement d'état de spin a de profondes conséquences sur les propriétés magnétiques et la stéréochimie des ligands.

La symétrie peut être octaédrale ou tétraédrale comme nous le montrons dans la figure 1 (p 8).

D'autres symétries sont connues, comme les symétries tétra-gonale et pyramidale carrée.

Dans le cas des bas spins, les ions Fe^{2+} et Fe^{3+} sont hexa-coordonnés, dans une symétrie octaédrale, avec des liaisons formant des angles de 90° , cette disposition étant favorisée par des orbitales d libres.

Dans le cas des hauts spins, toutes les orbitales d sont partiellement occupées et aucune direction n'est privilégiée. La stéréochimie dans ce cas est imposée par la nature du ligand ; ainsi les petits ligands comme H_2O favorisent la formation de 6 et même de 4 liaisons de coordination. On connaît même un système à 7 liaisons : il s'agit du complexe Fe^{3+} -EDTA

C - COMPLEXATION ET HYDROLYSE

L'ion Fe^{3+} est petit et fortement chargé, il a une grande affinité pour les anions F^- , CN^- , OH^- , RO^- . Ainsi, il déprotonne à pH neutre les OH pour les coordiner. Son affinité pour OH est telle que $(H_2O)_6Fe^{3+}$ avec un pKa de 3 est plus acide que l'acide acétique.

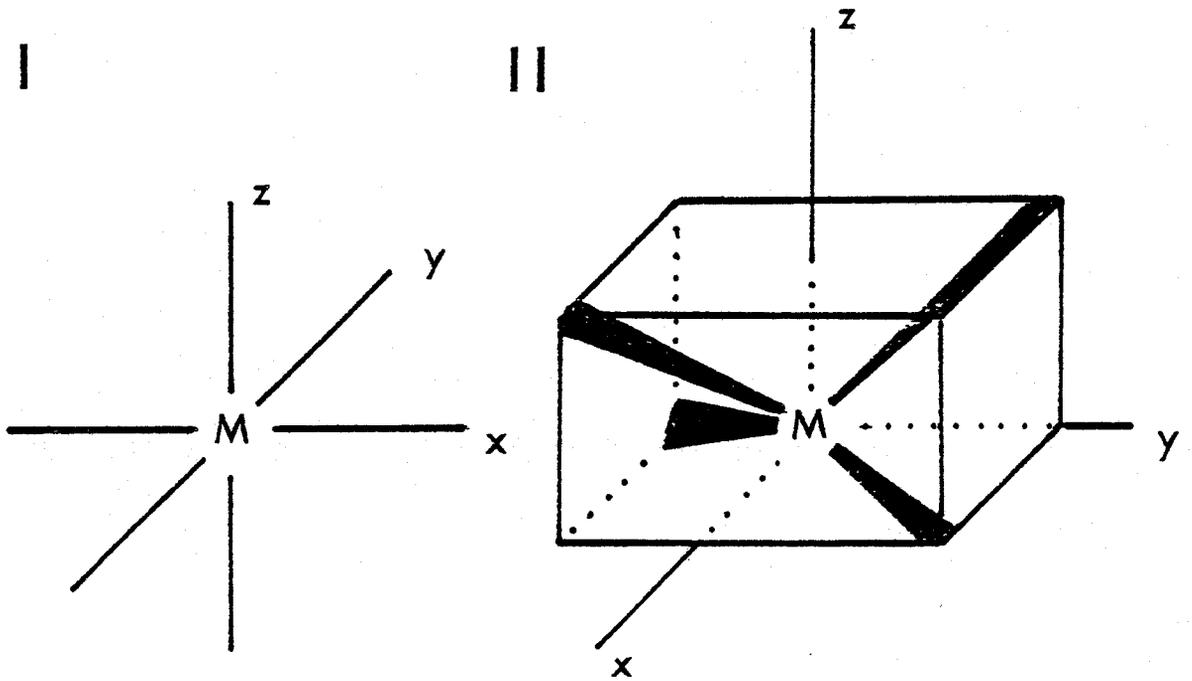


Figure 1

Symétrie des orbitales du $\text{Fe}^{\text{m}+}$
dans le système octaédral (I) et le système tétraédral (II)



L'hydrolyse n'est pas simple, elle peut donner des groupes tels que $(\text{Fe}(\text{OH})_{2,5}^{+0,5})_x$ ou x peut atteindre 1 000. La polymérisation de ces derniers peut être limitée par l'utilisation de l'acide éthylène diamine-tétracétique et l'acide nitrilo-tri-acétique.

La concentration à l'équilibre de Fe^{3+} ne peut donc excéder 10^{-18} M à pH 7 mais peut atteindre 1 M à pH 1.

Ainsi la chimie de Fe^{3+} à pH neutre dépend principalement de la nature de ses complexes et de ses produits d'hydrolyse.

Le Fe^{2+} est moins polymérisable que Fe^{3+} et possède un pKa de 7, pour une solubilité de 10^{-1} M à pH 7.

II - REPARTITION DU FER DANS L'ORGANISME

A - REPARTITION PONDERALE

D'après les résultats de FORTH et RUMMEL (4) résumés dans le tableau II (p 10), le fer est pondéralement le plus important des métaux lourds chez les mammifères. L'Homme adulte en contient 4 à 5 g, répartis principalement, comme le montre le tableau III (p 11), en deux compartiments constitués par les formes de réserve et les formes actives. Les formes de transport du fer qui ne renferment que 0,2 p 100 du métal assurent la répartition du métal entre ces deux compartiments.

Ces formes de transport sont des glycoprotéines que nous appellerons d'un terme général : les transferrines.

Nous ne développerons, par la suite, que les aspects du métabolisme du fer dans lesquels les transferrines sont directement impliquées.

B - FORMES DE TRANSPORT

Seul l'hème peut fixer le fer ferreux en présence d'oxygène. Les conditions physiologiques de pH et de pression d'oxygène font que le fer est toujours oxydé en Fe^{3+} . Le renouvellement quotidien du fer atteint 30 mg par jour soit 10^{-4} M alors que la concentration en Fe^{3+} ne peut excéder 10^{-18} M. De plus, comme nous l'avons décrit précédemment

TABLEAU II

IMPORTANCE PONDERALE DU FER CHEZ L'HOMME

d'après FORTH et RUMMEL (4)

Nature du métal	Quantité g / 70 kg	Absorption par jour en mg
Fe	3,9 - 5,0	12 - 15 (Fe^{2+} , Fe^{3+})
Cu	0,12 - 0,15	2 - 5 (Cu^{2+})
Zn	1,9 - 2,0	10 - 15 (Zn^{2+})



TABLEAU III

REPARTITION ET DEGRE D'OXYDATION DU FER CHEZ L'HOMME

Nature du constituant	Poids mg	Pourcentage	Degré d'oxydation
Fer porphyrinique			
Hémoglobine	2 500	65 - 70	II
Myoglobine	150	3 - 5	II
Enzymes héminiques	10	< 0,5	II, III
Enzymes non héminiques	L 5		II
Fer de transport	5		III
Fer de réserve			
Ferritine	500	} 25 - 30	III
Hémosidérine	500		III



page 9 , le Fe^{3+} s'hydrolyse rapidement pour former des complexes insolubles, rapidement inutilisables par l'organisme. Il apparaît donc que pour réaliser un pont entre les formes de réserve (Fe^{3+}) et les formes actives (Fe^{2+} , Fe^{3+}) il doit exister un transporteur du fer pour le maintenir en solution tout en le laissant disponible.

Ces transporteurs sont constitués chez les bactéries par les sidéochromes et chez les vertébrés par les transferrines

1 - TERMINOLOGIE ET DEFINITION

Il existe actuellement une polémique sur la nomenclature des transferrines. Plusieurs auteurs : MASSON et HEREMANS (5), AISEN et al. (6) et MORGAN (7) réservent le terme de transferrine à la protéine isolée du sérum. En accord avec MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (8) SPIK (9) et CHASTEEN (10), nous utiliserons le terme de transferrine pour désigner la famille des transporteurs du fer. Cette famille est constituée par :

- les sérotransferrines isolées pour la première fois du sérum,
- les lactotransferrines (lactoferrines) isolées du lait,
- les ovotransferrines (ovoferrine ou conalbumine) isolées du blanc d'oeuf des Oiseaux.

En effet, il est actuellement bien démontré que ces glycoprotéines possèdent des propriétés communes qui sont résumées dans le tableau IV (p 13).

2 - LOCALISATION DE LA SEROTRANSFERRINE

C'est en 1927 que BARKAN (11) démontre que le fer plasmatique est lié à une protéine. La réelle identité de la transferrine n'a été définie qu'à partir de 1940 par les groupes de HOLNBERG et LAURELL (12) et de SCHADE et CAROLINE (13).

La sérotransferrine se trouve essentiellement selon JAGER (14), BAMBACH (15), WOODWORTH et SCHADE (16) dans le sang humain à une concentration de 2 g par litre.

Un individu normal possède de 10 à 11 g de transferrine,

TABLEAU IV

PROPRIETES COMMUNES A TOUTES LES TRANSFERRINES

- 1 - Glycoprotéines monocaténaires de masse moléculaire voisine de 80 000
- 2 - Fixent réversiblement en deux sites spécifiques
 - 2 atomes de Fe^{3+}
 - 2 ions bicarbonate (ou carbonate)
 - développent une coloration rose avec un maximum d'absorption à 465 nm
- 3 - Sont composées de deux domaines structuraux possédant chacun un site métallique
- 4 - Possèdent de nombreuses homologies dans la structure covalente de la partie polypeptique
- 5 - Assurent le transport du fer jusqu'à une cellule cible qu'elles reconnaissent spécifiquement
- 6 - Possèdent une activité bactériostatique

dont 52 à 53 p 100 selon AWAI et BROWN (17) ou 56 à 62 p 100 selon KATZ (18) sont extravasculaires.

L'urine (BERGGARD) (19), (FRESNOY et al.) (20), le liquide céphalo-rachidien (EWERBECQ) (21), le lait (HANSON) (22), (HUIDOBROTECH) (23), (FILIPPE DA SILVA et al.) (24), (BLANC) (25), la bile (HARWICKE et al.) (26), les sécrétions nasales (ROSSEN et al.) (27), la salive (GABL et al.) (28), la lymphe (MOORE et al.) (29) en contiennent des quantités variables. De plus de nombreux tissus possèdent de la sérotransferrine. Nous avons rassemblé dans le tableau V (p 15) les résultats obtenus par MASON et TAYLOR (30) qui montrent d'une manière comparative la distribution de la sérotransferrine, de la lactotransferrine et de la ferritine, dans différents tissus.

3 - LOCALISATION DE LA LACTOTRANSFERRINE

La lactotransferrine a été découverte et isolée du lait de femme par MONTREUIL et MULLET (31), MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (32) et par JOHANSSON (33). Sa concentration dans le lait humain est importante et, comme l'ont démontré MASSON et HEREMANS (34), elle varie au cours de la lactation. Son taux atteint 6 g / l dans le colostrum, puis tombe rapidement pour se stabiliser selon MONTREUIL et al. (35) à 1 à 2 g / l.

BISERTE et al. (36) ont identifié les premiers la lactotransferrine dans les expectorations bronchiques ; par la suite, LOISILLIERS et al. (37) et MASSON, HEREMANS et DIVE (38) l'ont caractérisée en quantités variables dans de nombreux milieux de sécrétions : sécrétion gastrointestinale, liquide duodénal, mucus utérin, mucus nasal, bile hépatique, mucus bronchique, urine. Sa présence dans le plasma, où elle existe à un taux compris entre 0,7 et 1,1 µg /ml, peut être due selon RUMKE et al. (39), à la libération de la lactotransferrine leucocytaire.

Enfin, MASSON, HEREMANS, SCHONNE et CRABE (40) l'ont mise en évidence dans les épithélia sécréteurs de la glande mammaire, du tractus respiratoire, des glandes sous maxillaires, des muqueuses gastrointestinales et du rein. Certains de ces épithelia sont capables de synthétiser la lactotransferrine : il s'agit de la glande mammaire, de la muqueuse rectale, de l'endomètre, de l'endocol, du rein et des vésicules séminales (HECKMAN et RUMKE) (41).

TABLEAU V

REPARTITION COMPAREE DE LA SEROTRANSFERRINE, DE LA LACTOTRANSFERRINE
ET DE LA FERRITINE DANS LES TISSUS HUMAINS d'après MASON et al. (30)

Tissus	Transferrine	Lactotransferrine	Ferritine
<u>Tractus gastrointestinal</u>			
Foie	Hépatocytes	Non	Hépatocytes, cellules de Kupfler Histiocytes
Estomac	Cellules pariétales	Cellules à mucus	Cellules épithéliales
Duodénum	Cellules épithéliales	Cellules épithéliales	Cellules épithéliales
Vésicule biliaire	Cellules épithéliales	Non	Non
<u>Glandes endocrines</u>			
Thyroïde	Colloïde	Non	Non
<u>Appareil urogénital</u>			
Rein	Tubules	Non	
Utérus	Epithélium cervical Cellules myoépithéliales	Cellules glandulaires cervicales	Epithélium cervical
<u>Glandes exocrines</u>			
Tissu mammaire	Cellules périductulaires	Cellules acinaires, lait	Cellules périacinaires
<u>Moelle osseuse</u>	Non	Cellules myéloïdes	Histiocytes
<u>Système réticulo-endothélial</u>			
Histiocytes	Histiocytes activés	Non	Histiocytes
<u>Peau</u>	Cellules épidermiques	Non	Cellules épidermiques
<u>Système respiratoire</u>			
Bronches	Non	Cellules glandulaires	Non



La lactotransferrine est en outre présente, comme l'ont démontré MASSON, HEREMANS et SCHONNE (42) par des techniques d'immuno-électrophorèse, dans les leucocytes neutrophiles à un taux de 3,4 µg par million de leucocytes. Dans les leucocytes, elle est localisée dans les granules spécifiques et associée selon LEFFNELL et SPITZNAGEL (43) au lysozyme. Cette lactotransferrine leucocytaire est d'après MASSON (44) synthétisée par les tissus hématopoiétiques.

Au laboratoire, la lactotransferrine a été mise en évidence dans les selles de nourrissons alimentés au lait maternel. Cette lactotransferrine a gardé la capacité de fixer le fer (MAZURIER - DEHAINE)(45).

C - LES FORMES DE RESERVE

1 - LES COMPARTIMENTS DE RESERVE

Le métabolisme du fer est caractérisé par un échange externe limité et par une grande réutilisation du métal à partir des sources internes.

Il existe deux cycles différents de réutilisation du fer, comme le montre la figure 2 (p 17), faisant intervenir soit le système réticuloendothélial (R-E) des cellules du foie, de la rate et de la moelle osseuse, soit le système des cellules du parenchyme hépatique (HERSHKO et al.)(46). Le cycle érythrocyte - R-E - plasma est unidirectionnel puisqu'il ne peut prélever le fer de la sérotransferrine (STF), alors que le cycle hépatique parenchymateux est bidirectionnel (COOK et al.)(47).

Le fer est stocké sous forme de ferritine dans les deux systèmes.

2 - FERRITINE ET HEMOSIDERINE

La ferritine est une protéine soluble dans l'eau, isolée pour la première fois par LAUFBERGER en 1937 (48). Elle possède une masse moléculaire de 445 000 et est constituée de 24 sous-unités. Elle peut fixer jusqu'à 4 500 atomes de fer ferrique. Les études de diffraction aux rayons X montrent qu'elle a la forme d'une "coquille creuse" de rayon interne de 37 Å et de rayon externe de 61 Å. Elle

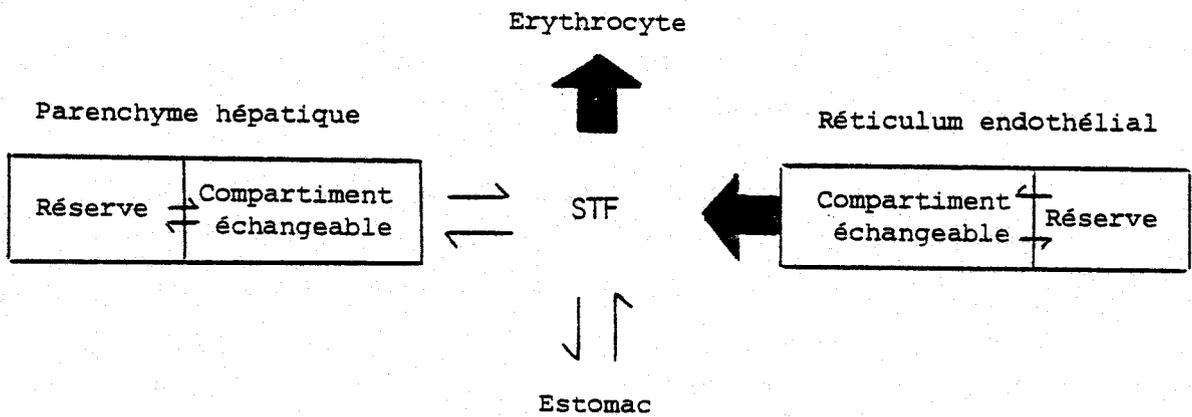


Figure 2

Relations entre la sérotransferrine (STF)
et les différents compartiments du fer d'après HERSHKO (46)



possède six anneaux, qui permettent le passage de molécules de dimension inférieure à 15 Å (HARRISON)(49), (HOARE et al.) (50), comme le montre la figure 3 (p 19). Il existe une grande hétérogénéité de la ferritine suivant les tissus et les espèces animales analysées. Actuellement 12 à 13 isoferritines ont été, selon DRYSDALE et al. (51), isolées.

L'hémosidérine est insoluble et contient plus de fer que la ferritine (Mc KAY et al.)(52, 53). Normalement l'hémosidérine renferme moins de la moitié du fer de réserve (BOTHWELL et al.)(54). Elle est probablement un produit d'oxydation ou de digestion de la partie protéique de la ferritine (TRUMP et al.) (55). Le fer de l'hémosidérine est mobilisable par l'organisme avec une efficacité beaucoup plus faible que celui de la ferritine (WYLLIE et al.) (56), (HERSHKO),(57)(MILLAR et al.) (58).

3 - CAPTURE ET ELIMINATION DU FER DE LA FERRITINE

Deux mécanismes sont évoqués pour expliquer la capture du fer par la ferritine : le premier proposé, à partir des travaux de SPIRO et al. (59), est que l'apoferritine piège les micelles de fer Fe^{3+} préformés. PAPE et al. (60) eux, pensent que les micelles de fer se forment indépendamment de l'apoferritine.

Cependant des expériences in vivo montrent que la première étape consécutive à une surcharge en fer est une synthèse de ferritine pauvre en fer (DRYSDALE et al.) (61), (FINBERG et al.) (62). Ces expériences ont conduit à l'hypothèse de "pénétration" (NIEDERER) (63). En effet, le Fe^{2+} est contrairement au Fe^{3+} rapidement incorporé par la ferritine et la catalyse de Fe^{2+} en Fe^{3+} est réalisée par la ferritine (NIEDERER) (64), (MACARA et al.) (65), (BRYCE et al.) (66).

La ferritine emmagasine le fer sous forme de Fe^{3+} mais le relâche sous forme de Fe^{2+} . Différents auteurs comme TANAKA (67), GREEN et MAZUR (68) et MAZUR et al. (69,70) suggèrent la participation de la xanthine oxydase lors de l'élimination du fer de la ferritine. Plus récemment, d'autres auteurs (FRIEDEN et al.) (71), (SIRIVECH et al.) (72), (CRICHTON et al.) (73) ont évoqué la participation d'une enzyme d'oxydo-réduction à NADH-FMN, pour réaliser le départ du fer de la ferritine.

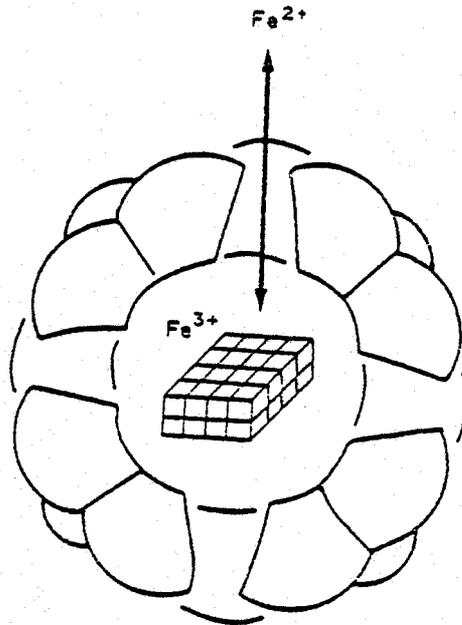


Figure 3

Schéma de structure de la ferritine d'après SIMKISS (74)



III - PROPRIETES PHYSICOCHEMIQUES DES TRANSFERRINES

A - MASSE MOLECULAIRE

La masse moléculaire des transferrines a été déterminée par de nombreux auteurs et les résultats ont longtemps été compris comme le montre le tableau VI (p 21) entre 68 000 et 114 000.

Des résultats plus récents, obtenus par LEGER, VERBERT et al. (75) donnent à la sérotransferrine une masse de 75 000 ± 2 000. Ces valeurs sont semblables à celles mesurées par SPIK et MONTREUIL (76), MANN et al. (77) et GREEN et FEENEY (78).

La lactotransferrine possède, quelle que soit la technique utilisée, une masse moléculaire supérieure à celle de la sérotransferrine. LEGER et al. (79) l'ont trouvée égale à 76 000 ± 1 000.

B - COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE EN MONOSACCHARIDES

Nous ne citerons que les travaux qui ont été réalisés dans le laboratoire et qui ont conduit à l'établissement de la structure primaire des glycanes des transferrines. La composition centésimale et molaire en monosaccharides de la sérotransferrine humaine a été établie par MONTREUIL, BISERTE et al. (80), SPIK (81) et SPIK et MONTREUIL (82) puis SPIK, VANDERSYPPE et al. (83), celle de la lactotransferrine humaine par SPIK (84), SPIK, VANDERSYPPE et al. (85) et MONTREUIL et SPIK (86) et SPIK, STRECKER et al. (87). Nous avons rassemblé dans le tableau VII (p 22) les compositions centésimales et molaires de la sérotransferrine humaine, de la lactotransferrine humaine et de l'ovotransferrine de Poule. Ces résultats montrent que ces trois transferrines diffèrent l'une de l'autre par la nature des oses : absence d'acide N-acétyl neuraminique et de galactose dans l'ovotransferrine, présence de fucose dans la lactotransferrine.

C - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

Les compositions en acides aminés ont été établies au laboratoire par MONTREUIL, BISERTE et al. (88), MONTREUIL et al. (89), MONTREUIL, SPIK et al. (90), puis SPIK (91), SPIK (92) et MONTREUIL

TABLEAU VI

MASSE MOLECULAIRE DE LA SEROTRANSFERRINE ET
DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINES

Méthode utilisée	Sérotransferrine	Lactotransferrine
Constante de sédimentation	73 800 à 91 000 (a-e)h	95 000 (i)
Equilibre de sédimentation	68 000 à 114 000 (a-e, e-h)	76 700 (d)
Tamisage moléculaire	76 000 à 78 000 (e-h)	76 000 (h)
Electrophorèse en gel de polyacrylamide	75 000 à 81 000 (g-h)	
Titration du Fer	74 100 à 93 000 (a, c, e)	75 980 - 80 000 (h, l)
Viscosité et sédimentation	74 000 à 79 300 (f, h)	78 100 (j)
Viscosité	74 700 à 96 000 (a, f, h)	77 500 (j)
Diffusion de la lumière		89 000 (i)

- a BEZKOROVAINY, RAFELSON et al. (93), BEZKOROVAINY et RAFELSON (94), BEZKOROVAINY (95), BEZKOROVAINY et GROHLICH (96)
- b CHARLWOOD (97)
- c ROBERTS et al. (98)
- d MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (99)
- e SPIK et MONTREUIL (100), SPIK (101)
- f MANN et al. (102)
- g PALMOUR et al. (103)
- h LEGER, SPIK et al. (104)
- i MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (105)
- j LEGER, VERBERT et al. (106)
- k SPIK (107)
- l MASSON et HEREMANS (108), QUERINJEAN et al. (109)



TABLEAU VII

COMPOSITION MOLAIRE ET CENTESIMALE
EN MONOSACCHARIDES DES TRANSFERRINES

Nature des Monosaccharides	Sérotransferrine humaine		Lactotransferrine humaine		Ovotransferrine de Poule
	a	b	c	d	e
Composition centésimale					
Oses neutres	2,6	2,3	3,9	3,11	0,85
N-acétyl-hexosamines	-	1,98	2,4	2,1	1,78
Acide N-acétyl- neuraminique	1,3	1,43	0,87	1,22	
Composition molaire					
Galactose	4	5	10	6	
Mannose	8	6	7	5	
Fucose	-	-	5	3	
N-acétyl-glucosamine	8	8	13	8	
Acide N-acétyl neuraminique	4	3-4	3	3	

a JAMIESON (110, 111)

b SPIK (112), SPIK et MONTREUIL (113), SPIK, VANDERSYPPE et al. (114)

c MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (115)

d SPIK, VANDERSYPPE et al. (116)

e SPIK, FOURNET et MONTREUIL (117)



et SPIK (118) pour la serotransferrine et la lactotransferrine humaine. Comme le montre le tableau VIII (p 24) les compositions sont très voisines mais elles diffèrent néanmoins pour certains acides aminés. Ainsi, la lactotransferrine possède moins de résidus de cystine et près de deux fois plus de résidus d'arginine que les autres transferrines.

D - CONCLUSIONS

Des transferrines de différentes origines ont actuellement été analysées, elles possèdent toutes une masse moléculaire et une composition en acides aminés voisines, mais elles diffèrent énormément par la nature de leurs monosaccharides.

IV - ETUDE DES DEUX SITES DE FIXATION DU FER

Pour une étude plus approfondie, nous renvoyons aux revues générales de CHASTEEN (119), de AISEN et BROWN (120) et aux deux ouvrages édités par CRICHTON (121) et par BROWN et al. (122).

Depuis la découverte de l'ovotransferrine par OSBORNE et CAMPBELL (123), la détermination de la structure des deux sites de fixation du fer a été entreprise par de nombreux auteurs. A l'heure actuelle, 30 ans après les travaux de pionniers comme FRAENKEL-CONRAT et FEENEY (124) la structure des sites est encore inconnue, qui plus est, les ligands et la géométrie du métal ne sont même pas définis. Dans sa revue générale, CHASTEEN (125) analyse les nombreux problèmes posés par l'étude de ces sites et montre l'importance du site anionique et de la conformation de la protéine.

La plupart des travaux ont été effectués sur la serotransferrine humaine. Tous les paramètres physiques que nous allons développer dans ce chapitre (état magnétique et stéréochimie du métal, propriétés optiques, constante d'affinité) déterminés sur toutes les transferrines (serotransferrine, ovotransferrine, lactotransferrine) par différentes techniques (absorption, fluorescence, dichroïsme circulaire, effet Raman, infrarouge, résonance paramagnétique électronique, effet Mossbauer, titration) sont identiques. Seule

TABLEAU VIII

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE,
DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE ET DE L'OVOTRANSFERRINE DE POULE

Nature des Acides aminés	Sérot transferrine		Lactot transferrine		Ovot transferrine
	a	b	c	d	e
Asp	77	71	65	71	68
Thi	30	25	33	30	28
Ser	42	35	46	54	30
Glu	62	53	69	62	65
Pro	33	36	33	26	30
Gly	48	46	49	53	48
Ala	55	51	56	59	55
1/2 Cys	30	30	26	26	41
Val	41	40	43	37	52
Met	5	7-8	5	6	10
Ile	15	14	16	14	30
Leu	58	52	54	54	51
Tyr	26	24	20	21	21
Phe	29	27	28	32	29
Try	7	-	11	13	-
Lys	54	49	39	41	49
His	17	17	10	10	14
Arg	20	23	38	40	34
Total	634	601	641	649	655

a SPIK (126,127), MONTREUIL, BISERTE et al. (128), MONTREUIL, SPIK et al. (129)

b SUTTON et BREW (130)

c QUERINJEAN et al. (131)

d MONTREUIL et SPIK (132)

e WILLIAMS (133)



la lactotransferrine se différencie des autres par sa grande résistance vis-à-vis de l'action des protons (MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (134)).

Jusqu'en 1975, les deux sites ont été considérés comme similaires et le modèle proposé par WINDLE et al. (135) en 1963 (Fig. 4, p 26) était généralement admis. De récents travaux dont les nôtres, remettent ce schéma en cause.

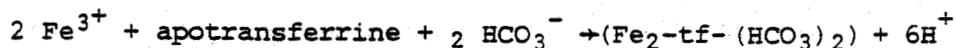
Ainsi dans l'exposé qui suit, nous étudierons les différentes propriétés des sites en prenant comme références les résultats obtenus sur la sérotransferrine humaine.

A - PROPRIETES PHYSIQUES GENERALES DES SITES METALLIQUES

1 - CONDITIONS DE FIXATION DU FER

Les transferrines peuvent fixer deux atomes de fer de manière réversible en développant une coloration rouge dont le maximum d'absorption est centré à 465 nm (LAURELL et INGELMAN) (136), (AISEN et LEIBMAN) (137), (AASA et al.) (138), (MONTREUIL, TONNELAT et MULLET) (139), (JOHANSSON) (140), (SPIK) (141).

La fixation de chaque ion métallique nécessite la fixation d'un ion bicarbonate (WARNER et WEBER) (142), (AISEN, AASA et al.) (143), (MASSON et HEREMANS) (144) et la libération de trois protons (SCHADE, REINHART et al.) (145), (WARNER et WEBER) (146), (TEUWISSEN, MASSON et al.) (147) selon la formule suivante :



2 - FIXATION D'AUTRES METAUX

Les transferrines fixent de nombreux ions de métaux de transition aussi bien divalents que trivalents, tout comme plusieurs lanthanides : Cu^{2+} , Zn^{2+} , VO^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{3+} , CO^{3+} , Ga^{3+} , Hb^{3+} , Er^{3+} , Tb^{3+} , Eu^{3+} , Nd^{3+} , Pr^{3+} , Gd^{3+} (WINDLE, WIERSEMA et al.) (148), (LUK) (149), (WARNER et al.) (150), (CANNON et CHASTEEN) (151), (HARRIS, GRAY et al.) (152), (AASA et AISEN) (153), (ZWEIR) (154), (TEUWISSEN, MASSON et al.) (155) à raison de deux ions par molécule de transferrine à l'exception

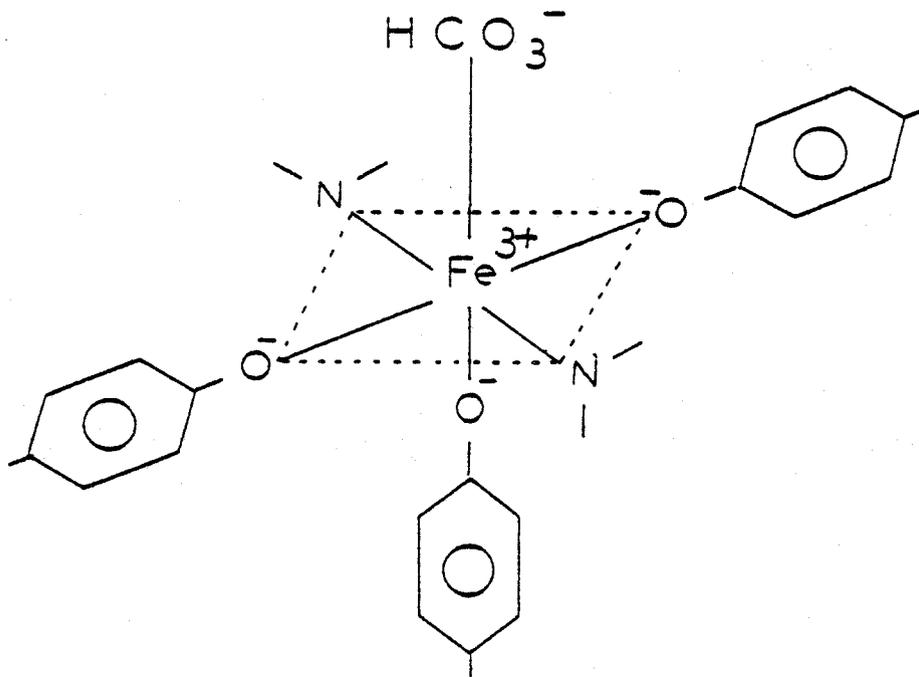


Figure 4

Site de fixation du fer des transferrines selon WINDLE et al. (156)



de Nd^{3+} et Pr^{3+} où un seul ion est fixé. Par contre, le Fe^{2+} ne semble pas être fixé (BATES, WORKMAN et al.) (157).

TAN et WOODWORTH (158) ont calculé la stabilité des différents complexes métalliques de l'ovotransferrine. Le fer est le métal qui a le plus d'affinité suivi du Cu^{2+} . Le Ni^{2+} possède l'affinité la plus faible. Tous ces métaux ne se fixent sur la protéine qu'en présence de bicarbonate (AISEN, AASA et al.) (159), (CHASTEEN, WHITE et al.) (160).

Actuellement, plusieurs auteurs ont décrit des transferrines mixtes, c'est-à-dire possédant un métal différent sur chaque site : Fe-Cr (AISEN et al.) (161), Fe-Cu, Fe-Tb (CANNON et CHASTEEN) (162), (ZWEIR) (163).

Les travaux récents de EVANS et WINTER (164) et EVANS (165) montrent que la sérotransferrine in vivo est un transporteur de Zn, et qu'elle est responsable de son adsorption intestinale. Cependant CHARLWOOD (166) démontre que la sérum albumine a la possibilité de déplacer puis de complexer le Zn transporté par la sérotransferrine.

3 - CONSTANTES D'AFFINITE

Tous les auteurs qui ont étudié les constantes d'affinité, jusqu'en 1976, sur la serotransferrine et l'ovotransferrine (AASA, MALMSTROM et al.) (167), (AISEN et LEIBMAN) (168), (JARRIT et CHARLWOOD) (169), par les techniques d'équilibre de dialyse ont suggéré que les deux sites pouvaient être considérés comme équivalents et indépendants l'un de l'autre. La constante apparente de dissociation pour un pH et une pression p CO_2 voisins de ceux du sang est de l'ordre de $k_1=10^{24}$. Elle n'est affectée ni par la désialylation des groupements glycaniques, ni par le remplacement du bicarbonate par un anion équivalent : l'oxalate (JARRIT et al.) (170).

Les premiers travaux de DAVIS et al. (171) qui montrent que les constantes des deux sites diffèrent par un facteur 400 semblent erronés, car leurs mesures effectuées en présence d'E.D.T.A. n'étaient pas réalisées à l'équilibre de dialyse.

La lactotransferrine se différencie nettement de la séro-

transferrine humaine à pH 6,4 par une constante $K_1=2,6 \cdot 10^5$ soit 260 fois plus importante (AISEN et LEIBMAN) (172)

Une récente réinvestigation des constantes d'équilibre stochiométrique ou thermodynamique de la sérotransferrine a permis à AISEN, LEIBMAN et al. (173) de démontrer que, quel que soit le pH d'étude, K_1 est toujours plus grand que K_2 et qu'à pH 7,4 et à p CO_2 , K_{a1} et K_{a2} , les constantes apparentes de stabilité, valent respectivement $4,7 \cdot 10^{20}$ et $2,4 \cdot 10^{19}$. Les mêmes auteurs constatent que la fixation séquentielle des métaux est anticoopérative.

4 - GEOMETRIE DU METAL

L'analyse du spectre R.P.E. des complexes des ferritransferrines montre que le fer ferrique est sous la forme haut spin dans un champ cristallin rhombique (AASA, MALMSTROM et al.) (174), (WINDLE et al.) (175), (AISEN et LEIBMAN) (176). L'environnement du métal a une faible symétrie. Des considérations théoriques permettent de proposer deux géométries (CASTNER et al.) (177) :

- un arrangement tétraédral avec ses substituants identiques deux par deux.

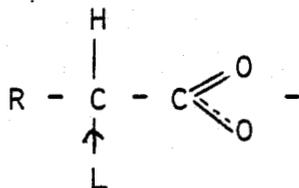
- un arrangement hexacoordonné avec six ligands identiques, à égale distance l'un de l'autre. Cet arrangement a été choisi par WINDLE et al. (178) à la suite de considérations chimiques sur le nombre de ligands.

B - LE SITE ANIONIQUE

La difficulté d'obtenir des solutions absolument démunies de carbonate a longtemps rendu aléatoire toute étude du site anionique. Les travaux de SCHLABACH et BATES (179), confirmés par ceux de TSANG et al. (180) montrent que le métal ne peut se fixer sur le site spécifique qu'en présence d'un anion. Par contre, l'anion ne se fixe pas sur la protéine en l'absence du métal (AISEN, AASA et al.) (181). Il existe donc un effet coopératif entre le métal et l'anion.

1 - NATURE DE L'ANION

L'anion doit avoir une formulation du type :



où L est un groupement donneur d'électrons qui doit adopter une configuration de type carbonate (CHASTEEN) (182). Les anions qui ont l'effet synergique le plus important sont le bicarbonate, le carbonate et l'oxalate (SCHLABACH et al.) (183). Il n'est pas encore possible de définir si l'anion naturel est le carbonate ou le bicarbonate.

2 - LOCALISATION DU SITE ANIONIQUE

Le coefficient d'extinction molaire à 465 nm varie en fonction de la nature de l'anion (SCHLABACH et al.) (184). Ceci peut être la conséquence d'un effet allostérique sur le site métallique induit par la fixation de l'anion, ou la conséquence de la fixation de l'anion directement sur le métal. La résonance en ^{13}C du complexe $\text{Fe}_2 \text{ STF } (^{13}\text{CO}_2)_2$ indique que la distance entre Fe^{3+} et ^{13}C est de 9 Å (HARRIS, GRAY et al.) (185). Par contre, CAMPBELL et CHASTEEN (186) montrent que dans le cas d'un complexe STF-VO l'anion est directement coordonné au métal tout au moins dans le cas du site dénommé B, qui correspond donc au site "acide labile" localisé dans la région N-terminale.

Afin d'expliquer que seuls les anions du type carbonate sont utilisables, BATES et SCHLABACH (187) ont suggéré que l'anion est de plus coordonné à la protéine par l'intermédiaire d'un groupement X pour former un carbone tétravalent comme nous l'indiquons dans la figure 5 (p 30).

Cette hypothèse a trouvé confirmation, d'une part, au niveau de la séquence peptidique où Mc GILLIVRAY et al. (188) montrent qu'un résidu arginyl se retrouve 4 fois dans une séquence conservatrice en

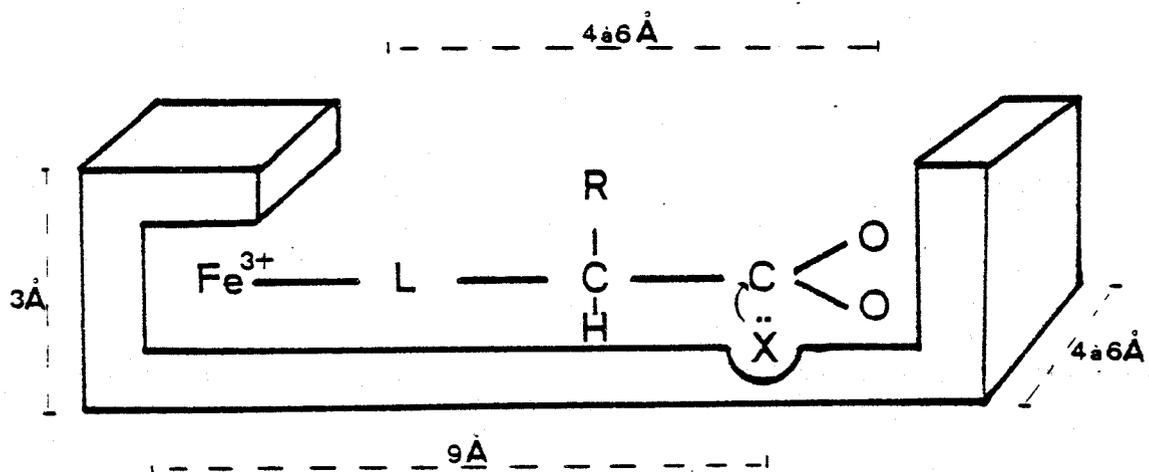


Figure 5

Modèle des sites de fixation du fer et de l'anion
d'après SCHLABACH et al. (189)

1 - La distance entre le carbonate et le métal a été mesurée par
HARRIS et al. (190)



position 5 par rapport à un résidu de His

Lys-Lys-Ser-Cys-His-Thr-Gly-Leu-Gly-Arg

Lys-Lys-Ser-Cys-His-Thr-Ala-Val-Thr-Arg

Val-Pro-Ser- \emptyset -His-Thr-Val-Val-Ala-Arg

Ala-Pro-Asn- \emptyset -His-Ala-Val-Val-Thr-Arg

d'autre part, par la démonstration par ROGERS et al. (191) que la modification chimique sélective de l'arginine inhibe la fixation du fer.

C - DIFFERENCES ENTRE LES DEUX SITES DE FIXATION DU METAL

A ce jour aucune différence n'a pu être mise en évidence dans la nature ou le nombre des ligands de chacun des 2 sites.

Le problème de la non équivalence biologique des deux sites de la sérotransferrine a été posé en hypothèse par FLETCHER et HUEHMS en 1967 (192) (voir chapitre VII, p 62). Il a fallu attendre 1975 pour voir la démonstration de cette non équivalence au niveau de l'attaque des protons par PRINCIOTTO et al. (193) et au niveau de la réactivité des résidus d'histidine par notre laboratoire.

1 - PROTONATION

La courbe de dissociation du métal de la sérotransferrine est biphasique (PRINCIOTTO et ZAPOLSKI) (194), (LESTAS) (195). Un premier métal est éliminé à pH 5,8, le deuxième à pH 4,8, les auteurs définissent ainsi un site basique et un site acide. De la même manière, la fixation du métal est séquentielle et influencée par la nature du complexe métallique présenté : lorsqu'une quantité de métal équivalente à 50 p 100 de saturation est présentée, celui-ci se fixe sur le site "acide stable" dans le cas du complexe Fe-N-TA, et sur le site "acide labile" à partir du sulfate ou du chlorure ferrique à pH basique.

2 - REACTIVITE CHIMIQUE DES RESIDUS D'HISTIDINE

La différence de réactivité des deux sites vis-à-vis du

diéthylpyrocarbonate, réactif spécifique de la modification des résidus d'histidine fait l'objet du chapitre II de nos travaux personnels.

3 - SPECTRES EN RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE

L'analyse des spectres R.P.E. permet dans certaines conditions de mettre en évidence une différence dans le comportement des métaux suivant le site qu'ils occupent.

a - Spectre des ferritransferrines

L'analyse des spectres R.P.E. des ferritransferrines ne décèle que de très faibles variations, en fonction du site considéré. Les résultats de PRICE et GIBSON (196) montrent que les deux sites identiques existent chacun sous deux conformations différentes.

b - Spectre des transferrines complexées à d'autres métaux

Les spectres des Cr^{2+} , Cu^{2+} , VO^{2+} -transferrines sont résolus en deux composantes. En particulier, il existe une dépendance des spectres du Cu^{2+} (ZWEIR) (197) et du VO^{2+} (CHASTEEN) (198) en fonction du pH. Le cas du VO^{2+} a été bien étudié et comme le montre le schéma suivant, la sérotransferrine fixe deux ions en deux sites distincts puisqu'ils donnent deux signaux R.P.E. caractéristiques. Le signal B provient de l'ion VO^{2+} saturant le site "acide labile". En milieu alcalin, les deux ions donnent le même signal C, ce qui suggère une modification au moins de l'environnement des deux sites.

Nombre d'ions fixés	1	2	2
Signal R.P.E.	A	A+B	C
Zone de pH	(4 - 6)	(6 - 9)	(9 - 10)

4 - DEMONSTRATION "IN VIVO"

MAKEY et al. (199) ont réussi les premiers à séparer en électrophorèse les quatre formes de la sérotransferrine = aposérotransferrine, serotransferrine avec 1 seul métal sur le site acide stable, sérotransferrine avec 1 seul métal sur le site acide labile,

sérotransferrine complètement saturée. LEIBMAN et AISEN (200), en réalisant une immunoélectrophorèse bidimensionnelle utilisant dans la première dimension le système de MAKEY et al. (201), ont démontré que, dans le sérum, la sérotransferrine fixe presque uniquement le métal sur le site "acide labile". Ce résultat a été confirmé par WILLIAMS et al. (202).

D - DISTANCE ENTRE LES DEUX SITES DE FIXATION

Les premiers travaux obtenus par AASA et al. (203) indiquaient une distance minimale de 9 Å entre les deux sites. En 1971, LUK (204) travaillant en déclin de fluorescence trouve une distance de 45 Å, alors qu'en 1977 MEARES et al. (205) par la même technique estiment la distance à 25 ± 2 Å.

E - NATURE DES LIGANDS IMPLIQUES DANS LA FIXATION DU METAL ET DE L'ANION

1 - TYROSINE

La démonstration de la participation de la tyrosine a été réalisée par les méthodes optiques et par modification chimique. La fixation du métal entraîne l'apparition de deux bandes optiques à 245 et 295 nm, caractéristiques de l'ionisation de 4 résidus de tyrosine. (CANNON et al.) (206), (WOODWORTH et al.) (207), (TAN et al.) (208), (LEHRER) (209).

De plus l'étude en fluorescence des complexes STF-lanthanides indique la coordination de 4 résidus tyrosine (LUK) (210). Toutes ces méthodes sont critiquables car le modèle de tyrosine ne tient pas compte de l'effet de la fixation du métal sur le spectre optique.

D'autre part, la modification chimique des résidus de tyrosine par iodination (PHILLIPS et al.) (211) ou nitration (BEZKOROVAINY et GROHLICH) (212) suggère la participation de 4 et 6 résidus.

Un modèle, constitué d'un complexe Fe^{3+} - EDDHA (éthylène diamine di(O-hydroxylphényl acétate), dans lequel existent deux groupements phénolate coordonnés au métal, donne un spectre identique

à deux des transferrines. L'analyse des spectres Raman réalisés sur l'ovotransferrine et la sérotransferrine (GABER et al.) (213), TOMIMATSU, KINT et al. (214), TOMIMATSU, WONG et al. (215) confirme ces résultats.

2 - TRYPTOPHANE

LEHRER (216) le premier, a suggéré l'intervention du tryptophane dans le site de la séro et de l'ovotransferrine. Il semble que cet acide aminé soit perturbé par la fixation du métal, en particulier, les différences de spectre obtenues après la fixation des métaux n'absorbant pas dans l'ultraviolet (TAN et WOODWORTH) (217) (TOMIMATSU et DONOVAN) (218), indiquent la très nette participation du tryptophane, mais sa liaison directe avec le métal n'a jamais été démontrée. Les modifications chimiques par le diméthyl 2 OH5NO₂ Benzyl (FORD-HUTCHINSON et al.) (219) n'interdit pas la fixation du fer sur la sérotransferrine.

3 - HISTIDINE

A l'origine, la participation de l'histidine dans le site métallique a été suggérée par AASA et al. (220) à partir des spectres R.P.E. des cupri-séro et ovotransferrines. Une interprétation erronée de ces auteurs, confirmée par WINDLE et al. (221) a conduit à admettre que chaque site fixe le fer par l'intermédiaire de deux noyaux azotés ne pouvant appartenir, vu leur pK, qu'à l'histidine. Une réinterprétation de ces résultats par AASA et al. (222) puis plus tard par nous-mêmes et enfin par ZWEIR et al. (223) et ZWEIR (224) a permis de démontrer l'inexistence d'un signal R.P.E. caractéristique de la coordination de 2 noyaux azotés. Les deux sites fixant le cuivre ne font intervenir qu'un seul azote dans une gamme de pH s'étalant de 6 à 8,6, pour des pH plus basiques, l'un des sites devient caractéristique de la fixation de 3 à 4 noyaux azotés.

Des modifications chimiques sélectives par l'acide bromoacétique (BEZKOROVAINY et GROHLICH) (225) puis par le diéthyl pyrocarbonate (ROGERS et al.) (226) faites postérieurement à nos travaux suggèrent la participation de 2 à 4 noyaux imidazoles. Nous consacrons un chapitre à la démonstration chimique de la participation de l'histidine dans la coordination du fer.

4 - ARGININE

Les premiers, BATES et SCHLABACH (227) ont suggéré la participation de l'arginine non pas dans le site métallique mais dans le site anionique. ROGERS et al. (228) ont récemment démontré que 66 p 100 des Arg sont modifiables sur les ferri séro et ovotransferrines sans perte de la capacité à fixer le métal, par contre, celle-ci est perdue après un taux de réaction de 88 p 100.

5 - EAU

Les travaux de KOENING et SCHILLINGER (229,230) en RMN du proton montrent qu'une molécule d'eau est située à 2 Å du métal et qu'une autre est éloignée de 5 Å.

V - STRUCTURE DE LA PARTIE PEPTIDIQUE DES TRANSFERRINES

Les revues générales de BEZKOROVAINY et al. (231), de LLINAS (232) traitent de manière approfondie les problèmes de la détermination de la structure et de la conformation des transferrines.

A - STRUCTURE COVALENTE

Les études de la séquence primaire des transferrines sont actuellement en cours dans différents laboratoires. En effet, celle de la sérotransferrine humaine est connue à 80 p 100 grâce aux travaux de Mac GILLIVRAY et al. (233), celle de l'ovotransferrine de Poule est en cours de détermination par le groupe de WILLIAMS ; en collaboration avec le groupe du Professeur JOLLES, nous avons abordé l'étude de la séquence primaire de la lactotransferrine.

Nous allons dans un premier temps développer les caractéristiques générales de la chaîne peptidique des différentes transferrines et discuter les résultats obtenus par Mac GILLIVRAY et BREW sur la sérotransferrine humaine.

1 - NATURE DES EXTREMITES N- ET C- TERMINALES

a - Extrémité N-Terminale

1°) Lactotransferrine. MONTREUIL, BISERTE et al. (234), SPIK et MONTREUIL (235), MAZURIER, SPIK et al. (236) n'ont pas caractérisé de fonction α -NH₂ libre à l'extrémité N-terminale. Par contre, BLUARD-DECONNINCK, MASSON et al. (237) et BEZKOROVAINY et al. (238) ont mis en évidence un résidu de glycolle.

2°) Sérotansferrine. Un seul acide aminé N-terminal, la valine, a été identifié par de nombreux auteurs : GOLLNER (239), PUTNAN (240), MONTREUIL, BISERTE et al. (241), BEARN et al. (242), JEPPSSON (243) et SPIK (244).

3°) Autres transferrines. GRAHAMS et WILLIAMS (245) ont identifié un résidu d'alanine en position N-terminale dans l'ovotransferrine de Poule. Selon ces mêmes auteurs, toutes les transferrines posséderaient une séquence N-terminale du type : X-Pro-^{Asp}Glu-Lys-Thr-

b - Extrémité C-terminale

1°) Lactotransferrine. SPIK (246), SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (247) ont mis en évidence, par hydrazinolyse, du glycolle et de la sérine en position C-terminale. Par contre, BLUARD-DECONNINCK, MASSON et al. (248) libèrent par action des carboxypeptidases A et B un résidu de Lys, d'Arg de Leu et de Phé et proposent la séquence C-terminale suivante : -Leu-Phe-Lys-Arg.

2°) Sérotansferrine. SPIK (249), SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (250) ont identifié la proline et la glycolle en position C-terminale. Ces résultats ont été confirmés par CHARET (251) qui a identifié en plus un résidu de cystine. Ce résidu de cystine a été retrouvé par GRAHAM et al. (252), par contre Mac GILLIVRAY et al. (253) n'ont identifié qu'un seul résidu de proline en position C-terminale.

2 - MONOCATENARITE DE LA CHAÎNE PEPTIDIQUE

La présence de plusieurs acides aminés C-terminaux, de deux sites de fixation du métal, les travaux de JEPSSON (254) sur la sérotransferrine, ceux de SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (255) et de GOT et al. (256) sur la lactotransferrine ont amené ces auteurs à admettre la nature pluricaténaire de la chaîne peptidique. C'est ainsi que, dans le cas de la sérotransferrine l'idée d'une duplication de la chaîne peptidique (GREEN et al.) (257), (MANN et al.) (258), (BAKER et al.) (259) a pris naissance. Cependant les travaux de PARKER et al. (260), de GREEN et al. (261), de BEZKOROVAINY et al. (262), de MANN et al. (263) et de QUERINJEAN et al. (264) et au laboratoire ceux de LEGER (265), LEGER, SPIK et al. (266), LEGER, VERBERT et al. (267) ont démontré que la longueur de la chaîne peptidique des transferrines et leur masse moléculaire ne sont pas modifiées par la réduction et l'alkylation des ponts disulfures. Ces résultats ont apporté la preuve de la monocatéarité de la chaîne peptidique.

3 - SEQUENCES PEPTIDIQUES AU VOISINAGE DES RESIDUS DE CYSTINE

En 1976, BLUARD-DECONNINCK et al. (268) ont isolé et séquencé à partir de la lactotransferrine oxydée 6 peptides contenant un résidu d'acide cystéique. D'après ces auteurs, les peptides dont nous donnons la séquence dans le tableau IX (p 38) sont homologués à certains peptides cystéiques isolés de l'ovotransferrine par ELLEMAN et al. (269).

4 - SEQUENCES PEPTIDIQUES AU VOISINAGE DU POINT D'ATTACHE DES GLYCANNES

La détermination de la séquence peptidique au voisinage du point d'attache des glycanes a été en partie effectuée au laboratoire sur la lactotransferrine par SPIK, VANDERSYPPE et al. (270) et METZ-BOUTIGUE et al. (271) et sur la sérotransferrine par SPIK et MONTREUIL (272), SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (273), SPIK (274), MONSIGNY, CHARET et al. (275), CHARET, SPIK et al. (276), CHARET, MONSIGNY et al. (277), CHARET et MONTREUIL (278), CHARET (279), CHARET, TETAERT et al. (280), GRAHAMS et WILLIAMS (281), Mac GILLIVRAY et al. (282)



TABLEAU IX

SEQUENCE PEPTIDIQUE PARTIELLE DE LA LACTOTRANSFERRINE AU VOISINAGE DE 7 RESIDUS DE DEMI-CYSTINE
d'après BLUARD-DECONNINCK, MASSON et al. (283)

- Pro - Phe - Gly - Ser - Phé - Ser - Cys - Gln - Leu - Cys - Glu - Ala - Thr - Asp - Asp - Lys
- Ala - Leu - Ala - Gln - Gly - Asn - Leu - Val - Glu - Cys - Asn - Phé - Ala - Lys
- Ala - Cys - Pro - (Asp,Thr) - Leu - Gly - Glu - Gly - Lys
- Glu - Asp - Gly - Cys - Thr - Asn - Ala - Ser - Ala - Leu - Glu - Val - Asp - Glu - Lys
- Ser - Asn - Ala - Asp - Glu - Pro - Leu - Gly - Val - Tyr - Cys - Glu - Ile - Ser - Gly - Pro - Lys
- Gly - Pro - Ser - Pro - Cys - Ile - Val - Lys

et sur l'ovotransferrine par ELLEMAN et WILLIAMS (284) et GRAHAM et WILLIAMS (285).

Ces structures confirment l'existence de la séquence code Asn-X-Thr pour le greffage des glycanes de type N-acétyl lactosaminique (DAYHOFF et al.) (286). Plus récemment GRAHAMS et WILLIAMS (287) ont proposé de classer les séquences en deux groupes : groupe A, où l'acide aminé X est basique et groupe B lorsqu'il est aliphatique. Nous discuterons ces séquences dans le chapitre V de nos travaux.

5 - ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE

L'importance de la chaîne peptidique des transferrines interdit actuellement toute étude directe. Ainsi tous les auteurs ayant entrepris la détermination de la structure covalente ont du utiliser les fragments obtenus après coupure des liaisons méthionyles par le bromure de cyanogène.

Le premier travail a été réalisé sur la sérotransferrine par JEPSSON (288) puis BEZKOROVAINY et al. (289), SUTTON et BREW (290) et enfin au laboratoire par CHARET (291), sur la lactotransferrine par nous-mêmes (292) et BEZKOROVAINY (293), sur l'ovotransferrine par TSAO, AZARI et al. (294), TSAO, MORRIS et al. (295) puis KINGSTON et WILLIAMS (296). Neuf fragments ont été isolés à partir de la sérotransferrine primaire, quatre d'entre eux : CN 6, 7, 8, 9 ont été séquencés par CHARET (297) en collaboration avec le groupe du Professeur JOLLES (JOLLES et al.) (298), (BOUTIGUE et al.) (299), les autres fragments à l'exception du CN₂ et CN₁₀ l'ont été par Mac GILLIVRAY et al. (300).

Sur l'ovotransferrine de Poule, un seul fragment : Bcd glycosylé, a été séquencé par KINGSTON et al. (301)

L'isolement à partir de la lactotransferrine humaine des fragments BrCN sera décrite dans la suite de notre travail.

6 - SEQUENCE PEPTIDIQUE DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE

Mac GILLIVRAY et al. (302) ont séquencé 80 p 100 de la chaîne peptidique de la sérotransferrine. Nous présenterons leurs résultats en comparaison avec la séquence de la lactotransferrine

dans le chapitre IV L'ensemble peptidique monocaténaire possède 673 acides aminés ce qui, compte tenu de la présence de deux glycanes, lui donne une masse moléculaire proche de 81 000. Au sujet de cette structure, plusieurs remarques sont à faire : il existe des divergences entre les séquences de l'extrémité C-terminale de CHARET et al. (303), celles de GRAHAMS et WILLIAMS (304) et celle de Mac GILLIVRAY et al. (302). Les fragments CN 7, 8, 9 ont été séquencés par JOLLES et al. (305). L'extrémité N-terminale a été séquencée par BOUTIGUE et al. (306).

Récemment, BRUNE et al. (307) ont séquencé l'extrémité N-terminale et positionné les deux premiers ponts disulfures.

L'analyse de la séquence apporte de précieux renseignements. Tout d'abord, il existe une grande homologie entre la séquence des résidus 1 à 336 et 337 à 673, ce qui confirme l'hypothèse de la duplication de la chaîne peptidique.

Les deux glycanes sont localisés dans la région C-terminale.

B - CONFORMATION DES TRANSFERRINES

La conformation des transferrines est très étroitement liée au degré de saturation des deux sites métalliques. Les premiers auteurs (IMMAN) (308), (WARNER et WEBER) (309), ayant supposé que la vitesse de fixation du premier métal est beaucoup plus lente que celle du second ont amené WOODWORTH (310) à proposer un mécanisme en deux temps : tout d'abord le premier atome de fer se fixe lentement sur deux points situés d'une manière éloignée sur l'apotransferrine provoquant un remaniement de la molécule qui, dans un deuxième temps permet, en rapprochant les deux autres points de la conjugaison du métal, la fixation de ce dernier. Ce schéma implique de profonds remaniements dans la conformation de la molécule et une interaction entre les deux sites.

1 - DIMENSIONS

Nous avons résumé dans le tableau X (p 41) les données actuelles sur les dimensions des transferrines.

TABLEAU X

DIMENSION DES TRANSFERRINES

Nature des transferrines	Dimension de l'axe a (Å)	Dimension de l'axe b (Å)	Rapport des axes $\frac{a}{b}$
Apo - STF	a 62	24,6	3
	b		2
STF	a 55,2	27,6	2
Apo - OTF	c 79	17,5	4,5
	d 68	21	
OTF	c 60	20	3

a ROSENEU et al. (311)

b BEZKOROVAINY (312)

c FAUST et al. (313)

d YEH et al. (314)



Tous les auteurs sont d'accord pour les définir comme des ellipsoïdes de révolution.

2 - STRUCTURE SECONDAIRE

Les analyses en dichroïsme circulaire sur l'ovotransferrine (TAN) (315), (TAN et al.) (316), sur la sérotransferrine (NAGGY et al.) (317), (TOMIMATSU et al.) (318), (VENTURA et al.) (319) et les nôtres sur la lactotransferrine montrent que les différentes transferrines possèdent de nombreuses analogies et que la structure secondaire est peu ou pas affectée par la fixation du métal.

Nous présenterons les résultats obtenus sur les différentes transferrines en comparaison avec les nôtres dans le chapitre II.

3 - MISE EN EVIDENCE DES DOMAINES STRUCTURAUX ET STRUCTURE TERTIAIRE

a) Coupure enzymatique. Le premier, WILLIAMS (320), en 1974, a isolé à partir de l'ovotransferrine, saturée à 30 p 100 en fer, un fragment peptidique de masse moléculaire 35 000 qui fixe un seul atome de fer. Ce fragment, monocaténaire, a été identifié à l'extrémité N-terminale de la protéine. Par une autre technique, il obtient (WILLIAMS) (321) un deuxième fragment de masse moléculaire 35 000, qui fixe lui aussi un seul métal mais qui correspond à l'extrémité C-terminale de l'ovotransferrine. Il est à remarquer que ces fragments sont obtenus à partir de protéine fixant le métal sur l'un ou l'autre site et par dégradation enzymatique de l'extrémité non protégée par le métal.

Ces fragments peptidiques ne possèdent aucun caractère immunologique commun.

Par la suite, le même type de manipulation a été réalisé sur la sérotransferrine bovine par BROCK et al. (322, 323, 324), à la différence cependant que dans ce cas les deux fragments ont été obtenus à partir de la protéine complètement saturée, sans dégradation de l'un des 2 domaines.

En 1976, LINE et al. (325) ont isolé à partir de la lactotransferrine un fragment de masse moléculaire 33 000, que plus

tard BLUARD-DECONNINCK, WILLIAMS et al. (326) ont identifié à l'extrémité C-terminale. Nous avons repris et étendu ces expériences et nous les développerons dans le chapitre IV (p156).

La sérotransferrine humaine a été, elle, coupée en deux ensembles par EVANS et al. (327) et tout récemment LEGER et al. (328) ont isolé un fragment à partir de la sérotransferrine de Lapin.

b - Dénaturation thermique. DONOVAN et ROSS (329), en utilisant les techniques de dénaturation thermique, ont réussi à démontrer qu'il existe pour les molécules de transferrine, une température de dénaturation, correspondant aux formes apo, monoferrique sur l'un ou l'autre site et diferrique. Le cas de la sérotransferrine (DONOVAN, BEARSLEE et al.) (330) a été bien étudié comme le montre la figure 6 (p 44).

L'aposérotransferrine possède deux domaines structuraux dont les températures de dénaturation sont bien définies. La fixation d'un ion ferrique ou d'un ion Al^{3+} sur l'un ou l'autre des domaines n'augmente la température de dénaturation que du domaine concerné. Il n'y a pas, ou peu, de relations entre ces domaines qui sont donc indépendants. Seule existe peut-être, une légère anticoo-pérativité dans la fixation séquentielle des deux ions. Cette indépendance des deux domaines peut expliquer la possibilité de séparer en électrophorèse en gel de polyacrylamide (MAKEY et al.) (331), ou en "isoelectrofocusing" (VAN EIJK et al.) (332), les quatre formes moléculaires de la sérotransferrine humaine.

Par contre, dans le cas de l'ovotransferrine, DONOVAN et al. (333) ont montré que les deux domaines existent et que les interactions sont faites entre eux puisque la dénaturation de l'un entraîne celle de l'autre. Cette interaction est détruite par l'action de $NaClO_4$.

4 - DONNEES CRISTALLOGRAPHIQUES

Les études cristallographiques ont été entreprises par trois groupes : le groupe du BIRBECK Collège (AL HILAL et al.) (334), (GORINSKI et al.) (335) sur la sérotransferrine de Lapin, le groupe de ABOLA (336) sur l'ovotransferrine et celui de BAKER et al. (337) sur la lactotransferrine. Nous résumons dans le

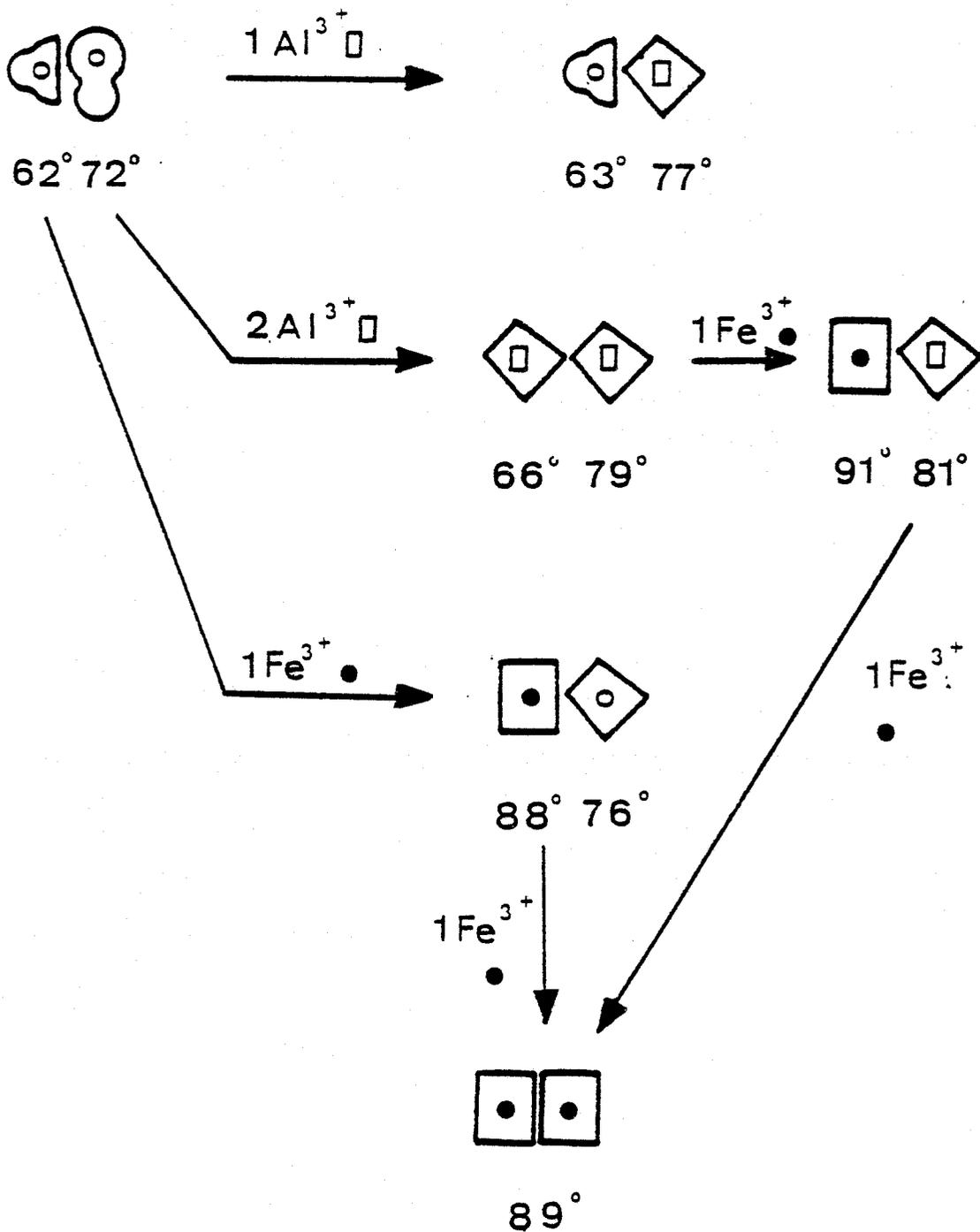


Figure 6

Relations entre les domaines structuraux de la sérotransferrine d'après DONOVAN et al. (338)



- site libre
- site occupé par Fe³⁺
- site occupé par Al³⁺

tableau XI (p 46) les données actuellement disponibles.

Récemment GORINSKI et al. (339) ont publié un modèle moléculaire de la sérotransferrine de lapin obtenu avec une résolution de 6 Å. Comme le montre la figure 7 (p 47), la sérotransferrine de lapin, de dimension 95 x 60 x 50 Å est constituée de deux lobes de volume presque identique ; chaque lobe dont les axes forment un angle de 30° entre eux est creusé d'une cavité ouverte sur l'axe de symétrie. L'une de ces cavités est délimitée d'un côté, par une hélice de α , de l'autre par un feuillet plissé β .

VI - STRUCTURE ET CONFORMATION DES GLYCANNES

A - STRUCTURE PRIMAIRE

1 - NATURE DU POINT D'ATTACHE GLYCANNE PROTEINE

Dès 1965, SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (340) et SPIK (341) ont démontré que les deux glycanes de la sérotransferrine étaient conjugués à la protéine par une liaison de type N-(β -aspartyl)-N-acétyl glucosaminyllaminique. Ce résultat a été retrouvé en 1966 dans le cas de la lactotransferrine par SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (342) et SPIK et MONTREUIL (343).

2 - STRUCTURE DES GLYCANNES

La détermination des structures glycaniques des différentes transferrines a été réalisée en grande partie au laboratoire et la structure des glycanes de la sérotransferrine fait partie des premières structures glycaniques complètes ayant été identifiées.

a - La sérotransferrine. La séquence primaire des glycanes de la sérotransferrine a été entreprise en 1962 par MONTREUIL, SPIK et CHOSSON (344) et MONTREUIL, ADAM CHOSSON et SPIK (345). Des résultats partiels ont été obtenus par JAMIESON et al. (346), SPIK, MONSIGNY et MONTREUIL (347) et SPIK (348). Elle a été définitivement établie par SPIK, VANDERSYPPE et al. (349), SPIK, FOURNET et al. (350) et SPIK, BAYARD et al. (351) dès 1974. Par la suite, cette structure

TABLEAU XI

PARAMETRES CRISTALLOGRAPHIQUES DES TRANSFERRINES SATUREES EN FER

	LTF humaine (a)	-STF de Porc (b)	-STF de Lapin (c)
Température de cristallisation	4°C	4°C	5°C
Système de cristallisation	orthorombique $P_{2_1 2_1 2_1}$	orthorombique $P_{2_1 2_1 2_1}$	tétragonal $P_{4_1 2_1 2_1}$ $P_{3_1 2_1 2_1}$
Pourcentage d'eau	42 p 100	-	68 p 100
Masse moléculaire	85 000		
Dimension des trois axes	(a) 155,5 (b) 97,3 (c) 55,5	87,1 88,3 114,0	126,9 126,9 145,2

- a BAKER et al. (352)
- b MAGDOFF et al. (353)
- c AL-HILAL et al. (354)





Figure 7

Modèle moléculaire de la sérotransferrine de Lapin obtenu
par diffraction des rayons X, avec une résolution de 6 Å^o
d'après GORINSKI et al. (355)

obtenue à l'aide des méthodes chimiques, a été confirmée par l'analyse des spectres de Résonance Magnétique Nucléaire à 360 MHz par DORLAND, HAVERKAMP et al. (356). Nous donnons la structure des glycanes de la sérotransferrine dans la figure 8 (p 49). Les deux glycanes sont du type N-acétyllactosaminique tel que l'a défini MONTREUIL (357). Deux structures coexistent : une structure biantennée et une triantennée.

b - La lactotransferrine. La structure des glycanes de la lactotransferrine a été plus délicate à déterminer, car elle présente de nombreuses variations dues à l'introduction de 1 à 3 résidus de L-fucose, branchés en α -1,6 ou en α -1,3, sur une structure de type N-acétyllactosaminique, identique à celle de la sérotransferrine humaine. Ces structures, représentées dans la figure 9 (p 50), ont été établies par SPIK, FOURNET et al. (358), SPIK, VANDERSYPPE et al. (359), MONTREUIL et SPIK (360), SPIK et al. (361), SPIK, FOURNET et al. (362), SPIK, STRECKER et al. (363)

c - Les autres transferrines. La structure du glycanne de la sérotransferrine de lapin déterminée par LEGER, TORDERA et al. (364) est identique à celle de la sérotransferrine humaine. La sérotransferrine de Lapin diffère néanmoins de la sérotransferrine humaine par la présence d'un seul glycanne.

La structure de l'unique glycanne de l'ovotransferrine de Poule se différencie nettement des autres transferrines par l'absence de résidus de galactose et d'acide N-acétyl neuraminique. Sa structure, présentée dans la figure 10 (p 51), a été établie par SPIK, FOURNET et MONTREUIL (365) et DORLAND, HAVERKAMP et al. (366).

La lactotransferrine bovine selon CHERON (367) et CHERON et al. (368) possède outre des glycanes de type N-acétyllactosaminique classique des glycanes de type oligomannosidique (MONTREUIL) (369).

D - CONCLUSIONS

Chaque transferrine se caractérise par des glycanes qui diffèrent soit par leur nombre, soit par leur structure.

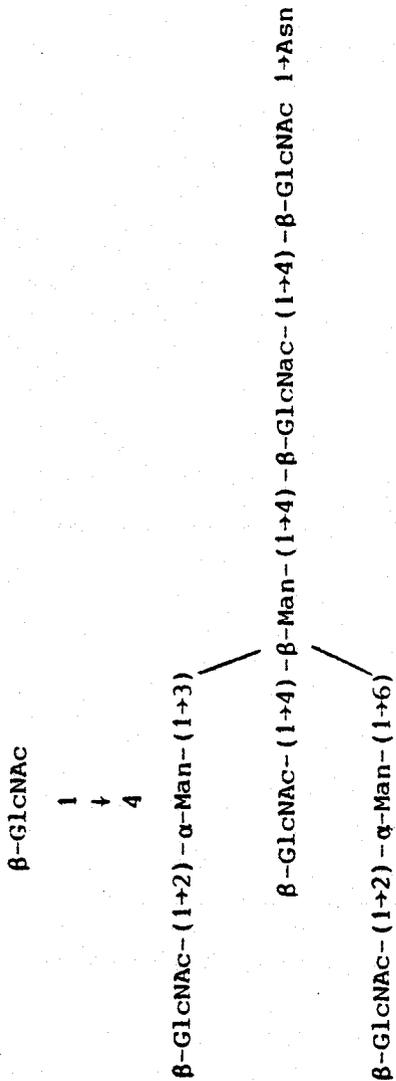


Figure 10

Structure du glycanne de l'ovotransferrine de Poule
d'après SPIK et al. (377) et DORLAND et al. (378)



E - CONFORMATION DES GLYCANNES

L'étude de la conformation des glycanes est encore purement spéculative. Cependant l'étude des modèles moléculaires du glycanne biantenné de la sérotransferrine a permis à MONTREUIL (379), MONTREUIL, FOURNET et al. (380), MONTREUIL et VLIEGENTHART (381) de définir quelques paramètres.

1. Le noyau pentasaccharidique du mannotriacidodi-N-acétylchitobiose invariable est compact. Le trisaccharide β Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNac-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNac-1 \rightarrow As-n conjugué au résidu d'asparagine est disposé dans un plan, de plus deux liaisons hydrogènes doivent le stabiliser.

2. Les antennes constituées par l'enchaînement sialyl N-acétyllactosamine s'enroulent en hélice.

3. Le résidu de mannose 4 peut se disposer de deux manières par rapport au plan défini par le trisaccharide défini précédemment et donner ainsi comme nous le montrons dans la figure 11 (p 53) soit une configuration en Y soit une configuration en T.

De récentes données cristallographiques (WARIN et al.) (382,383) laissent supposer que le modèle T serait le modèle correspondant à la réalité.

VII - ROLE DES TRANSFERRINES DANS LA REGULATION DU METABOLISME DU FER

A - RELATIONS ENTRE LES FORMES DE RESERVE ET LES FORMES ACTIVES

Pour une étude plus détaillée nous renvoyons aux revues générales de HERSHKO (384), LYNCH et al. (385), MORGAN (386) et AISEN et al. (387).

A - CAPTURE DU FER DE RESERVE PAR LES TRANSFERRINES

La principale source du fer est située dans les cellules

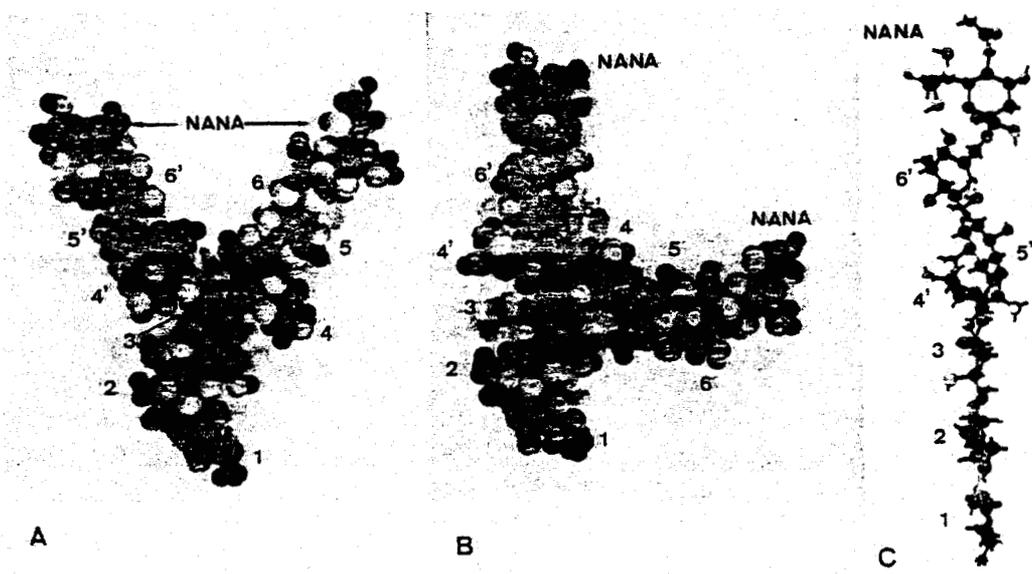


Figure 11

Modèles moléculaires compacts (A et B) et éclaté (C)
du glycanne biantenné de la sérotransferrine humaine selon MONTREUIL et al. (388)

A : conformation en Y

B : conformation en T



du système réticuloendothélial. Les deux tiers des réserves proviennent du catabolisme de l'hémoglobine des érythrocytes phagocytés. La presque totalité : 85 p 100 du métal du catabolisme de l'hème est immédiatement recyclée suivant le schéma que nous donnons dans la figure 12 (p 55), le reste 15 p 100 est stocké par la ferritine. Ainsi donc, dans les conditions physiologiques normales, les échanges avec les formes de stockage sont limités. Quelle que soit la source du métal (ferritine ou catabolisme immédiat de l'hème), son recyclage par l'intermédiaire de la sérotransferrine plasmatique nécessite une étape de réduction qui ferait intervenir l'acide ascorbique, puis une étape d'oxydation qui ferait intervenir un enzyme : la ferroxidase I. C'est en 1966 que OSAKI et al. (389) suggèrent la participation de la céruléoplasmine (Ferroxidase I) dans l'oxydation du fer. La figure 13 (p 56) schématise le rôle physiologique de la céruléoplasmine qui selon OSAKI et al. (390) réalise un gradient de concentration de Fe^{2+} et de Fe^{3+} entre le métal de stockage et le métal de transport.

Cependant un travail récent de HARRIS (391) suggère un transfert direct entre la ferritine et la transferrine, transfert qui est augmenté en présence d'ATP ou de citrate. Ce transfert pourrait être la conséquence d'un équilibre entre le fer du core de la ferritine et celui de la surface de la protéine.

De plus, en accord avec HARRISON, HOY et al. (392) la disponibilité du fer de la ferritine est fonction du taux de saturation de celle-ci, elle est maximale pour une saturation en métal comprise entre 30 et 50 p 100.

2 - TRANSFERRINE ET SYNTHÈSE DE L'HEME

La synthèse de l'hème s'effectue dans les mitochondries des cellules de la lignée érythropoïétique. La seule source de fer pour cette synthèse est la transferrine (HEMMAPLARDH et al.) (393). Les premiers travaux sur l'incorporation du fer par le réticulocyte et la moëlle osseuse datent de 1949 (WALSH et al.) (394) mais JANDL INMAN et al. (395) et JANDL et KATZ (396) furent les premiers à faire intervenir la transferrine dans la synthèse de l'hémoglobine.

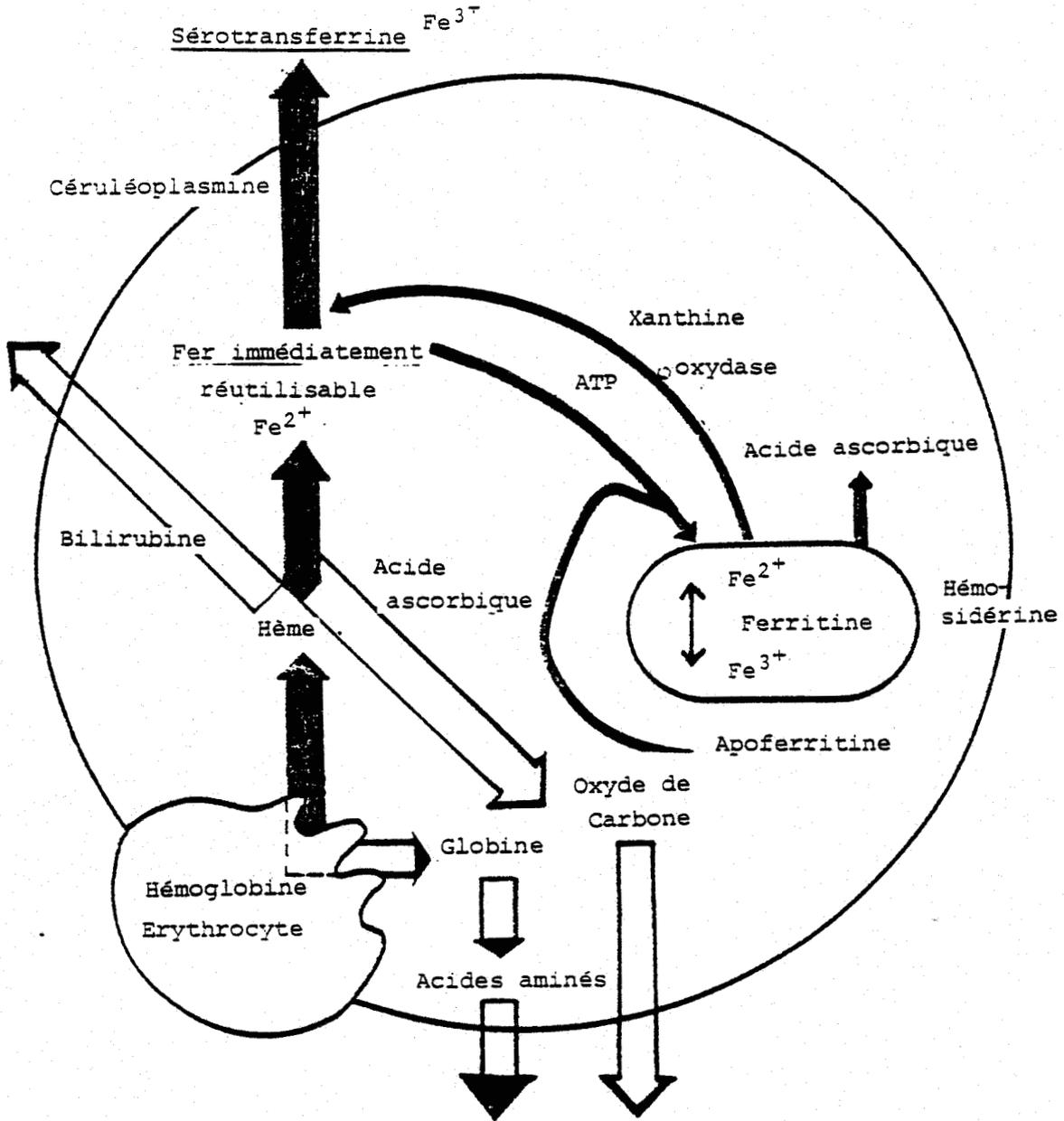


Figure 12

Représentation schématique du recyclage du fer dans les cellules du système réticulo-endothélial d'après LYNCH et al. (397)

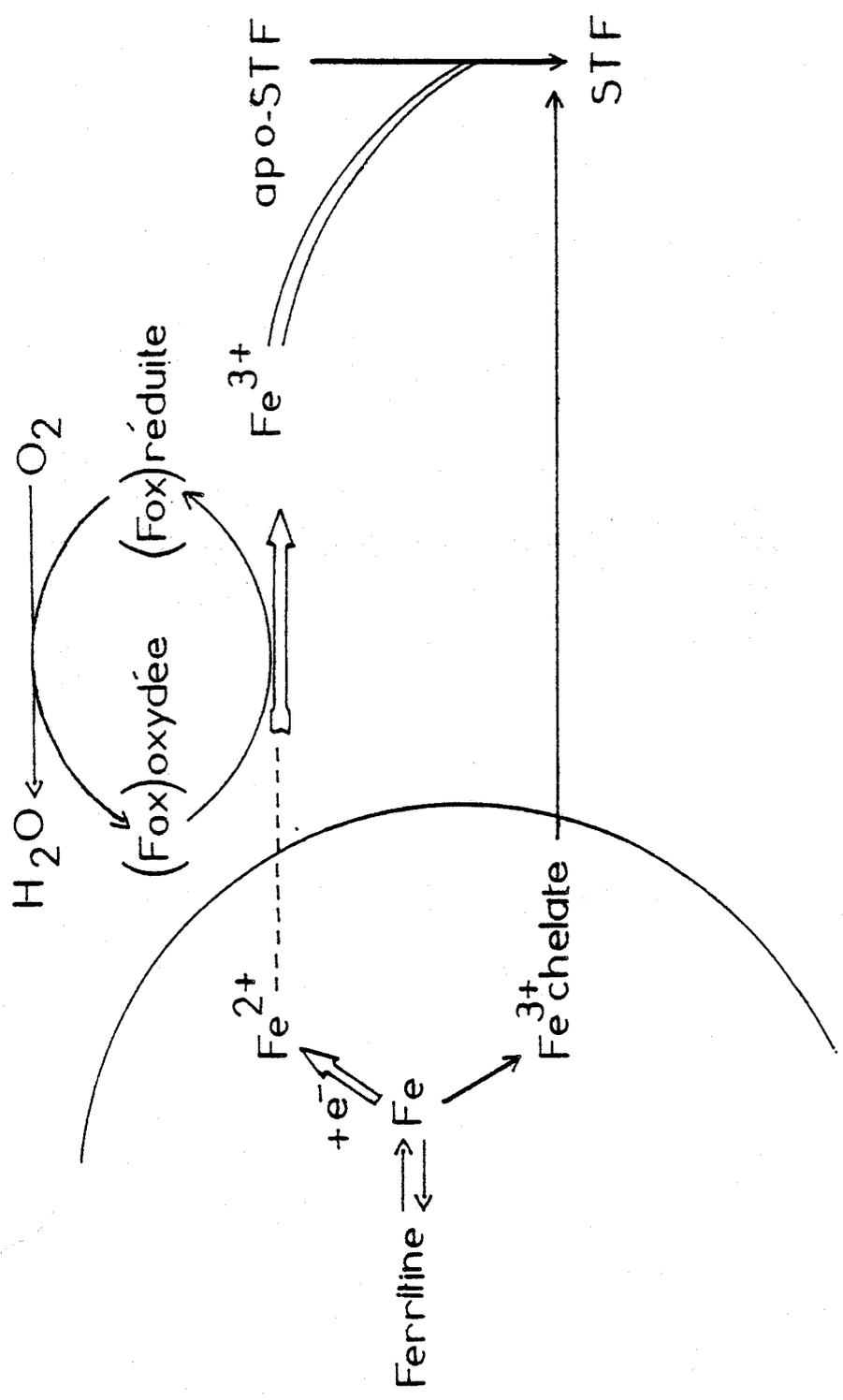


Figure 13

Mécanisme de la capture du fer de la ferritine par la sérotransferrine
d'après OSAKI et al. (398)



MORGAN (399) a suggéré l'intervention de plusieurs étapes dans l'interaction sérotransferrine-réticulocyte :

1. Reconnaissance de la sérotransferrine par le réticulocyte et formation d'un complexe avec le récepteur membranaire.
2. Transfert du fer au réticulocyte
3. Libération de la transferrine par le récepteur

Deux hypothèses sont actuellement proposées pour expliquer le transfert du fer de la sérotransferrine plasmatique à la mitochondrie. La première, que nous avons schématisée dans la figure 14 (p 58), étayée par les expériences de SPEYER et FIELDING (400), suppose que la sérotransferrine fixée par le récepteur membranaire (B_2) cède son fer à divers intermédiaires membranaires (B_1 , A) puis cytosoliques (C) qui vont le véhiculer jusqu'à l'hème.

La deuxième hypothèse, émise par MORGAN et son groupe (401), propose une endocytose de la sérotransferrine par le réticulocyte. Une récente étude de OCTAVE et al. (402) concilie les deux théories. Selon ces auteurs, la transferrine endocytée, gagne les lysosomes où elle perd son métal puis est excrétée dans le fluide extracellulaire.

Quel que soit le mécanisme proposé, certaines étapes, que nous allons développer, sont communes à ces différentes hypothèses.

- a Interactions sérotransferrine-réticulocytes
- b Départ du métal
- c Intermédiaires cytosoliques.

a - Interaction sérotransferrine-réticulocyte

L'interaction sérotransferrine-réticulocyte pose plusieurs problèmes :

- Pourquoi l'aposérotransferrine n'est-elle pas reconnue ?
- Quel est le signal de reconnaissance : les glycanes, la protéine, les sites de fixation du fer ?
- Quelle est la nature du récepteur ?

1° Les signaux de reconnaissance

Le fait que l'aposérotransferrine ne soit pas reconnue par la cellule cible suggère que l'élimination du fer induit un changement

de conformation de la protéine ou un changement de la localisation des signaux de reconnaissance. Au laboratoire, MONTREUIL et al. (404) (figure 15, p 60) ont émis l'hypothèse que les glycanes, véritables antennes sont responsables de la reconnaissance de la cellule cible.

Cependant, la désialylation des glycanes (KORNFELD) (405), (MORGAN) (406), et l'élimination de 60 p 100 des glycanes (KORNFELD) (407) ne sont suivies d'aucun effet sur le transfert du fer.

Par contre, la perte de propriété de fixer spécifiquement la sérotransferrine lors de la maturation du réticulocyte en hématie est synchrone de la déglycosylation du récepteur membranaire. (Van BOCKXMEER, MORGAN et al.) (408).

2° Le récepteur membranaire

Les résultats actuellement obtenus par de nombreuses équipes sont contradictoires. Cependant Van BOCKXMEER, YATES et al. (409) ont isolé du réticulocyte de Lapin une glycoprotéine membranaire de masse moléculaire 275 000 qui "in vitro", fixe réversiblement et à saturation la sérotransferrine. YANG-HU et al. (410) ont isolé eux un récepteur de masse moléculaire 175 000 (composé peut-être de deux sous-unités) dont le rapport des axes est égal à 9. Récemment un récepteur placentaire a été identifié et purifié (SELIGMAN et al.) (411), (WADA et al.) (412).

b - Départ du métal

La forte affinité de la transferrine pour le fer pose le problème du processus de libération de celui-ci.

Trois mécanismes sont possibles :

- réduction du fer ferrique en fer ferreux
- abaissement du pH, au niveau du site cellulaire par protonation
- élimination de l'ion bicarbonate (ou carbonate).

La seule certitude est l'existence, à un endroit quelconque, d'une étape de réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} qui fait intervenir soit un système à NADH (EGYED) (413) soit un système ATP-ascorbate (MAZUR et al.) (414).

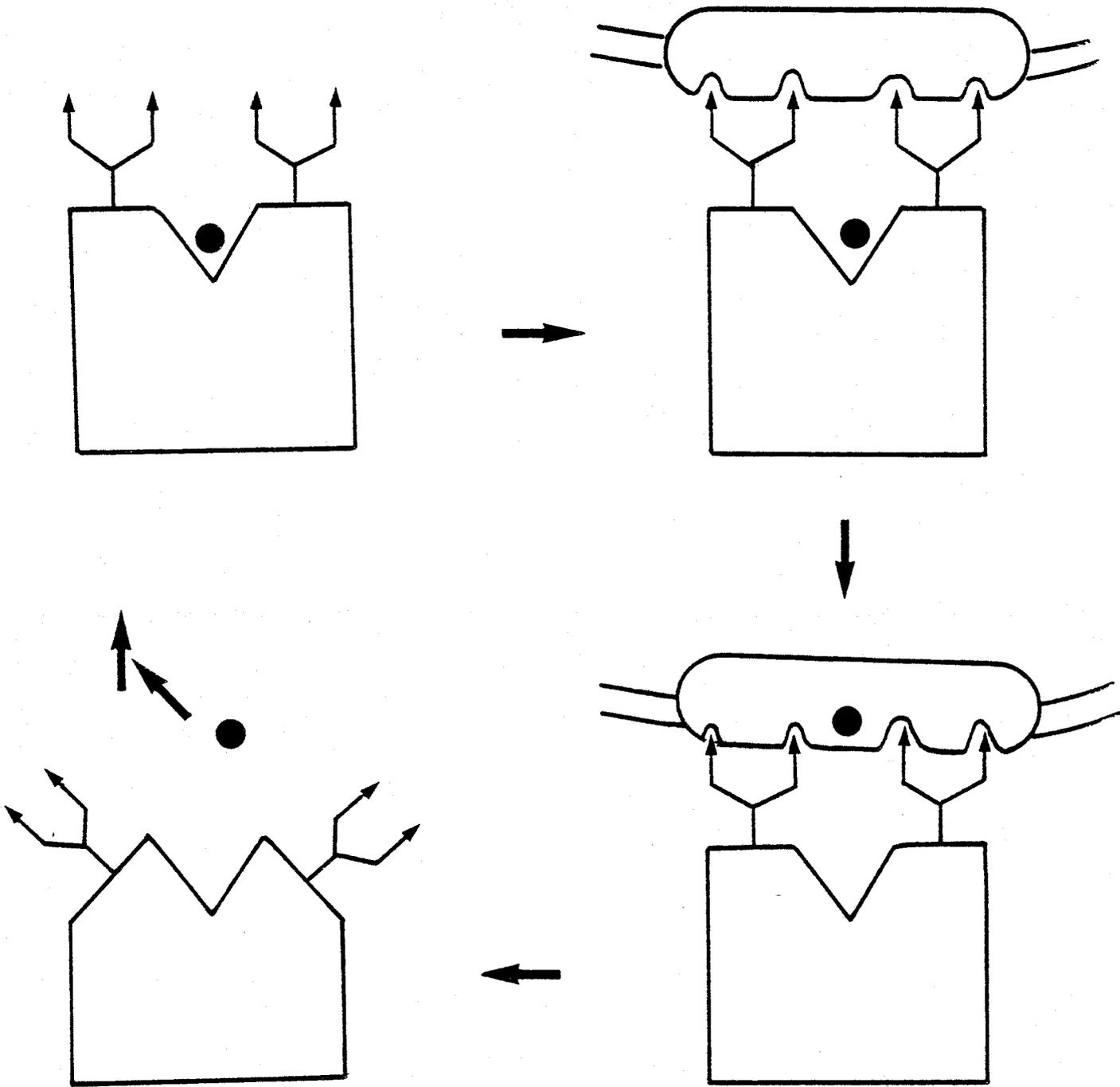


Figure 15

Rôle des glycannes dans la reconnaissance du réticulocyte,
d'après MONTREUIL et al. (415)



c - Les intermédiaires cytosoliques

Ils ne sont pas clairement définis mais deux protéines sont susceptibles de jouer un rôle important : la ferritine et la sérotransferrine.

- La ferritine est peut-être l'intermédiaire C défini par SPEYER et FIELDING (416) (Figure 14). Cette hypothèse est confirmée par les travaux de SPEYER et FIELDING (417) et ceux de ROMSLO (418).

- D'autre part, plusieurs auteurs ont décrit l'existence de récepteurs de la sérotransferrine à la surface de la mitochondrie (KONOPKA) (419), (KONOPKA et al.) (420).

3 - CONSTITUTION DES FORMES DE RESERVE A PARTIR DE LA TRANSFERRINE

a - Constitution des réserves hépatiques

Le foie constitue la plus grande réserve de fer de l'organisme, il contient approximativement 30 p 100 du métal de réserve (FINCH et FINCH) (421).

L'incorporation du fer de la transferrine par le système parenchymateux est faible (POLLYCOVE et MORTIMER) (422) : elle atteint 0,09 mg/100 ml de sang par jour, soit 20 p 100 du fer incorporable par le réticulocyte, elle peut atteindre 0,45 mg chez le sujet atteint d'anémie réfractaire aplasique.

La transferrine est certes la source principale du fer du parenchyme, mais d'autres voies doivent exister comme les incorporations à partir des systèmes hémoglobine-haptoglobine et hème-hémopexine (HERSHKO, COOK et al.) (423), (HERSHKO) (424) et (MULLER et al.) (425).

Toutes les protéines fixant le fer : hémopexine, transferrine, ferritine, ainsi que le fer libre, seraient pinocytées par l'hépatocyte. A ce niveau, le fer est libéré sous forme ferreuse par la formation de lysosomes secondaires (TRUMP et al.) (426) (SARGENT et al.) (427). La transferrine serait remise en circulation sous forme d'apotransferrine (MUNRO et LINDER) (428).

Les travaux de HOY et HARRISON (429) et de ZIMELMAN et al. (430) démontrent que le fer, ferrique ou ferreux, est incorporé par

l'hépatocyte mais que le phénomène est plus important avec le fer ferreux. Récemment GROHLICH, COLIN et al. (431, 432) ont mis en évidence des récepteurs protéiques spécifiques de la sérotransferrine à la surface de l'hépatocyte. Leurs résultats suggèrent que l'absorption plus importante du fer ferreux n'est que le reflet d'une étape intermédiaire du mécanisme d'absorption.

b - Hypothèse de FLETCHER et HUEHNS

La possibilité pour la sérotransferrine de céder spécifiquement le fer, soit aux formes actives de son métabolisme, soit aux formes de réserve, pose le problème de la différenciation des deux sites de fixation spécifique du métal.

L'élégante hypothèse de FLETCHER et HUEHNS (433, 434) peut certes apporter une réponse à ce problème. Ces auteurs suggèrent que les mécanismes de fixation ou d'incorporation du métal dépendent uniquement d'un processus d'interaction de la transferrine avec différents organes récepteurs. Le fer d'un des sites dénommés A serait délivré uniquement aux cellules érythropoïétiques alors que celui du deuxième site B serait cédé préférentiellement soit aux cellules concernées par le stockage du fer, soit aux cellules intestinales. Nous avons schématisé cette hypothèse dans la figure 16 (p 63).

Cette hypothèse, sur laquelle toute la recherche biologique sur les transferrines est fondée depuis 10 ans, a engendré de nombreux résultats contradictoires. Elle repose sur les travaux de FLETCHER et HUEHNS (435), AWAI et al. (436), HAHN (437) et ZAPOLSKI GANZ et al. (438), qui démontrent que le réticulocyte de Lapin incorpore le fer d'un seul des deux sites de fixation du métal de la sérotransferrine. De plus, le rat, à qui on injecte une sérotransferrine marquée au ^{59}Fe sur un site et au ^{55}Fe sur l'autre site, incorpore le ^{59}Fe sur l'érythrocyte, l'hème, la moelle osseuse et la rate alors que le ^{55}Fe se retrouve lui dans l'hépatocyte et l'intestin (AWAI et al.) (439).

Cependant, de nombreuses expériences contredisent cette hypothèse ; d'une part, HARRIS et AISEN (440) démontrent que dans un système homologue, transferrine humaine-réticulocyte humain, les deux sites donnent aux réticulocytes de la même manière, d'autre part, la distribution du fer de l'aposérotransferrine

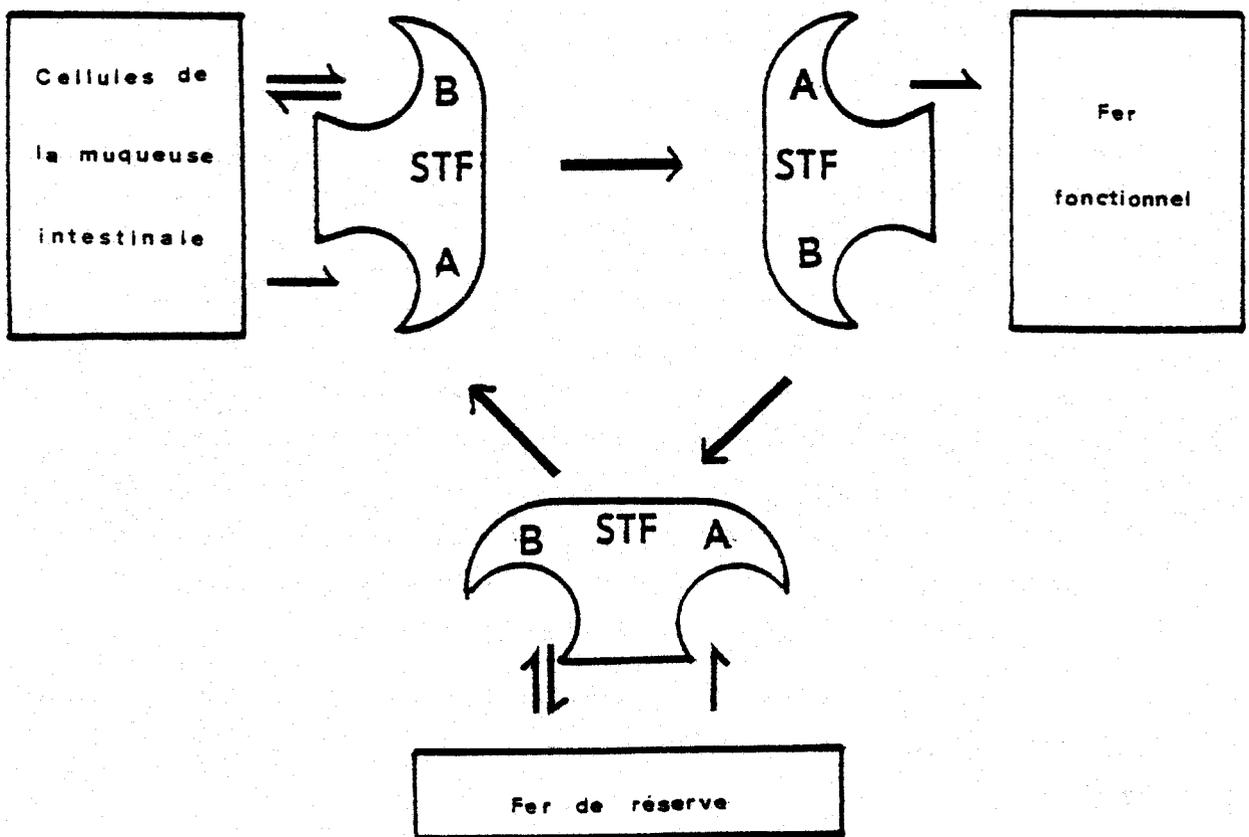


Figure 16

Hypothèse de FLETCHER et HUEHNS (441) concernant la différence fonctionnelle des deux sites de fixation du fer de la sérotransferrine



saturée par du ^{59}Fe au niveau des cellules intestinales, ou de la sérotransferrine partiellement désaturée par le système parenchymateux se répartit au hasard sur les deux sites (POOTRAKUL et al.) (442).

4 - LACTOTRANSFERRINE ET LE SYSTEME RETICULOENDOTHELIAL

Les interactions entre les formes de transport et les formes de stockage du fer font classiquement appel à la transferrine et aux systèmes parenchymateux et réticuloendothélial. Cependant, il existe une voie qui fait intervenir la lactotransferrine et le macrophage. Cette voie est mineure et n'existe que dans les cas pathologiques.

Lors d'une inflammation quelconque le taux de fer sérique baisse considérablement (CARTWRIGHT) (443), alors qu'il s'accumule dans la ferritine du système réticuloendothélial (CARTWRIGHT) (444), WOHLER et al. (445). Cette baisse du taux de fer est consécutive à une libération de l'apolactotransferrine des leucocytes neutrophiles (Van SNICK, MASSON et al.) (446) qui, par l'intermédiaire vraisemblablement d'ions citrates, prélève le fer de la sérotransferrine pour aller sous forme saturée reconnaître (Van SNICK et MASSON) (447) un récepteur de la membrane plasmique du macrophage. Ce récepteur est spécifique de la lactotransferrine saturée. Nous avons schématisé les relations entre la lactotransferrine et le système réticuloendothélial dans la figure 17 (p 65).

Le fer ainsi véhiculé se retrouve fixé à la ferritine tandis que la protéine est dégradée (VAN SNICK, MARKOWETZ et al.) (448).

B - ABSORPTION DU FER

Bien que de nombreux résultats aient été acquis sur l'étude de l'absorption du fer, un certain nombre de problèmes restent à résoudre. Ainsi, il reste à définir les formes assimilables du fer, les constituants responsables de l'absorption et de la régulation de celle-ci, le mécanisme du transfert du fer jusqu'à la sérotransferrine. Une étude détaillée de l'absorption du fer est réalisée dans les revues générales de FORTH et al. (449) et de TURNBULL (450).

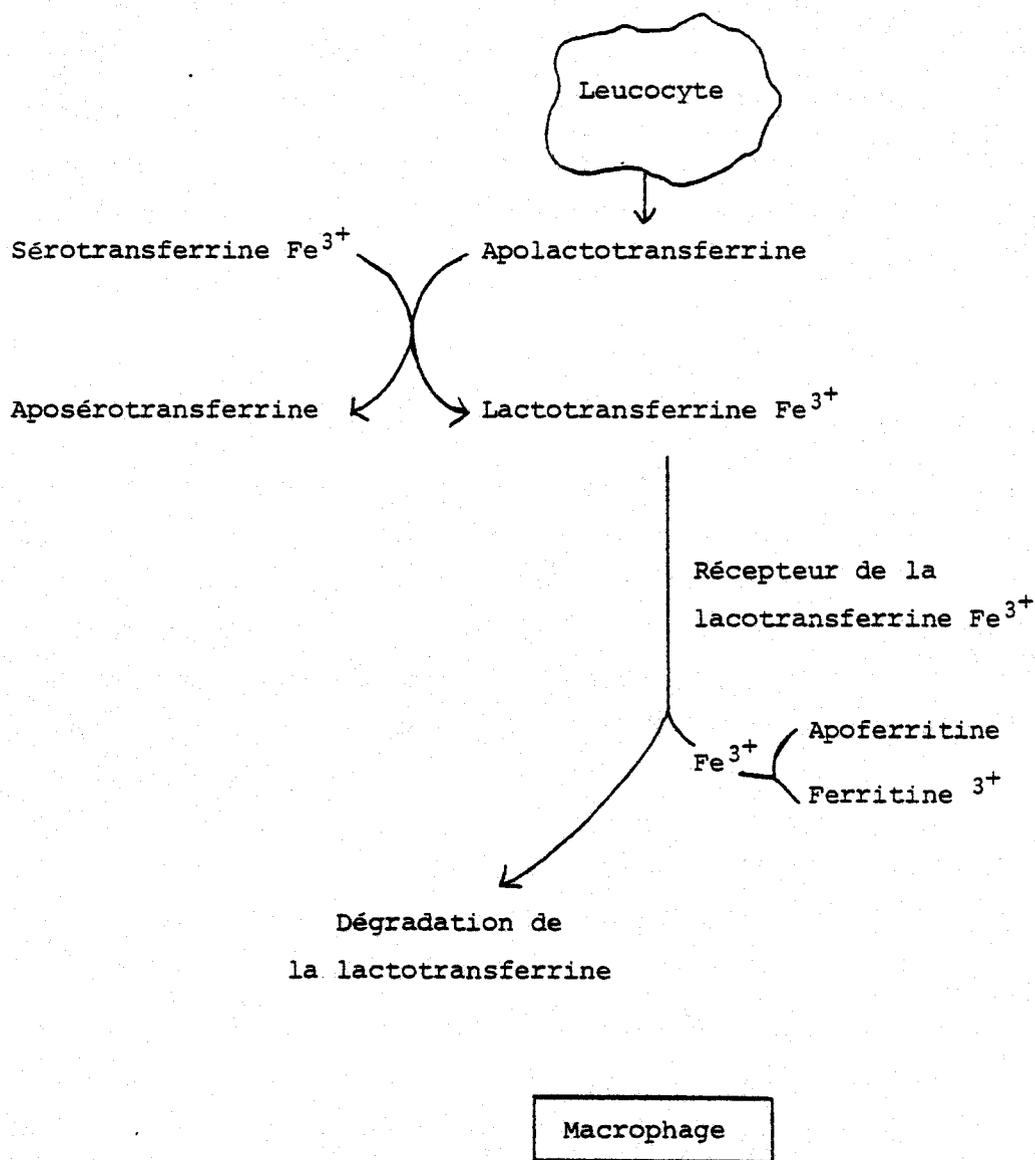


Figure 17
Relations entre la lactotransferrine et
le système réticulo-endothélial d'après VAN SNICK et al. (451)



1 - LE LIEU DE L'ABSORPTION

Une première phase rapide d'absorption du fer ionisé a lieu principalement au niveau du duodénum et du jéjunum (WEBY et al.) (452), une deuxième phase plus lente a lieu dans l'iléon (HEMMATI) (453), (WEBY) (454). D'après RHODES et al. (455) le fer peut aussi être absorbé au niveau de l'estomac.

Le siège de l'absorption au niveau du duodénum est l'entérocyte dont la bordure en brosse est en contact direct avec le flux alimentaire.

2 - LA FORME DU FER

Dès 1924, HEUBNER (456) suggère que le fer n'est absorbé qu'à l'état ferreux. Par la suite, MOORE et al. (457) et HAHN, JONES et al. (458) démontrent que chez des sujets anémiés par ferriprivation, la quantité de Fe^{2+} résorbé est 1,5 à 10 fois plus importante que celle de Fe^{3+} , ces résultats furent confirmés par BRISE et HALLBERG (459). Actuellement, il est admis que la différence de solubilité de Fe^{2+} ($1,6 \cdot 10^{-2}M$) et de Fe^{3+} ($10^{-18}M$) est responsable de la plus faible absorption des ions Fe^{3+} (STARKENSTEIN) (460), en effet, lorsqu'ils sont présentés sous forme de chélates les deux sels sont absorbés de manière identique (FORTH, LICHTENBERT et al.) (461) et FORTH et RUMMEL (462).

Actuellement, les auteurs considèrent que seul le métal "disponible", quelle que soit sa forme est susceptible d'être absorbé. La disponibilité du métal est fonction de la nature du milieu. En effet, la composition chimique du milieu stomacal fait que le fer arrive dans le duodénum sous forme ferrique, au fur et à mesure du transit, il va être soit complexé par des ligands, soit réduit par la présence d'agent réducteur, soit être précipité, comme le montre la figure 18 (p 67), sous forme d'hydroxydes ferriques insolubles.

Il apparaît donc que l'alimentation joue un rôle important dans la disponibilité du fer.

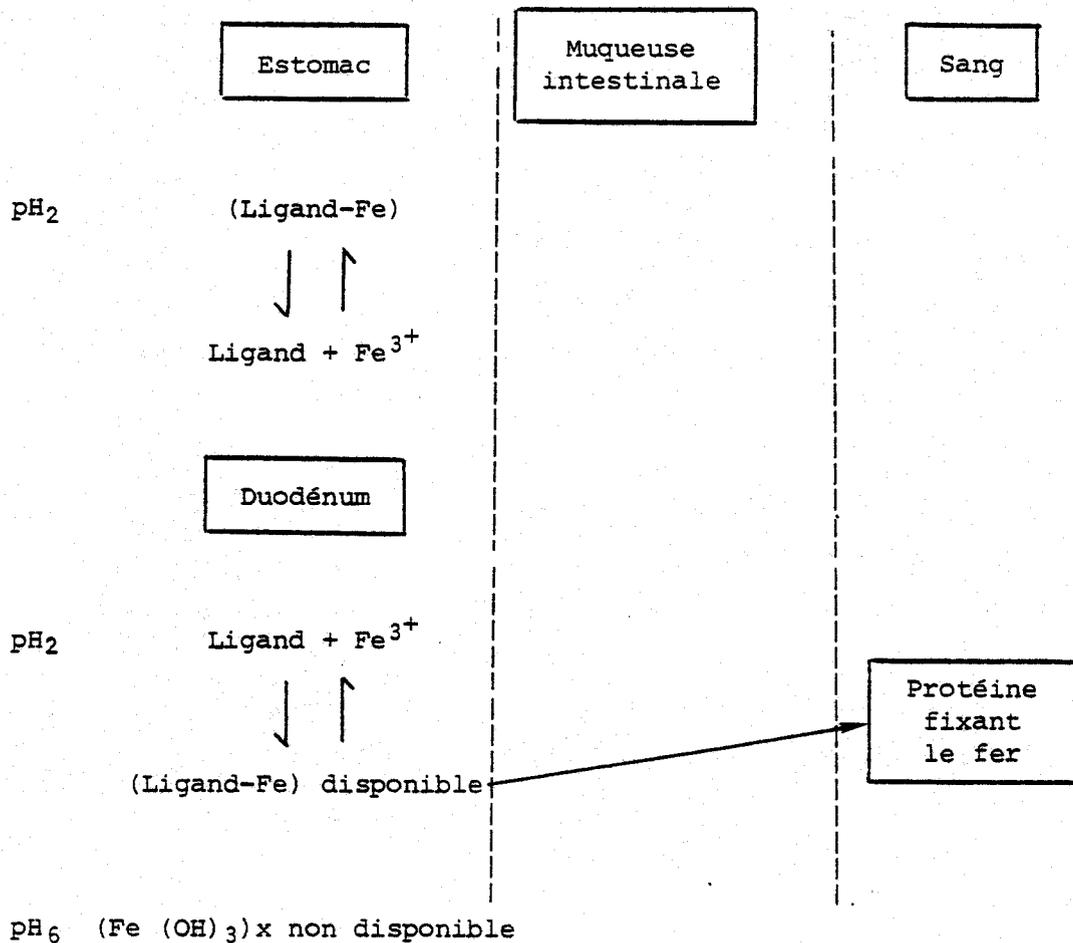


Figure 18

Destinée du fer dans le tractus gastrointestinal
d'après HUEBERS et RUMMEL (463)



3 - LES BESOINS EN FER

L'absorption du fer augmente linéairement en fonction de la quantité présentée jusqu'à une certaine limite, déterminée par les besoins de l'organisme (GITLIN et al.) (464).

Le pourcentage de fer (présenté sous forme de sulfate ferreux) incorporé par l'organisme est fonction de la dose présentée.

Ainsi, 25 mg de fer ingéré sont absorbés à 11,2 p 100, 50 mg à 7,4 p 100 et 100 mg à 8,2 p 100.

Il est actuellement admis que chez l'adulte normal 10 p 100 du fer ingéré est absorbé (X) (465). Dans le cas de déficience en fer de l'organisme, l'absorption augmente.

Il est encore difficile de déterminer cette quantité de fer absorbée, car comme nous le verrons plus loin de nombreux facteurs entrent en jeu, aussi bien au niveau de la présentation du métal qu'au niveau de la mesure du fer absorbé (comptage de radioactivité du corps entier, taux de saturation de la sérotransferrine, quantité de fer absorbé au niveau des sites d'absorption).

4 - CAS DU FER DU LAIT HUMAIN

Il existe d'après BLANC (466) 0,8 mg de fer par litre de lait de femme, ce fer est localisé dans la fraction lipidique, la caséine, et en grande partie dans le lactosérum où il est fixé réversiblement par la lactotransferrine.

D'après les résultats récents de SIIMES et al. (467) qui confirment ceux de BLANC (468), le taux de fer baisse en fonction de la durée de la lactation : à deux semaines la concentration statistique est de 0,56 mg/l, elle tombe à 0,3 mg/l au bout de 5 mois. La variation de la concentration en fer suit celle de la lactotransferrine. Si l'on considère qu'un lait stabilisé contient de 1 à 2 g (MONTREUIL et al.) (469) de lactotransferrine par litre de lait, sa saturation théorique en fer doit varier de 15 à 30 p 100 si elle fixe tout le métal présent. Or, la lactotransferrine isolée à partir du lait a un taux de saturation compris entre 15 et 30 p 100.

Le fer du lait humain a une grande disponibilité (Mac MILLAN et al.) (470), ainsi comme le montrent SAARINEN (471) et SAARINEN et al. (472) le taux d'absorption du fer du lait humain par l'enfant est de 50 p 100 contre 10 p 100 pour celui du lait de vache. Le problème du rôle de la lactotransferrine dans l'absorption du fer n'est pas encore résolue.

Selon BLANC et ISLIKER (473), la lactotransferrine, en captant le fer de la transferrine sérique, permettrait l'introduction directe de celui-ci dans le lait. La grande stabilité du complexe fer-lactotransferrine (SPIK et MONTREUIL) (474), (BLANC) (475), pose le problème du mécanisme de libération du fer au niveau de l'intestin du nourrisson. Pour SPIK (476), la lactotransferrine ne serait pas attaquée par des protéases, mais céderait son fer à des agents chélateurs, ou bien des transférases réaliseraient activement le transfert du fer aux chélateurs. Le rôle de la lactotransferrine dans l'apport du fer au nourrisson est mise en doute par MASSON (477) car il n'existe aucune relation entre le taux de fer et la concentration en lactotransferrine dans le lait des différents mammifères. Cependant, cet auteur n'exclut pas définitivement l'intervention de la lactotransferrine, qui pourrait agir de la façon suivante : le fer de la glycoprotéine pourrait être capté par les cellules épithéliales de la glande mammaire et être stocké dans des granules lipidiques qui seraient à l'origine du fer véhiculé par le lait.

5 - MECANISME D'ABSORPTION

Le mécanisme d'absorption du fer pose trois problèmes :

- a - Existe-t-il à la surface de la muqueuse des récepteurs spécifiques ?
- b - Quels sont les facteurs moléculaires de l'entérocyte qui vont stocker ou chélater le fer ?
- c - Par quel mécanisme la sérotransferrine va-t-elle au niveau de la muqueuse capter le fer absorbé ?

Très tôt les auteurs se sont intéressés aux problèmes de l'absorption du fer au niveau jejunal, nous avons fait figurer dans la figure 19 (p 70) les schémas résumant les travaux de GRANICK (478)

Lumière intestinale

Cellule intestinale

Sang

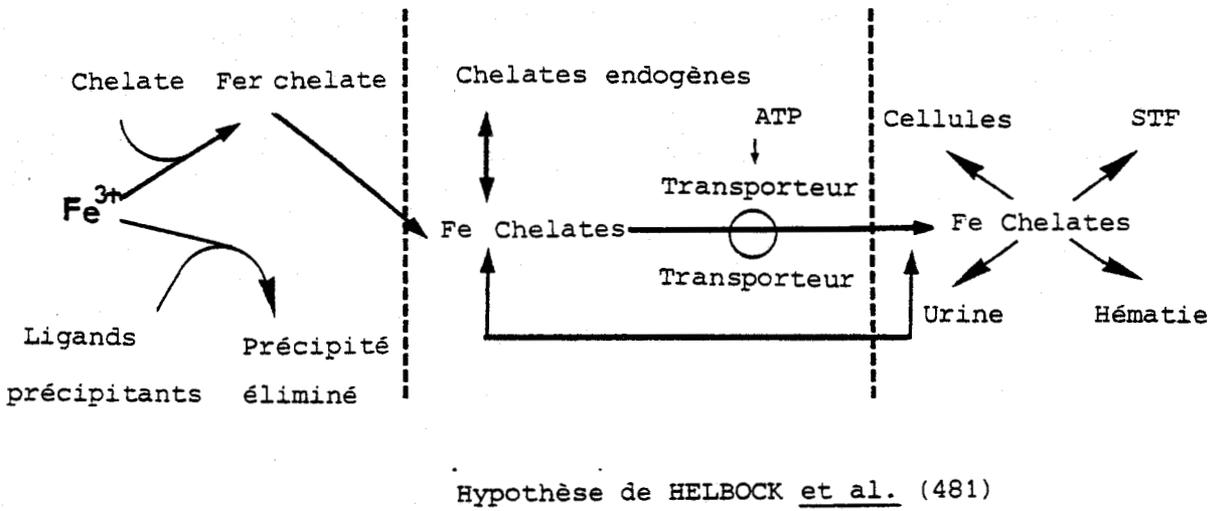
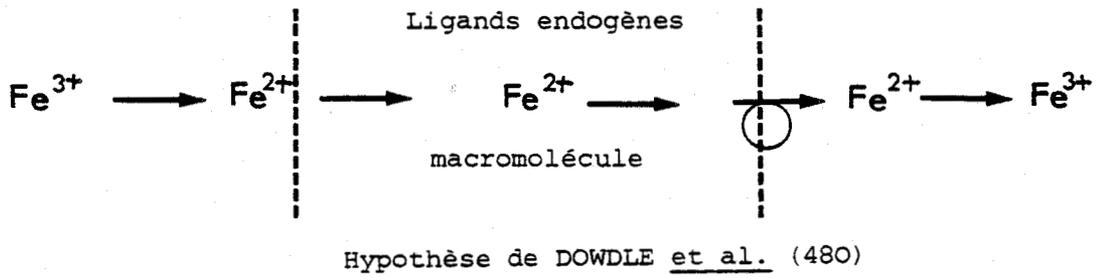
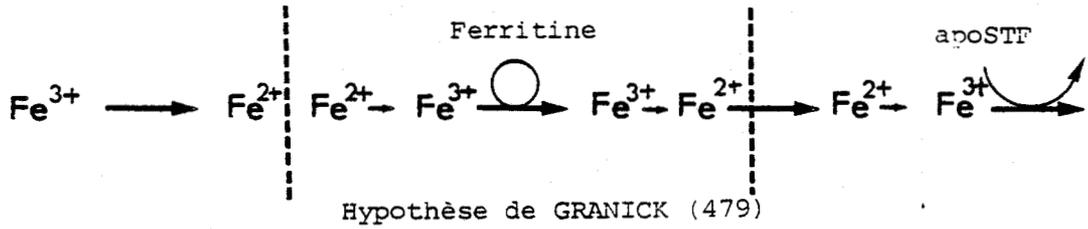


Figure 19

Evolution des hypothèses de l'absorption du fer
au niveau intestinal



DOWDLE et al. (480) et de HELBOCK et al. (481). A l'heure actuelle, les auteurs cherchent à préciser les différents constituants moléculaires intervenant dans l'absorption du métal.

a - Spécificité de l'absorption et présence d'un récepteur mucosal

Les travaux de HUEBERS, HUEBERS et RUMMEL (482) sur le rat (déficient en fer) montrent la présence d'un récepteur spécifique de l'absorption du fer au niveau de la bordure en brosse, ce récepteur n'existe pas au niveau de l'iléon. Ces mêmes auteurs mettent en évidence chez le rat un facteur soluble "facteur éluable" (figure 20 p 72) responsable de l'absorption du fer présenté sous la forme Fe^{3+} . Ce composé élué de la lumière intestinale peut être transféré à un intestin récepteur et rester fonctionnel. Cependant, il n'est pas détectable chez les sujets normaux (HUEBERS, HUEBERS et RUMMEL) (483).

b - Protéines chélatrices du fer dans la cellule intestinale

HUEBERS, HUEBERS et al. (484), HALIDAY, POWELL et al. (485), POLLACK et LASKY (486) et KAUFMAN et al. (487) ont isolé à partir de la muqueuse intestinale de rat ou de cobaye deux protéines fixant le fer. L'une de ces protéines : la protéine 1 est, selon les quatre auteurs, identifiable à une ferritine. La ferritine intestinale diffère néanmoins de la ferritine caractérisée dans le foie et dans la rate.

L'accord est par contre loin d'être fait sur la protéine 2, à l'exception du fait qu'elle fixe le Fe^{3+} . D'après HUEBERS et al. (488) il s'agirait d'une transferrine différente de la sérotransferrine sérique puisque in vitro elle ne peut fixer le métal qu'en présence d'un extrait cytosolique d'entérocyte. HALIDAY, POWELL et al. (489) n'identifient pas la protéine et considèrent qu'elle est contaminée par la transferrine sérique. Par contre, POLLACK et al. (490) démontrent chez le cobaye qu'elle (s'il s'agit bien de la même protéine) fixe deux atomes de fer ferriques mais qu'elle est bicaaténaire avec une masse moléculaire de 40 000 D et qu'elle n'est identifiable ni à la sérotransferrine ni à la lactotransferrine.

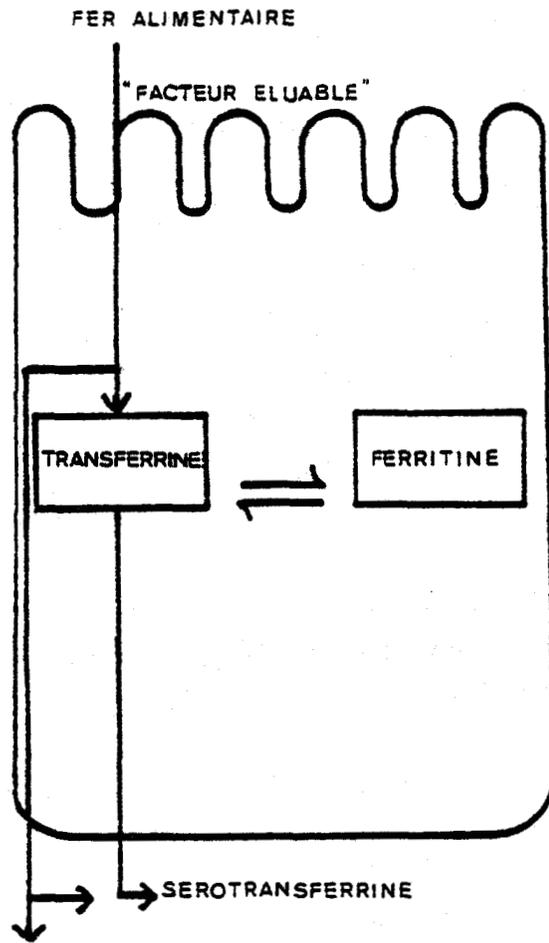


Figure 20

Protéines impliquées dans l'absorption du fer dans l'entérocyte
selon HUEBERS et al. (491)



6 - REGULATION DE L'ABSORPTION DU FER

Le taux de renouvellement journalier du fer par destruction de la lignée rouge est de 2 p 100 (Von HEVESY et Von LOCKNER) (492). La régulation du métabolisme du fer dépend donc essentiellement de son absorption (Mac CANSE et al.) (493), (BOTWELL et al.) (494).

Les facteurs régulant cette absorption peuvent être classés en trois suivant leur localisation : facteurs intraluminaux, humoraux et mucosaux.

a - Facteurs intraluminaux

1° Gastro ferrine. Actuellement les auteurs excluent la participation des constituants du liquide gastrique et en particulier de la "gastroferrine" (qui seraient de nature polysaccharidique), dans la régulation de l'absorption du fer (MURRAY et STEIN) (495).

2° Lactotrans ferrine. Le rôle de la lactotransferrine dans la régulation de l'absorption du fer n'est pas clairement établi et nous le discuterons dans le chapitre I de nos travaux personnels.

b - Facteurs humoraux

1° Erythropoïétine. La recherche d'une hormone régulant l'absorption du fer a été vaine (KRANTZ et al.) (496), (BEUTLER et al.) (497). L'érythropoïétine augmente, certes, l'absorption du fer, mais indirectement par le biais de son action sur la moelle osseuse (MENDELL) (498).

2° Hypoxémie. L'absorption du fer est augmentée dans des conditions d'asphyxie. Ceci est à rapprocher de l'action de la déficience en oxygène à haute altitude (WEINTRAUB et al.) (499).

3° Trans ferrine. Il est actuellement bien démontré que la baisse du taux de saturation de la sérotransferrine induit une augmentation de l'absorption intestinale du fer. Les travaux de KAUFMAN en 1966 (500) montrent que la perte du fer provoquée par

saignée est compensée par un apport de réserves qui diffèrent de celles de la moelle épinière et du foie. Ces réserves pourraient être localisées au niveau de la muqueuse intestinale.

c - Facteurs propres à la muqueuse intestinale

Les premiers CROSBY (501), puis CONRAD et CROSBY (502) ont proposé dès 1966 que la capacité d'absorption de la muqueuse est régulée par sa propre teneur en fer.

Chez les sujets déficients en fer, seul le transfert de la muqueuse vers la séreuse est augmenté. Les deux protéines : Protéine 1 de type ferritine et Protéine 2 de type transferrine, sont impliquées. Dans les premiers temps, une augmentation de la synthèse de la protéine mucosale de type transferrine provoque une augmentation de l'absorption du fer. Cette Protéine 2 est le support de la phase rapide de l'absorption du fer. Dans une deuxième étape la production de ferritine mucosale va prévenir le transfert du fer dans le sang, en le stockant (EL SCHOBAKI et RUMMEL) (503).

7 - PASSAGE DU FER A TRAVERS LA SEREUSE

Presque tout le fer incorporé pénètre dans le plasma et moins de 5 p 100 pénètre dans le système lymphatique (PETERSON et al.) (504). La vitesse d'incorporation dépend du taux de saturation de la sérotransferrine (HYDE) (505) et (COX et al.) (506). Cependant, la saturation artificielle in vivo de la sérotransferrine a peu d'action sur l'incorporation du fer (POLLACK et al.) (507).

VIII - FER, TRANSFERRINES ET INFECTION

Le rôle des transferrines dans la lutte contre l'infection a fait l'objet de nombreuses revues générales dont en particulier celles de WEINBERG (508) et de SUSSMAN (509).

De part la nature même de ses fonctions dans la chaîne de transport des électrons et comme cofacteur de nombreux enzymes, le fer est un oligo-élément indispensable aussi bien à la vie de l'organisme de l'hôte infecté qu'à celle des microorganismes parasites.

Dans les conditions physiologiques, tous les êtres vivants ayant créé des systèmes de transport du fer, comme les transferrines ou comme les sidérophores bactériens (entérochiline, ferrichrome, ferrioxamine B), la lutte de l'organisme contre l'invasion bactérienne pourrait se résumer à une compétition entre les chélates du fer de l'hôte et de ceux des parasites. En réalité, comme le montre le tableau XI (p 76) (WEINBERG) (510), il existe chez l'hôte infecté de nombreux mécanismes pour limiter la disponibilité du fer indispensable à la croissance des microorganismes parasites.

Nous ne traiterons dans ce chapitre que les cas où les transferrines sont directement impliquées.

A - ACTION AU NIVEAU DU METABOLISME DU FER

L'organisme va réagir en diminuant la quantité de fer de transport et en augmentant la quantité de fer de stockage.

1 - BAISSSE DE L'ABSORPTION DU FER

Une faible baisse de l'absorption du fer a été constatée chez l'homme lors de l'agression microbienne (BERESFORD et al.) (511), (CARTWRIGHT et al.) (512), (DUBACH et al.) (513).

Les transferrines n'ont pas été impliquées directement dans ce phénomène, mais on ne peut les exclure étant donné le rôle qu'elles jouent dans le mécanisme de l'absorption du fer.

2 - DIMINUTION DU FER PLASMATIQUE ET AUGMENTATION DU FER DE RESERVE

Ce phénomène, encore mal expliqué, se manifeste par une anémie ferriprive consécutive au stockage du fer dans le foie et à l'arrêt de la réutilisation du fer du système réticulo-endothélial.

Chez le sujet infecté, l'administration parentérale du fer provoque une accumulation de celui-ci dans le système réticulo-endothélial du foie et de la rate. Les travaux de Van SNICK et al. (514, 515, 516) ont montré que la lactotransferrine leucocytaire (voir p 64) libérée dans le plasma capte le fer de la sérotransferrine pour le transférer à la ferritine du macrophage qui possède à sa surface des récepteurs spécifiques de la ferrilactotransferrine. Ces résultats ont amené plusieurs auteurs : HANSEN et al. (517),

TABLEAU XI

MECANISMES MIS EN OEUVRE PAR L'HOTE POUR DIMINUER
LA DISPONIBILITE DU FER INDISPENSABLE A LA CROISSANCE
DES MICROORGANISMES PARASITES d'après WEINBERG (518)

- 1 Augmentation de l'excrétion du fer
- 2 Baisse de l'absorption intestinale du fer
- 3 Diminution du fer plasmatique et augmentation du fer
de réserve
- 4 Présence des protéines de transport du fer au niveau
de l'agression
- 5 Augmentation de la synthèse des protéines de transport
du fer
- 6 Inhibition de la synthèse des sidérophores bactériens

LEFFEL et al. (519) et BENNETT et al. (520) à étudier la variation du taux de lactotransferrine dans les leucocytes neutrophiles et le plasma en comparaison avec d'autres protéines comme la myélo-péroxydase ou encore en fonction de divers paramètres connus : le sexe et l'âge. Nous avons schématisé dans la figure 21 (p 78) le rôle des transferrines dans l'hyposidérémie des états inflammatoires.

3 - AUGMENTATION DE LA SYNTHÈSE DES TRANSFERRINES

Alors que chez la Souris (SWORD) (521), (EDWARDS et al.) (522), la concentration en sérotransferrine augmente considérablement durant l'infection, chez l'Homme, l'anabolisme devient plus faible que le catabolisme (JARNUM et al.) (523), ce qui provoque une baisse de 15 à 20 p 100 de la concentration en sérotransferrine.

L'augmentation de la concentration en lactotransferrine du plasma de sujet arthritique est due selon BENNETT et al. (524) à l'accélération du taux de renouvellement des leucocytes neutrophiles qui la libèrent dans le milieu. Cette observation est confirmée par HANSEN et al. (525) dans des cas de pneumonie. Cependant, au niveau de la glande mammaire de Vache, l'augmentation de 300 p 100 du taux de lactotransferrine constatée après une infection par Escherichia Coli (mastite) serait consécutive à une synthèse accélérée (HARMON et al.) (526).

B - LIBÉRATION DES TRANSFERRINES AU LIEU DE L'AGRESSION

1° MECANISME D'ACTION DES TRANSFERRINES

a - Compétition entre transferrines et sidérophores.

L'activité bactériostatique des transferrines a été mise en évidence "in vitro" par SCHADE et CAROLINE (527,528) et SCHADE (529) en utilisant l'ovotransferrine et la sérotransferrine. Elle a été posée en hypothèse dans le cas de la lactotransferrine, par MONTREUIL (530) puis BLANC et ISLIKER (531) puis vérifiée "in vitro" vis-à-vis de différents germes Staphylococcus aureus (BLANC) (532), Staphylococcus albus et Pseudomonas aeruginosa (MASSON et HEREMANS) (533), Bacillus staeru Hermophilus (ORAM et REITER) (534).

Cette activité bactériostatique est due selon FEENEY (535) et SCHADE et CAROLINE (536) à un mécanisme de ferriprivation. En

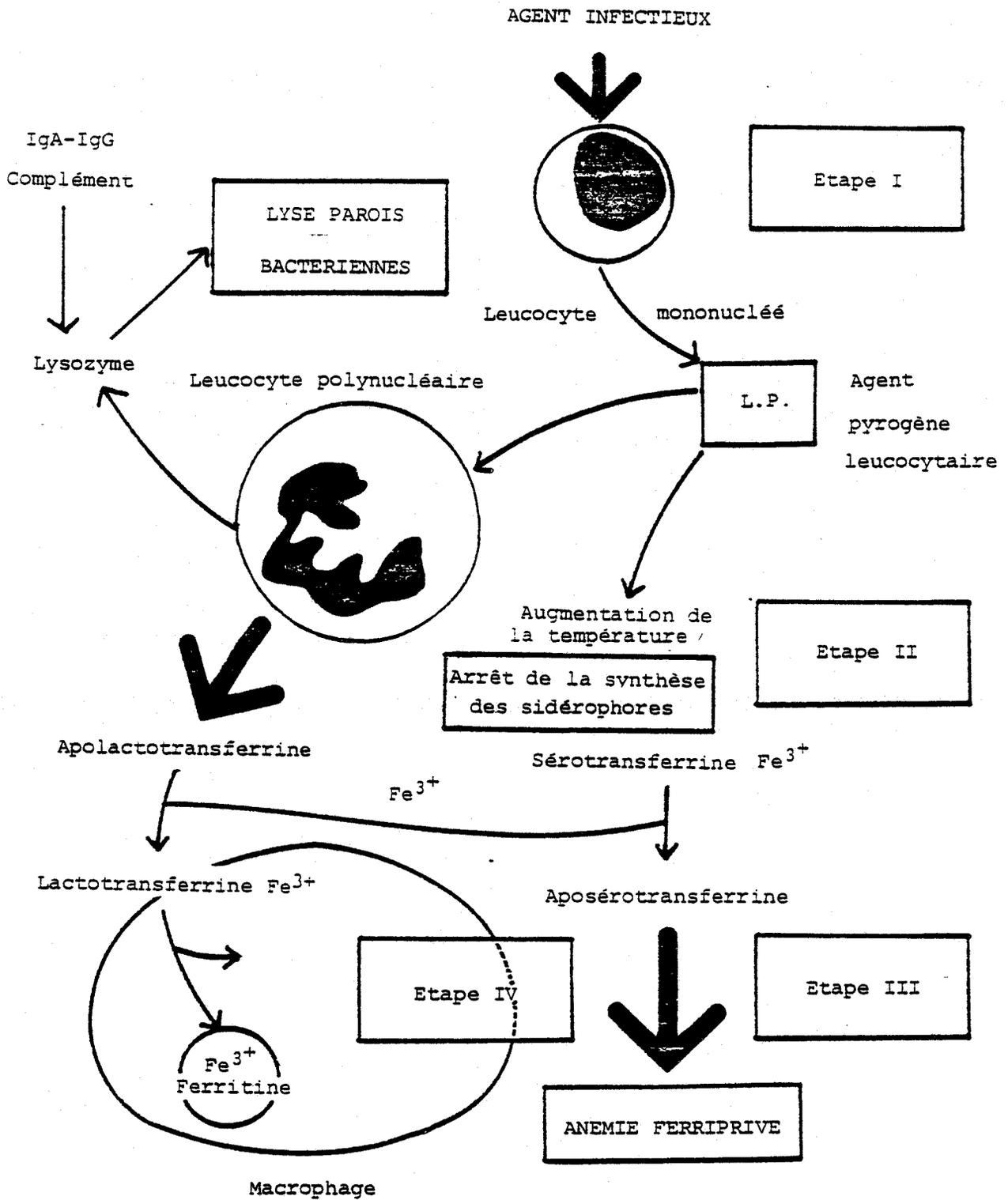


Figure 21

Schéma récapitulatif de l'intervention des transferrines
 lors d'une agression microbienne d'après SPIK (537)

- Etape I KLEMPNER et al. (538)
- Etape II GARIBALDI (539,540), KOCHAN (541)
- Etape III CARTWRIGHT (542)
- Etape IV Van SNICK et al. (543,544, 545)



réalité, les constantes d'affinité des sidérophores bactériens (entérochiline, ferrichrome, ferrioxamine B) pour le fer, sont du même ordre de grandeur que celles des transferrines. Les chélateurs bactériens sont donc capables de prélever le fer à ces dernières. Le mécanisme de ferriprivation se résume ainsi à une compétition entre chélateurs du fer, il est influencé par le taux de saturation des protéines chélatrices (POLLACK, AISEN et al.) (546), le rapport molaire entre transferrines et sidérophores, le pH du milieu qui doit être supérieur à pH 7,5 (BULLEN, CUSHNIE et al.) (547) et il nécessite la présence d'ions citrates ou bicarbonates (REITER, BROCK et al.) (548).

Toutefois, cette activité ferriprive serait selon MARTIN et al. (549) faible in vivo pour la sérotransferrine.

b - Synergie entre la lactotransferrine et les immunoglobulines. REITER, BROCK et al. (550) puis BULLEN, ROGERS et al. (551) ont démontré que l'activité d'anticorps spécifiques d'Escherichia coli (O III/B₄/B₂) est stimulée par l'addition de lactotransferrine

De récentes expériences réalisées par SPIK, CHERON et al. (552) montrent sans ambiguïté que des IgA de sécrétion (isolées du lait de femme) potentialisent l'activité bactériostatique de la lactotransferrine. Ces IgA sont inactives seules, contrairement aux IgG spécifiques utilisées par BULLEN et al. (553), de plus, l'addition de bicarbonate au mélange IgA-lactotransferrine est sans effet.

MONTREUIL (554) postule que la protection en particulier de l'intestion du nourrisson se réalise par l'intermédiaire de complexes formés par la lactotransferrine, les immunoglobulines, le lysozyme, le facteur α_1 -antitrypsique et des glycopeptides acides.

2° LIBERATION DES TRANSFERRINES AU LIEU DE L'AGRESSION

Les transferrines, et en particulier la lactotransferrine, sont souvent présentes dans les tissus les plus exposés à l'invasion microbienne. Ainsi, selon BOARD (555) l'ovotransferrine du blanc d'oeuf de Poule n'aurait qu'une activité bactériostatique.

La lactotransferrine, présente dans tous les épithélia sécréteurs, voit sa concentration s'élever considérablement chez le

sujet infecté soit par une activation de sa biosynthèse soit par une accélération du taux de renouvellement des leucocytes polynucléaires neutrophiles.

Ainsi, le taux de lactotransferrine dans le liquide pancréatique augmente considérablement dans la pancréatite chronique (COLOMB, ESTEVENON et al.) (556), (FIGARELLA et al.) (557), (COLOMB, PIANETTA et al.) (558), ce qui permet de la différencier du cancer du pancréas (FEDAIL, SALMON et al.) (559) où il reste faible.

Le taux de lactotransferrine est augmenté lors de l'inflammation comme par exemple dans le liquide synovial (BENNET, EDDIE-WUARTET et al.) (560), les exudats arthritiques (MALMQUIST et al.) (561) et les glandes salivaires (TABAK, MANDEL et al.) (562).

Le rôle de la lactotransferrine dans la protection de la muqueuse intestinale du nourrisson pose un important problème. En effet, il est difficile de concilier son activité bactériostatique consécutive à sa capacité à fixer le fer dans les milieux relativement acides et la grande capacité d'absorption du fer du lait humain par le nourrisson (BARNES et al.) (563). Cet équilibre entre la disponibilité du fer nécessaire pour son absorption et sa capture irréversible pour prévenir l'infection est réalisé chez le sujet normal. Chez le nourrisson fortement anémique l'administration du fer augmente la résistance à l'infection (MACKAY) (564), alors que chez l'enfant alimenté avec un lait artificiel surchargé en fer et ne contenant pas de lactotransferrine, les auteurs observent le développement d'entérocolite nécrosante (BOOK et al.) (565).

C - CONCLUSIONS

Le rôle de la lactotransferrine dans la lutte contre l'infection n'est pas encore totalement élucidé, en particulier dans ses relations avec la lignée blanche. Récemment BROXMEYER (566) et ZUCALI et al. (567) ont mis en évidence une activité inhibitrice de la lactotransferrine sur la sécrétion à partir de monocytes des substances qui stimulent la myélopoïèse.

RESULTATS PERSONNELS

CHAPITRE I

SPECIFICITE DE RECONNAISSANCE DE CELLULES CIBLES PAR LA LACTOTRANSFERRINE ET LA SEROTRANSFERRINE HUMAINES

Ce travail, dont l'idée revient à notre laboratoire, a été réalisé dans le Service du Professeur T. PETERS au "Royal Postgraduate Medical School" à l'Hôpital de HAMMERSMITH à Londres, en collaboration avec T. COX (M.D.)

I - INTRODUCTION

La lactotransferrine étant le principal chélateur du fer présent dans le lait humain, il était primordial de savoir si elle est capable de céder son métal à l'entérocyte humain. Ainsi l'hypothèse de MONTREUIL (568) selon laquelle la lactotransferrine serait la forme d'apport alimentaire du fer chez le nourrisson serait vérifiée.

Le rôle de la lactotransferrine dans l'absorption du fer a fait, jusqu'à présent, l'objet de différents travaux qui ont conduit à des conclusions contradictoires. Ainsi, DE LAEYS et al. (569) en utilisant un système hétérologue (lactotransferrine humaine et intestin isolé de rat ou de cobaye) montrent que l'apolactotransferrine diminue au niveau de la muqueuse l'absorption du fer, sans jamais la supprimer. Au contraire, au niveau de la membrane séreuse, le transport du fer n'est jamais affecté. Les travaux de BLANC et al. (570), chez l'Homme semblent confirmer ceux de DE LAEYS et al. (571). Ces auteurs observent en outre, après l'inhibition de l'absorption intestinale, une augmentation de l'incorporation du métal dans les réticulocytes. Plus récemment, DE VET et Van GOOL (572), DE VET et Van HOOPEN (573) ont établi une relation entre le métabolisme du fer et la concentration de la lactotransferrine dans le fluide duodéal

et dans les leucocytes polynucléaires : la lactotransferrine inhibe l'absorption du fer, non pas par ferriprivation puisque la protéine utilisée est saturée à 85 p 100, mais selon DE VET et al. (574), en masquant des récepteurs membranaires présents à la surface de l'entérocyte. Par ailleurs, Van GUGH et al. (575) montrent que l'anémie induite chez le Lapin par des saignées répétées, provoque une augmentation de la concentration en lactotransferrine dans la bile. Cette concentration redevient normale après une surcharge en fer.

D'autre part, les expérimentations réalisées jusqu'ici sur la spécificité de reconnaissance des cellules cibles par différentes transferrines sont contradictoires. En effet, PRINCIOFFO et ZAPOLSKI (576) ont démontré que les réticulocytes n'incorporent le fer que de la sérotransferrine, alors que WILLIAMS et al. (577) et LINE et al. (578), montrent respectivement que l'ovotransferrine et la lactotransferrine sont capables de céder le fer aux réticulocytes. C'est pourquoi nous avons étudié "in vitro"

1 - l'incorporation du ^{59}Fe complexé à la lactotransferrine humaine par l'entérocyte humain ;

2 - la spécificité de reconnaissance des cellules cibles, entérocytes et réticulocytes, par différentes transferrines : lactotransferrines humaine et bovine, sérotransferrine humaine et ovotransferrine du blanc d'oeuf de Poule.

II - MATERIELS ET METHODES

Les lactotransferrines du lait de Femme et du lait de Vache ont été préparées selon le protocole décrit dans l'appendice technique (p 1). La sérotransferrine humaine a été purifiée selon la méthode de ROOP et PUTNAM (579) et l'ovotransferrine a été fournie par la firme Sigma (grade I)

Toutes les techniques de saturation et de désaturation des différentes transferrines ainsi que le marquage radioactif par le ^{59}Fe ou ^{125}I et la préparation des tampons d'incubation sont détaillés dans l'appendice technique (p 11).

A - PREPARATION DES CELLULES CIBLES

1 - RETICULOCYTES. Les réticulocytes proviennent d'un sang hépariné, prélevé chez un sujet anémié à la suite d'une coagulation intravasculaire disséminée. Après centrifugation à 1 000 g pendant 5 mn, le culot cellulaire est lavé deux fois par le milieu de Hanks puis est réparti en aliquotes de 0,5 ml.

2 - ENTEROCYTES. Les expérimentations ont reçu l'approbation du comité éthique local.

Le tissu a été prélevé chez des sujets susceptibles de présenter une maladie du tractus digestif, par biopsie au niveau du duodénum selon la technique de CROSBY et al. (580). Seuls les tissus des patients présentant un métabolisme du fer normal et dont l'analyse histologique n'a révélé aucune anomalie ont été étudiés. Aussitôt après le prélèvement, effectué sous contrôle radiographique, le tissu est plongé dans la solution isotonique saturée en O₂ dont la composition est décrite p 3 et est maintenu à la température de la glace fondante.

La pièce de tissu, pesant en général une trentaine de mg, est débarrassée du mucus par grattage puis fragmentée en deux parties, l'une est destinée aux analyses cytologiques, l'autre est découpée en morceaux pesant de 2 à 5 mg.

B - INCUBATION

1 - RETICULOCYTES. Les transferrines marquées au ⁵⁹Fe sont dessalées sur colonne de Séphadex G₂₅ (1 x 5 cm) stabilisée dans le milieu de HANKS. 0,5 ml du milieu d'incubation sont alors additionnés aux 0,5 ml de cellules, après agitation douce et stabilisation à 37°C, la protéine (maintenue à 37°C) est additionnée pour obtenir une concentration de 0,001 mM. L'incubation est arrêtée aux temps 5, 10, 30 et 60 mn par addition de 8 ml de tampon phosphate de sodium 310 m Osm pH 7,4 à la température de la glace fondante. Après centrifugation, le culot cellulaire est lavé deux fois, puis des aliquotes de 0,2 ml sont prélevées, réparties dans les tubes de comptage puis hémolysées par 0,2 ml d'eau.

2 - ENTEROCYTES. Les transferrines saturées en fer et marquées soit au ^{59}Fe , soit à ^{125}I soit aux deux radioisotopes, sont déssalées sur une colonne de Séphadex G-25 (1 x 5 cm) stabilisée cette fois dans le tampon isotonique (p 3) pour échanger les sels. Des fractions de 200 μl sont recueillies et analysées au compteur de radioactivité Gamma afin de ne recueillir que les fractions qui contiennent la protéine non contaminée par le métal libre. La transferrine est ensuite diluée par le tampon isotonique, pour obtenir une solution 0,010 mM en protéine et 0,020 mM en métal. La ^{57}Co -Cyanocobalamine est alors additionnée selon la technique de COX et al. (581) pour obtenir une concentration finale de 5 nM. La solution est amenée à 37°C et est oxygénée en continu par de l'oxygène pur à 100 %. Après stabilisation de la température, les pièces de tissus sont mises en suspension, deux fragments sont prélevés aux temps 5, 10, 15 et 20 mn. Ils sont lavés, soigneusement éponnés, puis relavés deux fois par le tampon isotonique à 4°C, enfin, ils sont séchés, pesés et répartis dans les tubes de comptage contenant 0,5 ml de tampon isotonique. De même des aliquotes de la solution de protéine avant et après addition de la ^{57}Co -Cyanocobalamine et après l'incubation sont prélevées.

C - RESULTATS OBTENUS

1 - RETICULOCYTES. Dans ce cas où un seul radioisotope est présent, nous exprimons la quantité de fer absorbé en p.mol par nombre de réticulocytes.

2 - ENTEROCYTES. La radioactivité est mesurée sur trois canaux séparés, permettant le comptage simultané de ^{59}Fe et ^{57}Co , ou de ^{125}I et ^{57}Co . L'émission gamma de chaque élément est corrigée par un coefficient, déterminé avant chaque mesure, permettant de définir le taux de contamination de la radioactivité du ^{57}Co par celle de ^{59}Fe et de celle de ^{125}I par ^{57}Co . Enfin, connaissant la radioactivité spécifique de chaque isotope dans la solution, le volume puis la quantité de ^{59}Fe , ^{125}I et ^{57}Co sont exprimés par mg de tissu frais.

La cyanocobalamine n'étant pas absorbée au niveau du jéjunum (SCHUTZ et al.) (582), (COX et al.) (583), elle se répartit

en moins de 5 mn dans le liquide extracellulaire. La quantité de ^{57}Co prélevée par le tissu est donc constante, aux erreurs expérimentales près, tout au long de la cinétique, seule une quantité de ^{59}Fe supérieure à la quantité de ^{57}Co , reflète une absorption.

La quantité de fer absorbée est exprimée en pmol/mn/mg de tissu frais suivant la formule :

$$Q = \frac{\mu\text{l}^{59}\text{Fe} - \mu\text{l}^{57}\text{Co} \cdot c}{p \cdot t} \cdot A$$

où p = poids du tissu en mg

t = temps d'incubation en mn

c = correction due à la contamination du ^{57}Co par ^{59}Fe

A = radioactivité spécifique de la solution de ^{59}Fe

III - RESULTATS

A - SPECIFICITE DE RECONNAISSANCE PAR LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE D'UN RECEPTEUR MEMBRANAIRE AU NIVEAU DU RETICULOCYTE HUMAIN

1 - CINETIQUE D'INCORPORATION DU ^{59}Fe COMPLEXE A LA SEROTRANSFERRINE ET A LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE PAR LES RETICULOCYTES HUMAINS

La figure 22 (p 86) montre, de manière comparative, la cinétique d'incorporation du ^{59}Fe de la sérotransferrine humaine, à la concentration physiologique de 0,002 mM et de la lactotransferrine par des cellules sanguines humaines contenant 6 p 100 de réticulocytes. Le taux de fer incorporé à partir de la lactotransferrine, représente moins de 1 p 100 du métal présenté et reste constant alors que le taux d'incorporation du fer dû à la sérotransferrine augmente linéairement au cours du temps. Le faible pourcentage de réticulocytes (6 p 100) explique que tout le fer de la sérotransferrine ne soit pas prélevé en 60 mn d'incubation.

2 - DISCUSSION

Cette expérience montre sans ambiguïté que la lactotrans-

pmol Fer

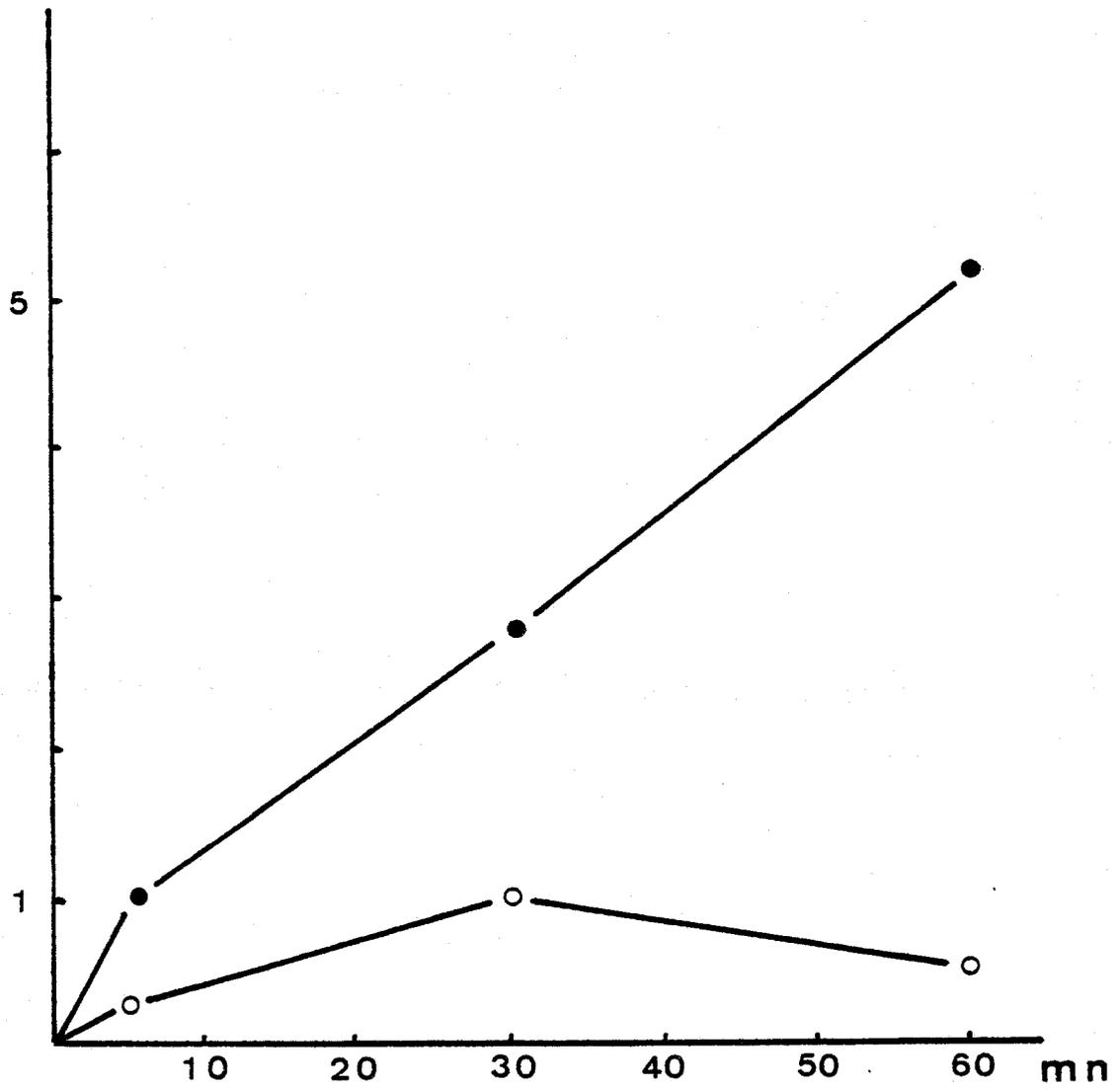


Figure 22

Cinétique d'incorporation du ^{59}Fe , complexé à la sérotransferrine et à la lactotransferrine humaine par les réticulocytes humains



Lactotransferrine O-O

Sérotransferrine ●-●

ferrine humaine n'est pas reconnue par le réticulocyte humain. Les résultats obtenus par LINE et al. (584), qui observent une incorporation du ^{59}Fe complexé à la lactotransferrine humaine par le réticulocyte de Lapin, peuvent s'expliquer par une cause d'erreur au cours de la méthode de marquage au ^{59}Fe de la lactotransferrine. En effet, ces auteurs laissent incuber la protéine saturée avec du fer "froid" (^{57}Fe) en présence de $^{59}\text{FeCl}_3$. La constante d'affinité de la lactotransferrine pour le fer étant de $k = 10^{27}$, il est vraisemblable que la faible radioactivité obtenue sur la protéine soit due à une fixation non spécifique du fer sur la protéine.

B - SPECIFICITE DE RECONNAISSANCE PAR LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE
D'UN RECEPTEUR MEMBRANAIRE AU NIVEAU DES ENTEROCYTES HUMAINS

1 - MISE EN EVIDENCE DE L'INCORPORATION DU FER DE LA LACTO-
TRANSFERRINE PAR L'ENTEROCYTE HUMAIN

Nous avons utilisé la technique mise au point par COX et PETERS (585) pour démontrer "in vitro" l'incorporation par l'entérocyte du ^{59}Fe complexé à différents chélates organiques comme l'acide nitrilotriacétique ou le citrate.

La concentration en protéine a été choisie pour complexer la totalité du métal présent dans le liquide duodénal. Ceci correspond à une concentration de 0,01 mM en transferrine complètement saturée en métal, ce qui représente un énorme excès par rapport à la concentration physiologique en lactotransferrine du tractus gastro intestinal qui n'est détectée que par radioimmunologie.

La figure 25 (p 92) montre le résultat de l'incorporation du ^{59}Fe complexé à la lactotransferrine et de la ^{57}Co -Cyanocobalamine. Cette dernière, n'étant pas absorbée par l'entérocyte prélevé au niveau du duodénum, sert de marqueur interne. L'incorporation est linéaire sur un temps de 20 mn au bout duquel le tissu perd son intégrité fonctionnelle.

La courbe représentée dans la figure 23 (p 88) obtenue par l'analyse statistique de l'incorporation du ^{59}Fe par 42 pièces de tissus provenant de 9 biopsies permet de calculer la vitesse moyenne d'absorption. Cette vitesse est de 0,6 p mol Fe/mg/mn, c'est-à-dire de l'ordre de celle observée pour le complexe citrate-

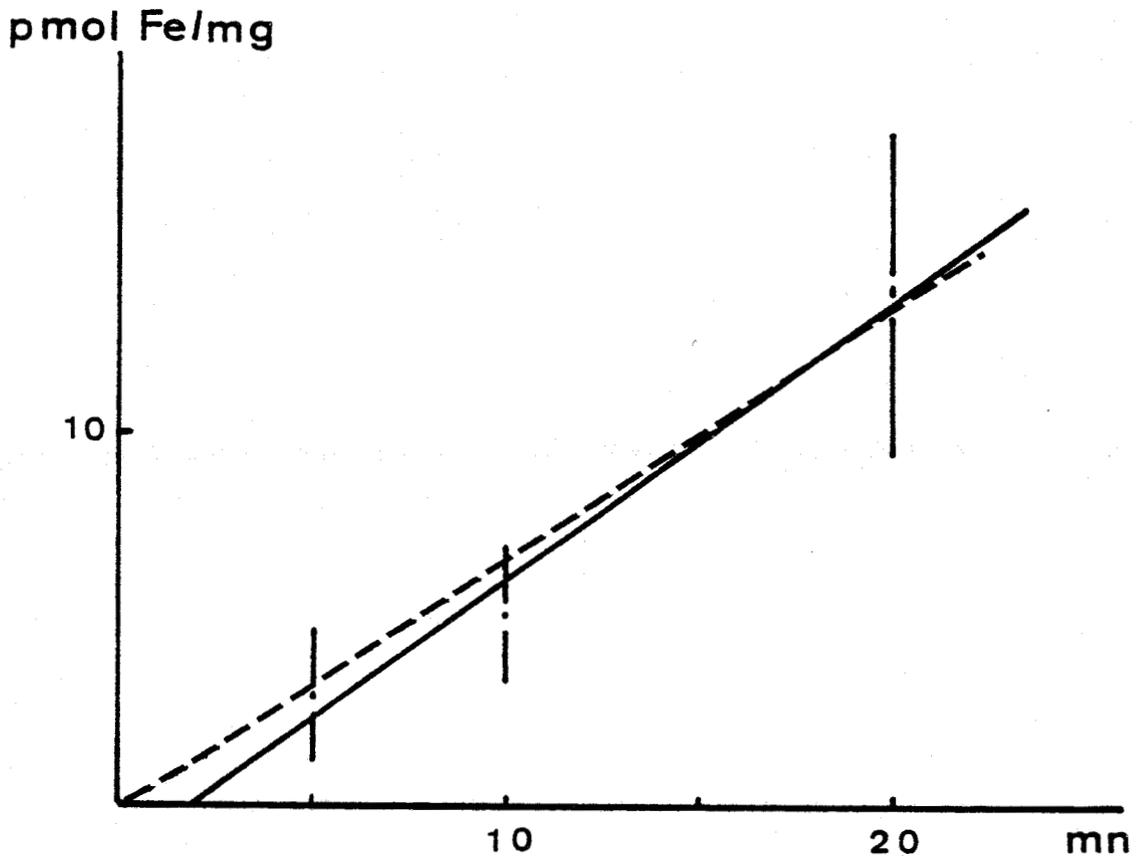


Figure 23



Analyse statistique de l'incorporation par l'entérocyte
du ^{59}Fe complexé à la lactotransferrine

Fe-III (0,9 p mol/mg/mn). Cette augmentation de la radioactivité en ^{59}Fe de l'entérocyte peut être le reflet d'une absorption de la lactotransferrine sur la muqueuse intestinale. En effet, il est bien connu que la lactotransferrine forme des complexes avec des composés acides (HEKMAN) (586), (DESCAMPS) (587), or la muqueuse intestinale est tapissée de mucus acide sécrété par les glandes à mucus, c'est pourquoi nous avons analysé le comportement de la lactotransferrine marquée à ^{125}I .

2 - CINÉTIQUE D'INCORPORATION PAR L'ENTEROCYTE DE LA LACTO-TRANSFERRINE MARQUÉE A ^{125}I .

La figure 24 (p 90) donne la répartition de ^{125}I lactotransferrine saturée en fer et de la cyanocobalamine. La concentration en ^{125}I (0,243 $\mu\text{l}/\text{mg} \pm 0,225$) reste constante, aux erreurs expérimentales près, au cours du temps, et elle est voisine de celle de la cyanocobalamine (0,218 $\mu\text{l} \pm 0,114 \mu\text{l}/\text{mg}$), ce qui montre la présence continuelle de lactotransferrine à la surface de l'entérocyte. Cependant, l'impossibilité d'étudier simultanément, pour des raisons techniques, la répartition de ^{125}I , ^{59}Fe et ^{57}Co , nous ayant obligé à étudier séparément la cinétique d'incorporation d'une protéine marquée à ^{125}I et d'une protéine marquée au ^{59}Fe , nous ne pouvons affirmer que l'iodination n'a pas, en modifiant la conformation de la protéine, diminué sa capacité à transférer le fer. Nous avons donc, pour éliminer cette possibilité, étudié sur une même biopsie, d'une part, le comportement en présence de cyanocobalamine, d'une lactotransferrine marquée au ^{59}Fe et, d'autre part, celui de la même protéine marquée simultanément au ^{59}Fe et à ^{125}I . La distribution des radioisotopes au bout de 20 mn d'incorporation a été la suivante :

- Première série : $^{125}\text{I} = 0,260 \mu\text{l}/\text{mg} \pm 0,014$
 $^{59}\text{Fe} = 1,099 \mu\text{l}/\text{mg} \pm 0,224$
- Deuxième série : $^{57}\text{Co} = 0,140 \pm 0,014$
 $^{59}\text{Fe} = 1,386 \pm 0,3$

Ces résultats démontrent que l'iodination n'a perturbé ni la reconnaissance de l'entérocyte par la lactotransferrine, ni le transfert du fer.

Nous pouvons donc conclure que l'augmentation de la concentration du ^{59}Fe dans l'entérocyte n'est pas la conséquence d'une

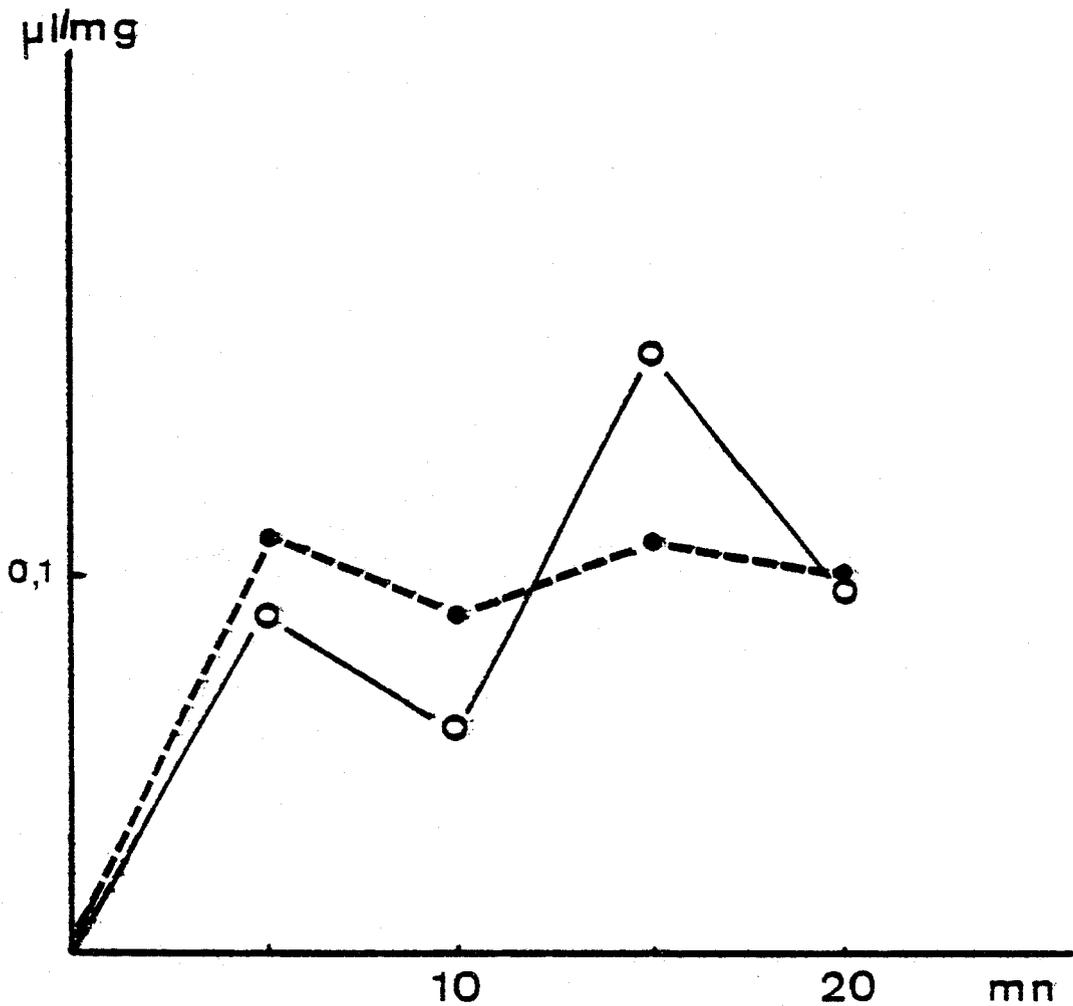


Figure 24

Cinétique d'incorporation par l'entérocyte humain
de la lactotransferrine marquée à ^{125}I

^{125}I lactotransferrine ○—○

^{51}Co -cyanocobalamine ●—●



absorption de la protéine sur la muqueuse intestinale.

3 - ACTION DE LA CYTOCHOLASINE D.

La cytocholasine D est un inhibiteur de la contraction des microtubules et provoque la suppression de l'activité de pinocytose ou d'endocytose (WAGNER et al) (588), (DUNCAN et al.) (589). Nous avons étudié son action sur l'incorporation du fer complexé à la lactotransferrine par l'entérocyte.

L'expérimentation, réalisée avec une concentration de 10^{-5} M en cytocholasine D, a donné une incorporation de $9,4 \pm 1,8$ p mol/mg alors que le témoin a donné une augmentation de $6,8 \pm 2,8$ p mol/mg.

Le phénomène de pinocytose semble donc être exclu.

4 - SPECIFICITE DE TRANSFERT DU FER

Afin de démontrer que l'incorporation du fer est bien consécutive à une interaction spécifique entre l'entérocyte et la lactotransferrine, nous avons étudié le comportement du fer complexé à d'autres transferrines : la sérotransferrine humaine, l'ovotransferrine de poule et la lactotransferrine bovine.

Nous illustrons dans la figure 25 (p 92) les cinétiques d'incorporation du fer obtenues à partir de la même biopsie avec la séro et la lactotransferrine humaines. La concentration du ^{59}Fe de la sérotransferrine est nettement plus faible que celle du ^{57}Co , la protéine se répartit donc uniquement dans le fluide extracellulaire.

Nous avons résumé dans le tableau XII (p 93) les résultats obtenus après l'étude de 3 biopsies sur les quatre protéines présentées à la concentration de 0,01 mM avec un taux de saturation voisin de 95 p 100.

Nous n'avons jamais observé d'incorporation à partir de la sérotransferrine ou de l'ovotransferrine.

Par contre, le fer complexé à la lactotransferrine bovine est absorbé mais à une vitesse cinq fois inférieure à celle du complexe fer-lactotransferrine humaine

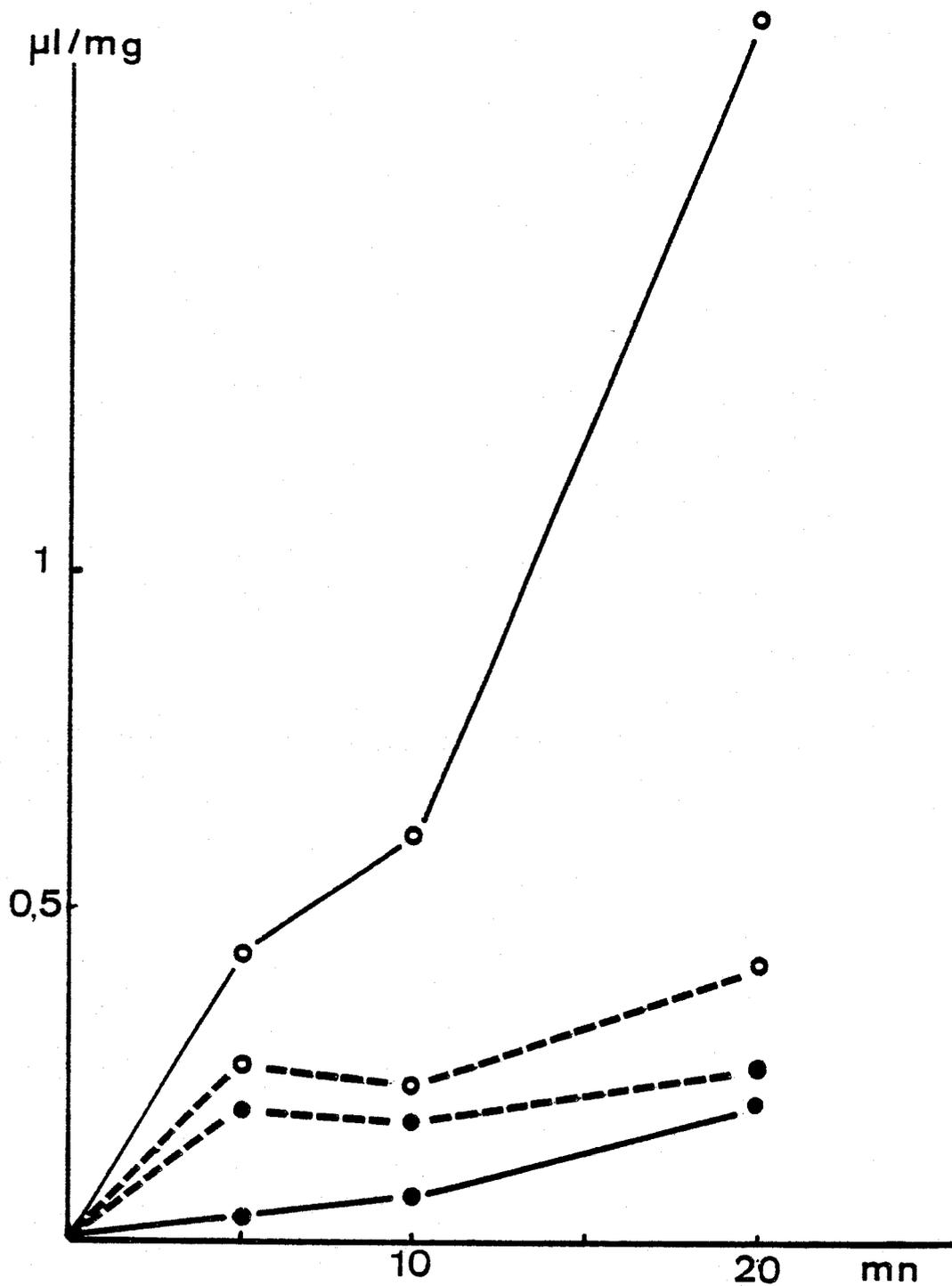


Figure 25



Cinétique d'incorporation par l'entérocyte humain du ^{59}Fe complexé à la lactotransferrine et à la sérotransferrine humaines

^{59}Fe lactotransferrine O—O

^{59}Fe sérotransferrine ●—●

^{57}Co cyanocobalamine - - -

TABLEAU XII

ABSORPTION DU FER COMPLEXE A LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE,
LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE, LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE ET A L'OVOTRANSFERRINE
DU BLANC D'OEUF DE POULE PAR LES ENTEROCYTES HUMAINS

Transferrines	^{59}Fe incorporé en pmol/mg de tissus
Lactotransferrine humaine	40,3
	16,8
Lactotransferrine bovine	16,8
	4,7
Sérotransferrine humaine	< 0,1
	< 0,1
Ovotransferrine du blanc d'oeuf de Poule	< 0,1
	< 0,1



5 - DISCUSSION

Nous avons démontré, sans ambiguïté, que l'ion ferrique Fe^{3+} complexé à la lactotransferrine était absorbé, "in vitro", par l'entérocyte puisque nous mettons en évidence le métal dans la cellule intestinale alors que la protéine reste dans le milieu d'incubation. Il est certain que nous n'avons pas mis en évidence un simple phénomène d'absorption du métal dissocié de la protéine car, alors, celui-ci se réaliserait de façon encore plus manifeste, lorsque la forme d'apport du métal est la sérotransferrine humaine ou l'ovotransferrine de Poule dont les constantes d'affinité pour le fer sont plus faibles. La lactotransferrine paraît donc jouer un rôle important dans la pénétration du fer dans la cellule intestinale. En effet, si nous n'avons pu vérifier, dans notre système expérimental, que le métal se retrouve ensuite complexé à la ferritine de l'entérocyte et surtout transporté par la sérotransferrine circulante, nous avons cependant montré que l'entérocyte fixait spécifiquement la lactotransferrine et qu'il était capable de dissocier le complexe métallique dont la constante d'affinité est de l'ordre de $k = 10^{27}$.

Le rôle de la lactotransferrine dans l'absorption intestinale du fer est confirmé, en outre, par le fait que la lactotransferrine sécrétée par le pancréas et par la vésicule biliaire (De VET et al.) (590), (Van GUGH et al.) (591), tapisse la muqueuse intestinale (MASSON) (592) au niveau des cellules responsables de l'absorption (MASON et al.) (593) et que sa concentration est augmentée chez les sujets anémiques (ISOBE et al.) (594).

IV - CONCLUSIONS

Nous avons démontré, pour la première fois, in vitro, que la lactotransferrine était capable de reconnaître spécifiquement l'entérocyte et que celui-ci possédait la propriété de dissocier le complexe fer-lactotransferrine et d'accumuler le métal.

Ces résultats corroborent l'hypothèse de MONTREUIL selon laquelle la lactotransferrine, principal chélateur du fer dans le

lait humain serait le facteur alimentaire responsable de l'absorption de ce métal chez le nourrisson.

Le groupe de glycoprotéines que constituent les transferrines fixent à saturation deux atomes du fer et assurent le transport du métal entre les formes de réserve et les formes actives. Elles possèdent, en outre, une activité bactériostatique qui s'exerce par ferriprivation. Le rôle de transporteur du fer des transferrines implique qu'elles sont capables de prélever le métal à des formes de réserve et de le céder à des cellules cibles qu'elles reconnaissent spécifiquement : le réticulocyte pour la sérotransferrine (JANDL et al.) (595), les cellules embryonnaires pour l'ovotransferrine (WILLIAMS et al.) (596), les entérocytes pour la lactotransferrine.

Nous nous proposons, dans la suite de cet exposé de donner des bases moléculaires aux deux fonctions des transferrines : ferriprivation et transport du fer et à la spécificité de reconnaissance des cellules cibles. Ces bases ont dans une certaine mesure été définies au cours de l'étude comparée à laquelle nous nous sommes livrés pendant plusieurs années et qui a porté :

- 1 - sur la conformation de la sérotransferrine et de la lactotransferrine humaines en fonction de leur degré de saturation en métal
- 2 - sur les sites de fixation des métaux de ces deux transferrines
- 3 - sur la séquence covalente de la lactotransferrine humaine.

CHAPITRE II

ETUDE COMPAREE DE LA CONFORMATION DE LA LACTOTRANSFERRINE ET DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINES ET DES MODIFICATIONS INDUITES PAR L'ELIMINATION DU FER

Ce travail a été réalisé en ce qui concerne le dichroïsme avec la collaboration de Madame LOUCHEUX, Maître de Recherche au C.N.R.S. à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille et à l'Unité V de l'I.N.S.E.R.M., Directeur : Professeur G. BISERTE.

NOus leur adressons nos vifs remerciements.

I - INTRODUCTION

Les travaux de JANDL et KATZ (597) puis de FLETCHER et HUEHNS (598) ont montré que l'incorporation du fer par le réticulo-cyte était 10 fois plus rapide lorsque la sérotransferrine était présentée sous forme diférique. Cette influence de la saturation en métal sur le mécanisme de reconnaissance de la cellule suggère un remaniement conformationnel de la protéine lors de l'élimination du métal.

Cette modification de la conformation de la protéine a été depuis longtemps posée en hypothèse à la suite des travaux de WINDLE et al. (599), AZARI et FEENEY (600) et SPIK (601) qui ont démontré une plus grande résistance des ferritransferrines à l'action de la chaleur et des enzymes protéolytiques et de ceux de AISEN et al. (602) puis de MAKEY et al. (603) qui ont constaté une variation du point iso-électrique de la sérotransferrine en fonction du nombre d'ions Fe^{3+} fixés : 0,1, ou 2.

En outre, la grande stabilité du complexe fer-lactotransferrine qui n'est dissocié qu'en dessous de pH 4 (MONTREUIL, TONNELAT et MULLET) (604) et sa spécificité de reconnaissance pour l'entérocyte peuvent s'expliquer par une conformation différente de celle de la sérotransferrine.

Nous avons donc essayé de définir les paramètres de la variation de conformation de la sérotransferrine humaine en fonction de leur taux de saturation en métal en étudiant :

- 1 - leur structure secondaire en dichroïsme circulaire,
- 2 - la localisation des chromophores tyrosine et tryptophane,
- 3 - la dénaturation des deux glycoprotéines par le chlorhydrate de guanidine .

II - ETUDE COMPAREE DES SPECTRES DICHROIQUES DES DEUX TRANSFERRINES

A - MATERIEL ET METHODES

Les concentrations en protéines ont été mesurées par la méthode de LOWRY et al. (605) et d'après leur absorbance à 280 nm en utilisant les valeurs de $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ de 11,0, 11,2, 14,3 et 14,0 respectivement pour les apolactotransferrine et aposérotransferrine et leurs dérivés saturés en fer. Le degré de saturation en métal a été déterminé par dosage du fer selon la méthode à la bathophénanthroline modifiée par SPIK (606).

Les spectres ont été obtenus à partir de protéines dissoutes à une concentration de 0,1 p 100 dans NaF 0,214 M, de telle manière que l'absorbance soit toujours inférieure, en ultraviolet, à 1,5.

Nous avons utilisé un Dichographe JOBIN et YVON R.J. Mark III et des cuves dont le trajet optique est de 0,1 mm lors des mesures dans l'ultraviolet et de 5 mm lors des mesures dans le visible. Pour tous les calculs d'ellipticité, nous avons utilisé une valeur moyenne de masse moléculaire pour un résidu d'acide aminé de 112

et une masse moléculaire pour les transferrines de 76 000. Nous avons négligé la participation de la N-acétylglucosamine et de l'acide N-acétyl-neuraminique qui ne représentent que 2 et 1 p 100 de la masse totale des protéines. L'ellipticité a été exprimée en $\text{degré}/\text{cm}^{-2}/\text{dmol}^{-1}$.

B - RESULTATS

1 - SPECTRES ENTRE 180 ET 250 NM. Les courbes obtenues pour l'apolactotransferrine et la lactotransferrine saturée en fer sont identiques. Elles montrent (figure 26 p 99) deux maxima à 208 et 220 nm qui possèdent la même ellipticité.

L'ellipticité des spectres de la sérotransferrine est plus faible. Il n'existe pas de maximum à 220 nm.

L'application de l'équation de CHEN et al. (607) a permis de calculer les pourcentages de feuillet plissé β et d'hélice β . Les valeurs sont données dans le tableau XIII (p 100) en comparaison avec celles obtenues par les autres auteurs.

2 - SPECTRES ENTRE 250 ET 600 NM. Les apoprotéines donnent entre 245 et 350 nm un spectre caractérisé par une large bande négative centrée à 276 nm sur laquelle viennent se surimposer des bandes vers 250 et 291 nm (Figure 27 p 101). La bande négative à 252 nm est déplacée à 256 nm pour la sérotransferrine. Les bandes à 283 et 291 nm qui sont attribuables à la tyrosine et au tryptophane ont une ellipticité 3 fois supérieure dans le cas de la lactotransferrine. La bande à 276 nm qui est probablement due aux ponts disulfures et aux résidus de phénylalanine est 2,5 fois plus importante dans le cas de la lactotransferrine.

La fixation spécifique du métal induit dans les deux protéines trois nouvelles bandes à 305, 325 et 456 nm.

La bande à 305 nm, bien définie, est attribuable à une perturbation de l'environnement électronique du tryptophane. La bande à 325 nm est peut-être la fin de celle centrée à 456 nm ou, comme l'a suggéré TAN (608) à propos de l'ovotransferrine, la conséquence du changement de l'angle diédral d'un pont disulfure.

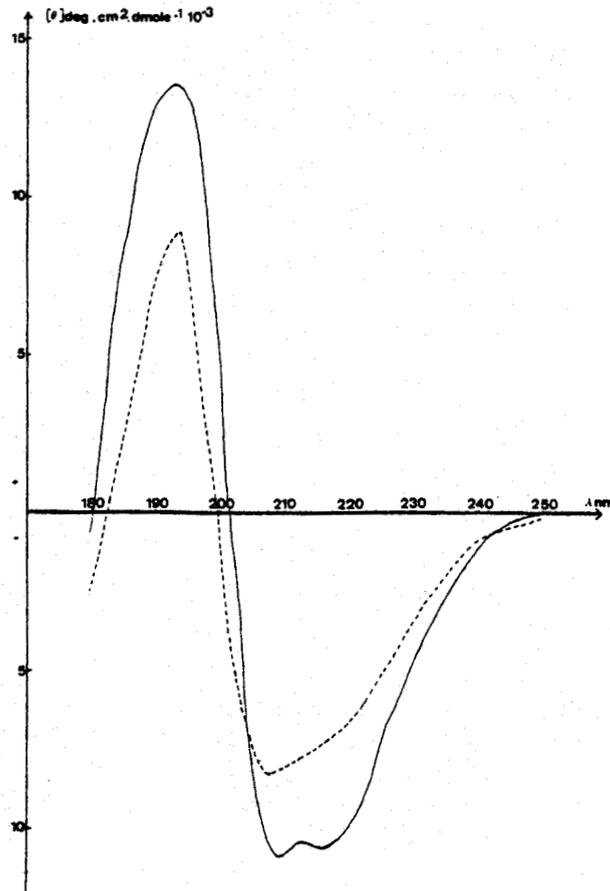


Figure 26

Spectres dichroïques de la lactotransferrine (—)
et de la sérotransferrine (---) entre 180 et 250 nm

TABLEAU XIII

STRUCTURE SECONDAIRE DES TRANSFERRINES

Taux d'hélicité α en p 100	Taux de structure β en p 100
Apo LTF (a) 28	64
LTF (a) 26	57
Apo STF (a) 17	68
(b) 21	-
(c) 20	40 - 45
(d) 17-18	-
STF (b,c,d) 17-18	-
Apo OTF (e) 28	32
(b) 16	-
OTF (b,e) 19	-

- a résultats personnels
- b TOMIMATSU et al. (609)
- c VENTURA et al. (610)
- d NAGY et al. (611)
- e TAN (612)

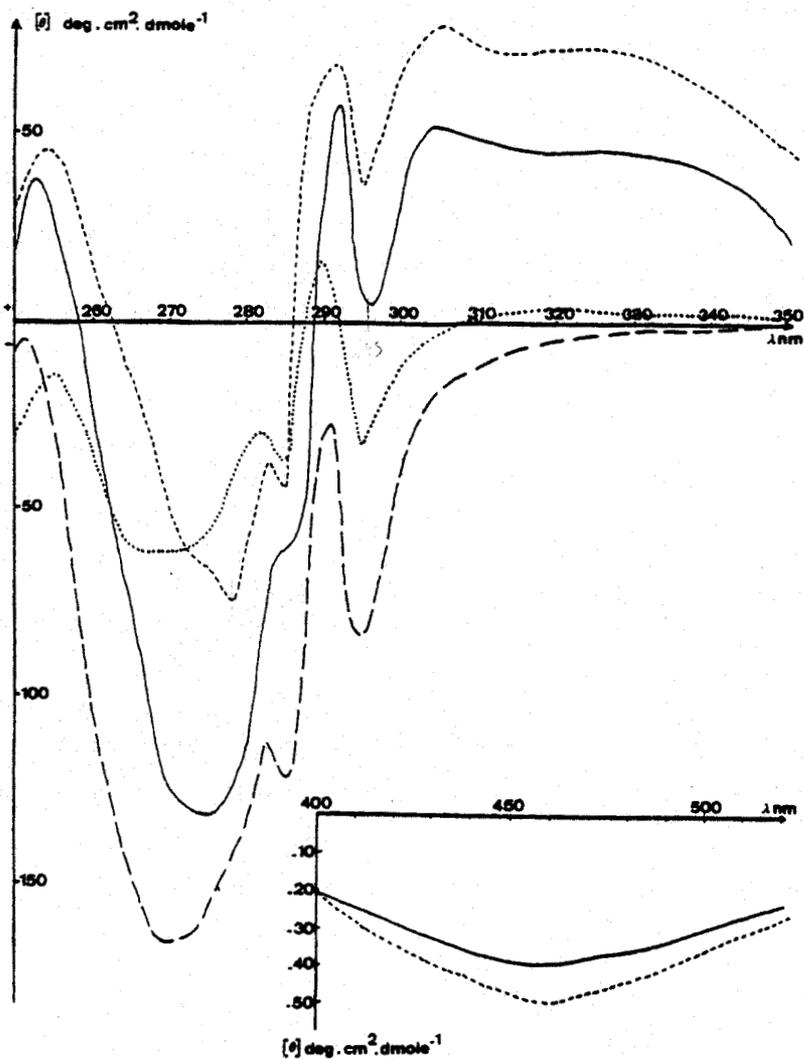


Figure 27

Spectres dichroïques des apo et ferritransferrines entre 250 et 600 nm

- ferrilactotransferrine
- - - apolactotransferrine
- ferrisérotansferrine
- aposérotansferrine

C - CONCLUSIONS

Ces résultats montrent que la sérotransferrine à un taux d'hélicité très faible (17 p 100) et que sa structure secondaire n'est pas affectée par la fixation spécifique du métal. Ils confirment les résultats obtenus par TOMIMATSU et al. (613) et par JIRGENSONS (614).

Le taux d'hélicité de la lactotransferrine atteint 28 p 100 et n'est pas non plus affecté par la fixation du fer. La plus grande ellipticité des bandes extrinsèques de l'apolactotransferrine la différencie nettement de l'aposérotransferrine et suggère des interactions plus importantes entre les chaînes latérales des chromophores ou encore une différence entre les sites de fixation du métal.

III - LOCALISATION DES RESIDUS DE TYROSINE ET DE TRYPTOPHANE

Nous avons essayé, en utilisant la technique de "perturbation", de suivre le comportement des chromophores tyrosine et tryptophane localisés à la surface des apo- et ferritransferrines en tenant compte du fait que 4 à 6 résidus de tyrosine sont impliqués dans la liaison avec le métal.

A - MATERIEL ET METHODES

La préparation des apotransferrines réduites et alkylées a été modifiée de manière à obtenir des protéines solubles en absence d'agent dénaturant.

Après réduction de 50 mg d'apotransferrine selon la méthode de CRESTFIEL et al. (615) (p 4), l'alkylation est effectuée par l'acide iodoacétique à pH 8,6 et la protéine est immédiatement précipitée par un mélange acétone, HCl 1M (20-1, v/v). Le précipité est repris dans un tampon TRIS-HCl 0,1 M pH 8,6 puis mis en dialyse 24 h contre le même tampon puis trois fois contre de l'eau distillée.

1 - DOSAGE DES CHROMOPHORES

a - Tryptophane. Le tryptophane a été dosé selon la technique de EDELHOCH (616). La protéine réduite et alkylée est dissoute dans un tampon phosphate de sodium 0,02 M pH 6,5, Gu, HCl 6 M, sa concentration est déterminée sur un lot dissout dans le même tampon ne contenant pas de Gu, HCl. Le nombre de résidus de tryptophane est exprimé par la relation :

$$N \text{ Try} = 10^{-3} (0,322 \epsilon_{288} - 0,069 \epsilon_{280})$$

b - Tyrosine. Le nombre de résidus de tyrosine est mesuré selon la méthode de DONOVAN (617) sur les apoprotéines réduites et alkylées.

$$N \text{ Tyr} = \frac{I_b - I_a \times 76 \text{ 000}}{c \times \Delta \epsilon \text{ Tyr}}$$

où I_a = Absorbance à 295 nm de la protéine en solution dans un tampon KCl 0,1 M pH 6,5 (Gu, HCl 0 ou 6 M)

I_b = Absorbance à 295 nm de la protéine en solution à pH 13

c est la concentration de la protéine.

$\Delta \epsilon \text{ Tyr} = 2 \text{ 310}$ dans le tampon KCl 0,1 M

$\Delta \epsilon \text{ Tyr} = 2 \text{ 430}$ dans le tampon Gu, HCl 6 M

2 - LOCALISATION DES CHROMOPHORES

Nous avons utilisé la technique mise au point par HERSKOVITS et LAWKOWSKI (618, 619). Les mesures ont été faites sur des protéines en solution dans un tampon KCl 0,1 M, phosphate de sodium 0,01 M pH 7,5 à une concentration voisine de 0,1 p 100. Les spectres ont été réalisés sur un spectrophotomètre Beckman à double faisceau entre 250 et 310 nm à la température de 22°C.

Nous avons étudié l'action de quatre perturbants possédant des diamètres décroissants : le polyéthylène glycol (9,2 Å), le glycérol (5,2 Å), l'éthylène glycol (4,4 Å) et l'eau lourde (2 Å) et vérifié que l'action du perturbant est proportionnelle à sa concentration entre 0 et 50 p 100.

a - Mesures. Une solution mère a été préparée en dissolvant 30 mg de protéine dans 4 ml de tampon KCl 0,1 M - phosphate de sodium 0,01 M

pH 7,5. A partir de cette solution mère nous avons réalisé comme suit 4 solutions dénommées To, T, Po, P : (dans le cas d'une concentration de 30 p 100 en perturbant).

	Solution mère de protéine en ml	Perturbant en ml	Tampon en ml
To	0	0	4
T	0,4	0	3,6
Po	0	1,2	2,8
P	0,4	1,2	2,4

Le spectre est lu entre To, P et T, Po

b - Expressions des résultats. Les résultats obtenus ont été exprimés suivant la méthode de HERSKOVITS et SORENSEN (620).

$$N \text{ Trp} = \frac{\Delta \epsilon_{292}}{\Delta \epsilon_{292} \text{ Try}} \quad \text{ou}$$

$\Delta \epsilon_{292}$ est la différence du coefficient d'extraction molaire mesurée entre la protéine et la protéine perturbée

$\Delta \epsilon_{292} \text{ Try}$ est mesurée sur une solution témoin de N-acétyl, O-éthyl-ester tryptophane

$$N \text{ Tyr} = \frac{\Delta \epsilon_{286} - N \text{ Try} \Delta \epsilon_{286} \text{ Try}}{\Delta \epsilon_{286} \text{ Tyr}}$$

où dans ce cas

$N \text{ Try} \Delta \epsilon_{286} \text{ Try}$ représente l'absorbance à 286 nm de N Try résidus de tryptophane.

B - RESULTATS

Nous présentons dans le tableau XIV (p 105) l'accessibilité des chromophores tyrosine et tryptophane des deux transferrines sous forme apo et saturée.

Le nombre de résidus accessibles de tryptophane et de tyrosine de la sérotransferrine saturée reste constant lorsque la taille du perturbant passe de 4,4 Å à 9,2 Å. Ainsi, 27 p 100 des résidus de tryptophane et 32 p 100 des résidus de tyrosine sont perturbés par

TABLEAU XIV

NOMBRE DE RESIDUS DE TRYPTOPHANE ET DE TYROSINE DE LA LACTOTRANSFERRINE
ET DE LA SEROTRANSFERRINE ACCESSIBLES A L'ACTION DE QUATRE PERTURBANTS

Perturbants	Résidus de tryptophane accessibles						Résidus de tyrosine accessibles					
	STF apo STF ≠			LTF apo LTF ≠			STF apo STF ≠			LTF apo LTF ≠		
Polyéthylène Glycol	2,1	3	1	3,2	4,0	1	4,6	12,4	7	6,3	12,5	6
Glycérol	3,0	4,6	2	3,9	6,2	2	8,8	15,4	7	9,8	19,4	9
Ethylène Glycol	3,2	4,6	2	3,9	6,3	2	8,9	15,7	7	9,3	20,0	10
Deutérium Oxyde	5,6	7,8	2	3,6	10,0	6	9	18,8	9	12,2	21	9



l'éthylène glycol. Ce pourcentage ne varie pas pour la tyrosine en présence d'eau lourde, alors qu'il monte à 50 p 100 dans le cas du tryptophane.

De même, pour la lactotransferrine saturée en fer, 30 p 100 des résidus de tryptophane et 47 p 100 de ceux de tyrosine sont exposés aux perturbants de taille moyenne.

Le départ du métal de la sérotransferrine se traduit par l'exposition de deux résidus de tryptophane et de 7 résidus de tyrosine supplémentaires.

Dans le cas de la lactotransferrine le nombre de résidus supplémentaires accessibles est de respectivement 2 et 10 pour le tryptophane et la tyrosine. De plus les chromophores deviennent beaucoup plus accessibles à l'eau lourde.

C - CONCLUSIONS

Les deux ferriprotéines ont un comportement voisin et une structure très compacte.

Le départ du métal de la sérotransferrine, ne se traduit que par l'exposition de 2 résidus de tryptophane et 7 résidus de tyrosine, acides aminés qui sont justement impliqués dans la fixation du métal. Ce qui laisse présager que l'apoprotéine adopte une conformation très peu différente de celle de la ferriprotéine.

Par contre, l'élimination du fer de la lactotransferrine induit de profonds chagements, matérialisés par une grande accessibilité à l'eau lourde.

IV - ETUDE DE LA DENATURATION PAR LE CHLORHYDRATE DE GUANIDINE

Afin d'obtenir des renseignements plus précis sur l'influence du métal sur la conformation des transferrines, nous avons analysé leur comportement en présence d'un agent dénaturant.

Nous avons choisi le chlorhydrate de guanidine puisque l'urée, même à la concentration de 8 M, n'est pas capable de dénaturer complètement la lactotransferrine saturée en fer, et que l'action

du pH est difficile à interpréter à cause des perturbations apportées dans les spectres par la présence de Fe^{3+} .

L'effet de la dénaturation a été suivi en dichroïsme circulaire et en différence de spectre.

A - MATERIEL ET METHODES

1 - DIFFERENCE DE SPECTRES DANS L'ULTRA-VIOLET. Nous avons utilisé la technique des quatre cuves en tandem sur des solutions de protéines en tampon phosphate de sodium 0,05 M, KCl 0,1 M pH 7,5 de telle manière que la densité optique soit toujours inférieure à 1,5 u D.O.

Pour chaque molarité en Gu, HCl nous préparons un témoin blanc \bar{b} et trois solutions T, Po et P de la manière suivante :

Solution mère de protéine : 30 mg 4 ml tampon

Solution mère de Gu, HCl : 38,2 g qsp 50 ml

La différence de spectre est lue de 600 à 240 nm entre les cuves To, P et T et Po, au bout de 2 h et 24 h d'incubation.

2 - DICHROISME CIRCULAIRE. Dans ce cas la dénaturation est réalisée par dissolution de la protéine dans Na F 0,214 M.

Les spectres dichroïques ont été réalisés sur chacune des solutions préparées comme nous l'avons décrit plus haut.

Nous avons de plus analysé systématiquement les différences de spectre pour chaque molarité en Gu, HCl.

B - RESULTATS

1 - APOTRANSFERRINES

a - Différence de spectres. Nous représentons dans la figure 28a (p 108) la dénaturation des deux apoprotéines suivies à 292 nm. Leur comportement est voisin puisque les 50 p 100 de dénaturation sont obtenus pour la même molarité en Gu, HCl : 1,5 M. Cependant, dans le cas de la lactotransferrine, l'effet bathochrome obtenu entre 0 et 1M, est caractéristique de la perturbation de résidus de tryptophane, sans dénaturation de la protéine. Nous

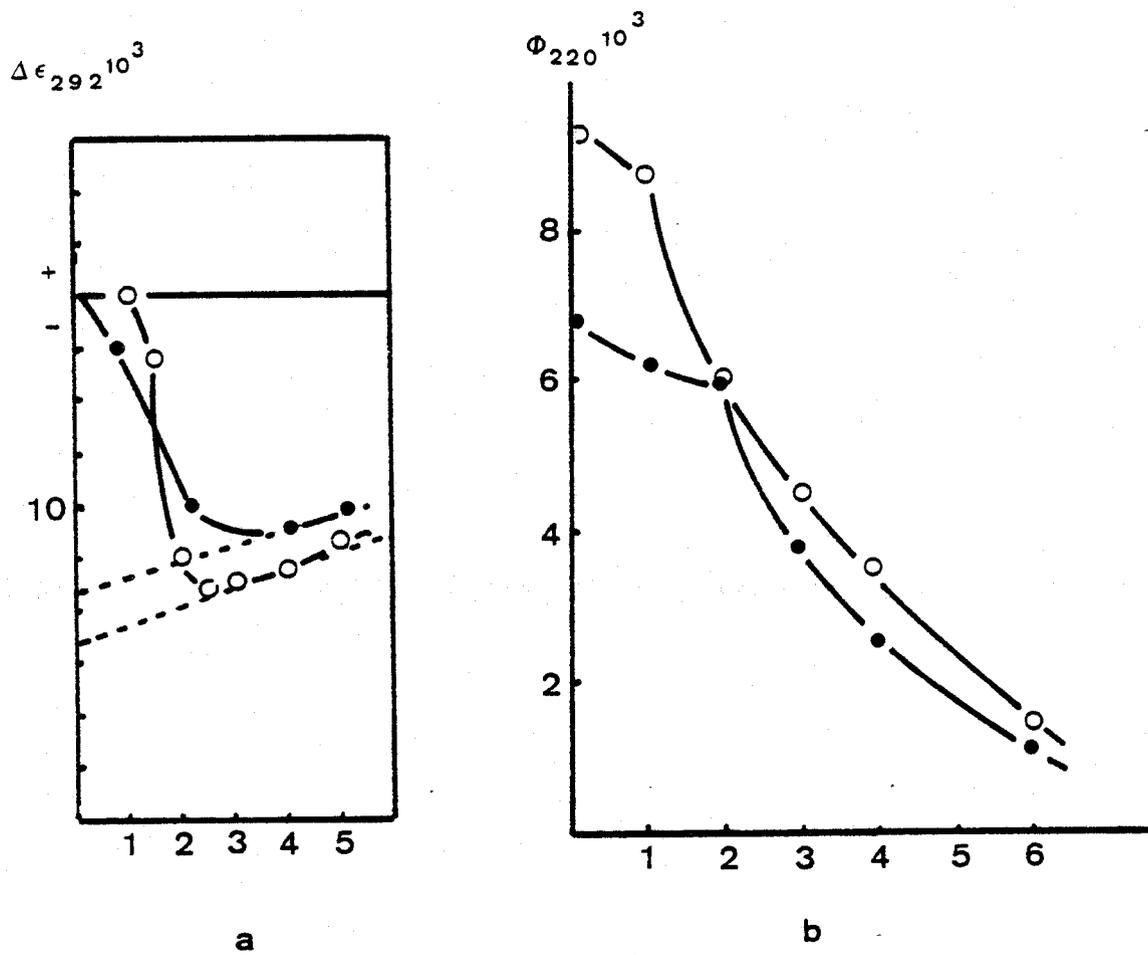


Figure 28

Dénaturation par le chlorhydrate de guanidine
de l'apolactotransferrine (o-o) et de l'aposérottransferrine (●-●) humaines

a suivie en différence de spectre à 292 nm

b suivie en dichroïsme circulaire à $\theta = 220$ nm



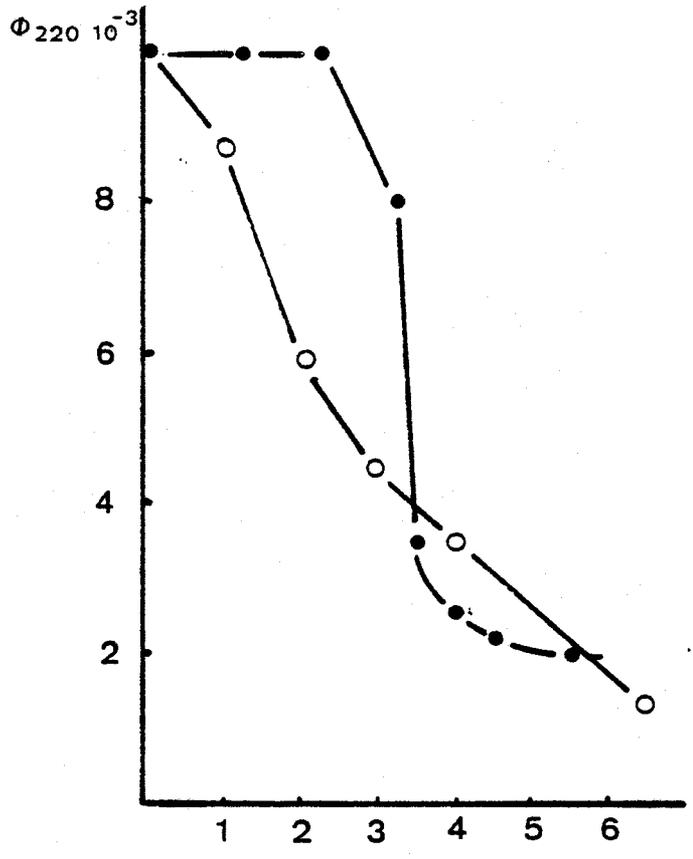
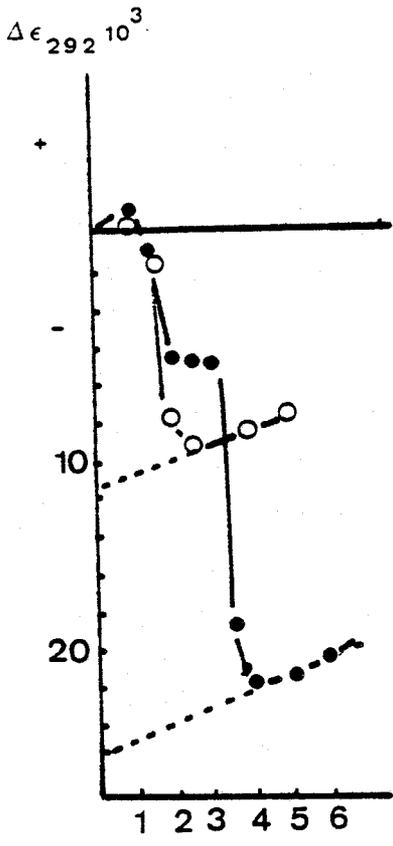
avons pu calculer, en mesurant la pente à l'origine de cet effet, que 2,6 résidus de tryptophane sont accessibles à l'action de la Gu, HCl à la concentration de 1 M. Un tel effet n'est pas observé dans le cas de la sérotransferrine, dont la dénaturation commence immédiatement. Par ailleurs, la dénaturation de la sérotransferrine n'est complète qu'à 3 M Gu, HCl, alors qu'elle l'est dès 2,5 M pour la lactotransferrine. L'amplitude de la dénaturation extrapolée à concentration nulle en Gu, HCl est de $\Delta \epsilon_{292} = -13\,500 \pm 750$ et $\Delta \epsilon_{292} = -11\,500 \pm 500$, respectivement pour la lactotransferrine et la sérotransferrine. Si l'on tient compte, dans le cas de la lactotransferrine, que 3 résidus de tryptophane, sur les 13 dosés, ne sont pas impliqués dans la dénaturation, une valeur statistique de -1 350 est obtenue pour le transfert d'un résidu sous l'action de l'agent dénaturant.

b - Dichroïsme circulaire. La figure 28 b (p 108) montre l'effet de la dénaturation, suivie, à 250 nm. Dans ce cas, il apparaît que les 50 p 100 de dénaturation sont obtenus en présence d'une concentration en chlorhydrate de guanidine 2 M pour l'apolactotransferrine et de 3 M pour la sérotransferrine. Ces résultats confirment ceux précédemment obtenus.

2 - LACTOTRANSFERRINE SATURÉE EN FER

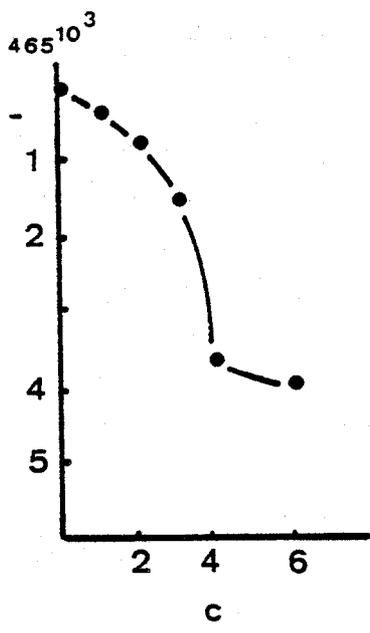
a - Différence de spectres. Nous avons représenté dans la figure 29 (p 110), la dénaturation par le chlorhydrate de guanidine de l'apo et de la ferrilactotransferrine en présence d'ions phosphates qui fragilisent la liaison avec le métal (FIALA) (621). Tout comme dans le cas de l'apolactotransferrine, le dérivé saturé en fer montre lorsque la concentration en Gu, HCl augmente de 0 à 1 M une perturbation des résidus de tryptophane sans dénaturation de la protéine. Les dosages montrent que 3 tryptophanes sont impliqués dans ce phénomène.

Le processus de dénaturation est biphasique. Dans un premier temps entre 1 et 2 M Gu, HCl, nous observons une dénaturation qui suit celle de l'apolactotransferrine mais dont l'amplitude extrapolée à une concentration nulle en Gu, HCl est de l'ordre de $\Delta \epsilon_{292} = -7\,000$, c'est-à-dire deux fois inférieure à celle de l'apolactotransferrine. Lors de cette première étape de dénaturation, la différence



a

b



c

Figure 29

Dénaturation de l'apolactotransferrine (o-o) et de la ferrilactotransferrine (●-●) par le chlorhydrate de guanidine

- a analyse en différence de spectre à 292 nm
- b analyse en dichroïsme circulaire à $\theta = 220$ nm
- c analyse en différence de spectre à 465 nm



de spectre lue à 465 nm montre que 50 p 100 du métal sont éliminés.

La deuxième étape de dénaturation a lieu entre 2,7 et 4 M Gu, HCl et est synchrone de la dissociation totale du complexe métallique.

L'extrapolation, à concentration nulle du Gu, HCl, de l'amplitude de la dénaturation donne $\Delta \epsilon_{292} = - 27\ 000 \pm 875$ ce qui permet de calculer une valeur de - 2 700 pour le transfert d'un résidu de tryptophane lors du processus de dénaturation puisque l'exposition de trois résidus n'entraîne pas de dénaturation de la protéine. Cette valeur est nettement supérieure à celle obtenue avec l'apolactotransferrine. La différence de - 14 000 \pm 775 observée au cours de la deuxième phase de dénaturation peut être consécutive à la fixation du métal sur des résidus de tryptophane.

b - Dichroïsme circulaire. Les études ont été réalisées en absence d'ions phosphates. La figure 29 b (p 110) montre que dans ce cas la dénaturation de la ferrilactotransferrine est monophasique et est retardée jusqu'à une concentration en Gu, HCl 3 M. L'analyse simultanée de θ 465 mm et θ 220 mm montre que l'élimination du métal est synchrone du dépliement de la chaîne peptidique.

3 - SEROTRANSFERRINE SATURÉE EN FER.

a - Différence de spectres. L'analyse de la figure 30 a (p 112) montre que dans ce cas la présence de métal ne retarde pas le processus de dénaturation, mais que l'amplitude de celle-ci atteint à concentration nulle en Gu, HCl une valeur de $\Delta \epsilon = - 27\ 500 \pm 1\ 500$, ce qui représente une différence de - 16 000 \pm 1 500 avec l'aposérotansferrine. Cette valeur est supérieure à celle trouvée par la lactotransferrine.

b - Dichroïsme circulaire. L'analyse en dichroïsme circulaire, réalisée en absence d'ions phosphates donne des renseignements beaucoup plus intéressants. En effet, comme nous le montrons dans la figure 30 b (p 112), 50 p 100 de dénaturation sont atteints pour la même concentration (3 M) en Gu, HCl pour l'apo et la sérotransferrine. Cependant à 2 M en Gu, HCl alors que le dépliement de la chaîne peptidique n'est pas encore commencé, 50 p 100 de la capacité

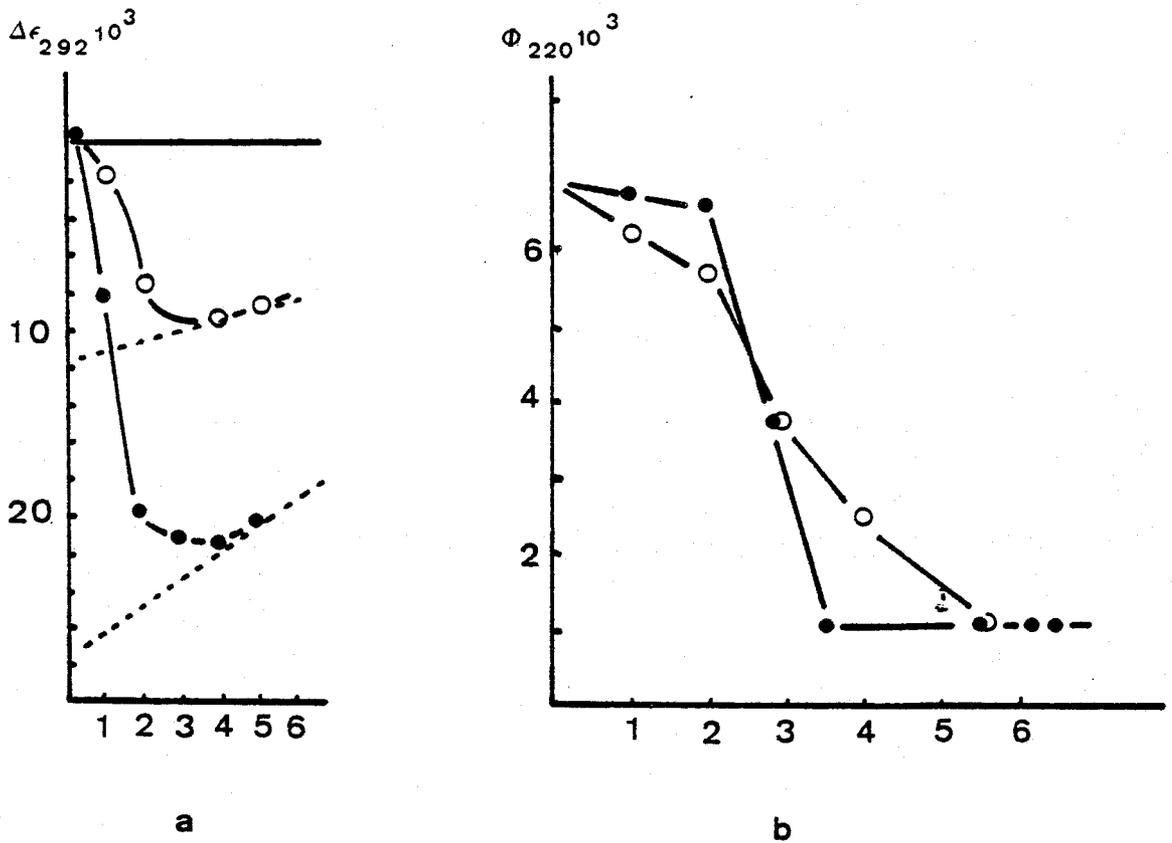


Figure 30

Dénaturation de l'aposérotransferrine (o-o) et de la ferrisérotransferrine (●-●) par le chlorhydrate de guanidine

a analyse en différence de spectre à 292 nm

b analyse en dichroïsme circulaire à $\theta = 220$ nm



de fixation du métal sont déjà perdus. Ce phénomène est aussi observé en différence de spectres à 292 nm.

C - CONCLUSIONS

La dénaturation des deux apotransferrines par le chlorhydrate de guanidine suivie aussi bien en dichroïsme circulaire au niveau de la structure secondaire, qu'en différence de spectre, montre que les deux glycoprotéines possèdent une organisation très voisine.

En effet, les courbes obtenues en différence de spectres, pour les deux transferrines sont superposables. Néanmoins, la lactotransferrine doit posséder une structure légèrement plus organisée, mais elle est dénaturée plus rapidement que la sérotransferrine.

L'étude des dérivés saturés en métal montre, par contre, de profondes différences entre les deux glycoprotéines.

La fixation des deux ions ferriques par la sérotransferrine ne change en rien le comportement de la protéine vis-à-vis de l'agent dénaturant. Ce résultat sous-entend que la fixation du métal n'entraîne que des changements mineurs dans la conformation de la glycoprotéine. De plus, l'étude de la dénaturation permet de localiser un site métallique à la surface de la protéine, le deuxième site, interne, n'est détruit que lors du dépliement de la chaîne peptidique.

Le processus de dénaturation de la lactotransferrine saturée en fer est retardé jusqu'à une concentration 3,5 M en chlorhydrate de guanidine comme le montre l'étude en dichroïsme circulaire. L'addition d'ions phosphates permet de différencier deux phases dans la dénaturation. Dans une première étape, alors qu'un ion métallique est éliminé, la courbe de dénaturation se superpose à celle de l'apolactotransferrine, mais elle possède une amplitude deux fois moindre. Par contre le deuxième site n'est éliminé, quant à lui, qu'à une concentration 3,5 M en guanidine alors que la protéine est complètement dépliée.

Il est donc possible de définir, tout comme pour la sérotransferrine, un site externe puisqu'il est accessible aux ions phosphates et un site interne. Le fait que le site externe ne soit démasqué qu'en présence d'ions phosphates suppose que la liaison du métal avec la lactotransferrine diffère de celle avec la sérotransferrine.

Il est encore possible que la lactotransferrine adopte lors de la fixation du métal une conformation nouvelle.

V - DISCUSSION

Dans le cas de la sérotransferrine, l'étude de la localisation des résidus de tryptophane et de tyrosine ainsi que l'analyse de la dénaturation par le chlorhydrate de guanidine de l'apo- et de la ferrisérotransferrine montrent que cette glycoprotéine possède une conformation très compacte. Un site métallique est situé à la surface de la protéine, alors que le deuxième est en position plus interne. Le départ du métal qui s'accompagne de l'exposition de 2 résidus de tryptophane et de 7 résidus de tyrosine ne change pas le comportement de la glycoprotéine vis-à-vis de l'agent dénaturant. Ces résultats suggèrent que le changement de conformation, induit par la fixation (ou le départ) des ions métalliques sur les sites préexistants, est très limité et n'intéresse vraisemblablement que les sites métalliques eux-mêmes.

Le cas de la lactotransferrine est plus complexe. En effet, s'il est possible, tout comme dans le cas de la sérotransferrine, de définir un site situé en surface et un site interne, au contraire, la grande accessibilité des chromophores de l'apolactotransferrine, comparée à celle limitée de la lactotransferrine saturée en fer, suggère que le remaniement de conformation induit par l'élimination du métal est très important, principalement dans la région qui fixe le site interne.

CHAPITRE III

DEMONSTRATION DE LA NON IDENTITE DES SITES DE FIXATION DU METAL DES TRANSFERRINES

Nous tenons à remercier Monsieur LHOSTE directeur de recherche à l' I.N.S.E.R.M. à l' Institut CURIE (ORSAY), qui nous a permis de réaliser toute l' étude en Résonance Paramagnétique Electronique des cupri-transferrines.

I - INTRODUCTION

A l'époque où nous avons entrepris ce travail, aucune différence d'ordre chimique n'avait été démontrée entre les deux sites de fixation des ions ferriques de la sérotransferrine et de la lactotransferrine humaine. Cependant, l'hypothèse de FLETCHER et HUEHNS (622) (p 62) et la spécialisation de reconnaissance que nous avons démontré précédemment pouvaient être la conséquence d'une différence dans la structure des sites métalliques de chaque transferrine.

C'est pourquoi, nous avons entrepris :

1 - l'étude chimique des sites métalliques de ces deux glycoprotéines en nous intéressant uniquement aux résidus d'histidine.

2 - l'étude de la stabilité des sites métalliques de la lactotransferrine en fonction du pH et de la force ionique.

II - DEMONSTRATION DE LA PARTICIPATION DE L'HISTIDINE DANS LA COORDINATION DU METAL

A - HISTORIQUE

La participation de l'histidine dans la coordination des ions ferriques de la séro et de l'ovotransferrine a été suggérée, dès 1963, par WINDLE et al. (623) à la suite de la mise en évidence en R.P.E. de la participation des noyaux azotés dans la fixation des ions cuivriques. La confirmation de cette hypothèse par les voies chimiques a été tentée par BEZKOROVAINY et al. (624). Les résultats obtenus par ces auteurs sur la sérotransferrine sont très discutables. En effet, l'action de l'acide bromoacétique entraîne la modification de 11 à 12 résidus d'histidine seulement au bout de 48 heures, la modification de 2 et 4 résidus supplémentaires n'est réalisée qu'après 12 jours. La durée de cette expérience étant trop longue, nous avons étudié la modification des résidus d'histidine par un réactif plus spécifique et plus rapide d'action : le diéthyl pyrocarbonate.

B - ACTION DE LA CARBETHOXYLATION SUR LA CAPACITE DE FIXATION DU METAL

Nous avons, dans un premier temps, analysé la capacité de fixation du fer par les apotransferrines en fonction de la concentration en diéthyl pyrocarbonate et nous avons de même étudié le comportement des ferritransferrines.

1 - MATERIEL ET METHODES

a - Modification chimique

1 - Sur les apoprotéines. Une solution de transferrine à 0,1 p 100 (10 μ M), dans un tampon phosphate de sodium 0,05 M, chlorure de potassium 0,1 M pH 6,1 est répartie en fractions de 3 ml.

Le diéthyl pyrocarbonate de densité 1,12 est additionné pour obtenir une concentration finale en réactif variant de 0 à 30 mM. Pour les molarités inférieures à 5 mM, le réactif est préalablement

(et extemporanément) dissout dans 10 v d'éthanol dans ce cas le témoin est constituée par la solution de protéine traitée par le même volume d'éthanol.

Après 50 minutes d'incubation à température ambiante, une aliquote de 1 ml est analysée en différence de spectres entre 320 et 230 nm, alors que les 2 ml restants sont dessalés sur une colonne de Séphadex G-25 PD₁₀ (1,5 cm) 0,1 M pH 8,6. La concentration de chaque éluat est déterminée puis 10 µl de solution de FeCl₃-citrate (40 µg Fe/100 µl) contenant 2 p 100 de ⁵⁹Fe (551 mCi/mg) sont ajoutés pour obtenir une saturation théorique de 110 p 100. Une aliquote de 100 µl est alors prélevée.

L'excès de réactif est éliminé par chromatographie d'échange d'ions sur 2 ml de résine Dowex 2x8 200-400 "mesh") stabilisée dans le tampon citrate-bicarbonate 0,1 M pH 8,6 et répartie dans des cônes de pipettes automatiques. L'éluat et les eaux de lavage (3 x 0,5 ml) sont réunis et analysés, ainsi que l'aliquote de la solution chromatographiée, à l'aide d'un compteur de radioactivité gamma afin de déterminer le pourcentage de ⁵⁹Fe fixé par la protéine.

2 - Sur les ferriprotéines. Dans ce cas, la réaction a été effectuée sur des solutions de transferrine de 0,1 à 0,3 p 100 dans des tampons chlorure de potassium 0,1 M, phosphate de sodium 0,05 M de pH 6,1 et 6,8.

b - Détermination de la capacité de fixation du métal.

3 ml d'une solution d'apotransferrine à 0,3 p 100 sont traités par le diéthyl pyrocarbonate à la concentration de 3,5 mM pour la lactotransferrine et à 12 mM pour la sérotransferrine. Après analyse des spectres d'absorption dans l'ultraviolet, les protéines sont dessalées sur colonne de Séphadex G-25 PD 10 (1 x 5 cm) stabilisée dans le tampon 0,1 M pH 8,6. La concentration en protéine est déterminée en mesurant sa densité optique à 280 nm.

La capacité de fixation en fer est mesurée, sur les apotransferrines modifiées par le diéthyl pyrocarbonate, par additions successives d'aliquotes de FeCl₃-citrate. La densité optique est mesurée à 465 nm et chaque nouvelle addition de fer est réalisée, lorsque la densité optique est devenue stable.

Après saturation complète, la solution est dialysée puis la concentration en protéine et en métal est mesurée.

2 - RESULTATS

a - Modification chimique.

1 - Sur les apotransferrines. Les résultats obtenus sont rassemblés dans la figure 31 (p 119). Les comportements des deux transferrines sont voisins, puisque nous observons pour chacune trois étapes dans la capacité de fixation du métal. Cependant, la première phase permet de les différencier. En effet, la lactotransferrine perd 50 p 100 de sa capacité à fixer le métal entre 1,4 et 2,8 mM en diéthyl pyrocarbonate, alors que pour la sérotransferrine cette destruction se produit linéairement entre 0 et 12 mM.

La deuxième phase est caractérisée par la formation de transferrine gardant la possibilité de fixer le fer à 50 p 100 de la saturation.

Dans la troisième phase, qui s'amorce à la concentration de 20 mM, la capacité commence à diminuer, mais, même aux concentrations les plus fortes en réactif (30 mM), elle est toujours au moins égale à 30 p 100.

2 - Influence de la carbéthoxylation sur les protéines saturées en fer. La carbéthoxylation de la lactotransferrine saturée en fer a été réalisée à pH 6,1 et 6,8, dans ces conditions la fixation du métal et les propriétés optiques ne sont pas altérées.

La carbéthoxylation de la sérotransferrine, qui ne peut être réalisée qu'à pH 6,8, car en dessous de ce pH elle perd le métal fixé, ne modifie pas la fixation du métal, mais induit des modifications de ses propriétés optiques. En effet, le spectre d'absorption dans le visible, centré à 465 nm pour la protéine non modifiée, se déplace à 470 nm alors que son coefficient d'extinction molaire augmente jusqu'à 28 p 100 de sa valeur initiale.

b - Dosage des ions ferriques spécifiquement fixés par les transferrines modifiées.

Dans les expériences précédemment décrites, nous avons mesuré

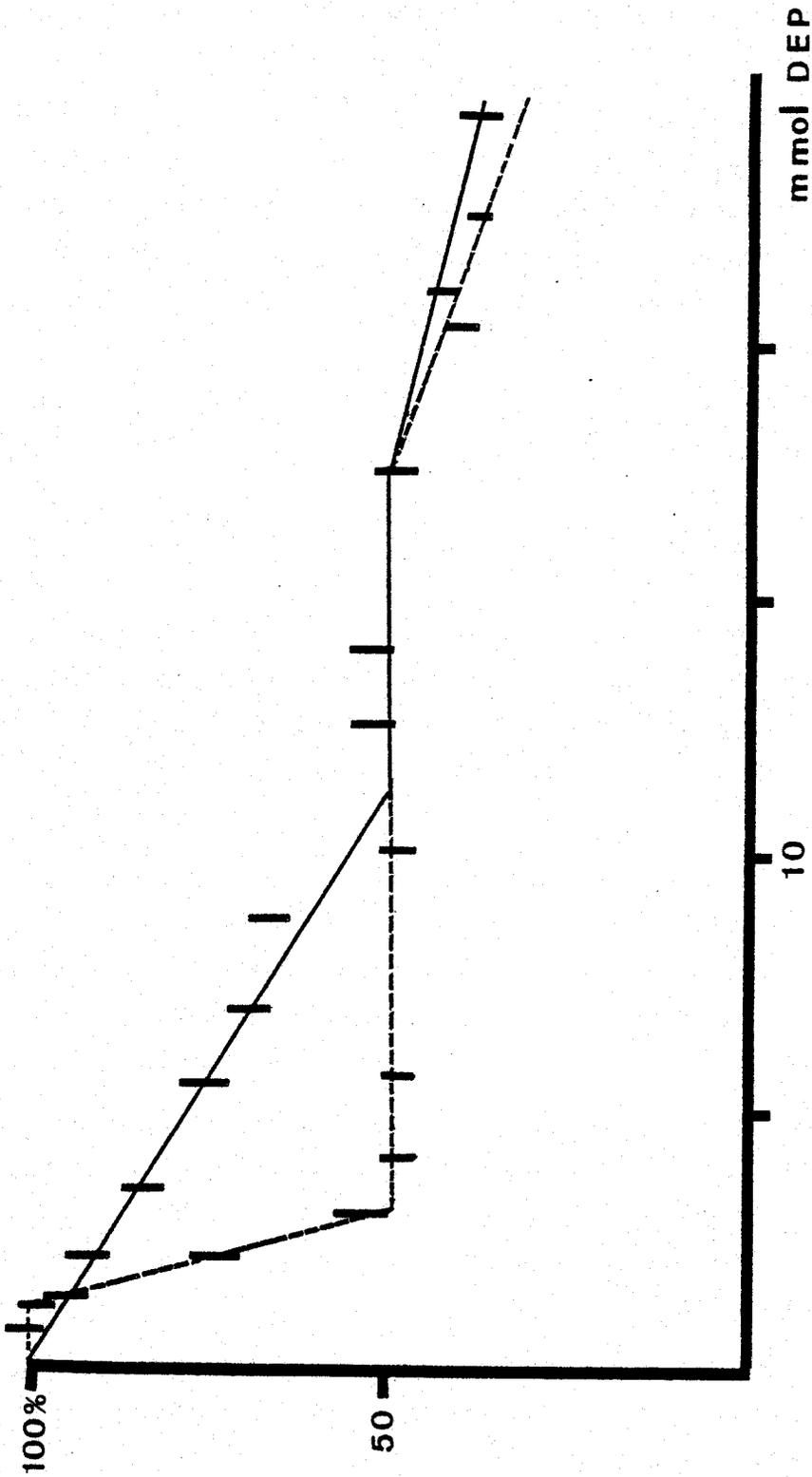


Figure 31

Capacité de fixation du Fe³⁺ de l'apolactotransferrine (---) et de l'aposerotransferrine (—) soumises à l'action de concentration croissante de diéthyl pyrocarbonate



de manière relative, grâce à un marquage radioactif par le ^{59}Fe , la capacité de fixation du métal des transferrines en fonction du degré de carbéthoxylation. Afin de démontrer sans ambiguïté que les transferrines modifiées ne fixent qu'un seul atome de fer, nous avons effectué un dosage du métal réellement complexé par les protéines modifiées.

La figure 32 (p 121) donne les résultats obtenus de manière comparative, sur l'apolactotransferrine et l'apolactotransferrine modifiée par une concentration de 3 mM en D.E.P. Pour des quantités de 6,7 mg de protéines le plateau de saturation est atteint pour l'apolactotransferrine après addition de 10 μg de Fer et pour l'apolactotransferrine modifiée après addition de 5 μg de Fe.

Nous avons résumé dans le tableau XVI (p 122) les résultats des dosages que nous avons effectués.

3 - CONCLUSIONS

L'apolactotransferrine, tout comme l'aposérotansferrine, ne fixe plus qu'un seul atome de fer après action du diéthylpyrocarbonate. L'augmentation de la concentration en réactif ne permet pas de détruire complètement les deux sites de fixation du métal.

Les deux apoprotéines ont un comportement différent puisque l'inactivation de l'apolactotransferrine se produit pour une molarité bien déterminée en réactifs (2,8 mM), alors que celle de l'aposérotansferrine s'étale entre 0 et 12 mM. Ce résultat suggère que le mécanisme de perte de la capacité de fixation d'un métal pour la sérotransferrine met en jeu plus de composants que celui de la lactotransferrine.

Le comportement de la sérotransferrine saturée suggère que la carbéthoxylation agit au niveau même du site. Les effets hyperchrome et bathochrome observés sont identiques à ceux décrits par BATES et SCHLABACH (625) qui étudient la substitution de l'ion bicarbonate par l'ion nitrilotriacétate (p 29).

Il est possible que le groupement carbéthoxy d'une histidine proche du métal ou liée à celui-ci se substitue à l'ion carbonate. En effet, le groupement carbéthoxy possède toutes les propriétés des anions pouvant substituer le carbonate (cft p 28). En outre, il est démontré que les deux noyaux azotés de l'histidine sont réactifs vis-à-vis du D.E.P., ce qui suggère que la liaison avec le métal

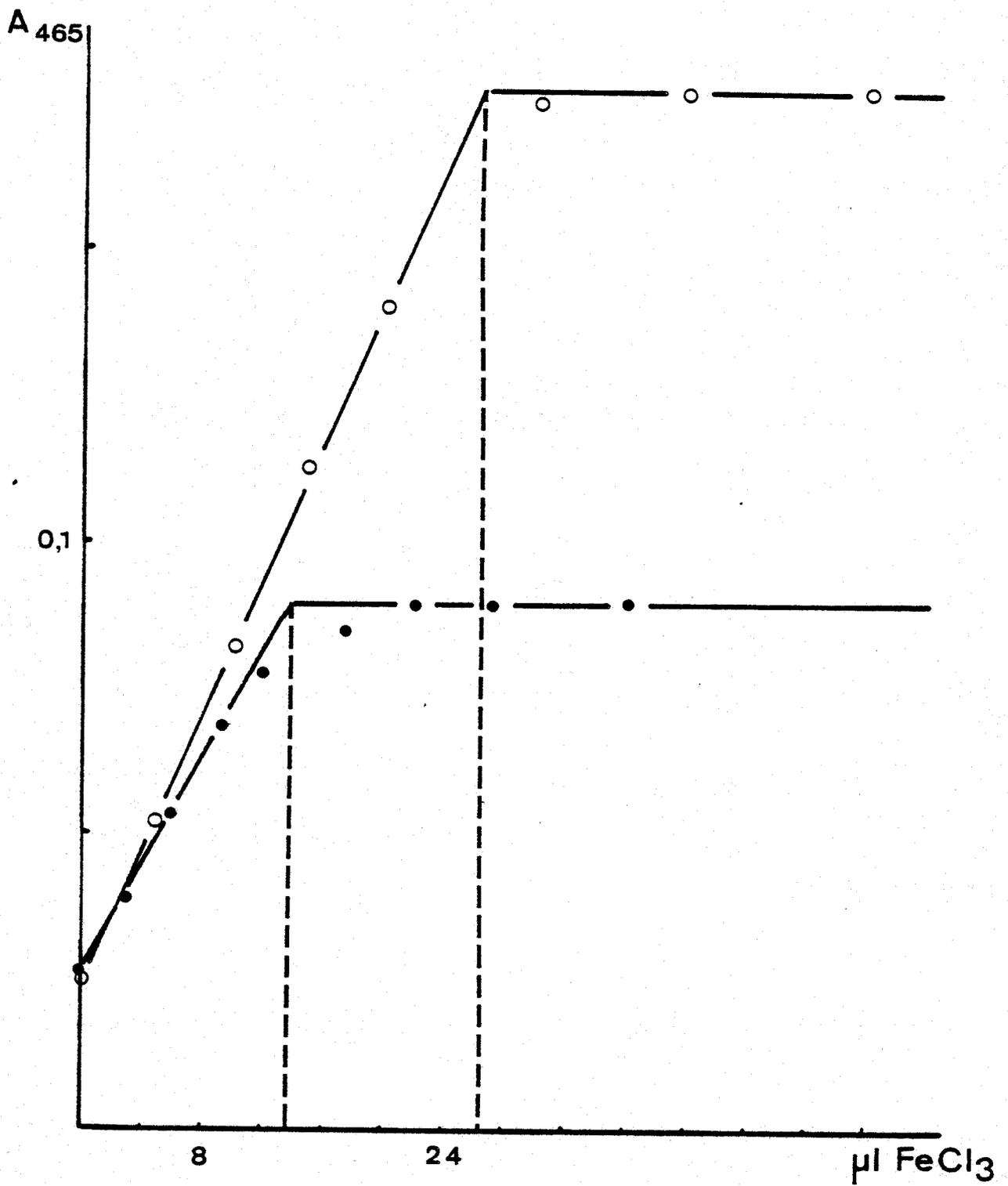


Figure 32

Détermination du nombre d'atomes de fer fixés par l'apolactotransferrine native (O-O) et par l'apolactotransferrine carbéthoxylée (●-●)



TABLEAU XVI

CAPACITE DE FIXATION DU FER DE L'APOLACTOTRANSFERRINE
ET DE L'APOSEROTRANSFERRINE EN FONCTION DU DEGRE DE CARBETHOXYLATION

	Molarité en DEP en m mol	µg de Fer fixé/ mg de protéine	Nombre d'atomes de fer fixé
Apolactotransferrine	0	1,40	2
	4	0,64	1
	20	0,64	1
Aposérotransferrine	0	1,32	2
	12	0,68	1
	20	0,64	1



n'inhibe pas totalement la réactivité de l'histidine.

Ces résultats qui montrent qu'un ion Fe^{3+} au moins fixé par la sérotransferrine est accessible au réactif, confirment la localisation à la surface de la molécule d'un des 2 sites métalliques que nous avons démontrée dans le chapitre précédent.

C - SPECIFICITE DE LA REACTION

Bien que la modification ait été réalisée dans des conditions décrites comme spécifiques de l'histidine, il nous faut vérifier que les résidus de tyrosine n'ont pas été touchés et que la modification de la lysine n'est pas responsable de la destruction d'un site métallique.

De plus, comme de gros excès en D.E.P. sont utilisés, en particulier, pour la sérotransferrine, il est possible que la destruction partielle du deuxième site, soit provoquée par une modification de la conformation de la protéine.

1 - MATERIEL ET METHODES

a - Spécificité de la réaction

1 - Tyrosine. Nous avons analysé tous les spectres différentiels pour chaque molarité de réactif, entre la protéine et la protéine modifiée, entre 320 nm et 235 nm. La o-carbéthoxylation de la tyrosine se traduit, en effet, par l'apparition d'un spectre négatif centré à 278 nm.

2 - Régénération de l'histidine. La durée de demi-vie de la carbétoxyhistidine étant de 55 h., nous avons suivi en fonction du temps la fixation d'une quantité connue de métal par une protéine modifiée.

Nous avons analysé l'action de l'hydroxylamine sur la capacité de fixation du métal. Après traitement de 4 ml de la solution de protéine par le diétylpyrocarbonate comme il est décrit précédemment, la solution de transferrine est divisée en deux lots A et B. Le lot A est additionné de 2 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M pH 7, le lot B est additionné de 2 ml d'une solution de NH_2OH 1 M dans le même tam-

pon. Après incubation, les solutions sont déssalées sur colonne de Séphadex G-25 PD 10 (1 x 5 cm) stabilisée dans le tampon citrate-bicarbonate 0,1 M pH 8,6. Les protéines sont resaturées puis analysées comme nous l'avons décrit précédemment (p 116)

b - Intégrité de la conformation. Les spectres dichroïques de chaque échantillon ont été réalisés. Le protocole expérimental est celui décrit précédemment (p 97).

2 - RESULTATS

a - Spécificité de la réaction

1 - Différence de spectres : Les différences des spectres montrent pour les faibles molarités en D.E.P. un spectre positif centré à 240 nm, caractéristique de la carbéthoxylation de l'histidine. L'amplitude de ce spectre augmente progressivement en fonction de la concentration en réactif (Figure 33 p 125) et à partir de 12 mM se déplace progressivement vers 232 nm. Simultanément (Figure 33, p 125) un spectre négatif centré à 278 nm apparaît ainsi qu'un spectre positif à 305 nm. Ces résultats montrent d'une part, qu'à fortes concentrations en réactif (à partir de 12 mM), les résidus d'histidine commencent à subir une deuxième carbéthoxylation comme l'ont démontré LOOSEMORE et al. (626)

Le spectre négatif à 278 nm est attribué, comme l'ont démontré BURSTEIN et al. (627) à la O-carbéthoxylation de la tyrosine. Le tableau XVII (p 126) donne le nombre de résidus de tyrosine modifiés lorsque 50 p 100 de la capacité de fixation du métal sont atteints et lorsque la molarité en D.E.P. atteint 25 mM.

2 - Régénération de l'histidine. Le tableau XVII (p 126) donne la capacité de fixation du métal des apotransferrines modifiées après traitement à l'hydroxylamine et après incubation de 24 h à température ambiante.

La régénération des résidus d'histidine n'a jamais été complète. Cependant, la capacité de fixation du métal est restaurée aux faibles molarités en D.E.P.

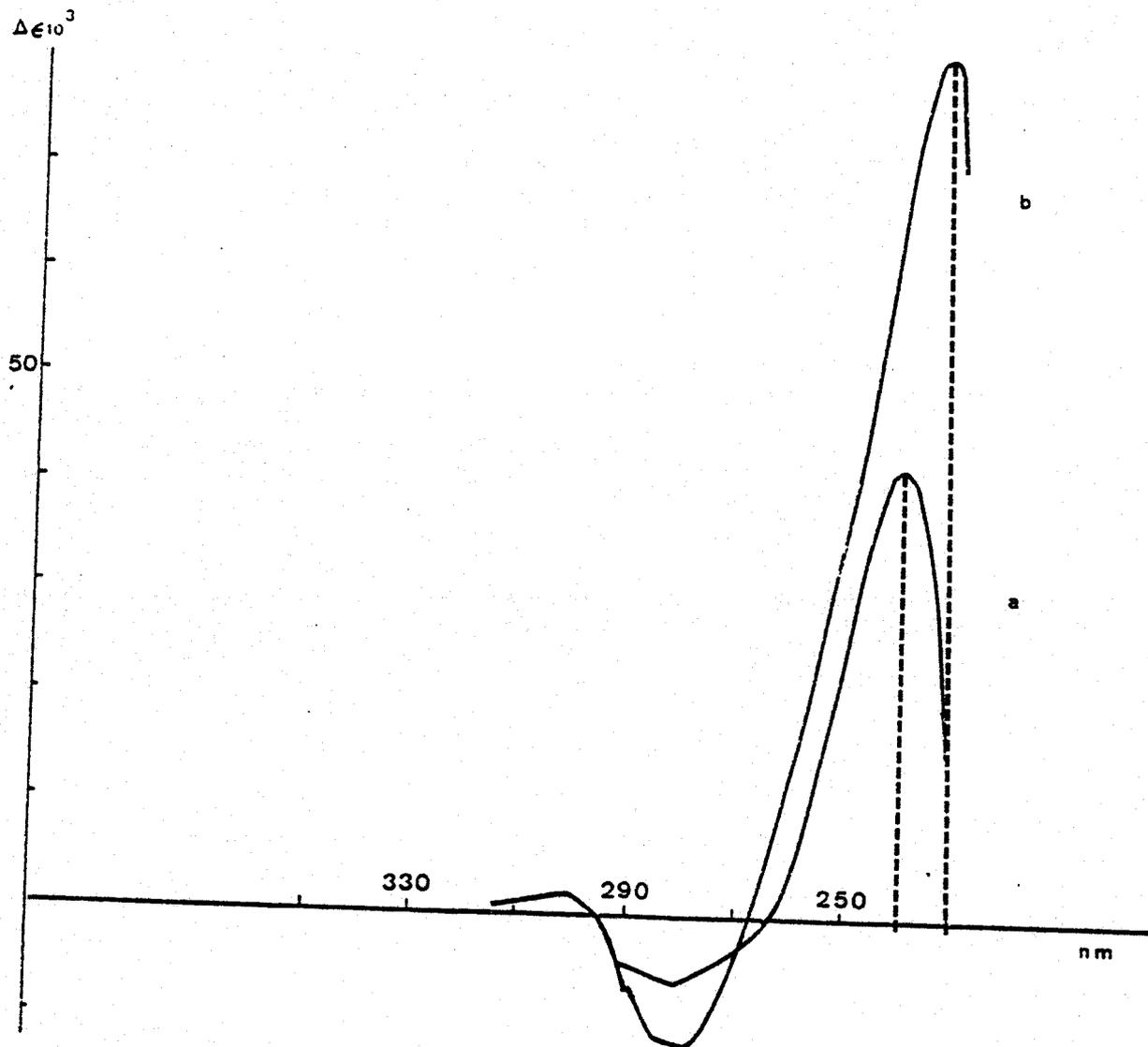


Figure 33

Différence de spectre entre 350 nm et 230 nm de l'aposérotransferrine
et de l'aposérotransferrine carbéthoxylée

a aposérotransferrine DEP (10 mM)

b aposérotransferrine DEP (25 mM)



TABLEAU XVII

CAPACITE DE FIXATION DU FER DES APOTRANSFERRINES CARBETHOXYLEES APRES
REGENERATION DES RESIDUS D'HISTIDINE ET NOMBRE DE RESIDUS DE TYROSINE MODIFIES

	Molarité en DEP en m mol	Fixation du Fer en p 100	Nombre de résidus de Tyrosine modifiés	Pourcentage de fixation du métal après trai- tement par NH ₂ OH 0,8M	Pourcentage de fixation du métal après incubation de 24 h
Lactotransferrine	0	100	0	100	100
	4	50	0,5	85	80
	25	30	3,5	50	50
Sérotansferrine	0	100	0	100	100
	12	50	1,5	85	75
	25	30	9,1	50	50



b - Intégrité de la structure

L'analyse des spectres dichroïques (figure 34 p 128) donne des résultats presque identiques pour les deux glycoprotéines.

Jusqu'à une concentration de 12 mM en réactif les spectres ne subissent aucune altération aussi bien au niveau des bandes aromatiques que dans l'ultraviolet. Entre 12 mM et 20 mM, l'ellipticité de la bande centrée à 270 nm baisse légèrement dans le cas de la sérotransferrine. Par contre, après 20 mM les bandes centrées vers 250, 285, 290 nm disparaissent.

3 - CONCLUSIONS

Tous les résultats obtenus montrent que la destruction du site accessible est bien consécutive à la modification chimique de l'histidine puisque jusqu'à environ 12 mM, la perte de 50 p 100 de la capacité de fixation du métal est réversible et que ni la tyrosine ni le tryptophane ne sont modifiés. Par contre, le deuxième site n'est pas détruit par la carbéthoxylation. En effet, le début de perte de capacité de fixation du métal du deuxième site est synchrone de la modification de la tyrosine, du tryptophane et d'une désorganisation de la conformation des transferrines. Ces résultats contredisent, dans le cas de la sérotransferrine humaine, ceux obtenus par ROGERS et al. (628) qui concluent à la destruction des deux sites métalliques après action du diéthyl pyrocarbonate.

D - CINETIQUE ET STECHIOMETRIE DE LA REACTION

Tous les paramètres de la modification ayant été définis dans les chapitres précédents, il nous est possible d'étudier quantitativement la réaction de carbéthoxylation en nous plaçant dans des conditions telles qu'elles soient spécifiques. En effet, le dosage des résidus d'histidine par le diéthyl pyrocarbonate, n'est réalisable que dans les conditions où seule la monocarbéthoxy-histidine est formée. Dans ce cas à pH 6,1, l'utilisation du coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{240} = 3\ 200$ (OVADI et al.) (629) permet le dosage de la monocarbéthoxy-histidine. Lorsque la molarité du réactif augmente, il y a formation progressive de N-N' bi carbéthoxy-histidine (LOOSEMORE et PRATT) (630), ces composés possèdent dans l'ultraviolet un spectre

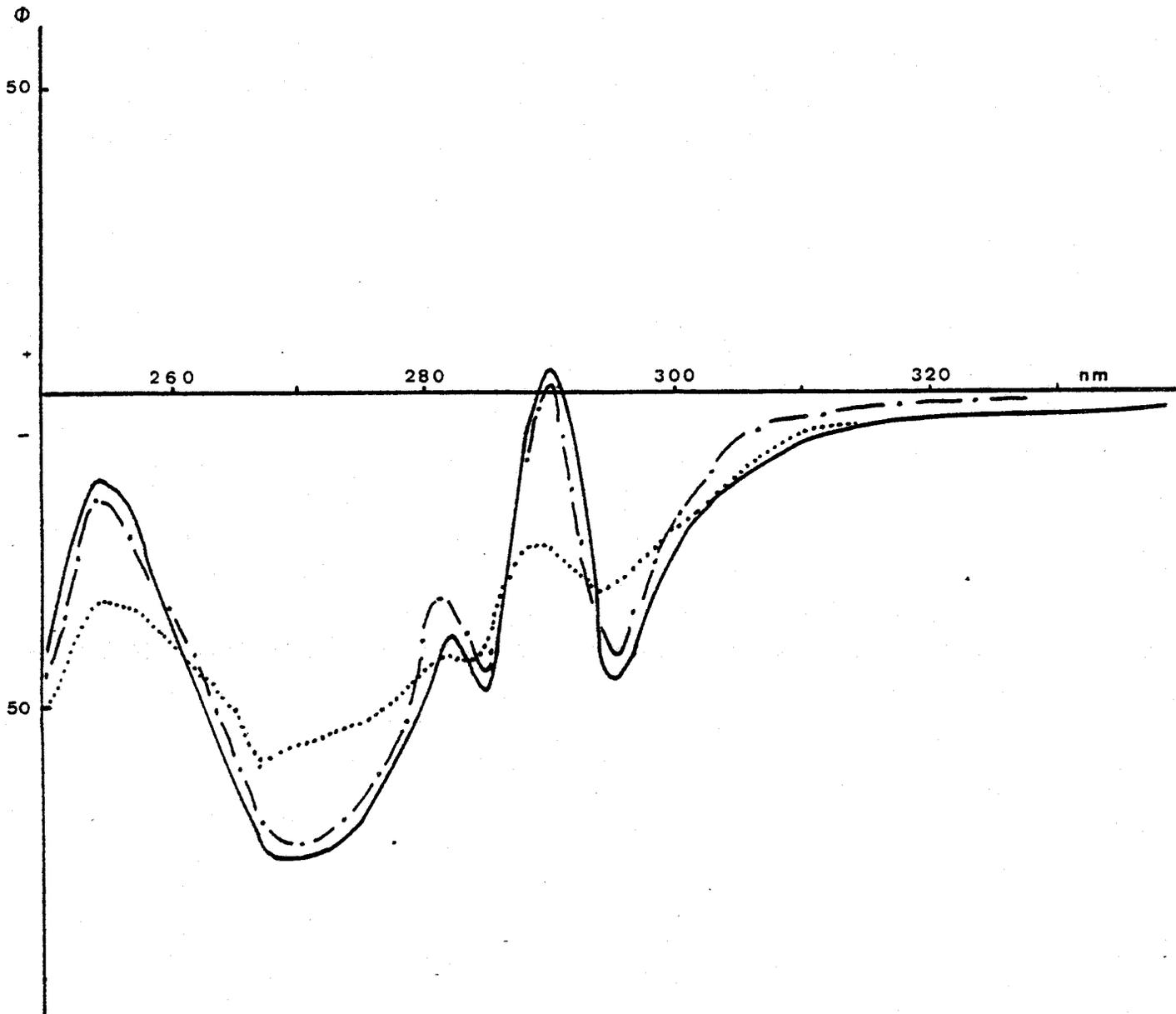


Figure 34

Spectre dichroïque entre 250 et 340 nm de l'aposérotransferrine
et l'aposérotransferrine carbéthoxylée

- aposérotransferrine
- - - aposérotransferrine carbéthoxylée (10 mM)
- aposérotransferrine carbéthoxylée (25 mM)



dont le maximum se déplace progressivement vers 230 nm, avec un coefficient d'extinction molaire qui peut augmenter jusqu'à plus de 6 000. En théorie, il est possible, en utilisant des coefficients de correction (ROOSEMONT et al.) (631), de doser l'histidine quelle que soit la molarité du réactif. Dans le cas des transferrines, l'utilisation de ces coefficients n'a donné aucun résultat interprétable probablement parce qu'il existe deux populations d'histidine différentes par leur réactivité.

Nous n'avons donc pu doser avec certitude que les résidus d'histidine modifiés à faible molarité, c'est-à-dire jusqu'à 5 mM en D.E.P.

1 - MATERIEL ET METHODES

Les apo- et les ferriprotéines ont été étudiées dans les conditions précédemment décrites mais pour des concentrations en réactif inférieures à 5 mM. Le pH d'étude a toujours été de 6,1, excepté pour la sérotransferrine saturée en fer où nous avons travaillé à pH 6,8.

2 - RESULTATS

a - Cinétique de réaction des apoprotéines. L'analyse des courbes log du pourcentage de réaction en fonction du temps montre (figure 35 p 130) que les réactions sont biphasiques et de pseudo ordre 1.

Les constantes de vitesse mesurées sont de $k_1 = 0,25 \text{ mn}^{-1}$ pour l'aposérotransferrine humaine et $k_1 = 0,9 \text{ mn}^{-1}$ pour l'apolactotransferrine humaine (mesurée dans ce cas à 14°C). Le nombre de résidus d'histidine, de la lactotransferrine, modifiés dans la première phase (60 p 100), est plus important que dans le cas de la sérotransferrine (50 p 100).

b - Stœchiométrie

1 - Etude comparative des apo- et ferritransferrines.

Nous avons résumé dans la figure 36 (p 131) le nombre de résidus modifiés sur les apo- et les ferriprotéines à pH 6,1 et 6,8. Ces

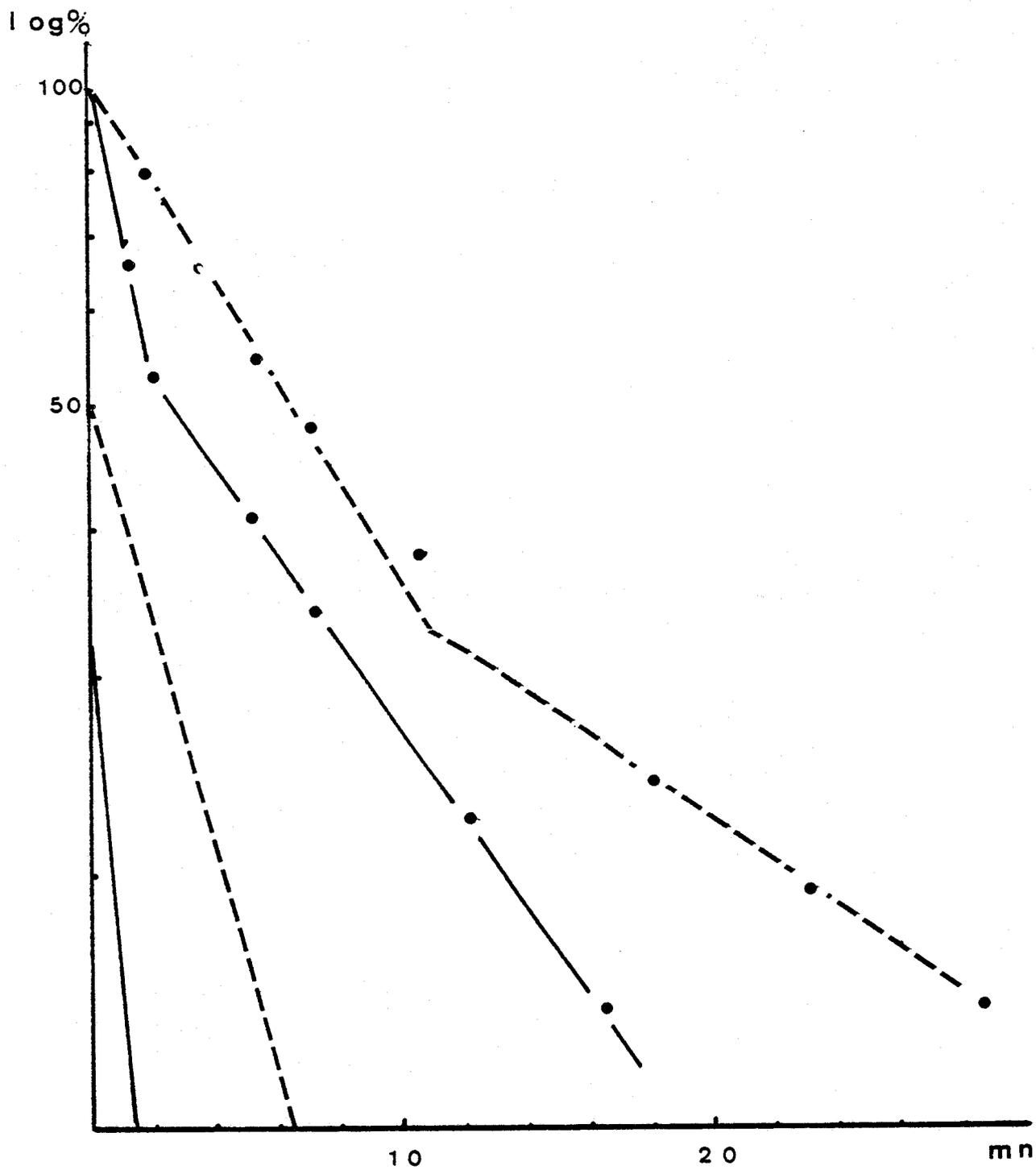


Figure 35

Cinétique de carbéthoxylation de l'aposérottransferrine (---)
et de l'apolactotransferrine (—)



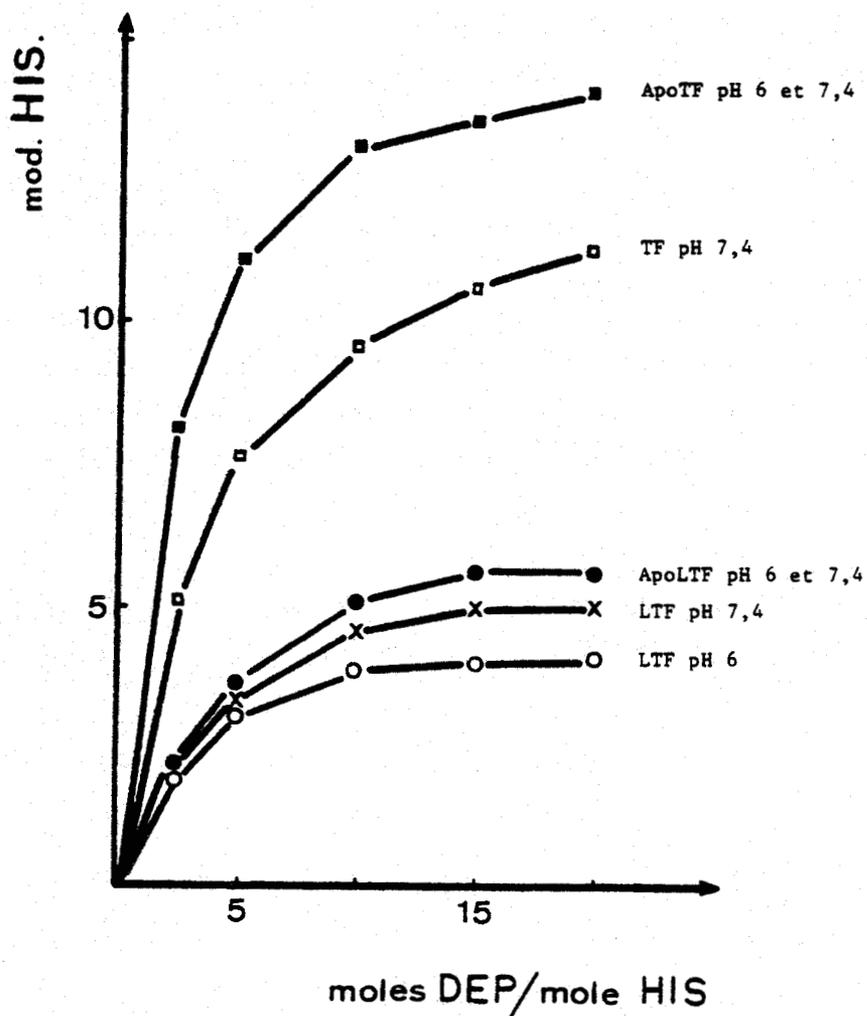


Figure 36

Accessibilité des résidus d'histidine de l'apo- et de la ferrilactotransferrine et de l'apo- et de la ferrisérotransferrine à faible molarité en diéthylpyrocarbonate



résultats montrent que, dans ces conditions expérimentales, seuls 14 résidus sont modifiés par l'aposerotransferrine et 6 pour l'apolactotransferrine. La modification totale des résidus d'histidine n'a été obtenue qu'en présence d'urée 8 M. Le nombre de résidus modifiés sur la lactotransferrine est fonction du pH puisqu'il passe de 4 à 5 alors que le pH monte lui de 6 à 6,8.

La fixation du métal protège trois résidus supplémentaires dans le cas de la sérotransferrine et un seul dans le cas de la lactotransferrine.

2 - Nombre de résidus d'histidine impliqués dans la liaison avec l'ion ferrique. Nous avons exprimé dans la figure 37 (p 133), la capacité de fixation du fer des apotransferrines en fonction du nombre apparent d'histidines modifiées, c'est-à-dire lorsque la molarité en diéthyl pyrocarbonate varie de 0 à 30 mM. Il apparaît que dans ces conditions, la destruction du site accessible de la lactotransferrine est imputable à la modification de un seul résidu d'histidine puisqu'elle se produit à une molarité en diéthylpyrocarbonate suffisamment faible pour pouvoir utiliser le coefficient d'extinction molaire mesuré par OVADI et al. (632) ($\epsilon_{240} = 3\ 200$).

Dans le cas de la sérotransferrine, les quatre résidus impliqués dans la liaison métallique sont dosés en excès.

3 - CONCLUSIONS

Dans les conditions expérimentales dans lesquelles nous avons travaillé, seulement 80 p 100 des résidus d'histidine dans le cas de la sérotransferrine, et 60 p 100 dans le cas de la lactotransferrine, ont pu être carbéthoxylés. La totalité des résidus n'ont pu être modifiés qu'en présence d'urée 8 M. Des résultats différents ont été obtenus par ROGERS et al. (633) sur la sérotransferrine. Ces auteurs ont dosé respectivement 19,5 et 15,6 résidus d'histidine sur l'apo et la ferri-sérotransferrine et ont déduit qu'il existait une coordination de deux résidus d'histidine pour chaque ion ferrique.

Cependant, ROGERS et al. (634) travaillent à une molarité de 18 mM en D.E.P. et dosent les résidus modifiés en utilisant le

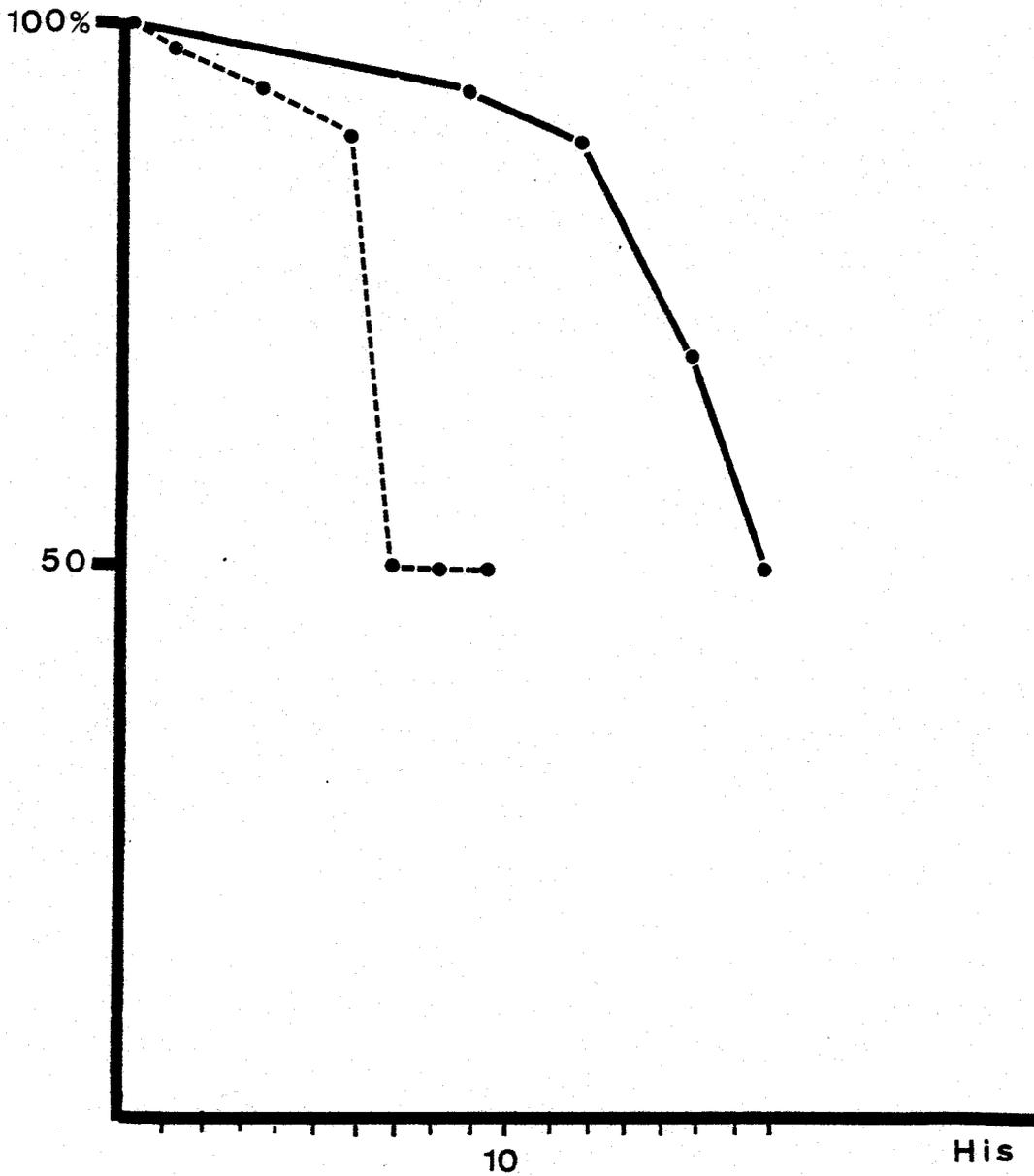


Figure 37

Capacité de fixation du fer de l'apolactotransferrine (---) et de l'aposérottransferrine (—) en fonction du nombre apparent de résidus d'histidine carbéthoxylés



coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{240} = 3\ 200$ alors que dans ces conditions expérimentales, ROOSEMONT (635) a démontré que $\epsilon_{240} = 5\ 000$.

Nous avons différencié pour les deux transferrines deux populations d'histidine en fonction de leur réactivité vis-à-vis du diéthyl pyrocarbonate. La vitesse de réaction des histidines très actives permet de différencier la lactotransferrine ($k_1 = 0,9\ \text{mn}^{-1}$ à 14°C) de la sérotransferrine ($k_1 = 0,25\ \text{mn}^{-1}$ à 20°C).

Le dosage des résidus d'histidine carbéthoxylés permet de démontrer qu'un seul résidu d'histidine est coordonné à l'ion Fe^{3+} du site accessible de la lactotransferrine.

Dans le cas de la sérotransferrine, nous ne pouvons doser précisément le nombre d'histidines impliquées dans le site détruit. Nous ne pouvons que nous borner à dire qu'il est supérieur à 1 et inférieur à 4.

L'étude de cinétique de la réactivité des histidines montre que l'histidine impliquée dans la coordination de Fe^{3+} , dans le cas de la lactotransferrine, appartient à la population faiblement réactive.

E - LOCALISATION DU SITE MODIFIÉ PAR LE D.E.P.

Pour obtenir des renseignements sur la localisation du site modifié, nous avons été amenés à étudier les spectres R.P.E. des cupri-transferrines. En effet, il est démontré (voir p. 34) que les signaux R.P.E. des cupri-transferrines sont caractéristiques d'interaction hyperfine avec les noyaux azotés.

Depuis les travaux de AASA et al. (636) et de AISEN et al. (637), il est connu que les deux sites des cupri-transferrines donnent en R.P.E. des signaux différents en fonction des conditions opératoires utilisées. Ces auteurs ont démontré qu'à pH acide, le signal obtenu est caractéristique d'un seul noyau azoté et coordonné au cuivre alors qu'à pH basique (pH 10) et en absence de bicarbonate, le signal est caractéristique d'au moins trois noyaux azotés coordonnés à l'ion cuivrique. Nous avons repris cette étude en nous plaçant dans des conditions telles que deux atomes de cuivre soient fixés, c'est-à-dire entre pH 8,2 et 9 et nous avons étudié l'in-

fluence de la carbéthoxylation sur les spectres R.P.E.

1 - MATERIEL ET METHODES

a - Fixation du cuivre. Nous avons travaillé avec l'isotope ^{63}Cu (C.E.A. France), le chlorure a été préparé par action du chlore gazeux sur le métal.

A 5 ml d'une solution à 1 p 100 d'apotransferrine dans un tampon Tris, HCl 0,1 M, NaHCO_3 0,05 M pH 8,6 sont additionnés 70 μl d'une solution 0,2 M de $^{63}\text{CuCl}_2$ dans le même tampon.

Les apoprotéines sont préalablement déssalées sur colonne de Séphadex G₂₅ (1 x 5 cm), stabilisée dans le tampon de fixation afin d'éliminer toutes traces d'éthylène diamine tétraacétique.

Après fixation du métal, les cupri-transferrines sont déssalées sur colonne de Séphadex G₂₅ (1 x 5 cm), stabilisées dans un tampon NH_4HCO_3 0,01 M, puis lyophilisées.

b - Détermination du pourcentage de saturation en métal.

Le pourcentage de saturation est déterminé par dosage de la protéine par la méthode de LOWRY et al. (638) et par dosage des ions métalliques par la méthode de PETERSON et al. (639). Enfin les spectres visible et ultraviolet sont analysés.

c - Modification par le diéthyl pyrocarbonate. Nous avons travaillé dans les conditions précisées dans le chapitre précédent, sur des protéines en solution à 5 p 100 et avec une concentration en réactif de 12 mM et 4 mM respectivement pour l'aposérotransferrine et l'apolactotransferrine.

d - Mesure du spectre R.P.E. Les spectres ont été obtenus à la température de l'azote liquide à partir de solutions de protéine dans D_2O , KCl 0,1 M à un pD non corrigé de 7,5 ajusté par NaOD. Les spectres ont été mesurés par un appareil Varian E - 3 à 9,15 GHz. Les valeurs de g ont été calibrées par un standard de D.P.P.H.

2 - RESULTATS

a - Fixation de Cu^{2+} sur les apotransferrines et leurs dérivés carbéthoxylés. La fixation de deux ions Cu^{2+} à pH 8,6 sur

les apotransferrines se traduit par l'apparition d'un spectre visible dont le maximum d'absorbance est centré à 432 nm. Simultanément la densité optique à 280 nm augmente de 10,7 p 100 et de 9,09 p 100 respectivement pour la lactotransferrine et la sérotransferrine. Il est à remarquer que dans le cas de la fixation d'ions ferriques, cette augmentation atteint 27,6 et 27,2 p 100.

Comme nous l'avons résumé dans le tableau XVIII (p 137) la carbéthoxylation de la cupri-lactotransferrine ne change en rien ses propriétés optiques. L'apolactotransferrine carbéthoxylée ne peut fixer, elle, qu'un seul ion cuivrique.

La modification de la cupri-sérotransferrine n'a pu être réalisée, car même à pH 7,3 la protéine perd 50 p 100 de son métal. L'aposérotransferrine carbéthoxylée fixe, aussi, un seul ion Cu^{2+} , mais le spectre visible est très altéré puisque son maximum se déplace à 420 nm.

b - Spectre R.P.E. Les caractéristiques des spectres R.P.E. sont données dans le tableau XIX (p 138). Les cupri-transferrines (figure 38 p 139) donnent chacune deux signaux dont la population est dans le rapport 1-1. Les deux transferrines donnent un signal A "étroit" dont les caractéristiques sont voisines et qui sont identifiées au signal décrit par AASA et al. (640).

Il présente des structures hyperfines caractéristiques de la coordination avec un seul noyau azoté.

Le deuxième signal B "large" est différent pour chaque transferrine. Son profil est comparable avec une interaction faisant intervenir au moins trois noyaux azotés. L'abaissement du pH à 7,3 qui provoque la perte de 50 p 100 des ions cuivriques fixés par la sérotransferrine fait disparaître ce seul signal.

La carbéthoxylation des apotransferrines qui résulte en la perte de 50 p 100 de la capacité de fixation des ions cuivriques, s'accompagne de la seule disparition du signal B "large" ainsi que, dans le cas de la sérotransferrine, d'une légère modification du signal A "étroit" (figure 38 p 139).

La carbéthoxylation de la lactotransferrine saturée en cuivre qui ne modifie ni sa capacité de fixation, ni ses propriétés optiques d'absorption dans le visible, change par contre le spectre

TABLEAU XVIII

PROPRIETES DES CUPRITRANSFERRINES ET DE
LEURS DERIVES CARBETHOXYLES

	Nombre d'ions Cu^{2+} fixés	Absorbance à 432 nm (solution à 1 p 100)	Absorbance à 280 nm (solution à 1 p 100)
^{63}Cu STF	2	0,45	12,0
^{63}Cu His CM STF	1	0,30 ^a	12,0
^{63}Cu LTF	2	0,50	12,4
^{63}Cu His CM LTF	1	0,30	12,4
His CM ^{63}Cu LTF	1	0,50	12,4

a Valeur mesurée à 420 nm



TABLEAU XIX

CARACTERISTIQUES R.P.E. DES CUPRITRANSFERRINES
ET DE LEURS DERIVES CARBETHOXYLES

Transferrine		gII	gI	A _{II Cu} ⁶³ G	H _{II N} G	Nombre de résidus d'histidine impliqués
⁶³ Cu STF	Signal A	2,30	2,04	145	9,0	1
	Signal B	2,23	2,04	180	N.R.**	au moins 3
⁶³ Cu-HisCM-STF	Signal A'	2,27	2,04	150	9,0	1
⁶³ Cu-LTF	Signal A	2,31	2,04*	140	9,4	1
	Signal B	2,17	2,04*	200	N.R.	au moins 3
⁶³ Cu-HisCM-LTF	Signal A	2,31	2,04	140	9,4	1

* signal A et B confondu

** non résolu



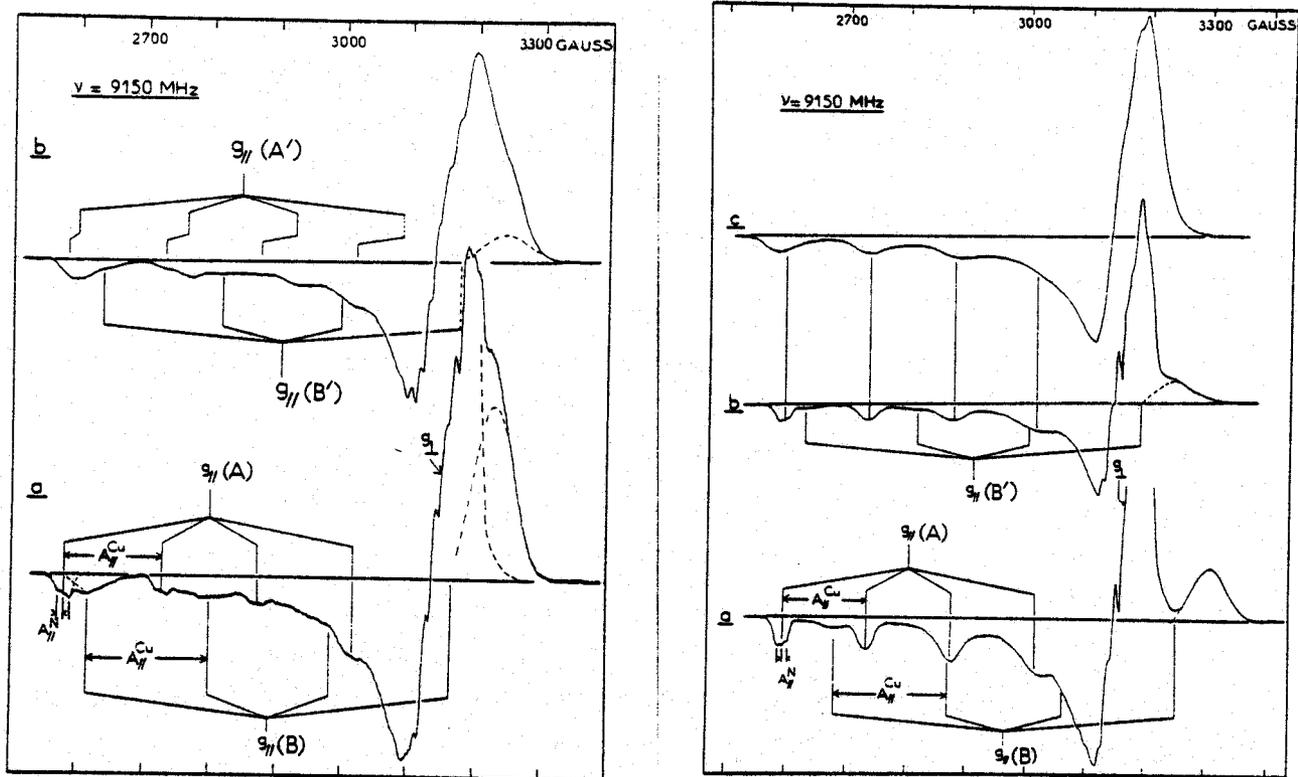


Figure 38

Spectre RPE des cupritransferrines et de leurs dérivés carbéthoxylés

- I a cupris rotransferrine
- b aposérotransferrine carbéthoxylée saturée en cuivre
- II a cupriloctotransferrine
- b cupriloctotransferrine carbéthoxylée saturée en cuivre
- c cupriloctotransferrine carbéthoxylée



R.P.E.

Le signal B disparaît progressivement pour se surimposer quand la réaction est terminée avec le signal A. Ce résultat suggère donc qu'un seul résidu d'histidine est protégé de la carbéthoxylation dans le site accessible au réactif, ce résultat est en bon accord avec les données obtenues précédemment lors du dosage des carbéthoxyhistidines.

3 - CONCLUSIONS

Les deux signaux A, "étroit", et B, "large", que nous avons observés sur les cupri-lactotransferrines et sérotransferrines sont ceux décrits séparément par AASA et AISEN (641) pour la sérotransferrine. Cependant, à la différence de ces auteurs, le signal B est obtenu à pH 8,6 et en présence de bicarbonate. Les deux signaux qui sont présents dans le même rapport ont une résistance différente à l'action de la carbéthoxylation et du pH. Le signal B est le seul à disparaître lors de la perte de 50 p 100 de la capacité de fixation du métal sous l'action du diéthyl-pyrocarbonate, de plus il est le seul éliminé, lors de la perte de l'ion cuivrique qui est consécutive à un abaissement du pH. Ainsi, nous pouvons attribuer la perte de 50 p 100 de capacité de fixation du métal à un seul site. Ce site est accessible au réactif et est labile dans le cas de la sérotransferrine à pH acide.

Les deux transferrines étudiées donnent le même signal R.P.E., A pour le site non détruit, ce signal bien que non détruit par la carbéthoxylation est caractéristique, pour les cupri-transferrines, de la coordination avec un noyau azoté.

Nos travaux, qui ont été réalisés en 1977, ont été dans le cas de la sérotransferrine confirmés et étendus par ZWEIR (642) qui a démontré que la fixation du cuivre sur cette glycoprotéine est séquentielle en fonction du pH et que les spectres R.P.E. de chaque ion cuivrique évoluent eux aussi. Ainsi, à pH acide, les deux ions sont coordonnés à un seul ion cuivrique, alors que le premier ion fixé se coordine à pH basique à 3 ou 4 noyaux azotés.

F - CONCLUSIONS

La lactotransferrine et la sérotransferrine humaines possèdent chacune deux sites de fixation du fer, qui se différencient par leur réactivité vis-à-vis du diéthyl-pyrocarbonate. Ce réactif, utilisé dans des conditions telles que seuls les résidus d'histidine soient modifiés, détruit un seul site de fixation du métal qui peut être identifié au site externe défini précédemment (chapitre II, p 113). Ce site externe est labile dans le cas de la sérotransferrine à pH acide.

Cependant, ce site accessible ne possède pas les mêmes propriétés pour les deux transferrines puisque dans le cas de la lactotransferrine un seul résidu d'azote est essentiel à la fixation du métal alors que dans le cas de la sérotransferrine il existe au moins deux résidus coordonnés au métal.

III - DIFFERENCE DE STABILITE DES DEUX SITES DE LA LACTOTRANSFERRINE EN FONCTION DU PH ET DE LA FORCE IONIQUE

La différence de réactivité des deux sites de la lactotransferrine doit, tout comme l'ont montré PRINCIOTTO et ZAPOLSKI (643) à propos de la sérotransferrine humaine, se manifester au niveau de la stabilité vis-à-vis de l'action des protons. D'autre part, la lactotransferrine doit, en principe, être capable de prélever le fer en milieu acide. En effet, dans le tractus digestif, au niveau du duodénum, le pH remonte progressivement de pH 1,5 à 6. Le fer libéré dans l'estomac, oxydé en ions Fe^{3+} , doit être rapidement chélaté ou réduit afin de ne pas précipiter sous forme d'hydroxyde ferrique. C'est pourquoi, nous avons analysé la capacité de fixation du fer de la lactotransferrine en fonction du pH.

A - DEMONSTRATION DE L'ELIMINATION SEQUENTIELLE DU FER

1 - DISSOCIATION EN MILIEU ACIDE

a - Matériel et méthodes. Nous avons travaillé sur des

protéines préparées à partir de lactosérum humain selon les méthodes décrites dans l'appendice technique. Le taux de saturation de ces protéines a été dosé à 80 p 100. Dans certains cas, nous avons utilisé une lactotransferrine saturée à 100 p 100 par addition de chlorure ferrique (appendice technique p 2) et déssalée par chromatographie sur colonne de Séphadex G₂₅ stabilisée dans une solution de bicarbonate d'ammonium 0,1 M.

1 - Préparation des tampons. Nous avons utilisé des tampons de force ionique 0,1, 0,2 et 0,4 réalisés dans une gamme de pH allant de 2,6 à 4 avec le système acide formique-formiate de sodium, de pH 3,6 à 6 avec l'acide acétique-acétate de sodium et de pH 7 à 8 avec le système Tris, HCl. L'influence des ions phosphates a été étudiée en additionnant du phosphate acide de sodium aux tampons précédents pour obtenir une concentration finale de 0,02 à 0,2 M. L'action de E.D.T.A. a été analysée en additionnant son sel bisodique à la concentration maximale de 40 mM.

2 - Analyse de la désaturation. Une solution mère de transferrine 70 mM est réalisée dans le chlorure de sodium de force ionique égale à celle du tampon de désaturation utilisé. Des aliquotes de 0,3 ml de la solution de protéine sont ajoutées à 1 ml de la solution désaturante. Après une incubation de 16 h, le pH de chaque fraction est mesuré et le degré de saturation est déterminé par lecture de la densité optique à 465 mn.

b - Résultats.

1 - Comparaison de la stabilité de la lactotransferrine et de la sérotransferrine. Nous avons représenté dans la figure 39 (p 143) le résultat d'une désaturation réalisée avec une force ionique $I = 0,1$. La désaturation de la sérotransferrine est biphasique avec une demi-désaturation entre pH 5,0 et 5,5 et une désaturation complète à pH 4. Dans les mêmes conditions, la désaturation de la lactotransferrine est monophasique et n'est totale qu'à pH 2.

2 - Influence de la force ionique. L'augmentation de la force ionique de $I = 0,1$ à $I = 0,4$ se traduit par un recul du pH de 1/2 dissociation du complexe Fe^{3+} -lactotransferrine de pH 3,3

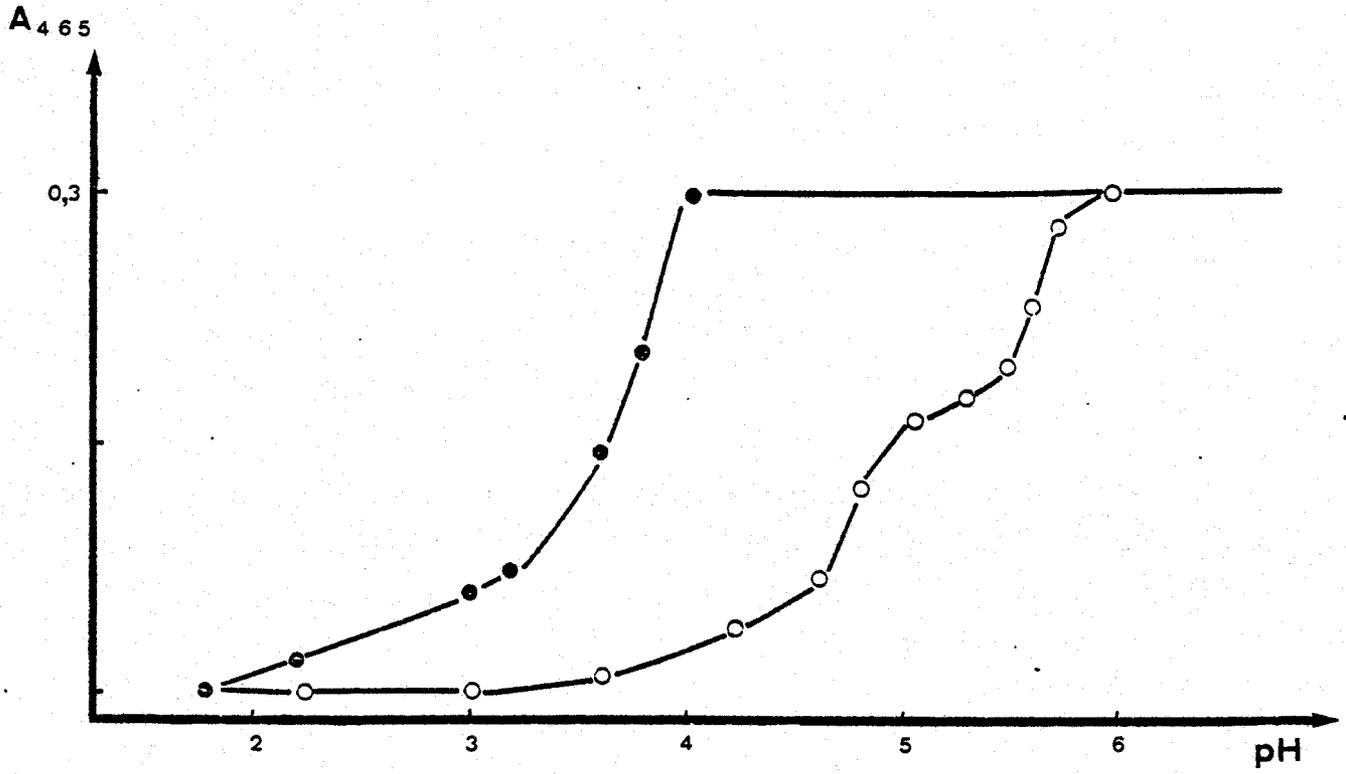


Figure 39

Analyse comparée de la désaturation de la lactotransferrine (● ●) et de la sérotransferrine (○ ○) humaines en fonction du pH pour une force ionique $I = 0,1$



à pH 3,9 (figure 40 p 145).

3 - Influence des ions phosphates. L'addition des ions phosphates fragilise le complexe métallique (figure 41 p 146). Ainsi pour une force ionique de 0,1 en acétate de sodium et de 0,02 en phosphate, la 1/2 dissociation est reculée à pH 3,5, pH qui correspond à la 1/2 dissociation dans un tampon de force ionique $I = 0,2$ en absence de phosphate.

L'augmentation de la concentration en phosphate de 0,02 à 0,2 M permet une désaturation biphasique avec 50 p 100 de désaturation entre pH 8 et 6 et la désaturation totale entre pH 4,8 et 4.

4 - Influence de l'E.D.T.A. L'addition d'E.D.T.A. à la concentration de 0,04 M à un tampon de $I = 0,1$ permet comme le montre la figure 42 (p 147) d'obtenir une courbe de dissociation sigmoïde, avec le départ du premier métal entre pH 5 et 4 et du second à pH 3,6.

L'action d'un tampon acétate formiate de sodium $I = 0,2$ contenant 0,2 M de phosphate et 4 mM d'E.D.T.A. permet la meilleure différenciation des deux sites. En effet, un tel tampon permet une élimination du premier ion entre pH 6 et 8, alors qu'entre pH 5 et 6, nous observons un palier et que le deuxième site part entre pH 4 et 5.

2 - MARQUAGE SELECTIF DU SITE ACIDE ET DU SITE LABILE

a - Matériel et méthodes

1 - Marquage au ^{59}Fe . Nous avons étudié la dissociation en milieu acide de deux lots de lactotransferrine saturée en fer de la manière suivante :

Lactotransferrine A : 85 mg de lactotransferrine saturée en fer sont dissous dans 4 ml de solution désaturante acétate de sodium $I = 0,2$, NaHPO_4 0,2 M E.D.T.A. 40 mM pH 5,2. Après 16 h d'incubation, à température ambiante, la solution de protéine ainsi désaturée à 50 p 100 est dessalée sur une colonne de Séphadex G₂₅ PD₁₀ (1 x 5 cm) équilibrée dans un tampon citrate-bicarbonate de sodium 0,1M pH 8,6. La protéine est alors resaturée à 100 p 100 par

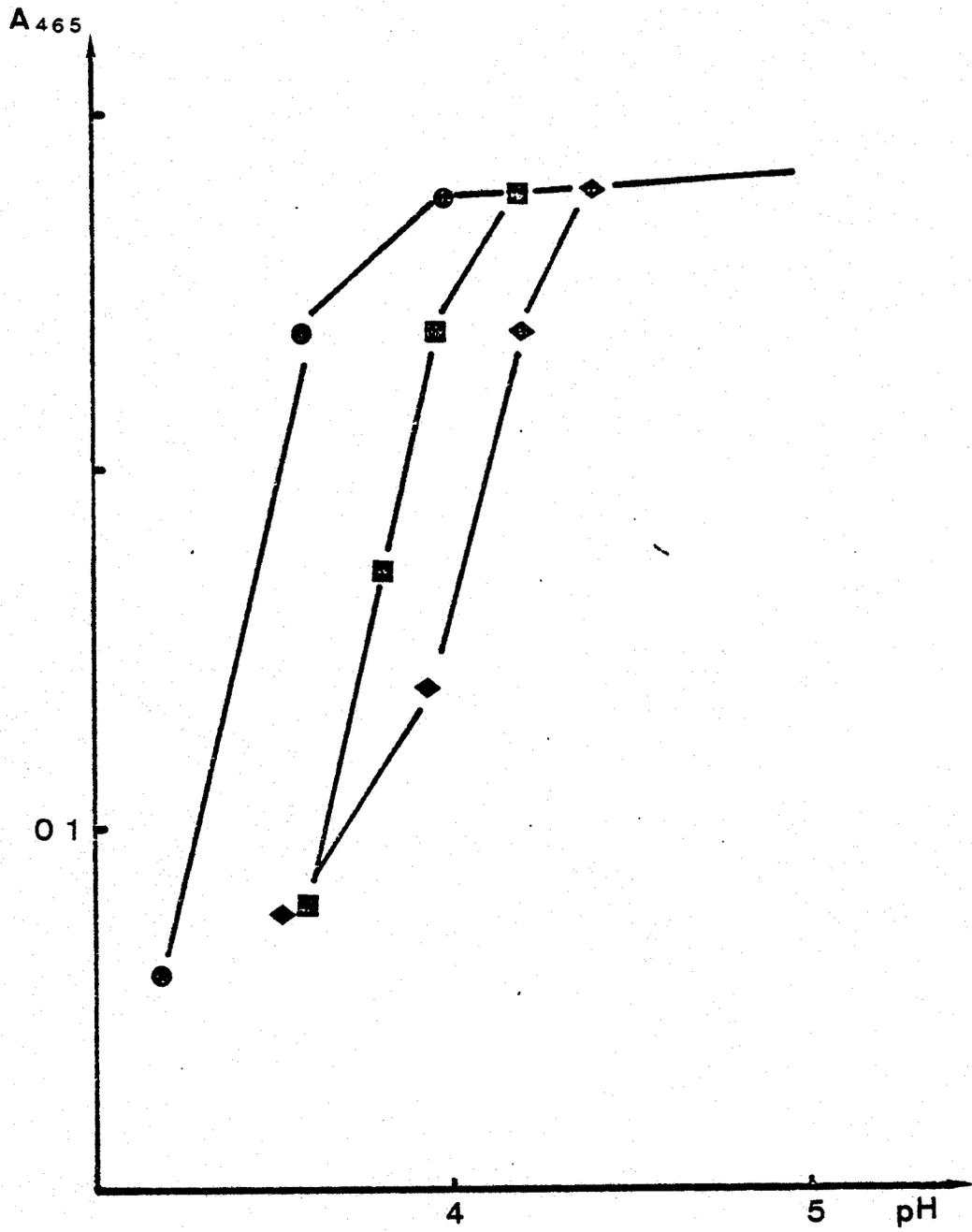


Figure 40

Influence de la force ionique sur la stabilité
du complexe métallique de la lactotransferrine

- I = 0,1
- ■ I = 0,2
- ◊ I = 0,4



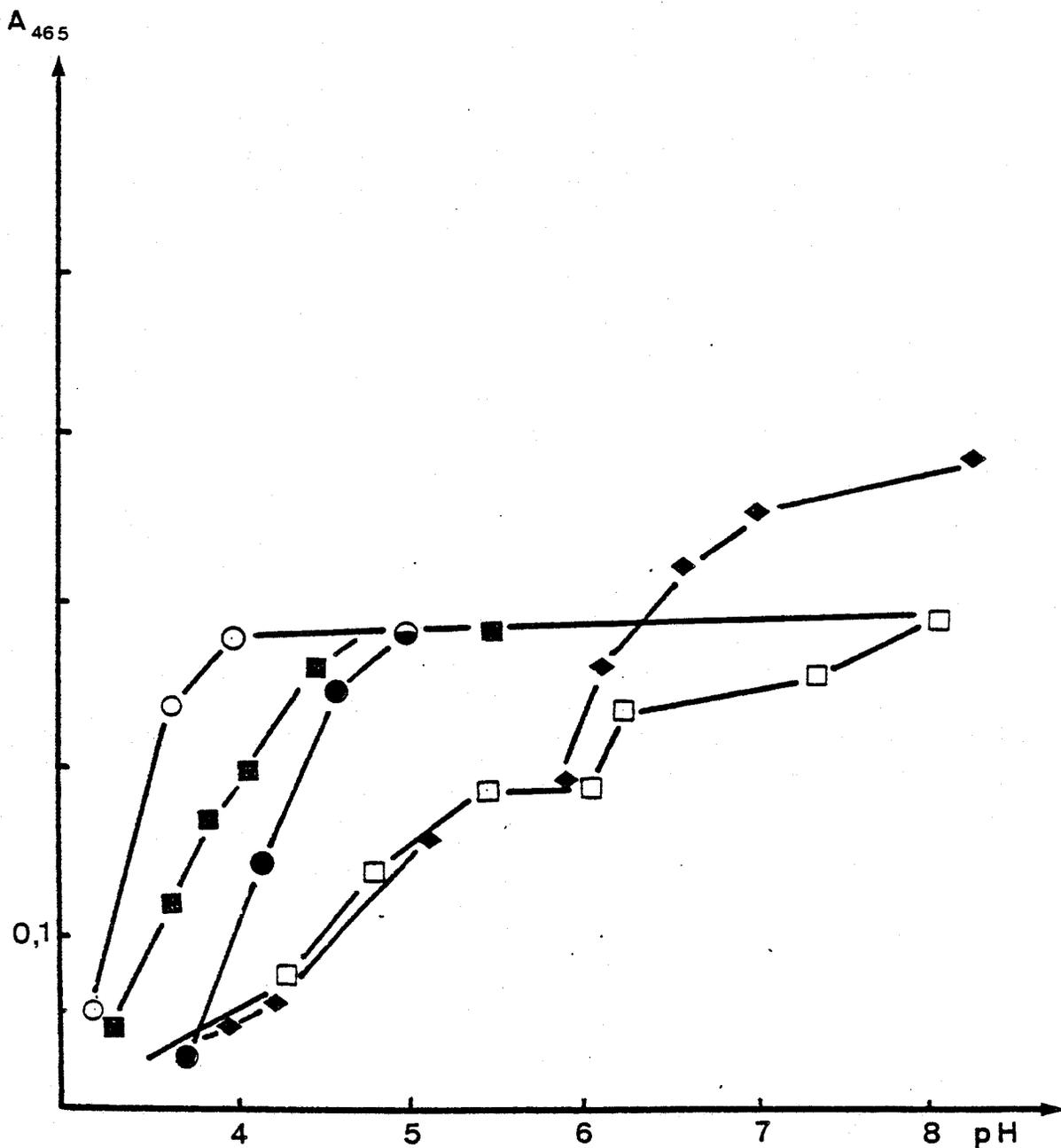


Figure 41

Action des ions phosphates sur la stabilité du complexe métallique de la lactotransferrine saturée à 78 p 100

○-○ $I = 0,1$

■-■ $I = 0,2$

●-● $I = 0,1 + 0,02 M PO_4^{---}$

□-□ $I = 0,2 + 0,2 M PO_4^{---}$

◆-◆ $I = 0,2 + 0,2 M PO_4^{---}$ LTF saturée à 100 p 100



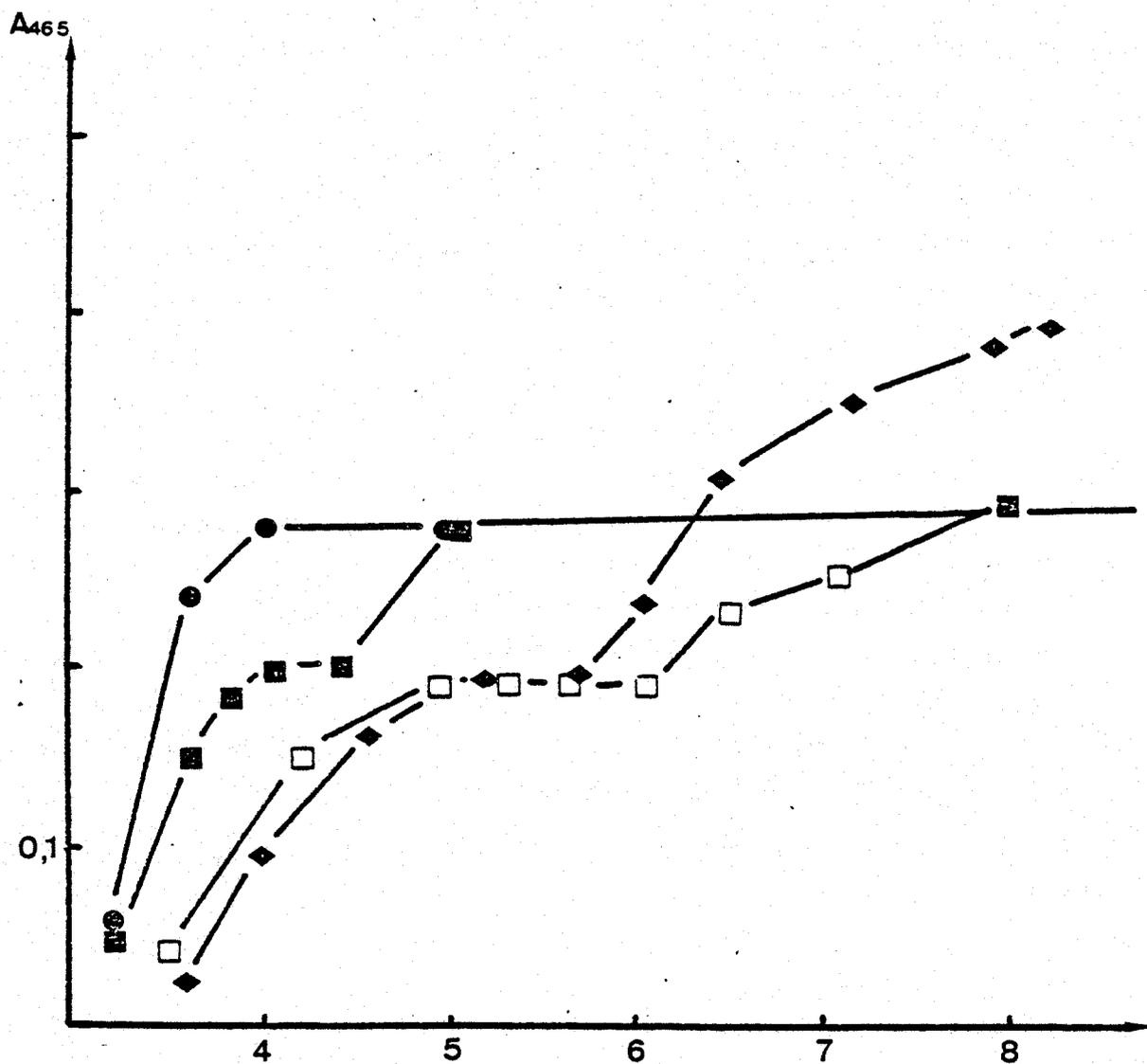


Figure 42

Action de l'E.D.T.A. et des ions phosphates sur la stabilité du complexe métallique de la lactotransferrine saturée à 78 p 100

●-● $I = 0,1$

■-■ $I = 0,1 + \text{E.D.T.A. } 4 \text{ mM}$

□-□ $I = 0,2 + \text{E.D.T.A. } 4 \text{ mM} + \text{PO}_4^{---} 0,2 \text{ M}$

◆-◆ $I = 0,2 + \text{E.D.T.A. } 4 \text{ mM} + \text{PO}_4^{---} 0,2 \text{ M}$ LTF saturée à 100 p 100



addition du réactif FeCl_3 - citrate bicarbonate 0,1 M pH 8,6 (40 μg $\text{Fe}/100 \mu\text{l}$) contenant 2 p 100 de ^{59}Fe ($\text{FeCl}_3 / \text{HCl}$ 0,1 N 51 mCi/ μg CEA France). L'excès de réactif est éliminé sur colonne de Séphadex $\text{G}_{25}\text{-PD}_{10}$ équilibré dans NaCl 0,2 M.

Lactotransferrine B : nous avons utilisé le même protocole que pour la lactotransferrine A mais dans ce cas, nous sommes partis d'une solution de lactotransferrine marquée au ^{59}Fe et nous avons resaturé la protéine après action du tampon pH 5,2 par du ^{57}Fe non radioactif.

2 - Désaturation. Nous avons étudié la désaturation des deux lots de lactotransferrine dans le système tampon acétate de sodium I = 0,2, NaHPO_4 0,2 M, E.D.T.A. 40 mM, dans la gamme de pH de pH 3 à pH 8-0,3 ml des solutions A et B sont additionnés à 1 ml de tampon de désaturation. Après 16 h d'incubation, 1 ml de chaque solution est désalé sur 2 ml de résine Dowex 2x8 (200-400 "mesh") présentée dans des cones de pipettes automatiques et stabilisée dans le même tampon que la solution de protéine. La colonne est rincée par 2 x 0,5 ml de tampon .

Nous avons déterminé la radioactivité gamma de chaque éluat de colonne, de la colonne lavée, et d'une aliquote de 100 μl de solution non déssalée. Simultanément, le pH et la DO de chaque solution ont été mesurés. Nous avons exprimé le pourcentage de radioactivité fixé par la protéine.

b - Résultats.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 43 (p 149). Les deux lots A et B de la lactotransferrine donnent en DO à 465 nm le même profil de désaturation. Cependant, le lot A de lactotransferrine voit toute sa radioactivité éliminée entre pH 8 et pH 6,2 dans la première phase de désaturation alors que le lot B perd, lui, au contraire, sa radioactivité en dessous de pH 5. Ce résultat démontre que les courbes biphasiques de désaturation de la lactotransferrine obtenues précédemment sont bien le reflet d'une élimination séquentielle du métal.

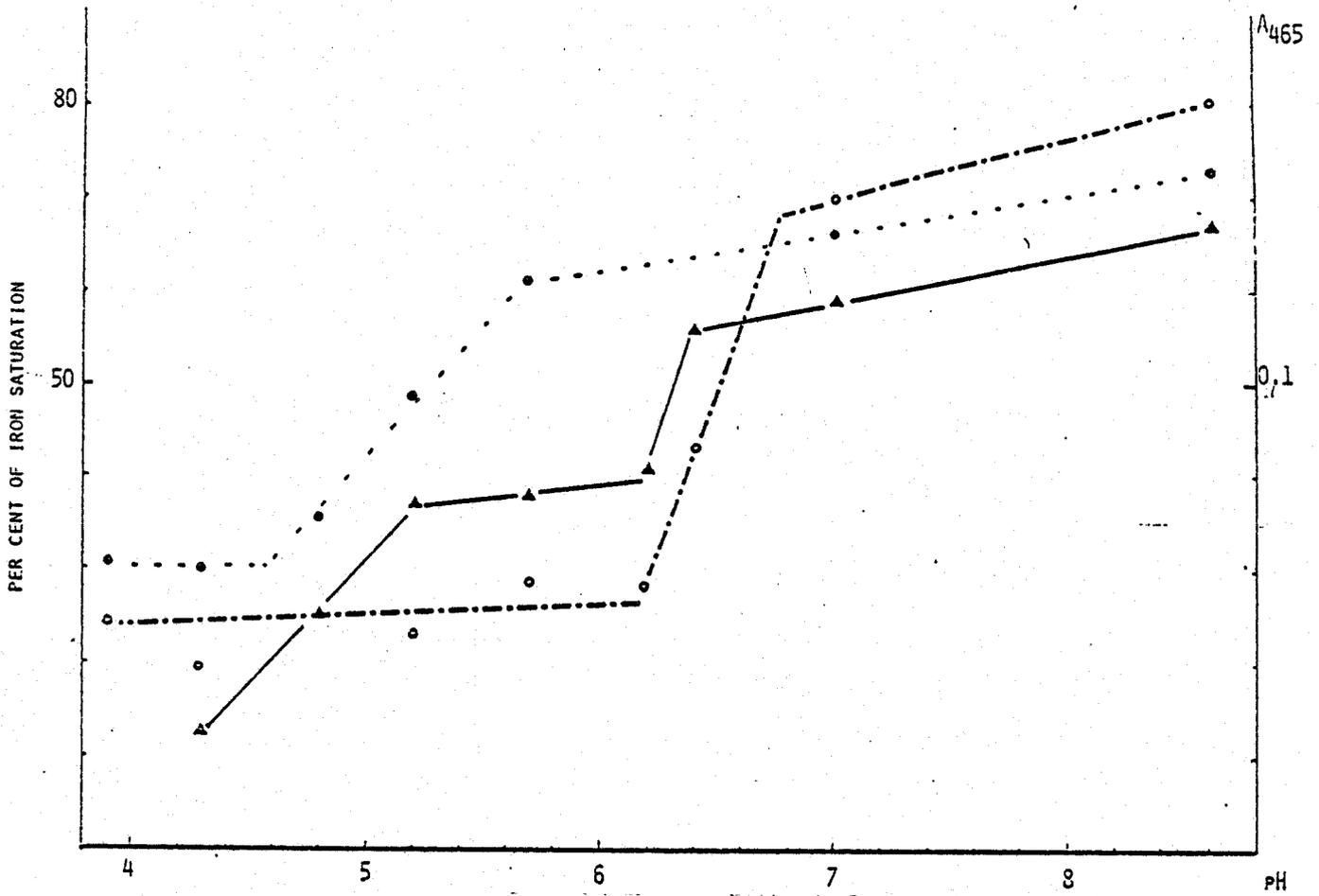


Figure 43

Analyse de la dénaturation de la lactotransferrine marquée au ^{59}Fe
soit sur le site labile (OO) soit sur le site stable (●●)



3 - CONCLUSIONS

En présence d'un agent chélateur des ions ferriques (phosphate ou E.D.T.A.), il est possible d'éliminer le Fe^{3+} de la lactotransferrine à pH 4, ce qui permet d'obtenir une apolactotransferrine non dénaturée qui a conservé intacte sa capacité de fixation du métal.

L'élimination séquentielle des deux ions Fe^{3+} démontre que les deux sites manifestent une susceptibilité différente vis-à-vis de l'action des protons. Nous avons ainsi défini un site "acido-stable" dont l'ion Fe^{3+} ne peut être éliminé qu'à pH 4 et un site "acido-labile" dont l'ion Fe^{3+} ne peut être éliminé qu'à pH 6,2.

B - FIXATION SEQUENTIELLE DU METAL SUR LA LACTOTRANSFERRINE

1 - MATERIEL ET METHODES

a - Saturation. La fixation spécifique du métal a été réalisée dans un tampon citrate de sodium 0,1 M, bicarbonate de sodium 0,04 M dans une gamme couvrant le pH de 5 à 9.

Une solution mère à 10 p 100 de transferrine dans NaCl 0,2 M est réalisée. Des aliquotes de 0,3 ml de cette solution sont dissoutes dans 3 ml de solution de saturation à différents pH;

La saturation en métal est réalisée par addition de 600 μ l de réactif $FeCl_3$ - citrate (40 μ g Fe/100 μ l). Après 16 h d'incubation, le pH et la densité optique à 465 nm de chaque solution sont mesurés. Nous avons aussi dosé le fer fixé par la protéine après déssalage.

b - Localisation du site. La protéine est saturée dans ce cas en introduisant 2 p 100 de ^{59}Fe ($^{59}FeCl_3$ /HCl 0,1 N, 51 mCi/mg, CEA France). Après incubation, la solution est déssalée sur une colonne de Séphadex G₂₅PD₁₀ (1 x 5 cm) stabilisée dans chlorure de sodium 0,2 M. A ce niveau, la désaturation est conduite comme nous l'avons décrite dans le chapitre précédent (p 148).

2 - RESULTATS

a - Saturation. Nous avons reproduit dans la figure 44 (p 151) les résultats obtenus sur la sérotransferrine et la lacto-

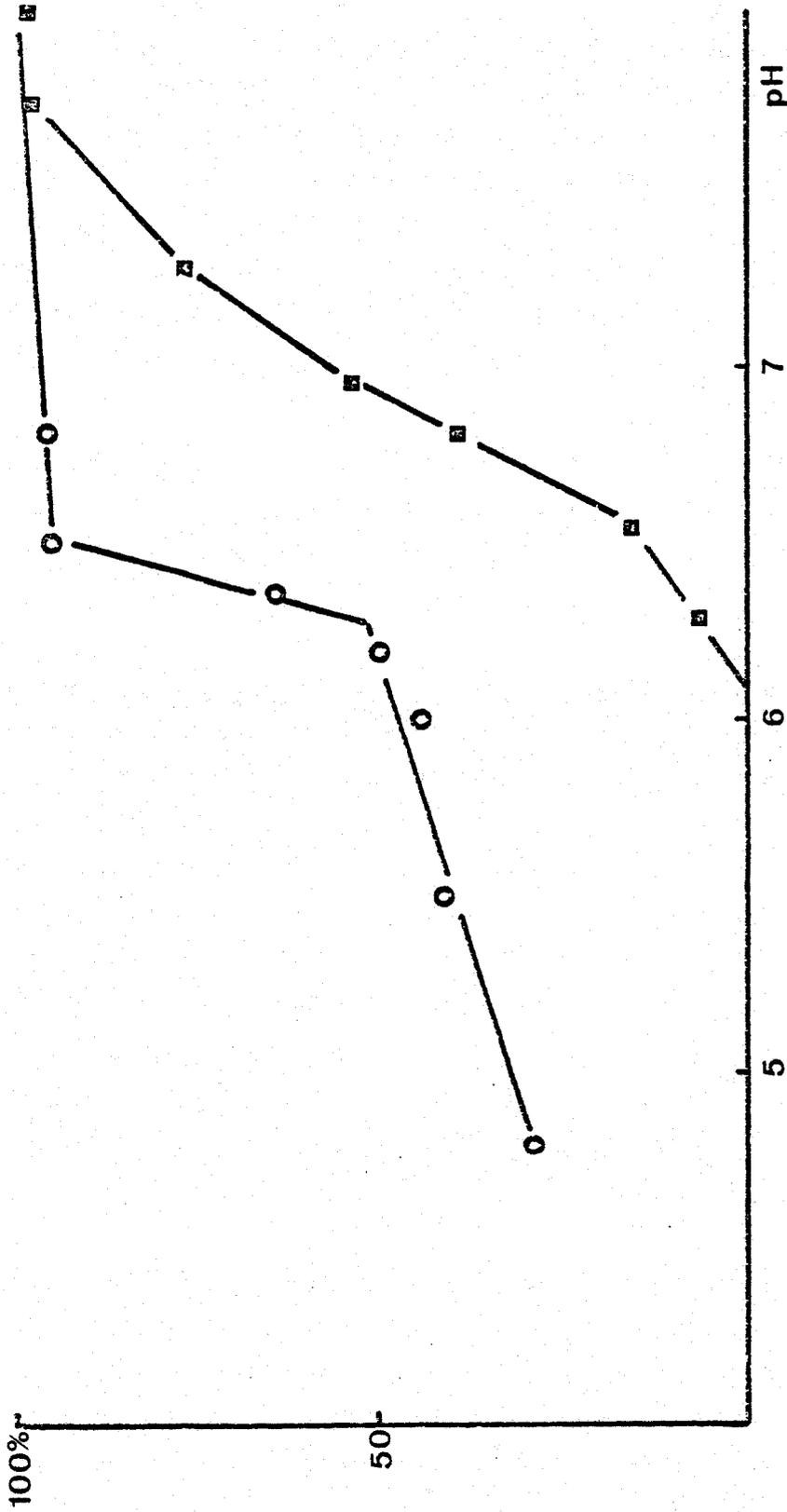


Figure 44

Analyse de la saturation par Fe^{3+} de l'aposérottransferrine (■) et de l'apolactotransferrine (○) humaines en fonction du pH



transferrine. La saturation de la sérotransferrine ne commence, dans ces conditions expérimentales, qu'à partir de pH 6,2 et n'est complète qu'à partir de pH 7,8.

Le comportement de la lactotransferrine est complètement différent, puisqu'à pH 4,8 20 p 100 de saturation sont déjà atteints. De plus nous distinguons deux étapes, dans une première phase qui se termine à pH 6,2, le taux de saturation ne dépasse pas 50 p 100, puis dans une deuxième étape à partir de pH 6,4, la saturation atteint 100 p 100 presque sans transition. Le pourcentage de saturation obtenu par méthode optique est confirmé, comme le montre le tableau XX (p 153), par le dosage du fer.

Afin de vérifier qu'en dessous de pH 6,2, la lactotransferrine fixe le fer sur un seul site et non d'une manière statistique sur les deux, nous avons analysé le comportement d'une lactotransferrine saturée à pH 6,2, dans les systèmes de désaturation que nous avons décrits page 144.

b - Localisation du Fe^{3+} fixé par la lactotransferrine à pH acide. Nous avons comparé les courbes de dissociation en fonction du pH, d'une lactotransferrine saturée en Fe^{3+} (marquée au ^{59}Fe) à pH 6,2 et à pH 8,6. Les résultats représentés dans la figure 45 (p 154) montrent que la lactotransferrine saturée à 50 p 100 à pH 8,6 a une radioactivité répartie également sur le site "acido-stable" et sur le site "acido-labile". Dans le cas d'une saturation à pH 6,2, 80 p 100 du métal fixé sont localisés sur le site "acide labile".

La comparaison des courbes de dissociation des ions ferriques des deux préparations de lactotransferrine montre que l'élimination du Fe^{3+} du site labile est beaucoup plus facile à partir de la protéine saturée à pH 8,6.

c - Applications. Nous avons étudié la désaturation en milieu acide d'une lactotransferrine isolée du lait sans modification de la teneur en fer de celui-ci. Le taux de saturation d'une telle lactotransferrine varie, selon les échantillons, de 15 à 30 p 100. Ce taux trop faible pour suivre la densité optique à 465 nm nous a amené à suivre la désaturation par lecture de la densité optique à 320 nm et à 280 nm.

TABLEAU XX

CAPACITE DE FIXATION DES IONS Fe^{3+} PAR LES
PAR LES TRANSFERRINES, EN FONCTION DU pH

pH	Lactotransferrine		Sérotansferrine	
	% DO 465 nm	% Fer fixé	% DO 465 nm	% Fer fixé
8,6	100	110	100	100
6,2	50	49	12	10
5,8	41	37	0	0



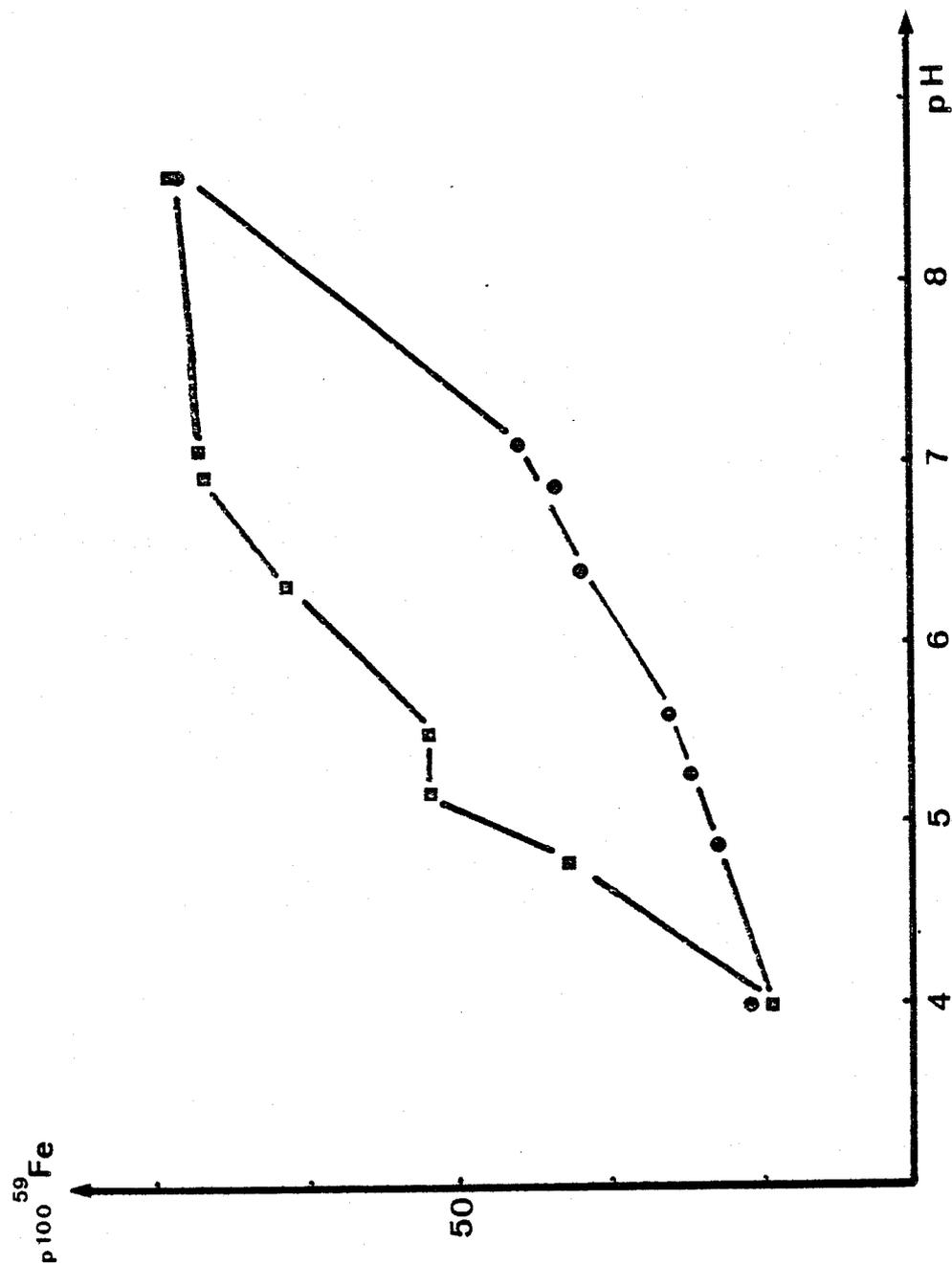


Figure 45

Dissociation en milieu acide du Fe de la LTF saturée à 50 p 100 soit à pH 8,6 (■ ■) soit à pH 6,2 (● ●)



Les résultats de la désaturation, réalisée dans le système acétate-formiate de sodium I = 0,2 contenant 0,2 M de phosphate et 4 mM d'E.D.T.A., montrent que 80 p 100 du métal sont éliminés entre pH 8 et 6,2.

Ces résultats suggèrent que, "in vivo", la lactotransferrine, comme la sérotransferrine, fixe le fer sur le site "acido-labile".

3 - CONCLUSIONS

L'apolactotransferrine peut fixer le fer à pH acide, jusqu'à pH 4,6, dans les conditions expérimentales où le complexe sérotransferrine $(Fe^{3+})_2$ est dissocié.

La fixation du métal n'est possible jusqu'à un pH voisin de 6,35 que sur le seul site "acido-labile". L'analyse de la lactotransferrine native, c'est-à-dire sans modification du taux de fixation de Fe^{3+} de la protéine, est en faveur de la seule saturation du site "acido-labile".

IV - CONCLUSIONS

Nous avons démontré que, bien qu'il soit possible de différencier pour la sérotransferrine humaine et pour la lactotransferrine humaine un site métallique "externe" et un site "interne", un site "acido-labile" et un site "acido-stable", les sites métalliques de ces deux protéines possèdent un comportement nettement différent.

En particulier, le site "acido-labile" de la lactotransferrine, qui est le seul occupé "in vivo", coordine l'ion ferrique par l'intermédiaire d'un seul résidu d'histidine. Dans le cas de la sérotransferrine, la coordination implique au moins deux résidus d'histidine.

Cette différence dans le nombre de résidus d'histidine coordonnés peut expliquer la capacité de l'apolactotransferrine à fixer un ion métallique à pH acide sur le site "acido-labile".

CHAPITRE IV

RECHERCHE SUR LA STRUCTURE PRIMAIRE DE LA CHAÎNE PEPTIDIQUE DE LA LACTOTRANSFERRINE

Nous avons subdivisé ce chapitre en deux parties. La première est relative à des travaux qui nous sont personnels et qui concernent la préparation de fragments peptidiques, obtenus par coupures enzymatiques ou chimiques, ainsi que l'étude de leur comportement vis-à-vis du fer.

La seconde porte sur la détermination de la séquence des acides aminés des fragments peptidiques précédents, résultats qui seront rassemblés dans le mémoire de thèse de Doctorat d'Etat de Madame METZ-BOUTIGUE. C'est pourquoi, ce travail ayant essentiellement été réalisé dans le groupe du Professeur P. JOLLES, nous le présentons sous la forme des mémoires qui sont parus en co-publication.

1ère Partie

I - INTRODUCTION

La lactotransferrine est une glycoprotéine monocaténaire possédant plus de 630 acides aminés, il est donc difficile d'envisager la détermination directe de sa structure covalente. Le faible nombre de résidus de méthionine, 6 en l'occurrence, nous a amené à entreprendre la coupure sélective des liaisons méthionyles par le bromure de cyanogène et à isoler les fragments ainsi libérés. Cependant, il apparaît vite que ce seul procédé de coupure est insuffisant,

ne serait-ce que pour tenter de réenchaîner les différents fragments BrCN. Nous avons donc essayé d'obtenir des fragments peptidiques longs au moyen de coupures enzymatiques ménagées, en jouant sur les différences de résistance de l'apolactotransferrine et de la forme saturée en métal.

La pureté des fragments peptidiques que nous avons obtenus a été contrôlée avant leur analyse par Séquenceur par :

- chromatographie de tamisage moléculaire
- électrophorèse en gel de polyacrylamide
- électrophorèse en acétate de cellulose
- immunoélectrophorèse
- électrophorèse à haut voltage
- analyse des extrémités N- et C-terminales

Les fragments ne répondent pas tous à l'ensemble de ces critères de pureté, le seul critère décisif restant la possibilité de déterminer la séquence peptidique covalente du fragment et la libération, au cours de l'analyse par Séquenceur, d'un PTH - amino acide unique à chacune des premières étapes de la dégradation d'Edman.

II - COUPURES ENZYMATIQUES MENAGEES

A - INTRODUCTION

Il est bien connu depuis les travaux de SPIK et MONTREUIL (644) et de SPIK (645) que la lactotransferrine saturée en fer est particulièrement résistante à l'hydrolyse enzymatique. En 1976, LINE et al. (646), à la suite des travaux de WILLIAMS (647,648) sur l'ovotransferrine, ont isolé à partir de la lactotransferrine saturée en fer un fragment peptidique fixant un seul ion ferrique. Ce résultat a été confirmé par DECONNINCK et al. (649) qui ont identifié ce fragment à la moitié C-terminale de la lactotransferrine.

Jusqu'à présent, toutes les tentatives pour préparer la moitié N-terminale de la lactotransferrine n'ont pas été couronnées de succès. Seuls, DECONNINCK et al. (650) ont obtenu, avec un rendement de 1 p 100, un fragment ne possédant aucun déterminant antigé-

nique commun avec le fragment C-terminal.

La possibilité d'obtenir indifféremment la fixation d'un ion Fe^{3+} sur le site "acido-stable" ou le site "acido-labile" (p 141) nous a amené à étudier l'action de diverses enzymes en vue d'obtenir des fragments peptidiques correspondant aux extrémités N- ou C-terminales de la lactotransferrine.

B - ISOLEMENT DES FRAGMENTS N- ET C-TERMINAUX

1 - MATERIEL ET METHODES

a - Hydrolyse de la lactotransferrine saturée. Nous avons repris le protocole mis au point par LINE et al. (651) : 180 mg de lactotransferrine saturée, dissous dans 3,6 ml de tampon Glycocolle/HCl 0,1 M pH 3 sont incubés à 37°C pendant 3 h avec 18 mg de pepsine* mise en suspension dans 0,4 ml du même tampon. La réaction est arrêtée en ajustant le pH à 7,8.

b - Hydrolyse de la lactotransferrine fixant un seul ion Fe^{3+} sur le site "acido-labile"

1 - Préparation du substrat. 180 mg d'apolactotransferrine, dissous dans 4,5 ml de tampon citrate de sodium 0,1 M, bicarbonate de sodium 0,04 M pH 6,0 sont saturés pendant 4 h à température ambiante par 0,600 ml de la solution d'AZARI et BAUGH (652).

2 - Hydrolyses enzymatiques

. Hydrolyse trypsique et chymotrypsique. La solution de lactotransferrine est déssalée par chromatographie sur une colonne de Séphadex G₂₅ (5 x 1 cm) stabilisée dans un tampon bicarbonate de sodium 0,1 M. De l'urée est alors ajoutée suivant la technique de DECONNINCK et al. (653) pour obtenir 7,5 ml de solution 4 M en urée. Une quantité de 6 ml d'enzyme* activé par 300 μ l de $(CH_3-COO^-)_2Ca$ 0,1 M est dissoute dans 7,5 ml de bicarbonate de sodium 0,1 M puis est mise à incuber à 37°C. La solution de protéine dénaturée est alors ajoutée goutte à goutte à la solution enzymatique. La réaction est arrêtée au bout de 4 h par abaissement du pH à 6,2.

* Pepsin Krist. MERCK. 100 mU/mg

* Trypsine: SIGMA ; (2 x cristallized ; 11,0 BAEE/mg) α -chymotrypsine: MILES LABORATORIES

. Hydrolyse par la clostripaine*. Dans ce cas le déssalage de la solution de lactotransferrine est réalisé sur 4 ml de résine échangeuse d'ions Dowex 2x8 (200-400 "mesh") Cl⁻ stabilisée dans le tampon citrate-bicarbonate pH 6,2. Comme précédemment de l'urée est additionnée pour obtenir 7,5 ml d'une solution 4 M. La clostripaine (1,8 mg) activée par 10 mM de dithiothréitol est dissoute dans le tampon pour obtenir un volume de 7,5 ml. L'hydrolyse conduite comme précédemment est arrêtée par addition de Na OH 2N. jusqu'à obtention d'un pH de 8,6.

. Hydrolyse par la papaine. Pour cette enzyme à spécificité très large, la lactotransferrine après déssalage sur 4 ml de résine Dowex 12x8 (200-400 "mesh") Cl⁻ stabilisée dans le tampon citrate-bicarbonate de sodium pH 6,2 est directement soumise à l'action de 18 mg de papaine* préalablement activée par 10 mg de KCN pendant 1 h à 37°C. La réaction est arrêtée après 3 h par remontée du pH à pH 8,6.

c - Electrochromatographie. Chaque hydrolysats a été analysé par électrophorèse à pH 2,4 sur papier Whatman 3 MM (CH₃COOH 1 M) 7,5 V/cm pendant 16 h suivie d'une chromatographie dans le système de PARTRIDGE (654).

d - Purification des fragments. Les hydrolysats sont fractionnés par tamisage moléculaire sur colonne de Séphadex G75 (100-200 "mesh") (3 x 80 cm) stabilisée dans une solution de bicarbonate d'ammonium 0,1 M. Le débit est de 24 ml / h, les fractions sont de 8 ml.

2 - RESULTATS

a - Electrochromatographie. Les électrochromatographies des hydrolysats pepsiques montrent la libération d'une quarantaine de peptides et la présence d'une fraction non hydrolysée qui ne migre pas en chromatographie. Les autres hydrolysats donnent une carte similaire avec cependant la libération d'un plus petit nombre de peptides.

* Clostripaine: Don du Prof. KEIL que nous remercions vivement.

* Papain 2 x crystallized. 35 V / mg: SIGMA

b - Fractionnement. Nous avons reproduit dans la figure 47 (p 161) le diagramme d'élution de la lactotransferrine et de ses différents hydrolysats. Nous avons différencié 6 fractions dénommées (A-F). Les quatre fractions A-D présentent une absorbance à 465 nm, caractéristique de la fixation spécifique des ions ferriques. Les cinq fractions A-E ont une réaction positive au phénol sulfurique, ce qui montre qu'elles sont de nature glycopeptidique.

La fraction A est toujours présente dans l'hydrolysats pepsique, elle est éluée au volume mort de la colonne. Sa concentration augmente lorsque le pH d'hydrolyse est de pH = 3,6. Il s'agit vraisemblablement d'un dimère de la lactotransferrine.

La fraction B a été identifiée à la lactotransferrine non hydrolysée. Ces deux fractions sont obtenues avec un rendement pondéral de 5 p 100.

La fraction C est absente de l'hydrolysats pepsique mais nous l'avons obtenue avec un rendement de 30 p 100 à partir des hydrolysats papaïque et clostripaïque.

La fraction D est presque négligeable dans les hydrolysats papaïque et clostripaïque. Elle représente 10 p 100 des hydrolysats tryptique et chymotryptique et 30 p 100 de l'hydrolysats pepsique.

La fraction E de nature glycopeptidique et la fraction F contiennent, comme le montrent les électrochromatographies, des peptides de faible masse moléculaire.

c - Analyse électrophorétique et immunoélectrophorétique des différentes fractions. Nous avons analysé comme le montre la figure 48 A (p 162), le comportement en électrophorèse sur acétate de cellulose des différents fragments fixant le métal. Nous avons ainsi défini deux classes de composés : la classe à caractère acide représentée par les fragments isolés des fractions C et que nous avons appelée C-pe (pepsine), C-tr (trypsine), C-ch (chymotrypsine), C-cl (clostripaïne), et une classe de fragments qui ne migrent pas à pH 8,6 et qui ont un caractère basique. Ces fragments proviennent des fractions B précédemment définies et nous les avons appelés N-pe, N-tr, N-ch, N-cl et N-pa.

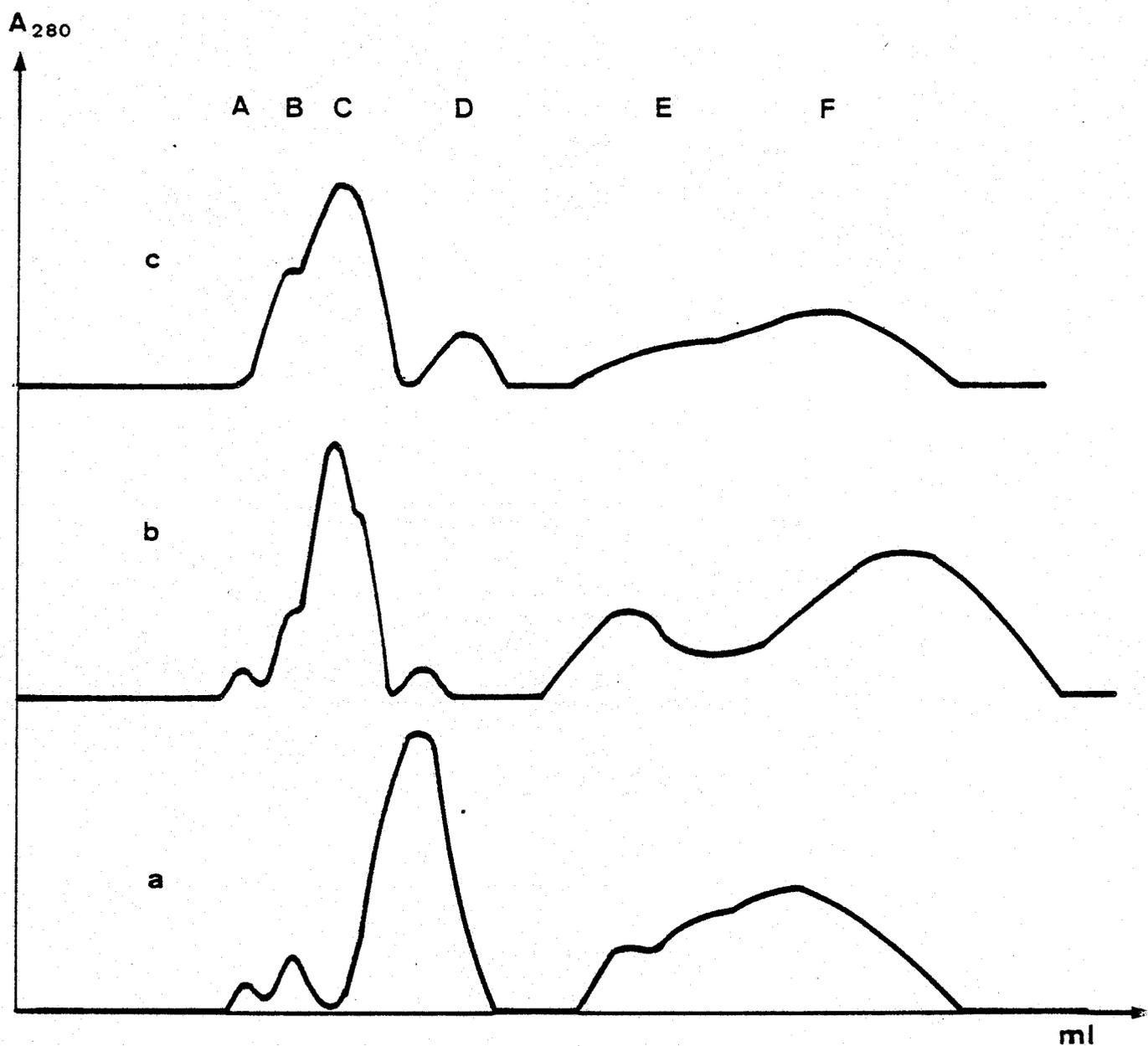


Figure 47

Chromatographie de tamisage moléculaire sur colonne de Séphadex G-75 (3 x 80 cm)

- a L'hydrolysate pepsique
- b L'hydrolysate papaïque
- c L'hydrolysate clostripaïque

Elution par le bicarbonate d'ammonium 0,1 M ; débit de 24 ml/h, fractions de 8 ml



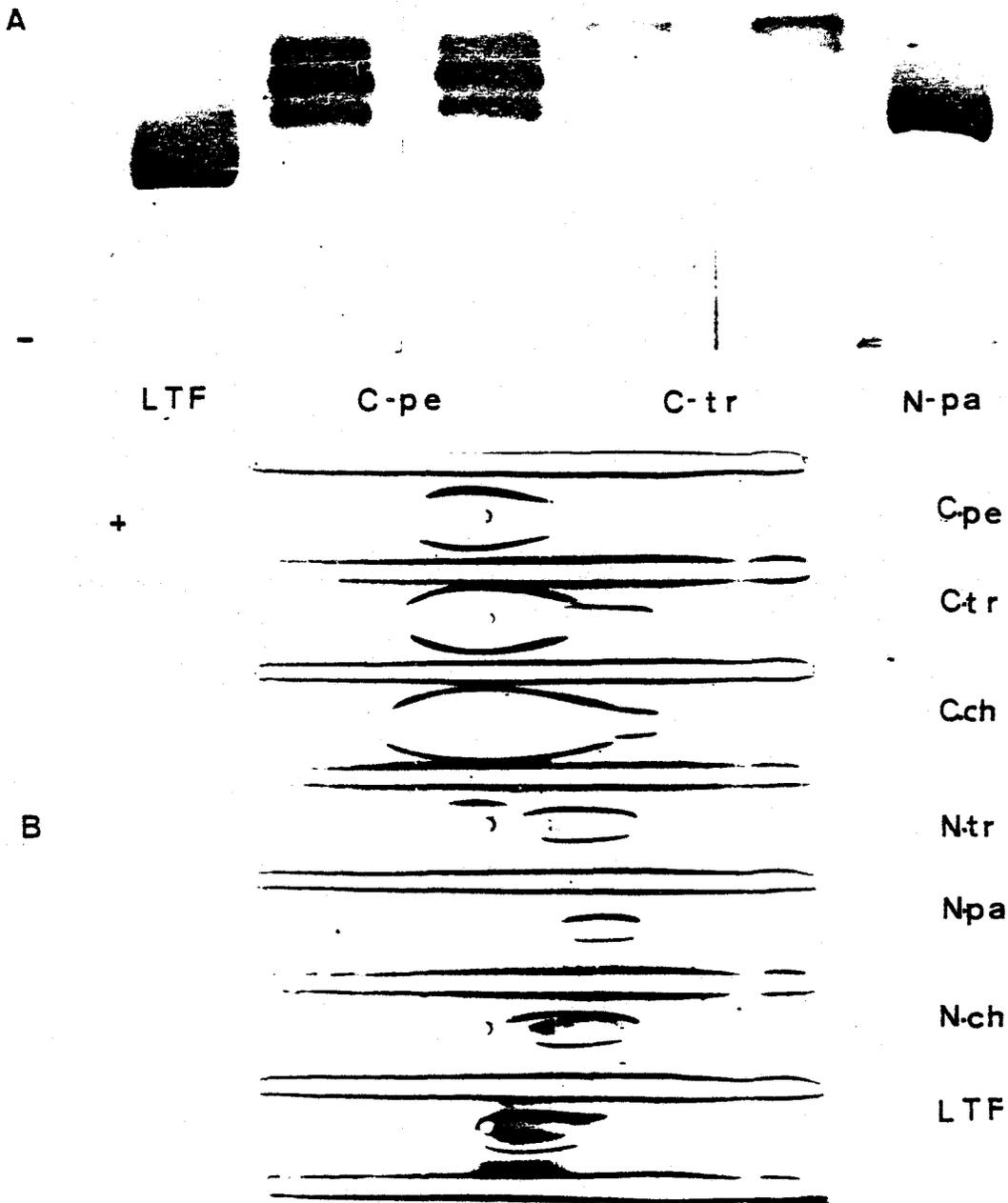


Figure 48

Electrophorèse sur acétate de cellulose (A) et Immunoélectrophorèse (B) contre un antiserum anti-lactotransferrine des différents fragments fixant le fer isolés par coupures enzymatiques ménagées de la lactotransferrine



Cette classification est confirmée, comme le montre la figure 48 B (p 162), par l'analyse en immunoélectrophorèse sur gel d'agarose contre un antisérum anti-lactotransferrine.

d - Réaction d'immunodiffusion radiale. En présence d'un antisérum anti-lactotransferrine tous les fragments présentent une réaction d'identité partielle avec la lactotransferrine humaine. Les fragments isolés de la fraction B ont une réaction d'identité totale entre eux. Les fragments C-ch et C-tr donnent, comme le montre la figure 49 (p 164), une réaction d'identité partielle ce qui suggère que le fragment C-ch a perdu un déterminant antigénique de plus que le fragment C-tr. Enfin les fragments de type C donnent une réaction d'identité partielle avec ceux de type N.

3 - CONCLUSIONS

Les coupures enzymatiques de la lactotransferrine fixant un ion Fe^{3+} , soit sur le site "acido-labile", soit sur le site "acido-stable", permettent d'obtenir de gros fragments peptidiques encore capables de fixer le métal. La présence dans les hydrolysats d'un grand nombre de petits peptides démontre que la libération des fragments fixant encore le fer est consécutive à l'hydrolyse de la partie peptidique non protégée par le métal. Cependant, l'hydrolyse n'est possible que lorsque la chaîne peptidique subit une légère dénaturation, soit par addition d'urée, soit par abaissement du pH. Les fragments qui fixent le métal sur le site "acido-labile" : N-pa, N-cl ainsi que N-tr et N-ch ont un caractère basique et doivent posséder une masse moléculaire plus élevée que le fragment C-pe qui fixe le métal sur le site "acido-stable". L'hydrolyse par la trypsine et par la chymotrypsine libère simultanément un fragment de type N et un autre de type C.

Nous n'avons pas, contrairement à DECONNINCK et al. (655), jugé bon de purifier de fragment qui ne possède pas de déterminants antigéniques communs avec le fragment C-pe. En effet, les fragments obtenus par ces auteurs ne représentent que 1 p 100 de la lactotransferrine traitée au départ et sont constitués d'unités peptidiques reliées entre elles par des ponts disulfures.

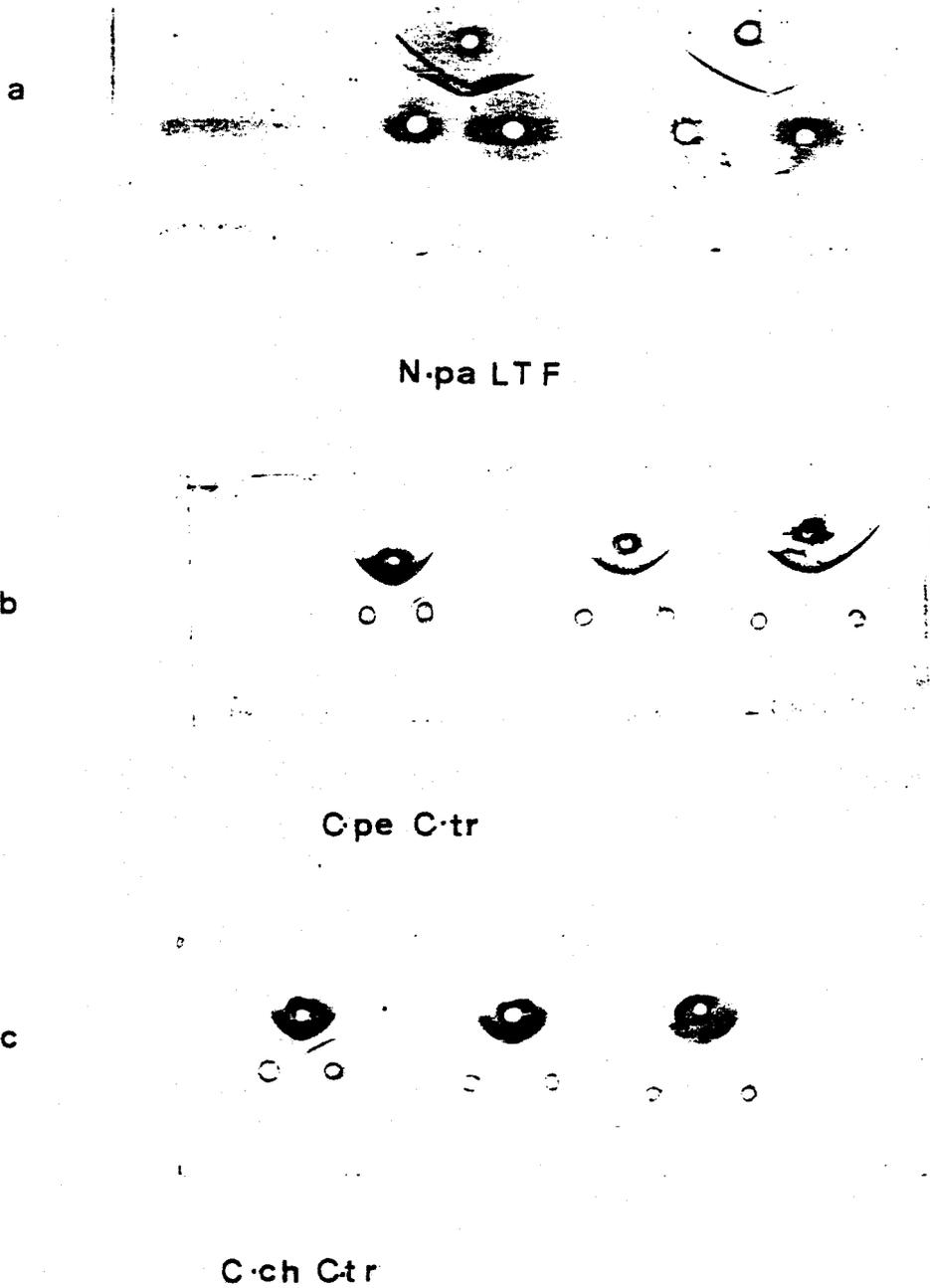


Figure 49

Immunodiffusion en présence d'un antisérum anti-lactotransferrine de

- a : La lactotransferrine et le fragment N-pa
- b : Les fragments C-pe et C-tr
- c : Les fragments C-tr et C-ch



C - PRINCIPALES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES FRAGMENTS OBTENUS

1 - MATERIEL ET METHODES

Les modes opératoires utilisés pour étudier la masse moléculaire, la nature des extrémités N- et C-terminales, la composition en acides aminés, la fixation du métal sont décrits dans l'appendice technique.

2 - RESULTATS

a - Masse moléculaire. Nous avons mesuré la masse moléculaire de chaque fragment par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, par chromatographie de tamisage moléculaire et en ultracentrifugation analytique à l'équilibre de sédimentation. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XXI (p 166). Les fragments de type N et le fragment C-pe possèdent une masse comprise entre 50 000 et 60 000. Les fragments C-tr et C-ch ont une masse moléculaire plus faible voisine de 30 000.

b - Nature des extrémités N- et C-terminales. Nous avons rassemblé dans le tableau XXI (p 166) la nature des extrémités N- et C-terminales de ces fragments. Seuls les fragments C-pe et N-pa ne révèlent qu'un seul acide aminé N-terminal. La séquence C-terminale du fragment C-pe est identique à celle de la lactotransferrine humaine. Les fragments N-cl, N-tr, C-tr, C-ch possèdent de nombreux acides aminés en positions N- et C-terminales, en particulier, la carboxypeptidase B libère du fragment C-tr un nombre de résidus de lysine et d'arginine nettement supérieur au nombre de mole de fragment analysé.

c - Composition en acides aminés. La composition en acides aminés des différents fragments est donnée dans le tableau XXII (p 167). Les fragments C sont proportionnellement plus riches en résidus d'acides aspartique et glutamique que la lactotransferrine. Le fragment C-ch qui possède la même masse que le fragment C-tr et une composition en acides aminés très voisine en diffère cependant par la perte de 5 résidus de lysine et 5 d'arginine, ce qui lui confère son comportement électrophorétique très acide. La libération

TABLEAU XXI

PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES FRAGMENTS PEPTIDIQUES
OBTENUS PAR COUPURES ENZYMATIQUES MENAGEES

	N-pa	N-cl	N-tr	C-pe	C-tr	C-ch
<u>Masse moléculaire</u>						
Tamisage moléculaire	60 000	60 000	60 000	50 000	30 000	30 000
Ultracentrifugation à l'équilibre de sédimentation (Vsp 0,714)	53 000	50 000	-	53 000	28 000	-
Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (sans rupture des ponts disulfures)	60 000	60 000	60 000	50 000	32 000	-
<u>Acide aminé N-terminal</u>	trace Leu	-	Ala, trace de Leu	-	-	-
<u>Acide aminé C-terminal</u>	-	-	Lys, Arg	Lys, Arg	-	-



TABLEAU XXII

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES FRAGMENTS C-pe, C-tr, C-ch, N-pa et N-tr

	LTF	C-pe	C-tr	C-ch	N-pa	N-tr
Asp	71	62	41	37	63	59
Thr	31	22	14	13	23	18
Ser	52	40	24	28	38	39
Glu	60	46	30	33	48	49
Pro	28	21	18	13	23	30
Gly	52	36	26	24	38	43
Ala	60	42	28	23	45	48
Cys	26	18	10	6	10	10
Val	37	13	11	12	22	16
Met	6	4	2	1	3	
Ile	13	4	2	4	4	6
Leu	53	43	28	25	45	40
Tyr	21	15	10	9	18	15
Phé	31	15	10	8	19	21
His	10	7	5	2	8	7
Lys	40	31	20	15	32	30
Arg	41	21	15	10	25	28
GlcNAc	8	4	4	4	8	8



de ces 10 résidus basiques par la chymotrypsine suggère la présence d'unités répétitives poly-arginine, poly-lysine. Les fragments de type C possèdent un glycanne, les fragments de type N deux glycannes.

d - Analyse du complexe métallique.

1 - Stabilité du complexe métallique. Nous avons analysé la stabilité du complexe métallique dans les systèmes tampons décrits Chapitre III (p 142).

- Les fragments N-pa, N-tr perdent leur métal avant pH 6,2.

- Le fragment C-pe devient insoluble aux pH inférieurs à pH 6. L'élimination totale du métal n'est possible qu'à pH 3,6 alors que le fragment se solubilise.

- Les fragments C-tr et C-ch solubles, perdent leur métal à pH acide (pH 3,6).

2 - Capacité de fixation du métal

- Fragment N-papaïque. Comme nous le montrons dans la figure 50 (p 169), l'apofragment papaïque fixe un seul ion Fe^{3+} en donnant un spectre d'absorption dans le visible centré à 465 nm
avec $E_{465\text{ nm}}^{1\text{ cm}} = 0,26$ pour $E_{280\text{ nm}}^{1\text{ cm}} = 12,0$.
 $1\text{ p } 100$ $1\text{ p } 100$

- Fragment C-pepsique. L'apofragment C pepsique étant insoluble, nous n'avons pu mesurer sa capacité à refixer le fer. Les dosages de fer sur le fragment natif montrent qu'il fixe un seul atome de fer pour une masse moléculaire de 50 000. Son absorbance à 465 nm est de $E_{465\text{ nm}}^{1\text{ cm}} = 0,28$ pour une absorbance à 280 nm de $E_{280\text{ nm}}^{1\text{ cm}} = 14,4$.
 $1\text{ p } 100$ $1\text{ p } 100$

- Fragments C-trypsique et C-chymotrypsique. Les apo-fragments ne refixent que 0,2 atome de fer.

D - CONCLUSIONS

Nous avons, après hydrolyse enzymatique ménagée, isolé 8 fragments peptidiques fixant chacun un seul ion Fe^{3+} . Quatre de ces fragments, de comportement électrophorétique acide, fixent le métal sur le site "acido-stable", les quatre autres, de mobilité

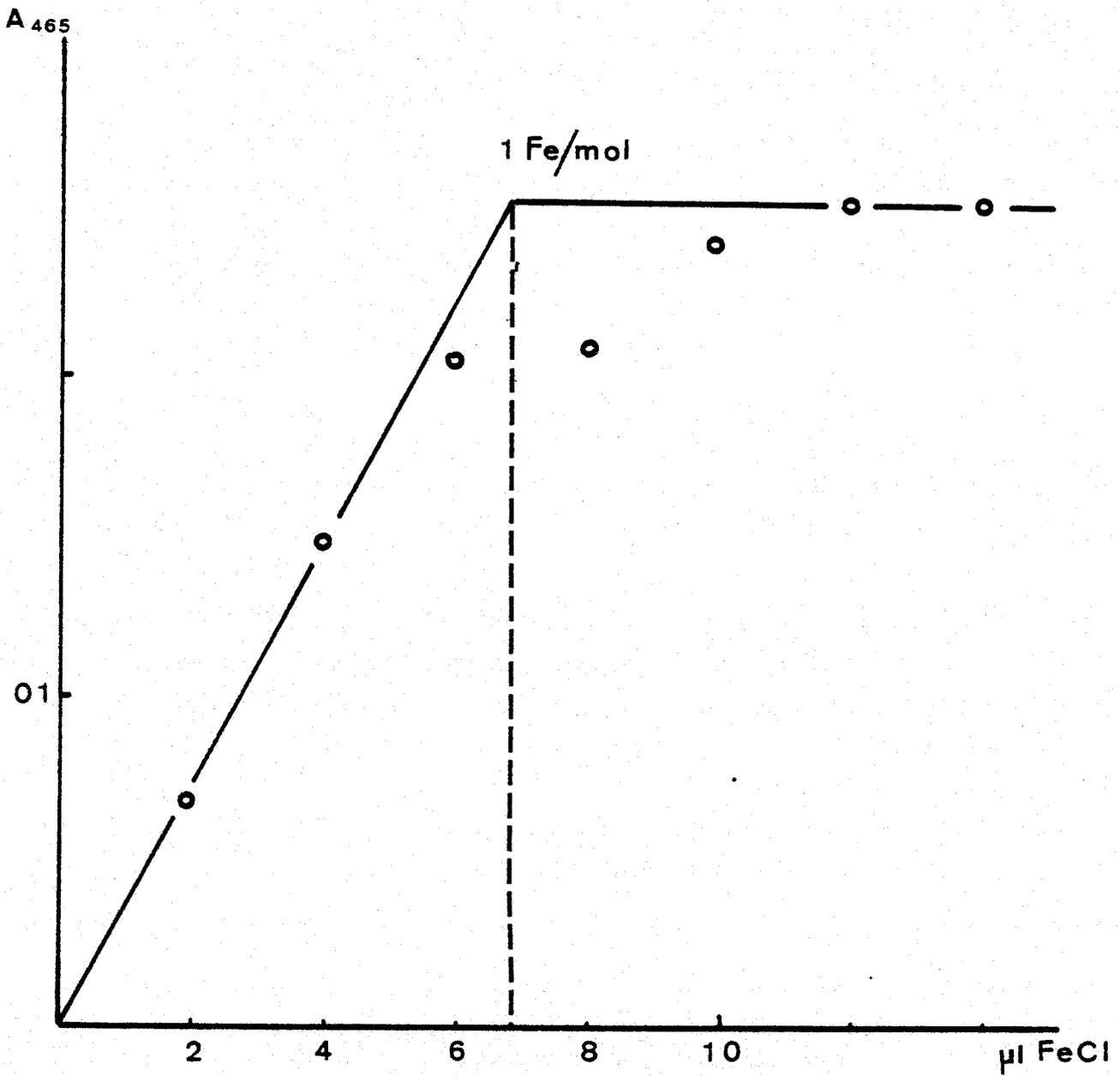


Figure 50

Détermination de la capacité de fixation du fer du fragment N-papaine



électrophorétique basique, fixent le métal sur le site "acido-labile".

Nos résultats concernant le fragment C-pepsique confirment ceux de LINE et al. (656) et de DECONNINCK et al. (657) à l'exception de la masse moléculaire que nous avons estimée à 50 000 par trois techniques différentes, au lieu de 35 000.

Les fragments C-tr et C-ch, qui sont composés de sous-unités peptidiques reliées par les ponts disulfures, perdent leur capacité de fixer réversiblement le fer. Le plus petit fragment que nous ayons obtenu possède une masse moléculaire de 28 000, ce qui montre que les acides aminés impliqués dans le site métallique "acido-stable" sont répartis sur 35 p 100 de la chaîne peptidique au plus.

Seuls les fragments C-pepsine et N-papaïne possèdent encore une intégrité peptidique. Ces deux fragments qui représentent chacun près de 60 p 100 de la chaîne peptidique totale se recouvrent donc en une région que nous avons appelée "zone charnière" dont la longueur est au moins 20 p 100 de celle de la chaîne peptidique.

Le comportement électrophorétique de plus en plus acide des fragments de type C alors que leur masse moléculaire diminue suggère que cette "zone charnière" est basique. La zone charnière doit posséder au moins un des déterminants antigéniques de la lactotransferrine puisque tous les fragments que nous avons obtenus ont au moins un déterminant antigénique commun.

III - ISOLEMENT, PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET REENCHAINEMENT DES FRAGMENTS BrCN DE L'APOLACTOTRANSFERRINE

A - INTRODUCTION

Nous avons défini, dans notre mémoire de thèse de 3^e cycle, les conditions optimales de coupure des liaisons méthionyles de l'apolactotransferrine par le bromure de cyanogène. La méthodologie utilisée est décrite dans l'appendice technique (p 6). Nous rappellerons donc succinctement les résultats que nous avons obtenus (MAZURIER, SPIK et MONTREUIL) (658).

L'apolactotransferrine traitée par le BrCN libère deux ensembles peptidiques de même masse moléculaire voisine de 40 000. Ces deux ensembles sont séparés de l'apolactotransferrine par tamisage moléculaire sur Biogel P₁₀₀, ils sont élués simultanément dans une fraction que nous avons appelée fraction C. La fraction C libère après oxydation performique six fragments qui sont purifiés par chromatographie d'échange d'ions en présence d'urée 4 M et par chromatographie de tamisage moléculaire après maleylation. Un septième fragment est isolé d'une fraction D élue au volume total de la colonne. Il n'existe pas de séquence -Met-Met. Les fragments ainsi purifiés sont difficiles à travailler au Séquenceur. Nous avons donc dû modifier en partie cette technique en coupant les ponts disulfures par réduction par le 2-mercapto-éthanol et alkylation par l'iodoacétamide de la fraction C afin de permettre l'identification directe de la S-carboxamido-méthyl cystéine, du tryptophane de la tyrosine, après dégradation automatique selon la méthode d'EDMAN, des différents fragments.

Dans la première partie de ce chapitre, nous décrivons une nouvelle méthode qui nous a permis de purifier les six fragments BrCN de la fraction C de l'apolactotransferrine. Cette méthode a conduit à l'obtention de fragments dont la structure peptidique est en cours de détermination par le groupe du Professeur JOLLES.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié les fragments BrCN des fragments C-pepsine et N-papaine qui nous ont permis de relier les fragments BrCN de l'apolactotransferrine.

B - FRACTIONNEMENT DES FRAGMENTS BrCN DE LA FRACTION C DE L'APOLACTOTRANSFERRINE TRAITÉE AU BrCN.

1 - MODE OPERATOIRE

a - Coupage des ponts disulfures. Nous avons coupé les ponts disulfures par réduction au 2-mercapto-éthanol selon la méthode de CRESTFIELD et al. (659), l'alkylation a été effectuée par l'iodoacétamide. La méthodologie est décrite dans l'appendice technique (p 4).

b - Chromatographie de "Gel filtration". Nous avons éliminé les produits de la réaction par chromatographie sur une colonne de

Séphadex G-25 (100-200 "mesh", 5 x 80 cm), stabilisée dans l'acide acétique 10 p 100. La colonne a été chargée par 500 mg de fraction C réduite et alkylée additionnée de 1 ml de 2-mercapto-éthanol.

c - Purification des fragments de masse moléculaire élevée.

Nous avons utilisé une colonne de Biogel P-60 (100-200 "mesh", 2 x 120 cm), stabilisée dans l'acide acétique 10 p 100. La charge est de 80 mg dissoute dans 4 ml d'acide acétique 30 p 100, contenant 1 p 1000 (v/v) de 2-mercapto-éthanol.

d - Purification des fragments de faible masse moléculaire.

Les petits peptides ont été purifiés par électrophorèse à pH 2,4 (acide acétique 1 M) sur papier Whatman 3 MM à raison de 7,5 V/cm pendant 16 h.

2 - RESULTATS

a - Elimination des sels. La chromatographie sur Séphadex G₂₅ permet de séparer des sels deux fractions que nous avons appelées CI et CII.

b - Purification des fragments de masse moléculaire élevée. La fraction C (CI + CII) réduite et alkylée, chromatographiée sur colonne de Biogel P-60 donne à 254 nm un profil d'élution schématisé dans la figure 51 (p 173). Le 2-mercapto-éthanol sert de marqueur interne et permet de calculer le R_F de chaque fraction. Les 10 fractions sont découpées comme nous l'indiquons dans la figure 51 (p 173).

Un repérage par la méthode au phénol-sulfurique de DUBOIS et al. (660) permet de localiser les glycopeptides dans les fractions 1 à 4.

- La fraction 1 obtenue avec un rendement en poids de 5 p 100 est composée d'agrégats.

- La fraction 2 conduit après recyclage à l'obtention du fragment FI avec un rendement pondéral de 19 p 100.

- La fraction 3 recyclée donne 3 fragments : FI, F'I et FII. Elle représente 7 p 100 du matériel injecté.

- Les fractions 4, 5, 6 obtenues avec respectivement un rendement de 12, 7 et 5 p 100 permettent après recyclage l'obtention

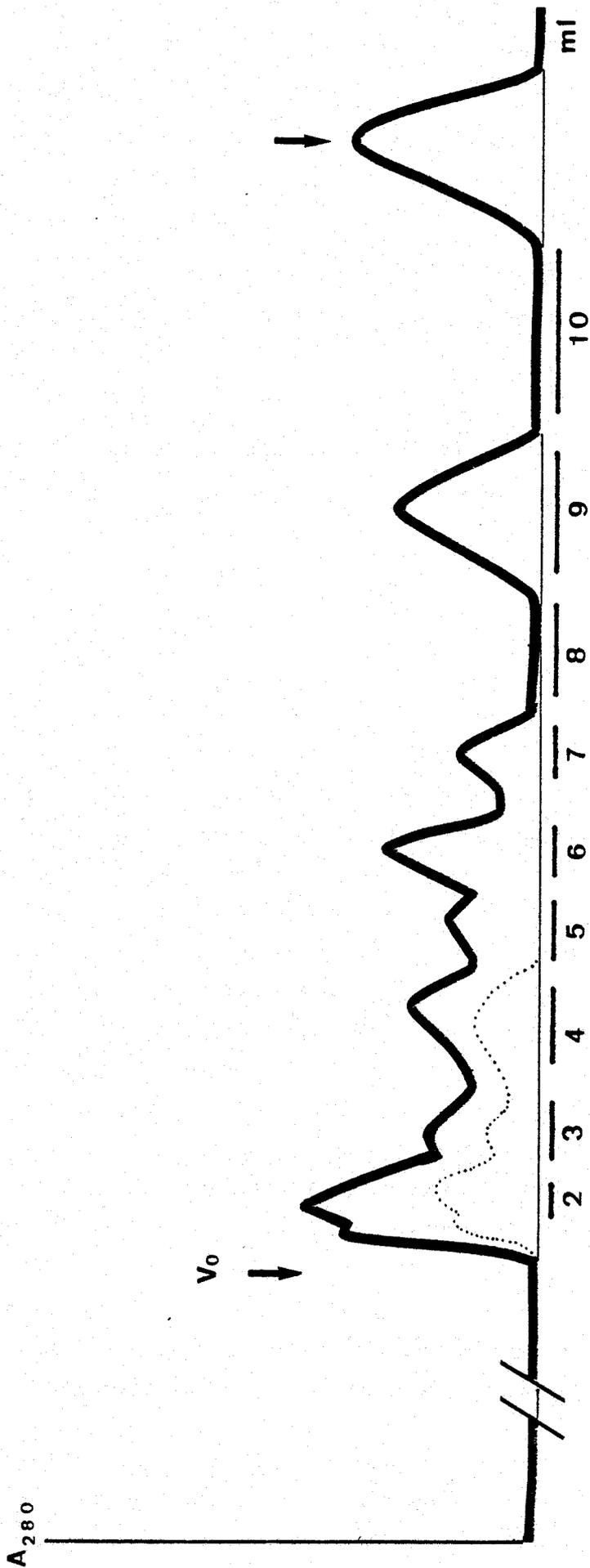


Figure 51

Fractionnement sur colonne de Biogel P-60 (2 x 120 cm) de la fraction C réduite et alkylée :
élution par CH₃COOH 10 p 100 12 mL/h, fractions de 4 ml

- Repérage des fractions glycopeptidiques par la méthode de DUBOIS et al. (660)
- Découpage des fractions



des fragments FII, FII et FIV.

- La fraction 7 obtenue avec un rendement de 2 p 100 est constituée, comme nous le verrons plus loin (p178), de deux fragments FV qui ne diffèrent que par les deux premiers acides aminés N-terminaux.

- La fraction 8 ne contient aucune peptide.

- Les fractions 9 et 10 conduisent à l'obtention des fragments F'V et FVI.

c - Purification des peptides de faible masse moléculaire.

L'électrophorèse préparative à pH 8,4, de la fraction CII, ou des fractions 9 et 10, permet la séparation de deux peptides de mobilité électrophorétique $m = 0,75$ et $m = 0,55$ ($m = 0$ pour gly, $m = + 1$ pour Arg) que nous avons appelés respectivement F V' et FVI.

3 - CONCLUSIONS

L'addition de 2-mercapto-éthanol rend la dissolution plus facile et surtout permet de minimiser les phénomènes d'aggrégation. Nous avons constaté que, en l'absence de cet agent réducteur, certains peptides, en particulier le fragment FIII, se polymérisaient et étaient élués tout au long de la colonne. Nous avons purifié six fragments FI, FII, FII, FIV, F V' et FVI. Les fragments F'I et FV, comme nous le développerons plus loin, sont dus à des ruptures secondaires du fragment FI. Nous avons exclu l'existence de fragments peptidiques de faible masse moléculaire qui pourraient être élués simultanément avec les sels lors de la chromatographie sur colonne de Séphadex G₂₅, en réalisant un fractionnement sur l'apolactotransferrine réduite et alkylée puis soumise à l'action du BrCN.

C - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES FRAGMENTS OBTENUS APRES ACTION DU BrCN ET RUPTURE DES PONTS DISULFURES DE LA LACTOTRANSFERRINE

La masse moléculaire, la nature des acides aminés N- et C-terminaux, la composition en acides aminés, en monosaccharides, de chacun des fragments BrCN ont été déterminées après vérification

de leur homogénéité en électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et en chromatographie de tamisage moléculaire.

1 - ETUDE DE LA MASSE MOLECULAIRE

Les fragments peptidiques possèdent des masses moléculaires comprises entre 1 500 et 30 000.

a - Mode opératoire. Nous avons mesuré la masse moléculaire par ultracentrifugation à l'équilibre de sédimentation en milieu dénaturant (Gu, HCl 6 M), par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et par tamisage moléculaire. L'ensemble de ces techniques sont décrites dans l'appendice technique (p 20).

b - Résultats. Les résultats obtenus par les différentes techniques ont été rassemblés dans le tableau XXIII (p176). La masse moléculaire des fragments FI mesurée par équilibre de sédimentation est certainement donnée par défaut. La masse moléculaire des différents fragments ne sera connue avec précision que lorsque leur séquence peptidique covalente aura été déterminée.

2 - EXTREMITES N- ET C-TERMINALES

a - Mode opératoire. Nous avons déterminé l'acide aminé N-terminal par dansylation, quand le peptide l'a permis, nous avons étudié la séquence N-terminale par la technique manuelle de dégradation d'EDMAN.

L'extrémité C-terminale a été analysée soit par la technique d'hydrazinolyse soit par action de la carboxypeptidase B.

b - Résultats.

1 - Extrémités N-terminales. Nous avons résumé la nature des extrémités N-terminales des différents fragments dans le tableau XXIV (p 177). Seul le fragment FI n'a donné aucun résultat aussi bien en dansylation qu'en dégradation récurrente d'EDMAN. Cette absence de résultat peut s'expliquer par l'impossibilité à



TABLEAU XXIII

MASSE MOLECULAIRE DES FRAGMENTS OBTENUS APRES ACTION
DU BrCN SUR LA LACTOTRANSFERRINE ET REDUCTION ET ALKYLATION

	F I	F'I	F II	F III	F IV	F V	FVI	F V'	F VII	B 6
Vsp	0,714		0,711	0,724	0,724					
Ultracentrifugation à l'équilibre de sédimentation	24,000		18 000	10 000	10 000	-	-	-	-	-
Electrophorèse en gel de polyacrylamide	30 000	20 000	18 000	13 000	10 000	8 500	-	-	-	-
Tamissage moléculaire	28 000	20 000	18 000	15 000	10 000	8 500	3 500	3 500	2 000	6 500

TABLEAU XXIV

EXTREMITES N- ET C- TERMINALES DES FRAGMENTS OBTENUS APRES ACTION
DU BrCN SUR LA LACTOTRANSFERRINE ET REDUCTION ET ALKYLATION

	Extrémité N-terminale		Extrémité C-terminale	
	Dansylation	Dégradation d'Edman	Hydrazinolyse	Carboxypeptidase B
F I	Rien	Rien	Hse	Rien
F' I	Rien	X-Lys-Val	-	Rien
F II	Gly	Gly-Leu-Leu	Hse	(Arg, Leu, Ala) -Hse
F III	Asp	Asp	-	(Leu, Arg, Lys)
F IV	Ser	Ser-Leu-Asp-Gly-Gly	Hse	Rien
F V	Pro	Pro-Asp-Pro		
F V'	Gly	Gly	Hse	(Arg) Hse
F VI	Ala	Ala-Pro-Asn-X-Ala-Val	Hse	(Gly, Ser) -Hse
F VII	Ala		Hse	(Gly-Ser) Hse
LTF	Traces Gly			
LTF+Br CN	Gly, Asp, Ser, Gly Ala, Pro, Leu, Phe			



dissoudre le fragment dans le tampon de couplage que nous utilisons pour la dégradation d'EDMAN. La séquence N-terminale a été cependant déterminée par le groupe du Professeur JOLLES : Arg-Lys-Val. Le fragment F'I lui a donné une séquence N-terminale identique au fragment FI.

Seuls les fragments FII et F'V ont le même acide aminé N-terminal que la lactotransferrine. Les études de séquence ont montré que le fragment F'V' correspond à l'extrémité N-terminale de la lactotransferrine.

Le fragment FV qui possède la proline en position N-terminale est en fait un mélange de deux peptides dérivant l'un de l'autre par une coupure entre le résidu aspartique n° 2 et le résidu de proline n° 3.

2 - Extrémités C-terminales. L'étude des acides aminés libérés après action de la carboxypeptidase B est résumée dans le tableau XXIV (p 177). Les fragments FI, F'I et FIV ne sont pas hydrolysés. Le fragment FIII donne les mêmes acides aminés que la lactotransferrine. Dans la mesure où nous avons analysé tous les fragments BrCN de la lactotransferrine, nous pouvons identifier le fragment FIII à l'extrémité C-terminale de la lactotransferrine.

3 - COMPOSITION EN ACIDES AMINES ET EN MONOSACCHARIDES

Nous avons rassemblé la composition en acides aminés et en monosaccharides de chaque fragment dans le tableau XXV (p 179).

Les fragments FI et FII sont de nature glycopeptidique. La somme de chaque acide aminé est en bon accord avec la composition de la lactotransferrine.

4 - PROBLEMES POSES PAR LES FRAGMENTS FI, F'I et FV

La séquence peptidique N-terminale du fragment F'I est identique à celle du fragment FI, nous avons donc émis l'hypothèse que ce glycopeptide de masse moléculaire 20 000 correspond à l'extrémité N-terminale du fragment FI. D'autre part, le fragment FV qui est un mélange de deux fragments dont la séquence N-terminale est Pro-Asp-Pro-Asn... et Pro-Asn..., peut lui aussi provenir d'une

TABLEAU XXV

COMPOSITION EN ACIDES AMINES ET EN MONOSACCHARIDES DES FRAGMENTS

BrCN DE L'APOLACTOTRANSFERRINE

	LTF	LTF BrCN	FI	FII	FIII	FIV	F V'	FVI	FVII
Cys CM	-	26	7	7	7	3	2	0	0
Asp	71	72	24	21	13	11	1	1	2
Thr	31	33	11	7	8	5	1	1	1
Ser	52	46	19	8	7	7	3	2	2
Glu	60	68	27	14	15	6	5	2	1
Pro	28	34	17	6	4	6	1	1	0
Gly	52	52	23	11	9	7	1	1	1
Ala	60	59	26	13	8	7	3	1	2
Val	37	40	16	7	5	8	3	1	1
Met	6								
Hse		6	1	1	0	1	1	1	1
Ile	13	14	8	2	2	2	0	0	0
Leu	53	65	20	16	16	7	0	1	1
Tyr	21	20	7	5	4	4	0	0	0
Phe	31	31	13	8	6	2	1	0	0
Lys	40	47	16	10	14	5	1	1	1
His	10	9	3	2	2	1	0		1
Arg	41	42	17	7	6	5	6	1	1
GlcNAc	8	8	4	4					
Gal	4	4	3	3					
Man	6	6	2	2					
Fuc	3	2	1	1					
NeuAc	2	1							

rupture secondaire en milieu acide du fragment FI. Nous avons éliminé la possibilité d'une rupture secondaire des fragments FII, FIII et FIV car le fragment FV n'est pas retrouvé lors du fractionnement du fragment C-pepsique après action du BrCN (p 180).

Nous avons incubé le fragment FI pendant 48 h dans une solution d'acide formique 70 p 100 puis après évaporation à l'évaporateur rotatif, nous avons analysé les extrémités N-terminales du fragment et nous l'avons analysé en électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS. Nous avons observé après action de l'acide formique l'apparition du dansyl proline et la libération, comme le montre la figure 52 (p 181), d'une faible proportion du fragment F'I.

Les fragments F'I et FV sont donc des ruptures secondaires du fragment FI.

5 - CONCLUSIONS

La fraction C libre, après coupure des ponts disulfures, 6 fragments dont les masses moléculaires s'échelonnent entre 1 000 et 30 000. Les fragments FI et FII sont de nature glycopeptidique. Le fragment FIII possède la même séquence C-terminale que l'apolactoferrine. De même, le fragment F'V s'identifie à l'extrémité N-terminale de la glycoprotéine. Ces fragments ont été obtenus avec une pureté permettant de déterminer leur structure peptidique covalente.

D - REENCHAINEMENT DES FRAGMENTS BrCN DE L'APOLACTOTRANSFERRINE

1 - FRACTIONNEMENT DES FRAGMENTS BrCN DE L'APOFRAGMENT C-PEPSINE

a - Mode opératoire. L'apofragment C-pepsine (100 mg) a été soumis à l'action du BrCN dans les conditions classiques décrites dans l'appendice technique. Après arrêt de la réaction le produit a été concentré à l'évaporateur rotatif puis déssalé sur une colonne de Séphadex G-25 (100 x 200 "mesh", 2 x 30 cm) stabilisée en acide acétique 10 p 100. Le produit lyophilisé a été réduit et alkylé puis déssalé sur la même colonne avant d'être chromatographié sur colonne de Biogel P-60.

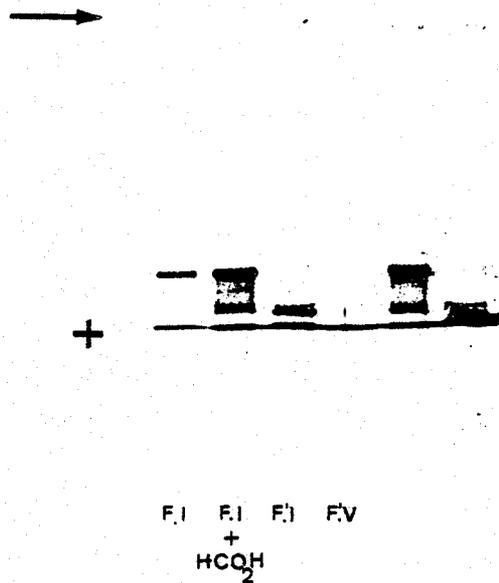


Figure 52

Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS des fragments FI F'I et du fragment FI après traitement pendant 48 h par l'acide formique 70 p 100



b - Résultats

1 - Déssalage. Le diagramme d'élution du fragment C-pepsique réduit et alkylé sur la colonne de Séphadex G-25 permet de définir deux fractions C-pe-1 et C-pe-2.

2 - Fractionnement de la fraction C-pepsique 1. Le diagramme d'élution de la fraction C-pe-1 sur colonne de Biogel P₆₀ est donné dans la figure 53 (p 183) de manière comparative avec celui de la fraction C réduite et alkylée de l'apolactotransferrine. Nous avons obtenu 6 fractions numérotées de B1 à B6 .

Les fractions B1 et B2 représentent moins de 5 p 100 du total injecté, elles sont de nature glycopeptidique.

Les fractions 3, 4 et 5 conduisent après recyclage à l'isolement des fragments FII, FIII, FIV.

La fraction 6 permet l'obtention d'un nouveau peptide que nous avons appelé B6.

3 - Fractionnement de la fraction C-pepsique 2. L'électrophorèse à pH 2,4 révèle l'unique présence du fragment FVI.

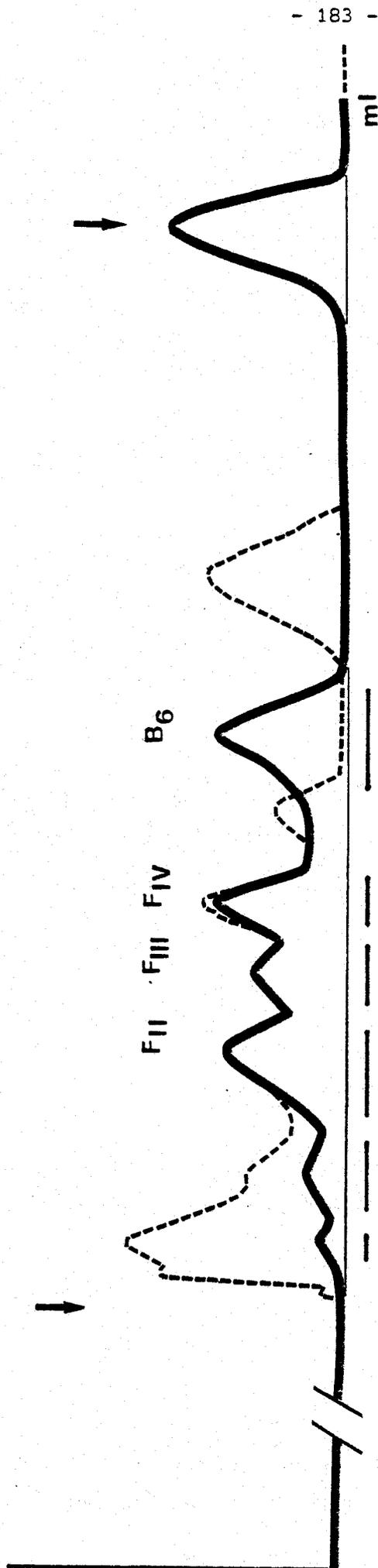
4 - Conclusions. Le fragment C-pepsique, obtenu par coupure pepsique ménagée de la lactotransferrine saturée en fer, contient donc 4 peptides BrCN que nous avons identifiés aux fragments FII, FIII, FIV, FVI et un cinquième fragment B6. Ce fragment B6 ne correspondant à aucun des peptides libérés par action directe du BrCN sur la lactotransferrine réduite et alkylée se situe donc obligatoirement à l'extrémité N- ou C-terminale du fragment C-pe. Comme la partie C-terminale a été identifiée au fragment FIII, le fragment B6 est donc localisé en position N-terminale du fragment C-pe.

2 - ETUDE DU FRAGMENT B6

a - Propriétés physico-chimiques du fragment B6.

1 - Matériel et méthodes. Les techniques utilisées sont décrites dans l'appendice technique.

A₂₈₀



- 183 -

ml

Figure 53

Diagramme d'élution des fragments BrCN sur colonne de Biogel P₆₀ (2 x 120 cm)

a de l'apolactotransferrine - - - -

b du fragment C-pepsique ———

Elution : par CH₃COOH 10 p 100, débit : 12 ml/h, fractions de 4 ml



2 - Résultats. La masse moléculaire du fragment B6 mesurée par tamisage moléculaire est de 6 500. L'acide aminé N-terminale a été identifié par dansylation à l'alanine (souillé de Leucine). La carboxypeptidase B libre pour 20 nM de peptide : de l'homosérine : 17 nM, de l'alanine : 29 nM, de l'arginine : 77 nM, ce qui permet de proposer le schéma de séquence suivant : Ala..... (Ala_{1à2}), Arg₍₂₋₃₎-Hse. La composition en acides aminés est la suivante : SCM(2) Asp(5), Thr(4), Ser(5), Glu(1), Pro(1), Gly(5), Ala(7), Val(4), Ile(1), Leu(5), Tyr(1), Phe(1) Lys(3) Arg(4) Hse(1).

b - Carte peptidique du fragment B6

1 - Matériel et méthodes. Le fragment B6 (0,5 mg) a été soumis à l'action de 0,020 mg de trypsine activée par CaCl₂ 0,01 M pendant 16 h dans un tampon Tris, HCl 0,1 M pH 8,2. L'hydrolysat a été soumis à une électrophorèse sur papier Whatman 3 MM, à pH 2,4 (CH₃COOH 0,1 M) à 10 V/cm pendant 16 h puis à une chromatographie dans le système solvant de PARTRIDGE (661).

2 - Résultats. La carte peptidique représentée dans la figure 54 (p 185) montre la libération de 15 peptides. Les peptides sont tous retrouvés sur la carte peptidique du fragment FI, de plus les peptides 1, 4, 5, 6, 7, 8, 13, 14, 15 sont retrouvés dans la carte peptidique du fragment FV.

c - Discussion

Le fragment B6 a donc été identifié à l'extrémité N-terminale du fragment C-pepsique. L'analyse des cartes peptidiques permet de plus de localiser le fragment FI dans la région C-terminale du fragment FI. Ce peptide possède certaines unités tryptiques communes avec le fragment FV.

3 - FRACTIONNEMENT DES FRAGMENTS BrcN DE L'APOFRAGMENT N-PAPAINE

a - Mode opératoire.

L'apofragment N-papaine (100 mg) a été soumis à l'action du BrcN dans les conditions classiques. Après évaporation, le produit

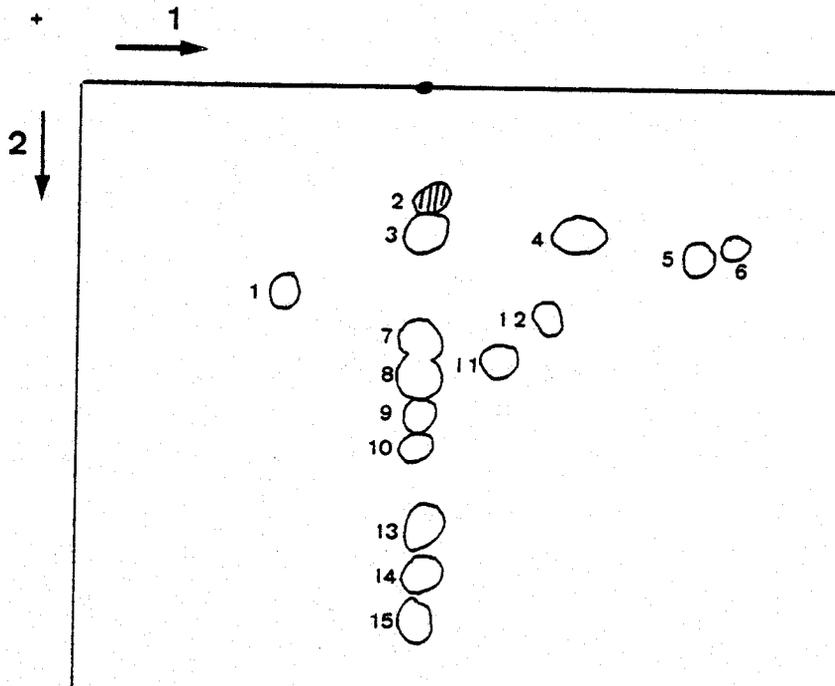


Figure 54

Carte peptidique de l'hydrolysate trypsique du fragment B6

1 : Electrophorèse à pH 2,4 (CH_3COOH 1 M)

2 : Chromatographie dans le solvant, butanol, acide acétique, eau (4:1:5)



a été chromatographié sur colonne de Biogel P₆₀. Enfin chaque fraction a été réduite et alkylée, désallée sur colonne de Séphadex G-25 puis chromatographiée sur colonne de Biogel P-60 comme nous l'avons décrit précédemment.

b - Résultats.

1 - Chromatographie sur colonne de Biogel P₆₀ du fragment N papaique après action du BrCN. Le diagramme d'élution, suivi à 280 nm a permis comme le montre la figure 55 (p 187) de séparer deux fractions N-papaine en 1 et 2. Ces deux fractions sont de nature glycopeptidique.

2 - Chromatographie sur colonne de Biogel P₆₀ des fractions N-papaine 1 et 2 après réduction et alkylation. Comme nous le montrons dans la figure 55 (p 187), la fraction N-pa-1 après réduction et alkylation a conduit à l'isolement d'un fragment de nature glycopeptidique qui a le comportement chromatographique du fragment FI. La fraction N-pa - 2 réduite et alkylée libère des fragments (figure 55 p 187) P₁ et P₂. Le fragment P₁ de nature glycopeptidique possède la même séquence N-terminale que le fragment FII, mais il est élué avec un Rf = 0,50 alors que le fragment FII possède un Rf = 0,46, nous l'avons donc identifié à l'extrémité N-terminale du fragment FII. Le fragment P₂ est élué avec le même Rf et possède la même extrémité N-terminale que le fragment F-IV.

c - Conclusions

La libération par le bromure de cyanogène des fragments FI et FIV et d'un sous fragment de FII permet de localiser le fragment FII à l'extrémité C -terminale du fragment N-papaine. Nous n'avons malheureusement isolé aucun peptide correspondant à l'extrémité N-terminale du fragment N-papaine.

De plus, nous pouvons déduire que les fragments FII et FIV sont reliés entre eux par au moins un pont disulfure puisque l'action du BrCN libère le fragment FI et un ensemble peptidique correspondant aux fragments FII et FIV.

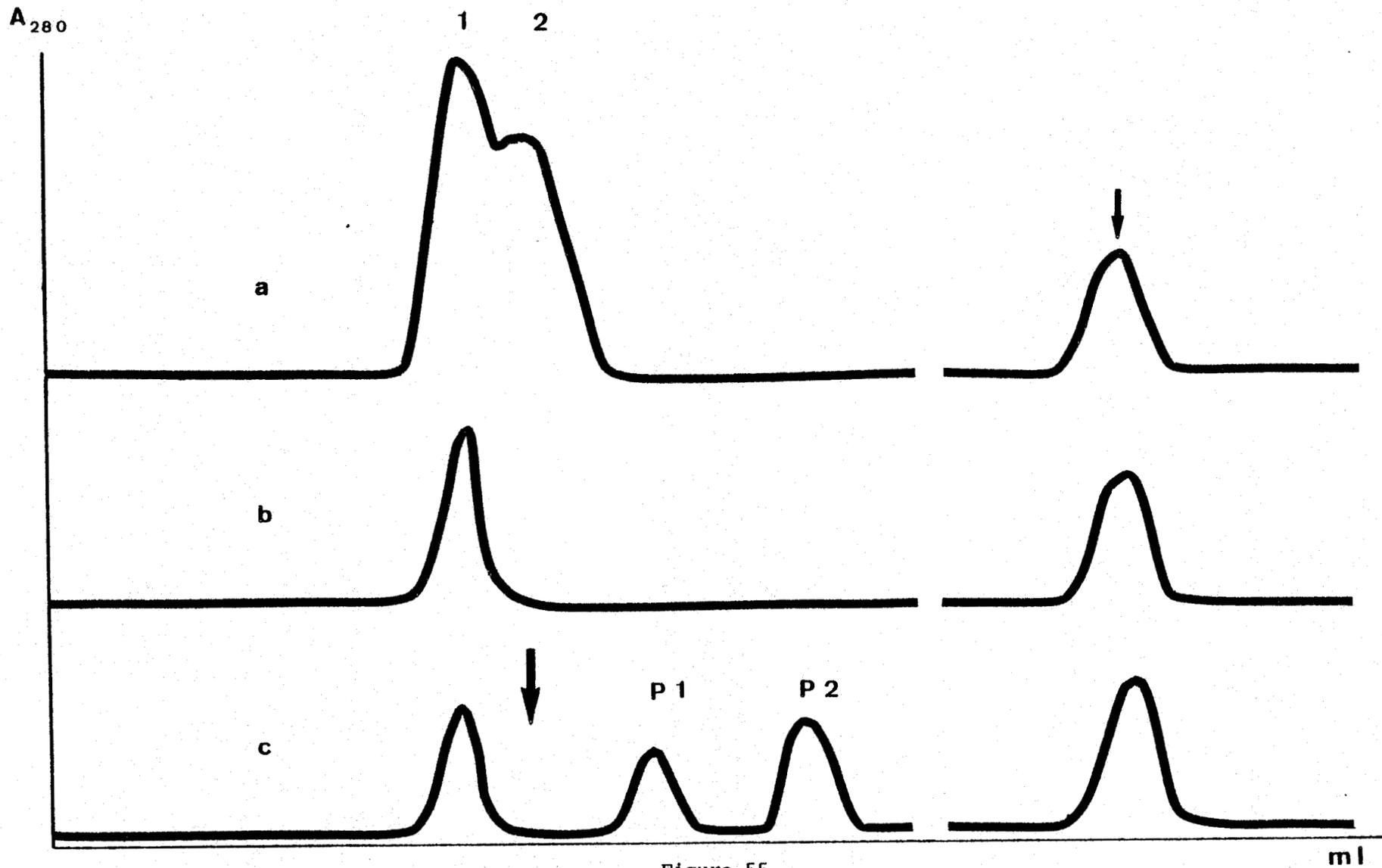


Figure 55

Fractionnement du fragment N-papaïne après action du BrCN sur colonne de Biogel P₆₀ (2 x 120 cm)

- a Fractionnement du N-papaïne après action du BrCN
- b Fractionnement de N-pa-₁ après réduction et alkylation
- c Fractionnement de N-pa-₂ après réduction et alkylation

Elution par CH₃COOH 10 p 100, débit 12 ml/h, fractions de 4 ml



4 - CONCLUSIONS

L'isolement et l'étude des fragments BrCN des apofragments C-pepsique et N-papaine permettent d'envisager le réenchaînement des fragments BrCN de l'apolactotransferrine, proposé dans la figure 56 (p 189). Le fragment FVI a été placé entre les fragments FII et FIII par homologie de séquence avec la sérotransferrine. Seul, le fragment FVII n'a pu être localisé. Nous avons placé un pont disulfure dans le fragment B6, puisque ce peptide, qui possède deux résidus de 5-carboxyméthylcystéine n'est relié à aucun des fragments FII, FIII ou FIV.

IV - CONCLUSIONS

Nous avons isolé, par coupure enzymatique ménagée, 8 fragments peptidiques capables chacun de fixer un seul ion Fe^{3+} . Quatre de ces fragments fixent le métal sur le site "acido-stable" et possèdent un comportement électrophorétique acide. Les quatre autres fixent le métal sur le site "acido-labile" et présentent un caractère basique.

L'action du bromure de cyanogène sur l'apolactotransferrine libère, après coupure des ponts disulfures, 7 fragments dont deux, FI et FII, sont de nature glycopeptidique. Les fragments F'V et FIII ont été respectivement identifiés aux extrémités N- et C-terminales.

L'étude des peptides libérés par action du BrCN sur le fragment C-pepsine permet d'identifier les fragments FII, FIII, FIV et FVI ainsi que l'extrémité C-terminale du fragment FI (B6). Ces résultats confirment l'idée que le fragment C-pepsine correspond bien à la partie C-terminale de la lactotransferrine.

L'étude du fragment N-papaine qui comporte le site "acido-labile" montre qu'il est localisé dans la partie N-terminale de la lactotransferrine mais qu'il empiète sur sa partie C-terminale.

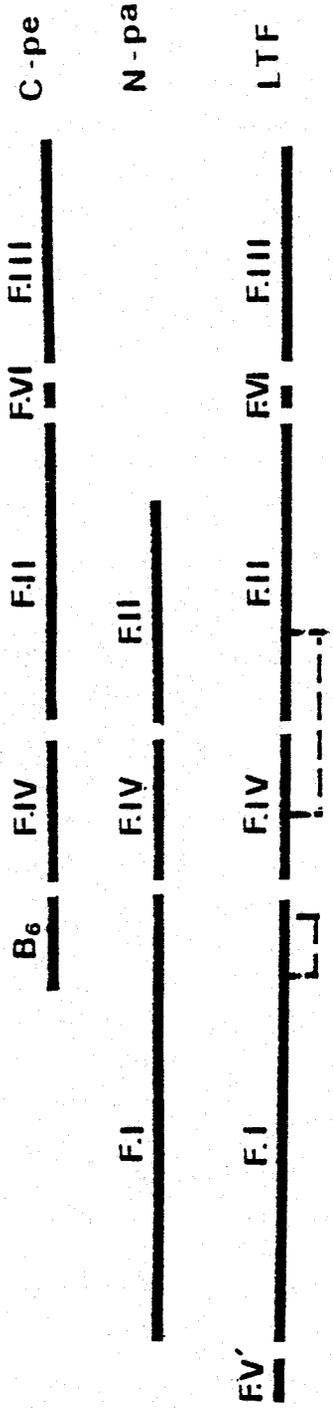


Figure 56

Réenchafnement des fragments BrCN de l'apolactotransferrine et positionnement de deux ponts disulfures



La lactotransferrine est donc constituée de deux domaines peptidiques qui possèdent chacun un glycanne et un site métallique comme nous l'avons schématisé dans la figure 57 (p 191)

2ème partie

I - INTRODUCTION

Ainsi que nous l'avons précisé précédemment, les résultats rapportés dans ce chapitre sont le fruit d'une collaboration avec Mr Pierre JOLLES, Professeur, Mme Jacqueline JOLLES, Chargée de Recherches au C.N.R.S. et de Mme Marie-Hélène METZ-BOUTIQUE qui ont déterminé la séquence peptidique covalente des fragments - BrcN de l'apolactotransferrine que nous avons préparés.

Tout d'abord, nous présentons essentiellement sous forme de 3 publications, les séquences peptidiques connues et nous les comparons à celles de la sérotransferrine humaine. Puis nous décrivons la structure secondaire des chaînes peptidiques au voisinage du point d'attache des glycannes.

II - SEQUENCE PEPTIDIQUE COVALENTE PARTIELLE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE. HOMOLOGIES AVEC LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE

A - SEQUENCE PEPTIDIQUE PARTIELLE DES FRAGMENTS FI, FII, FIII, FIV ET F V'

1 - MEMOIRE N° 1 : SEQUENCE N-TERMINALE DE LA LACTOTRANSFERRINE : HOMOLOGIE AVEC LA REGION N-TERMINALE D'AUTRES TRANSFERRINES

Dans cet article, la localisation du fragment-BrcN F V' à l'extrémité N-terminale de la lactotransferrine, a été établie. La séquence peptidique de ce peptide présente de nombreuses homologies

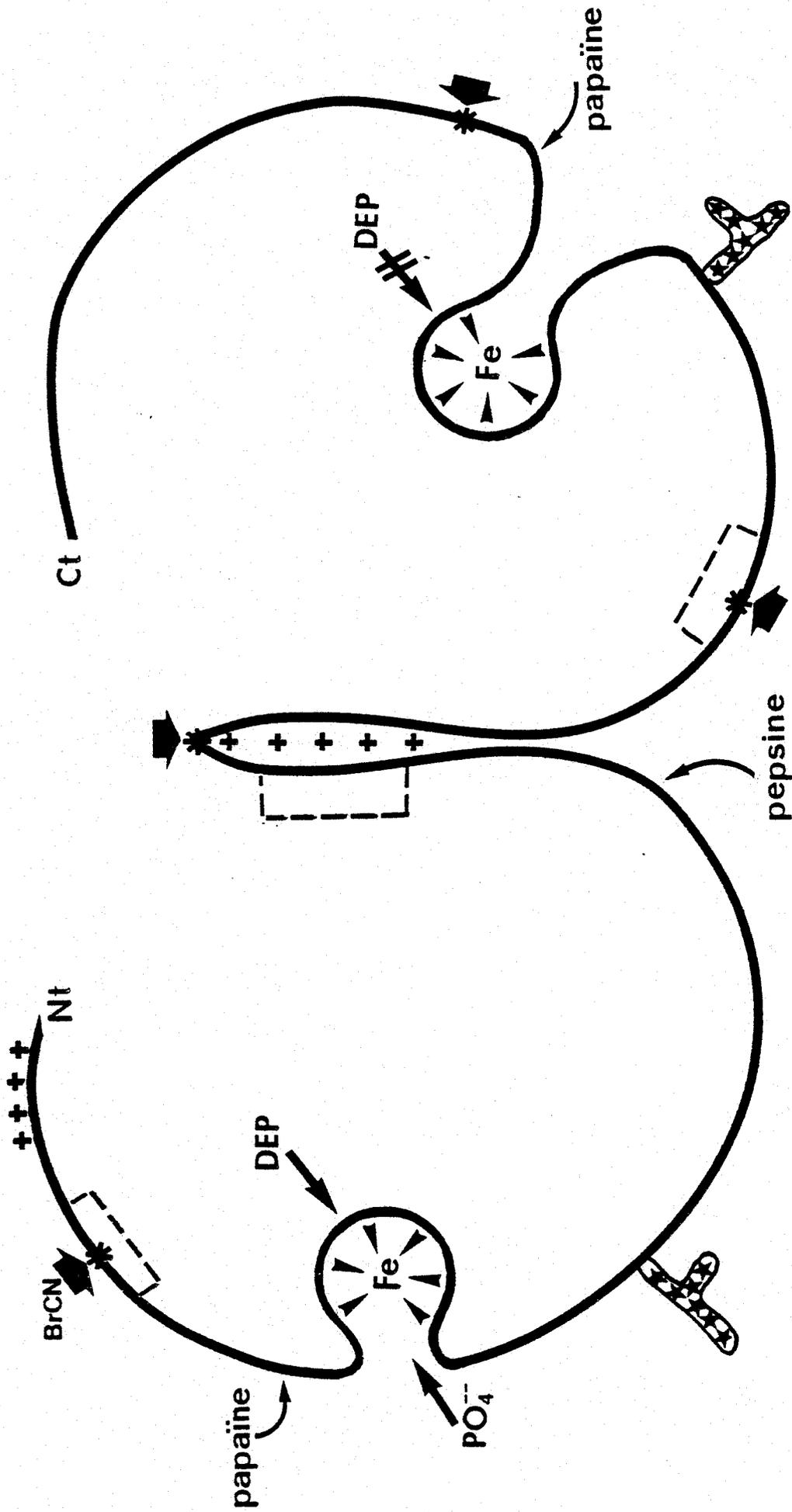


Figure 57

Hypothèse sur la conformation bilobée de la lactoferrine humaine

Résidu de méthionine (★), coupure enzymatique (⤿), pont disulfure (---), glycanne (+)



avec celles de la région N-terminale de la sérotransferrine humaine et de l'ovotransferrine de Poule.

En particulier, la position des deux résidus de cystine 10 et 20 est conservée dans les 3 transferrines. Néanmoins, la région N-terminale de la lactotransferrine se différencie par l'existence d'une séquence poly-Arg (2 à 5).

THE N-TERMINAL SEQUENCE OF HUMAN LACTOTRANSFERRIN: ITS CLOSE HOMOLOGY WITH THE AMINO-TERMINAL REGIONS OF OTHER TRANSFERRINS

J. JOLLÈS*, J. MAZURIER**, M.-H. BOUTIGUE*, G. SPIK**, J. MONTREUIL** and P. JOLLÈS*

*Laboratoire des Protéines, Université de Paris V, 45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06, and **Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille-I, B.P. No. 36, F-59650 Villeneuve d'Ascq

Received 24 July 1976

1. Introduction

Human lactotransferrin (also called lactoferrin) [1-3] consists of a single polypeptide chain of molecular weight 76 500 [4,5] and possesses two carbohydrate groups which are conjugated to the protein by an asparaginyl-*N*-acetylglucosamine linkage [6]: their structures were established by Spik et al. [7,8]. However, the present knowledge of the amino acid sequence of human lactotransferrin remains very limited: some cyanogen bromide fragments have been purified and analyzed [9] and six short cysteic acid containing peptides [10] as well as short tryptic and chymotryptic glycopeptides [7,8,11] have been sequenced. Finally glycine has been identified as the *N*-terminal amino acid [10].

The present paper is dealing with the establishment of the *N*-terminal sequence of human lactotransferrin and of the corresponding cyanogen bromide fragment. Extensive similarities were thus demonstrated between the *N*-terminal regions of the ovo-, serum- and lactotransferrins.

2. Materials and methods

Human lactotransferrin was obtained according to Chéron et al. [12]. The protein was reduced following the procedure of Crestfield et al. [13]; iodoacetamide was employed for the alkylation step. The preparation and purification of the cyanogen bromide (CNBr) fragments were reported by Mazurier et al. [9 and unpublished results].

The *N*-terminal amino acids of the protein and of

the CNBr-fragment were identified by the dansylation procedure. Automated Edman degradation was carried out in a Socosi Sequencer Model PS-100, by the quadrol double-cleavage method [14]; dithioerythritol was added in 1-chlorobutane (10 mg/l). The thiazolinones were converted into the corresponding phenylthiohydantoin (PTH)-amino acids; the latter were characterized, as previously reported [15], by thin-layer chromatography, by gas-liquid chromatography (Beckman GC 45 chromatograph) and by chromatography of the free amino acids (Technicon amino acid Autoanalyzer) regenerated from the PTH-amino acids (150°C; 24 h; 6 M HCl containing 1/2000 2-mercaptoethanol).

The chymotryptic digestion of CNBr-fragment F-V' was performed during 24 h at 37°C in 0.05 M NH₄HCO₃ with an enzyme/substrate ratio of 1/20. The chymotryptic peptides were purified by paper electrophoresis (Whatman No. 1) at pH 6.5 (pyridine-water-acetic acid, 100 : 900 : 4, v/v/v) and 50 V/cm.

3. Results

3.1. *N*-terminal sequence of human lactotransferrin

By the dansylation procedure, Gly was characterized as the *N*-terminal amino acid of the protein. By automated Edman degradation, the ten first amino acids could be identified (table 1).

3.2. The *N*-terminal cyanogen bromide fragment of human lactotransferrin: characterization of the first 24 amino acids of the protein

7 CNBr-fragments (F-I to F-VII) have so far been

Table 1

N-terminal sequences of human lactotransferrin and of the cyanogen bromide fragment F-V' (N-terminal moiety of the intact lactotransferrin molecule). Methods of identification were as follows: (a) +, PTH-derivative determined by thin-layer chromatography; cysteine was determined as PTH-S-carboxamidomethylcysteine; (b) PTH-amino acid determined by gas-liquid chromatography, yield %; (c) amino acid determined with an Autoanalyzer after regeneration, % of recovery.

Sequence position	Human lactotransferrin			Residue	CNBr-fragment F-V'			Residue
	a	b	c		a	b	c	
1	Gly	Gly (18)	Gly (20)	Gly	Gly	Gly (15)	Gly (18)	Gly
2	Arg*		Arg (4)	Arg			Arg (7)	Arg
3	Arg*		Arg (4.2)	Arg			Arg (7)	Arg
4	Arg*		Arg (4.8)	Arg			Arg (9)	Arg
5	Arg*		Arg (4)	Arg			Arg (9)	Arg
6	Ser	Ser (11)		Ser	Ser	Ser (17)		Ser
7	Val	Val (12)	Val (12)	Val	Val	Val (24)	Val (19)	Val
8	Gln		Glu (8)	Gln	Gln		Glu (14)	Gln
9	Trp	Trp (5)		Trp	Trp	Trp (15)		Trp
10	Cys		Cys (1)	Cys	Cys	Cys	Cys (2)	Cys
11					Ala	Ala (18)	Ala (14)	Ala
12					Val	Val (18)	Val (14)	Val
13					Ser	Ser (13)		Ser
14					Gln		Glu (10)	Gln
15					Pro	Pro (5)	Pro (3)	Pro
16					Glu		Glu (4)	Glu
17					Ala	Ala (7)	Ala (5)	Ala
18					Thr	Thr		Thr
19					Lys		Lys (4)	Lys
20					Cys	Cys	Cys(0.5)	Cys
21					Phe	Phe (2)	Phe (2)	Phe
22					Gln		Glu (1)	Gln
23					Trp	Trp (0.5)		Trp
24					Gln			Gln

* Characterized by thin-layer chromatography during 3.5 h (instead of 0.5 h) in solvent 7 (15) and staining with the Sakaguchi reagent.

Table 2

Mobility m (at pH 6.5) values, yields and structures of the chymotryptic peptides of fragment F-V' of human lactotransferrin. $m = 0$ for Gly; $m = +1$ for Arg; $m = -1$ for CySO₂H.

Peptide	m	Yield (%)	Structure
C-1	+1.15	35	Gly-Arg-Arg-Arg-Arg
C-2	0	35	Ser-Val-Gln-Trp
C-3	-0.25	50	Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe
C-4	-0.56	15	PyrGlu*-Trp
C-5	+0.58	32	Gln-(Asx, Ser, Ala, Val, Arg ₂)-HSer*
C-6**	+0.33	34	Gln-Trp-Gln-(Asx, Ser, Ala, Val, Arg ₂)-HSer*

* PyrGlu, pyrrolidonecarboxylic acid; HSer, homoserine.

** C-6 = C-4 + C-5.



Table 3
 Homology of the amino-terminal regions of human lactotransferrin (this study), human serum transferrin [16] and hen ovotransferrin [18] - ϕ - deletion.

Lactotransferrin	1	10	20	25
	Gly-Arg-Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-			
Serum transferrin	Val-Pro-Asp-Lys- ϕ	-Thr-Val-Arg-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Glu-His-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Gln-Ser-Phe-Arg-Asp-		
Ovotransferrin	Ala-Pro-Pro-Lys- ϕ	-Ser-Val-Arg-Trp-Cys-Thr-Ile-Ser-Ser-Pro-Glu-Gln-Lys-Lys-Cys-Asn-Leu-Arg-Asp-		



isolated [9]. During further purification of fragment F-V, a peptide F-V' was obtained by filtration on Biogel P6 with 10% acetic acid as eluent followed by chromatography on Dowex 1 × 2 with a pyridine (10%)–acetic acid buffer of pH 8.4.

Its amino acid composition was established (residues/mole between parentheses): Asp (1), Thr (1), Ser (3), Glu (5), Pro (1), Gly (1), Ala (3), Cys (2), Val (3), Phe (1), Trp (2), Lys (1), Arg (6), H.Ser (1). F-V' was submitted to automated Edman degradation. Table 1 indicates that this fragment constitutes the N-terminal region of human lactotransferrin: a sequence constituted by the first 24 amino acids was established, and this result is reported for the first time.

Fragment F-V' was further submitted to a chymotryptic digestion. Table 2 indicates the mobilities, yields and structures of six chymotryptic peptides (C-1 to C-6) in the order as they appear in the sequence. Peptide C-6 was composed of peptides C-4 + C-5; in C-4, glutamine was characterized as pyrrolidone-carboxylic acid. An unusual chymotryptic split was observed after the fourth arginine residue of F-V'. The study of peptides C-1 to C-6 corroborated the data established by automated Edman degradation.

4. Discussion

4.1. Comparison of the amino terminal regions of 3 transferrins

From the N-terminal sequence of human serum transferrin which we previously published [16] and present data concerning human lactotransferrin, the alignments proposed in table 3 could be constructed; they demonstrate strikingly the extensive similarity between the N-terminal regions of the two proteins. We point out more particularly the satisfactory alignment of the cysteinyl residues present in both sequences: this was not possible when the N-terminal sequence of serum transferrin proposed by Sutton and Brew [17] was considered. Our results were in accordance with the highly conservative behaviour of cysteinyl residues during evolution, a fact illustrated by several other published phylogenetic protein data. Table 3 also includes Williams' recently established long N-terminal sequence of hen ovotransferrin

quoted, without details, by Bluard-Deconinck et al. [18] despite the fact that it differs from previously published data by Elleman and Williams [19]: indeed the N-terminal sequence of hen transferrin presents again a close homology with the corresponding sequences of the two human transferrins.

Acknowledgments

This research was supported in part by the C.N.R.S. (ER. 102 and LA 217), the I.N.S.E.R.M. (group U-116) and the D.G.R.S.T. (contract 75.7.1334).

References

- [1] Montreuil, J. and Mullet, S. (1960) C. R. Acad. Sci. Paris 250, 1736–1737.
- [2] Montreuil, J., Tonnelat, J. and Mullet, S. (1960) Biochim. Biophys. Acta 45, 413–421.
- [3] Masson, P. L., Heremans, J. F., Prignot, J. J. and Wauters, G. (1966) Thorax 21, 538–544.
- [4] Querinjean, P., Masson, P. L. and Heremans, J. F. (1971) Eur. J. Biochem. 20, 420–425.
- [5] Spik, G. (1971) Ann. Nutr. 25, A81–A90.
- [6] Spik, G., Monsigny, M. and Montreuil, J. (1966) C. R. Acad. Sci. Paris 263, 893–896.
- [7] Spik, G., Vandersyppe, R., Montreuil, J., Han, K. K. and Tetaert, D. (1974) FEBS Lett. 38, 213–216.
- [8] Spik, G., Vandersyppe, R., Fournet, B., Bayard, B., Charet, P., Bouquelet, S., Strecker, G. and Montreuil, J. (1975) Actes du Colloque C.N.R.S. sur la Méthodologie des Glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq, 20–27 Juin 1973, C.N.R.S. éd., Paris, 483–499.
- [9] Mazurier, J., Spik, G. and Montreuil, J. (1974) FEBS Lett. 48, 262–265.
- [10] Bluard-Deconinck, J. M., Masson, P. L., Osinski, P. A. and Heremans, J. F. (1974) Biochim. Biophys. Acta 365, 311–317.
- [11] Graham, I. and Williams, J. (1975) Biochem. J. 145, 263–279.
- [12] Chéron, A., Mazurier, J., Fournet, B. and Montreuil, J. Biochim. Biophys. Acta (in press).
- [13] Crestfield, A. M., Moore, S. and Stein, W. H. (1963) J. Biol. Chem. 238, 622–627.
- [14] Edman, P. and Begg, G. (1967) Eur. J. Biochem. 1, 80–91.

- [15] Jollès, J., Schoentgen, F., Hermann, J., Alais, Ch. and Jollès, P. (1974) *Eur. J. Biochem.* 46, 127-132.
- [16] Boutigue, M. H., Jollès, J., Charet, P., Montreuil, J. and Jollès, P. (1976) *Biochimie* 58, 891-892.
- [17] Sutton, M. R. and Brew, K. (1974) *FEBS Lett.* 40, 146-148.
- [18] Williams, J. in Bluard-Deconinck, J. M., Osinski, P., Querinjean, P., Masson, P. and Heremans, J. F. (1975) *Proc. 1st Int. Conf. 'Solid Phase methods in Protein Sequence Analysis'* (Laursen ed.) Boston, p. 203-209.
- [19] Elleman, J. C. and Williams, J. (1970) *Biochem. J.* 116, 515-535.

2 - MEMOIRE N° 2 : ETUDES STRUCTURALES CONCERNANT LA LACTOTRANS-
FERRINE HUMAINE : SES PARENTES AVEC LA SEROTRANSFERRINE HU-
MAINE ET EVIDENCE D'UNE HOMOLOGIE INTERNE

Les séquences peptidiques partielles des fragments FI et FIV mettent en évidence une nouvelle fois une homologie avec la sérotransferrine. Ainsi, les cystines 11 et 20 du fragment FI et 13 du fragment FIV se retrouvent en position 39, 48 et 403 dans la sérotransferrine. En outre, l'unité trypsique FI Ts₃₋₂ possède une séquence peptidique au voisinage d'un résidu d'histidine que l'on retrouve quatre fois dans la sérotransferrine en position 121, 252, 451, 582. Ce résidu d'histidine qui est toujours accompagné en position 5 par un résidu d'arginine, peut appartenir d'après Mac GILLIVRAY et al. (662) au site métallique.

D'autre part, la séquence N-terminale du fragment FIV est homologue de l'unité trypsique FI TP₃ du fragment FI. Ce résultat confirme l'hypothèse émise par Mac GILLIVRAY et al. (663) sur la duplication du gène codant les transferrines.

Structural studies concerning human lactotransferrin : its relatedness with human serum transferrin and evidence for internal homology.

M.-H. METZ-BOUTIGUE *, J. JOLLÈS *,
J. MAZURIER **, G. SPIK **, J. MONTREUIL **
and P. JOLLÈS *◇.

(10-4-1978).

* *Laboratoire des Protéines,
Universités de Paris V et VI,
45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06.*
** *Laboratoire de Chimie Biologique
et Laboratoire associé au C.N.R.S. N° 217,
Université des Sciences et Techniques
de Lille-I,
F-59650 Villeneuve d'Ascq.*

Introduction.

Recently we reported the N-terminal sequence of human lactotransferrin [1]; extensive similarities were thus demonstrated between the N-terminal regions of the ovo, serum and lactotransferrins [1]. The present paper is dealing with some structural data concerning two further cyanogen bromide (CNBr) fragments. The results allowed to extend our knowledge concerning the homology between both human transferrins and revealed features that were of structural (cystine residues) and functional interest as they concerned one of the carbohydrate binding asparagine residues as well as some tyrosine and histidine residues which might be involved in iron binding. Furthermore as previously noted for human serum transferrin [2], the existence of internal homology in human lactotransferrin can also be suggested.

Materials and Methods.

Sephadex G-25 fine and G-50 fine were obtained from Pharmacia and Dowex 1 × 2 from Touzart and Matignon (Paris). All other reagents (analytical grade) were purchased from Prolabo or Merck except those employed for the Sequencer which were obtained from Pierce and from S.D.S. (Marseilles). Human lactotransferrin was obtained according to Chéron *et al.* [3]. The

preparation, purification and analysis of the CNBr-fragments FI and FIV with molecular weights of 23,000 and 10,000 respectively were reported by Mazurier *et al.* [4]. The amino acid composition of the peptides after total hydrolysis (5.6 M HCl : 18, 48 and 72 h ; under vacuum) and the characterization of the phenylthiohydantoin (PTH)-amino acids after regeneration of the free amino acids (150° ; 24 h ; 6 M HCl containing 1/2000 2-mercaptoethanol) were achieved with a Technicon Autoanalyzer. Automated Edman degradation was carried out in a Socosi Sequencer, Model PS-100, (a) for longer peptides by the 1.0 M quadrol double cleavage method and (b) for shorter peptides by the 0.1 M quadrol single cleavage method in presence of Polybrene [5]; the characterization of the PTH-amino acids was previously reported [6].

The tryptic digestion of CNBr-fragment FI was performed during 24 h at 37°C in 0.1 M NH_4HCO_3 with an enzyme/substrate ratio of 1/50. Trypsin (Worthington) was pretreated during 16 h with 0.0625 M HCl at 37°C. The R_f of the peptides were determined by paper chromatography (Whatman N° 1) in solvent A : n-butanol-pyridine-acetic acid-water (75:50:15:60, v/v/v/v) and their mobility m by paper electrophoresis at pH 6.5 (Whatman N° 1 ; pyridine-water-acetic acid, 100:900:4, v/v/v, 50 V/cm ; $m = 0$ for Gly ; -1 for CysO_3H ; $+1$ for Arg).

Results and Discussion.

N-terminal sequences of FI and FIV.

By automated Edman degradation, the 20 and 26 first amino acids of respectively FI and FIV could be identified. The experimental details are indicated in table I.

Tryptic digest of FI.

The tryptic digest of FI was dried and afterwards treated with 70 per cent formic acid : a

Abbreviations : STF, serum transferrin.
LTF, lactotransferrin.

◇ To whom all correspondence should be addressed.

BUS
LILLE

precipitate (FI-TP) and a supernatant (FI-TS) were thus obtained.

on figure 1B. 10 fractions (FI-TS3.1 to FI-TS3.10) were characterized. Two of them contained pure

TABLE I.
N-terminal sequences of cyanogen bromide fragments FI and FIV and of the tryptic peptide FI-TP3.

Sequence position	FI			FIV			FI-TP3		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
1			Arg (4)	Ser	Ser (30)		Leus	Leus (20)	Ile (20)
2	Lys		Lys (9)	Leus	Leus (20)	Leu (20)	Asp		Asp (16)
3	Val/Phe	Val (15)	Val (16)	Asp		Asp (17)	Ser	Ser (8)	
4			Arg (2)	Gly	Gly (12)	Gly (18)	Gly	Gly (9)	Gly (10)
5	Gly	Gly (9)	Gly (9)	Gly	Gly (14)	Gly (23)	Leus	Leus (16)	Leu (10)
6	Pro	Pro (7)	Pro (7)	Tyr	Tyr (17)	Tyr (11)	Tyr	Tyr (10)	Tyr (6)
7	Pro	Pro (6)	Pro (7)	Val/Phe	Val (14)	Val (19)	Leus	Leus (16)	Leu (10)
8	Val/Phe	Val (12)	Val (10)	Tyr	Tyr (10)	Tyr (10)	Gly	Gly (10)	Gly (7)
9	Ser	Ser (11)		Thr	Thr		Ser	Ser (3)	
10	Cys	Scm	Scm (1)	Ala	Ala (14)	Ala (16)	Gly	Gly (4)	Gly (6)
11	Leus	Leus (11)	Ile (8)	Gly	Gly (7)	Gly (10)	Tyr	Tyr (6)	Tyr (3)
12	Lys		Lys (8)	Lys		Lys (10)	Val/Phe	Phe (3)	Phe (3)
13			Arg (1)	Cys	Scm	Scm (2)	Thr	Thr	
14	Asp		Asp (3)	Gly	Gly (6)	Gly (12)	Ala	Ala (1.3)	Ala (1)
15	Ser	Ser (5)		Leus	Leus (10)	Leu (11)			
16	Pro		Pro (2)	Val/Phe	Val (12)	Val (11)			
17	Leus	Leus (4)	Ile (4)	Pro	Pro (3)	Pro (2)			
18	Gln		Glu (2)	Val/Phe	Val (12)	Val (11)			
19	Cys		Scm (0.5)	Leus	Leus (10)	Leu (8)			
20	Leus		Ile (4)	Ala	Ala (12)	Ala (7)			
21				Glu		Glu (4)			
22				Asn		Asp (3)			
23				Tyr	Tyr (6)	Tyr (3)			
24				Lys		Lys (5)			
25				Ser	Ser (6)				
26				Gln		Glu (3)			

Leus : Leu or Ile ; the characterization was only possible by amino acid analysis.

Scm : S-carboxymethylcysteine.

Methods of identification were as follows : (a) PTH-derivative determined by thin-layer chromatography ; cysteine was determined as PTH-S-carboxamidomethylcysteine ; (b) PTH-amino acid determined by gas-liquid chromatography, yield % ; (c) amino acid determined with an Autoanalyzer after regeneration, % of recovery.

FI-TP was dissolved in pure formic acid and filtered on Sephadex G-50 (180 cm × 1.2 cm) with 30 per cent acetic acid as solvent. Five peaks (FI-TP1 to FI-TP5) were characterized : peak FI-TP3 contained a pure peptide of 25 amino acids. Its amino acid composition is Asp₂, Thr₁, Ser₂, Glu₂, Pro₁, Gly₃, Ala₂, Val₁, Ile₂, Leu₃, Tyr₃, Phe₁, Lys₁, Arg₁ ; its structure was studied as indicated in table I.

FI-TS was first filtered on Sephadex G-25 and its eluate was divided into four parts (FI-TS1 to FI-TS4) (fig. 1A). FI-TS3 was further chromatographed on Dowex 1 × 2 : the details are indicated

peptides after desalting on Sephadex G-25 and paper chromatography in solvent A and were sequenced.

FI-TS3.2 is a nonapeptide (R_f in solvent A : 0.32 ; m = + 0.64) : Val-Pro-Ser-His-Ala-Val-Val-Ala-Arg.

FI-TS3.8 is a decapeptide (R_f in solvent A : 0.57 ; m = - 0.15). Its N-terminal sequence was determined automatically : Asp-Gly-Ala-Gly-Asp-Val. After digestion with carboxypeptidase B at 37°C for 1 h in 0.1 M ammonium bicarbonate, 66 per cent Arg, 47 per cent Ile and 34 per cent Phe were released ; carboxypeptidases B and A

released under the same experimental conditions, after 6 h, 80 per cent Arg, 57 per cent Ile, 58 per cent Phe and 38 per cent Ala. Thus the sequence

ferrin : the almost complete structure of the latter with its two homologous domains was recently published [7].

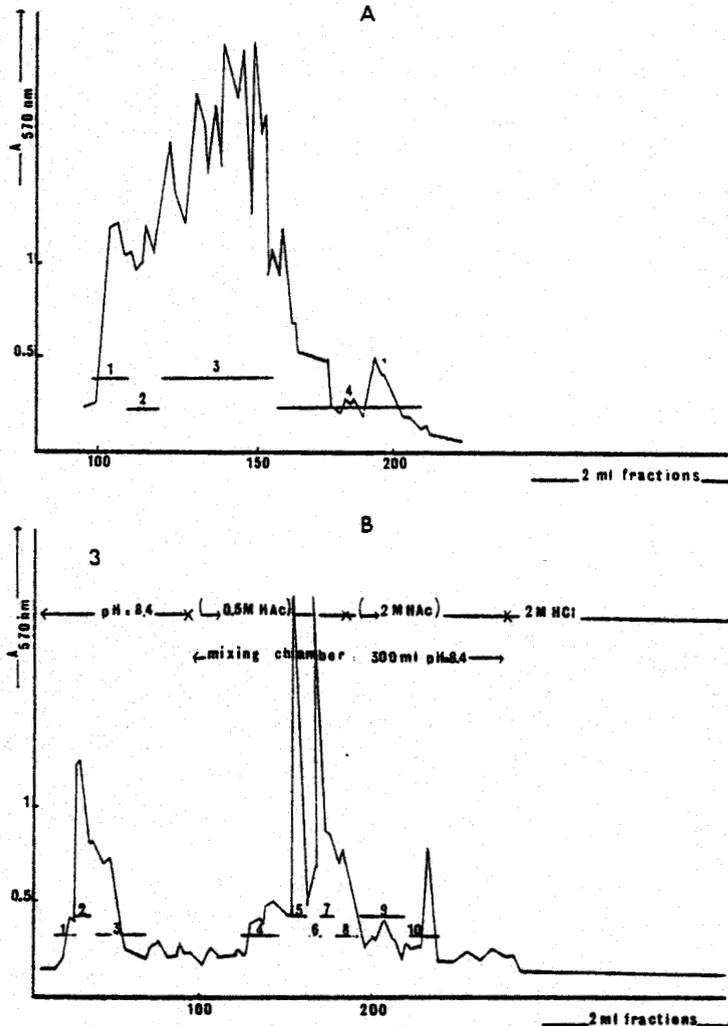


FIG. 1. — Purification of the soluble tryptic peptides of FI-TS (150 mg).

(A) : Filtration on Sephadex G-25 (200 cm x 1.7 cm) with 30 per cent acetic acid as eluent.

(B) : Chromatography of fraction FI-TS3 on Dowex 1 x 2 (140 cm x 1.2 cm). The peptides were characterized by the ninhydrin procedure after alkaline hydrolysis (A_{570}) carried out on 0.2 ml samples.

of the peptide is : Asp-Gly-Ala-Gly-Asp-Val-Ala-Phe-Ile-Arg.

Some homologies of structural and functional interest between human serum transferrin and lactotransferrin.

Table II indicates some interesting homologies between human lactotransferrin and serum trans-

Several strong homologies were observed around the structural important cystine residues (i, iii) as well as around histidine (ii) and tyrosine (iii) residues, some of which play an important role in iron binding. As previously noted in the case of ovo- and serum transferrins [7], peptide FI-TS3.2 (ii) possesses also an arginine residue 5 residues C-terminal to the highly conserved his-



TABLE II.

Homologies of structural and functional interest between human lactotransferrin (present study) and serum transferrin(*) [7]. Δ , carbohydrate carrying residue; \emptyset , gap. The homologous residues (identical amino acids) are boxed.

(i) Homologies around Cys residues

LTF FI N-terminal	Arg-Lys-Val-Arg- Gly-Pro -Pro-Val-Ser- Cys -Ile- Lys -Arg-Asp- Ser -Pro-Ile-Gln- Cys -Ile
{ STF 30-49	Ile-Pro-Ser-Asp- Gly-Pro -Ser-Ala-Val- Cys -Val- Lys -Lys-Ala- Ser -Tyr-Leu-Asx- Cys -Ile
{ and its internal homologous sequence (369-379)	Cys -Val-Ser-Ala-Glu-Thr-Thr-Glu-Asp- Cys -Ile
other example : section (iii)	

(ii) Homology around a His residue

LTF FI-TS3.2	Val-Pro-Ser- \emptyset -His- Ala - Val-Val - Ala-Arg
{ STF 117-126	Lys-Lys-Ser-Cys-His-Thr-Gly-Leu-Gly-Arg
{ and its internal homologous sequence (447-456)	Lys-Lys-Ser-Cys-His-Thr- Ala - Val -Thr-Arg
{ STF 249-257	Val-Pro-Ser- \emptyset -His-Thr- Val-Val - Ala-Arg
{ and its internal homologous sequence (579-587)	Ala-Pro-Asn- \emptyset -His- Ala - Val-Val -Thr-Arg

(iii) A. Internal homology of lactotransferrin. B. Characterization of the homologous fragment to one of the serum transferrin glycopeptides.

A. LTF FI-TP3	Ile- \emptyset -Asp-Ser- Gly-Leu - \emptyset -Tyr-Leu- \emptyset -Gly-Ser- \emptyset -Gly-Tyr-Phe-Thr-Ala
A. LTF FIV N-terminal	Ser-Leu- \emptyset -Asp-Gly-Gly-Tyr-Val-Tyr-Thr- Ala-Gly-Lys-Cys-Gly-Leu-Val-Pro-Val-Leu-Ala-Glu-Asn-Tyr - \emptyset -Lys-Ser-Gln
B. STF 391-417	Ser-Leu- \emptyset -Asp-Gly-Gly-Phe-Val-Tyr-Ile- Ala-Gly-Lys-Cys-Gly-Leu-Val-Pro-Val-Leu-Ala-Glu-Asn-Tyr -Asn-Lys-Ser-Asp
B. STF 61-88	Thr-Leu-Tyr-Asx- Ala - Gly-Leu -Val-Tyr-Asx- Ala -Tyr-Tyr-Leu-Ala-Pro-Asx-Asx-Leu-Lys-Pro-Val-Ala-Val-Glx-Phe-Tyr-Gly

(iv) Highly homologous tryptic peptides

LTF FI-TS3.8	Asp-Gly-Ala-Gly-Asp-Val-Ala-Phe -Ile-Arg
STF 193-202	Asx-Gly-Ala-Gly-Asp-Val-Ala-Phe-Val-Lys

* the gaps have not been taken into account in numbering the residues.

tidine residue. These arginine residues may be involved in anion binding [8].

Serum transferrin contains one of its sugar moieties linked to asparagine N° 414 (see table II, iii and foot-note). The long homologous sequence in lactotransferrin (N-terminal sequence of FIV) was however devoid of polysaccharide as a deletion occurred at the level of the asparagine residue (table II, iii).

Internal homology in human lactotransferrin.

Section iii in table II provides evidence for internal homology in the polypeptide chain of lactotransferrin as tryptic peptide FI-TP3 and the N-terminal sequence of peptide FIV are homologous. A similar observation has previously been reported for human serum transferrin [2, 7], reflecting an ancestral gene doubling during the phylogenetic development of vertebrate transferrins.

Acknowledgements.

This research was supported in part by the C.N.R.S. (E.R. 102 and L.A. 217) and the I.N.S.E.R.M. (groupe

U-116). The excellent technical assistance of Mr. Ly Quan Le is gratefully acknowledged.

REFERENCES.

1. Jollès, J., Mazurier, J., Boutigue, M.-H., Spik, G., Montreuil, J. & Jollès, P. (1976) *FEBS Letters*, **69**, 27-31.
2. MacGillivray, R. T. A. & Brew, K. (1975) *Science*, **190**, 1036-1037.
3. Chéron, H., Mazurier, J., Fournet, B. & Montreuil, J. (1977) *C. R. Acad. Sci. Paris*, **284**, 585-588.
4. Mazurier, J., Spik, G. & Montreuil, J. (1974) *FEBS Letters*, **48**, 262-265.
5. Klapper, D. G., Wilde III, C. E. & Capra, J. D. (1978) *Anal. Biochem.*, **85**, 126-131.
6. Jollès, J., Schoentgen, F., Hermann, J., Alais, Ch. & Jollès, P. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **46**, 127-132.
7. MacGillivray, R. T. A., Mendez, E. & Brew, K. (1977) in *« Proteins of iron metabolism »* (Brown, E. B., Aisen, P., Fielding, J. & Crichton, R. R. ed.), pp. 133-141, Grune and Stratton, New York-San Francisco-London.
8. Bates, G. W. & Schlabach, M. R. (1975) in *« Proteins of iron storage and transport in Biochemistry and Medicine »* (Crichton, R. R. ed.), pp. 51-58, North-Holland, Amsterdam.

MEMOIRE N° 3 : LES GLYCOPEPTIDES DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE :
SEQUENCE DES ACIDES AMINES, LOCALISATION ET ASPECT PLYLOGENETIQUE

Dans ce mémoire sont présentées les séquences peptidiques au voisinage des glycanes des fragments FI et FII de la lactotransferrine. Le glycanne qui est lié au résidu de Asn en position 5 du fragment FII possède un environnement peptidique qui permet de l'identifier au glycanne II séquencé par SPIK, VANDERSYPPE, MONTREUIL et al. (664). Cette séquence peptidique se retrouve dans la sérotransferrine où la substitution du résidu de Ser par un résidu de Leu en position 468 explique l'absence de glycosylation. Par contre, 23 sur 36 résidus d'acides aminés dont 4 résidus de cystine se retrouvent dans le glycopeptide de l'ovotransferrine de Poule.

Le fragment FIV, de la lactotransferrine, qui n'est pas glycosylé possède une séquence homologue, glycosylée en position 414 dans la sérotransferrine. L'absence de glycosylation du fragment FIV s'explique par la délétion du résidu d'asparagine.

La séquence peptidique du glycanne I de la lactotransferrine n'a pas été retrouvée dans les séquences actuellement connues de la sérotransferrine. Elle peut être identifiée à celle du glycopeptide I décrit par SPIK, VANDERSYPPE, MONTREUIL et al. (665) bien que 7 différences soient observées.

Le fragment FII de la lactotransferrine, identifié à l'extrémité C-terminale de la lactotransferrine possède en position 20 un résidu d'asparagine non glycosylé alors que la position 22 est occupée par un résidu de sérine. Cette séquence code habituellement (DAYHOFF) (666) la glycosylation de la chaîne peptidique. Cette particularité de la lactotransferrine nous a amené à rechercher l'explication de cette absence de glycosylation au niveau de la structure secondaire.

BBA 38388

AMINO ACID SEQUENCE, LOCATION AND PHYLOGENETIC ASPECTS OF THE GLYCOPEPTIDES OF HUMAN LACTOTRANSFERRIN

M.-H. METZ-BOUTIGUE^a, J. JOLLES^a, P. JOLLES^a, J. MAZURIER^b, G. SPIK^b and J. MONTREUIL^b

^a *Laboratoire des Protéines, Université de Paris V, 45 rue des Saints-Pères, F 75270 Paris Cedex 06* and ^b *Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille-I, B.P. 36, F-59650 Villeneuve d'Ascq (France)*

(Received July 19th, 1979)

Key words: Lactotransferrin sequence; Transferrin glycopeptide; Phylogeny

Summary

Human lactotransferrin contains two prosthetic sugar groups situated in two different cyanogen bromide fragments: the amino acid sequences around the two polysaccharide attachment sites were established. The location of the prosthetic groups was quite different in serum and lactotransferrins and no sequence homology could so far be characterized between the glycopeptides of these two transferrins, whereas a close relationship between a glycopeptide of human lactotransferrin and a glycopeptide of hen ovotransferrin was noted.

Introduction

Human lactotransferrin is a glycoprotein [1] of molecular weight 76 500 which consists of a single polypeptide chain [2,3] to which two carbohydrate groups are attached [3,4]. The presence of N-glycosidic linkages could be demonstrated between asparagine and N-acetylglucosamine [3,4] and the structure of the sugar parts was established [3,5]. Previously, the reduced and alkylated lactotransferrin was directly submitted to a tryptic digestion and the amino acid sequences of two different glycopeptides were studied [3,6]. We are

Supplementary data to this article are deposited with, and can be obtained from, Elsevier/North-Holland Biomedical Press B.V., BBA Data Deposition, P.O. Box 1345, 1000B Amsterdam, The Netherlands. Reference should be made to No. BBA/DD/130/38388/622(1980)308–314.

The supplementary information includes: The results of automatic Edman degradation of the tryptic glycopeptide contained in the CNBr fragment F1, of the N-terminal sugar-containing sequence of CNBr fragment FII and of the N-terminal sequence of the CNBr fragment FIII of human lactotransferrin. Further, the N-terminal sequences of human serum transferrin and lactotransferrin.

currently involved in the study of the primary structure of lactotransferrin and extensive investigations are devoted to its cyanogen bromide (CNBr) fragments [7-9]. Seven fragments (FI to FVII) have so far been isolated [5]. Two fragments, FI and FII, contain sugars and the present paper reports the amino acid sequences around the two polysaccharide attachment sites as the previous structural results of Spik et al. [6] could not be corroborated. The location of the sugar-rich CNBr fragments in the whole lactotransferrin molecule could be specified. Structural comparisons with serum and ovotransferrins have led to a schematic representation of human lactotransferrin and to the identification of its C-terminal CNBr fragment.

Materials and Methods

Sephadex G-25 fine was obtained from Pharmacia. All reagents were purchased from Prolabo or Merck except those employed for the Sequencer which were obtained from Pierce and from S.D.S. (Marseilles). Trypsin, chymotrypsin and carboxypeptidases A and B, were purchased from Worthington.

Human lactotransferrin was obtained according to Cheron et al. [10]. The protein was reduced following the procedure of Crestfield et al. [11] and alkylated with iodoacetamide. The preparation and purification of the CNBr fragments were carried out as reported by Spik and Mazurier [5,7].

The amino acid composition of the peptides after total hydrolysis in 5.6 M HCl for 18, 48 and 72 h under vacuum and the characterization of the phenylthiohydantoin amino acids after regeneration of the free amino acids (150°C, 24 h, 6 M HCl containing 1/2000 2-mercaptoethanol) were achieved with a Technicon Autoanalyzer. Automated Edman degradation was carried out in a Socosi Sequencer, Model PS-100, (a) for longer peptides by the 1.0 M quadrol double-cleavage method [12] and (b) for shorter peptides by the 0.1 M quadrol single-cleavage method in the presence of polybrene [13]; the characterization of the phenylthiohydantoin amino acids was previously reported [9]. High-performance liquid chromatography (Waters chromatograph, model ALC/GPC-204) was also used. The carbohydrate-carrying residue was determined by the dansylation technique [14] after removal of the preceding amino acid(s) by the Edman procedure.

The tryptic or chymotryptic digestion of CNBr-fragment FI was performed during 24 h at 37°C in 0.1 M NH_4HCO_3 with an enzyme/substrate ratio of 1/50. Trypsin (Worthington) was pretreated for 16 h with 0.0625 M HCl at 37°C. The presence of the sugars during the purification of the glycopeptides was followed by the characterization (AutoAnalyzer) of glucosamine after total hydrolysis. The R_f values of the peptides were determined by paper chromatography (Whatman No. 1) in solvent A: *n*-butanol/pyridine/acetic acid/water (75 : 50 : 15 : 60, v/v/v/v) and their mobility, m , by paper electrophoresis at pH 6.5 (Whatman No. 1; pyridine/water/acetic acid (100 : 900 : 4, v/v/v), 50 V/cm; $m = 0$ for glycine, $m = -1$ for cysteic acid and $m = +1$ for arginine).

The C-terminal amino acids were determined by digestion with carboxypeptidases A and B at 37°C for different time intervals in 0.1 M ammonium bicarbonate and in the presence of $2 \cdot 10^{-3}$ M diisopropylfluorophosphate. The digests were then analyzed on a Technicon AutoAnalyzer to determine released C-terminal amino acids.

Results and Discussion

Amino acid sequence of the two glycopeptides

Glycopeptides FI and FII with molecular weights of 23 000 and 17 000, respectively, were the sole glycopeptide CNBr fragments of human lactotransferrin [7].

Glycopeptide from CNBr fragment FI. The first 24 amino acids of fragment FI were identified by automated Edman degradation [8]: the sugars were not situated in this part of the molecule. Thus, the CNBr fragment was submitted to tryptic digestion. The enzymic digest was dried and afterwards treated with 70% formic acid: a precipitate and a supernatant were thus obtained, only the latter contained the sugars. Gel filtration of the supernatant was performed on Sephadex G-25 (200 × 1.7 cm) with 30% acetic acid as eluent. The polysaccharide part was characterized in the first peak which contained a mixture of at least two peptides as demonstrated by the dansyl technique. The purification of the glycopeptide was achieved by rechromatography on Sephadex G-50 (180 × 2 cm) with 30% acetic acid as eluent. Its purity was ascertained by the determination of a unique N-terminal amino acid (leucine): its R_f value in solvent A was 0.04 and its mobility, m , at pH 6.5 was -0.13 . The amino acid composition was as follows:

Asp_{1.08}, Thr_{0.86}, Glu_{1.77}, Pro_{2.76}, Gly_{1.06}, Ala_{2.0}, Val_{0.86}, Ile_{0.72}, Leu_{0.98}, Trp_{0.90}, Arg_{0.77}.

The presence of glucosamine was also established.

The sequence was determined by automated Edman degradation: 13 out of the 15 amino acids could be characterized by this technique. The identification of the second residue failed: the presence of aspartic acid was determined by dansylation and it was thus concluded that asparagine was the carbohydrate-carrying residue. Edman degradation apparently did not proceed normally through N-glycosylated asparagine as also noted by Tomita et al. [15] but continued after this residue, though with a very low yield. The C-terminal amino acid of the glycopeptide (arginine) was determined after digestion with carboxypeptidase B. Furthermore, the C-terminal sequence of the peptide was corroborated by incubation with carboxypeptidases A and B. Arg (53%), Val (45%) and Ala (79%) were thus liberated.

In conclusion, the structure of the glycopeptide of CNBr fragment FI was:

Leu-Asn-Trp-Thr-Gly-Pro-Pro-Glu-Pro-Ile-Glu-Ala-Ala-Val-Arg
 |
 CHO

Seven differences were noted with the sequence of Spik et al. [6] which was previously established by manual techniques. Also, from the chymotryptic digest of CNBr fragment FI, a glycopeptide could be isolated by similar techniques. Its R_f value in solvent A was 0.05 and its mobility at pH 6.5 was -0.25 . Its sequence was identical to that of the tryptic glycopeptide, but it did not contain the C-terminal arginyl residue.

Glycopeptide from CNBr fragment FII. The CNBr fragment FII was submitted to automated Edman degradation and its first 36 amino acids were thus characterized: the fifth amino acid was the asparagine residue to which the sugars

TABLE I

The glycopeptide of CNBr-fragment FII of human lactotransferrin (LTF): comparison with homologous sequences from hen ovotransferrin (OTF) [19] and human serum transferrin (STF) [16]. Asn (CHO), carbohydrate-carrying Asn residue. θ , deletion; X, residue not yet characterized. The homologous residues (identical residues, □) and the conservative changes (◻) are boxed.

LTF FII	-Met-◻Gly-Leu-Leu-◻Phe-◻Asn(CHO)-◻Gln-◻Thr-Gly-Ser-Cys-Lys-Phe-Asp-Glu
OTF	-Met-◻Gly-Leu-◻Ile-His-◻Asn(CHO)-◻Arg-◻Thr-Gly-Thr-Cys-◻Asn-Phe-Asp-Glu
STF (464-478)	-Met-◻Gly-Leu-Leu-◻Tyr-Asn-◻Lys-Ile-Asn-His-◻Cys-Lys-Phe-◻Glx-Glx
LTF FII	Tyr-Phe-Ser-◻Gln-Ser-◻Cys-Ala-Pro-◻Gly-Ser-Asp-◻Pro-◻Arg-◻Ser-Asn-◻Leu-
OTF	Tyr-Phe-Ser-◻Glu-Gly-◻Cys-Ala- θ -◻Gly-Ser-Pro-◻Pro-Asn-◻Ser-Arg-◻Leu-
STF (479-480)	Phe-Phe-◻ ← not determined →
LTF FII	◻Cys-X-◻Leu-Cys-Ile-◻Gly-
OTF	◻Cys-Gln-◻Leu-Cys-Gln-◻Gly-

were attached. Residue Nos. 11 and 12 were different to those which were previously published [6]; furthermore, the establishment of a longer sequence allowed the characterization of a close structural relationship between lacto- and ovotransferrins (see below).

Location of the two glycopeptides in the lactotransferrin molecule. One of the two glycopeptides of lactotransferrin was situated in CNBr fragment FI. By homology with serum transferrin according to MacGillivray et al. [16], fragment FI seemed to be directly linked to the N-terminal sequence of the protein constituted by CNBr fragment FV' as established by Jollès et al. [9]. In the homologous N-terminal sequences of both transferrins, 19 out of 51 amino acid residues were identical and an additional five corresponded to conservative changes: the alignment of the half-cystine residues should be more particularly pointed out. Glycopeptide FI was thus located in the N-terminal moiety of lactotransferrin (Fig. 1). Its second glycopeptide situated in fragment FII belonged to the C-terminal moiety of the protein. This statement was deduced from the comparison of homologous sequences between the lacto- and serum transferrins (Table I and Fig. 1).

Phylogenetic aspects concerning the glycopeptides of lacto-, serum- and ovotransferrins. Schematic representation of human lactotransferrin

(1). *Different locations of the glycopeptides in human lacto- and serum transferrins.* Each of the two transferrins contained two polysaccharide groups; however, their positions were quite different. In lactotransferrin, as established in this study, one group was situated in the N-terminal and the other, as suggested by Bluard-Deconinck et al. [17], in the C-terminal moiety of the protein, whereas in serum transferrin, both sugar groups were characterized in the C-terminal part [3,16]. In Fig. 1 a schematic representation of the two proteins and their sugar groups is indicated. Some homologous sequences containing more particularly half-cystine residues are also presented.

(2). *The glycopeptides of human lactotransferrin: the homologous sequences in serum transferrin are devoid of sugars.* For the glycopeptide of lactotransferrin contained in CNBr fragment FI (N-terminal moiety), no homologous counterpart could so far be characterized in serum transferrin, according to the

sequence data of MacGillivray et al. [16]. To the second glycopeptide situated in CNBr fragment FII (C-terminal moiety) corresponded a homologous peptide in serum transferrin (MacGillivray, R.T.A., Mendez, E. and Brew, K., personal communication, Int. Meet. Proteins of Iron Metabolism, New York (1977)) which was devoid of sugars: indeed it lacked the code sequence Asn-X-Ser/Thr (Table I).

(3). *The glycopeptides of human serum transferrin: the homologous sequences in lactotransferrin are devoid of sugars. Characterization of the C-terminal CNBr fragment of lactotransferrin.* One of the sugar moieties of serum transferrin was linked to asparagine No. 414 [16]: the long homologous sequence in lactotransferrin (N-terminal sequence of CNBr fragment FIV) was, however, devoid of polysaccharide as a deletion occurred at the level of the asparagine residue [8]. 23 out of 27 amino acid residues were identical, and an additional residue corresponded to a conservative change (Table II A). Also, for the second sugar group of serum transferrin situated near its C-terminal end [16] a homologous sequence occurred in lactotransferrin, i.e., the N-terminal sequence of CNBr fragment FIII (present study). The latter was devoid of polysaccharide; at the level of the sugar carrying asparagine residue No. 608 [16] of serum transferrin, the presence of a residue of asparagine without the prosthetic group was observed in lactotransferrin, despite the presence of the code sequence Asn-Gly-Ser. 21 out of 41 amino acid residues were identical, and an additional two residues corresponded to conservative changes (Table II B). The alignment of the half-cystine residues in these two homologous sequences should also be pointed out.

When CNBr fragment FIII was digested by carboxypeptidases A and B, Arg (87%), Lys (77%), Leu (80%) and Phe (47%) were liberated. The same result was obtained when lactotransferrin was submitted to the action of the carboxypeptidases [18]. Thus, CNBr fragment FIII constitutes the C-terminal sequence of the protein.

(4). *Homology of glycopeptides of human lactotransferrin and hen ovotransferrin.* The glycopeptide isolated from CNBr fragment FII of human lactotransferrin was closely homologous to a glycopeptide of hen ovotransferrin [19]: 23 out of 36 amino acid residues were identical and an additional residue corresponded to a conservative change (Table I), whereas the corresponding sequence of human serum transferrin was devoid of sugars and presented a lower degree of homology as only seven out of 16 amino acid residues were identical. The alignment of the four cystine residues between the sequences of human lactotransferrin and hen ovotransferrin should more particularly be pointed out.

Conclusion

In conclusion, despite large homologies in the amino acid and sugar sequences between human serum and lactotransferrins, important differences were noted in the primary structures of some areas of the molecules as well as in the location of the prosthetic sugar groups which might reflect differences in their biological behaviour.

Acknowledgements

This research was supported by the I.N.S.E.R.M. (group U-116), the C.N.R.S. (E.R. 102, ATP A6513677 and LA 217), and the Fondation pour la Recherche Médicale Française. The excellent technical assistance of Mrs. C. Alonso, Mr. J.-P. Decottignies and Mr. Ly Quan Le (automated Edman degradation) is gratefully acknowledged.

References

- 1 Montreuil, J., Tonnelat, J. and Mullet, S. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 45, 413-421
- 2 Querinjean, P., Masson, P.-L. and Heremans, J.F. (1971) *Eur. J. Biochem.* 20, 420-425
- 3 Montreuil, J. and Spik, G. (1975) in *Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine* (Crichton, R.R., ed.), pp. 27-38, North-Holland, Amsterdam
- 4 Spik, G., Monsigny, M. and Montreuil, J. (1966) *C.R. Acad. Sci. Paris* 263D, 893-896
- 5 Spik, G. and Mazurier, J. (1977) in *Proteins of Iron Metabolism* (Brown, E.B., Aisen, P., Fielding, J. and Crichton, R.R., eds.), pp. 143-151, Grune and Stratton, New York
- 6 Spik, G., Vandersyppe, R., Montreuil, J., Tetaert, D. and Han, K.K. (1974) *FEBS Lett.* 38, 213-216
- 7 Mazurier, J., Spik, G. and Montreuil, J. (1974) *FEBS Lett.* 48, 262-265
- 8 Metz-Boutique, M.-H., Jollès, J., Mazurier, J., Spik, G., Montreuil, J. and Jollès, P. (1978) *Biochimie* 60, 557-561
- 9 Jollès, J., Mazurier, J., Boutique, M.-H., Spik, G., Montreuil, J. and Jollès, P. (1976) *FEBS Lett.* 69, 27-31
- 10 Chéron, A., Mazurier, J. and Fournet, B. (1977) *C.R. Acad. Sci. Paris* 284, 585-588
- 11 Crestfield, A.M., Moore, S. and Stein, W.H. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 622-627
- 12 Edman, P. and Begg, G. (1967) *Eur. J. Biochem.* 1, 80-91
- 13 Tarr, G.E., Beecher, J.F., Bell, M. and McKean, D.J. (1978) *Anal. Biochem.* 84, 622-627
- 14 Wang, K.T. and Woods, K.R. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 133, 366-369
- 15 Tomita, M., Furthmayr, H. and Marchesi, V.T. (1978) *Biochemistry* 17, 4756-4770
- 16 MacGillivray, R.T.A., Mendez, E. and Brew, K. (1977) in *Proteins of Iron Metabolism* (Brown, E.B., Aisen, P., Fielding, J. and Crichton, R.R., eds.), pp. 133-141, Grune and Stratton, New York
- 17 Bluard-Deconinck, J.M., Williams, J., Evans, R.W., van Snick, J., Osinski, P.A. and Masson, P.L. (1978) *Biochem. J.* 171, 321-327
- 18 Bluard-Deconinck, J.M., Masson, P.L., Osinski, P.A. and Heremans, J.F. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 365, 311-317
- 19 Kingston, I.B. and Williams, J. (1975) *Biochem. J.* 147, 463-472

l' α -lactalbumine (HILL et al.) (670). Enfin, certaines sont glycosylées sur un site et non sur les autres comme l'ovalbumine (DAYHOFF) (671) et la déoxyribonucléase (LIAO et al.) (672). Selon PLESS et LENNARTZ (673), le degré de glycosylation dépend de plusieurs facteurs comme la présence et la spécificité des glycosyl-transférases appropriées, la compartimentation subcellulaire et la maturation de la chaîne peptidique. Les travaux de AUBERT et LOUCHEUX (674), AUBERT, BISERTE et LOUCHEUX (675) et LOUCHEUX (676), puis de BEELEY (677) ont montré qu'en plus de la séquence code Asn-X-Ser(ouThr), le résidu d'asparagine doit se trouver dans une conformation en coude β pour être glycosylé. Nous avons donc essayé d'obtenir une image de la structure secondaire des chaînes peptidiques au voisinage du point d'attache des glycanes en utilisant les techniques de prédiction de CHOU et FASMAN (678).

B - PREDICTION DES STRUCTURES SECONDAIRES

1 - METHODE

Nous avons utilisé la technique mise au point par CHOU et FASMAN (679). Tout segment peptidique d'au moins six résidus d'acides aminés avec une probabilité $P(\alpha) > 1,03$ et $P(\alpha) > P(\beta)$ aura une conformation en hélice α à condition de respecter un certain nombre de règles que nous n'exposerons pas ici. (Biochemistry -1974- 13, 211-245). De même les segments peptidiques d'au moins 5 résidus d'acides aminés avec $P(\beta) > 1,05$ et $P(\beta) > P(\alpha)$ auront une conformation en feuillet plissé. Les tétrapeptides possédant une structure en coude β doivent répondre aux trois conditions suivantes : $P(\alpha) < 0,9$, $P(t) > P(\beta)$ et $P(t) > 0,510^4$.

2 - RESULTATS

Nous avons schématisé dans la figure 58 (p) les prévisions de structure secondaire obtenues pour chaque séquence glycosylée et de son homologue non glycosylée.

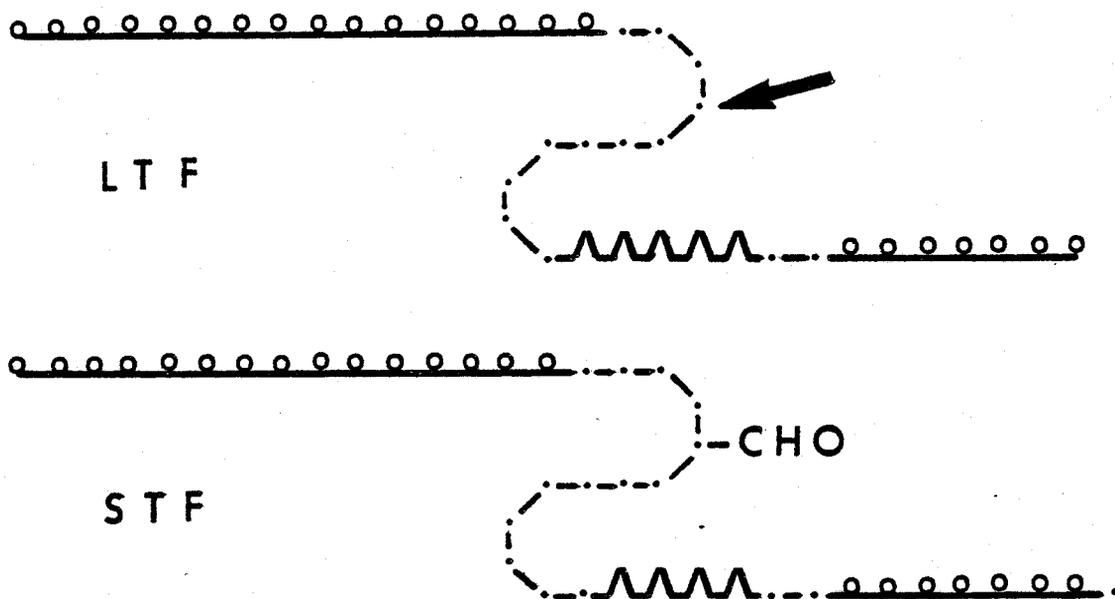
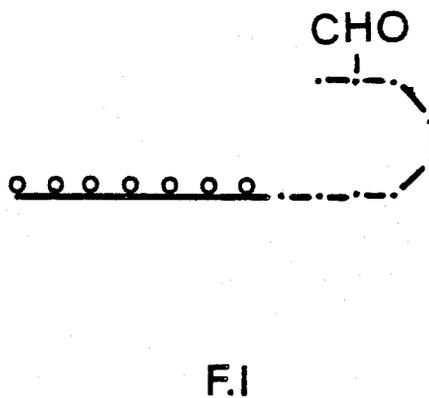
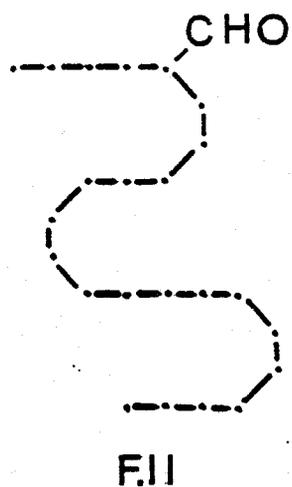


Figure 58

Prédiction de structure secondaire des glycopeptides de la lactotransferrine,
de la sérotransferrine et de leurs homologues non glycosylés



C - CONCLUSIONS

Tous les résidus d'asparagine glycosylés des deux transferrines se trouvent localisés dans un coude β ou à proximité d'un coude β . La structure secondaire prédite pour le fragment FIII de la lactotransferrine est absolument identique à celle obtenue pour son homologue de la sérotransferrine. L'asparagine non glycosylée se trouve dans un coude β . Nous sommes donc actuellement dans l'impossibilité d'expliquer l'absence de glycosylation du fragment FIII.

CONCLUSIONS GENERALES

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de notre travail, qui a porté sur les relations structure-activité biologique de deux glycoprotéines de la classe des transferrines : la lactotransferrine et la sérotransferrine, sont les suivantes :

Nous avons mis en évidence, pour la première fois, l'existence dans l'entérocyte humain d'un récepteur membranaire spécifique de la lactotransferrine. La lactotransferrine, en effet, transfère à l'entérocyte les ions Fe^{3+} avec une vitesse de $0,6 \text{ p mol} / Fe^{3+} / \text{mg tissu} / \text{mn}$. Cette vitesse est cinq fois supérieure à celle mesurée à partir de la lactotransferrine bovine. Quant aux ions Fe^{3+} , fixés par la sérotransferrine humaine et par l'ovotransferrine du blanc d'oeuf de Poule, nous avons montré qu'ils n'étaient pas incorporés par l'entérocyte. Ces résultats, associés à ceux obtenus antérieurement par d'autres auteurs, démontrent la spécificité de reconnaissance de chaque type de ferritransferrine pour une cellule cible

Sérotransferrine - réticulocyte

Ovotransferrine - cellule embryonnaire

Lactotransferrine - entérocyte

Le fait que seules les ferritransferrines soient reconnues par les cellules cibles, suggère que le transfert du fer induit une modification de la conformation entre les formes apo- et ferri- des transferrines.

Nous avons recherché l'explication, d'une part, de la spécificité de reconnaissance de la sérotransferrine et de la lactotransferrine pour leur cellule cible et, d'autre part, de la spécificité de reconnaissance des formes ferriques pour le récepteur membranaire au niveau :

- de la conformation de la sérotransferrine et de la lactotransferrine humaines en fonction de leur degré de saturation en fer,

- des sites de fixation du fer de ces deux transferrines,
- de la structure covalente de la lactotransferrine.

1. Les variations de conformation ont été analysées en dichroïsme circulaire, en différence de spectre et par dénaturation par le chlorhydrate de guanidine des formes apo- et ferri- des deux transferrines.

Les deux apotransferrines possèdent un taux d'hélicité faible : 17 % pour la sérotransferrine, 28 % pour la lactotransferrine. La fixation du fer n'entraîne pas dans ces 2 cas de modification d'hélicité détectable en dichroïsme circulaire. Cependant, lors des études de différences de spectre le départ des ions ferriques se traduit par l'exposition à différents perturbants de 2 résidus de tryptophane et de 7 résidus de tyrosine dans le cas de la sérotransferrine. L'exposition d'un nombre plus élevé de chromophores : 6 résidus de tryptophane et 10 de tyrosine dans le cas de la lactotransferrine suggère que cette molécule subit sous l'influence de la fixation du fer un remaniement moléculaire plus important.

Sous l'action d'une concentration croissante de chlorhydrate de guanidine, le déploiement de la chaîne peptidique de l'apo- et de la ferri-sérotransferrine sont identiques. Cependant, le premier ion Fe^{3+} est éliminé avant le début de la dénaturation, alors que la destruction du deuxième site métallique est synchrone du déploiement de la chaîne polypeptidique qui est terminée en présence de 2 M de Gu-HCl.

Dans le cas de la lactotransferrine, les résultats sont plus complexes. En effet, le comportement de l'apolactotransferrine est identique à celui de l'aposérotransferrine alors que celui de la ferri-lactotransferrine montre une dénaturation en 2 étapes. Au cours de la première étape (0-2 M Gu-HCl) semblable à celle de l'apo-lactotransferrine, il y a élimination d'un premier ion Fe^{3+} , la deuxième étape de dénaturation pendant laquelle le deuxième ion Fe^{3+} est éliminé se termine en présence de 4 M en Gu HCl. Ceci suggère que la grande stabilité de la ferrilactotransferrine est due essentiellement à un seul site métallique.

Ces résultats démontrent que l'accessibilité des 2 sites est différente pour les deux transferrines. L'un des 2 sites de la

sérotransferrine est extrêmement labile et est fort probablement localisé à la surface de la protéine. Le changement induit par la fixation (ou le départ) des ions métalliques sur les sites préexistants de la sérotransferrine est très limité et n'intéresse vraisemblablement que les sites métalliques eux-mêmes. Le remaniement de conformation de la lactotransferrine est plus important, principalement dans la région où se trouve localisé le site plus interne de la molécule.

2. La mise en évidence d'une différence de comportement des 2 sites de fixation du métal nous a amené à étudier plus en détail la structure et la stabilité des 2 sites métalliques de chacune des transferrines.

Jusqu'à présent seule la participation des résidus de tyrosine dans la coordination des ions Fe^{3+} était clairement établie. La présence de résidus d'histidine dans les sites métalliques était suggérée par les résultats obtenus en R.P.E. sur les 2 cupri-transferrines.

L'utilisation du diéthyl pyrocarbonate, réactif spécifique de l'histidine, nous a permis de confirmer l'intervention de l'histidine dans la fixation du fer et de démontrer en outre, pour la première fois, qu'un seul site dans les 2 transferrines est accessible au réactif. L'ion Fe^{3+} du site accessible est coordonné à un seul résidu d'histidine dans le cas de la lactotransferrine et à au moins deux résidus dans le cas de la sérotransferrine. L'analyse des spectres R.P.E. des cupritransferrines montre que le métal du deuxième site est coordonné par l'intermédiaire d'un seul noyau azoté. Cet azote non substitué par le diéthyl pyrocarbonate peut cependant appartenir à un noyau imidazole.

Ce résultat apporte une nouvelle preuve, d'une part, de la non identité des deux sites de chaque transferrine et, d'autre part, démontre que les 2 transferrines diffèrent dans la structure d'au moins un site, celui qui est accessible au diéthyl pyrocarbonate.

Parallèlement à ces recherches, d'autres auteurs ont démontré que dans le cas de la sérotransferrine les deux sites de fixation du fer pouvaient être différenciés par leur stabilité en fonction du pH. Néanmoins, dans les conditions expérimentales décrites pour la séro-

transferrine, le complexe fer-lactotransferrine reste stable à pH 3 ; au delà de ce pH, les 2 ions Fe^{3+} sont éliminés simultanément. Nous avons donc entrepris une étude systématique de l'influence du pH, de la force ionique et des agents chelateurs du fer sur la stabilité des 2 sites métalliques de la lactotransferrine. Les résultats obtenus nous ont permis de démontrer que dans la lactotransferrine, les 2 sites de fixation possèdent un comportement différent vis-à-vis du pH à condition de se trouver en présence d'une solution tampon de force ionique élevée et renfermant des ions phosphates ou E.D.T.A. Nous avons ainsi pu définir un site "acido-labile" qui libère le métal entre pH 7 et pH 6 et un site "acido-stable" qui libère le deuxième ion Fe^{3+} en dessous de pH 4.

D'autre part, l'étude de l'influence du pH sur la saturation en fer des apotransferrines montre que la lactotransferrine est capable de fixer dans un tampon citrate de faible force ionique spécifiquement un seul ion Fe^{3+} entre pH 4,6 et 6,2 sur le site "acido-labile". Dans ces mêmes conditions, le complexe fer - sérotransferrine est entièrement dissocié.

3. Nous avons tiré partie de la différence de stabilité des deux sites métalliques de la lactotransferrine pour essayer de localiser chacun d'entre eux sur la chaîne polypeptidique.

L'action de différents enzymes protéolytiques sur la lactotransferrine fixant un seul ion métallique, soit sur le site "acido-stable", soit sur le site "acido-labile", nous a ainsi permis d'isoler huit fragments glycopeptidiques gardant chacun la propriété de fixer un seul ion Fe^{3+} . Deux de ces fragments : C-pepsine et N-papaïne, ont été obtenus avec un degré de pureté suffisant pour entreprendre l'étude de leurs propriétés physicochimiques. Les fragments peptidiques fixant l'ion Fe^{3+} sur le site "acido-stable" ont un comportement électrophorétique acide et sont identifiés à l'extrémité C-terminale de la chaîne peptidique de la lactotransferrine. Les fragments peptidiques fixant le métal sur le site "acido-labile" ont un comportement électrophorétique basique et sont identifiés à une région peptidique localisée dans la portion N-terminale de la glycoprotéine.

Ces résultats et ceux obtenus par différents auteurs sur les 3 classes de transferrine, en particulier par l'équipe de Birbeck College par diffraction des RX sur la sérotransferrine de Lapin,

permettent d'envisager que la molécule de la lactotransferrine est organisée en au moins deux domaines.

La connaissance de la séquence peptidique covalente étant indispensable à la compréhension de la conformation globale de la molécule et de son activité biologique, nous l'avons abordée en isolant par coupure des liaisons méthionyles et après rupture des ponts disulfures sept fragments peptidiques : FI, FII, FIII, FIV, F'V, FVI et FVII. Deux de ces fragments : FI et FII, sont de nature glycopeptidique.

La détermination des séquences des sept fragments par le groupe du Professeur JOLLES a permis d'établir qu'il existe de nombreuses analogies structurales entre les chaînes peptidiques de la lactotransferrine, de la sérotransferrine humaines et de l'ovotransferrine du blanc d'oeuf de Poule.

La connaissance de ces séquences, ainsi que l'isolement des fragments BrCN à partir des fragments C-pepsine et N-papaine ont permis de réenchaîner six de ces fragments.

L'analyse comparée des chaînes peptidiques de la lactotransferrine et de la sérotransferrine nous a conduit aux remarques suivantes :

- La chaîne polypeptidique de ces deux protéines résulterait de la duplication d'un gène ancestral.

- La lactotransferrine possède un glycanne sur chaque domaine alors que, dans le cas de la sérotransferrine, les deux glycanes sont localisés dans le domaine C-terminal.

La lactotransferrine possède dans le domaine C-terminal une séquence peptidique Asn-X-Ser non glycosylée malgré sa position dans un coude β . Cette séquence possède un homologue glycosylé dans la sérotransferrine.

L'ensemble des résultats obtenus pour permet de proposer un schéma de la conformation de la lactotransferrine. Selon ce schéma, la lactotransferrine serait organisée en deux domaines :

. le domaine C-terminal qui a un caractère acide et est très résistant à la dénaturation ; il possède un glycanne et un site de glycosylation non glycosylé. Le site métallique de ce domaine est interne, inaccessible au diéthyl pyrocarbonate et coordine un

ion cuivrique par l'intermédiaire d'un seul noyau azoté.

. le domaine N-terminal qui a un comportement basique, possède un glycanne. Le site métallique de ce domaine sensible à l'action des ions phosphates est détruit par le diéthyl pyrocarbonate, réactif spécifique des résidus d'histidine.

Les différences mises en évidence au niveau de la conformation et au niveau de la structure des sites de fixation du métal entre la lactotransferrine et la sérotransferrine permettent d'expliquer dans une certaine mesure les spécificités de reconnaissance des deux molécules par des récepteurs membranaires de l'entérocyte et du réticulocyte.

BIBLIOGRAPHIE

- AASA R., AISEN P., J. Biol. Chem., 1968, 243, 2399-2404 (153,222)
- AASA R., AISEN P., J. Biol. Chem., 1972, 243, 2399-2403 (636,640,641)
- AASA R., MALMSTRÖM B., SALTMAN P., VÄNNGÅRD T., Biochim. Biophys. Acta, 1963, 75, 203-222 (138,167,174,203,220)
- ABOLA J.E., WOOD M.K., in abstracts of 4th International Conference on proteins of iron metabolism, DAVOS, 1979 (336)
- AISEN P., AASA R., MALMSTRÖM B., VÄNNGÅRD T., J. Biol. Chem., 1967 242, 2484 (143)
- AISEN P., AASA R., REDFIELD A.G., J. Biol. Chem., 1969, 244, 4628 (159, 161,181)
- AISEN P., BROWN E.B., Prog. Hematol., 1975, 9, 25-56 (6,120,387)
- AISEN P., LANG O., WOODWORTH R., J. Biol. Chem., 1972, 248, 649-653 (637)
- AISEN P., LEIBMAN A., Biochim. Biophys. Acta, 1971, 257, 314-323 (137, 168,172,176)
- AISEN P., LEIBMAN A., REICH H., J. Biol. Chem., 1966, 241, 1666-1671 (602)
- AISEN P., LEIBMAN A., ZWEIR J., J. Biol. Chem., 1978, 253, 1930-1937 (173)
- AL-HILAL P., BAKER E., CARLISLE C.H., GORINSKI B., HORSBURG R.L., LINDLEY P.F., MOSS D.S., SCHNEIDER H., STIMPSON R., J. Mol. Biol., 1976, 108, 255-257 (334,354)
- AUBERT J.P., BISERTE G., LOUCHEUX M.H., Arch. Biochem. Biophys., 1976, 175, 410-418 (674)
- AUBERT J.P., LOUCHEUX M.H., Arch. Biochem. Biophys., 1976, 175, 400-409 (673)
- AWAI M., BROWN E., J. Lab. Clin. Med., 1963, 61, 363 (17)
- AWAI M., CHIPMAN B., BROWN E.B., J. Lab. Clin. Med., 1975, 85, 769-784 (436,439)
- AZARI P.R., FEENEY R.E., Arch. Biochem. Biophys., 1961, 92, 44 (600)
- AZARI P., BAUGH R.F., Arch. Biochem. Biophys., 1967, 118, 138-144 (652)
- BAKER E.N., RUMBALL S.V., J. Mol. Biol., 1977, 111, 207-210 (337,352)
- BAKER E., SHAW D.C., MORGAN E.H., Biochemistry, 1968, 7, 1371-1378 (259)
- BAMBACH M., Klin. Wochschr., 1966, 44, 1276 (15)
- BARKAN G., Z. Physiol. Chem., 1927, 171, 194-221 (11)
- BARNES L.A., MAUER A.M., ANDERSON A.S. et al., Pediatrics, 1976, 58, 765-768 (563)
- BATES G.W., SCHLABACH M.R., F.E.B.S. Letters, 1973, 33, 289 (187,227,625)
- BATES G.W., WORKMAN E.F., SCHLABACH M.R., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1973, 50, 84 (157)

- BEARN A.G., PARKER W.C., in *Glycoproteins* Elsevier, Gottschalk Ed., 1966, 413 (242)
- BEELEY R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, 76, 1051 (676)
- BENNETTS R.M., EDDIE QUARTEY A.C., HOLT P.T.L., *Arthritis Rheum.*, 1973, 16, 186-190 (524,560)
- BENNETT R., MOHLA C., *J. Lab. Clin. Med.*, 1976, 88/1, 156-166 (520)
- BERESFORD C., NEALE R.J., BROOKS O.G., *Lancet*, 1971, i : 568-572 (511)
- BERGGARD I., *Nature*, 1960, 187, 776 (19)
- BEUTLER E., BUTTENWEISEN E., *J. Lab. Clin. Med.*, 1960, 55, 274-280 (497)
- BEZKOROVAINY A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, 126, 286 (312)
- BEZKOROVAINY A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, 127, 535 (95)
- BEZKOROVAINY A., *Comp. Biochem. Physiol.*, 1974, 47, 787 (293)
- BEZKOROVAINY A., GROHLICH D., *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, 147, 497 (96)
- BEZKOROVAINY A., GROHLICH D., *Biochem. J.*, 1971, 123, 125-126 (225,624)
- BEZKOROVAINY A., GROHLICH D., *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 263, 645 (212)
- BEZKOROVAINY A., GROHLICH D., *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 310, 365 (289)
- BEZKOROVAINY A., GROHLICH D., GERBECK ., *Biochim J.*, 1968, 110, 765 (262)
- BEZKOROVAINY A., ZSCHOCKE R., *Arzneim-Forsch (Drug.Res)*, 1974, 24, 476 (231-238)
- BEZKOROVAINY A., RAFELSON M., *Arch. Biochim. Biophys.*, 1964, 107, 302 (94)
- BEZKOROVAINY A., RAFELSON M., LIKHTE V., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1963, 103, 371 (93)
- BISERTE G., HAVEZ R., CUVELIER R., *Exp. Ann. Biochim. Méd.*, 1963, 25, 85 (36)
- BLANC B., Thèse Doct. ès Sciences, éd. Médecine et Hygiène, Genève, 1964 (25,466,468)
- BLANC B. in Peeters H., *Protides of the Biological Fluids*, Elsevier éd., Amsterdam, 1966, 14, 125 (475,532)
- BLANC B., ISLIKER H., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1961, 43, 929 (531)
- BLANC B., ISLIKER M., *Helv. Chim. Acta*, 1963, 322, 2905 (473)
- BLANC B., MAGNETAT P., DE LALLOYE B., in *Iron deficiency-Pathogenesis-Clinical aspect, therapy*, Academic Press, HALBERG et al. ed, London, 1970, 135-150 (570)
- BLUARD-DECONINCK J.M., MASSON P.L., OSINSKI P.A., HEREMANS J.F., *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, 365, 311-317 (237,248,268,284)
- BLUARD-DECONINCK J.M., WILLIAMS J., EVANS R., VANSNICK J., OSINSKI P.A., MASSON P.L., *Biochem J.*, 1978, 171, 321-327 (326,649,650,653,655,657)
- BOARD R.G., *Adv. Appl. Microbiol.*, 1969, 11, 245-281 (555)
- Van BOCKXMEER F.M., MORGAN E.M., *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, 437-450 (408)
- Van BOCKXMEER F.M., YATES G., MORGAN E.M., *Eur. J. Biochem.*, 1978, 92, 147-154 (409)
- BOOK L.S., HERBST J.J., ATHERTON S.O., JUNG A.L., *J. Pediatr.*, 1975, 87, 602-605 (565)

- BOTHWELL T.H., FINCH C.A. in Iron Metabolism, T.M. Bowthwell and C.A. Finch ed., Boston, 1962, 120-128 (54,494)
- BOUTIGUE M.H., JOLLES J., CHARET P., MONTREUIL J., JOLLES P., Biochimie, 1976, 58, 891 (299,306)
- BRISE H., HALLBERG C., Acta Med. Scand., 1962, Supp. 358 to 168, 23-27 (459)
- BROCK J.H., ARZABE F., F.E.B.S. Letters, 1976, 69/1, 63-66 (324)
- BROCK J.H., ARZABE F., LAMPREAVE F., PINEIRO A., Biochim. Biophys. Acta, 1976, 446, 214-225 (323)
- BROCK J.H., ARZABE F., RICHARDSON N., DEVERSON E., Biochem. J., 1978, 171, 73-78 (322)
- BROWN J.W., in Proteins of iron metabolism, Brown ed., New-York, 1976 (122)
- BROXMEYER F., J. Clin. Invest., 1979, 64, 1717-1720 (566)
- BRUNE J.E.L., MARTIN S.R., BOYD B.S., PALMOUR R.M., SUTTON H.E., Texas Reports on Biology and Medicine, 1978, V 36, 47-61 (307)
- BRYCE C.F.A., CRICHTON R.R., Biochem. J., 1973, 133, 301-309 (66)
- BULLEN J.J., CUSHNIE G.H., ROGERS H.J., Immunology, 1957, 12, 303-312 (547)
- BULLEN T.J., ROGERS H.J., LEIGH L., Brit. Med. J., 1972, 1, 69 (551-553)
- BURSTEIN Y., WALSH K.A., NEURATH H., Biochemistry, 1974, 13, 205-210 (627)
- CAMPBELL R.F., CHASTEEN N.D., J. Biol. Chem., 1977, 252, 5996-6001 (186)
- CANNON J.L., CHASTEEN N.D., in Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine, CRICHTON R.R. ed., North Holland, Amsterdam, 1975, 67 (162,206)
- CANNON J.L., CHASTEEN N.D., Biochemistry, 1975, 14, 4573 (151)
- Mac CANSE R.A., WIDDONSON E.M., Lancet, 1937, 1, 680-684 (493)
- CARTWRIGHT G.E., Sem. Hematol., 1966, 3, 351 (443,444,542)
- CARTWRIGHT C.E., LAURITSEN M.A., JONES P.J., MERRILL I.M., WINTRUBE M.M., J. Clin. Invest., 1946, 25, 65-80 (512)
- CASTNER J., NEWELL G.S., MOLTON W.C., SIICHTER C.P., J. Chem. Phys., 1960, 32, 668 (177)
- CHARET P., Thèse Doc. ès Sci., 1975, Lille (251,279,287)
- CHARET P., C.R. Acad. Sci., 1975, 280 D, 2049-2052 (291)
- CHARET P., MONSIGNY M., SPIK G., MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., 1969, 269 D, 1019 (277)
- CHARET P., MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., 1971, 273 D, 533 (278)
- CHARET P., SPIK G., MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., 1971, 273 D, 422 (276-303)
- CHARET P., TETAERT D., MAN K.K., MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., 1973, 276 D, 1629-1630 (280)
- CHARLWOOD P.A., Biochem. J., 1963, 88, 394 (97)
- CHARLWOOD P.A., Biochim. Biophys. Acta, 1979, 581, 260-265 (166)
- CHASTEEN N.P., Coordination Chem. Rev., 1977, 22, 1-36 (10,119,125,182,198)
- CHASTEEN N.D., WHITE L.K., CAMPBELL R.F., Biochemistry, 1977, 10, 363 (160)
- CHEN Y.H., YANG J.T., MARTINEZ H.H.M., Biochemistry, 1972, 11, 4120-4131 (607)

- CHERON A., MAZURIER J., FOURNET B., C.R. Acad. Sci., 1977, 284, 585-588 (368)
- CHERON A., Thèse Doc. ès Sci., 1975, Lille (367)
- CHOU P., FASMAN G., Biochemistry, 1974, 13, 211-245 (677,678,679)
- COLOMB E., ESTEVENON J.P., FIGARELLA C., OGUY O., SARLES H., Biochim. Biophys. Acta, 1974, 342, 306-312 (556)
- COLOMB E., PIANETTA A., ESTEVENON C., GUY O., FIGARELLA C., SARLES H., Digestion, 1976, 14, 242 (558)
- CONRAD M.E., CROSBY W.H., Blood, 1963, 22, 406-415 (502)
- COOK J.D., MARSAGLIA G., ESCHBACH J., J. Clin. Invest., 1970, 49, 197-205 (47)
- COX T., PETERS T., Lancet, 1978, 1, 123-124 (581,583,585)
- COX T., PETERS T., J. Physiol., 1979, 289, 469-478 (506)
- CRESTFIELD A., MOORE S., STEIN W., J. Biol. Chem., 1963, 238, 622-627, (615,659)
- CRICHTON R., in Proteins of Iron Storage, Crichton ed., North-Holland, Amsterdam, 1975 (121)
- CRICHTON R.R., WAUTERS M., ROMAN P., in Proteins of Iron Storage, Crichton ed., North Holland, Amesterdam, 1975, 287-294 (73)
- CROSBY W.H., Blood, 1963, 22, 441-449 (501)
- CROSBY W.H., KUGLER H.W., Am. J. Dig. Dis., 1957, 2, 236-241 (580)
- DAVIS P., SALTMAN P., BENSON X., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1962, 8, 56 (171)
- DAYHOFF M.O., in Atlas of Protein Sequence and Structure, DAYHOFF ed., Washington, 1972, 5 (286,666)
- DAYHOFF M.O., in Atlas of Protein Sequence and Structure, DAYHOFF ed., Washington, 1973, 5/S1 (670)
- DE LAEYS M., MASSON P.L., HEREMANS J.F., in Protides Biol. Fluids Proc. Coll Colloq. BRUGES H. PEETERS ed., Pergamon Press, Oxford, 1968, 16, 627-632 (569-571)
- DESCAMPS J., Thèse Doctorat ès Sciences, 1975, Lille (587)
- DE VET B., Van GOOL J., Acta Med. Scand., 1974, 196, 393-402 (572,574,590)
- DE VET B., Van HOOPEN C., Acta Med. Scand., 1978, 203, 197-203 (573)
- DONOVAN J.W., J. Biol. Chem., 1969, 244, 1961-1967 (617)
- DONOVAN J.W., in Proteins of iron metabolism, Brown ed., New-York, 1976, 179-186 (338)
- DONOVAN J.W., BEADSLEE R.A., ROSS K.P., Biochem. J., 1976, 153, 631-639 (330-333)
- DONOVAN J.W., ROSS K., J. Biol. Chem., 1975, 250, 6026 (329)
- DORLAND L., HAVERKAMP J., SCHUT B.L., Vliegenthart J.F.G., SPIK G., STRECKER G., FOURNET B., MONTREUIL J., F.E.B.S. Letters, 1977, 77, 15-20 (356)
- DORLAND L., HAVERKAMP J., Vliegenthart J., SPIK G., FOURNET B., MONTREUIL J., Eur. J. Biochem., 1979, 100, 569-574 (366,378)

- DOWDLE G.B., SCHACHTER D., SHENKER H., *Am. J. Physiol.*, 1960, 198, 609 (480)
- DRYSDALE J.W., AROSIO P., ADELMAN T., in *Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine*, CRICHTON ed., Amsterdam, 1975, 359-366 (51)
- DRYSDALE J.W., MONRO D.M., *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 3630-3637 (61)
- DUBACH R.S., CALLENDER T.E., MOORE C.V., *Blood*, 1948, 3, 526-542 (513)
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F., *Anal. Chem.*, 1956, 28, 350 (660)
- DUNLAN R., LLOYD J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, 544, 647-655 (589)
- EDELHOCH M., *Biochemistry*, 1967, 6, 1948-1954 (616)
- EDWARDS C.Q., DEISS A., COLE B.C., WARD J.R., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1975, 150, 664-668 (522)
- EGGYED A., *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, 1974, 9, 43-52 (413)
- Van EIJK H.G., NOORT W.L., KROOS M.J., HEUL L., *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1978, 16, 557-560 (332)
- ELLEMAN T.C., WILLIAMS J., *Biochem J.*, 1970, 116, 515-535 (269,283,284)
- EL SHOBAKI F.A., RUMMEL W., *Res. Exp. Med.*, 1977, 171, 243-253 (503)
- EVANS G.W., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1976, 151, 775 (165)
- EVANS R.W., WILLIAMS J., *Biochem J.*, 1978, 173, 543-552 (327)
- EVANS R.W., WINTER G.W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975, 66, 1218 (164)
- EWERBECQ H., *Klin. Wochschr.*, 1950, 28, 692 (21)
- FAUST C.H., TENDERDY R.P., *Immunochemistry*, 1971, 8, 211 (313)
- FEDAIL S.S., SALMON P.R., HARVEY R.F., READ A.E., *The Lancet*, 1978, 28, 181-182 (559)
- FEENEY R.E., *Biochim. Biophys. Acta*, 1951, 34, 196 (535)
- FIALA S., *Czechoslov. Chem. Com. Trav. Chim.*, 1949, 14, 287-290 (621)
- FIGARELLA C., SARLES H., *Scand. J. Gastroent.*, 1975, 10, 449 (557)
- FINBERG R.A., GREENBERG D.M., *J. Biol. Chem.*, 1955, 214, 97-106 (62)
- FINCH S.C., FINCH C.A., *Medicine*, 1955, 34, 381-430 (421)
- FLETCHER J., HUEHNS E.R., *Nature*, 1967, 215, 584-586 (192,434,441)
- FLETCHER J., HUEHNS E.R., *Nature*, 1968, 218, 1211-1298 (433,435,598,622)
- FORD-HUTCHINSON A.W., PERKINS D., *Eur. J. Biochem.*, 1972, 25, 415-419 (219)
- FORTH W., LICHTENBERG H., RUMMEL W., *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 1965, 250, 234-235 (461)
- FORTH W., RUMMEL W., *Physiological Reviews*, 1973, 53/3, 746-753 (4,449,462)
- FRAENKEL-CONRAT H., FEENEY R.E., *Arch. Biochem.*, 1950, 101, 29 (124)
- FRESNOY N., GOUSSAULT Y., BOURRILLON R., *Biochimie*, 1971, 53, 1207-121 (20)
- FRIEDEN E., OSAKI S., *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1974, 48, 235-265 (71)
- GABER B.P., MISKOWSKI V., SPIRO T.G., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1974, 96, 6868 (213)

- GABL F., WACHTER M., in Protides of the Biological Fluids, 9è Colloque de Bruges (1961), Elsevier ed., 1962, 336 (28)
- GARIBALDI J.A., J.Bacteriol., 1971, 105, 1036-1038 (540)
- GARIBALDI J.A., J.Bacteriol., 1972, 110, 262-265 (539)
- Mac GILLIVRAY R., MENDEZ E., BREW K., in Proteins of Iron Metabolism BROWN et al. ed, Grune and Stratten, New-York, 1977, 133-141 (188, 233, 253, 282, 300, 302, 305, 662, 663)
- GITLIN J., GRUCHAUD M., J. Clin. Invest., 1962, 41, 344-350 (464)
- GOLLNER I., Behringwerk. Mitt., 1955, 30, 42 (239)
- GORINSKI B., HORSBURGH C., LINDLEY P.F., MOSS D.S., PARKAU M., WATSON J.C., Nature, 1979, 281, 157-158 (335, 339, 355)
- GOT R., GOUSSAULT Y., FONT J., Carbohydrate Res., 1966, 3, 157 (256)
- GRAHAMS I., WILLIAMS J., Biochem. J., 1975, 145, 263-279 (245, 252, 281, 285, 287, 304)
- GRANICK S., Bull. N.Y. Acad. Med., 1954, 30, 81 (478-479)
- GREEN F., FEENEY R., Biochemistry, 1968, 7, 1367 (78, 257, 261)
- GREEN S., MAZUR A., J. Biol. Chem., 1957, 227, 653-668 (68)
- GROHLICH D., COLIN G., MORLEY D., BEZKOROVAINY A., Int. J. Biochem., 1979, in press (431)
- GROHLICH D., COLIN G., MORLEY D., MILLER R.J., BEZKOROVAINY A., Biochem. Biophys. Research. Com., 1977, 76/3, 682-690 (432)
- Van GUGH H., Van GOOL J., LADIGES N., BOERS W., Quaterly Journal of Experimental Physiology, 1975, 60, 79-88 (575, 591)
- HAHN D., Eur. J. Biochem., 1973, 34, 311-316 (437)
- HAHN P.F., JONES E., LOWE R.L., MENEELY G.R., PEACOK W., Amer. J. Physiol., 1945, 143, 191 (458)
- HALLIDAY J.W., POWELL L.W., MACK U., in Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine, CRICHTON ed., 1975, 405-410 (489)
- HALLIDAY J.W., POWELL L.W., MACK U., Br. J. Haematol., 1976, 34, 237-250 (485)
- HANSEN N.E., KARLE H., ANDERSEN V., MALMQUIST J., HOFF G.E., Clin. Exp. Immunol., 1976, 26, 463-468 (525)
- HANSEN N., MALMQUIST J., THORELL J., Acta Med. Scand., 1975, 198, 437-443 (517)
- HANSON L.A., Experimentia, 1959, 15, 473 (22)
- HARDWICKE J., BAKER K.J., RANKIN J.G., PREISIG R., in Protides of Biological Fluids, 10è Colloque de Bruges (1962) Elsevier ed., 1963, 218 (26)
- HARMON R.J., SCHANBACHER F.L., FERGUSON L.C., SMITH K.L., Infect. Immun., 1976, 13, 533-542 (526)
- HARRIS D.C., Biochemistry, 1978, 17, 3071-3078 (391)
- HARRIS D.C., AISEN P., Biochemistry, 1975, 14, 262-268 (440)
- HARRIS D.C., GRAY G.A., AISEN P., J. Biol. Chem., 1974, 249, 5261 (152, 185, 190)

- HARRISON P.M., J. Mol. Biol., 1963, 6, 404-422 (49)
- HARRISON P.M., HOY T.G., MACARA I.G., MOABE R.J., Biochem. J., 1974, 143, 445 (392)
- HARWICKE J., BAKER K., RANKIN J., PREISIG R., in Protides of Biological Fluids, 10è Colloque de Bruges (1962), Elsevier Ed., 1963, 218 (26)
- HECKMAN A.M., Biochim. Biophys. Acta, 1971, 251, 380 (586)
- HECKMAN A.M., RUMKE P., in Peeters H. Protides of the Biological Fluids, Elsevier Ed., Amsterdam, 1968, 16, 549 (41)
- HELBOCK H.J., SALTMAN P., Biochim. Biophys. Acta, 1967, 135, 979 (481)
- HEMMAPLADH D., MORGAN E.M., Biochim. Biophys. Acta, 1974, 373, 84 (393)
- HEMMATI S., Deut. Med. Wochschr., 1968, 93, 1468-1472 (453)
- HERSHKO C., Br. J. Haematol., 1975, 29, 199-204 (424)
- HERSHKO C., Haematology, 1977, 10, 105 (46,57,384)
- HERSHKO C., COHEN H., ZAJICEK C., Br. J. Haematol., 1976, 33, 505-517 (46)
- HERSHKO C., COOK J.D., FINCH C.A., J. Lab. Clin. Med., 1972, 80, 624-634 (423)
- HERSKOVITS T., LAWKOWSKI M., J. Biol. Chem., 1960, 235 P 6, 56-57 (618)
- HERSKOVITS T., LAWKOWSKI M., J. Biol. Chem., 1962, 237, 2481-2492 (619)
- HERSKOVITS T., SORENSEN M., Biochemistry, 1968, 7, 2523-2532 (620)
- HEUBNER W., Dtsch. Med. Wschr., 1924, 68, 131 (456)
- Von HEVESY G., Von LOCKNER D., Arkiv. Kemi., 1961, 19/26, 205-285 (492)
- HILL R.L., BREW K., Adv. Enzymol., 1975, 43, 419-425 (669)
- HOARE R.J., HARRISON P.M., HOY T.G., in Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine, CRICHTON Ed., Amsterdam, 1975, 231-236 (50)
- HOLMBERG C., LAURELL C., Acta Physiol. Scand., 1945, 10, 307 (12)
- HOY T.G., HARRISON P.M., Brit. J. Haematol., 1976, 33, 497-504
- HUEBERS H., HUEBERS E., Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 1974, 355, 1159 (483)
- HUEBERS H., RUMMELS W., in Intestinal permeation Proceeding of the fourth Workshop Conference HOECHST Schlön Reisenberg, 19-22 Octobre 1975 (463)
- HUEBERS H., HUEBERS E., RUMMEL W., in Iron metabolism and its disorders, 1975, 12-21 (482,491)
- HUEBERS H., HUEBERS E., RUMMEL W., CRICHTON R., Eur. J. Biochem., 1976, 66, 447-455 (484,488)
- HUIDOBROTECH G., in Immunoelktrophoretische Untersuchungen an Kolostrum und Frauenmilch, Med. Diss., Freiburg in Breisgan, 1959 (23)
- HUNT L.T., DAYHOFF M.O., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1970, 39, 757-765 (667)
- HYDE A.S., Am. J. Physiol., 1957, 191, 265-270 (505)
- ISOBE K., SAKURAMI T., in XVII Cong. Int. Soc. Hematol., Paris, 1978, 467 (594)

- IMMAN J.K., Thèse Doc. Med. Harvard, 1956 (308)
- JAGER B., J. Clin. Invest., 1949, 4, 792 (14)
- JAMIESON G., Biochim. Biophys. Res. Commun., 1964, 17, 775 (111)
- JAMIESON G., J. Biol. Chem., 1965, 240, 2914 (110)
- JAMIESON G., JETT M., DEBARNADO S.L., J. Biol. Chem., 1971; 246
3686-3693 (346)
- JANDL J.H., INMAN J.K., SIMMONS R.L., ALLEN D.W., J. Clin. Invest.,
1959, 38, 161 (395,595)
- JANDL J.H., KATZ , J. Clin. Invest., 1963, 42, 314 (396,597)
- JARNUM S.J., LASSEN N.A., Scand. J. Clin. Invest., 1961, 13, 357-368
(523)
- JARRITT P.M., CHARLWOOD P.A., Biochim. Biophys. Acta, 1976, 453,
319-331 (169,170)
- JEPSSON J.O., Acta. Chem. Scand., 1967, 21, 1686 (254)
- JEPSSON J.O., Biochim. Biophys. Acta, 1967, 140, 477 (243,288)
- JIRGENSONS B., Biochim. Biophys. Acta, 1970, 200, 9-17 (614)
- JOHANSON B., Acta Chem. Scand., 1960, 14, 510 (33,140)
- JOLLES J., CHARET P., JOLLES P., MONTREUIL J., F.E.B.S. Letters,
1974, 46, 1, 276-280 (298,305)
- KATZ J., J. Clin. Investig., 1961, 40, 2143 (18)
- KAUFMAN R.M., POLLACK S., CROSBY W.H., Blood, 1966, 28, 726-737 (500)
- KAUFMAN N., WYLLIE J.L., NEWKIRK M., Biochim. Biophys. Acta, 1977,
497, 719-727 (487)
- Mac KAY R.H., FINEBERG R.A., Arch. Biochem. Biophys., 1964, 104,
496-508 (53)
- Mac KAY R.H., FINEBERG R.A., Arch. Biochem. Biophys., 1964, 104,
487-495 (52)
- KINGSTON I.B., WILLIAMS J., Biochem. J., 1975, 147, 463-472 (246,301)
- KLEMPNER M.S., DINARELLO C.A., GALLIN J.I., J. Clin. Invest., 1978,
1330-1336 (538)
- KOCHAN I., Microorganisms and minerals, WEINBERG Ed., DELLERS Inc.,
N.Y. (541)
- KOENIG S., SCHILLINGER W., J. Biol. Chem., 1969, 244, 3283 (230)
- KOENIG S., SCHILLINGER W., J. Biol. Chem., 1969, 244, 6520 (229)
- KONAPKA K., F.E.B.S. Letters, 1978, 92-2, 308-312 (419)
- KONAPKA K., TURSKA E., F.E.B.S. Letters, 1979, 105, 85-89 (420)
- KORNFELD S., Biochemistry, 1968, 7, 945-954 (405,407)
- KRANTZ S., GOLDWASSER E., JACOBSON L.O., Blood, 1959, 14, 654-661 (496)
- LAUFBERGER V., Bull. Soc. Chim. Biol., 1937, 19, 1575-1582 (48)
- LAURELL C.B., INGELMAN B., Acta Chem. Scand., 1947, 1, 770 (136)

- LEFFEL M.S., SPITZNAGEL J.K., *Infect. Immun.*, 1972, 6, 761 (43)
- LEFFEL M., SPITZNAGEL J., *Infect. Immun.*, 1975, 18/4, 813-820 (519)
- LEGER D., Thèse Doc. 3ème Cycle, 1974, Lille (265)
- LEGER D., Communication personnelle (328)
- LEGER D., SPIK G., VERBERT A., DUPIRE C., MONTREUIL J., XIè Journées Biochimiques Latines, Salamanque, 24-27 Avril 1973, C 66 (79,104,266)
- LEGER D., TORDERA V., SPIK G., DORLAND L., HAVERKAMP J., VLIEGENTHART J.F.G., *F.E.B.S. Letters*, 1978, 93, 255-260 (364)
- LEGER D., VERBERT A., LOUCHEUX M.H., SPIK G., *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 1977, 17 (5-A), 737-747 (75,106,267)
- LEHRER S.S., *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 3613 (209,216)
- LEIBMAN A., AISEN P., *Blood*, 1979, 53, 1058-1065 (200)
- LESTAS A.N., *Br. J. Haematol.*, 1976, 32, 341 (195)
- LIAO T.H., SALNIKOW J., MOORE S., STEIN W., *J. Biol. Chem.*, 1973, 248, 1489-1495 (671)
- LINE W.F., SLY D.A., BEZKOROVAINY A., *Int. J. Biochem.*, 1976, 7, 203-208 (325,578,584,646,651,656)
- LLINAS M., in *Structure and Bonding* Springer Verlag Berlin Heidelberg, New-York, 1973, 17, 195-220 (232)
- LOISILLIERS F., GOT R., BURTIN F., GRABBAR F., in Peeters H., *Protides of the Biological Fluids*, Elsevier Ed., Amsterdam, 1960, 14, 133 (37)
- LOOSEMORE M.J., PRATT R.F., *F.E.B.S. Letters*, 1976, 72, 155 (626-630)
- LOUCHEUX M.H., *L'actualité chimique*, 1980, Janvier, 12-27 (675)
- LOWRY O., ROSEBROUGH W., FARR A., RANDALL R., *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265-275 (605,638)
- LUK C.K., *Biochemistry*, 1971, 10, 2838 (149,204,210)
- LYNCH S.R., LIPSCHITZ D.A., BOTHWELL T.H., CHARLTON R.W., in *Iron in Biochemistry and Medicine*, Jacobs A. and Worwood M. Ed., Academic Press, London, 564-585 (385,397), 1974
- MACARA I.G., HOY T.G., HARRISON P.M., *Biochem. J.*, 1972, 126, 151-162 (65)
- MACKAY H.M.M., *Arch. Dis. Child.*, 1928, 3, 117-125 (564)
- MAGDOFF-FAIRCHILD B., LOW B.W., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1970, 138, 703 (353)
- MAKEY D.G., SEAL V.S., *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 453, 250-256 (199, 201,331,603) MALMQUIST J.,
- MALMQUIST J., THORELL J., WOLLHEIN A., *Acta Med. Scand.*, 1977, 202, 313-318 (561)
- MANN K.G., FISH W.W., COX A.L., TANFORD C., *Biochemistry*, 1970, 9, 1348 (77,102,258,263)
- MARTIN C.M., JANDL J.H., FINLAND M., *J. Infect. Diseases*, 1963, 112, 158 (549)

- MASON D.Y., TAYLOR C.R., *J. Clin. Path.*, 1978, 31, 316-327 (30,593)
- MASSON P.L., in "La Lactoferrine", Arscia Ed., Bruxelles, 1970 (44,477,592)
- MASSON P.L., HEREMANS J.F., in Peeters H., *Protides of the Biological Fluids*, Elsevier Ed., Amsterdam, 1966, 14, 115 (5,34,144,533)
- MASSON P.L., HEREMANS J.F., *Eur. J. Biochem.*, 1968, 6, 579-584 (108)
- MASSON P.L., HEREMANS J.F., DIVE C., *Clin. Chim. Acta*, 1966, 14, 735 (38)
- MASSON P.L., HEREMANS J.F., SCHONNE E., *J. Exp. Med.*, 1969, 130, 643 (42)
- MASSON P., HEREMANS J.F., SCHONNE E., CRABE P.A., in Peeters H., *Protides of the Biological Fluids*, Elsevier Ed., Amsterdam, 1968, 16, 633 (40)
- MAZUR A., GREEN S., CARLETON A., *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 595-603 (414)
- MAZUR A., GREEN S., SAHA A., *J. Clin. Invest.*, 1958, 37, 1809-1817 (69,70)
- MAZURIER J., Thèse Doct. 3ème cycle, Lille, 1974 (292)
- MAZURIER-DEHAINE C., Thèse Doct. 3è cycle, 1973, Lille (45)
- MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J., *F.E.B.S. Letters*, 1974, 48, 262-265 (236,658)
- MEARES C.F., LEDBETTER J.E., *Biochemistry*, 1977, 16, 5178 (205)
- MENDEL G.A., *Blood*, 1961, 18, 727-735 (498)
- METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., JOLLES P., MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, sous presse (271)
- Mac MILLAN J.A., LANDAW S.A., OSKI F.A., *Pediatrics*, 1976, 58, 686 (470)
- MILLAR J.A., CUMMING R.L.C., SMITH J., *Biochem. J.*, 1970, 119, 643-649 (58)
- MONSIGNY M., CHARET P., SPIK G., MONTREUIL J., *Arch. Inter. Physiol. Biochim.*, 1969, 77, 750 (275)
- MONTREUIL J., communication personnelle (554-568)
- MONTREUIL J., *Pure and Applied Chem.*, 1975, 42, 431-477 (357,369,379)
- MONTREUIL J., ADAM-CHOSSON A., SPIK G., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, 47, 1867 (345)
- MONTREUIL J., BISERTE G., MULLET S., SPIK G., LEROY N., *C.R. Acad. Sci.*, 1961, 252, 4065 (80,88,128,234,241,128)
- MONTREUIL J., FOURNET B., SPIK G., STRECKER G., *C.R. Acad. Sci.*, 1978, 287, 837-840 (380,388)
- MONTREUIL J., LEGER D., SPIK G., Communication personnelle (404,415)
- MONTREUIL J., MULLET S., *C.R. Acad. Sci.*, 1960, 250, 1376 (1,31)
- MONTREUIL J., SPIK G., in R.R. CHRICHTON : *Proteins of iron storage and transport in Biochemistry and Medicine*, North Holland Ed. Amsterdam, 1975, 27-38 (86,118,132,360,376)
- MONTREUIL J., SPIK G., CHOSSON A., *C.R. Acad. Sci.*, 1962, 255, 3493 (344)
- MONTREUIL J., SPIK G., MONSIGNY A., DESCAMPS J., BISERTE G., DAUTREVAUX M., *Experientia*, 1965, 21, 254 (90,129)

- MONTREUIL J., TONNELAT J., MULLET S., *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 45, 413 (2,8,32,35,89,99,105,115,134,139,469,530,604)
- MONTREUIL J., Vliegenthart J.F.G., *Proceedings of the fourth international symposium on glycoconjugats*, 1979, 1, 35-78 (381)
- MOORE C.V., DUBACH R., MINNINCH V., ROBERTS H.K., *J. Clin. Invest.*, 1944, 23, 755 (457)
- MOORE C.V., MINNINCH V., WELCH J., *J. Clin. Investig.*, 1939, 18, 543 (29)
- MORGAN E.M., in *IRON in Biochemistry and Medicine*, Jacobs and Worwoods Ed., Academic Press, 1974, 30-63 (7,386,399,401,406)
- MULLER-EBERHARD V., BOSMAN C., LIEM H.H., *Lab. J. Clin. Med.*, 1970, 76, 426-431 (425)
- MUNRO H.N., LINDER M.L., *Physiol. Revs*, 1978, 58, 317-396 (428)
- MURRAY M.J., STEIN N., *Gastroenterology*, 1966, 51, 694-700 (495)
- NAGY B., LEHRER S.S., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1972, 148, 27-36 (317,611)
- NIEDERER W., *Experientia*, 1970, 26, 218,220 (63,64)
- OCTAVE J.N., SNEIDER Y.J., HOFFMANN P., TROVET A., CRICHTON R., *F.E.B.S. Letters*, 1979, 108-1, 127-130 (402)
- ORAM J.P., REITER B., *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 170, 351 (534)
- OSAKI S., JOHNSON D.A., FRIEDEN E., *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 3018-3023, (389,390,398)
- OSBORNE J., CAMPBELL R.F., *J. Am. Chem. Soc.*, 1900, 22, 422 (123)
- OVADI J., LIBOV S., ELÖDI P., *Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, 1967, 2, 455-458 (629,632)
- PALMOUR R.M., SUTTON H.E., *Biochemistry*, 1971, 10, 4027 (103)
- PAPE L., MULTANI J.S., SPITT C., *Biochemistry*, 1968, 7, 606-612 (60)
- PARKER W.C., CRESTFIELD A.M., BEARN A.G., in *Gottschalh A. Glycoprotein*, Elsevier Ed., 1966, 423 (260)
- PARTRIDGE S.M., *Biochem. J.*, 1948, 42, 238 (654,661)
- PETERSON R.E., MAN J.D., *Am. J. Physiol.*, 1952, 169, 765-766 (504,639)
- PHILIPPS J.L., AZARI P., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1972, 151, 445 (211)
- PLESS D., LENNARZ W.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 74/1, 134-138 (672)
- PLUMMER T.H., HIRS C.H.W., *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 2530-2538 (668)
- POLLACK S., AISEN P., LASKY F.D., VANDERHOFF G., *Br. J. Haematol.*, 1976, 34, 231-235 (546)
- POLLACK S., BALLERZACK S.P., CROSBY W.H., *Blood*, 1963, 21, 33-38 (507)
- POLLACK S., LASKY F.D., in *Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine*, CRICHTON Ed., 1975, 389-393 (486,490)
- POLLYCOVE M., MORTIMER R., *J. Clin. Invest.*, 1961, 40, 753-782 (422)
- POOTRAKUL P., CHRISTENSON A., JOSEPHSON B., *Blood*, 1977, 49, 957-966, (442)
- PRICE M., GIBSON J.F., *J. Biol. Chem.*, 1972, 247/24, 8031-8035 (196)
- PRINCIOTTO J.V., ZAPOLSKI E.J., *Nature*, 1975, 255, 87 (143,194,643)

- PRINCIOTTO E.J., ZAPOLSKI J.V., *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 421, 80-86 (576)
- PUTNAM F.W., *Science*, 1955, 122, 275 (240)
- QUERINJEAN P., MASSON P.L., HEREMANS J.F., *Eur. J. Biochem.*, 1971, 20, 420 (109,131,264)
- REITER B., BROCK J.H., STEEL E.D., *Immunology*, 1975, 28, 83 (548,550)
- RHODES J., BETON D., BROWN D.A., *Gut.*, 1968, 9, 323-324 (455)
- ROBERTS R.L., MAKEY D.G., SEAL O.S., *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 4907 (98)
- ROGERS T.B., BORRESEN T., FEENEY R.E., *Biochemistry*, 1978, 17, 1105 (191,228)
- ROGERS T.B., GOLD R.A., FEENEY R.E., *Biochemistry*, 1977, 16, 2299 (226,628,633,634)
- ROMSLO I., ULVIK R., in abstracts of 4th International Conference on Proteins of Iron Metabolisms, DAVOS, 1979 (418)
- ROOP W., PUTNAM F., *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 2507-2513 (579)
- ROOSEMONT J.L., *Anal. Biochem.*, 1978, 88, 314-321 (631,635)
- ROSSEN R., SCHADE A.L., BUTLER W.T., KASEL J.A., *J. Clin. Invest.*, 1966, 45, 768 (27)
- ROSSENEU-MORTREFF M.Y., SOETEWY F., LAMOTE R., PEETERS H., *Biopolymers*, 1971, 10, 1039 (311)
- RUMKE P., VISSER D., KWA H.G., HART A.A.M., *Folia Med. Neerl.*, 1971, 14, 156 (39)
- SAARINEN V., *J. of Pediatrics*, 1978, 93, 177-180 (471)
- SAARINEN V.M., SIIMES M.A., DALIMAN D.R., *The Journal of Pediatrics*, 1977, 91/1, 36-39 (472)
- SARGENT K.S., MUNRO H.N., *Exp. Cell. Res.*, 1975, 93, 15-22 (427)
- SCHADE A.L., in *Protides of the Biological Fluids*, 8^e Colloque de Bruges (1960), Elsevier Ed., 1961, 261 (529)
- SCHADE A.L., CAROLINE L., *Science*, 1944, 100, 14-15 (527,536)
- SCHADE A.L., CAROLINE L., *Science*, 1946, 104, 340-341 (13,340,528)
- SCHADE A., REINHART R.W., LEYY H., *Arch. Biochem.*, 1949, 20, 170 (145)
- SCHLABACH M.R., BATES G.W., *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, 2182 (179, 183,184,189)
- SCHÜTZ J.V., REIZENSTEIN P., *Am. J. Dig. Dis.*, 1963, 8, 904-907 (582)
- SELIGMAN P.A., SCHLEICHER R.B., ALLEN R.H., *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 9943-9946 (411)
- SIIMES M.A., VVORI E., KUITUNEN P., *Acta Paediatr. Scand.*, 1979, 68, 29-31 (467)
- SIMKISS K., *Endeavour*, 1979, 3, 2-6 (74)
- SIRIVECH T., FRIEDEN E., OSAKI S., *Biochem. J.*, 1974, 137, 67-70 (72)
- Van SNICK J., MASSON P., HEREMANS J., *J. Exp. Med.*, 1974, 140, 1068-1084 (446,451,514,543)

- Van SNICK J.L., MASSON P.L., J. Exp. Med., 1976, 144, 1568-1580 (447,515, 544)
- Van SNICK J.L., MARKOWETZ B., MASSON P.L., J. Exp. Med., 1977, 146, 817-827 (448,516,545)
- SPEYER B.E., FIELDING J., Biochim. Biophys. Acta, 1974, 332, 192-200, (400,403,416)
- SPEYER B.E., FIELDING J., Br. J. Haematol., 1979, 42 n° 2, 257 (417)
- SPIK G., Communication personnelle (537)
- SPIK G., Thèse, Doct. ès Sci., Lille, 1968 (3,81,84,91,101,112,126,141, 244,246,249,274,341,348,601,606,645)
- SPIK G., Ann. Nutr. Alim., 1971, 25, A81-A134 (9,92,107,127,476)
- SPIK G., BAYARD B., FOURNET B., STRECKER G., BOUQUELET S., MONTREUIL J., F.E.B.S. Letters, 1975, 50, 296-299 (351)
- SPIK G., CHERON A., MONTREUIL J., DOLBY J.M., Immunology, 1978, 35, 663 (552)
- SPIK G., FOURNET B., BAYARD B., VANDERSYPPE R., STRECKER G., BOUQUELET S., CHARET P., MONTREUIL J., Arch. Intern. Physiol. Biochim., 1974, 82, 791 (350,358,371)
- SPIK G., FOURNET B., CHERON A., STRECKER G., MONTREUIL J., DORLAND L., Vliegenthart J.F.G., in Proceeding of the fifth International Symposium on glycoconjugates, 1979, 1, 21-22 (362,374)
- SPIK G., FOURNET P., MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., 1979, 288, 967-970 (117,365,377)
- SPIK G., MAZURIER J., in Proteins of iron metabolism, Brown Ed., New-York, 1977, 143-159 (361,373)
- SPIK G., MONSIGNY M., MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., 1965, 261, 1137 (273,340,347)
- SPIK G., MONSIGNY M., MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., 1966, 263 D, 893 (342)
- SPIK G., MONSIGNY M., MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 2186 (247,250,255)
- SPIK G., MONTREUIL J., Résultats non publiés (76,100,235)
- SPIK G., MONTREUIL J., C.R. Soc. Biol., 1966, 160, 94 (474,644)
- SPIK G., MONTREUIL J., International Symposium IV chromatographie-Electrophorèse, Bruxelles (1966), Presses Acad. Européennes Ed., Bruxelles, 1968, 36 (343)
- SPIK G., MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1969, 51, 1271 (82,113,272)
- SPIK G., STRECKER G., FOURNET B., DEBRAY R., BOUQUELET S., DORLAND L., Vliegenthart J.F.G., MONTREUIL J., Eur. J. Biochem., 1980 (87,363,375)
- SPIK G., VANDERSYPPE R., FOURNET B., BAYARD B., CHARET P., BOUQUELET S., STRECKER G., MONTREUIL J., Actes Coll. Intern N° 221, 1974, 483-500 CNRS, Paris (83,85,114,116,349,359,370,372)
- SPIK G., VANDERSYPPE R., MONTREUIL J., TETAERT D., HAN K.K., F.E.B.S. Letters, 1974, 38, 213 (270,664,665)
- SPIRO T.G., ALLERTOW S.E., RENNER J., J. Am. Chem. Soc., 1966, 88, 2721-2726 (59)

- STRAKENSTEIN E., in Handb. der Exptl. Pharmacology, A. HEFFTER et W. HEURNER Ed., Berlin, 1934, 312, 682-1286 (460)
- SUSSMAN S.S., Iron in Biochemistry and Medicine, JACOBS A. and WODWOOD Ed., Academic Press London, N° 4, 649-679 (509), 1974
- SUTTON M.R., BREW K., Biochem. J., 1974, 139, 163 (130,290)
- SWORD C.D., J. Immunol., 1966, 96, 790-796 (521)
- TABAK L., MANDEL I.D., KARLAN D.K., BAUMASH H., J. Deut. Research, 1978, 57, 43-47 (562)
- TAN A.H., Can. J. Biochem., 1971, 49, 1971-1975 (315,608,612)
- TAN A.T., WOODWORTH R.C., Biochemistry, 1969, 8/9, 3711-3716 (158,208)
- TAN A.T., WOODWORTH R.C., J. Polym. Sci. Part C, 1970, 599 (217,316)
- TANAKA S., J. Biochem. (Japan), 1950, 37, 129-143 (67)
- TEUWISSEN B., MASSON P.L., OSINSKI P., HEREMANS J.F., Eur. J. Biochem., 1972, 31, 239-245 (147,155)
- TOMIMATSU Y., DONOVAN J.W., F.E.B.S. Letters, 1976, 71/2, 299-302 (218)
- TOMIMATSU Y., KINT S., SCHERER J.R., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1973, 54, 1067 (214)
- TOMIMATSU Y., VICKERY L.E., Biochim. Biophys. Acta, 1972, 285, 72-83 (318,609,613)
- TOMIMATSU Y., WONG R.Y., PALMER K.J., KINT S., SCHERER J.N., Abstract of papers First Chemical Congress of the North American Continent, Mexico City, November 3 1975, Inorganic section, paper 49 (215)
- TRUMP B.F., ARSTILA A.V., VALIGORSKY J.M., in Proteins of Iron Stockage and Transport in Biochemistry on Medicine, CRICHTON Ed., Amsterdam, 1975, 343-350 (55)
- TRUMP B.F., ARSTILA A.V., VALIGORSKY J. et al., in Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine, CRICHTON R.R. Ed., Amsterdam, 1975, 343-350 (426)
- TSANG C.P., BYLE A.J., MORGON E.H., Biochim. Biophys. Acta, 1975, 386, 32 (180)
- TSAO P., AZARI P., PHILIPS J., Biochemistry, 1974, 13, 397-403 (244)
- TSAO P., MORRIS D.H., AZARI P., TENDERGY R.P., PHILIPS J.L., Biochemistry, 13, 403-407 (295)
- TURNBULL A., in Iron in Biochemistry and Medicine, A. JACOBS and WODWOOD Ed., Acad. Press, London, 1974, 370-404 (450)
- VENTURA M., BASTOS ARAGAO J., IKEMOTO H., An. Acad. Brasil. Liêne, 1973, 45, 450-452 (311,610)
- WADA H.G., HASS P.E., SUSMAN H.H., J. Biol. Chem., 1979, 254, 12629-12635 (412)
- WAGNER R., ROSENBERG M., ESTENSEN R., J. Cell. Biol., 1972, 50, 804-817 (588)
- WALSH R.J., THOMAS E.D., CHOW S.K., FLUNARTY R.G., FINCH A., Science, 1949, 110, 396-398 (394)
- WARIN V., BAERT F., FOURET R., STRECKER G., SPIK G., FOURNET B., MONTREUIL J., Proceedings of the fourth international symposium on glycosylirgac, 1979, 1, 317-320 (382)

- WARIN V., BAERT F., FOURNET R., STRECKER G., SPIK G., MONTREUIL J., Carbohydrate Res., 1979, 76, 11-22 (383)
- WARNER R.C., WEBER F., J. Amer. Chem. Soc., 1952, 75, 5094 (142,146, 150,309)
- WEBY M.S., JONES L.G., CROSBY W.A., J. Clin. Invest., 1964, 43, 1433-1442 (452)
- WEINBERG S., Microbiological Reviews, 1978, 42/1, 45-66 (508,510,518)
- WEINTRAUB L.R., CONRAD M.E., CROSBY W.H., Brit. J. Haematol., 1965, 1, 432-438 (499)
- WHEBY M.S., Clin. Res., 1966, 14, 50 (454)
- WILLIAMS J., Biochem. J., 1974, 141, 745-752 (133,320,648)
- WILLIAMS J., Biochem. J., 1975, 149, 237-244 (321,647)
- WILLIAMS J., MORETON A., Biochem. J., 1980, 185, 483-488 (202)
- WILLIAMS S.C., WOODWORTH R.C., J. Biol. Chem., 1973, 248, 5848-5853 (577,596)
- WINDLE J.J., WIERSEMA A.K., CLARK J.R., FEENEY R.E., Biochemistry, 1963, 2/6, 1341-1345 (135,148,156,175,178,221,529,623)
- WOHLER F., OTTE N., Acta Haematol. (Basel), 1961, 26, 81 (445)
- WOODWORTH R.L., MORALLE K.G., WILLIAMS R.J.P., Biochemistry, 1970, 9, 839 (207)
- WOODWORTH R.L., 136th Meeting Am. Chem. Soc., 1959 (310)
- WOODWORTH R., SCHADE A., Biochim. Biophys. Acta, 1961, 47, 403 (16,207)
- WYLLIE J.L., KAUFMAN N., Br. J. Haematol., 1971, 20, 321-327 (56)
- X, J. Am. Med. Assoc., 1968, 203, 407-412 (465)
- YANG-HU HSIANG-YUN, AISEN P., J. of Supramolecular Structure, 1978, 8, 349-360 (410)
- YEH Y., IWAI S., FEENEY R., Biochemistry, 1979, 18/5, 882-889 (314)
- ZAPOLSKI E.J., GRANT R., PRINCIOTTO J.V., Am. J. Physiol., 1974, 226, 334-339 (438)
- ZIMELMAN A.P., ZIMMERMAN H.J., Mac LEAN R., WEINTRAUB L.R., Gastroenterology, 1977, 72, 129-131 (430)
- ZUCALI J.R., BROXMEYER H.E., VLATOWSKI J.A., Blood, 1979, 54/4, 951-954 (567)
- ZWEIR J.L., J. Biol. Chem., 1978, 253/21, 7616-7621 (154,163,197,224,642)
- ZWEIR J., AISEN P., J. Biol. Chem., 1977, 252/17, 6090-6096 (223)

APPENDICE TECHNIQUE

I - PREPARATION DES TRANSFERRINES

A - PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

1 - INTRODUCTION

MONTREUIL et MULLET (1), MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (2) ont décrit dès 1960 le premier procédé de préparation de la lactotransferrine humaine, par la suite ce procédé a été amélioré au laboratoire par MONTREUIL, ANTONY et al. (3) puis modifié par MONTREUIL, SPIK et al. (4) puis SPIK (5). D'autres méthodes ont été proposées par JOHANSSON (6), BLANC et ISLIKER (7), GOT (8), MASSON et HEREMANS (9) JOHANSSON (10) puis MALMQUIST et JOHANSSON (11). Toutes ces méthodes utilisent un fractionnement du lactosérum par précipitation, soit au sulfate d'ammonium, soit au rivanol, soit à l'éthanol suivi par une chromatographie d'échange d'ions. Plus récemment, HAUPT et BAUDNER (12), LONNERDAL et al. (13), BLACKERG et al. (14) ont proposé des méthodes de fractionnement directement par chromatographie d'affinité du lactosérum.

Actuellement au laboratoire, nous utilisons une méthode dérivée de celle mise au point par CHERON et al. (15) pour la préparation industrielle de la lactotransferrine bovine.

2 - PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE NATIVE

a - Préparation du lactosérum

Le lait humain est délipidé par centrifugation pendant 45 mn à 20 000 g dans un "rotor batch" puis est dialysé à 4°C contre de l'eau distillée. Après trois jours de dialyse, le lactosérum est amené à pH 4,6 par addition de HCl 0,1 N ; après un repos de 24 h, la caséine précipitée est éliminée par centrifugation à 20 000 g pendant 45 mn.

b - Chromatographie du lactosérum

Le lactosérum (6 l) est chromatographié à 4°C sur une colonne de SP-Séphadex (8 x 40 cm) stabilisée dans de l'acétate de sodium 0,22 M. La colonne est ensuite lavée par 6 l d'acétate de sodium 0,22 M, par de l'acétate de sodium 0,4 M puis la lactotransferrine est éluée par de l'acétate de sodium 0,5 M. La lactotransferrine est dialysée 3 jours contre de l'eau distillée puis lyophilisée.

c - Purification de la lactotransferrine

La lactotransferrine est purifiée par chromatographie d'échange d'ions sur une colonne de SP-Séphadex (5 x 40 cm) stabilisée dans l'acétate de sodium 0,22 M. Elle est éluée par de l'acétate de sodium 0,4 M.

Le rendement pondéral est de 1 g de lactotransferrine par litre de lactosérum. Le taux de saturation de la lactotransferrine native est voisin de 30 p 100, de la lactotransferrine obtenue après saturation en fer du lactosérum est de 80 p 100.

d - Préparation de l'apolactotransferrine

La lactotransferrine native est dissoute dans un tampon formiate de sodium 0,2 M, phosphate de sodium 0,2 M, E.D.T.A. 40 mM pH 4 pour obtenir une concentration maximale de 0,5 p 100. Après une incubation de 24 h, la solution est dialysée 3 jours contre de l'eau distillée.

B - PREPARATION DES TRANSFERRINES SATUREES EN METAL

1 - FIXATION DU FER

a - Méthode de AZARI et BAUGH (16)

La protéine est dissoute à raison de 0,5 à 20 mg / ml dans un tampon acétate-bicarbonate de sodium 0,1 M pH 8,6. Le fer est additionné sous forme de citrate ferrique préparé en dissolvant 260 mg de FeCl₃ (6H₂O) dans 100 ml de tampon citrate-bicarbonate de sodium 0,1 M pH 8,6. La fixation des ions Fe³⁺ est réalisée en additionnant de 1,25 à 50µl de la solution de citrate ferrique (60 µgFe/100 µl)

par ml de la solution d'apoprotéine. L'incubation à température ambiante est d'au moins 3 h.

b - Méthode à l'acide nitrilotriacétique (N.T.A.)

Dans ce cas la protéine est dissoute dans un tampon Tris/HCl 0,1 M, bicarbonate de sodium 0,05 M pH 7,5. Le complexe Fe^{3+} est réalisé de la manière suivante :

Solution A : Solution d'acide nitrilotriacétique 1,005 mg

NaOH 63 mg q.s.p. 1,5 ml H_2O

Solution B : $FeCl_3 (6H_2O)$ 7,14 $\mu g/ml$

Solution C : 15 V de A + 10 V de B

La saturation de 10 mg de protéine est réalisée en ajoutant 25 μl de la solution C.

2 - FIXATION DU CUIVRE

L'apoprotéine (25 mg) est dissoute dans 2,5 ml de tampon TRIS/HCl 0,1 M-bicarbonate de sodium 0,05 M pH 8,2. La solution de protéine est dessalée dans le même tampon pour éliminer toutes les traces d'E.D.T.A. puis 3,5 μl d'une solution de $CuCl_2$ 0,2 M pH 8,2 sont additionnés.

3 - ELIMINATION DES PRODUITS EN EXCES

Après incubation, les protéines saturées sont séparées du métal en excès par chromatographie de tamisage moléculaire sur Séphadex - G_{25} ou par chromatographie d'échange d'ions sur DOWEX 2 x 8 ("200-300" mesh" Cl^- stabilisée dans le tampon d'utilisation.

II - MILIEUX D'INCUBATION

Nous avons utilisé deux milieux d'incubation suivant le type de cellules étudiées.

A - MILIEU D'INCUBATION DES RETICULOCYTES

Nous avons utilisé le milieu de HANKS et al. (17) dont la composition donnée en grammes de sel par litre de solution est la

suiuante : NaCl (8), KCl (0,4) CaCl₂ (0,14) MgSO₄(7H₂O) (0,20)
Na₂PO₄(12H₂O) (0,12) K H₂PO₄(H₂O) (0,06), NaHCO₃(0,35) Glucose
(1); le pH est pH 7,35.

B - MILIEU D'INCUBATION DES ENTEROCYTES

Nous auons utilisé le milieu 288 milliosmolaire mis au
point par COX et PETERS (18) : H p s : (3,78), NaCl (7,318) KCl (0,26)
CaCl₂ (0,11) MgSO₄ (7H₂O) 2,46, Glucose (1,8), le pH est de 7,4.

III - MODIFICATIONS CHIMIQUES

A - COUPURE DES PONTS DISULFURES

1 - OXYDATION PERFORMIQUE

L'oxydation performique a été r alis e selon la technique
de HIRS (19).

L'acide performique est préparé en additionnant à 5 ml
d'eau oxyg n e, 45 ml d'acide formique concentré. La solution est
laiss e au repos 2 h à la température ambiante, puis 15 mn   - 10 C.
A la protéine (1g), dissoute dans 25 ml d'acide formique concentré
et 5 ml de méthanol, nous ajoutons lentement sous agitation à +4 C
50 ml d'acide performique. La réaction se poursuit pendant 2 h 30
  4 C et à l'obscurité.

La réaction est ensuite arr t e par addition de 800 ml
d'eau refroidie à 4 C, puis la solution est lyophilis e.

2 - REDUCTION ET ALKYLATION

a - Réduction

La réduction est effectu e suivant le procédé de CRESTFIELD
MOORE et STEIN (20) :

- la protéine (1 g) dissoute dans 50 ml de tampon Tris-0,1 M
de pH 8,2 renfermant de l'E.D.T.A. 0,03 M et l'urée 8 M est soumise
  l'action du 2-mercaptoéthanol (2,3 ml, soit 30 mM). La réaction se
poursuit pendant 3 h à l'abri de la lumière et sous azote débarrassé
de son oxygène par passage dans une solution de pyrogallol à 1 p 100.

b - Alkylation

Les groupements thiol libérés sont stabilisés par alkylation avec l'iodacétamide. Une quantité de 50 mM d'iodacétamide est ajoutée à la solution, la réaction s'effectue à pH 8,2 jusqu'à ce que le test au nitroprussiate soit négatif.

Le réactif au nitroprussiate est obtenu par addition extemporanée de 1 volume d'ammoniaque 4 N et de 1 volume de nitroprussiate à 2 p 100 dans l'eau, il vire au rouge violacé en présence de groupements thiols libres.

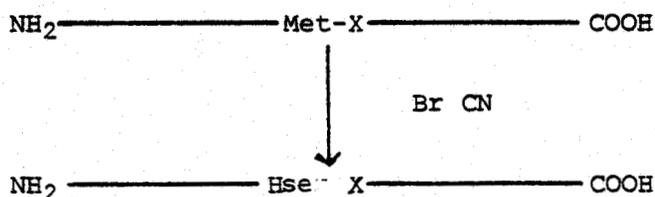
Après 15 mn d'incubation, la solution est additionnée de 1 ml de 2-mercaptoéthanol. Les sels sont éliminés par chromatographie de tamisage moléculaire sur une colonne de Séphadex G₂₅ (3 x 80 cm) stabilisée dans l'acide acétique 10 p 100. Le débit de la colonne est de 24 ml/h, les fractions recueillies sont de 8 ml.

B - COUPURE DES LIAISONS METHIONYLES PAR LE BROMURE DE CYANOGENE

1 - PRINCIPE

CAHOURS (21) puis BRAUN et ENGELBERTZ (22) ont décrit les premiers l'action du bromure de cyanogène sur les liaisons thioéthers et sur les sulfures. GROSS et al. (23) ont démontré la possibilité de coupure des liaisons peptidiques au niveau de la méthionine par l'action du bromure de cyanogène avec la conversion de la méthionine en homosérine ou sa lactone.

Tous les fragments d'une chaîne polypeptidique, après rupture par le bromure de cyanogène, possèdent un résidu d'homosérine ou homosérine lactone en position C-terminale, à l'exception du fragment C-terminal de la protéine.



Lorsqu'il existe des séquences répétitives du genre :
X-Met-Met-Y, il y a libération des fragments X-Hse et Y et d'homosérine

(homosérine lactone) libre. Il est à noter, en outre, que la réaction n'a pas lieu sur les résidus de méthionine oxydés.

2 - MECANISME DE LA REACTION

En milieu acide, la fonction thio-méthyl de la méthionine polarise le bromure de cyanogène en $\text{Br}^- \text{CN}^+$ ce qui permet la formation d'un bromure de cyanosulfonium qui se scinde en méthylthiocyanate et en bromhydrate d'immunolactone d'homosérine. Ce dernier se décompose et libère d'un côté la lactone d'homosérine et de l'autre un peptide ayant comme acide aminé N-terminal l'acide aminé lié primitivement à la méthionine. Le mécanisme de la réaction est décrit dans la figure 1 (p 7).

Lorsque la méthionine est liée à un acide aminé hydroxylé, la réaction est plus lente et la coupure ne s'effectue qu'à 50 p 100. On peut expliquer ce mauvais rendement (HAN) (24) par le fait que la fonction hydroxylée de la sérine ou de la thréonine réagit avec le bromure d'iminolactone pour former un cycle oxazolidine qui peut évoluer comme le montre la figure 2 (p 8) de deux manières différentes :

- 1 - Transformation de la méthionine en homosérine sans coupure de la chaîne peptidique.
- 2 - Transformation en homosérine avec rupture mais à une vitesse beaucoup plus lente.

La méthode originale décrite par GROSS et WITKOP (25) s'opère en milieu HCl 0,1 N. Dans ces conditions, la réaction est quantitative à 30°C, mais conduit d'après HOFMAN (26) à des coupures secondaires, qui donnent naissance à des peptides ayant la leucine en position N-terminale. En milieu acide, le BrCN peut attaquer lentement la cystéine par son groupement thiol sans couper la liaison peptidique. STEERS et al. (27) ont remplacé le milieu HCl 0,1 N par de l'acide formique 70 p 100, ce qui permet une réaction complète, même à 25°C, sans réaction secondaire.

3 - MODE OPERATOIRE

L'action du bromure de cyanogène sur l'apolactotransferrine a été réalisée dans des conditions inspirées de celles de STEERS et al. (28).

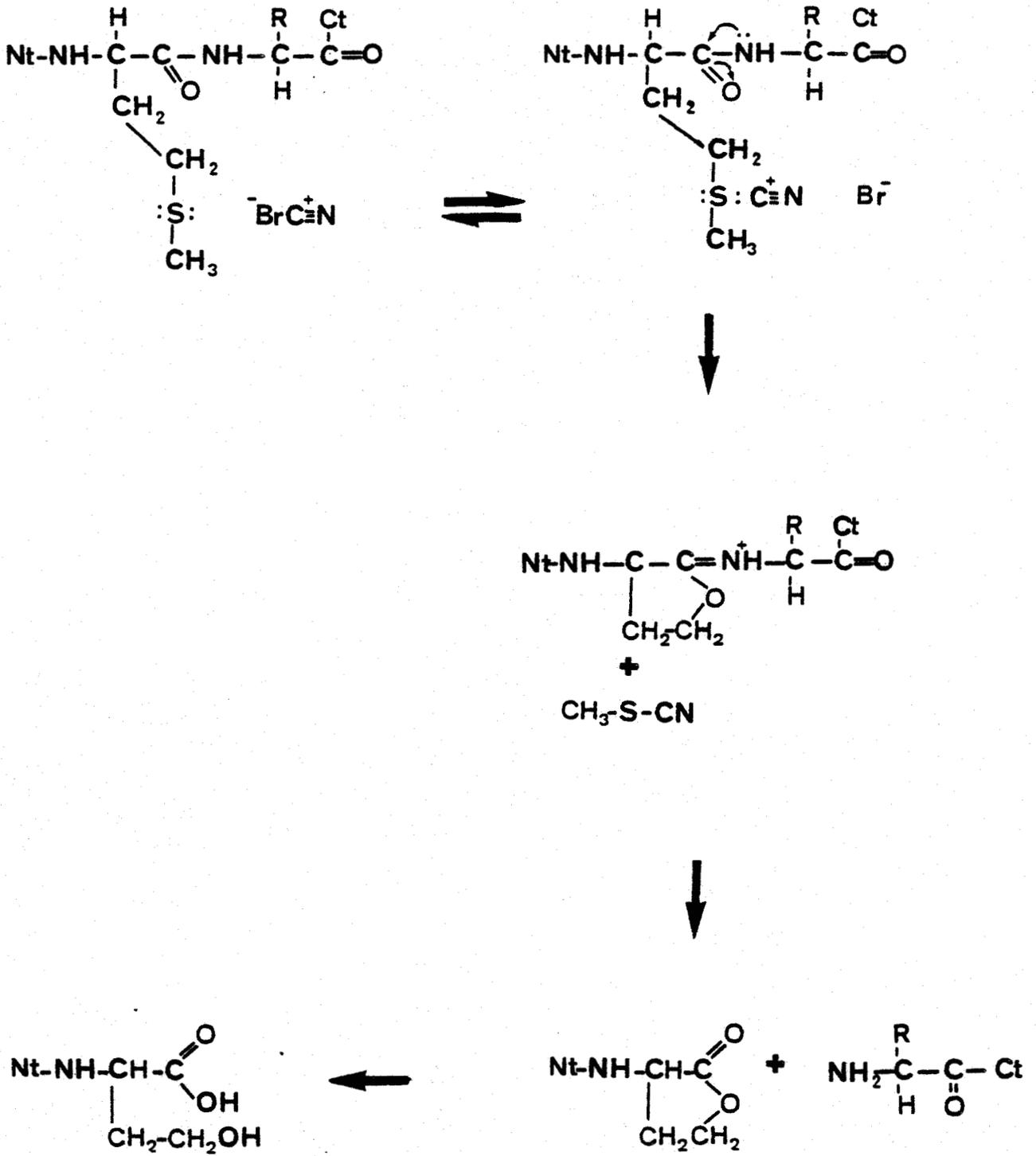


Figure 1

Mécanisme de la coupure de la liaison peptidique
au niveau de la méthionine par le bromure de cyanogène



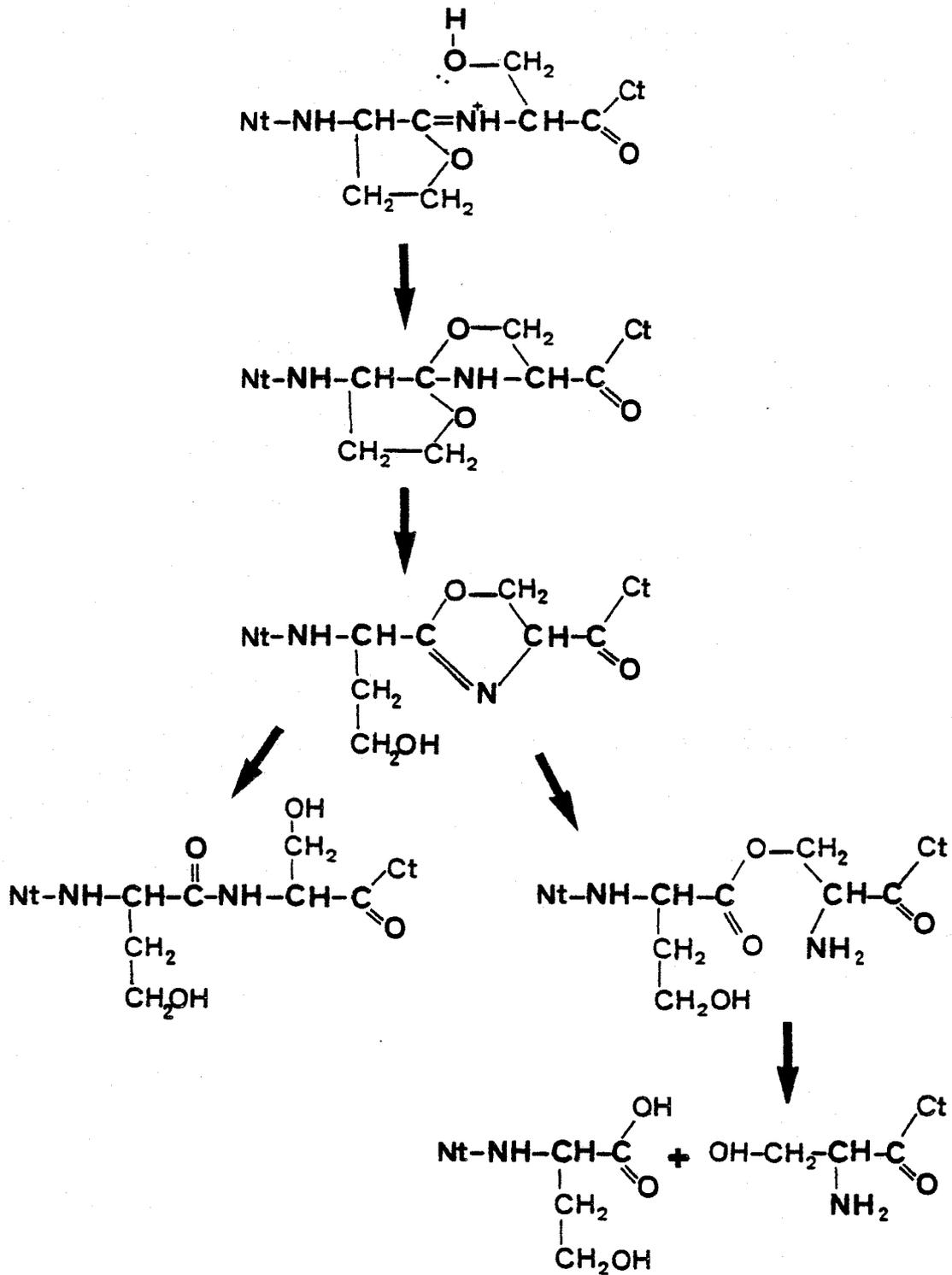


Figure 2

Mécanisme d'action du bromure de cyanogène dans le cas d'une liaison Met - Ser ou Met - Thr



A une solution d'apolactotransferrine à 1 p 100 dans de l'acide formique à 70 p 100, on ajoute une quantité de bromure de cyanogène 200 fois supérieure à la quantité théorique.

Le mélange, placé à l'obscurité et à 25°C, est soumis à une agitation douce pendant 48 heures. La réaction est arrêtée par addition de 10 volumes d'eau glacée ; les produits de dégradation du bromure de cyanogène sont ensuite éliminés par évaporation à l'évaporateur rotatif ou par lyophilisation. La cinétique de rupture des liaisons méthionyles a été suivie par l'étude de la modification de la méthionine en homosérine à l'auto-analyseur Beckman après hydrolyse de lactotransferrine et décyclisation de l'homosérine lactone par la méthode de AMBLER (29).

4 - FRACTIONNEMENT SUR COLONNE DE BIOGEL P₁₀₀

La lactotransferrine traitée au BrCN est chromatographiée sur colonne de Biogel-P₁₀₀ (5 x 100 cm) stabilisée dans l'acide formique 0,1 M avec un débit de 35 ml/h, les fractions recueillies sont de 17,5 ml. Le diagramme d'élution représenté dans la figure 3 (p 10) montre la présence de quatre fractions A.B.C.D.

La fraction A représente 5 p 100 du poids total de la lactotransferrine traitée au BrCN, cette fraction est éluée au volume mort de la colonne ; après solubilisation et recyclage de cette fraction sur colonne de Biogel-P₁₀₀ dans les mêmes conditions on obtient un diagramme d'élution identique à celui obtenu à partir de la lactotransferrine totale, traitée au BrCN. La fraction A peut donc être considérée comme formée d'aggrégats, cette fraction a été éliminée par la suite.

La fraction B représente 10 p 100 de la lactotransferrine traitée au BrCN. Cette fraction se révèle homogène en gel de polyacrylamide. La bande protéique obtenue possède une vitesse de migration très voisine de celle de la lactotransferrine totale.

Après rupture des ponts disulfures par oxydation performique, la fraction B se dissocie en gel de polyacrylamide en 6 fragments peptidiques.

La dansylation de la fraction B permet l'identification des mêmes dansyls amino-acides que ceux obtenus à partir de la lacto-

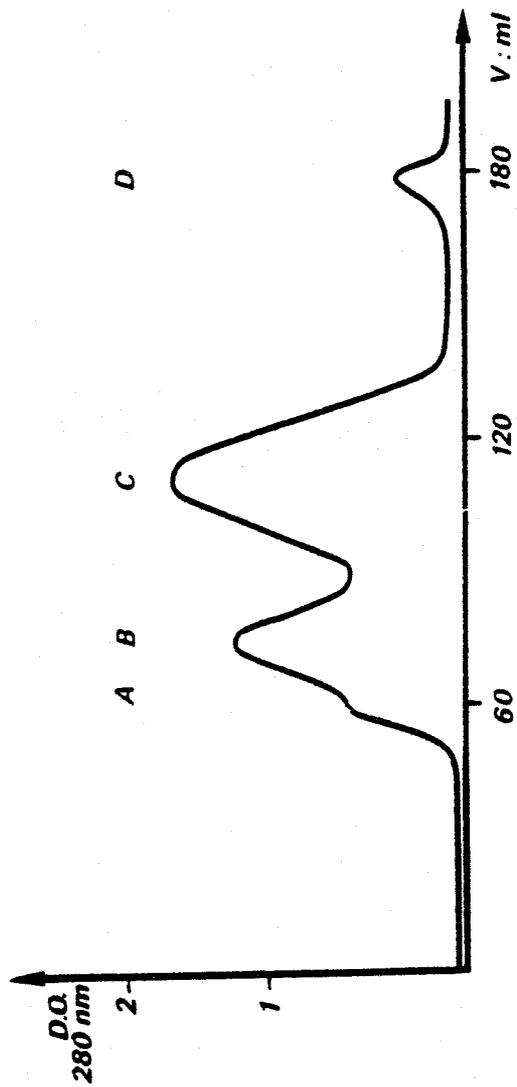


Figure 3

Fractionnement de l'apolactotransferrine traitée au BrCN pour une colonne de Biogel P₁₀₀ (5 x 100 cm)

L'éluion est réalisée par une solution d'acide formique 0,1 M



transferrine totale traitée au BrCN à l'exception du dansyl-sérine qui a disparu de la fraction B correspond à de la lactotransferrine partiellement coupée par le BrCN.

La fraction C représente la fraction majeure de la lactotransferrine traitée par le BrCN, soit 70 p 100. En gel de polyacrylamide, cette fraction C migre sous forme d'une seule bande protéique qui correspond à la bande B II obtenue à partir de la lactotransferrine totale traitée au Br CN.

La dansylation de cette fraction C conduit à l'identification de tous les dansyls amino-acides présents dans la lactotransferrine totale traitée au BrCN à l'exception du dansyl-alanine que nous retrouverons dans la fraction D.

Après rupture des ponts disulfures par oxydation performique, la fraction C se dissocie, en gel de polyacrylamide, en trois fragments peptidiques, d'une masse moléculaire approximative de 10 à 13 000 ; 18 à 20 000 et de 25 000.

L'analyse des acide aminés N-terminaux montre que la fraction C est constituée d'au moins 6 fragments peptidiques reliés par des ponts disulfures, seuls trois d'entre eux sont identifiés en gel de polyacrylamide.

La fraction D correspond à 2 p 100 de la fraction de lactotransferrine traitée au BrCN. Cette fraction possède une masse moléculaire très faible ; ceci explique son élution au volume total de la colonne de Biogel et l'absence de révélation par le bleu de Coomassie en gel de polyacrylamide.

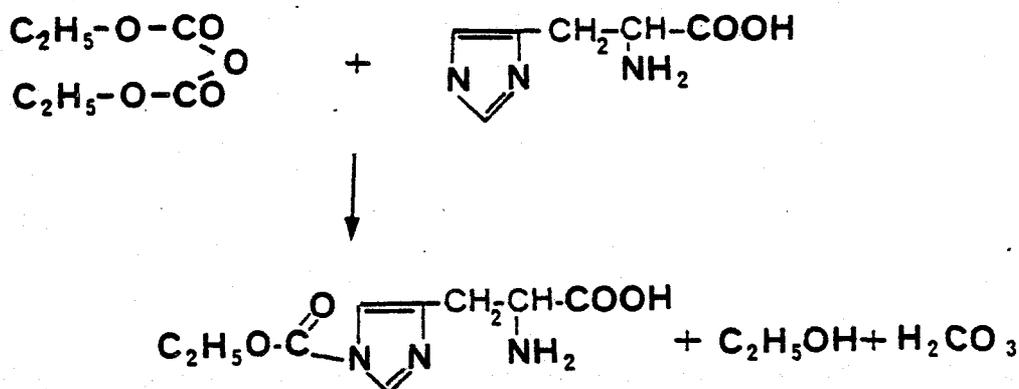
La pureté de la fraction a été étudiée par électrophorèse sur papier dans le tampon de MICHL (30) à pH 3,9 et par la méthode de dansylation de HARTLEY (31).

Les résultats obtenus montrent que la fraction D donne, dans la zone neutre, une tache majeure révélée au réactif à la ninhydrine après électrophorèse sur papier. L'identification d'un seul dansylamino-acide correspondant à l'alanine confirme l'homogénéité de cette fraction qui a été appelée, par la suite, fragment FVII.

C - CARBETHOXYLATION

1 - PRINCIPE

Le diéthyl-pyrocarbonate réagit spécifiquement sur les résidus d'histidine (OVADI et al.) (32) à pH 6,1 en donnant formation à la carbéthoxy-histidine suivant le schéma :



2 - MODE OPERATOIRE

Nous avons travaillé sur des protéines dissoutes à une concentration voisine de 10 mM (0,7 à 1 mg/ml) dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M, chlorure de potassium 0,05 M p H 6,1 ou 7,3 selon la technique de OVADI et al. (33). Le diéthyl pyrocarbonate de densité d = 1,12 est additionné pour une concentration finale de 0 à 30 mM. Pour les faibles concentrations en réactif, le diéthyl pyrocarbonate est extemporanément dilué dans de l'éthanol absolu, de telle manière que la concentration finale en alcool soit toujours inférieure à 2 p 100.

D - MARQUAGES RADIOACTIFS DES TRANSFERRINES

1 - MARQUAGE AU ⁵⁹Fe

Le marquage au ⁵⁹Fe se fait en introduisant extemporanément dans la solution de AZARI et BAUGH (34) 2 p 100 de ⁵⁹Fe Cl₃ (HCl, 0, 1N, 51 mCi/mg, 1mCi/ml, AMERSHAM - GRANDE-BRETAGNE). La

quantité d'HCl additionnée est neutralisée par addition de soude 0,1 N.

2 - MARQUAGE A ^{125}I

Nous avons utilisé la méthode à la chloramine T de HUNTER et GREENWOOD (35).

a - Réactifs

- A. $^{125}\text{I}_2$ sans entraîneur 2mCi dilué par 1 ml de NaHCO_3 20mM
- B. Transferrine 0,14 μM dans 1,2 ml NaHCO_3 0,2 M
- C. NaI 7mM dans NaHCO_3 0,2 M
- D. Chloramine T 1 mg/ml NaHCO_3 0,2 M
- E. Métabisulfite de sodium 1 mg/ml dans NaHCO_3 0,2 M.

b - Mode opératoire

On additionne rapidement dans B, 50 μl A, 20 μl C, 100 μl D, après 10 s à 4°C on ajoute 100 μl E.

La protéine iodinée est dessalée sur colonne de Sephadex G₂₅ stabilisée dans le tampon d'utilisation.

IV - ANALYSE CHIMIQUE

A - DOSAGE DES METAUX

1 - DOSAGE DU FER

Le fer est dosé sous forme ferreuse par la sulfobathophé-nanthroline selon la méthode de PETERSON (36), TRINDER (37) modifiée par SPIK (39).

a - Réactifs

- A. Acide ascorbique : 1 p 100 dans HCl 2 N (extemporanément)
- B. Acide trichloroacétique 20 p 100
- C. Acétate d'ammonium 50 p 100
- D. Sulfobathophénanthroline 10 mg/20 ml H_2O
- E. Solution titrée de fer 12 $\mu\text{g/ml}$

b - Dosage

A une quantité de 0,4 ml de solution de protéine contenant 4,8 µg de fer sont additionnés 0,4 ml de A et 0,4 ml de B. Après 30 mn d'incubation à 37°C, le précipité est centrifugé puis 0,3 ml du surnageant sont prélevés puis 0,9 ml d'H₂O et 0,150 ml de C et 0,150 ml de D sont additionnés. La lecture est effectuée à 535 nm.

2 - DOSAGE DU CUIVRE

Le cuivre est dosé par la méthode de PETERSON et al. (39)

a - Réactifs

- A. Acide trichloroacétique 20 p 100
- B. Acide chlorhydrique 2 N.
- C. Phosphate tripotassique saturé
- D. Phénolphtaléine 0,1 p 100 H₂O
- E. Témoin de Cu²⁺ : 0,3928 g Cu SO₄ (5H₂O) qsp 1 l.

b - Dosage

A 1 ml de la solution de protéine sont additionnés : 0,7 ml de B puis après 10 mn d'attente 1 ml de A. Le précipité est éliminé par centrifugation et 2 ml du surnageant sont prélevés et 2 gouttes de phénol phtaléine, 1,5 ml de C (pH 8-8,2) x ml de B (pour obtenir un pH de 7,5-7,9), 0,2 ml E sont additionnés. Le volume de la solution est ajusté à 3,5 ml. La lecture se fait à 600 nm avant 60 mn.

B - ANALYSE DE LA COMPOSITION MOLAIRES EN MONOSACCHARIDES

Nous avons analysé la composition molaire en monosaccharide après méthanolyse et chromatographie en phase gazeuse des méthyls glycosides trifluoro-acétyles selon le procédé de ZANETTA et al. (41).

1 - METHANOLYSE

Un échantillon de glycoprotéine contenant de 300 à 500 µg d'oses totaux est préalablement lavé par des mélanges binaires de CHCl₃/CH₃OH dans les rapports 2 : 1, puis 1 : 2 et enfin par du méthanol seul. Le produit ainsi traité est additionné de 50 µg de méso-inositol (témoin interne) puis lyophilisé et placé en dessic-

cation sur anhydride phosphorique. Le résidu est repris par 2 ml de méthanol chlorhydrique (0,5 N ou 1,5 N en acide chlorhydrique) et placé à 80°C pendant 24 h. Le méthanolysat est refroidi puis séché sous courant d'azote.

2 - TRIFLUORO-ACÉTYLATION

Le résidu est repris par 100 µl de mélange dichlorométhane anhydride trifluoroacétique (v/v). La trifluoroacétylation est effectuée à 150°C pendant 5 mn. La solution refroidie est prête à l'analyse en chromatographie en phase gazeuse.

3 - CONDITIONS DE LA CHROMATOGRAPHIE

Les O-méthyl-glycosides trifluoroacétylés des monosaccharides neutres, des N-acétylosamines et de l'acide N-acétyl-neuraminique sont chromatographiés sur colonne (300 x 0,3 cm en verre) de Varaport 30 à 5 p 100 (p/p) de silicone OV 210 à la température programmée de 110° à 210° (1° par mn) avec un débit de gaz vecteur azote de 7,5 ml/mn.

C - ANALYSE DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX

1 - REACTION DE DANSYLATION

Nous avons utilisé deux techniques de dansylation suivant la masse moléculaire des peptides.

a - Peptides de masse moléculaire supérieure à 10 000.

Nous avons appliqué la méthode de GROS et LABOUESSE (41) modifiée par PERCY et BUCHWALD (42).

Une quantité de 5 nm de peptides est dissoute dans 500 µl d'urée 8 M, la solution est tamponnée par 150 µl de bicarbonate de sodium 0,2 M pH 9,2, puis 200 µl de diméthyl formamide et 5 mg de chlorure dansyl dissous dans 100 µl d'acétonitrile sont ajoutés. La réaction se poursuit pendant 1 h à 37°C.

La protéine dansylée est ensuite précipitée par l'ACTA à 10 p 100 à 4°C, puis lavée par de l'acétone pour éliminer l'excès de chlorure dansyl. Le précipité est enfin hydrolysé par de l'HCl

5,6 N pendant 8 h à 18 h à 105°.

b - Peptides de masse moléculaire inférieure à 10 000.

Nous avons utilisé la technique de HARTLEY (43).

1 à 5 nm de peptides sont dissoutes dans 10 μ l de bicarbonate de sodium 0,2 M, pH 9,2 puis 10 μ l d'une solution de chlorure de dansyl à 2,5 mg par ml d'acétone "pH 9,8" sont additionnés. La réaction dure 1 h à 37°C. La solution est séchée sous excicateur contre NaOH puis le précipité est hydrolysé dans les conditions décrites précédemment.

2 - CHROMATOGRAPHIE DES ACIDES AMINES DANSYLES

L'hydrolysate séché sous vide contre NaOH est chromatographié sur des plaques de micropolyamide suivant le procédé de WOODS et WANG (44) et de HARTLEY (45).

Les acides aminés dansylés sont extraits par de l'acétate d'éthyl saturé en eau, à l'exception de DNS Arg, α DNS Lys, ϵ DNS Lys et DNS His. qui sont repris dans un mélange acide acétique acétone dans les rapports 3 : 2.

3 - METHODE D'EDMAN

Le protocole utilisé est celui mis au point par HAN et al. (45) qui est rapide et qui fournit de bons rendements permettant de dégrader profondément le glycopeptide.

L'acide aminé sur lequel est fixé le groupement glycanique ne peut être décelé, l'acide aminé suivant est parfois lui aussi difficilement identifiable. L'identification des PTH amino-acides devient de nouveau possible à partir de l'acide aminé placé en β de la liaison glycosidique.

a - Réactifs

Les réactifs utilisés de pureté "Sequanal Grade" sont fournis par la firme PIERCE CHEMICAL SOCIETY.

L'éther éthylique distillé sans peroxyde, renferme

,1 p 100 de dithioerythritol.

b - Etape de couplage

1 μ mole de peptide (2 μ moles de glycopeptide) placé dans un tube conique rôdé est dissous dans 100 à 300 μ l de tampon nPropanol/eau/N-allyl-N-N' diméthylamine (15 : 10 : 1,2) (v : v) de pH 9,5 justé par l'acide trifluoracétique à 10 p 100.

10 μ l de phénylisothiocyanate sont ajoutés.

La réaction est effectuée sous atmosphère d'azote, à 50°C, pendant 40 minutes, avec agitation toutes les 5 minutes. On contrôle ensuite si la réaction a été réalisée en présence d'un excès de phénylisothiocyanate, en refroidissant le tube sous un courant d'eau froide. Le phénylisothiocyanate précipite. En cas contraire, la réaction de couplage doit être recommencée pendant 20 minutes, en ajoutant 10 μ l de phénylisothiocyanate.

Les phenylthiourées sont alors éliminées en extrayant par 3 fois 1 ml de benzène. La phase de couplage est ensuite séchée par un courant d'azote. Pour parfaire le séchage, quelques gouttes d'acétate d'éthyle sont ajoutées puis évaporées sous azote. Enfin, le tube réaction est placé dans un dessiccateur sur P₂O₅, à 60°C, sous vide, pendant 30 minutes, afin que le tube soit rigoureusement sec pour effectuer la réaction de clivage.

c - Etape de clivage

150 μ l d'acide trifluoracétique anhydre sont ajoutés. Après agitation, la réaction de clivage est effectuée, sous atmosphère d'azote, à 50°C, pendant 7 minutes. L'acide trifluoroacétique est éliminé par un courant d'azote. Il se forme un précipité rosé collant aux parois.

La thiazolinone est extraite par 3 fois 2 ml d'éther.

Le peptide résiduel est séché sur KOH pendant 30 minutes avant de commencer un nouveau cycle de dégradation.

d - Etape de conversion

L'extrait étheré renfermant la thiazolinone est séché. 100 μ l d'acide chlorhydrique N sont ajoutés et la réaction de conver-

sion est effectuée, sous atmosphère d'azote, à 80°C, pendant 10 minutes.

Le PTH amino-acide formé est extrait par 2 fois 1 ml d'acétate d'éthyl, séché sous azote et repris par 20 µl d'acétate d'éthyl en vue de la chromatographie.

e - Identification des PTH-amino-acides

La chromatographie en couche mince sur gel de silice 60 F₂₅₄ de 0,25 mm d'épaisseur est utilisée. Les chromatoplaques sont fournies par la firme MERCK. Sur ces plaques, des couloirs de 1 cm de large sont tracés à la pointe sèche. Les PTH-amino-acides à identifier sont déposés en alternance avec des mélanges de témoins judicieusement composés.

L'identification des PTH-amino-acides détachés des glycopeptides étudiés a pu être résolue grâce à l'utilisation des deux systèmes solvants préparés de la manière suivante :

Système E modifié,	Acétate de butyle	97 ml
HAN <u>et al.</u> (47)	Eau	3 ml

Après agitation et repos pendant une nuit, la phase supérieure est reprise et on y ajoute 4 ml de formamide et 3 ml d'acide propionique.

La cuve en verre est saturée après que le mélange ait été équilibré pendant 2 heures.

Système H ₁ , EDMAN <u>et al.</u> (48)	Chlorure d'éthylène	60 ml
	Acide acétique	14 ml

D - ANALYSE DES ACIDES AMINES C-TERMINAUX

1 - HYDRAZINOLYSE

a - Réaction selon AKOBORI (49)

1 µM de protéine desséchée à 105°C pendant 12 h est soumise à l'action de 200 µl d'hydrazine anhydre à 105°C pendant 6 heures. L'hydrazinolysat est séché dans un excicateur contre H₂SO₄. Dans ces conditions, les acides aminés sont dégradés très facilement et le pourcentage de récupération des acides aminés témoins est de l'ordre

de 30 à 50 p 100. Des acides aminés comme l'acide aspartique et la cystine sont presque entièrement détruits, le glycofolle et la sérine apparaissent comme artéfacts.

Extraction à la benzaldéhyde.

La benzaldéhyde lavée par de la soude puis par de l'eau distillée, est distillée, puis séchée, en présence de CaCl_2 . Avant emploi, la benzaldéhyde est soumise à nouveau à une distillation.

L'hydrazinolysat est extrait 3 à 5 fois par la benzaldéhyde jusqu'à ce qu'il devienne incolore.

2 - CARBOXYPEPTIDASE B

a - Mode opératoire

La protéine ou le fragment (100 mM) est mise en suspension dans 0,5 ml de bicarbonate d'ammonium 0,1 M. 0,1 mM en norleucine. La carboxypeptidase est additionnée à raison de 1 E.C. / 100 mM de substrat. La réaction à 37°C dure 1 h, 2 h et 3 h. Un témoin est réalisé avec l'enzyme seul et un autre avec le substrat seul.

b - Analyse des acides aminés libérés

Des aliquotes correspondant à 25 nM de protéine sont prélevées à des temps de 1, 2 et 3 h. La protéine est précipitée par deux gouttes d'acide acétique, le surnageant recueilli après centrifugation est séché puis analysé à l'auto-analyseur Beckman.

V - DETERMINATION DES MASSES MOLECULAIRES

A - ULTRACENTRIFUGATION A L'EQUILIBRE DE SEDIMENTATION

1 - THEORIE

L'ultracentrifugation à l'équilibre de sédimentation permet de calculer la masse moléculaire d'une molécule. Dans des conditions caractéristiques de la molécule (vitesse et temps de sédimentation) le flux de sédimentation égalant le flux de diffusion, la relation

$$M = \frac{RT}{1 - v\rho} \frac{1}{v} \frac{dc/dt}{cr}$$

permet de calculer la masse moléculaire :

- \bar{V} : Volume spécifique partiel de la molécule
- ρ : Densité du solvant (g/l)
- ω : $\frac{2\pi}{60}$ (tpm) radian/s
- c : Concentration de la solution
- r : Distance à l'axe de rotation.

2 - MODE OPERATOIRE

a - Matériel

Les déterminations ont été réalisées dans une ultracentrifugeuse analytique "Beckman" modèle E, équipée du système optique interférentiel de RAYLEIGH en utilisant la méthode d'YPHANTIS (50) modifiée par CHERVENKA (51).

Les ultracentrifugations sont faites à 20°C, la température du rotor est régulée par le système RITC. Le rotor utilisé est en titane (réf. AnH) et les cellules sont à double secteur.

b - Détermination des caractéristiques de la sédimentation

Les vitesses de centrifugation varient de 16 000 tpm pour le fragment FI à 56 000 tpm pour le fragment FIV. Elles sont déterminées d'après l'équation proposée par CHERVENKA

$$\text{tpm} = 1,4 \times 10^5 \left(\frac{T}{M(1-v\rho)} \right)^{1/2}$$

où T est la température absolue et M la masse de la molécule.

c - Préparation de l'échantillon

Nous avons travaillé sur les peptides en solution dans un tampon Gu, HCl, 6M, Tris 0,1 M, pH 7,5 ou sur les peptides maleylés dissous dans un tampon Tris-HCl pH 8,5.

Dans les deux cas, l'échantillon est dissous à raison de 0,2 à 0,7 mg par ml de tampon, puis est dialysé deux jours contre le même tampon.

d - Méthode de calcul

Nous avons utilisé le système optique interférentiel de RAYLEIGH, et appliqué l'équation :

$$M = \frac{2RT}{1 - \phi' \rho} \frac{1}{CO^2} \frac{d \log c}{dr^2}$$

où M est la masse moléculaire de la protéine

$$R = 8,313 \times 10^7$$

$$T = 273 + \theta \quad \theta = \text{température de l'expérience en } ^\circ\text{C}$$

ϕ = Volume spécifique partiel effectif de la protéine dans le

ρ = solvant

ρ = Densité du solvant

c = Concentration de la solution

r = Distance à l'axe de rotation.

Le volume spécifique partiel de chaque peptide a été calculé d'après la composition en acides aminés et en monosaccharides suivant la méthode décrite par COHN et EDSALL (52) et SQUIRE et al. (53)

B - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE SDS
D'APRES LA METHODE DE DAVIS (54)

La fixation du dodécyl sulfate de sodium (SDS) sur une chaîne peptidique confère à celle-ci des charges négatives telles que la migration électrophorétique anodique de la protéine ne dépend plus que de la longueur de sa chaîne peptidique.

1 - REACTIFS

Solutions 1 A : 36,3 g Tris qsp 1 000 ml H₂O p H 8,9

1 B : 12,1 g Tris qsp 1 000 ml H₂O pH 6,8

2 A : 48 g d'acrylamide

1,28 g de bisacrylamide qsp 100 ml

3 A : 0,5 g de persulfate d'ammonium + 4,5 ml d'

C : Dodécylsulfate de sodium 20 p 100

2 - MODE OPERATOIRE

a - Gel inférieur

Pour un gel à 7,5 p 100 : 6,25 ml de 1 A, 7,5 ml de 2 A et 36 ml d'H₂O sont dégazés puis 37,5 µl de TEMED, 37,5 µl de 3 A et 250 µl de C sont additionnés.

b - Gel supérieur

Le gel de concentration à 5 p 100 est réalisé en ajoutant 2,5 ml de 1 B, 2 ml de 2 A, 15,4 ml d'eau, 15 µl de TEMED, 150 µl de 3 A et 100 µl de C.

3 - CONDITIONS D'ELECTROPHORESE

a - Préparation de l'échantillon

L'échantillon est dissout dans un tampon dont la composition est la suivante : SDS (10 p 100), glycérol (20 p 100) 1 A (10 p 100), 2- mercaptoéthanol 5 p 100.

b - Electrophorèse

L'électrophorèse est réalisée dans un tampon Tris 0,025 M Gly 0,18 M pH 8,6 à raison de 8 V/cm.

- AKOBORI S., Bull. Chem. Soc. Japan, 1952, 25, 67-68 (49)
- AMBLER R., Biochem. J., 1965, 96, 32 P (29)
- AZARI P., BAUGH R.F., Arch. Biochem. Biophys., 1967, 118, 138-144 (16,34)
- BLACKBERG L., HERNELL O., FEBS Letters, 1980, 109/2, 180-184 (14)
- BLANC B., ISLIKER M., Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 929 (7)
- BRAUN V., ENGELBERTZ P., Berichte, 1918, 51, 96 (22)
- CAHOURS S., Ann. Chim. Phys., 1877, 10, 13 (21)
- CHERON A., MAZURIER J., FOURNET B., C.R. Acad. Sci., 1977, 284, 585-588 (15)
- CHERVENKA C., Anal. Biochem., 1970, 34, 24 (51)
- COHN E.J., EDSALL J.T., Proteins, amino acids and peptide as ions and depolar ions, Reinhold, NEW-YORK, 1943 (52)
- COX T.M., PETERS T.J., J. Physiol., 1979, 289, 469-478 (18)
- CRESTFIELD A., MOORE S., STEIN W., J. Biol. Chem., 1963, 258, 522 (20)
- DAVIS B., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 121, 404-427 (54)
- EDMAN P., BEGG G., Eur. J. Biochem., 1967, 1, 80 (48)
- GOT R., Clin. Chim. Acta, 1965, 11, 432 (8)
- GROS C., LABOUESSE B., Eur. J. Biochem., 1969, 7, 463 (41)
- GROSS E., WHITKOP B., J. Biol. Chem., 1962, 237, 1856 (23,25)
- HAN K., Thèse Biologie Humaine, 1970, Lille (24)
- HAN K., PLANCHON B., DAUTREVAUX M., BISERTE G., Ann. Pharmaceutiques Fr., 1973, 31, 539-5550 (46,47)
- HANKS J.M., WALLACE R.E., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1949, 71, 196 (17)
- HARTLEY R., Biochem. J., 1970, 119, 805-822 (31,43,45)
- HAUPT H., BAUDNER S., Hoppe-Jeyler's Z. Physiol. Chem., 1973, 354, 944-948 (12)
- HOFMAN T., Biochemistry, 1964, 3, 356 (26)
- HIRS, J. Biol. Chem., 1956, 219, 611-621 (19)
- HUNTER W., GREENWOOD F., Nature, 1962, 194, 495-496 (35)
- JOHANSSON B., Acta Chem. Scand., 1960, 14, 510 (6)
- JOHANSSON B., Acta Chem. Scand., 1969, 23, 683 (10)
- LÖNNERDAL B., CARLSSON J., PORATH J., F.E.B.S. Letters, 1977, 75-1 89-93 (13)
- MALMQUIST J., JOHANSSON B., Biochim. Biophys. Acta, 1971, 236, 38-46 (11)
- MASSON P. HEREMANS J. in PEETER M. Protides of the biological Fluids ELSEVIER éd. Amsterdam, 1966, 14, 115 (9)
- MONTREUIL J., ANTONY N., DESCAMPS J., DUQUESNE N., Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 1963, 3, 129 (3)

- MONTREUIL J., MULLET S., C.R. Acad. Sci., 1960, 250, 1736-1737 (1)
- MONTREUIL J., SPIK G., MONSIGNY M., DESCAMPS J., BISERTE G., DAUTREVAUX M., Experimentia, 1965, 21, 1-4 (4)
- MONTREUIL J., TONNELAT J., MULLET S., Biochim. Biophys. Acta, 1960, 45, 413-421 (2)
- MICHL H., Monatsch. Chem, 1951, 82, 489 (30)
- OVADI J., LIBOV S., ELODI P., Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung, 1967, 2, 455 (32,33)
- PERCY M., BUCHWALD B., Anal. Biochem., 1972, 45, 6067 (42)
- PETERSON R., Anal. Chem., 1953, 25, 1337 (36)
- PETERSON R., BOLLIER M., Anal. Chem., 1955, 27, 1195-1197 (39)
- SPIK G., Thèse Doct. ès Sci., 1968, Lille (38)
- SPIK G., ANN. Nutr. Alim., 1971, 25, A81-134 (5)
- SQUIRE P., DELIN S., PORATH T., Biochim. Biophys. Acta, 1964, 89, 409, 421 (53)
- STEERS E., CRAVEN G.R., ANFINSEN C., BETHUNE J., J. Biol. Chem., 1965, 240, 2478 (27,28)
- TRINDER P., J. Clin. Pathol., 1956, 9, 170 (37)
- WOODS K., WANGS K., Biochim. Biophys. Acta, 1967, 133, 369 (44)
- YPHANTIS D., Biochemistry, 1964, 3, 297 (50)
- ZANETTA J., BRECKENRIDGE W., VINCENDON G., J. Chromatogr., 1972, 69, 291-304 (40)

