

N° d'ordre : 1235

50376  
1985  
5

# MÉMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE 3<sup>ème</sup> CYCLE**

Spécialité : BIOCHIMIE APPLIQUEE

par

**Dominique LEGRAND**



ETUDE STRUCTURALE ET CONFORMATIONNELLE D'UN  
GLYCOPEPTIDE DE 18 kDa ISOLE DU LOBE N-TERMINAL  
DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE ET CONTENANT  
LE SITE DE FIXATION A DU FER

Présenté le 15 Janvier 1985 devant la Commission d'Examen

Président

J. MONTREUIL

Rapporteurs

G. SPIK

R.R. CRICHTON

Examineurs

M.H. LOUCHEUX-LEFEBVRE

G. BISERTE

Ce travail a été réalisé sous la Direction de  
Mademoiselle le Professeur Geneviève SPIK dans le Laboratoire de  
Chimie Biologique (Directeur : Professeur Jean MONTREUIL) de  
l'Université des Sciences et Techniques de Lille (Laboratoire  
Associé au C.N.R.S. n° 217 : Relations structure-fonction des  
constituants membranaires).

A mes parents,

avec toute mon affection

A Anne Marie,

avec tout mon amour

A Geneviève,

Je te remercie d'avoir guidé mes premiers pas dans la Recherche et de m'avoir fait découvrir les joies qu'elle procure. J'ai toujours trouvé auprès de toi beaucoup de gentillesse, de disponibilité et de compréhension ainsi que de précieux conseils. Sois assurée de ma profonde reconnaissance et de mon amitié.

---

A Monsieur Le Professeur MONTREUIL,

Vous avez bien voulu m'accepter et m'intégrer dans votre Laboratoire. En me confiant ce travail que j'ai réalisé avec le plus grand plaisir, vous m'avez permis de partager la vie du C-9 et de bénéficier, non seulement de la clarté de votre enseignement mais aussi de votre dynamisme et de votre haute compétence scientifique. Je voudrais vous exprimer ma plus vive gratitude pour la confiance que vous m'avez témoignée. Permettez-moi de joindre à ma profonde reconnaissance mon respectueux attachement.

---

A Monsieur Le Professeur R.R. CRICHTON,

Malgré vos nombreuses occupations, vous m'avez fait l'honneur d'être Rapporteur de cette thèse. Je tiens à vous exprimer ma respectueuse gratitude

---

A Madame le Docteur M.H. LOUCHEUX-LEFEBVRE,

Vous avez bien voulu me faire l'honneur de juger cette thèse. Soyez remerciée et assurée de ma profonde reconnaissance.

---

A Monsieur le Professeur G. BISERTE,

Vous avez toujours suivi nos travaux avec beaucoup d'intérêt et de bienveillance. Vous m'avez fait l'honneur de juger cette thèse. Veuillez trouver l'expression de ma reconnaissance.

---

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

*Monsieur le Professeur P. JOLLES, Madame le Docteur J. JOLLES et Madame le Docteur M.H. METZ-BOUTIGUE pour leur fructueuse collaboration,*

*Madame le Docteur M.H. LOUCHEUX et Monsieur le Docteur J.P. AUBERT pour m'avoir permis de réaliser les études par dichroïsme circulaire,*

*Monsieur le Docteur J.M. LHOSTE pour avoir réalisé les études par résonance paramagnétique électronique,*

Je remercie très sincèrement *Monsieur le Docteur JOEL MAZURIER* pour ses conseils, sa disponibilité et sa gentillesse. Qu'il soit assuré de toute mon amitié.

Je tiens enfin à remercier tous ceux qui, par leur collaboration, leur aide et leur amitié m'ont aidé dans la réalisation de ce travail, en particulier ceux du "103".

---

SOMMAIRE

	Page
INTRODUCTION . . . . .	1
GENERALITES . . . . .	4
I. - PROPRIETES PHYSICOCHEMIQUES DU FER . . . . .	4
A. - Les états d'oxydation du fer . . . . .	4
B. - Les coordinations du fer . . . . .	4
C. - Les complexants du fer . . . . .	4
ii. - LE FER DANS L'ORGANISME HUMAIN . . . . .	5
A. - La répartition du fer . . . . .	5
B. - L'absorption du fer . . . . .	5
C. - Les formes de réserve. . . . .	6
D. - Le transport du fer : les transferrines . . . . .	7
III. - STRUCTURE DE LA PARTIE PROTEIQUE DES TRANSFERRINES . . . . .	7
A. - Structure covalente des transferrines . . . . .	7
B. - Conformation des transferrines . . . . .	17
IV. - STRUCTURE ET CONFORMATION DES GLYCANNES DE LA LACTO- TRANSFERRINE HUMAINE . . . . .	24
A. - Structure covalente . . . . .	24
B. - Conformation des glycanes . . . . .	26
V. - LES SITES DE FIXATION DU FER DES TRANSFERRINES . . . . .	30
A. - Propriétés physicochimiques générales . . . . .	30
B. - Les différences entre les deux sites de fixation . . . . .	31



	Page
C. - Distance entre les deux sites de fixation . . . . .	33
D. - Nature et localisation des ligands impliqués dans la fixation de l'anion et du métal . . . . .	33
VI. - ROLES BIOLOGIQUES DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE . . . . .	39
A. - Localisation de la lactotransferrine humaine . . . . .	39
B. - Rôle de la lactotransferrine humaine dans la nutrition en fer du nourrisson et dans l'ab- sorption intestinale . . . . .	40
C. - Rôle de la lactotransferrine humaine dans le stockage du fer dans le foie . . . . .	41
D. - Rôle de la lactotransferrine humaine dans les mécanismes de défense antibactérienne . . . . .	42
E. - Conclusions . . . . .	47
CONCLUSIONS DES GENERALITES . . . . .	48
TRAVAUX PERSONNELS . . . . .	50
COUPURES PROTEOLYTIQUES MENAGEES DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE - ISOLEMENT ET ETUDE DES PROPRIETES DES FRAGMENTS N- ET C- TERMINAUX	
I. - MISE AU POINT DES CONDITIONS D'HYDROLYSE ENZYMATIQUE MENAGEE DE LA LACTOTRANSFERRINE . . . . .	51
A. - Hydrolyse pepsique . . . . .	51
B. - Hydrolyse papaïque . . . . .	53
C. - Action de la ficine . . . . .	53
D. - Action de la protéase V8 . . . . .	53
E. - Hydrolyse tryptique . . . . .	54

	Page
F. - Hydrolyse chymotryptique . . . . .	54
G. - Conclusions . . . . .	55
II. - ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES FRAGMENTS OBTENUS . .	55
A. - Préparation et caractérisation du fragment pepsique . . . . .	56
B. - Préparation et caractérisation des fragments obtenus par la protéase V8 . . . . .	56
C. - Préparation et caractérisation des fragments obtenus par hydrolyse tryptique . . . . .	59
D. - Conclusions . . . . .	59
III. - ETUDE DES PROPRIETES PHYSICOCHEMIQUES DES FRAGMENTS N- ET C- TERMINAUX ISOLES PAR HYDROLYSE TRYPTIQUE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE . . . . .	60
A. - Comportement électrophorétique des fragments N-trp et C-trp . . . . .	61
B. - Composition en acides aminés et masse molé- culaire des fragments N-trp et C-trp . . . . .	61
C. - Composition centésimale et molaire en oses des fragments N-trp et C-trp . . . . .	61
D. - Fixation du fer des fragments N-trp et C-trp . . .	64
E. - Etude par dichroïsme circulaire des fragments N-trp et C-trp . . . . .	64
F. - Conclusions . . . . .	68
IV. - PHENOMENES D'ASSOCIATION ET DE REASSOCIATION DES LOBES N- et C- TERMINAUX DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE . .	68
A. - Association et dissociation des lobes N- et C- terminaux de la lactotransferrine . . . . .	68

B. - Réassociation des lobes N- et C- terminaux de la lactotransferrine . . . . .	71
C. - Conclusions . . . . .	79
ISOLEMENT ET PROPRIETES D'UN GLYCOPEPTIDE DE 18 KDa FIXANT LE FER OBTENU A PARTIR DU FRAGMENT N-TERMINAL DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE	
I. - CARACTERISATION ET LOCALISATION D'UN GLYCOPEPTIDE DE 18.500 DALTONS FIXATEUR DU FER . . . . .	82
II. - PRINCIPALES PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DU GLYCOPEPTIDE N2	90
A. - Comportement électrophorétique du glycopeptide N2 .	90
B. - Composition en acides aminés et masse moléculaire du glycopeptide N2 . . . . .	91
C. - Composition centésimale et molaire en oses du glycopeptide N2 . . . . .	91
D. - Fixation du fer par le glycopeptide N2 . . . . .	91
E. - Analyse en résonance paramagnétique électronique du glycopeptide N2 . . . . .	96
F. - Etude par dichroïsme circulaire du glycopeptide N2.	96
G. - Cristallisation . . . . .	99
H. - Conclusions . . . . .	102
CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE ET SECONDAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE	
I. - CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE . . . . .	104
A. - Critères de choix des peptides . . . . .	104

	Page
B. - Isolement de peptides renfermant de la cystine en vue de la localisation des ponts disulfures de la lactotransferrine . . . . .	105
C. - Isolement de peptides ne renfermant pas de cystine en vue du réenchaînement de fragments protéiques de la lactotransferrine . . . . .	110
D. - Conclusions . . . . .	113
II. - ETUDE THEORIQUE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE . . . . .	115
A. - Choix des méthodes de calcul . . . . .	115
B. - Structure secondaire de la lactotransferrine humaine . . . . .	116
C. - Conformation hypothétique du site de fixation du fer contenu dans le glycopeptide N2 . . . . .	119
D. - Conclusions . . . . .	121
CONCLUSIONS GENERALES . . . . .	123
BIBLIOGRAPHIE . . . . .	127
APPENDICE TECHNIQUE	

---

SOMMAIRE APPENDICE TECHNIQUE

	Page
I. - PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE . . . . .	1
A. - Préparation de la lactotransferrine humaine native . . . . .	1
B. - Préparation de l'apolactotransferrine . . . . .	2
C. - Préparation de la lactotransferrine saturée en métal . . . . .	2
II. - PREPARATION DES FRAGMENTS DE LACTOTRANSFERRINE HUMAINE. .	3
A. - Microméthodes d'hydrolyse enzymatique de la lactotransferrine humaine . . . . .	3
B. - Hydrolyses enzymatiques préparatives . . . . .	6
C. - Méthodes d'isolement des fragments protéiques . . .	7
D. - Préparation des fragments de lactotransferrine saturés en fer . . . . .	7
III. - PREPARATION DE PEPTIDES DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE EN VUE DE LA CARACTERISATION DES PONTS DISULFURES . . .	8
A. - Hydrolyses enzymatiques . . . . .	8
B. - Chromatographie de tamisage moléculaire . . . . .	8
C. - Chromatographie liquide en haute pression . . . . .	9
D. - Chromatographie sur papier . . . . .	9
E. - Electrophorèse sur papier . . . . .	9
IV. - ANALYSE CHIMIQUE . . . . .	10
A. - Dosage des protéines . . . . .	10
B. - Dosage du fer . . . . .	10
C. - Détermination de la composition en acides aminés des peptides de la lactotransferrine . . . . .	11

	Page
D. - Composition molaire en glucides . . . . .	12
E. - Détermination des acides aminés N- et C- terminaux .	
F. - Détermination de la séquence des fragments . . . . .	13
G. - Détection des résidus de cystine dans les peptides de la lactotransferrine . . . . .	13
V. - ANALYSE PHYSIQUE . . . . .	14
A. - Immunodiffusion radiale double . . . . .	14
B. - Electrophorèse en gel de polyacrylamide . . . . .	14
C. - Analyse par dichroïsme circulaire . . . . .	15
VI. - METHODES RELATIVES AUX ETUDES DE CRISTALLISATION DU GLYCOPEPTIDE N2 . . . . .	16
A. - Principe . . . . .	16
B. - Matériel et méthode . . . . .	16
VII. - METHODES DE CALCUL DES STRUCTURES SECONDAIRES ET DES ZONES HYDROPHOBES ET HYDROPHILES DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE	18
A. - Méthode de <i>CHOU et FASMAN</i> ( ) . . . . .	20
B. - Méthode de <i>GARNIER et al.</i> ( ) . . . . .	21
C. - Méthode de <i>KYTE et DOOLITTLE</i> ( ) . . . . .	22

---

INTRODUCTION



La découverte de la lactotransferrine humaine dans le lait de femme, par MONTREUIL en 1960, (MONTREUIL et MULLET (159), MONTREUIL, TONNELAT et MULLET (161)), a ouvert la voie, au Laboratoire, à des recherches structurales sur les fractions protéiques et glycaniques des transferrines et à des recherches sur les rôles biologiques de ces deux fractions dans les mécanismes d'interaction des transferrines avec leur récepteur membranaire.

L'étude du rôle biologique d'une protéine ne peut être envisagée correctement qu'après connaissance de tout ou partie de ses caractéristiques structurales. C'est en ce sens qu'ont été entrepris de nombreux travaux de détermination de la structure protéique et glycanique de la lactotransferrine humaine.

Notre travail, commencé en 1982 lors de notre arrivée au Laboratoire, s'est orienté vers la détermination de la structure de la partie protéique de la lactotransferrine humaine.

Nous nous sommes intéressé, d'une part, aux problèmes de la détermination de la séquence primaire de la lactotransferrine et plus particulièrement, à la détermination de la position des ponts disulfures sur la chaîne peptidique. D'autre part, nous avons voulu mettre en évidence un aspect de la structure tridimensionnelle de la lactotransferrine humaine : l'existence de "blocs de construction" appelés domaines structuraux, capables de se structurer indépendamment et, comme c'est le cas pour d'autres protéines, de posséder un rôle biologique particulier. En effet, la présence d'homologies internes dans les séquences peptidiques des transferrines permet de penser que celles-ci seraient constituées de deux, quatre ou six domaines structuraux. Nous avons voulu isoler ces domaines par l'hydrolyse enzymatique ménagée.

Les résultats que nous avons obtenus concernent, premièrement, l'isolement et l'étude physicochimique des deux lobes N- et C- terminaux de la lactotransferrine humaine ainsi que l'isolement et l'étude d'un glycopeptide : le plus petit glycopeptide fixant le fer jamais isolé d'une transferrine. Ce glycopeptide, appelé glycopeptide N2, correspondrait à l'un des six domaines hypothétiques de la lactotransferrine. Deuxièmement, nos résultats concernent l'étude de la structure primaire et de la structure

secondaire calculée de la lactotransferrine humaine. Les calculs des structures secondaires et des zones hydrophobes de la protéine nous amènent à proposer un schéma du site de fixation du fer.

Les travaux que nous avons réalisés ont couvert un large champ d'investigations physicochimiques réclamant des expérimentations que seules les collaborations fructueuses avec les équipes du *Professeur JOLLES*, de *Mme LOUCHEUX* et de *Monsieur LHOSTE* ont permises.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus a fait l'objet des publications et communications suivantes :

Publications :

1. - "Location of the iron-binding sites of Lactotransferrin and importance of the glycan structures in the iron uptake".  
G. SPIK, J. MAZURIER, D. LEGRAND, V. DEBRUYNE, J. MONTREUIL  
Elsevier Science Publishers B.V. (1983), Structure and Function of Iron Storage and Transport Proteins, I. URUSHIZAKI *et al.* eds., 223 -230.
2. - Characterization and localization of an iron-binding 18Kda Glycopeptide isolated from the N-terminal half of Human Lactotransferrin".  
D. LEGRAND, J. MAZURIER, M.H. METZ-BOUTIGUE, J. JOLLES, P. JOLLES, J. MONTREUIL, G. SPIK.  
Biochim. Biophys. Acta (1984) 787, 90 -96
3. - "Human Lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins".  
M.H. METZ-BOUTIGUE, J. JOLLES, J. MAZURIER, F. SCHOENTGEN, D. LEGRAND, G. SPIK, J. MONTREUIL, P. JOLLES.  
Eur. J. Biochem. (1984) 145, 659 - 676

Communications par affiches :

1. - "Functions of Lactotransferrin and Serotransferrin glycans"

J. MAZURIER, D. LEGRAND, M. GOAVEC, D. LEGER, S. BOUQUELET,  
J. MONTREUIL, G. SPIK

VII° International Symposium on Glycoconjugates, LUND-RONNEBY  
(SWEDEN), July 17 - 23, 1983.

2. - "Physico-chemical and biological Properties of the iron-binding  
Domains isolated from the N- et C- terminal regions of Human  
Lactotransferrin"

G. SPIK, D. LEGRAND, J. MAZURIER, J. MONTREUIL

VI° International Conference on Proteins of iron Storage and  
Transport, SAPPORO (JAPAN), July 11 - 14, 1983.

---

GENERALITES

## I. - PROPRIETES PHYSICOCIMIQUES DU FER

### A. - Les états d'oxydation du fer

Le fer est un métal de la première série de transition et possède la formule électronique :  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^6$ . Le fer, de même que la série des métaux de transition (manganèse, cobalt, etc.) peut être trouvé dans une grande variété d'états d'oxydation allant de -2 à +6, les états d'oxydation les plus communs étant les états d'ions ferriques (+3) et ferreux (+2). Seuls ces deux derniers états d'oxydation du fer sont stables en solution aqueuse et co-existent dans les conditions physiologiques.

### B. - Les coordinations du fer

Dans les solutions acides, les ions ferreux et ferriques existent sous forme de  $Fe(H_2O)_6^{2+}$  et  $Fe(H_2O)_6^{3+}$ . Les molécules d'eau, dans ces sphères de coordination, peuvent être remplacées par de nombreux ligands incluant les halogénures, cyanides, thiocyanates. La géométrie préférentielle pour la coordination du fer est octaédrale mais des contraintes stériques peuvent engendrer d'autres géométries : tétraédrale par exemple pour les complexes avec les chlorures et bromures.

Tandis que le fer ferreux possède une forte affinité pour les ligands susceptibles de délocaliser ses électrons dans des orbitales  $\pi$  vacantes (ligands diiminés), le fer ferrique possède, quant à lui, une forte affinité pour les ligands capables de se coordonner grâce à un oxygène (phosphate, oxalate, dicétones, phénols, polyols).

### C. - Les complexants biologiques du fer

Une grande variété de micro-organismes produisent et relâchent de petites molécules, appelées sidérophores, capables de chélater le fer ferrique. Ces ligands, contenant des groupements hydroxamates ou phénoliques, forment des complexes extrêmement stables, peu sujets à l'hydrolyse.

Un tel système de mobilisation du fer n'est apparemment pas aussi développé dans le système animal. Le fer ferrique est réduit en fer ferreux avant

assimilation à travers la membrane intestinale. Il est ensuite pris en charge par des molécules de transport (transferrines) ou des molécules de stockage (ferritine), ceci sous la forme ferrique.

## II. - LE FER DANS L'ORGANISME HUMAIN

### A. - La répartition du fer

Puisque directement impliqué dans les mécanismes biologiques vitaux que sont les chaînes d'oxydo-réduction mitochondriales, et en général, dans tous les processus d'oxydo-réduction cellulaires et extracellulaires, le fer constitue, pondéralement, le principal métal lourd présent chez les mammifères. Cette quantité, chez l'homme adulte, est de l'ordre de 4 à 5g, répartis principalement en 2 compartiments constitués par les formes actives et les formes de réserve. Un troisième compartiment existe, c'est celui des formes de transport du fer. Il ne contient que 0,2 % du fer et assure la répartition entre les deux compartiments principaux. Dans ce compartiment se trouvent des glycoprotéines appelées transferrines, responsables du transport du fer et dont nous développerons l'étude par la suite.

### B. - L'absorption du fer

Le système qui permet l'absorption quotidienne d'une quantité minime de fer (1 à 2 mg) est très complexe et fait l'objet d'une régulation importante. L'absorption a lieu principalement au niveau du jejunum et du duodenum où la bordure en brosse des entérocytes est en contact direct avec le fer alimentaire. Le mécanisme de l'absorption intestinale du fer est encore assez mal connu (FORTH *et al.* (73), TURNBULL (215)). On sait que le fer, quelle que soit sa forme (ferreuse ou ferrique), peut être absorbé. Le fer ferreux est absorbé par l'intestin de sujets anémiés par ferriprivation de 1,5 à 10 fois plus vite que le fer ferrique (MOORE *et al.* (162), HAHN *et al.* (81)) mais cette différence de vitesse d'absorption serait probablement en relation avec la différence de solubilité entre le fer ferreux ( $1,6 \cdot 10^{-2} M$ ) et le fer ferrique ( $10^{-18} M$ ) (STARKENSTEIN (204)). Après passage dans l'estomac, le fer devenu fer ferrique, arrive dans le duodenum et est, soit complexé par des ligands, soit

précipité sous la forme d'hydroxydes ferriques. Quelques mécanismes d'absorption du fer ferreux ou du fer ferrique complexé par l'entérocyte ont été décrits dans la littérature (GRANICK (78) , DOWDLE *et al.*(64), HELBOCK *et al.* (87)). Le mécanisme de l'absorption du fer en 2 étapes est maintenant bien admis, il consisterait en une absorption du fer par l'entérocyte, suivie de son transfert de l'entérocyte vers la circulation sanguine. La première étape, dont nous discuterons dans le chapitre "Rôles biologiques de la lactotransferrine humaine", nécessiterait l'intervention d'une transferrine. Dans la seconde étape, le fer serait capté, selon HUEBERS *et al.*(94), par une transferrine différente de la sérotransferrine et stocké par la ferritine. La majeure partie du fer absorbé pénètre ensuite dans le plasma où il est véhiculé par la sérotransferrine vers les formes actives ou vers les formes de réserve.

### C. - Les formes de réserve

Le foie constitue un organe important de réserve en fer puisqu'il renferme, au niveau de ses cellules parenchymateuses, environ 1/3 des réserves en fer de l'organisme. Le système réticulo-endothélial peut également mettre le fer en réserve. Dans des conditions non pathologiques, chez l'homme, le fer de réserve est présent à raison de 10 à 15 mg/Kg. Il se répartit pour 2/3 dans la ferritine et pour 1/3 dans l'hémosidérine.

La ferritine et, dans une moindre mesure, l'hémosidérine constituent les deux formes majeures de réserve de fer dans l'organisme. La ferritine est une protéine soluble dans l'eau isolée pour la première fois par LAUFBERGER (108) en 1937. Elle possède une masse moléculaire de 445.000 daltons et est constituée de 24 sous-unités que DRYSDALE (65) décrit comme différentes selon l'origine et la nature des tissus qui la contiennent. Les ferritines seraient composées de 2 types de sous-unités qui existent en proportions différentes selon les tissus. Ainsi le type L est trouvé principalement dans le foie et la rate et le type H, principalement dans le coeur. Les séquences primaires des apoferritines de rate de cheval, de rate humaine et de foie humain ont été déterminées par HEUSTERSPREUTE *et CRICHTON* (88), WUSTEFELD *et CRICHTON* (236), ADDISON *et al.* (4), respectivement. BANVARD *et al.* (14) ont réalisé des études en diffraction aux rayons X sur la molécule. La ferritine peut fixer jusqu'à 4.500 atomes de fer ferrique par molécule.

L'hémosidérine est une protéine insoluble qui contient plus de fer que la ferritine mais ce fer est plus faiblement mobilisable que celui de la ferritine (WYLLIE *et al.* (237)). Cette protéine peut être considérée comme un constituant amorphe composé de débris cellulaires et de molécules de ferritine plus ou moins dégradées.

#### D. - Le transport du fer : les transferrines

Les transferrines constituent une classe importante de glycoprotéines fixatrices de fer. On les trouve dans tous les liquides physiologiques des vertébrés (AISEN *et al.* (7)) et des invertébrés (HUEBERS *et al.* (94), MARTIN *et al.* (125)). Ces glycoprotéines, qui possèdent une masse moléculaire voisine de 80.000 daltons et peuvent fixer 2 ions  $Fe^{3+}$ , comprennent la sérotransferrine, la lactotransferrine et l'ovotransferrine.

La sérotransferrine est le principal transporteur du fer dans l'organisme. Elle est chargée des échanges du fer au niveau de trois tissus principaux : la lignée érythrocytaire constituée de la moelle érythropoïétique et des globules rouges circulants, le système réticulo-endothélial et le parenchyme hépatique (COOK *et al.* (54)).

La lactotransferrine humaine, sur laquelle portent nos travaux, a été découverte bien après la sérotransferrine, isolée en 1927 par BARKAN (15). C'est en 1960 que MONTREUIL et MULLET (159) puis MONTREUIL *et al.* (161) et JOHANSSON *et al.* (97) ont décrit simultanément un protéide rose-saumon isolé du lait de femme auquel MONTREUIL *et al.* (161) donnèrent le nom de lactotransferrine. Nous développerons ultérieurement les rôles biologiques joués par cette protéine.

### III. - STRUCTURE DE LA PARTIE PROTEIQUE DES TRANSFERRINES

#### A. - Structure covalente des transferrines

##### 1. Structure primaire des transferrines

De toute la famille des transferrines, seule la structure primaire de la sérotransferrine humaine, de l'ovotransferrine de poule et de la lactotransferrine humaine ont été l'objet d'études approfondies.



La séquence primaire complète de l'ovotransferrine de poule a été déterminée, en 1982, par *JELTSCH et CHAMBON (96)* et par *WILLIAMS et al. (230)*. Les premiers auteurs utilisèrent la séquence nucléotidique complète du mRNA codant pour l'ovotransferrine de poule, les seconds utilisèrent des méthodes classiques de détermination de séquence. Les résultats portent à 686 résidus d'acides aminés la longueur de la chaîne peptidique de l'ovotransferrine.

L'isolement et la détermination de la séquence de 10 fragments obtenus après coupures par le bromure de cyanogène et par des protéases permirent à *MAC GILLIVRAY et al. (123,122)* de caractériser la séquence peptidique complète de la sérotransferrine humaine soit 679 résidus d'acides aminés. En 1984, *UZAN et al. (216)* et *YANG et al. (238)* réussirent à isoler, identifier et caractériser, respectivement, le mRNA et le cDNA codant pour la sérotransferrine humaine. Ces travaux apportent quelques corrections à la séquence totale décrite par *MAC GILLIVRAY et al. (123,122)*.

En ce qui concerne la lactotransferrine humaine, l'étude de sa séquence primaire a été entreprise au Laboratoire, en collaboration avec le groupe du Professeur *JOLLES*. Dès 1974, *BLUARD-DECONINCK et al. (29)* isolèrent des peptides contenant de l'acide cystéique et *SPIK et al. (203)* isolèrent des glycopeptides tryptiques et chymotryptiques. La séquence N-terminale de la lactotransferrine fut déterminée par *JOLLES et al. (98)* et des études portant sur deux glycopeptides furent réalisées par *METZ-BOUTIGUE et al. (145)*. La coupure de la lactotransferrine par le bromure de cyanogène est la méthode qui a permis d'avancer véritablement dans la détermination de sa séquence primaire. La molécule possède six résidus de méthionine par mole, permettant ainsi sa coupure par le bromure de cyanogène (*MAZURIER et al. (141)*) en sept fragments BrCN que *METZ-BOUTIGUE et al. (150, 146)* ont isolés et alignés par analogie avec la sérotransferrine humaine : les fragments FI, FII, FIII, FIV, FV', FVI et FVII (voir la Fig. 25, p. 112, dans la partie "Travaux personnels"). Les fragments FII, FIII, FIV, FVI et FVII appartiennent à la région C-terminale tandis que les fragments FI et FV' appartiennent à la région N-terminale ; le fragment FI constitue le plus long fragment BrCN, il contient un peu plus de 350 résidus d'acides aminés et déborde largement dans la région C-terminale. En 1982, 4 fragments (FIII, FIV, FVI et FV') étaient séquencés. La nécessité de déterminer la séquence des fragments FI, FII et FVII ainsi

que la nécessité de réenchaînement des différents fragments BrCN ont conduit à utiliser des fragments et peptides issus de la protéolyse de la molécule. L'isolement de la moitié C-terminale obtenue par hydrolyse pepsique de la lactotransferrine selon le protocole de *LINE et al.*(116) et l'isolement de la moitié N-terminale par hydrolyse tryptique (*LEGRAND et al.*(112) ont autorisé l'obtention de nouveaux peptides après recoupeure par la pepsine, la trypsine, la chymotrypsine et la protéase V8 de *Staphylococcus aureus*. Ces travaux, auxquels nous avons participé en collaboration avec le groupe de P. JOLLES ont permis d'achever la détermination de la séquence peptidique complète des 703 résidus d'acides aminés de la lactotransferrine (*METZ-BOUTIGUE et al.* (147) ; nous les développerons ultérieurement dans la partie "Travaux personnels".

La séquence complète de la lactotransferrine humaine est représentée dans la figure 1, p. 10 , où l'on retrouve également celles de la sérotransferrine humaine et de l'ovotransferrine de poule. Nous noterons que les résidus 395 à 400 qui constituent en partie le fragment BrCN FVII n'ont pu être séquencés à cause de leur résistance à la dégradation d'EDMAN. Cependant, la détermination de séquence d'un long peptide (résidus 356 à 406) a permis de le localiser et sa composition en acides aminés a été déterminée (Asp, Ser, Glu, Gly, Phe).

En tenant compte de la séquence d'acides aminés et la composition statistique en carbohydrates due à la poly-disparité de la structure des glycanes (*SPIK et al.*(200)), la masse moléculaire calculée de la lactotransferrine humaine s'élève à  $82.400 \pm 400$ .

## 2. Emplacement des ponts disulfures des transferrines

Aucune étude des transferrines n'a montré l'existence de résidus de cystéine dans la chaîne polypeptidique : tous les résidus sont impliqués dans la constitution des ponts disulfures.

Les ponts disulfures jouent un rôle important dans la conformation de la protéine, la connaissance de leur position sur la chaîne peptidique des transferrines est primordiale.

Leur localisation est rendue possible par l'isolement et la caractérisation de peptides pluricaténaires porteurs d'un ou plusieurs résidus de cystine.

LTF G R R R R S V Q W C I A V S Q P E A T K C F Q W Q R N M R K V R G P P V S C  
 STF Y P D K T V R W C I A V S E H E A T K C Q S F R D H M K S V I P S D G P S V A C  
 OTF A P P K S V I R W C T I S S P E E K K C N N L R D L T Q Q E R I S L T C

LTF A R R A R V V W C I A V G E G E L R K C N Q W S G L S Q G S V T C  
 STF Q E C K P V K W C I A L S H H E R L K C D E W S V N S V G K I E C  
 OTF R E N R I Q W C I A V G K D F K S K C D R W S V V S N G D V E C

LTF I K R D S P I Q C I Q A I A E N R A D A V T L D G G F  
 STF V K K A S Y L D C I R A I A A N E A D A V T L D A G L  
 OTF V Q K A T Y L D C I K A I A N N E A D A S L D G G Q

LTF W S A S T T E D C I A L V L K G E A N A S V L M (D, S, E, G, F) L A R M S L D G G Y  
 STF V S A E T T E D C I A K I M N G E A D A M S L D G G F  
 OTF T V V D E T K D C I T I K I H K G E A D A V A L D G G L

OTF I Y E A G L A P Y K L R P V A A E V Y G T E R Q P R T H  
 STF V Y D A Y L A P N N L K P V V A E F Y G S K E D P Q T F  
 OTF V F E A G L A P Y K L K P I A A E I Y E H T E G S T T S

LTF V Y T A G K C G L V P V L A E N Y K S Q S S D P D P N C V D R P V E G  
 STF V Y I A G K C G L V P V L A E N Y N K S D N C E D T P E A G  
 OTF V Y T A G V C G L V P V M A E R Y D D E S Q C S K T D E R P A S

LTF Y Y A V A V V I K K G G S F O L N E L Q G L K S C H T G L R T A G W N V P I G  
 STF Y Y A V A V V K K D S G F O M N Q L R G K K S C H T G L G R S A G W N I P I G  
 OTF Y Y A V A V V I K K G T E F T Y N D L Q G K T S C H T G L G R S A G W N I P I G

LTF Y L A V A V V I R R S D T S L T W N S V K G K K S C H T A V D R T A G W N I P M G  
 STF Y F A V A V V K K S A S D L T W D N L K G K K S C H T A V G R T A G W N I P M G  
 OTF Y F A V A V A R K D S N V N W N N L K G K K S C H T A V G R T A G W I P M G

LTF T L R P F L N W T G P P E P T E A A V R F F S A S C V P G A O K G Q F P  
 STF L L Y C D L P E P R K P L E K A V A N F F S G S C A P C A O G T D F P  
 OTF T L L H W G A I E W E G I E S G S V E Q A V A X F F S A S C V P G A T T E R

LTF L L F N Q T G S C K F D E Y F S Q S C A P G S D P R S  
 STF L L Y N K I N H C R F D E F F S E G C A P G S K K D S  
 OTF L I H N R T G T C N F D E Y F S E G C A P G S P P N S

LTF N L C R L C A G T G E N K C A F L S K E P K F S Y S G A F K C L R D G A G  
 STF Q L C Q L C P I G C G N C S T L N E Y F G Y S G A F K C L K D G A G  
 OTF K L C R Q C K I G D P K T K C A R N A P Y S G Y S G A F H C L K D G K G

LTF N L C A L C I G D E E G E N K C V P N S N E R Y Y G Y T G A F R C L A E N A G  
 STF S L C K L C M G S G L N L C E P N N K E G Y Y G Y T G A F R C L V E K G  
 OTF R L C Q L C Q G S G G I P P E K C V A S S H E K Y F G Y T G A F R C L V E K G

LTF D V A F I R E S T V F E D L S D E A E R D E Y E L L C P D N T R I  
 STF D V A F V K H S T I F E N L A N K A D R D Q Y E L L C L D N T R I  
 OTF D V A F V K H T T V N E H A P D L N D E Y E L L C L D G S R

LTF D V A F V K D V T V L Q N T D G N N N E A W A K D L K L A D F A L L C L D G K R  
 STF D V A F V K H O T V P Q N T G G K N P D P W A K N L N E X D Y E L L C L D G T R  
 OTF D V A F I Q H S T V E E N T G G K N K A D W A K N L O H D D F E L L C T D G R R

LTF K P V D F K C D C H L A R V P S H A V A R S V N G K E D A I W N L L R Q A O  
 STF K P V D E Y K D C H L A Q V P S H T V V A R S M G G K E D I W E L L N Q A O  
 OTF Q P V D N Y K T C N W A R V A A H A V A R D D N K V E D I W S F L S K A O

LTF K P V T E A R S C H L A M A P N H A V V S R M D K V E R L K Q V L L H Q Q A  
 STF K P V E E Y A N C H L A R A P N H A V V T R K D K E A C Y H K I L R Q Q H  
 OTF A N V M C Y R E C N L A E V P T H A V V V R P E K A N K I R D L L E R Q E K

LTF E K F G K D K S P K F Q L F G S P S G Q K D L L F K D S A I G F S R V P  
 STF E H F G K D K S K E F L F S S P H G K D L L F K D S A H G L K V P  
 OTF S D F G V D T K S D F H L F G P P G K K D P V L K D L L F K D S A I M L K R V P

LTF K F G R N G S D C P D K F C L F Q S E T K N I L L F N O N T E C L A R L H  
 STF L F G D N Y T D C S G N F C L F R S E T K D I L L F R D D T V C L A K L H  
 OTF R F G Y N G S E K S K F H M F E S Q N K F L L F K D L T K C L F K V R

LTF P R I D S G L Y L G S G Y F T A I Q N L R K S E E E V A  
 STF P R M D A K M Y L G Y E Y V T A I R N L R E G T C P E A P T  
 OTF S L M D S Q L Y L G F E Y Y S A I Q S M R K D Q L T P S P

LTF G K T T Y E K Y L G P Q Y V A G I T N L R K C S T S F L L E A C E F L R K  
 STF D R N T Y E K Y L G E E Y V K A V G N L R K C S T S S L L E A C T F R R P  
 OTF E G T T Y K E F L G D K F Y T V I S N L K T C N P S O I L Q M C S F L E G K

- Figure 1 -

Séquence de la lactotransferrine humaine (LTF) (147) comparée à celles de la sérotransferrine humaine (STF) (122) et de l'ovotransferrine de poule (OTF) (96) : résidus homologues dans chaque moitié des transferrines ; \* : emplacement du glycanne

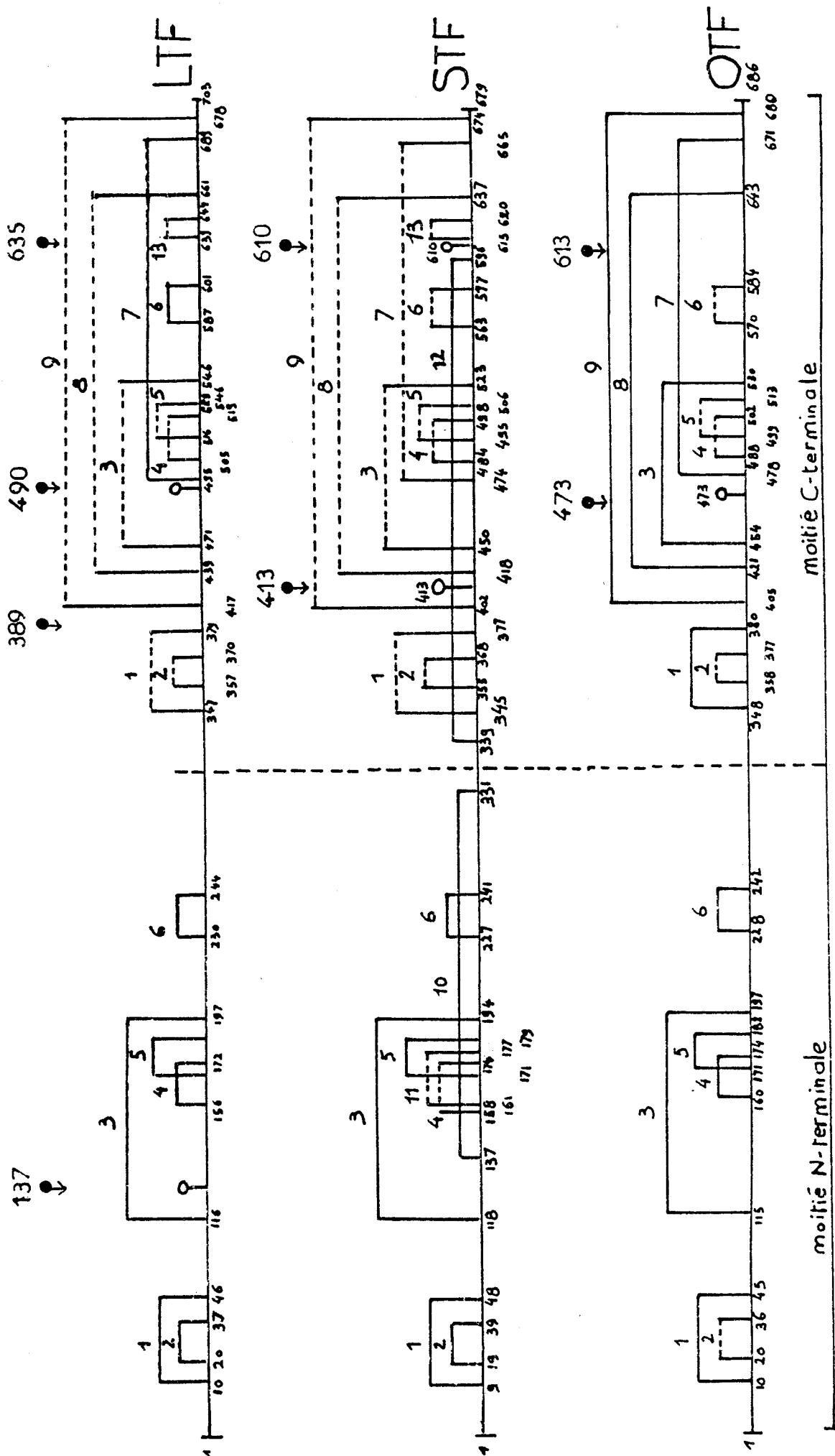
Ainsi qu'il est montré dans la figure 2, p. 12, l'ovotransferrine de poule possède le plus petit nombre de demi-cystines, soit 30 résidus, 12 d'entre eux sont situés dans la moitié N- terminale et 18 dans la moitié C- terminale : la position de 12 ponts disulfures a été précisée (ELLEMAN et WILLIAMS (68)).

Dans la sérotransferrine humaine qui contient 38 résidus de demi-cystine, 16 sont situés dans la moitié N- terminale et 22 dans la moitié C- terminale : 6 ponts disulfures sur 19 ont pu être localisés (BRUNE et al.(40), MAC GILLIVRAY et al. (122)).

La lactotransferrine humaine, dont l'isolement des peptides à cystine a été entreprise au Laboratoire, en collaboration avec celui du Professeur JOLLES, possède 32 résidus de demi-cystine soient 16 ponts disulfures dont aucun, jusqu'en 1982, n'avait pu être caractérisé directement. Des travaux d'isolement de peptides à cystine auxquels nous avons participé et dont nous discuterons dans la partie "Travaux personnels", ont permis de localiser les positions de 8 ponts disulfures (METZ-BOUTIGUE et al.(147)). Parmi ces 8 ponts disulfures, nous trouvons tous les ponts disulfures de la moitié N- terminale (soit 6 au total : 1N, 2N, 3N, 4N, 5N et 6N) et 2 ponts disulfures de la région C-terminale (6C et 7C). Nous noterons que l'existence du pont 14N, évoquée par METZ-BOUTIGUE et al. (150) et qui serait situé à proximité du pont 6N, a été infirmée par nos travaux.

Ainsi que le montre la figure 2, p. 12, la lactotransferrine humaine semblerait ne posséder qu'un pont disulfure supplémentaire (le pont 13C) par rapport à l'ovotransferrine de poule. Ce pont 13C est positionné par analogie avec le pont 13C de la sérotransferrine humaine. Les autres ponts disulfures de la lactotransferrine qui n'ont pas été caractérisés directement (ponts 1C, 2C, 3C, 4C, 5C, 8C et 9C) sont positionnés par analogie avec la sérotransferrine humaine et l'ovotransferrine de poule.

Nous remarquerons qu'il existe de nombreuses homologues dans les positions des ponts disulfures des moitiés N- et C- terminales des transferrines citées ci-dessus, avec, cependant, un nombre de ponts disulfures supérieur dans la région C- terminale de ces molécules (10 ponts disulfures sur les 16 ponts que contient la lactotransferrine humaine). De plus, leur positionnement dans la chaîne peptidique implique une conformation de la région C- terminale plus compacte que celle de la région N- terminale.



- Figure 2 -

Diagramme des ponts disulfures et position des glycanes de la lactoferrine humaine (LTF), de la sérotransferrine humaine (STF) et de l'ovotransferrine de poule (OTF). (—) : ponts non caractérisés ; [ ] : ponts caractérisés ; ↓ : glycanes ; ↓ : séquences glycosylables).

Ces différences entre les deux régions N- et C- terminales, au sujet du nombre et de la localisation des ponts disulfures, peuvent expliquer la différence de stabilité des deux régions vis-à-vis de la protéolyse et dans la fixation des métaux.

### 3. Homologies de séquences

Ainsi que nous pouvons le constater dans la figure 1, p. 10, les transferrines possèdent de nombreuses homologies de séquences entre elles. Ces homologies entre les différentes transferrines sont de l'ordre de 59 % lorsque l'on compare la lactotransferrine humaine à la sérotransferrine humaine et de 49 % lorsque l'on compare la lactotransferrine à l'ovotransferrine de poule. La comparaison entre l'ovotransferrine de poule et la sérotransferrine humaine donne 51 % d'homologie.

Les homologies de séquences sont toutes aussi évidentes par superposition de chaque moitié N- et C- terminales de chaque transferrine (acides aminés encadrés). Par comparaison de chaque moitié de transferrine : lactotransferrine humaine, sérotransferrine humaine et ovotransferrine de poule, on obtient respectivement 37 %, 41 % et 33 % d'homologies. Ces homologies concernent essentiellement des acides aminés liés directement à la conformation de la protéine (demi-cystines et prolines), des acides aminés basiques et surtout des acides aminés hydrophobes ou aromatiques dont certains sont impliqués dans la fixation des métaux ; nous reparlerons de ces derniers ultérieurement. Dès les premières études des séquences primaires des transferrines, les auteurs ont remarqué l'existence de ces homologies internes dans la chaîne peptidique. En 1975, MAC GILLIVRAY et BREW (120), WILLIAMS (229), font état d'homologies internes pour la sérotransferrine humaine et l'ovotransferrine de poule. Ils mettent en évidence la présence de deux lobes possédant chacun un site de fixation du métal. Des travaux préliminaires réalisés en 1976 par LINE et al. (116) sur la lactotransferrine humaine aboutissent à des conclusions identiques. Ces observations, confirmées par les travaux de MAC GILLIVRAY et al. (121), METZ-BOUTIGUE et al. (148, 150, 146), WILLIAMS et al. (230), JELTSCH et CHAMBON (96), MAC GILLIVRAY et al. (123, 122), MAZURIER et al. (139), METZ-BOUTIGUE et al. (147) ont entraîné l'hypothèse de la duplication d'un gène ancestral codant pour les transferrines. Cependant, les travaux récents de WILLIAMS et al. (231) montrent que les moitiés N- et C- terminales de l'ovotransferrine de

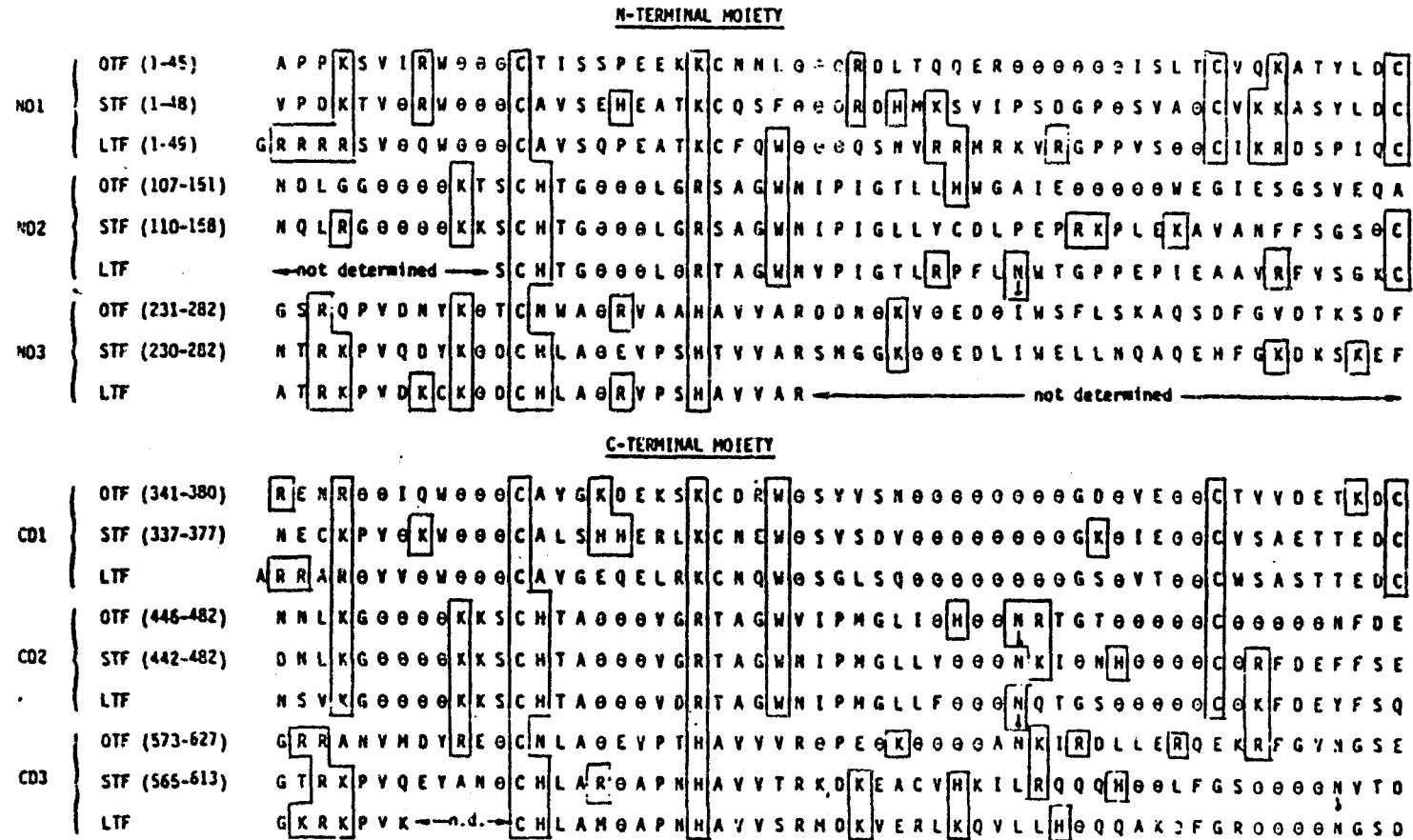
poule obtenues selon WILLIAMS (228,229) et injectées dans la circulation sanguine de souris traversent la barrière rénale et se retrouvent dans l'urine. Ces auteurs concluent que la transferrine ancestrale n'était pas une transferrine sérique ou que celle-ci n'était pas d'une taille aussi petite que celle de la moitié de la molécule actuelle. En 1977, à l'examen de la séquence primaire de la sérotransferrine humaine, MAC GILLIVRAY *et al.* (121) conclurent à l'hypothèse d'une quadriplification d'un gène ancestral qu'appuyèrent des analyses statistiques informatisées (JELTSCH *et CHAMBON* (96)). Les observations que nous avons réalisées, en collaboration avec le groupe de P. JOLLES, mettent en hypothèse l'hexaplication d'un gène ancestral codant pour les transferrines (METZ-BOUTIGUE *et al.* (150), MAZURIER *et al.* (139), METZ-BOUTIGUE *et al.* (147)). Cette hypothèse a été avancée sur la base d'homologies internes de séquences retrouvées, à un pourcentage très faible cependant, dans trois zones de chaque moitié N- et C- terminales des transferrines (Fig. 3, p. 15). En conséquence de l'hypothèse de l'hexaplication, la lactotransferrine humaine serait constituée de 6 domaines d'environ 110 résidus appelés ND1, ND2, ND3 pour la région N- terminale et CD1, CD2, CD3 pour la région C- terminale. Les domaines ND2 et CD2 sont porteurs d'un glycanne (voir le paragraphe suivant) et sont impliqués dans la fixation du fer. La figure 4, p. 16, rend compte de la position des 6 domaines sur un modèle de la chaîne peptidique en 2 dimensions dit "modèle en ficelle", inspiré de celui proposé par WILLIAMS *et al.* (230).

Des homologies de séquences existent également entre les transferrines et des protéines telles que la céruléplasmine (METZ-BOUTIGUE *et al.* (149)), l'azurine de *Pseudomonas aeruginosa* et la plastocyanine d'*Anabaena variabilis* (MAZURIER *et al.* (139)).

#### 4. Emplacement des glycannes

Ainsi qu'en rend compte la figure 2, p. 12, l'ovotransferrine de poule ne possède qu'un seul glycanne de type N-acétyllactosaminique dont la position a été déterminée par KINGSTON *et WILLIAMS* (104) dans la région C- terminale de la molécule.

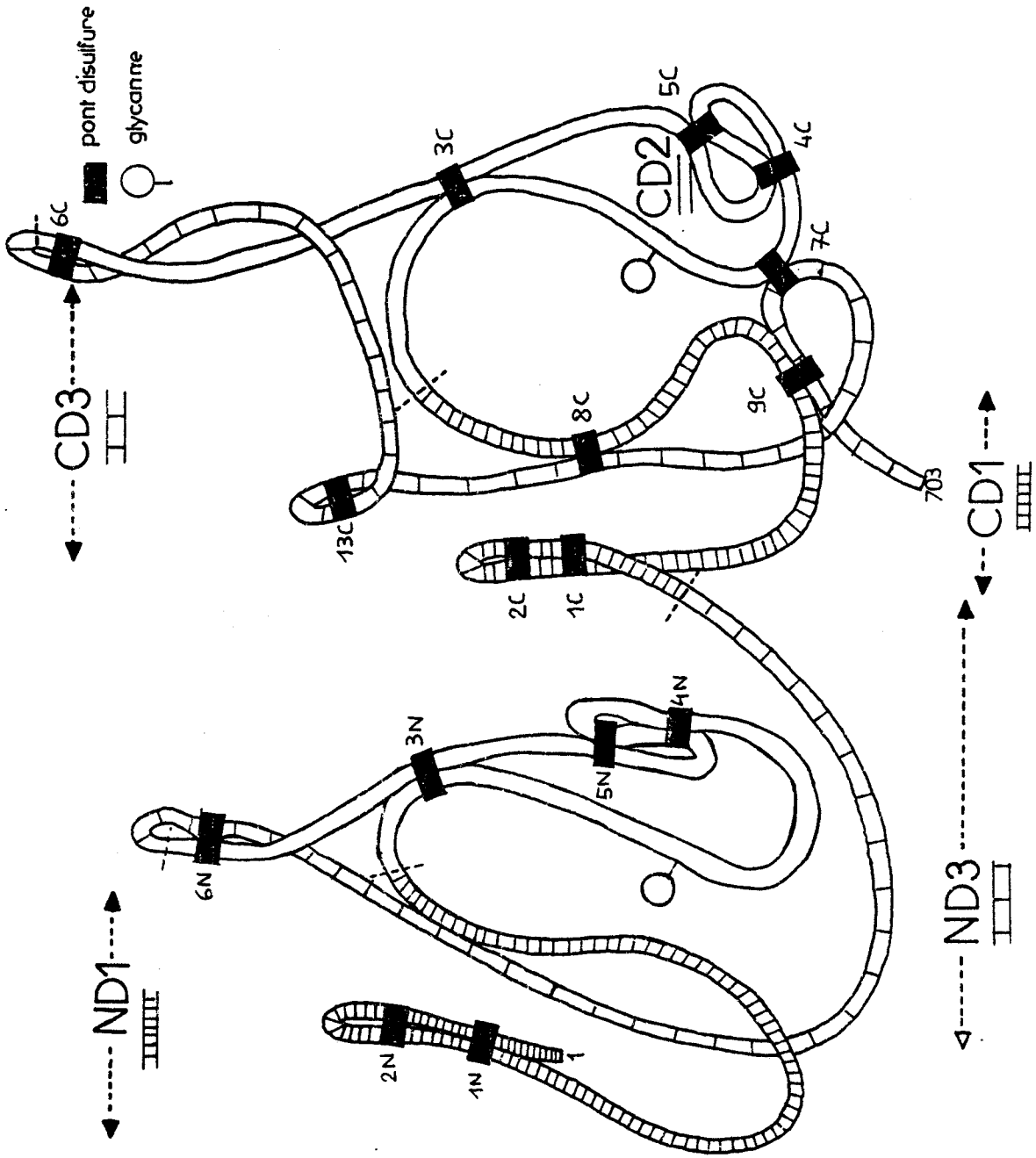
La sérotransferrine humaine possède 2 glycannes, situés eux aussi dans la région C- terminale de la molécule mais dans des positions telles qu'aucune n'est homologue avec la position du glycanne de l'ovotransferrine de poule.



- Figure 3 -

Homologies de séquences entre les six domaines (ND1, ND2, ND3, CD1, CD2, CD3) de l'ovotransferrine de poule (OTF), de la sérotransferrine humaine (STF) et de la lactotransferrine humaine (LTF) d'après MAZURIER *et al.* (139).





- Figure 4 -

Localisation des six domaines structuraux de la lactotransferrine humaine sur un modèle "en ficelle" inspiré de celui proposé par WILLIAMS *et al.* (230).

La détermination de la position de ces glycannes a fait l'objet de nombreux travaux complétés plus récemment par *MAC GILLIVRAY et al.* (121).

Dans la lactotransferrine humaine, un glycanne est présent dans le domaine ND2 de la région N- terminale (branché sur l'asparagine n° 137) et un autre dans le domaine CD2 de la région C- terminale (branché sur l'asparagine n° 490) (*MAZURIER et al.*(139), *METZ-BOUTIGUE et al.* (147) en position homologue à celui de l'ovotransferrine de poule (Fig. 2, p. 12 ).

*NEUBERGER et al.* (166) ont montré que le tripeptide Asn-X-Thr/Ser représente la séquence code pour la greffe des glycannes de type N-acétyllactosaminique. L'acide aminé X peut être de type basique ou aliphatique (*GRAHAMS et WILLIAMS* (77). *BAUSE* (18) indique que lorsque cet acide aminé X est la proline, la glycosylation n'est pas possible. Le résidu d'asparagine portant le glycanne est situé généralement dans une conformation particulière de la molécule appelée "coude  $\beta$ " (*AUBERT et al.*(11), *BEELEY* (19)), ainsi que dans un environnement hydrophobe (*BEELEY* (20)). Répondant à ces critères, on dénombre 2 séquences codes dans la région C-terminale de l'ovotransferrine de poule, 2 séquences codes dans la région C-terminale de la sérotransferrine humaine, 4 séquences codes dans la lactotransferrine humaine dont une dans la région N- terminale et 3 dans la région C- terminale. Nous situons dans la figure 2, p. 12 , l'emplacement des séquences glycosylables et glycosylées. Nous pouvons nous rendre compte d'homologies de positions des séquences glycosylées et glycosylables des trois transferrines. La question de savoir pourquoi telle ou telle séquence glycosylable n'est pas glycosylée reste encore sans réponse.

## B. - Conformation des transferrines

### 1. Dimensions des transferrines

Tous les auteurs définissent les transferrines comme des ellipsoïdes de révolution dont les dimensions sont reportées dans le tableau I, p. 18 . Nous remarquerons simplement que le rapport des axes  $\frac{a}{b}$  peut varier, dans le cas de la sérotransferrine humaine, de 2 à 3 en fonction de l'état de saturation en métal de la protéine.

TABLEAU I

DIMENSIONS 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.* (183)

b BEZKOROVAINY (24)

c FAUST *et al.* (71)

d YEH *et al.* (239)

## 2. Structure secondaire

Les méthodes d'analyse par dichroïsme circulaire ont permis de définir les taux de structures en hélice  $\alpha$  et en feuillets plissés pour l'ovotransferrine de poule (TAN (207)), pour la sérotransferrine humaine (NAGY *et al.*(165), TOMIMATSU *et al.*(214), VENTURA *et al.*(221)) et pour la lactotransferrine humaine (MAZURIER *et al.*(134)). Le tableau II, p. 20, résume ces résultats pour lesquels nous constatons d'une part, que les trois transferrines présentent des homologies et d'autre part, que la structure secondaire est peu ou pas affectée par la fixation du métal.

La connaissance de la séquence primaire d'une protéine permet d'envisager le calcul statistique de sa structure secondaire. Les structures secondaires de l'ovotransferrine de poule (WILLIAMS *et al.*(230) et de la sérotransferrine humaine (MAC GILLIVRAY *et al.*(123) ont été calculées. La structure secondaire du site de fixation du fer a été proposé par SPIK *et al.*(197) par compilation des données structurales des sites des trois transferrines. A la lumière de la détermination de la séquence primaire complète de la lactotransferrine humaine, nous proposons, dans la partie "Travaux personnels", la totalité de la structure secondaire calculée de la molécule.

## 3. Mise en évidence des domaines structuraux

Les mécanismes impliqués dans la formation de la structure tridimensionnelle d'une protéine biologiquement active ne sont pas encore connus. Ils donnent lieu à certaines hypothèses dont la possibilité d'un repliement par étapes : quelques éléments ou "blocs de construction" appelés domaines structuraux seraient capables de se structurer indépendamment, des affinements structuraux se produisant par suite de leurs interactions dans la molécule entière (VON (240)).

Deux approches sont possibles pour la mise en évidence des domaines structuraux des transferrines :

- la dénaturation thermique qui permet de souligner les différences de stabilité des domaines vis-à-vis de la température ;
- la coupure enzymatique qui permet l'isolement des domaines par action des protéases au niveau des régions interdomaines moins structurées donc plus sensibles à la protéolyse.

TABLEAU II

STRUCTURE SECONDAIRE DES TRANSFERRINES

Taux d'hélicité $\alpha$ en p 100	Taux de structure $\beta$ 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 MAZURIER *et al.* (134)
- b TOMIMATSU *et al.* (214)
- c VENTURA *et al.* (221)
- d NAGY *et al.* (165)
- e TAN (207)

a) La dénaturation thermique

DONOVAN et ROSS (61), en utilisant les techniques de dénaturation thermique, ont réussi à montrer qu'il existe une température de dénaturation correspondant aux formes privées de fer, monoferrique sur l'un et l'autre site et diferrique des transferrines.

L'aposérottransferrine possède deux lobes dont les températures de dénaturation sont bien définies ; il n'y a pas, ou peu, de relations entre ces parties qui sont donc indépendantes (DONOVAN et al. (60).

Par contre, dans le cas de l'ovotransferrine de poule, DONOVAN et al. (61) ont montré que les deux lobes existent et que les interactions sont faites entre eux puisque la dénaturation de l'un entraîne celle de l'autre.

b) La coupure enzymatique

De nombreux auteurs ont tenté d'isoler, par l'hydrolyse protéolytique ménagée et dans des conditions plus ou moins dénaturantes, les différents domaines structuraux constituant chaque transferrine. En effet, les hypothèses d'une duplication, d'une tétraplication ou d'une hexaplication d'un gène ancestral codant pour les transferrines sous-entendent l'existence de deux, quatre ou six domaines structuraux susceptibles d'être libérés par protéolyse.

L'isolement des deux moitiés de chaque transferrine constitue le résultat majeur des travaux sur l'isolement des domaines structuraux des transferrines (Tableau III, p. 22 ). WILLIAMS (228) dès 1974, a isolé à partir de l'ovotransferrine de poule et après coupure avec la trypsine ou la chymotrypsine de la protéine saturée à 30 % en fer, deux fragments saturés en métal, de masse moléculaire voisine de 35.000 daltons, appartenant à la région N-terminale de l'ovotransferrine. Le même auteur isole, un an plus tard, un autre fragment de même masse moléculaire que les précédents mais apparenté à la région C-terminale de l'ovotransferrine WILLIAMS (229). Il obtient ce fragment en faisant agir la subtilisine sur la protéine saturée en fer sur ses deux sites. En 1982, KEUNG et al (102) isolent simultanément deux fragments de 40.000 daltons par hydrolyse de l'ovotransferrine de poule par de la subtilisine immobilisée. Ces deux fragments correspondent aux moitiés N- et C-terminales de la molécule.

TABLEAU III - TRAVAUX D'ISOLEMENT DES DEUX LOBES N- ET C- TERMINAUX DES TRANSFERRINES PAR LA PROTEOLYSE.

TRANSFERRINE	AUTEURS	ENZYME UTILISE	MASSES MOLECULAIRES DES FRAGMENTS N- ET C- TERMINAUX DES TRANSFERRINES	
			FRAGMENT N- TERMINAL	FRAGMENT C- TERMINAL
OVOTRANSFERRINE DE POULE	WILLIAMS (227) WILLIAMS (229) KEUNG ET AL. (102)	TRYPSINE OU CHRYNOTRYPSINE SUBTILISINE SUBTILISINE IMMOBILISEE	35.000 -	- 35.000
LACTOTRANSFERRINE HUMAINE	LINE ET AL. (116) BLUARD-DECONINCK ET AL. (25)	PEPSINE TRYPSINE	- 40.000	40.000 40.000
SEROTRANSFERRINE HUMAINE	EVANS ET WILLIAMS (70) LINEBACK-ZINS ET AL. (114)	TRYPSINE THERMOLYSINE	36.000 36.000	43.000 -
SEROTRANSFERRINE BOVINE	BROCK ET AL. (37)	TRYPSINE	32.000	38.500
SEROTRANSFERRINE DE LAPIN	HEAPHY ET WILLIAMS (85)	CHYMOTRYPSINE	36.000 33.000	39.000

Le même type de manipulation a été réalisé par BROCK *et al.* (37) en 1976 sur la sérotransferrine bovine qui, après coupure tryptique, libère deux fragments identifiés aux régions N- et C- terminales.

En faisant agir la pepsine à pH 3,0 sur la lactotransferrine humaine diferrique, LINE *et al.* (116) permirent l'obtention quantitative d'un fragment de 33.000 daltons que, plus tard, BLUARD-DECONINCK *et al.* (30), WILLIAMS *et al.* (230) ont identifié à l'extrémité C-terminale de la molécule ; MAZURIER (133) a confirmé ces résultats. BLUARD-DECONINCK *et al.* (30) décrivent la préparation de 2 fragments N- et C- terminaux de 40.000 daltons par hydrolyse tryptique de la lactotransferrine saturée en fer à 30 %. Ces fragments sont obtenus avec un rendement très faible, de l'ordre de 1 % (p:p).

Concernant la sérotransferrine humaine, EVANS *et al.* (70) isolèrent, par des procédés différents de saturation en fer et par hydrolyse tryptique, deux fragments de 36.000 et 43.000 daltons identifiés aux régions N- et C- terminales de la protéine. Deux ans plus tard, LINEBACK-ZINS *et al.* (117) proposèrent une nouvelle méthode de préparation du fragment N-terminal de 36.000 daltons par hydrolyse avec la thermolysine de la sérotransferrine humaine. Les deux lobes de la sérotransferrine de lapin furent obtenus par HEAPHY *et al.* (85). Enfin, en 1980, ESPARZA *et al.* (69) entreprirent de démontrer que des transferrines aussi différentes que celles de l'homme, du lapin, du boeuf, du cochon et du cheval, présentent, vis-à-vis de la protéolyse tryptique, une coupure analogue de la protéine en ses deux lobes. L'apolactotransferrine est plus sensible à la protéolyse que la lactotransferrine diferrique. Ce phénomène a également été observé par BROCK *et al.* (37), dans le cas de la lactotransferrine bovine. Cependant, par comparaison entre les lactotransferrines bovine et humaine, BRINES *et al.* (34) relèvent une inhabituelle résistance de l'apolactotransferrine humaine vis-à-vis de la protéolyse qui pourrait refléter son aptitude à "survivre" dans l'intestin de l'enfant.

Nous développerons, dans la partie "Travaux personnels" la contribution que nous avons apportée pour l'isolement des domaines structuraux de la lactotransferrine humaine.

#### 4. Données cristallographiques

Les études cristallographiques ont été entreprises par trois groupes : le groupe du BIRBECK COLLEGE (AL HILAL *et al.* (8), GORINSKI *et al.* (76)) sur



la sérotransferrine de lapin, le groupe de *ABOLA et al.* (3) sur l'ovotransferrine et celui de *BAKER et al.* (13) sur la lactotransferrine.

*GORINSKI et al.* (76) ont publié un modèle moléculaire de la sérotransferrine de lapin obtenu avec une résolution de 6 Å. Comme le montre la figure 5, p. 25, la sérotransferrine de lapin, de dimensions 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  $\alpha$ , de l'autre par un feuillet plissé  $\beta$ .

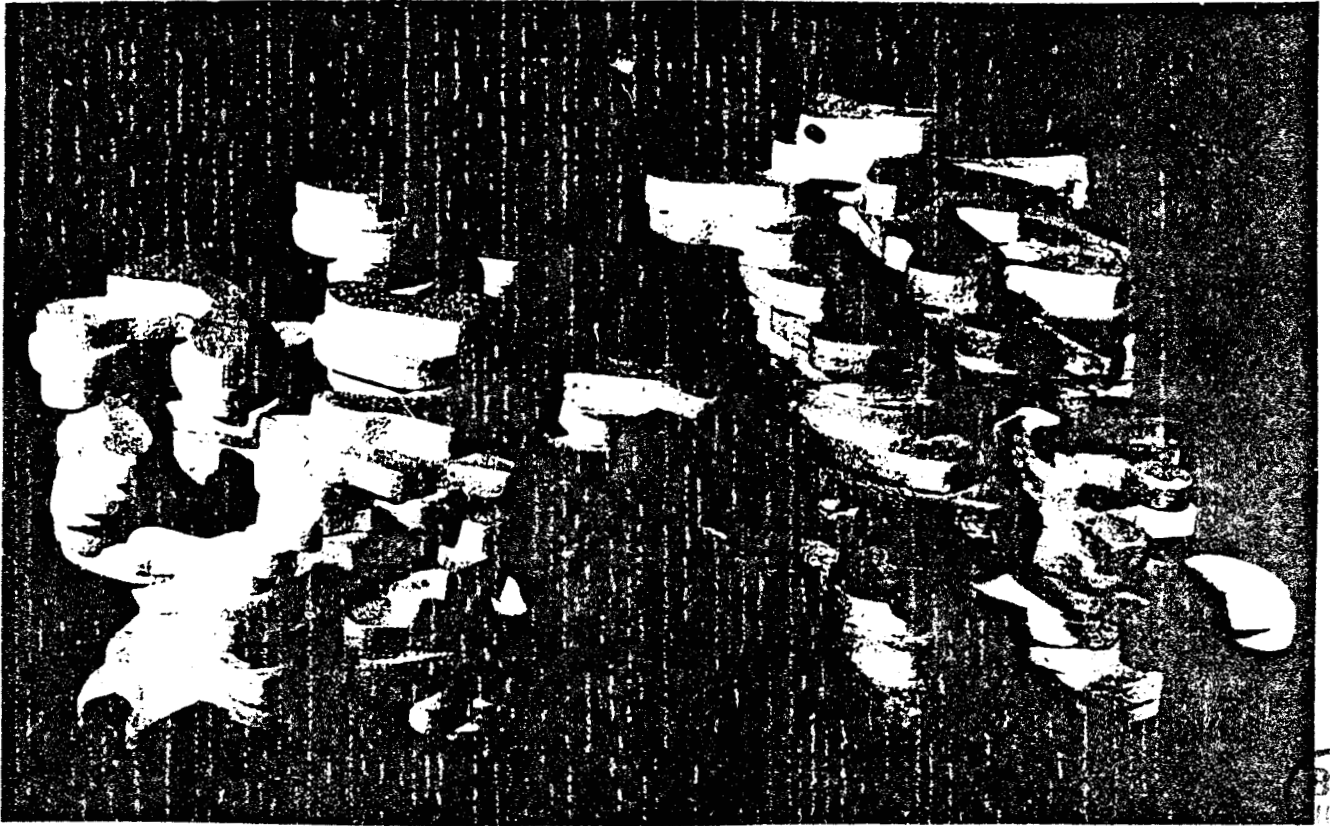
En ce qui concerne les travaux de *BAKER et al.* (13) en 1977 sur la cristallisation de la lactotransferrine humaine, ces auteurs obtenaient des cristaux de la protéine saturée en fer par dialyse contre une solution d'éthanol à 10 % (v:v). Les cristaux, de nature orthorhombique, présentaient une résolution d'au moins 3 Å en diffraction aux rayons X. Néanmoins, jusqu'à ce jour, aucune suite n'a été donnée à ces études.

#### IV. - STRUCTURE ET CONFORMATION DES GLYCANNES DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

##### A. - Structure covalente des glycanes

###### 1. La lactotransferrine humaine

Dès 1960, *MONTREUIL et al.* (161) démontrent la nature glycoprotéinique de la lactotransferrine humaine. En 1966, la présence de deux glycanes liés par une liaison de type 4N-(2-acétamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-L-asparagine et celle d'un glycanne lié O-glycosidiquement étaient décrites pour la lactotransferrine humaine (*SPIK et al.* (198)). L'existence des deux glycanes liés N-glycosidiquement fut confirmée en 1973 et la structure d'un d'entre eux fut proposée (*SPIK et al.* (201)). Enfin, en 1982, *SPIK et al.* (200) décrivent l'isolement des glycopeptides porteurs de structures glycaniques différentes. Parmi ces structures, 3 structures sont présentes en quantités importantes, elles sont représentées dans la figure 6, p. 27, les autres structures, de nature polyfucosylée, sont plus complexes et sont trouvées en très petites quantités (*MATSUMOTO et al.* (132)).



- Figure 5 -

Conformation bilobaire de la sérotransferrine de lapin d'après  
les travaux de diffraction aux rayons X de GORINSKI *et al.* (76)

Les glycannes que nous pouvons observer dans la figure 6 , p. 27 , montrent une structure disialylée ainsi que des structures monosialylées porteuses d'un ou deux résidus de fucose. L'un des fucoses est lié en  $\alpha$ -1-6 sur la première N-acétyl glucosamine, l'autre fucose est lié en  $\alpha$ -1-3 sur un résidu de N-acétyl glucosamine sur la branche (ou antenne) correspondant au mannose lié en 1-3 du core pentasaccharidique. Ces 3 structures sont trouvées indifféremment sur l'un ou l'autre des deux sites de glycosylation des régions N- et C- terminales de la lactotransferrine humaine.

## 2. Les autres transferrines

La détermination de la structure des glycannes de la sérotransferrine humaine a été entreprise dès 1962 par MONTREUIL *et al.* (160). Les deux glycannes, de type N-acétyllactosaminique (MONTREUIL (154) possèdent des structures de type biantenné (comparable à la structure disialylée de la lactotransferrine humaine), ou de type triantenné. La structure du glycanne biantenné a été établie définitivement par SPIK *et al.* (201,195,191) puis confirmée par DORLAND *et al.* (62) par analyse des spectres en résonance magnétique nucléaire à 360 MHz. Les glycannes de type triantenné possèdent deux structures différentes déterminées par SPIK *et al.* (194).

Un seul glycanne est présent sur l'ovotransferrine de poule. Sa structure, déterminée par SPIK *et al.* (196) et DORLAND *et al.* (62), se différencie nettement des autres transferrines par l'absence de résidus de galactose et d'acide N-acétyl neuraminique.

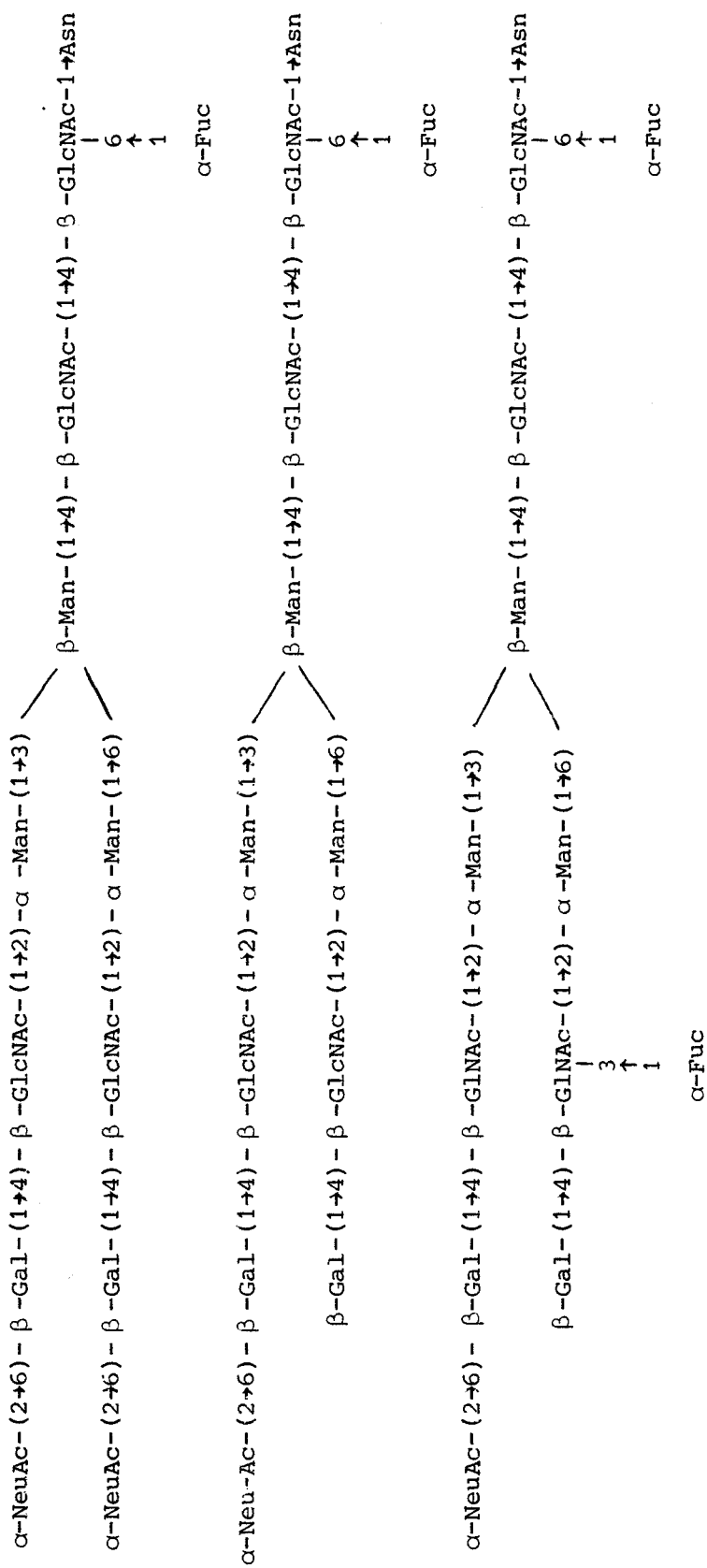
La structure de l'unique glycanne de la sérotransferrine de lapin est identique à celle de la sérotransferrine humaine (LEGER *et al.* (111).

La lactotransferrine bovine selon CHERON (50), possède, outre des glycannes de type N-acétyllactosaminique classique, des glycannes de type oligomannosidique (MONTREUIL (154), VAN HALBEEK *et al.* (218)).

## B. - Conformation des glycannes

Pour plus de détails sur la conformation des glycannes des glycoprotéines, nous renvoyons aux revues générales de MONTREUIL (154, 155, 156, 157).

De nombreuses conformations ont été proposées pour les glycannes des protéines N- glycosylées. La première conformation dite en "Y"



- Figure 6 -

Structure des glycanes de la lactotransferrine humaine (SPIK et al. (200)).

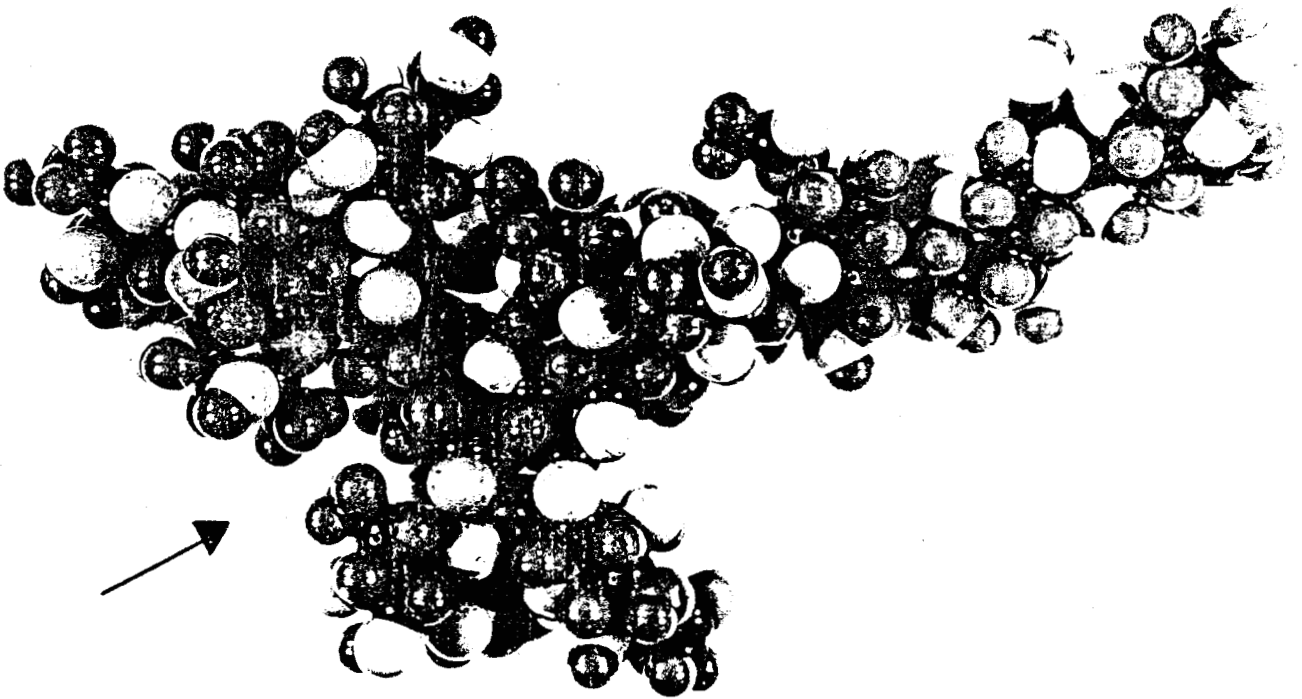
fut proposée dès 1974 par MONTREUIL (154) en respectant les possibilités de création des ponts hydrogènes.

Sur la base d'études de diffraction aux rayons X de cristaux du tri-saccharide Man ( $\alpha$  1-3) Man ( $\beta$  1-4) Glc Nac, isolé de l'urine d'un patient atteint d'une mannosidose, MONTREUIL *et al.*(158) et WARIN *et al.*(223) montrent que le mannose lié en  $\alpha$  1-3 est perpendiculaire au plan formé par le disaccharide Man ( $\beta$  1-4) Glc Nac. L'antenne en  $\alpha$  -1-3 possède ainsi une disposition perpendiculaire à celle à l'antenne branchée en  $\alpha$ 1-6 d'ou la conformation en "T" proposée par ces auteurs.

Plus récemment, de nombreuses études réalisées par microscopie électronique et diffusion de neutrons (DOUY *et al.* (63)), par calculs informatisés (WARIN *et al.*(224), par données cristallographiques (DEISENHOFER *et al.*(57)), HUBER *et al.* ( 90 , 91 , 92 ), DEISENHOFER (56), SUTTON *et al.*(206), RADE-MACHER *et al.*(175)) et par résonance magnétique nucléaire (BOCK *et al.*(31)) sont en faveur d'une conformation étendue du glycanne dite en "oiseau".

Enfin, à la suite d'études en résonance magnétique nucléaire (VLIEGENTHART *et al.*(222), BRISSON *et* CARVER (35, 36)) et de calculs (MEYER (151)), une conformation en "aile brisée" (MONTREUIL (157)) est proposée et dans laquelle la branche liée en  $\alpha$  1-6 subit une grande rotation qui la rabat contre le core du glycanne.

Dans le cas des structures glycaniques de la lactotransferrine humaine et particulièrement des structures monosialylées fucosylées (figure 7 , p. 29 ), la conformation en "aile brisée" est rendue d'autant plus probable que des interactions hydrophobes sont possibles entre les groupements méthyles des résidus de L-fucose branché en  $\alpha$  1-3 et en  $\alpha$  1-6 ainsi qu'avec les groupements méthyles des groupes acétamido des N-acétylglucosamines (figure 7 , p. 29 ). Ce type de structure entraîne donc une grande rigidité du glycanne puisque les deux branches  $\alpha$ 1-3 et  $\alpha$  1-6 sont immobilisées. Nous noterons par ailleurs dans la figure 1 , p. 10 , que les deux sites de glycosylation de la lactotransferrine sont situés dans un environnement très hydrophobe (Pro-Phe-Leu-Asn-Trp pour le site N-terminal et Leu-Leu-Phe-Asn pour le site C-terminal) pouvant interagir avec la zone hydrophobe du glycanne afin de réduire encore sa mobilité. Les résidus 138 (Trp) et 429 (Phe) sont les acides aminés les plus susceptibles d'intervenir dans ces interactions, de par leur proximité immédiate à côté des résidus d'asparagine branchés aux glycanes.



- Figure 7 -

Conformation "en oiseau blessé" du glycanne difucosylé de la lactotransferrine humaine (MONTREUIL (157) (La flèche indique la confluence des quatre groupes méthyles).

## V. - LES SITES DE FIXATION DU FER DES TRANSFERRINES

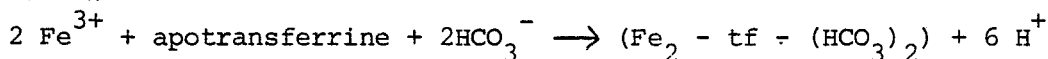
Depuis la découverte des transferrines, d'innombrables travaux ont été réalisés pour connaître la nature du mécanisme de fixation du fer par ces molécules. La diversité dans la nature de la protéine (sérot transferrine humaine, ovotransferrine de poule et lactotransferrine humaine) et dans la nature de la méthode chimique ou physique utilisée n'ont pas toujours abouti à des conclusions identiques quant à la nature et au nombre des ligands impliqués dans la fixation du métal. Néanmoins, l'analyse de la masse d'informations apportée par ces travaux, corrélée à l'analyse des homologies de séquences des 3 transferrines permettent d'avancer quelques conclusions sur la nature, le nombre et la localisation des ligands du fer dans les sites de fixation.

### A. - Propriétés physicochimiques générales

#### 1. Les conditions de la fixation

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 al.* (109)).

La fixation de chaque ion métallique nécessite la fixation d'un ion bicarbonate (WARNER *et al.* (225), AISEN *et al.* (5), MASSON *et al.* (128) et la libération de trois protons (SCHADE *et al.* (186), WARNER *et al.* (225), TEUWISSEN *et al.* (211)) selon la formule suivante :



#### 2. Nature des métaux fixés

Les transferrines fixent de nombreux ions des métaux de transition autres que le  $\text{Fe}^{3+}$ , aussi bien divalents que trivalents, tout comme plusieurs lanthanides :  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{VO}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{3+}$ ,  $\text{CO}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Hb}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Pr}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$  (WINDLE *et al.* (232), LUK (118), WARNER *et al.* (225), CANNON *et al.* (45), HARRIS *et al.* (83), AASA *et al.* (1), ZWEIER (243), TEUWISSEN *et al.* (211)) à raison de 2 ions par molécule de transferrine à l'exception de  $\text{Nd}^{3+}$  et  $\text{Pr}^{3+}$  où un seul ion est fixé (LUK (118)). En revanche, le  $\text{Fe}^{2+}$  ne peut être fixé (BATES *et al.* (17)).

Le  $\text{Fe}^{3+}$  est le métal qui présente le plus d'affinité pour les transferrines (TAN *et al.* (208)). A pH 6,4, la lactotransferrine humaine le fixe avec une constante de dissociation  $K_1$  de  $2,6 \cdot 10^5$ , soit une constante 260 fois plus élevée que celle de la sérotransferrine humaine (AISEN *et al.* (6)).

### 3. La géométrie du métal

L'analyse du spectre en résonance para magnétique électronique des complexes fer-transferrines montre que le fer est sous la forme haut spin dans un champ cristallin rhombique (AASA *et al.* (2)).

Selon CASTNER *et al.* (46), deux géométries sont possibles : un arrangement tétraédral ou un arrangement hexacoordonné que WINDLE *et al.* (232) ont choisi à la suite de considérations chimiques sur le nombre des ligands du fer (3 tyrosines, 2 histines, 1 ion carbonate).

### 4. La nature de l'anion

L'anion naturel est le carbonate ou le bicarbonate, deux anions qui, avec l'oxalate, ont l'effet synergique le plus important (SCHLABACH *et al.* (187)). En fait, selon CHASTEEN (47), tout anion possédant une formulation du type :  $\text{R}-\overset{\text{L}}{\text{C}}-\text{COO}^-$  où L est un donneur d'électrons, peut convenir. CAMPBELL *et al.* (44) montrent que dans le cas d'un complexe sérotransferrine-VO, le métal est directement lié à l'anion.

## B. - Les différences entre les deux sites de fixation

### 1. Mise en évidence par la protonation

Dans le cas de la sérotransferrine humaine, la dissociation du fer des 2 sites de fixation se réalise à 2 pH différents, l'un est éliminé à pH 5,8 du site dit "site basique", l'autre est éliminé à pH 4,8 du site dit "site acide" (PRINCIOTTO *et al.* (174), LESTAS (114)).

Les travaux réalisés par MAZURIER *et al.* (140), en 1980, sur la lactotransferrine humaine, indiquent également une différence de comportement des deux sites vis-à-vis de la protonation. Dans ces travaux, les auteurs mettent en évidence une différence de comportement entre les deux sites de fixation de la lactotransferrine : dans un tampon phosphate 0,2 M contenant 4mM EDTA, un



des  $\text{Fe}^{3+}$  quitte le site "acide labile" à pH 6, l'autre  $\text{Fe}^{3+}$  quitte le site "acide stable" à pH 4. Lors de la restauration en fer, dans une gamme de pH de 6,2 à 4,8, le  $\text{Fe}^{3+}$  ne se lie qu'au site "acide labile".

## 2. Réactivité chimique des résidus d'histidine

L'utilisation de la résonance paramagnétique électronique des complexes de la séro- et de l'ovotransferrine a permis, dès 1963, à AASA *et al.* (2) de suggérer la participation de l'histidine dans la fixation des métaux.

En 1981, MAZURIER *et al.* (136) mettent en évidence des différences dans l'accessibilité des résidus d'histidine au diéthylpyrocarbonate pour les deux sites de fixation des lactotransferrines humaine et bovine et des sérotransferrines humaine et de lapin. Des concentrations en urée supérieures à 3M sont nécessaires pour une accessibilité totale des histidines des deux sites au diéthylpyrocarbonate, la perte de la capacité de fixation du fer se déroule alors en deux temps (MAZURIER *et al.* (135)). Selon ces auteurs, la différence de stabilité entre les deux sites de fixation serait due au plus grand nombre de ponts disulfures situés dans la région C-terminale par rapport à la région N-terminale des transferrines.

## 3. Spectres en résonance paramagnétique électronique

Plus que les spectres des ferritransferrines qui ne présentent que peu de variations en fonction du site considéré, les spectres des  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{VO}^{2+}$ -transferrines ont été étudiés. La fixation du  $\text{Cu}^{2+}$  (AASA *et al.* (1), MAZURIER *et al.* (138), ZWEIER *et al.* (244,243)) ou du  $\text{VO}^{2+}$  (CANNON *et al.* (45), HARRIS (82), CHASTEEN *et al.* (49), sur la sérotransferrine humaine permet de différencier deux signaux caractéristiques de chaque site. Pour la lactotransferrine humaine, MAZURIER *et al.* (138) ont montré que les signaux des 2  $\text{VO}^{2+}$  étaient confondus en un seul, indiquant un environnement paramagnétique identique pour les deux sites.

## 4. Isolement des différentes formes saturées des transferrines

MAKEY *et al.* (124) ont réussi les premiers à séparer en électrophorèse, en présence d'urée, les différentes formes de la sérotransferrine : saturée

sur les deux sites, saturée sur le site acido-stable, saturée sur le site acido-labile et la forme dépourvue de fer. Des essais réalisés dans les mêmes conditions sur la lactotransferrine humaine n'ont donné aucun résultat (communication personnelle).

### C. - Distance entre les deux sites de fixation

En 1971, LUK (118) travaillant en déclin de fluorescence, indique une distance de 45 Å entre les deux sites de fixation du métal alors que MEARES *et al.* (143) par la même technique estiment la distance à  $25 \pm 2 \text{ \AA}$ . Très récemment, en 1983, ZWEIER (242) calcule une distance de  $41,6 \pm 2,8 \text{ \AA}$  entre les deux sites de fixation par mesure des spectres de résonance paramagnétique électronique de complexes formés entre la sérotransferrine humaine et des métaux tels que le fer, le cuivre et le gallium.

### D. - Nature et localisation des ligands impliqués dans la fixation de l'anion et du métal

#### 1. Nature des ligands

##### a) Tyrosine

La démonstration de la participation de la tyrosine a été réalisée par des méthodes optiques et par modification chimique.

L'observation des spectres en ultraviolet (CANNON *et al.* (45), WOODWORTH *et al.* (235), TAN *et al.* (208), LEHRER (113)) ou en fluorescence (LUK (118)) de complexes métal-transferrine indique la participation de 4 résidus de tyrosine.

La modification chimique des résidus de tyrosine par iodination (PHILLIPS *et al.* (172)) ou par nitration (BEZKOROVAINY *et al.* (26), WILLIAMS (227)) suggère respectivement la participation de 4,6 ou 7 résidus de tyrosine.

L'analyse des spectres Raman réalisés sur l'ovotransferrine et la sérotransferrine donne 4 résidus de tyrosine impliqués dans la fixation (GABER *et al.* (74), TOMIMATSU *et al.* (213)).

Aucun travail de détermination des tyrosines impliquées dans la fixation du fer n'a été réalisé dans le cas de la lactotransferrine humaine.

### b) Histidine

La spectroscopie en résonance paramagnétique électronique des complexes cuivriques des séro et ovotransferrines (AASA *et al.* (2)) donne un signal caractéristique de la coordination d'une seule histidine pour chaque site de fixation (AASA *et al.* (1), ZWEIER *et al.* (244)).

Des modifications chimiques sélectives par l'acide bromoacétique (BEZKOROVAINY *et al.* (25)) puis par le diéthylpyrocarbonate (ROGERS *et al.* (181), MAZURIER *et al.* (138, 136, 137, 135)) suggèrent la participation de 2 à 4 histidines. MAZURIER *et al.* (138, 136, 137, 135) suggèrent la participation d'une seule histidine dans le site accessible de la lactotransferrine au lieu de deux pour la sérotransferrine ; deux histidines interviendraient dans les sites acido-stables des deux transferrines.

Très récemment, WOODWORTH *et al.* (234) décrivent la participation probable de 2 résidus d'histidine dans chaque moitié de l'ovotransferrine de poule saturée en gallium, sur la base d'études en résonance magnétique nucléaire.

### c) Tryptophane

Dès 1969, LEHRER (113) a suggéré l'implication du tryptophane dans la fixation du fer à la suite d'études de fluorescence et de spectroscopie d'absorption des complexes cuivriques et ferriques de la séro et de l'ovotransferrine. TAN *et al.* (209) et TOMIMATSU *et al.* (212) ont montré qu'effectivement, la fixation du métal affecte les propriétés spectrales de cet acide aminé mais, à ce jour, sa liaison avec le métal n'a jamais été démontrée. Des études en fluorescence, réalisées au Laboratoire sur la lactotransferrine humaine (résultats non publiés) ont confirmé ces observations.

### d) Arginine et Lysine

L'arginine ou la lysine sont deux candidats possibles pour la fixation de l'anion. Selon BATES *et al.* (16)), les anions de type carbonate qui sont utilisables dans des conditions naturelles seraient coordonnés à la protéine par l'intermédiaire d'un groupement nucléophile "X" pour former un carbone tétravalent. Ces auteurs ont proposé l'arginine comme ligand de l'anion. ROGERS *et al.* (180) démontrent que 98 % des résidus d'arginine

modifiés par le 2,3 butanedione entraîne une perte totale de la capacité de fixation du fer des séro et ovotransferrines. ZWEIER (242) propose l'intervention possible du groupement  $\Sigma\text{NH}_2$  de la lysine comme ligand de l'anion. Aucune étude sur les ligands de l'anion de la lactotransferrine humaine n'a été réalisée à ce jour.

### e) Eau

Les travaux de KOENIG *et al.* (106) en résonance magnétique nucléaire montrent qu'une molécule d'eau est située à 2Å du métal et qu'une autre est éloignée de 5Å.

## 2. Localisation des ligands sur la chaîne peptidique

Si l'on admet le principe que les ligands impliqués dans la fixation du fer existent dans tous les sites de fixation de toutes les transferrines, ceux-ci doivent occuper des positions conservées dans la chaîne peptidique. Sur la base de ce principe, CHASTEEN (48) *et SPIK et al.* (197) par comparaison des séquences complètes des séro- et ovotransferrine et de la séquence alors incomplète de la lactotransferrine, ont déduit les positions présumées de certains ligands. A la lumière de la séquence primaire maintenant complète de la lactotransferrine humaine (METZ-BOUTIGUE *et al.* (147) nous ferons le point sur les positions possibles des ligands dans le site de fixation du fer.

La figure 1, page 10, qui représente les séquences N- et C-terminales des 3 transferrines, servira de support à nos explications. La numérotation utilisée pour décrire les positions d'acides aminés sera la numérotation propre à la lactotransferrine.

### a) Tyrosine

En 1982, WILLIAMS (227) isola de l'ovotransferrine de poule 10 peptides contenant des résidus de tyrosine protégés de la nitration par la fixation du fer sur la protéine. Parmi ces 10 tyrosines, 6 appartiennent à la moitié N-terminale : résidus 43, 83, 93, 188, 191, 318, tandis que les 4 autres appartiennent à la moitié C-terminale : résidus 426, 447, 537, 540. Les résidus 43 et 418 ne possédant pas d'homologues dans l'une ou l'autre moitié de l'ovotransferrine de poule, ils ne peuvent pas faire partie des ligands.

Si nous comparons les séquences des trois transferrines, nous remarquerons que les 8 autres résidus 83, 93, 188, 191, 426, 447, 537 et 540 sont tous en positions homologues dans toutes les transferrines, sauf la paire de tyrosines 188 et 537 qui ne possède de tyrosine homologue en position 188 sur la lactotransferrine mais un résidu de lysine. Restent donc 3 paires de tyrosines homologues sur toutes les transferrines : les paires 83-426, 93-447 et 191-540. (Fig. 8, p.37 ).

Dans nos "travaux personnels", nous discutons de l'obtention d'un glycopeptide de 18.500 daltons fixant encore le fer (LEGRAND *et al.*(112). L'acide aminé N-terminal du glycopeptide se trouve en position 91, ce qui permet d'exclure la paire de tyrosines 83-426 du site de fixation du métal (SPIK *et al.* (197)).

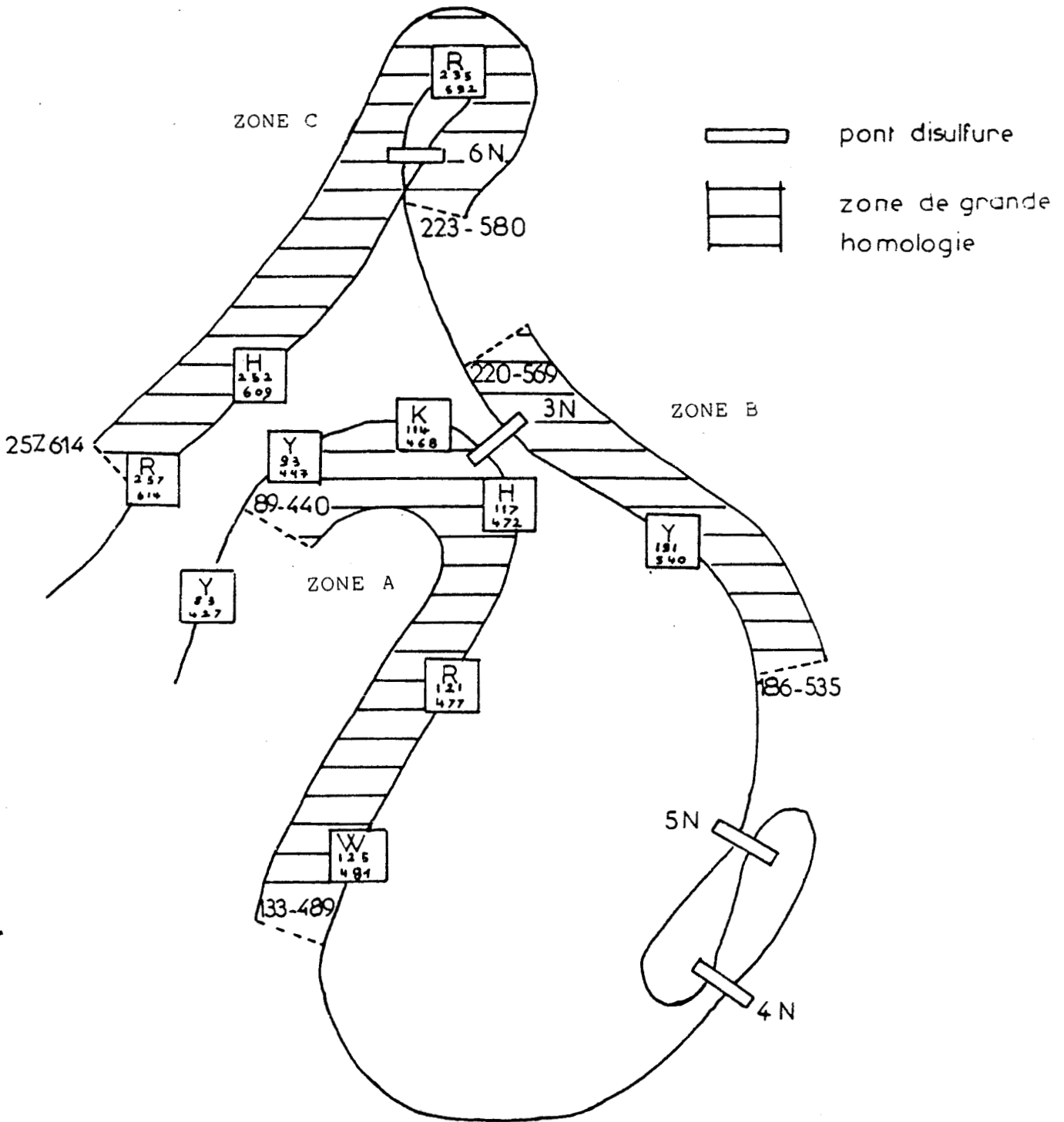
Les quatre tyrosines numérotées 93, 191, 447 et 540 seraient donc les seules susceptibles de jouer un rôle dans la fixation des 2 Fe<sup>3+</sup>.

#### b) Histidine

Le marquage de la sérotransferrine par l'anhydride acétique provoque de grands changements dans la réactivité au niveau des résidus de lysine 209 et 558, adjacents aux résidus d'histidine 210 et 559 (SHEWALE *et al.* (188)). Les positions des résidus 210 et 559 étant homologues dans chaque moitié des séro- et ovotransferrines, les auteurs conclurent à une implication de ces résidus dans la fixation du métal. En fait, l'homologie ne se retrouve pas dans la chaîne de la lactotransferrine, ce qui exclut ces résidus 210 et 559 dans la fixation du fer. En revanche, les paires de résidus d'histidine 117-472 et 252-609 sont retrouvées en positions homologues dans les 3 transferrines, ce qui semblerait les impliquer dans la fixation du métal (SPIK *et al.* (197)) (Fig. 8, p.37 ).

#### c) Tryptophane

Deux paires de résidus de tryptophane se trouvent homologues dans les 3 transferrines : 9-346 et 125-481, seule la paire de résidus 125-481 est localisée dans le site présumé de fixation du fer (CHASTEEN (48), SPIK *et al.* (197)) (Fig. 8, p.37 ).



- Figure 8 -

Localisation des résidus d'acides aminés susceptibles de fixer le fer et présents en positions homologues dans les sites de fixation du fer des transferrines. Localisation des zones de grande homologie décrites par YANG *et al.* (238). (La numérotation utilisée est celle de la lactotransferrine humaine).

d) Arginine et lysine

De nombreux résidus d'arginine et de lysine se trouvent dans des positions homologues dans les 3 transferrines, les paires les plus probables pour la fixation de l'anion sont les suivantes : Lys 114-468, Arg 121-477, Arg 257-614. (Fig. 8, p. 37 ).

3. Conclusions

Chaque site de fixation du fer des transferrines semblerait donc compter au nombre de ses ligands :

- 2 tyrosines en positions 93-447 et 191-540 ;
- 2 histidines en positions 117-472 et 252-609 ;
- 1 acide aminé basique du type lysine en position 114-468 ou du type arginine en position 121-477 ou 235-592 ou 257-614.

Sur la base d'un arrangement hexacoordonné dans le site de fixation (WINDLE *et al.* (232)) une molécule d'eau (KOENIG *et al.* (106)) pourrait constituer le sixième ligand possible de fixation du fer. YANG *et al.* (238) décrivent pour la sérotransferrine humaine trois zones : A, B et C où les taux d'homologies entre les moitiés N- et C- terminales sont les plus élevés (jusqu'à 65 %) et traduisent des contraintes liées à la fixation du fer (Fig. 8, p. 37 ). La zone A (résidus 89-444 à 133-469) contient la tyrosine en position 93-447, l'histidine en position 117-471, la lysine en position 114-468 et l'arginine en position 121-477. La zone B (résidus 186-535 à 220-569) contient la tyrosine en position 191-540. Enfin, la zone C (résidus 223-580 à 257-614) contient l'arginine en position 235-592, l'histidine en position 252-609 et l'arginine en position 257-614. Tous les ligands présumés du fer se retrouvent donc dans ces zones de grande homologie décrite par YANG *et al.* (238).

Nous devons cependant admettre que la nature et le nombre des ligands du fer, déduits des homologies de séquences entre les différentes transferrines, ne sauraient être exclusifs. En effet, rien ne prouve que la nature et le nombre des ligands du fer soient identiques d'un site de fixation à

l'autre ou d'une transferrine à l'autre. Au contraire, ce concept permet l'explication des différences de stabilité d'un site de fixation à un autre ou d'une transferrine à une autre.

Pour une meilleure connaissance des propriétés spécifiques liées aux sites de fixation de chaque transferrine, beaucoup d'études sont à poursuivre ou à engager. Particulièrement dans le cas de la lactotransferrine humaine, peu de travaux concernent la détermination des ligands du fer.

## VI. - ROLES BIOLOGIQUES DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

Le fer est un des oligoéléments les plus indispensables de l'organisme. Il est directement impliqué dans les mécanismes d'oxydo-réduction des chaînes respiratoires et constitue donc le "maillon clef" de la production d'énergie dans la cellule. Par sa présence dans l'hémoglobine, il participe également au transport de l'oxygène dans les hématies.

L'importance de la répartition du fer dans l'organisme humain entraîne une régulation de son transport entre les formes de réserve et les formes actives ; ce transport est réalisé par les transferrines. Alors que la sérotransferrine constitue la protéine sérique responsable de l'acheminement du fer vers les tissus utilisateurs, la lactotransferrine intervient plus spécifiquement dans les cas de l'absorption intestinale du fer et dans les mécanismes de défense anti-infectieux.

### A. - Localisation de la lactotransferrine humaine

La lactotransferrine humaine fut isolée à partir du lait de femme et décrite, pour la première fois par MONTREUIL *et al.* (159,161) puis par JOHANSSON (97) C'est dans le lait de femme et dans le colostrum que la lactotransferrine humaine est présente en plus grande quantité : environ 4,5 mg/ml de colostrum et 2mg/ml de lait mature (MASSON *et al.* (129), NAGASAWA *et al.* (164), Mc CLELLAND *et al.* (119)).

Plus tard, on s'est rendu compte que la lactotransferrine était présente dans de nombreux liquides et milieux biologiques (MASSON (127)), principalement dans les liquides et milieux d'excrétion tels que les larmes



(BROEKHUYSE (38)), la salive (MASSON (127)), le liquide synovial (BENNETT *et al.* (21)), le plasma séminal (HEKMAN *et al.* (86)), le suc pancréatique (CLEMENCE *et al.* (53)), le liquide céphalo-rachidien (TERENT *et al.* (210)), la bile (VAN GUT *et al.* (217)), le sang (RUKME *et al.* (134)), les sécrétions bronchiques (BISERTE *et al.* (27)) et le mucus cervical et gastro-intestinal (MASSON (127)).

En dehors des cellules excrétrices des muqueuses, la lactotransferrine connaît une localisation cellulaire, en particulier dans les granules secondaires des leucocytes polymorphonucléaires (MASSON *et al.* (131)). Elle est présente à l'état de traces dans les monocytes (BENNETT *et* KOKOCINSKI (22)).

#### B. - Rôle de la lactotransferrine humaine dans la nutrition en fer du nourrisson et dans l'absorption intestinale du fer

Les travaux de SIMES *et al.* (189) montrent que lorsque le fer est lié à la lactotransferrine, sa vitesse d'absorption intestinale est supérieure à celle de sels de fer. Pour cette raison, la lactotransferrine fut longtemps considérée comme la principale source de fer du nourrisson. Elle est présente à raison de 1 à 2 g par litre de lait de femme et renferme 0,3 ‰ du fer, soit 0,8 mg de fer par litre (BLANC (28)), quantité suffisante pour les besoins du nourrisson de moins de 4 à 6 mois nourri au sein maternel. Il est actuellement admis que chez l'adulte, le fer apporté par l'alimentation est libéré dans l'estomac sous l'effet du pH et sous l'action de la pepsine. Dans le cas de l'estomac du nourrisson, un pH voisin de 4 et une protéolyse très faible vis-à-vis de la lactotransferrine permettent à celle-ci de conserver son fer (SPIK (190)). D'après SPIK *et al.* (192), la lactotransferrine partiellement dégradée est retrouvée dans les selles des nourrissons alimentés au lait maternel. Cette copro-lactotransferrine a gardé son activité anti-infectieuse dont nous discuterons plus loin et sa capacité de fixer le fer, ce qui semble indiquer que la lactotransferrine assume jusqu'au bout du tractus digestif du nourrisson son rôle de transporteur du fer. La grande stabilité de complexe fer-lactotransferrine pose le problème du mécanisme de libération du fer dans l'intestin. Selon SPIK (190), la lactotransferrine céderait son fer à des chélateurs avec l'intermédiaire possible de transferrine.

Les travaux concernant la nature exacte de la molécule directement impliquée dans l'absorption intestinale du fer sont assez controversés. Récemment, *HUEBERS et al.* (93), par expérimentation *in vivo*, proposent un mécanisme dans lequel l'apوسérotransferrine de rat serait sécrétée par l'entérocyte de rat dans la lumière intestinale, y capterait le fer puis serait réinternalisée dans l'entérocyte. Cependant, *MARX et al.* (125) et *MAZURIER et al.* (142) rendent compte de l'absence de récepteurs de la sérotransferrine humaine à la surface des microvillosités des entérocytes humains ou de lapins, tandis que plusieurs auteurs démontrent plus ou moins directement l'implication de la lactotransferrine humaine dans le transfert du fer dans l'entérocyte humain (*in vivo*) (*DE VET et al.* (59)), ou de lapin (*in vitro*) (*COX et al.* (55)), ou de rat (*in vitro*) (*YOSHINO et al.* (241)). La présence de récepteurs spécifiques de la lactotransferrine humaine à la surface des microvillosités de la membrane entérocytaire de l'homme a été démontrée par *COX et al.* (55). Ce récepteur a été caractérisé chez le lapin par *MAZURIER et al.* (142) comme une protéine d'environ 100.000 daltons.

### C. - Rôle de la lactotransferrine humaine dans le stockage du fer dans le foie

L'implication de la lactotransferrine dans le stockage du fer est encore mal connue. *PRIEELS et al.* (173) mettent en évidence l'existence d'un récepteur hépatique chez le rat et la souris, responsable de l'élimination du sang de glycoprotéines portant un groupement fucose  $\alpha 1 \rightarrow 3$  N-acétylglucosamine. La lactotransferrine serait éliminée à 90 % de la circulation sanguine par ce récepteur et serait retrouvée dans l'hépatocyte. Très récemment, *RETEGUI et al.* (177) confirment l'existence d'un récepteur de la lactotransferrine dans le foie de la souris mais ces auteurs infirment sa spécificité au fucose  $\alpha 1 \rightarrow 3$  N-acétylglucosamine et le situent dans le système réticulo-endothélial. *MOGUILJEVSKI et al.* (153) concluent, par des expériences de carbamylation de la lactotransferrine, au rôle de la partie protéique dans la reconnaissance avec le récepteur hépatique. L'importance du mécanisme reste encore inexplicé.

## D. - Rôle de la lactotransferrine humaine dans les mécanismes de défense anti-infectieuse

Pour une étude plus approfondie du rôle de la lactotransferrine humaine dans les mécanismes de défense anti-bactérienne, nous renvoyons aux revues générales de REITER (176) et de SPIK et MONTREUIL (199).

### 1. Rôle de l'immunité à médiation cellulaire

#### a) Rôle dans l'activité bactéricide des leucocytes polymorphonucléaires

Les trois principaux types de cellules du système immunitaire sont les leucocytes neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes. Les leucocytes polymorphonucléaires synthétisent la lactotransferrine qui se retrouve stockée dans les granules secondaires de ces cellules. LEFFELL et SPITZNAGEL (110) ont montré que lors du phénomène de phagocytose d'une bactérie, 60 % de la lactotransferrine des granules secondaires était "dégranulée". Les granules non dégradés contenant encore 40 % de lactotransferrine fusionnent avec les vacuoles de phagocytose pour donner les phagolysosomes. A ce niveau, la lactotransferrine a un double effet bactéricide qui se traduit par la captation du fer dans le phagolysosome et par la régulation de la production des hydroxyles libres. Selon HABER et WEISS (80), le fer ferrique augmenterait la vitesse de conversion de l' $O_2$  en  $O_2^-$  et  $H_2O_2$  qui interagissent pour donner des radicaux hydroxyles très oxydants et bactéricides. Cette réaction nécessiterait des agents chélatants tels que l'E.D.T.A. ou l'acide nitrilotriacétique (WINTERBOURN (233)). Selon AMBRUSO et JOHNSTON (9), la lactotransferrine favoriserait ce phénomène par l'apport de son fer. Selon GUTTERIDGE et al. (79), la lactotransferrine capterait le fer et éviterait ainsi des dommages occasionnés aux leucocytes par ces radicaux hydroxyles.

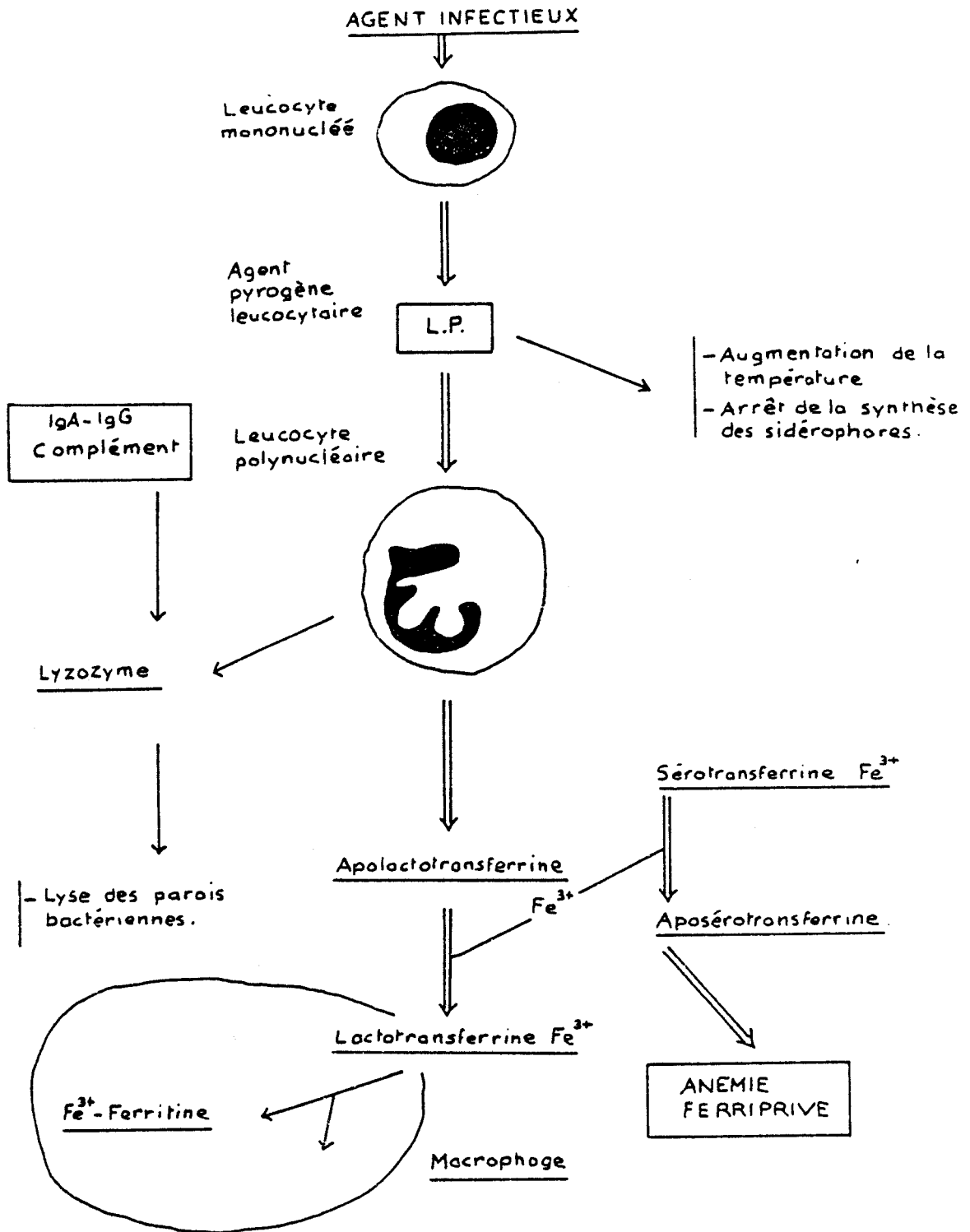
#### b) Rôle dans la migration des cellules immunocompétentes sur le lieu de l'inflammation

D'après DE SOUSA (58), les leucocytes polymorphonucléaires sont les premières cellules à arriver sur le lieu de l'inflammation. Ainsi que nous l'avons vu précédemment, la phagocytose entraîne la dégranulation des granules secondaires et l'excrétion de lactotransferrine dans le milieu. Selon

cet auteur, la lactotransferrine attirerait les macrophages et les lymphocytes qui possèdent des récepteurs membranaires pour cette molécule. Dans un second temps, les macrophages, grâce à la ferritine et à la sérotransferrine qu'ils synthétisent, amèneraient sur le lieu de l'inflammation les lymphocytes qui possèdent des récepteurs pour ces deux molécules. Ces phénomènes expliqueraient le rassemblement des cellules immuno-compétentes sur le lieu de l'inflammation. Par ailleurs, plusieurs auteurs confèrent à la lactotransferrine libérée par les leucocytes polymorphonucléaires la propriété de rendre ces dernières adhérentes aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (OSEAS *et al.*(168), BOXER *et al.*(32,33) et de permettre leur phagocytose par les macrophages (BOXER *et al.*(33)). Cette immobilisation des leucocytes serait renforcée par l'effet de la lactotransferrine dans la production d'un facteur inhibiteur de la migration leucocytaire (LIF) (KIJLSTRA *et al.* (103)).

#### c) Rôle de l'hyposidérémie inflammatoire

On sait actuellement que, lors d'une infection, la sidérémie baisse brutalement (WEINBERG (226), l'absorption intestinale du fer diminue (BERESFORD *et al.* (23), DUBACH *et al.* (67)) au profit d'une augmentation du fer de réserve dans le foie et les macrophages (PEKAREK *et al.*(170)). L'ensemble de ces phénomènes a pour but de diminuer par "ferriprivation" la croissance des bactéries, lesquelles libèrent des sidérophores ou sidéochromes qui vont rentrer en compétition avec les protéines ferri-fixatrices de l'hôte. La figure 9 , p. 44 , propose un schéma de mécanisme de l'hypo-sidérémie inflammatoire où, dans un premier temps, les leucocytes activés libèrent dans le sang un "leukocytic endogenous mediator" ou LEM (KAMPSCHMIDT *et al.*(101)) qui a été identifié au "leukocytic pyrogen" ou LEP. outre son pouvoir pyrogène, ce facteur entraîne une dégranulation des leucocytes et donc une libération de l'apolactotransferrine. Selon VAN SNICK *et al.*(219), l'apolactotransferrine ainsi libérée capterait le fer de la sérotransferrine et le transférerait dans la ferritine des macrophages. La présence de récepteurs membranaires de la lactotransferrine saturée sur le macrophage (CAMPBELL (43), VAN SNICK *et al.*(219)) serait en faveur du mécanisme.



- Figure 9 -

Schéma récapitulatif de l'intervention des transferrines lors d'une agression microbienne d'après SPIK et MONTREUIL (199)

d) Rôle de la régulation de la myélopoïèse

Les leucocytes polymorphonucléaires et les macrophages sont issus d'une même cellule prédifférenciée. Leur production est contrôlée par des facteurs antagonistes, les uns activateurs ("colony stimulating factors" ou CSF) synthétisés par les lymphocytes, monocytes et macrophages (METCALF (144)), les autres inhibiteurs ("colony inhibitory activity" ou CIA) synthétisés par les leucocytes neutrophiles. La lactotransferrine saturée en fer fait partie de ces facteurs CIA et inhibe ainsi l'activité stimulante granulomonocytaire (GM-CSA) (BRÖXMEYER *et al.* (39)) dans une interaction complexe impliquant les monocytes et certaines sous-populations de lymphocytes T (BAGBY *et al.* (12)).

e) Rôle dans la croissance des lignées lymphocytaires

Très récemment, HASHIZUME *et al.* (84) ont étudié l'effet de divers facteurs de croissance sur des lignées lymphocytaires humaines en culture dans des milieux sans sérum. Ces auteurs montrent que la lactotransferrine humaine aussi bien que la lactotransferrine bovine, constitue un facteur de croissance essentiel pour les lignées cellulaires. Cette activité de facteur de croissance est supérieure à celle de la sérotransferrine humaine. Elle se manifeste pour les lignées de lymphocytes B et T humaines mais non pour les lignées lymphocytaires de souris.

f) Rôle dans l'activité cytotoxique des monocytes et des cellules NK

Il existe dans le sang au moins deux types de cellules mononuclées capables de tuer des cellules cibles : les monocytes et les cellules NK (Natural Killer). La cytotoxicité de ces cellules est augmentée par la présence de l'interféron (MINATO *et al.* (152)) mais également, comme cela a été montré en 1984 par HORWITZ *et al.* (89), par la lactotransferrine humaine. Ces auteurs montrent même que la lactotransferrine augmente la cytotoxicité des monocytes vis-à-vis de certaines lignées cellulaires (CHANG *et al.* K562) alors que l'interféron ne le peut pas.

## 2. Rôle dans l'immunité humorale

### a) Activité bactériostatique

Il a été montré *in vitro* que la lactotransferrine inhibait la croissance de différentes souches d'*Escherichia coli* (BULLEN et al. (42), REITER et al. (176)), de staphylocoques (MASSON et al. (130)), de *Pseudomonas aeruginosa* (MASSON et al. (123)), de *Bacillus stearothermophilus* et *subtilus* (ORAM et al. (167)) et de *Candida albicans* (KIRKPATRICK et al. (105)). Cette activité réside en un mécanisme de ferriprivation (SCHADE et CAROLINE (185), FEENEY (72)) où la lactotransferrine joue un rôle compétitif avec les sidérophores bactériens pour la capture du fer, telle l'entérochiline d'*E. coli* avec laquelle la formation d'un complexe avec la lactotransferrine a été montrée au laboratoire.

### b) Activité bactéricide

ARNOLD et al. (10) démontrent que l'apolactotransferrine, dissoute dans de l'eau distillée, a un effet bactéricide direct sur un grand nombre de micro-organismes incluant des bactéries Gram (+), Gram (-), aérobies, anaérobies et des levures. Parmi ces bactéries, nous citerons : *Streptococcus mutans*, *salivarius*, *pneumoniae*, *Escherichia coli* (non entéropathogénique), *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*. L'apolactotransferrine doit être en contact direct avec la paroi bactérienne pour avoir un effet bactéricide.

### c) Synergies d'action entre le lactotransferrine et le lysozyme, le complément et les sIgA.

*In vitro*, le lysozyme associe son activité lytique vis-à-vis des parois des bactéries Gram (+) à l'action bactériostatique de la lactotransferrine. PERAUDIN et PRIEELS (171) ont montré récemment que les protoplastes de *Micrococcus luteus*, obtenus par l'action du lysozyme humain étaient agglutinés par l'addition de la lactotransferrine humaine ou bovine. La mise en évidence d'un complexe formé par la lactotransferrine humaine et le lysozyme humain a été réalisée par JORIEUX (99) et JORIEUX et al. (100).

La lactotransferrine posséderait, suivant sa concentration, une activité inhibitrice ou activatrice du complément (MORGAN *et al.* (163), VEERHUIS *et al.* (220)). Une synergie d'action semble avoir lieu aussi entre le complément et la sérotransferrine ou les sidérophores bactériens (RIVIER *et al.* (178)).

De nombreux auteurs ont montré que l'activité bactériostatique de la lactotransferrine humaine ou bovine augmente en présence d'immunoglobulines sIgA ou IgG spécifiques des bactéries (BULLEN *et al.* (42), ROGERS (179), ROGERS *et al.* (182), SPIK *et al.* (193)). Cette synergie d'action peut être expliquée par deux mécanismes différents. Selon BULLEN *et al.* (41), les immunoglobines spécifiques, en se fixant sur le récepteur membranaire de l'entérochiline, inhiberait le passage du fer du complexe fer-entérochiline à l'intérieur de la bactérie. Cette synergie d'action n'est effective que sur des bactéries pathogènes et non sur des bactéries commensales (STEPHENS *et al.* (205)). L'autre mécanisme concerne l'inhibition de l'adhésion des bactéries sur les muqueuses. Selon IZHAR *et al.* (95), cette inhibition serait liée à la partie glycanique de la lactotransferrine et des sIgA et particulièrement aux résidus de L- fucose présents sur ces molécules.

## E. - Conclusions

Les rôles joués par la lactotransferrine sont multiples. Elle semble constituer un maillon indispensable dans des mécanismes de régulation vitaux que sont l'absorption intestinale du fer et son stockage par le foie. Son importance est indiscutable pour tous les mécanismes immunitaires mis en jeu lors d'une agression bactérienne où son rôle ne se limite pas à une ferriprivation du milieu extracellulaire mais aussi à une reconnaissance cellulaire entraînant la "cavalcade" des cellules immunocompétentes sur le lieu de l'infection.



---

CONCLUSION DES GENERALITES

Ainsi que nous avons pu le constater au cours du chapitre des "Généralités", la sérotransferrine humaine, la lactotransferrine humaine et l'ovotransferrine de poule sont des glycoprotéines très étudiées tant au plan structural qu'au plan de leurs rôles biologiques.

La lactotransferrine humaine, malgré sa découverte plus tardive que celle de la sérotransferrine humaine ou de l'ovotransferrine de poule, a déjà fait l'objet de nombreuses études structurales.

La structure des glycanes de la lactotransferrine humaine est maintenant connue ainsi que la structure covalente de la protéine. Cette dernière a été déterminée, tout récemment, par notre Laboratoire en collaboration avec celui du *Professeur JOLLES*. L'achèvement de la détermination de la séquence peptidique de la lactotransferrine n'a été rendue possible qu'à la suite de travaux complémentaires qui ont consisté à isoler des peptides afin de réenchaîner les séquences connues. Ainsi que nous l'exposerons ultérieurement, nous avons contribué à ces travaux d'isolement de peptides qui nous ont permis également de caractériser les positions des ponts disulfures sur la chaîne peptidique. La détermination de la séquence primaire complète de la lactotransferrine nous a permis d'envisager le calcul de sa structure secondaire.

Les études de la conformation de la lactotransferrine humaine et des autres transferrines en général, sont, en revanche, peu avancées. Seule l'analyse par diffraction des rayons X de la sérotransferrine de lapin a été réalisée et a permis de constater la nature bilobaire de la protéine.

La présence de ces deux lobes dans les transferrines avait déjà été suggérée par l'obtention plus ou moins quantitative des deux moitiés N- et C- terminales après hydrolyse enzymatique de plusieurs transferrines. Dans le cas de la lactotransferrine humaine où seule la moitié C-terminale avait pu être isolée, nous avons voulu couper la molécule en ses deux lobes afin de déterminer leurs propriétés physicochimiques respectives.

L'examen des séquences peptidiques des transferrines révèle des homologies internes, d'une part entre les moitiés N- et C- terminales mais

aussi à l'intérieur de chaque moitié, ce qui a permis d'émettre l'hypothèse de l'existence de six domaines dans chaque transferrine. Nous avons cherché à isoler ces domaines par l'hydrolyse protéolytique ménagée de la lactotransferrine humaine.

Les résultats de nos travaux sont développés dans les chapitres suivants.

---

TRAVAUX PERSONNELS

COUPURES PROTEOLYTIQUES MENAGEES DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE  
ISOLEMENT ET ETUDE DES PROPRIETES DES FRAGMENTS N- ET C- TERMINAUX

Comme nous l'avons exposé dans la partie "généralités", de nombreux auteurs ont réussi à couper les transferrines en leurs deux lobes séparés. Ils prouvaient ainsi qu'il existe une zone "inter-domaines" moins structurée et donc plus fragile à la protéolyse entre les deux lobes N- et C-terminaux. L'isolement quantitatif des deux lobes de la lactotransferrine humaine n'avait jamais pu être réalisé. Seule la moitié C- terminale (fragment C-pe de 40.000 daltons) de la molécule a pu être isolé par *LINE et al.* (116) alors que, dans les conditions utilisées, la moitié N- terminale est systématiquement digérée.

Notre but a été, tout d'abord, d'isoler les deux lobes de la lactotransferrine humaine. Dans un second temps, nous avons cherché à isoler d'autres domaines à l'intérieur même de chaque lobe afin de confirmer l'existence des 6 domaines structuraux de la lactotransferrine.

## I. - MISE AU POINT DES CONDITIONS D'HYDROLYSE PROTEOLYTIQUE MENAGEE DE LA LACTOTRANSFERRINE

Nous avons entrepris l'étude de l'action d'une série de 6 protéases "classiques" que sont la pepsine, la papaïne, la chymotrypsine, la ficine et la protéase V8 de *Staphylococcus aureus* sur la molécule de la lactotransferrine.

L'hydrolyse enzymatique ménagée de la lactotransferrine par ces enzymes nécessite l'utilisation de paramètres d'hydrolyse bien définis. On peut faire varier l'état conformationnel de la molécule par action sur son degré de saturation par le fer (forme désaturée et forme saturée en fer) ou par la dénaturation causée par le milieu d'incubation (pH bas ou présence d'urée).

Les essais analytiques d'hydrolyses enzymatiques ont été réalisés de manière à choisir les enzymes et leurs paramètres d'hydrolyse pour l'obtention de fragments avec un haut rendement de coupure.

Afin de mieux suivre l'exposé des résultats, nous renvoyons au tableau IV p. 52, dans lequel figurent les masses moléculaires des fragments obtenus au cours des différentes protéolyses. Aucun rendement d'obtention des fragments ne peut être avancé de manière précise, sauf dans le cas des fragments dont l'isolement a été entrepris.

### A. - Hydrolyse pepsique

#### 1. Hydrolyse de l'apolactotransferrine

L'hydrolyse par la pepsine entraîne la dégradation de la molécule en peptides de masses moléculaires inférieures à 5.000 daltons. Cette dégradation est totale au bout d'une heure avec l'urée 2M ou 4M.

#### 2. Hydrolyse de la lactotransferrine saturée en fer

L'hydrolyse de la molécule saturée en fer sur son site acido-stable (le pH bas (2,85) implique le départ du fer du site acido-labile), permet d'obtenir un fragment de 40.000 daltons avec un rendement estimé à 50 % après 4 heures d'hydrolyse ; le rendement est moindre en présence d'urée.

TABLEAU IV  
 MASSES MOLECULAIRES DES FRAGMENTS PROTEIQUES OBTENUS  
 PAR PROTEOLYSE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

SUBSTRATS ENZYMES	APO LTF		LTF SATUREE	
	sans urée	avec urée	Sans urée	avec urée
PEPSINE	- 80 000 - peptides	- 80 000 - peptides	- 80 000 - 45 000 * - peptides	- peptides
PROTEASE v8	- 80 000 - fragments de 70 000 à 15 000 - peptides	- 80 000 - fragments de 70 000 à 15 000 - peptides	- 80 000 * - 50 000 * - 45 000 * - 15 000 - peptides	- 80 000 - fragments de 70 000 à 15 000 - peptides
FICINE	- 80 000 - 45 000 - peptides	- 80 000 - 45 000 - peptides	- 80 000 - 45 000 - peptides	- 80 000 - 45 000 - peptides
PAPAÏNE	- peptides	- peptides	- 80 000 - 60 000 - 55 000 - peptides	- peptides
TRYPSINE	- 80 000 - 60 000 - 45 000 - 35 000 - 30 000 - peptides	- 80 000 - peptides	- 80 000 * - 50 000 * - 30 000 * - 15 000 - peptides	- 80 000 - 50 000 - 30 000 - 15 000 - peptides
CHYMOTRYPSINE	- 80 000 - peptides	- 80 000 - peptides	- 80 000 - 25 000 - peptides	- 80 000 - 25 000 - peptides

\* Fragments obtenus avec un haut rendement de coupure

Ce résultat semble confirmer celui obtenu par *LINE et al.* (116). Leur rendement de coupure étant estimé supérieur au nôtre, nous avons repris leur protocole à des fins préparatives.

## B. - Hydrolyse papaïque

### 1. Hydrolyse de l'apolactotransferrine

L'hydrolyse de l'apolactotransferrine en présence ou en l'absence d'urée conduit à une hydrolyse totale, dès une minute de mise en contact avec l'enzyme, en peptides inférieurs à 5.000 daltons.

### 2. Hydrolyse de la lactotransferrine saturée en fer

L'hydrolyse de la molécule saturée en fer et dénaturée par l'urée, conduit au même résultat que l'hydrolyse de la molécule dépourvue de fer. En milieu non dénaturant, au bout d'une heure d'hydrolyse, on obtient avec un taux de coupure très faible deux fragments de 55.000 et 60.000 daltons.

## C. - Action de la ficine

### 1. Hydrolyse de l'apolactotransferrine

L'hydrolyse par la ficine permet l'obtention d'un unique fragment de 45.000 daltons avec un taux de coupure cependant faible et ce, en présence ou non d'urée.

### 2. Hydrolyse de la lactotransferrine saturée en fer

Le même résultat est obtenu par hydrolyse de la molécule saturée ou dépourvue de fer.

## D. - Action de la protéase V8

### 1. Hydrolyse de l'apolactotransferrine

La protéase V8 présente une spécificité d'action variable en fonction



des paramètres d'hydrolyse utilisés (pH 4,0 ou 6,1, urée 2M ou 4M). Elle donne de nombreux fragments de 15.000 à 70.000 daltons avec un taux de coupure faible.

## 2. Hydrolyse de la lactotransferrine saturée en fer

L'action de la protéase V8 dans un milieu d'incubation à pH 4,0 sans urée et pendant 5 minutes, permet l'obtention de 2 fragments de 45.000 et 50.000 daltons ainsi qu'un ou plusieurs fragments de 15.000 daltons.

### E. - Hydrolyse tryptique

#### 1. Hydrolyse de l'apolactotransferrine

L'hydrolyse tryptique de l'apolactotransferrine en présence d'urée 2M et 4M entraîne l'apparition de nombreux peptides.

En milieu non dénaturant, nous observons dès la première minute de réaction, l'apparition de fragments de 60.000, 45.000, 35.000, 30.000 et 15.000 daltons, en faible quantité.

#### 2. Hydrolyse de la lactotransferrine saturée en fer

L'hydrolyse tryptique fournit, à partir d'une heure de mise en contact, 3 fragments de 80.000, 50.000 et 30.000 daltons. L'apparition de ces fragments s'accroît au bout de 4 heures de réaction jusqu'à donner un rapport sensiblement équimoléculaire entre la lactotransferrine résiduelle et les deux fragments de 50.000 et 30.000 daltons. Nous n'avons pas constaté, par la présence ou l'absence de calcium ou d'urée, de différence qualitative dans l'obtention des fragments. La présence de calcium et l'absence d'urée permettent un meilleur rendement.

### F. - Hydrolyse chymotryptique

#### 1. Hydrolyse de l'apolactotransferrine

Quels que soient les paramètres d'hydrolyse utilisés, aucun fragment de

plus de 5.000 daltons n'a été obtenu.

## 2. Hydrolyse de la lactotransferrine saturée en fer

L'hydrolyse de la molécule saturée en fer se caractérise par l'obtention d'un fragment de 25.000 daltons dès la première minute de réaction, en présence ou non d'urée et favorisée en présence d'urée 2M. Le rendement est estimé optimal au bout d'une heure d'hydrolyse.

### G. - Conclusions

De ces essais d'hydrolyse enzymatique, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

. la saturation en fer de la molécule constitue, en général, une garantie de protection contre la protéolyse ;

. des enzymes aussi différents dans leur spécificité que la protéase V8, la ficine et la trypsine semblent fournir un même fragment de 40.000 daltons ;

. la dénaturation par l'urée 4M ou même 2M entraîne un déploiement important de la protéine qui favorise ainsi, dans la majorité des cas, une hydrolyse totale de la lactotransferrine en peptides.

Le rendement de coupure a constitué notre principal critère de sélection pour le choix des 3 protéases utilisées ensuite à des fins préparatives : pepsine, protéase V8, trypsine.

## II. - ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES FRAGMENTS OBTENUS

En vue de l'obtention des fragments issus des hydrolyses pepsique, tryptique et par la protéase V8 de *Staphylococcus aureus*, nous avons simplement adapté les paramètres d'hydrolyse à des fins préparatives.

#### A. - Préparation et caractérisation du fragment pepsique

En reprenant le protocole de *LINE et al.* (116), nous obtenons, après hydrolyse pepsique et fractionnement de l'hydrolysate sur colonne de Sephadex G75, 5 fractions nommées I, II, A, B et C (Fig. 10a, p. 57). La fraction I contient de la lactotransferrine intacte, la fraction II contient un fragment de 40.000 daltons obtenu avec un rendement de 40 % et dont la détermination de la séquence au laboratoire du Professeur *JOLLES* montre qu'il s'agit bien du lobe C-terminal de la molécule, allant du résidu n° 339 au résidu n° 703 (Fig. 11, p. 58). Les fractions A, B et C contiennent des peptides et ont été utilisées pour la recherche des peptides à cystine (pages 104 à 114).

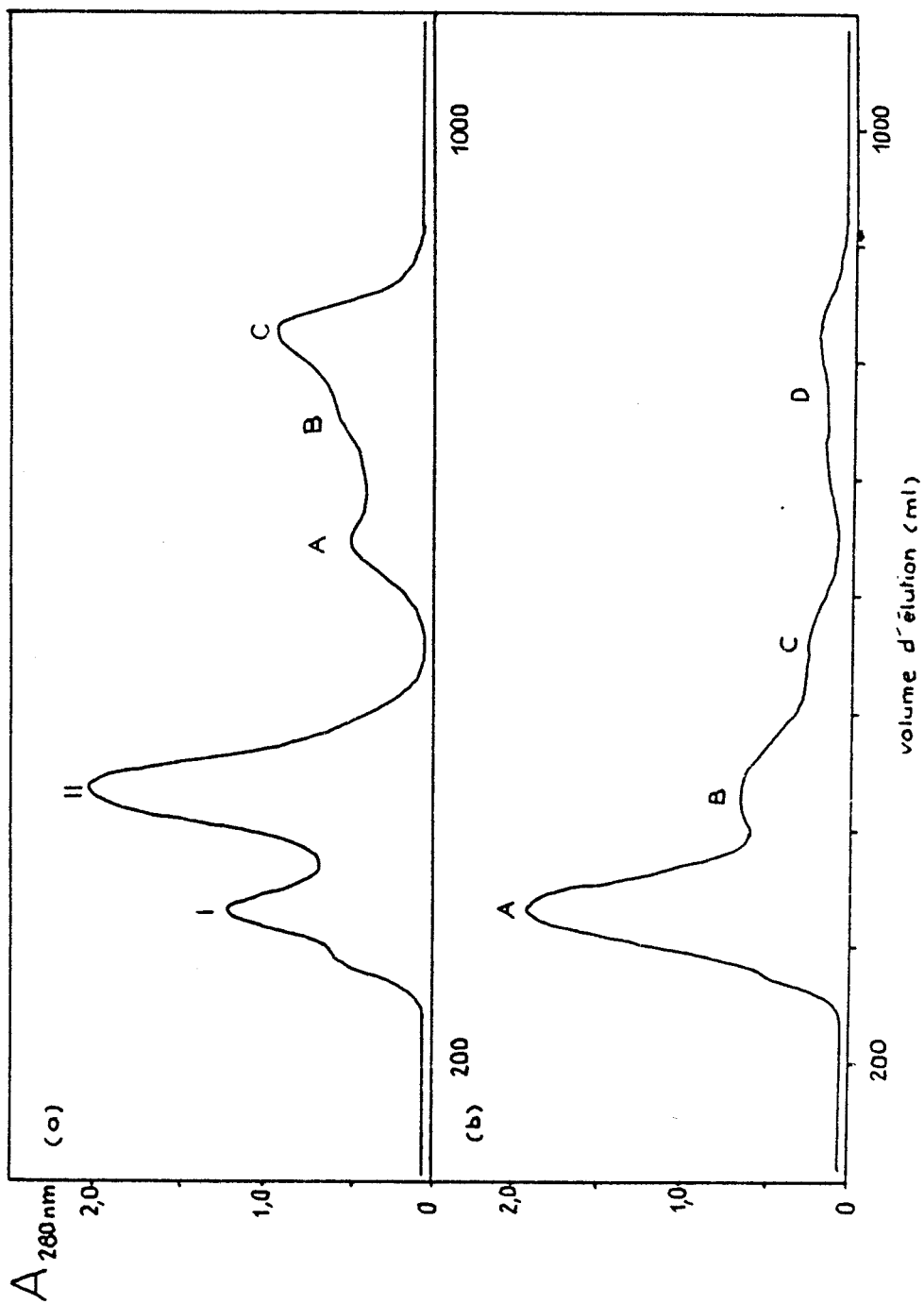
#### B. - Préparation et caractérisation des fragments obtenus par la protéase V8 de *Staphylococcus aureus*

La figure 10b, p. 57, donne le profil de l'évolution sur colonne de Séphadex G75 dans  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,1 M de l'hydrolysate de 100 mg de lactotransferrine saturée en fer.

Le pic A (60 mg) correspond à de la lactotransferrine vraisemblablement intacte, le pic B à un mélange de 2 fragments de 40.000 et 45.000 daltons obtenus avec un rendement d'environ 20 %. Le pic C (2 à 3 mg) contient un ou plusieurs fragments de 15.000 daltons dont l'étude n'a pas été entreprise. La fraction D (20 mg) est composée d'un ensemble complexe de glycopeptides et de peptides.

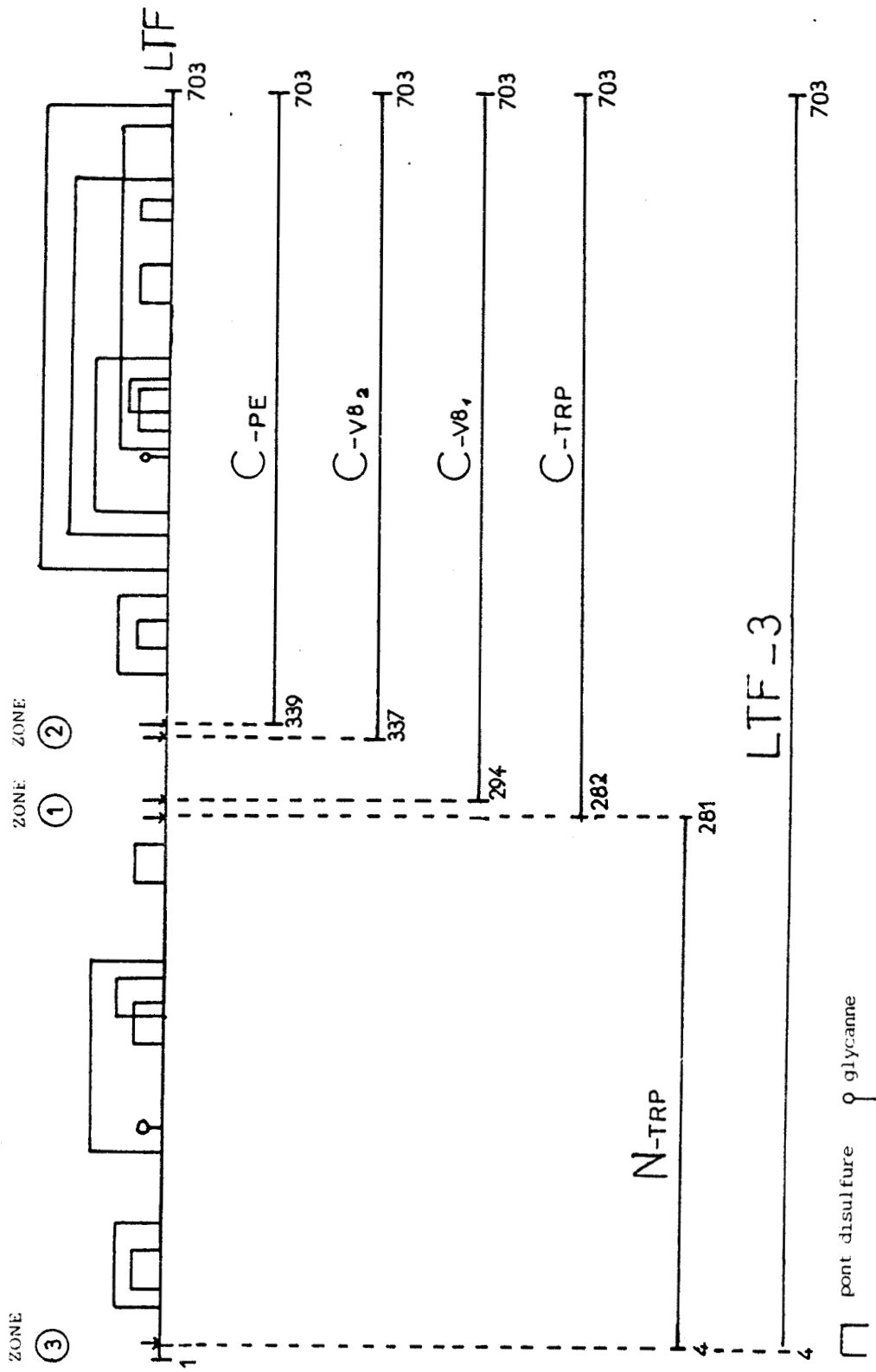
Le manque de moyens suffisamment résolutifs pour la séparation des fragments de 40.000 et 45.000 daltons nous a conduit à conserver ces derniers en mélange dans la même fraction. Les études de caractérisation des fragments ont amené les résultats suivants :

1) La mise en présence de lactotransferrine, du C-pe et des fragments de 40.000 et 45.000 daltons obtenus par la protéase V8, contre un anti-sérum anti-lactotransferrine selon la méthode d'*OUCHTERLONY* (169) révèle une communauté antigénique partielle des 2 fragments avec la lactotransferrine et totale avec le C-pe.



- Figure 10 -

Profils d'élution des hydrolysats (a) pepsique, (b) par la protéase V8 de la lactotransferrine (Colonne Séphadex G75 dans  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,1 M ; débit 5 ml/heure).



- Figure 11 -

Localisation sur la chaîne peptidique de la lactotransferrine humaine (LTF) des différents fragments obtenus par protéolyse ménagée. (Zones 1, 2 et 3 : zones de coupures privilégiées).

2) La réaction de dansylation du mélange des 2 fragments donne la thréonine et la valine comme acides aminés N- terminaux.

3) La détermination de la séquence du mélange des fragments confirme l'appartenance de ceux-ci à la région C- terminale de la protéine. Ainsi que le décrit la figure 11, p. 58 , il s'agit d'un mélange d'un fragment long du résidu n° 294 au n° 703 (fragment C- V8<sub>1</sub> de 45.000 daltons) et d'un autre fragment allant du résidu n° 337 au résidu n° 703 (fragment C- V8<sub>2</sub> de 40.000 daltons).

#### C. - Préparation et caractérisation des fragments obtenus par hydrolyse trypsique

Nous renvoyons à l'article présenté aux pages 83 à 89 , qui décrit la préparation et la caractérisation de 3 fragments de 80.000, 30.000 et 50.000 daltons obtenus avec des rendements de 43 %, 33 %, 20 % et appelés LTF-3, N-trp et C-trp. Ces deux derniers fragments appartiennent respectivement aux extrémités N- et C- terminales de la lactotransferrine : du résidu n° 4 au résidu n° 281 pour le N-trp, du résidu n° 282 au résidu n° 703 pour le C-trp ; le fragment LTF-3 va du résidu n° 4 au résidu n° 703 (Fig.11 , p. 58 ).

Les fragments N-trp et C-trp fixent réversiblement un ion ferrique et possèdent la propriété de s'associer pour former un complexe stable. Nous traiterons de cette propriété ultérieurement (pages 68 à 80 ).

#### D. - Conclusions

Nos travaux ont permis l'isolement et l'identification de 5 fragments protéiques de la lactotransferrine :

- . le C-pe de 40.000 daltons ;
- . le C-V8<sub>1</sub> de 45.000 daltons ;
- . le C-V8<sub>2</sub> de 40.000 daltons ;
- . le C-trp de 50.000 daltons ;
- . le N-trp de 30.000 daltons .

Ces résultats, résumés dans la figure 11 , p. 58 , permettent les conclusions suivantes :

1) deux zones paraissent fragiles à l'hydrolyse enzymatique ménagée, délimitant une région d'une cinquantaine de résidus d'acides aminés. La première zone ou zone 1 est située dans la région du résidu n° 280, la seconde zone ou zone 2 est située dans la région du résidu n° 340. Une troisième zone (zone 3), spécifique à la coupure tryptique, est localisée au niveau des premiers résidus d'acides aminés. Ces caractéristiques semblent propres à la lactotransferrine humaine.

2) L'obtention quantitative des fragments N-trp et C-trp indique un point de clivage très exposé qui n'est pas situé exactement au milieu de la molécule comme c'est le cas pour les autres transferrines, mais décalé d'une cinquantaine de résidus dans la région N- terminale.

3) L'isolement du complexe formé par les fragments N-trp et C-trp met en évidence la présence de fortes interactions dont nous reparlerons ultérieurement.

4) La coupure quantitative de la lactotransferrine en ses deux fragments N-trp et C-trp constitue un résultat original. Seuls *BLUARD - DECONINCK et al.* (30) réussirent la préparation, à partir d'une hydrolyse tryptique de la lactotransferrine humaine saturée en fer à 30 %, de deux fragments de 40.000 daltons ne possédant pas de déterminants antigéniques communs. Le rendement d'obtention de ces fragments était très faible : de l'ordre de 1 % (p:p) (au lieu de 33 % et 20 % dans nos conditions d'hydrolyse). Les deux fragments N-trp et C-trp que nous avons isolés correspondent approximativement aux lobes N- et C- terminaux de la lactotransferrine ; ils présentent un grand intérêt pour la mise en évidence de propriétés physicochimiques particulières de chacun des lobes.

### III. - ETUDE DES PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES FRAGMENTS N- ET C- TERMINAUX ISOLES PAR HYDROLYSE TRYPTIQUE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

L'isolement des fragments N-trp et C-trp de la lactotransferrine humaine, obtenus avec un rendement important (33 % et 20 %), nous a permis d'envisager

l'étude de quelques unes de leurs propriétés physicochimiques.

A. - Comportement électrophorétique des fragments N-trp et C-trp

Après 4 heures de migration à 100 volts dans un gel de polyacrylamide réticulé à 5 % et dans un tampon à pH 8,0, les fragments N-trp et C-trp se différencient de la lactotransferrine par une migration vers la cathode, plus importante pour le fragment N-trp que pour le fragment C-trp, la lactotransferrine restant au niveau du dépôt. Cette observation indique que les deux fragments N-trp et C-trp possèdent des pHI différents, inférieurs à celui de la lactotransferrine.

B. - Composition en acides aminés et masses moléculaires des fragments N-trp et C-trp

Ainsi que nous l'avons déterminé précédemment par électrophorèse en gel de polyacrylamide, les fragments N-trp et C-trp possèdent une masse moléculaire approximative de 30.000 et 50.000 daltons, respectivement. La connaissance de la séquence primaire des fragments permet de chiffrer avec exactitude leur composition en acides aminés et leur masse moléculaire, nous les reportons dans le tableau V, p. 62. En ce qui concerne la composition relative en acides aminés de chaque fragment par rapport à celle de la lactotransferrine, aucune différence marquée n'est observée.

C. - Composition centésimale et molaire en oses des fragments N-trp et C-trp

La détermination des compositions en oses des fragments N-trp et C-trp a été réalisée par méthanolyse, trifluoroacétylation puis analyse en chromatographie en phase gazeuse. Les compositions centésimales et molaires en oses des N-trp et C-trp sont reportées dans le tableau VI, p. 63, où on peut les comparer avec celles de la lactotransferrine humaine. Les résultats révèlent, sur chacun des fragments, la présence d'un glycanne de type N-acétyllactosaminique caractéristique de ceux de la lactotransferrine humaine (SPIK *et al.* (200)). Peu de différences caractérisent les glycannes des deux fragments



TABLEAU V

COMPOSITION EN ACIDES AMINES ET MASSES MOLECULAIRES CALCULEES  
DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE ET DES FRAGMENTS N-trp ET C-trp

Acides aminés	Lactotransferrine humaine	Fragment N-trp	Fragment C-trp
Gln	28	12	3
Trp	11	5	6
Glu	42	18	24
Arg	46	21	23
Thr	31	11	20
Tyr	20	7	13
Ile	16	9	7
Pro	34	18	16
Ala	63	28	35
Ser	50	15	35
Asp	38	14	24
Phe	32	14	18
Gly	56	21	34
His	9	4	5
Lys	46	19	27
Leu	61	19	42
Cys	32	12	20
Val	49	20	29
Asn	33	10	23
Mét	6	1	5
Nombre d'acides aminés	703	278	422
Masse moléculaire	77646	30912	46382

TABLEAU VI

COMPOSITIONS CENTESIMALES ET MOLAIRES EN OSES DES FRAGMENTS  
N-trp ET C-trp DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

Oses	Lactotransferrine humaine		Fragment N-trp		Fragment C-trp	
	%	moles/mole de protéine	%	moles/mole de protéine	%	moles/mole de protéine
NeuAc	0,9	2,3	0,9	0,9	0,9	0,6
Gal	0,9	4,2	1,2	2,1	0,8	2,0
Man	1,3	6,0	1,7	3,0	1,1	3,0
GlcNac	2,3	3,3	2,7	4,0	1,8	4,0
Fuc	0,5	2,2	0,8	1,5	0,6	1,8

par rapport à la lactotransferrine si ce n'est un rapport fucose/acide sialique un peu plus élevé pour le fragment C-trp.

#### D. - Fixation du fer des fragments N-trp et C-trp

L'article présenté aux pages 83 à 89, rend compte de la capacité de fixation du fer des 2 fragments. Le N-trp et le C-trp, désaturés en métal par leur fractionnement dans l'acide acétique à 10 % (p:v), refixent réversiblement et respectivement 0,8 et 0,9 ions ferriques par molécule. Nous devons noter cependant que le traitement drastique subit lors du fractionnement dans l'acide acétique entraîne une dénaturation qui se traduit par une insolubilisation partielle des fragments (environ 30 % (p:p)). Les essais de resaturation ont été réalisés sur les fragments en solution après élimination du précipité par centrifugation A 465 mm, avec 0,8 et 0,9  $\text{Fe}^{3+}$ /mole de fragments N-trp et C-trp, nous obtenons respectivement :  $E_{1\text{p}100}^{1\text{cm}}$  : 0,41 et  $E_{1\text{p}100}^{1\text{cm}}$  : 0,30.

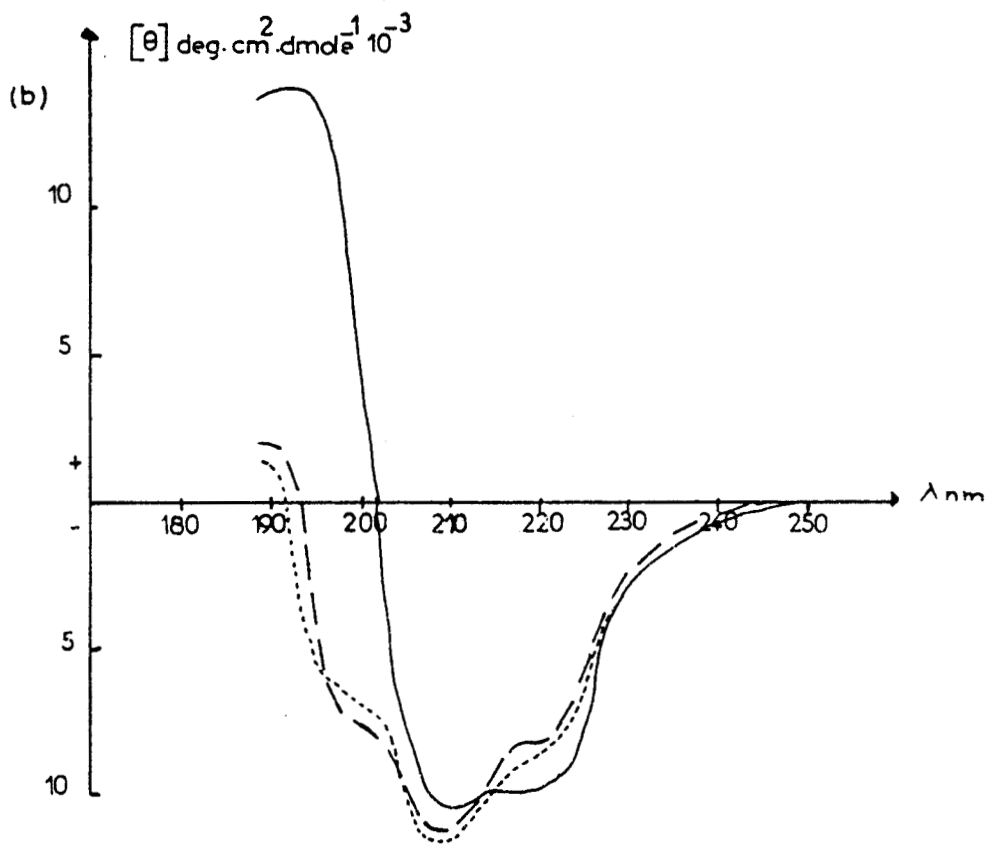
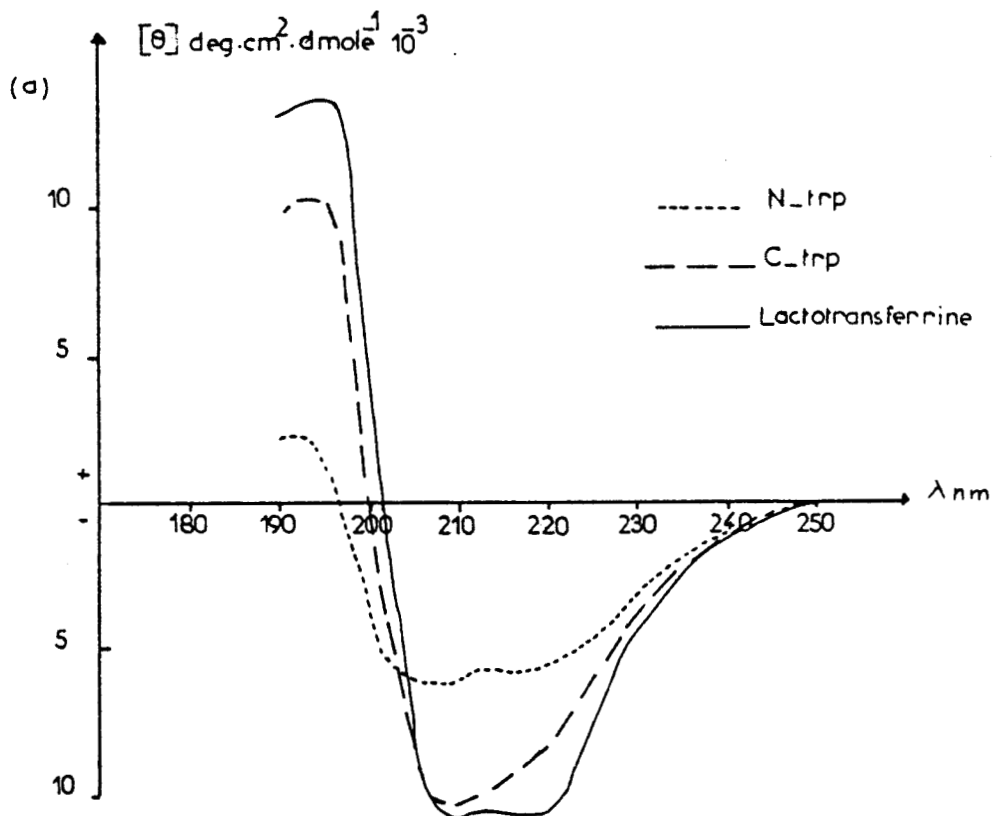
#### E. - Etudes par dichroïsme circulaire des fragments N-trp et C-trp

Tous nos travaux par dichroïsme circulaire ont pu être effectués avec la collaboration de Madame LOUCHEUX et de Monsieur AUBERT, à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille et à l'Unité V de l'INSERM ( Directeur : Professeur G. BISERTE ).

Des études par dichroïsme circulaire sur la lactotransferrine totale avaient déjà été réalisées par MAZURIER *et al* (134). Nous avons repris cette étude de manière à mettre en évidence des différences éventuelles de structures secondaires entre les deux fragments N-trp et C-trp et la protéine entière. Les spectres ont été réalisés avec la lactotransferrine et les fragments saturés ou désaturés en fer, entre 180 et 250 nm et entre 250 et 600 nm.

##### a) Spectres entre 180 et 250 nm

Les spectres obtenus pour la lactotransferrine saturée en métal ou dépourvue de fer (Fig. 12, p. 65) sont identiques ainsi que l'avaient décrit MAZURIER *et al*. (134). Ils montrent deux bandes négatives centrées à 210 et 220 nm et d'intensités égales. Ces bandes révèlent un taux d'hélicité  $\alpha$  de l'ordre de 26 %.



- Figure 12 -

Spectres dichroïques entre 180 et 250 nm (a) des fragments N-trp et C-trp saturés en fer et (b) des fragments N-trp et C-trp dépourvus de fer.

Les fragments N-trp et C-trp dépourvus de fer présentent des spectres très semblables (Fig. 12 , p.65 ) où l'on constate une diminution très sensible de l'hélicité (moins de 20 %). Cette diminution d'hélicité (bandes à 210 et 220 nm) laisse apparaître le pic à 215 nm caractéristique des structures en feuilletts plissés  $\beta$ , elle semble liée à l'apparition des structures désorganisées (bande à 198 nm).

Les spectres des fragments N-trp et C-trp saturés en fer montrent des différences sensibles :

. le N-trp saturé en fer possède un spectre où le taux d'hélicité est assez faible, soit 12 % seulement ;

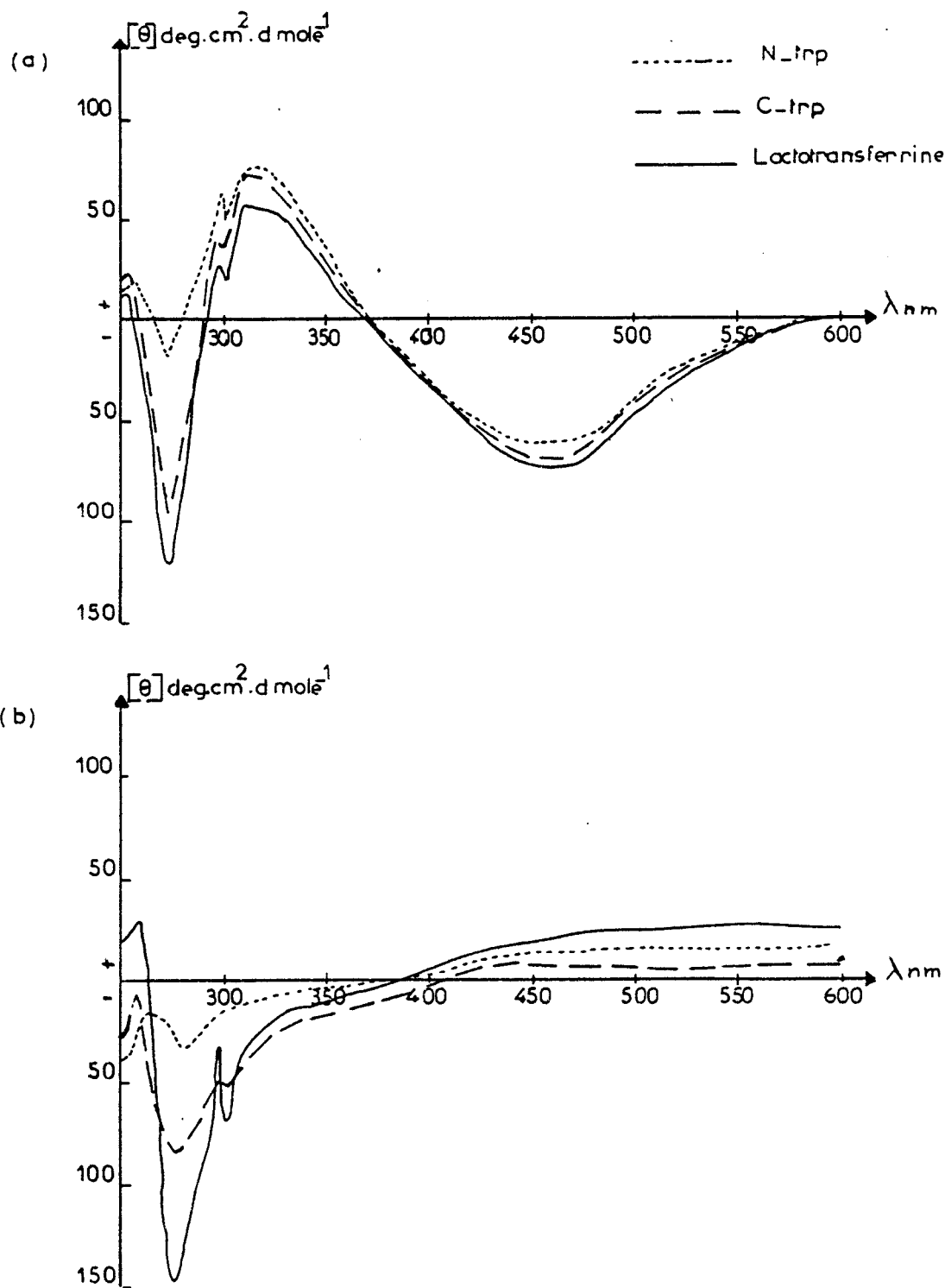
. le C-trp saturé en fer possède un taux d'hélicité plus proche de la lactotransferrine, de l'ordre de 21,5 %.

#### b) Spectres entre 250 et 600 nm

Les spectres de la lactotransferrine et du C-trp saturés en fer sont très semblables (Fig. 13 , p. 67 ) avec une large bande négative centrée à 276 nm (due aux ponts disulfures et à la phénylalanine) sur laquelle viennent se superposer des bandes à 250 et 291 nm (dues à la tyrosine et au tryptophane). On observe aussi trois bandes centrées à 305 nm (environnement électronique du tryptophane), 325 nm (changement de l'angle diédral des ponts disulfures) et 456 nm (fixation du métal).

Le N-trp saturé en fer (Fig. 13 , p. 67 ) présente un spectre différent de ceux de la lactotransferrine et du C-trp saturés en fer : les bandes à 250 et 291 nm sont très importantes alors que la bande négative centrée à 276 nm est faible ; la bande à 305 nm est beaucoup moins importante que celle à 325 nm.

L'apolactotransferrine et les fragments N-trp et C-trp dépourvus de fer présentent des spectres identiques où l'on ne retrouve plus les bandes à 305, 325 et 456 nm.



- Figure 13 -

Spectres dichroïques entre 250 et 600 nm (a) des fragments N-trp et C-trp saturés en fer et (b) des fragments N-trp et C-trp dépourvus de fer.

## F. - Conclusions

Les études du comportement électrophorétique et les études par dichroïsme circulaire révèlent des différences très sensibles entre les fragments N-trp et C-trp. D'une part, le fragment N-trp semble posséder un caractère plus acide que le fragment C-trp. D'autre part, le fragment N-trp saturé en fer présente un taux de structures en hélice  $\alpha$  très inférieur (12 %) à celui du fragment C-trp (21,5 %) et à celui de la lactotransferrine (26 %).

Alors que la présence ou l'absence du métal ne semble induire aucune différence entre les spectres de la lactotransferrine, l'absence de fer dans le N-trp ou dans le C-trp provoque une désorganisation importante des fragments concomitante à une perte significative de l'hélicité  $\alpha$ .

## IV. - PHENOMENES D'ASSOCIATION ET DE REASSOCIATION DES LOBES N- ET C-TERMINAUX DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

Le phénomène de l'association des lobes N- et C- terminaux de la lactotransferrine a déjà été évoqué au chapitre précédent. Cette propriété d'association des 2 lobes n'a jamais été décrite auparavant pour aucune autre transferrine et a retenu notre attention. Nous avons voulu connaître la nature des interactions régissant cette association et vérifier la réversibilité du phénomène. Nous avons utilisé le dichroïsme circulaire comme méthode d'analyse des changements structuraux entraînés par la réassociation, en collaboration avec *Mme LOUCHEUX et M. AUBERT* à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille.

### A. - Association et dissociation des lobes N- et C- terminaux de la lactotransferrine humaine

#### 1. Mise en évidence du complexe formé par les deux lobes

La coupure de la lactotransferrine par la trypsine, ainsi qu'elle est décrite dans l'appendice technique, donne, après analyse en électrophorèse en gel de polycylamide avec S.D.S., 3 bandes majeures de masses moléculaires voisines de 80.000, 50.000 et 30.000 daltons. Ces trois bandes existent en présence ou en l'absence d'agent réducteur ( $\beta$ -mercapto éthanol) ce qui permet

de conclure qu'aucune de ces bandes ne dérive d'un polypeptide pluricaténaire.

Le passage de l'hydrolysate sur colonne de Sephadex G75 dans  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,1 M donne le profil d'éluéon représenté dans la figure 14, p. 70. Un seul grand pic assymétrique est obtenu contenant encore les trois fragments. Il semble donc que cette fraction renferme la lactotransferrine de 80.000 daltons non digérée et un complexe formé par deux fragments de 50.000 et 30.000 daltons.

Le fractionnement de l'hydrolysate tryptique sur colonne de Bio-Gel P-60 dans l'acide acétique 10 % (v:v) permet l'obtention de 3 fractions contenant chacune un fragment de 80.000, 50.000 et 30.000 daltons. Cette observation confirme bien l'existence d'un complexe d'une masse moléculaire identique à celle de la lactotransferrine et dissociable dans l'acide acétique 10 % (v:v) en 2 fragments de 30.000 et 50.000 daltons que nous avons identifiés aux lobes N- et C- terminaux de la lactotransferrine (fragments N-trp et C-trp) (voir le paragraphe précédent).

## 2. Conditions de dissociation des 2 lobes

Les liaisons non covalentes qui existent au sein d'une protéine ou entre plusieurs protéines consistent essentiellement en des liaisons "pont-hydrogène", des liaisons ioniques et des liaisons hydrophobes. Les liaisons hydrophobes sont, de loin, les plus énergétiques.

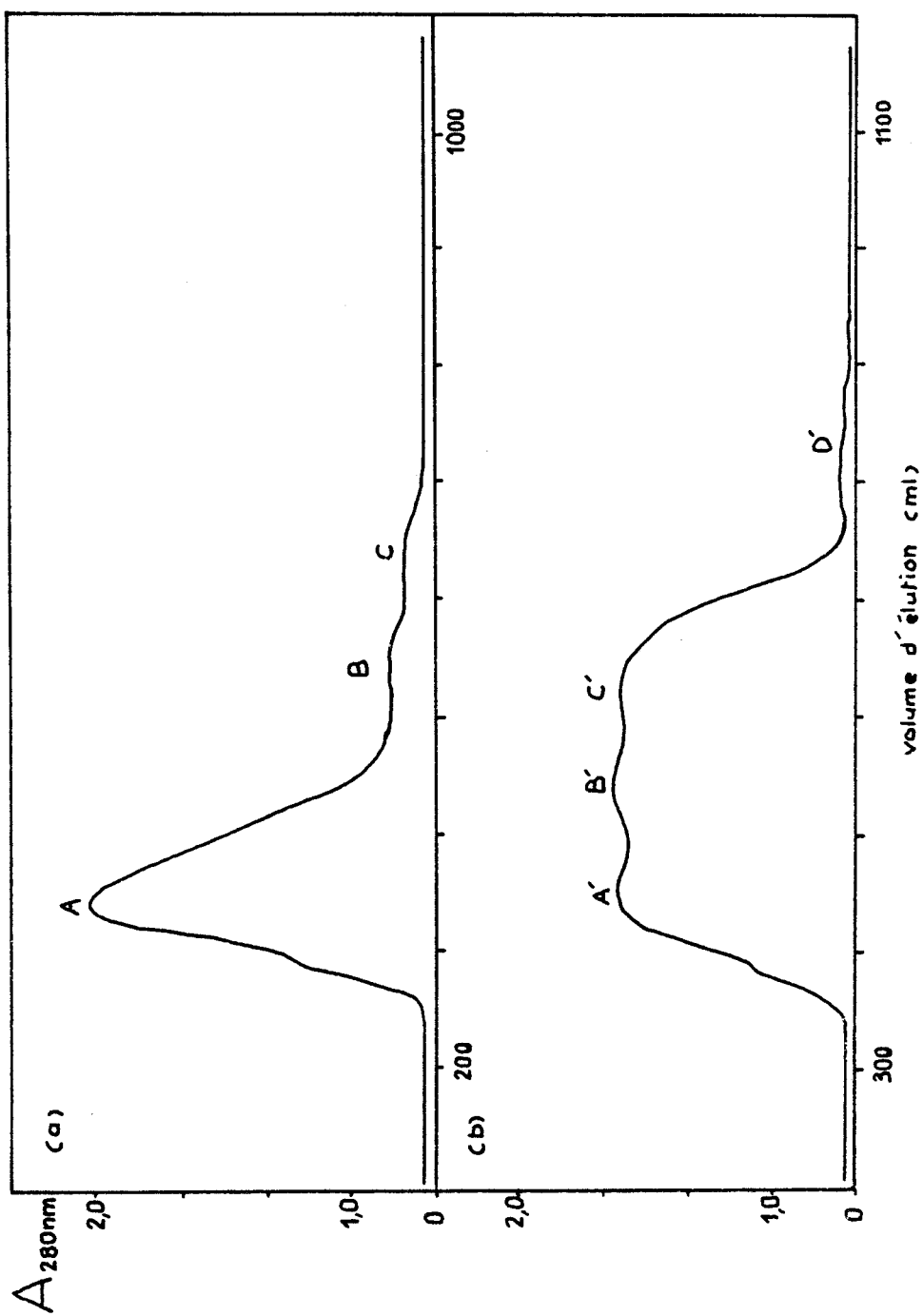
L'obtention d'un complexe des fragments N-trp et C-trp dans des conditions de force ionique et de pH non dénaturantes nous a conduit, pour isoler les deux fragments, à modifier les paramètres d'éluéon de l'hydrolysate tryptique par l'utilisation de solvants chaotropiques.

Nous avons utilisé différentes concentrations de 1 à 10 % (v:v) en acide acétique. Seule une concentration de 10 % en acide acétique a permis la dissociation du complexe par chromatographie sur colonne de Bio-Gel P 60.

En revanche, l'utilisation des tampons tris/HCL 0,1 M, pH 7,0 renfermant du KCl 1M, de l'urée 4M ou de l'éthanol 15 % (v:v) n'a permis d'aboutir à aucune dissociation du complexe.

Si l'on considère, d'une part, que l'acide acétique dissocie le complexe plus par son pouvoir solvant que par son pouvoir acide (la différence de pH entre l'acide acétique à 5 % et à 10 % n'excède pas 0,2 unité) et que, d'autre part, le complexe reste stable vis-à-vis d'agents aussi dénaturants





- Figure 14 -

Profils d'élution de l'hydrolyse tryptique de la LTF. (a) sur colonne de Séphadex G75 dans  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,1M ; débit 5 ml/heure. (b) sur colonne de Bio-Gel P60 dans  $\text{CH}_3\text{COOH}$  10% (v:v) ; débit 3 ml/heure.

que la KCl, l'urée et l'éthanol, nous pouvons penser que des interactions hydrophobes interviennent dans la formation du complexe des fragments N-trp et C- trp.

## B. - Réassociation des lobes N- et C- terminaux de la lactotransferrine

### 1. Conditions pour une réassociation quantitative des 2 lobes

Une dénaturation importante de la lactotransferrine LTF-3 (voir p. 59 ) et des fragments N-trp et C-trp, traduite par leur insolubilisation partielle, fait suite au fonctionnement et surtout à la lyophilisation dans l'acide acétique de l'hydrolysate tryptique de la lactotransferrine.

Pour réduire cette dénaturation, nous avons remonté le pH des différentes fractions à 7,5 avec de la soude 3N juste après chromatographie sur la colonne de Bio-Gel P 60 dans l'acide acétique 10 % et nous avons dialysé ces fractions pendant 3 jours contre une solution  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,05M. Dans ces conditions, lors de la remontée du pH, on observe une resaturation en fer progressive de la lactotransferrine LTF-3 et des fragments N-trp et C-trp jusqu'à un taux en fer de 70 % de la capacité totale de fixation.

La fraction qui contient en mélange les fragments N-trp et C-trp (recoupement des pics des fractions N-trp et C-trp) donne dans ces conditions, après lyophilisation et chromatographie sur colonne de Sephadex G75 dans  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,1M, un seul pic majeur correspondant au complexe de 80.000 daltons reformé par les 2 fragments. Ce pic majeur est suivi d'un pic beaucoup moins important contenant le fragment N-trp ou le fragment C-trp qui n'a pu, fort probablement, s'associer faute d'un mélange strictement équimolaire des deux fragments. La réassociation se réalise quantitativement avec un rendement de près de 90 % (p:p).

Nous ne savons pas encore si la réassociation des deux fragments se produit en même temps que leur resaturation en fer ou lors de la dialyse.

### 2. Etude du comportement électrophorétique du complexe formé par les fragments N-trp et C-trp

Nous avons étudié le comportement électrophorétique du complexe reformé par les fragments N-trp et C-trp saturés en fer, par migration à 100 volts dans un gel de polyacrylamide réticulé à 5 % et dans un tampon à pH 8,0.

Nous avons comparé la migration du complexe avec celle de la lactotransferrine native saturée en fer et celle de la lactotransferrine dépourvue de ses trois résidus d'acides aminés (LTF - 3). Tandis que la lactotransferrine native ne migre pas et reste à l'endroit du dépôt, on observe une légère migration vers la cathode de la LTF - 3, probablement à cause de la disparition de ses deux résidus d'acides aminés basiques (2 arginines). Le complexe présente une migration tout à fait identique à celle de la LTF-3.

### 3. Etude par dichroïsme circulaire de la réassociation des 2 lobes

Après isolement des fragments N-trp et C-trp dépourvus de fer, nous les avons saturés en métal par le complexe NTA-Fe<sup>3+</sup> afin d'étudier, au moyen du dichroïsme circulaire, un changement éventuel de la structure secondaire lors de la réassociation. Nous avons également utilisé dans ces études, le fragment C-pepsique (C-pe) obtenu selon la méthode de *LINE et al.* (116) et qui correspond à la moitié C-terminale de la lactotransferrine humaine, ainsi que le glycopeptide N2 dont nous décrirons l'isolement et les propriétés ultérieurement. Ce glycopeptide N2 de 18.500 daltons correspond au domaine ND2 contenu dans le fragment N-trp (Fig. 18 , p. 92 ).

Pour les études par dichroïsme circulaire, chaque fraction protéique est dissoute dans NaF 0,214 M à une concentration voisine de 1mg/ml, déterminée par un dosage selon la méthode de *LOWRY*.

Un spectre dichroïque de 180 à 250 nm est enregistré pour chaque fragment avant de procéder à leur mélange dans des proportions équimolaires. Après 15 mn de mise en contact à température ambiante, on analyse le spectre dichroïque du mélange. L'informatisation du dichrographe permet le calcul et le tracé de la différence de spectre entre le spectre théorique calculé des deux fragments en mélange et le spectre réellement obtenu après la mise en contact des fragments (Spectre [Mél. théo. - Mél. exp.]). Elle permet aussi le tracé de la différence de spectre entre le spectre de la lactotransferrine et le spectre obtenu après la mise en contact des fragments (spectre [LTF - Mél. exp.]). Cette méthode permet de juger de l'évolution du taux de structures secondaires, entraînées par la réassociation des différents fragments N- et C- terminaux.

a) Etude de la réassociation des fragments N-trp et C-trp dépourvus de fer

La mise en contact du N-trp et du C-trp ne met en évidence aucune différence de spectre entre le spectre du mélange théorique calculé et le spectre du mélange expérimental ([Mél. théo. - Mél. exp.] = 0) indiquant aucune modification des structures secondaires (Fig. 15 , p. 74 ).

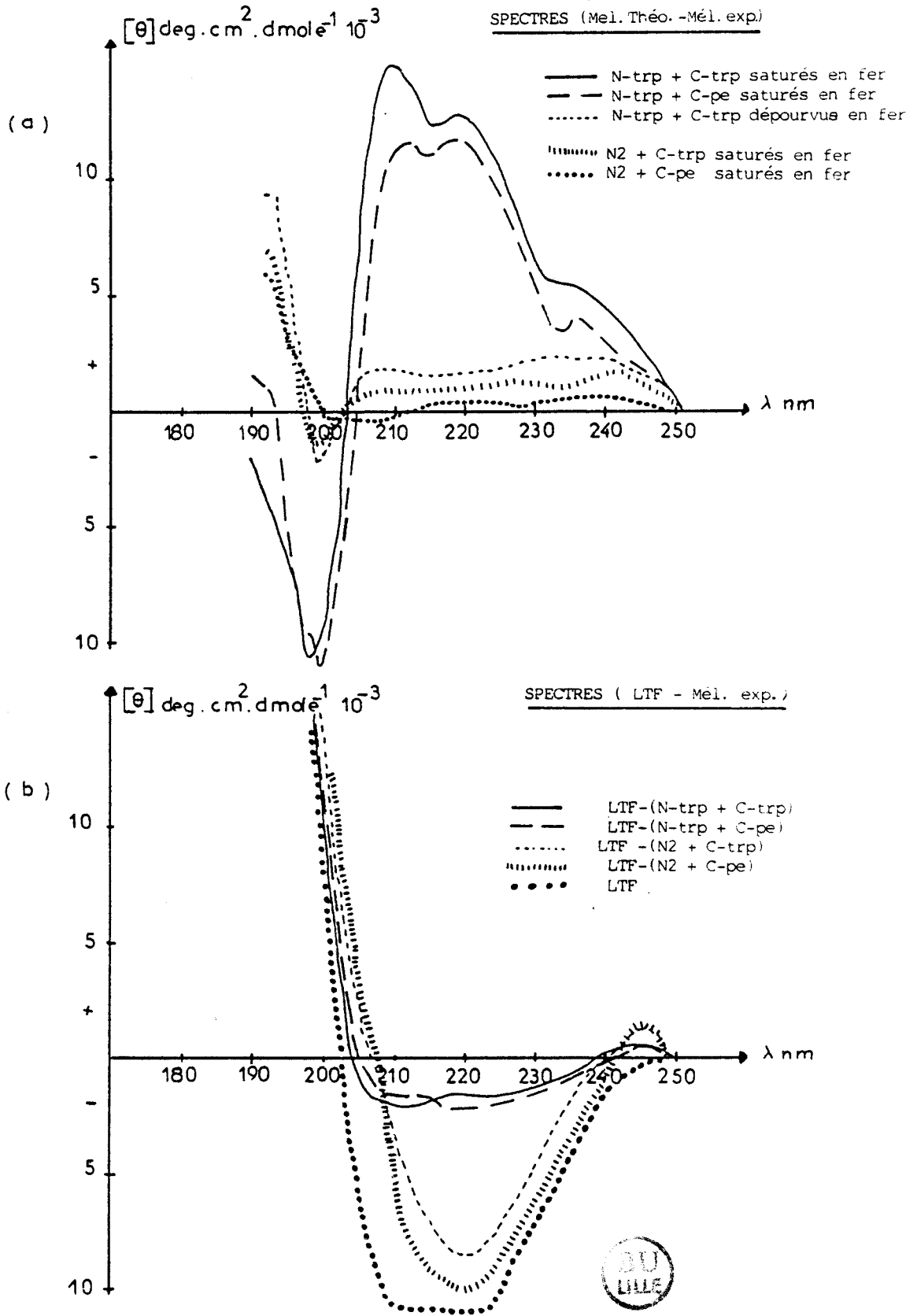
b) Etude de la réassociation des fragments N-trp et C-trp saturés en fer

Après 15 mn de mise en contact des fragments N-trp et C-trp saturés en fer, on enregistre un spectre [Mél. théo. - Mél. exp.] présentant deux bandes positives centrées à 210 et 220 nm ainsi qu'une large bande négative centrée à 198 nm (Fig. 15 , p. 74 ). Ce résultat se traduit essentiellement par un gain global de l'hélicité  $\alpha$  de l'ordre de 14 % par rapport à l'hélicité  $\alpha$  moyenne calculée pour le mélange des fragments. La bande négative centrée à 198 nm indique une perte du taux de structures organisées qui pourrait être en relation directe avec le gain en structures hélicoïdales.

Le spectre [LTF - Mél. exp.] montre, cependant, que toute l'hélicité  $\alpha$  de la lactotransferrine n'a pas été retrouvée par la mise en contact des fragments N-trp et C-trp, on ne retrouve que 88 % de l'hélicité  $\alpha$  totale de la lactotransferrine humaine.

c) Etude de la réassociation des fragments N-trp et C-pe saturés en fer

Le mélange des fragments N-trp et C-pe saturés en fer donne un spectre [Mél. théo. - Mél. exp.] voisin de celui enregistré pour le mélange des fragments N-trp et C-trp saturés en fer (Fig. 15 , p. 74 ). Cependant, l'intensité des bandes positives à 210 et 220 nm est moins importante et ne traduit qu'un gain global en hélicité  $\alpha$  de 10 %. De plus, une bande centrée à 215 nm indique un gain en structures en feuillets plissés  $\beta$ . Le spectre [LTF - Mél. exp.] montre que 84 % de l'hélicité  $\alpha$  totale de la lactotransferrine est ainsi retrouvée.



- Figure 15 -

Différences de spectres dichroïques enregistrées lors des essais de réassociation des fragments de la lactotransferrine humaine.

d) Etude de la réassociation des fragments N2 et (C-trp ou C-pe) saturés en fer

Lors du mélange du glycopeptide N2 avec, indifféremment, le C-trp saturé en fer ou le C-pe saturé en fer (Fig. 15 , p. 74 ), aucune différence de spectre [Mél. théo. - Mél. exp.] n'est enregistrée, signifiant qu'aucune modification sensible des structures secondaires n'a été induite par la mise en contact des fragments.

4. Etude par dichroïsme circulaire du complexe formé par les 2 lobes

La comparaison du spectre dichroïque de la lactotransferrine saturée en fer et de celui du complexe saturé à 70 % en fer, formé par les fragments N-trp et C-trp et repurifié par tamisage moléculaire, rend compte d'une exacte similitude dans les taux de structures en hélice  $\alpha$  (bandes 210 et 220 nm) (Fig. 16 , p. 76 ). En revanche, il faut remarquer un taux de structures en feuillets plissés légèrement inférieur dans le cas du complexe (creux accentué à 215 nm).

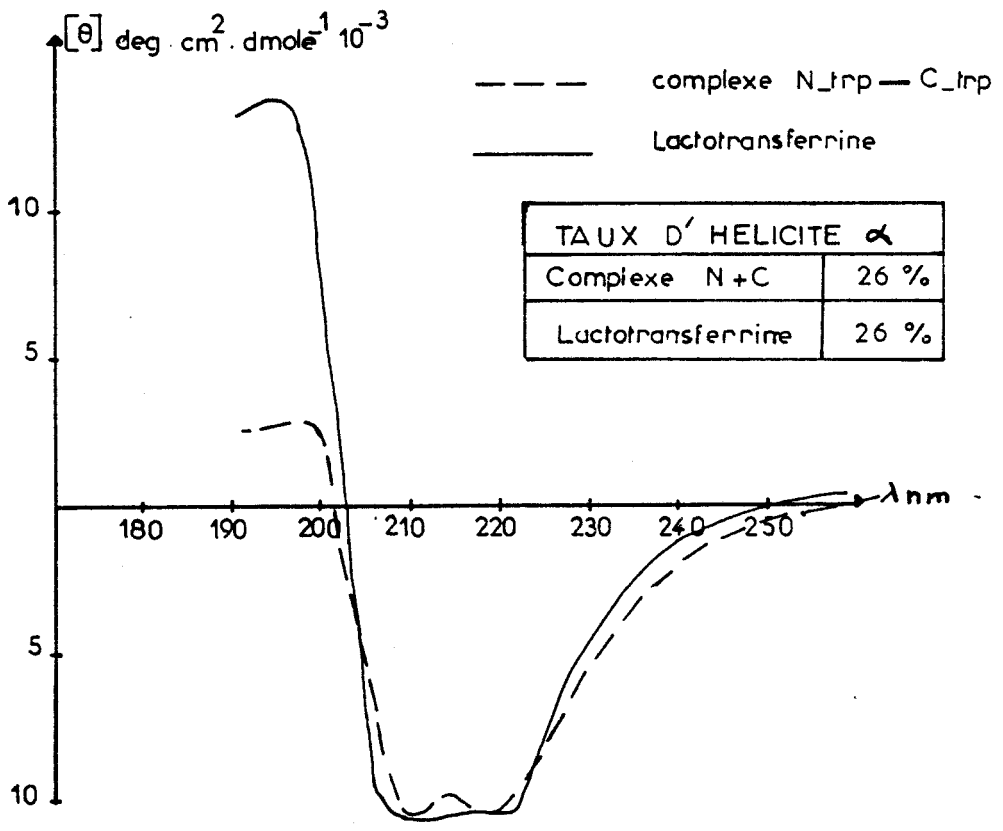
Ces résultats laissent penser que toute l'hélicité  $\alpha$  perdue par la dissociation des 2 lobes N- et C- terminaux (p. 77 ) a été recréée par réassociation de ces deux lobes.

5. Interprétations des résultats obtenus au cours des études par dichroïsme circulaire

a) Réversibilité des modifications structurales induites par la dissociation des fragments N-trp et C-trp

Nous avons montré que la dissociation des fragments N-trp et C-trp saturés en fer entraîne une perte globale du taux d'hélicité total de la lactotransferrine. En effet, le spectre calculé du mélange équimolaire des fragments N-trp et C-trp est de 26 % plus faible que celui de lactotransferrine (Fig. 15 , p. 74 ).

Le spectre dichroïque calculé du mélange équimolaire des fragments N-trp et C-trp saturés en fer présente un taux d'hélicité 26 % plus faible que celui de la lactotransferrine (Fig. 15 , p. 74 ). Cette perte globale



- Figure 16 -

Spectres dichroïques entre 180 et 250 nm de la lactotransferrine humaine et du complexe N-trp - C-trp saturés en fer.

d'hélicité des fragments N-trp et C-trp par rapport à celle de la lactotransferrine semble induite par la dissociation des 2 lobes.

L'étude du spectre dichroïque du complexe reformé par les fragments N-trp et C-trp saturés en fer montre un taux d'hélicité identique à celui de la lactotransferrine native (26 %), ce qui indique que toute l'hélicité  $\alpha$  perdue lors de la dissociation des fragments N-trp et C-trp a été recréée lors de leur réassociation.

Le fait de ne retrouver que 88 % de l'hélicité totale de la lactotransferrine saturée en fer après mise en contact des fragments N-trp et C-trp (p. 73) peut s'expliquer de 2 façons différentes. D'une part, il est probable que les conditions ioniques exigées pour les études par dichroïsme circulaire (NaF 0,214 M) ne soient pas optimales pour une bonne réassociation des 2 lobes. D'autre part, des traces de trypsine sont présentes dans la fraction contenant le N-trp et induisent une légère protéolyse aboutissant à une dénaturation partielle de ce fragment.

b) Localisation des structures secondaires modifiées lors de la réassociation des fragments N-trp et C-trp saturés en fer

Le tableau VII, p. 78, met en parallèle, pour chaque fragment protéique (lactotransferrine, N-trp, C-trp, C-pe, glycopeptide N2), les taux de structures hélicoïdales mesurés par dichroïsme circulaire et ceux déterminés par les méthodes de calcul statistique qui seront développées ultérieurement dans la partie "Etude théorique de la structure secondaire de la lactotransferrine humaine" (p. 116 à 122).

La prise en considération, dans les calculs des structures secondaires, de structures hélicoïdales dont la probabilité d'exister est faible, peut expliquer les taux calculés de structures hélicoïdales plus élevés que ceux mesurés par dichroïsme circulaire. Nous remarquerons que la lactotransferrine présente le moins de différence entre les taux mesurés et calculés (26 % et 30 %, respectivement), suivie du glycopeptide N2 (19,5 % et 24,5 %), du C-trp (21,5 % et 30 %) et du C-pe (25 % et 36 %). Le fragment N-trp possède, quant à lui, un taux de structures hélicoïdales mesuré deux fois moins élevé que le taux de structures hélicoïdales calculé (12 % au lieu de 25 %). Ceci semble indiquer que le fragment N-trp est le siège de la majorité des modifications des structures hélicoïdales induites par la dissociation et la réassociation des 2 lobes.



TABLEAU VII - COMPARAISON DES TAUX DE STRUCTURES HELICOIDALES  
MESURES ET CALCULES DE LA LACTOTRANSFERRINE ET  
DE SES FRAGMENTS TRYPTIQUES ET PEPSIQUE.

PROTEINE	TAUX D HELICITE MESURE (A)	TAUX D HELICITE CALCULE (B)
LACTOTRANSFERRINE	26 %	30 %
FRAGMENT N-TRP	12 %	25 %
FRAGMENT C-TRP	21,5 %	30 %
FRAGMENT C-PE	25 %	36 %
GLYCOPEPTIDE N2	19,5 %	24 %

(A) PAR DICHROISME CIRCULAIRE.

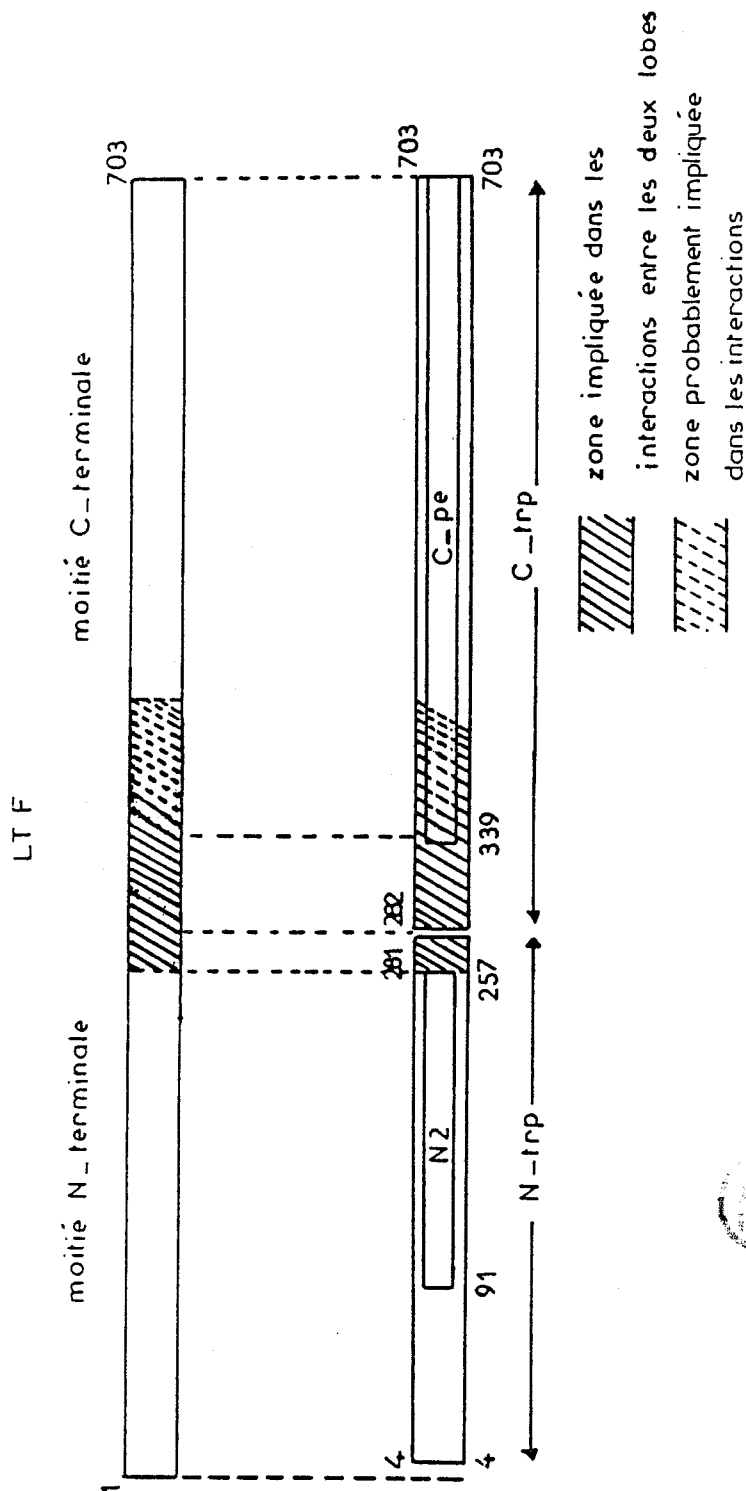
(B) PAR LA METHODE DE CALCUL DE GARNIER ET AL.(75)

c) Localisation de la zone des interactions entre les deux lobes

Sur la base du comportement électrophorétique des fragments N-trp et C-trp identique à celui de la lactotransferrine amputée de ses 3 premiers résidus d'acides aminés (LTF - 3), il est probable que peu de remaniements importants affectent la conformation du complexe par rapport à celle de la protéine native ; tout permet de penser que la zone de contact entre les deux fragments N-trp et C-trp est la même que celle qui existe entre les deux lobes reliés de manière covalente (zone inter-lobes). Nous avons montré que les modifications structurales induites par la réassociation sont plus faibles entre le N-trp et le C-pe qu'entre le N-trp et le C-trp, et nulles entre le glycopeptide N2 et les C-trp et C-pe. Nous en déduisons que, d'une part, la partie peptidique non commune entre les fragments C-trp et C-pe (résidus n° 282 à 338) doit participer partiellement à l'interaction puisque son absence dans le C-pe entraîne un moindre gain en hélicité  $\alpha$  et que d'autre part, les parties de la chaîne peptidique non communes entre le N-trp et le glycopeptide N2 (résidus n° 4 à 90 et n° 258 à 281) semblent indispensables à l'interaction puisque la mise en contact du glycopeptide N2 et des fragments C-trp et C-pe n'induit aucune modification des structures secondaires. En conclusion de toutes ces observations, nous proposons comme zone impliquée dans les interactions entre les lobes N- et C- terminaux, celle limitée au résidu n° 258 dans le domaine ND3 et limitée de manière encore indéterminée dans le lobe C-terminal de la lactotransferrine (Fig. 17 , p. 30 ).

C. - Conclusions

Le phénomène d'association non covalente des 2 lobes N- et C- terminaux de la lactotransferrine humaine a pu facilement être mis en évidence par la nécessité des conditions chromatographiques drastiques pour séparer les 2 fragments N-trp et C-trp après coupure tryptique de la molécule. L'étude de cette propriété, qui n' a été décrite pour aucune autre transferrine, a permis d'aboutir à quelques conclusions sur la nature des interactions, leur réversibilité, leur localisation et les contraintes structurales qu'elles engendrent.



- Figure 17 -

Localisation de la zone d'interactions entre les deux lobes  
N- et C- terminaux de la lactotransferrine humaine (LTF)

Nos travaux démontrent que :

- 1) Il existe de puissantes interactions entre les 2 lobes N- et C-terminaux constitués par les fragments N-trp et C-trp saturés en fer.
- 2) L'association non covalente des 2 lobes est réalisée essentiellement par des interactions de type hydrophobe.
- 3) L'association des 2 lobes est réversible.
- 4) La réassociation des fragments N-trp et C-trp saturés en fer ou N-trp et C-pe saturés en fer entraîne des modifications structurales qui se traduisent par une re-crédation de structures hélicoïdales surtout localisées dans le fragment N-trp.
- 5) La partie de la chaîne peptidique de la lactotransferrine impliquée dans les interactions entre les deux lobes est probablement située dans la zone "inter-lobes".
- 6) Les fragments N-trp et C-trp dépourvus de fer n'interagissent pas entre eux, ce qui était prévisible au vu de leur taux élevé en structures désorganisées.

L'isolement de ce complexe des fragments N-trp et C-trp saturés en fer, apparemment très proche de la lactotransferrine native sur le plan de la conformation, ouvre la voie à des investigations des rôles biologiques que ce complexe est susceptible de jouer en comparaison de ceux de la protéine native. Par exemple, dans l'intestin où la présence de trypsine rend très probable l'existence du complexe, il serait intéressant de vérifier si celui-ci ne joue pas un rôle particulier dans l'absorption du fer par l'entérocyte.

ISOLEMENT ET PROPRIETES D'UN GLYCOPEPTIDE DE  
18 KDa FIXANT LE FER OBTENU A PARTIR DU FRAGMENT  
N-TERMINAL DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

I. - CARACTERISATION ET LOCALISATION D'UN GLYCOPEPTIDE DE 18.500 DALTONS  
FIXATEUR DU FER

A. - Introduction

L'obtention des fragments N-trp et C-trp après hydrolyse tryptique de la lactotransferrine humaine, ainsi qu'elle a été décrite précédemment, a permis des investigations dans l'isolement de chaque lobe de la lactotransferrine. En effet, selon l'hypothèse de l'hexaplication d'un gène ancestral codant pour les transferrines (voir la partie "Généralités"), 3 domaines existent dans le lobe N-terminal : ND1, ND2 et ND3 ainsi que 3 autres dans le lobe C-terminal : CD1, CD2 et CD3. Dans le but d'isoler ces différents domaines, nous avons donc soumis les fragments N-trp et C-trp à de nouvelles coupures protéolytiques.

Des résultats intéressants ont été obtenus par protéolyse ménagée du fragment N-trp. Ils ont fait l'objet d'une publication, parue en 1984 dans la revue *Biochimica et Biophysica Acta* (volume 787, p. 90 à 96), que nous faisons figurer dans les pages suivantes.

BBA 31882

## CHARACTERIZATION AND LOCALIZATION OF AN IRON-BINDING 18-kDa GLYCOPEPTIDE ISOLATED FROM THE N-TERMINAL HALF OF HUMAN LACTOTRANSFERRIN

DOMINIQUE LEGRAND <sup>a</sup>, JOEL MAZURIER <sup>a</sup>, MARIE-HELENE METZ-BOUTIGUE <sup>b</sup>, JACQUELINE JOLLES <sup>b</sup>,  
PIERRE JOLLES <sup>b</sup>, JEAN MONTREUIL <sup>a</sup> and GENEVIEVE SPIK <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Chimie Biologique et Laboratoire Associé au C.N.R.S. No 217, Université des Sciences et Techniques de Lille I, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex and <sup>b</sup> Laboratoire des Protéines, Université de Paris V (C.N.R.S. E.R. No. 102 et I.N.S.E.R.M. U116), 45 rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cédex 06 (France)

(Received November 7th, 1983)

*Key words:* Iron-binding site; Partial proteolysis; Lactotransferrin; Lactoferrin; (Human)

Mild treatment of iron-saturated human lactotransferrin by trypsin at pH 8.2 cleaves the molecule into a N-tryptic ( $M_r = 30\,000$ ) and a C-tryptic ( $M_r = 50\,000$ ) fragment, which have been isolated. Each of them carries a glycan moiety and keeps the property to bind reversibly one  $Fe^{3+}$ . The N-tryptic fragment has been submitted to a second tryptic digestion which led to an iron-binding glycopeptide fragment with a molecular weight of about 18500. This fragment, the smallest iron-binding peptide isolated up to now from a transferrin, includes the ND2 domain of human lactotransferrin.

### Introduction

Human lactotransferrin [1,2], also called lactoferrin, is an iron-binding glycoprotein of the transferrin class, which is found in most mammalian tissues and secretions. It consists of a single polypeptide chain [3,4] to which two glycans are attached through a N-glycosidic linkage [5]. Human lactotransferrin, like all transferrins, is able to bind specifically and reversibly two  $Fe^{3+}$  ions with the fixation of two molecules of bicarbonate. Up to now, 75% of its amino acid sequence has been described [6,7]. Lactotransferrin presents internal sequence homologies [8-10] which suggest that, as in the case of serotransferrin [11] and of ovotransferrin [12,13], the polypeptide chain is organized into two lobes (or half-parts). The existence of these lobes has been confirmed by crystallographic data [14]. One glycan and one metal-

binding site are located on each lobe [10]. Attempts to isolate the two lobes and study their physicochemical and biological properties have been performed by many authors using proteinases: on hen ovotransferrin [15,16], human lactotransferrin [17,18], bovine serotransferrin [19], human serotransferrin [20-22] and rabbit serotransferrin [23]. Each lobe was obtained in an iron-saturated form from monoferric transferrins carrying the metal either on the N-terminal or the C-terminal binding site, after complete enzymatic digestion of the iron-free half-molecule. Only in the case of bovine serotransferrin were the two lobes obtained by proteolysis of a diferric molecule.

Concerning human lactotransferrin, Line et al. [17] have isolated an iron-binding fragment with a molecular weight of 39500 by peptic digestion. This fragment was shown to represent the C-terminal half of the protein [18]. Two iron-binding fragments of the same molecular weight, around 40000, were obtained by tryptic and chymotryptic

\* To whom correspondence should be addressed.

digestions under denaturing conditions and found to be immunologically distinct [18]. The two fragments which differ by their charge, were obtained with very low yields: 1% for the basic N-terminal fragment and 3% for the acidic C-terminal fragment. Moreover, no further physicochemical properties of these fragments have been investigated. In order to increase the yield and to isolate smaller peptides which may correspond to one of the six hypothetical domains present in transferrins [6,10], partial proteolytic hydrolysis was attempted on iron-saturated lactotransferrin.

This paper describes the preparation of two fragments, with molecular weights of 30 000 and 50 000, obtained simultaneously by tryptic digestion of diferric human lactotransferrin. These fragments correspond to large fragments of the N- and C-tryptic parts of the protein, respectively, and they reversibly bind one atom of iron. A second tryptic digestion performed on the purified N-tryptic fragment gives rise to an iron-binding glycopeptide (N2-glycopeptide) with a molecular weight of about 18 500, identified to be in the N-terminal iron-binding domain of lactotransferrin. These results have been preliminarily reported by Spik et al. [24].

## Materials and Methods

Pure human lactotransferrin was obtained according to Spik et al. [25] and the iron-saturated protein as described by Azari and Baugh [26]. It was homogeneous as demonstrated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and by immunoelectrophoresis.

Trypsin was purchased from Worthington Biochemical Corporation (Freehold, NJ, U.S.A.). PD-10 column was obtained from Pharmacia Chemicals (Uppsala, Sweden). Bio-Gel P-60 and P-30 were from Bio-Rad (Richmond, CA, U.S.A.), and nitrilotriacetic acid from Carlo Erba, (Divisione Chemica Industriale, Milan, Italy). All other chemicals were analytical grade. The reagents employed for the Sequencer were obtained from Pierce or S.D.S. (Marseilles).

*Limited proteolytic cleavage of the iron-saturated lactotransferrin and of the N-tryptic fragment. Isolation of the tryptic fragment.* A 1% solution (w/v) of diferric human lactotransferrin in 0.1 M Tris-HCl

buffer (pH 8.2)/0.025 M CaCl<sub>2</sub> was digested with trypsin (enzyme/substrate ratio: 1:50 by weight). The reaction was carried out at 37°C for 4 h. The diferric lactotransferrin tryptic digest was chromatographed on Bio-Gel P-60 in 10% (v/v) acetic acid.

Digestion of 1% (w/v) of the N-terminal fragment of lactotransferrin was performed in 0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (pH 7.8) at 37°C for 3 h with trypsin (enzyme/substrate ratio, 1:50 by weight). The tryptic digest of the N-tryptic fragment of lactotransferrin was submitted to a chromatography on Bio-Gel P-30 in a solution of 0.05 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>.

*Molecular weight determination.* Samples of the first and second digests containing 10 µg of protein were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis as described by Neville [27]. The molecular weights of lactotransferrin and its proteolytic fragments were measured by electrophoresis in 10% or 15% polyacrylamide gel containing 1% sodium dodecyl sulfate in the presence or absence of 1% (w/v) 2-mercaptoethanol. Bovine serum albumin, ovalbumin, chymotrypsinogen A and ribonuclease were used as markers. Protein fragments were stained with Amido black.

*Monosaccharide analysis.* Monosaccharide composition was determined by gas-liquid chromatography after methanolysis and trifluoroacetylation [28]. All calculations were made on the basis of three mannose residues per glycan.

*N-terminal sequence determination.* The N-terminal amino acid residues of the tryptic fragments were identified by the dansylation procedure [29] or by automated degradation in a Beckman Sequencer 890 C as described by Metz-Boutigue et al. [6].

*Immunological study of the fragments.* The antiserum used for the immunological study was raised in a rabbit by intradermal injections of intact iron-saturated lactotransferrin with complete Freund's adjuvant [30]. The antiserum was devoid of precipitating activities against milk or serum proteins other than lactotransferrin. The fragments were studied by double diffusion in agarose gel [31] with a rabbit antiserum against the whole lactotransferrin.

*Iron-binding capacity analysis.* The progressive saturation of the fragments was performed by

adding small amounts of iron under the form of a monoferrinitrilotriacetate complex [32]. The protein solutions of each fragment at a concentration of about 0.06 mM were adjusted to a final pH of 6.8 in 0.1 M Tris-HCl buffer/0.1 M NaHCO<sub>3</sub>. Saturation of fragments was monitored at 465 nm. Absorbances were read 15 min after each addition of metal. This short incubation time was sufficient, since no more modifications were observed 12 h after the addition of metal.

The estimation of iron content was performed by the bathophenanthroline method (Biotrol, France) and protein concentration was measured spectrophotometrically according to Lowry et al. [33].

**Spectral properties analysis.** The absorbance spectra were recorded with the Cary model 219 recording spectrophotometer. The circular dichroism spectra were obtained with a Jobin-Yvon Dichrograph R.J. Mark III at an absorbance less than 1.5 absorbance unit. For all calculations a mean amino acid residue weight of 112 was used. The electron paramagnetic resonance spectra were recorded at liquid nitrogen temperature using a Varian 4502 spectrometer operating at 9.30 GHz with a 100 kHz modulation amplitude of 5–10 G at power levels below saturation. The magnetic field strength was monitored with a Varian F-8A flux-meter and the frequency measured with a Sivers Lab. frequency meter which was calibrated using the diphenylpicryl hydrazine *g* value.

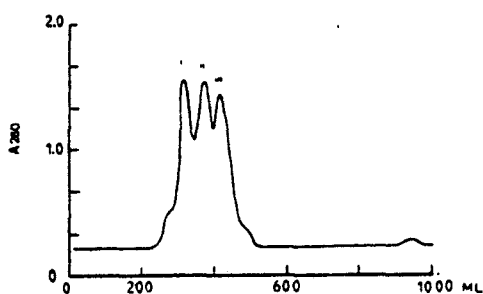


Fig. 1. Gel filtration pattern of the iron-saturated lactotransferrin tryptic digest on column (6 × 150 cm) of Bio-Gel P-60 in 10% (v/v) acetic acid. Volume of collected fractions: 15 ml. I, fragment of  $M_r$  80000; II, C-tryptic fragment ( $M_r$  50000); III, N-tryptic fragment (30000).

## Results

### Preparation of the N- and C-tryptic fragments of iron-saturated lactotransferrin

300 mg of diferric lactotransferrin were digested by trypsin as described in Materials and Methods. The elution profile of the enzyme-treated iron-saturated lactotransferrin on Bio-Gel P-60 in 10% (v/v) acetic acid showed three peaks (Fig. 1). These three fractions (I, II, III) contained carbohydrate as shown by the phenol/sulfuric reagent [34] and were obtained with a yield of 43%, 33% and 20%, respectively. After rechromatography under similar conditions, the fragments were homogeneous as demonstrated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Fig. 2): fractions I, II and III corresponded to about 80000, 50000 and 30000 molecular weight fragments, respectively. No change in the molecular weight of

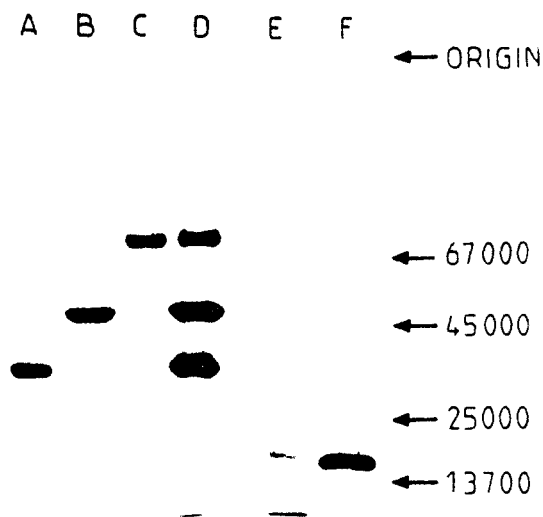


Fig. 2. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions of iron-saturated human lactotransferrin and of the tryptic fragments isolated by chromatography on Bio-Gel P-60 (see Fig. 1). Lane A, fragment III (N-tryptic fragment),  $M_r$  = 30000; lane B, fragment II (C-tryptic fragment),  $M_r$  = 50000; lane C, fragment I,  $M_r$  = 80000; lane D, tryptic digest of human lactotransferrin; lane E, tryptic digest of the N-tryptic fragment; lane F, N2-glycopeptide,  $M_r$  = 18500. Arrows indicate the approximate positions of molecular weight markers.



the fragments was observed by gel electrophoresis performed under reducing conditions, suggesting the monocatenarity of each fragment.

*Characterization of N- and C-tryptic fragments of lactotransferrin*

*N-terminal sequence of the fragments.* By automated Edman degradation, the following sequences of the tryptic fragments were determined: Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp- for the two fragments with molecular weights of about 30 000 and 80 000 and Ser-Pro-Lys-Phe- for the fragment with a molecular weight of about 50 000. The first sequence was identified to the N-terminal sequence of lactotransferrin devoid of its three first amino acid residues [6]. The second sequence begins around amino-acid residue No. 280 (unpublished results). These results suggested that the tryptic fragment with a molecular weight of about 30 000 and that of about 50 000 were located in the N-terminal and C-terminal parts of human lactotransferrin, respectively.

*Immunological studies of the fragments.* The fragments were studied by double diffusion in agarose gel with a rabbit antiserum raised against whole human lactotransferrin. We used as reference the peptic fragment obtained by Line's method [17] and localized on the basis of its amino-acid sequence in the C-terminal half of lactotransferrin [6]. As shown in Fig. 3, the N-tryptic fragment had no common antigenic determinant with the C-terminal peptic fragment or with the C-tryptic fragment. Both C-terminal

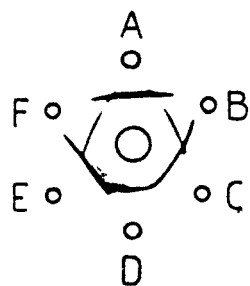


Fig. 3. Ouchterlony double-diffusion analysis of human lactotransferrin and of its tryptic fragments. Wells A and D, C-terminal peptic fragment; wells B and F, N-tryptic fragment; well C, C-tryptic fragment; well E, native human lactotransferrin; central well, anti-human lactotransferrin antiserum.

peptic and tryptic fragments were immunologically identical and had a partial immunological identity with whole lactotransferrin. The immunological studies are in favor of a location of the N- and C-tryptic fragments in the N- and C-terminal parts of human lactotransferrin, respectively. However, they do not exclude the possibility of the presence of some material derived from the N-terminal half of the protein in the C-tryptic fragment.

*Iron-binding capacity of the fragments.* No change in the visible absorption spectrum of the protein solution was noted before and after tryptic digestion. Therefore, no iron removal seemed to occur during digestion. It was obvious that drastic conditions such as 10% (v/v) acetic acid used to prepare tryptic fragments were sufficient for a total removal of iron from these fragments. In fact, an iron titration of the pure fragments showed a metal content of 0.056 and 0.13  $Fe^{3+}$ /mol of the N-tryptic and C-tryptic fragments, respectively.

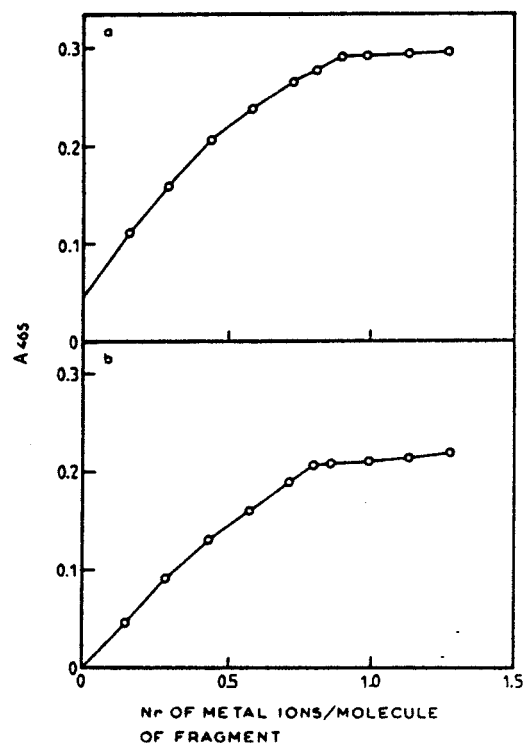


Fig. 4. Titration of (a) N- and (b) C-tryptic fragments of lactotransferrin with ferric mononitritotriacetate monitored at 465 nm.

94

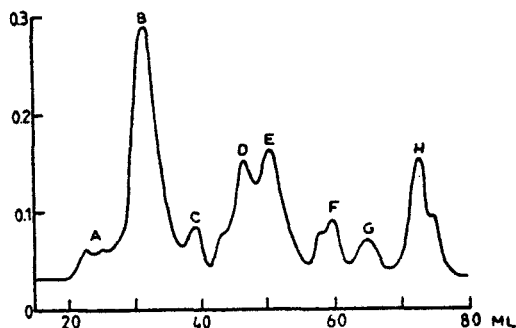


Fig. 5. Gel filtration pattern on Bio-Gel P-30 columns (2x100 cm) in 0.05 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> of the N-tryptic fragment digested by trypsin. Volume of collected fractions, 1 ml.

The progressive saturation of the fragments was performed with increasing amounts of ferric nitriacetate (Fig. 4). The visible absorption spectra of fragments, monitored from 300 to 700 nm showed a broad band centered at 465 nm. The progressive saturation was monitored at this wavelength. At 465 nm,  $E_{1p100}^{1cm} = 0.41$  and  $E_{1p100}^{1cm} = 0.30$  were obtained with 0.8 and 0.9 Fe<sup>3+</sup>/mol of N- and C-terminal fragments, respectively. Therefore, each fragment reversibly binds one ferric ion.

*Preparation of the lactotransferrin N2-glycopeptide*

A tryptic digestion of 40 mg of the N-tryptic fragment according to Materials and Methods was performed. The digest was directly fractionated on a Bio-Gel P-30 column in 0.05 M NaHCO<sub>3</sub>. The gel-filtration pattern showed eight peaks (Fig. 5). Polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate with or without 2-mercaptoethanol showed that peak A represented undigested N-

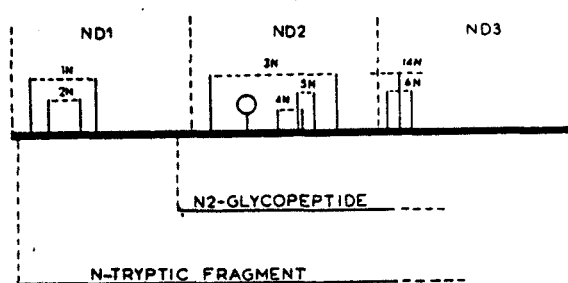


Fig. 6. Localization of the tryptic fragment and the N2-glycopeptide in the human lactotransferrin N-terminal moiety. Disulfide bridges are reported as described by Mazurier et al. [10]. Glycan is represented by a circle.

tryptic fragment. Peaks C to H were low-molecular-weight glycopeptides and peptides and were not further studied. Peak B was yellow in color and contained carbohydrates as determined by the phenol/sulfuric reagent [34]. Electrophoresis of peak B revealed only one strip (Fig. 2). The yield of the glycopeptide contained in peak B was around 4%.

*Characterization of the lactotransferrin N2-glycopeptide*

*Molecular weight of the N2-glycopeptide.* 15% polyacrylamide-gel electrophoresis of the N2-glycopeptide gave a molecular weight of about 18 500. No change in molecular weight of the glycopeptide was observed in reducing conditions, suggesting that this glycopeptide consisted of a single polypeptide chain.

*Monosaccharide composition.* The centesimal and molar carbohydrate compositions of human lactotransferrin and of the N2-glycopeptide are

TABLE I

CARBOHYDRATE COMPOSITION OF HUMAN LACTOTRANSFERRIN AND OF THE DERIVED N2-GLYCOPEPTIDE

The molar carbohydrate composition was calculated on the basis of 80000 and 18500 molecular weights for the lactotransferrin and N2-glycopeptide, respectively.

Monosaccharide	Human lactotransferrin		N2-glycopeptide	
	%	Molar	%	Molar
N-Acetylneuraminic acid	0.9	2.3	1.3	0.8
Galactose	0.9	4.2	2.0	2.1
Mannose	1.3	6	2.9	3.0
Fucose	0.5	2.2	1.1	1.3
N-Acetylglucosamine	2.3	8.3	4.9	4.1
Total	5.9		12.2	

reported in Table I. These results show that the N2-glycopeptide contains only one glycan instead of two in the native human lactotransferrin.

*Localization of the N2-glycopeptide on the peptide chain of lactotransferrin.* The N-terminal amino acid sequence of the N2-glycopeptide was established as Thr-His-Tyr-Tyr-Ala-Val- indicating that the glycopeptide begins at the end of the ND1 domain [10] as shown in Fig. 6 and according to its molecular weight, includes domain ND2.

*Spectral properties of the N2-glycopeptide.* The visible absorption of the N2 iron-containing glycopeptide was dominated by an intense absorption band; however, compared to the diferric human lactotransferrin, the maximal wavelength measured was shifted of 35 nm from 465 nm to 430 nm. The 430 nm absorption band was optically active, since the visible circular dichroism spectrum showed an intense negative dichroic band centered at 430 nm with a  $\theta$  value of 12. The N2 iron-containing glycopeptide exhibited an electron paramagnetic resonance with a large resonance around 1500 G ( $g = 4$ ) and a minor peak at 720 G. This spectrum which was found in all the ferric transferrins is characteristic of rhombic high-spin ferric complexes.

*Iron-binding capacity of the N2-glycopeptide.* An iron titration of the N2-glycopeptide by the bathophenanthroline method gives a value of 0.42  $\text{Fe}^{3+}/\text{mol}$  of the fragment and consequently a 45% iron recovery in the glycopeptide obtained with a 4% yield.

After removal of the iron by treatment with 2% (v/v) formic acid for 6 h and elimination of the salts by gel filtration on a PD-10 column, in 0.05 M  $\text{NaHCO}_3$ , all attempts at a progressive saturation with a monoferrinitrioloacetate complex as described under Materials and Methods and monitoring at 465 nm or by difference spectrometry at 245 nm [35] have failed.

## Discussion

In the present paper, we described the preparation in good yield of two iron-binding fragments corresponding to the N- and C-terminal parts of human lactotransferrin. These fragments are simultaneously obtained by mild tryptic digestion of diferric lactotransferrin. The absence in the

tryptic digest of long peptides other than the above mentioned two fragments suggests an important trypsin-sensitive site in human lactotransferrin, as in human serotransferrin [20] and bovine serotransferrin [19]. This trypsin-sensitive site is not located between the two lobes, but about amino acid residue No. 280 in the N-terminal moiety. The fragments, obtained in the iron-free form after chromatography in acetic acid, were shown to bind reversibly one ion of metal and will allow further investigation of their biological roles. It was interesting to note that the N- and C-terminal fragments still contained 0.056 and 0.13  $\text{Fe}^{3+}/\text{mol}$  respectively after chromatography in acetic acid. This result was in agreement with their relative stability toward pH, the C-terminal iron-binding site being more stable at low pH than the N-terminal one [36].

In the present work, we have also isolated an iron-containing N-tryptic glycopeptide with a molecular weight of about 18 500. The magnetic environments of the  $\text{Fe}^{3+}$  ions bound either by the glycopeptide or lactotransferrin were identical as suggested by electron paramagnetic resonance.

The blue-shift from 465 nm to 430 nm of the maximal wavelength of the LMCT (ligand metal to charge transfer transition) could be interpreted as proposed by Tsao et al. [37] about a CNBr-fragment from hen ovotransferrin as an indication "that the iron-protein chelate structure of this fragment must be quite different than that of the native protein". All characteristics of the N2-glycopeptide such as the presence of a single chain, one glycan, the N-terminal sequence, a molecular weight of about 18 500 and the iron-containing property allowed us to locate it on the lactotransferrin chain including the ND2 domain as shown in Fig. 6. This fragment is still able to bind iron, but not reversibly.

## Acknowledgments

This investigation was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (Laboratoire Associé No. 217: Relations structure-fonction des constituants membranaires and Equipe de Recherche No. 102 CNRS) and by the INSERM (Unité U116). The authors are indebted to Dr J.M. Lhoste who performed the electron

paramagnetic resonance measurements, to Drs M.H. Loucheux and J.P. Aubert for circular dichroism analysis and to J.P. Decottignies for skilful technical assistance.

### References

- 1 Montreuil, J. and Mullet, S. (1960) *C.R. Acad. Sci.* 250, 1736-1737
- 2 Montreuil, J., Tonnelat, J. and Mullet, S. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 45, 413-421
- 3 Querinjean, P., Masson, P.L. and Heremans, J.F. (1971) *Eur. J. Biochem.* 20, 420-425
- 4 Léger, D., Verbert, A., Loucheux, M.H. and Spik, G. (1977) *Ann. Biol. Anim. Bioph. Biophys.* 17(5-A), 737-747
- 5 Spik, G., Vandersyppe, R., Montreuil, J., Tetaert, D. and Han, K.K. (1974) *FEBS Lett.* 38, 213-216
- 6 Metz-Boutigue, M.H., Mazurier, J., Jollès, J., Spik, G., Montreuil, J. and Jollès, P. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 670, 243-254
- 7 Metz-Boutigue, M.H., Jollès, J., Mazurier, J., Spik, G., Montreuil, J. and Jollès, P. (1982) *FEBS Lett.* 142, 107-110
- 8 Metz-Boutigue, M.H., Jollès, J., Mazurier, J., Spik, G., Montreuil, J. and Jollès, P. (1978) *Biochimie* 60, 557-561
- 9 Abernethy, J.L., De Preter, J. and Prieels, J.P. (1980) *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 88, 1B12-1B13
- 10 Mazurier, J., Metz-Boutigue, M.H., Jollès, J., Spik, G., Montreuil, J. and Jollès, P. (1983) *Experientia* 39, 135-141
- 11 Mac Gillivray, 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 & Stratton, New-York
- 12 Jeltsch, J.M. and Chambon, P. (1982) *Eur. J. Biochem.* 122, 291-295
- 13 Williams, J., Elleman, T.C., Kingston, I.B., Wilkins, A.G. and Kuhn, K.A. (1982) *Eur. J. Biochem.* 122, 297-303
- 14 Gorinsky, B., Horsbargh, C., Lindley, P.F., Moss, D.S., Parkar, M. and Watson, J.L. (1979) *Nature (London)* 281, 157-158
- 15 Williams, J. (1974) *Biochem. J.* 141, 745-752
- 16 Williams, J. (1975) *Biochem. J.* 149, 237-244
- 17 Line, W.F., Sly, A.D. and Bezkorovainy, A. (1976) *Int. J. Biochem.* 7, 203-208
- 18 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
- 19 Brock, J.H. and Arzabe, F.R. (1976) *FEBS Lett.* 69, 63-66
- 20 Evans, R.W. and Williams, J. (1978) *Biochem. J.* 173, 543-552
- 21 Lineback-Zins, J. and Brew, K. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 708-713
- 22 Esparza, I. and Brock, J.H. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 622, 297-307
- 23 Heaphy, S. and Williams, J. (1982) *Biochem. J.* 205, 611-617
- 24 Spik, G., Mazurier, J., Legrand, D., Debryne, V. and Montreuil, J. (1983) in *Structure and Function of Iron Storage and Transport Proteins* (Urushizaki, I., Aisen, P., Listowski, I. and Drysdale, J.W., eds.), pp. 223-230, Elsevier, Amsterdam
- 25 Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dorland, L., Van Halbeek, H. and Vliegthart, J.F.G. (1982) *Eur. J. Biochem.* 121, 413-419
- 26 Azari, P.R. and Baugh, R.F. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* 118, 138-144
- 27 Neville, D.M. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 6328-6334
- 28 Zanetta, J.P., Breckenbridge, W.C. and Vincendon, G. (1972) *J. Chromatogr.* 69, 291-304
- 29 Hartley, R. (1970) *Biochem. J.* 119, 805-822
- 30 Vaitukaitis, J., Robbins, J.B., Nieschlay, E. and Ross, G.T. (1971) *J. Clin. Endocrinol.* 33, 988-991
- 31 Ouchterlony, Ö. (1949) *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 26, 507
- 32 Woodworth, R.C. (1966) *Protides Biol. Fluids* 14, 37-44
- 33 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- 34 Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) *Anal. Chem.* 28, 350-356
- 35 Teuwissen, B., Masson, P.L., Osinski, P.A. and Heremans, J.F. (1972) *Eur. J. Biochem.* 31, 239-245
- 36 Mazurier, J. and Spik, G. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 629, 399-408
- 37 Tsao, D., Azari, P. and Phillips, J.L. (1974) *Biochemistry* 13, 397-402

## B. - Conclusions

Nos travaux décrivent l'isolement et la caractérisation d'un glycopeptide de 18.500 daltons de masse moléculaire, obtenu après hydrolyse tryptique ménagée du fragment N-trp. Ce glycopeptide, appelé glycopeptide N2, est encore capable de fixer un ion ferrique mais apparemment, il ne le fixe pas réversiblement.

La localisation du glycopeptide N2 sur la chaîne peptidique de la lactotransferrine humaine l'identifie au domaine ND2 contenant le site de fixation du fer.

Ce fragment constitue le plus petit peptide fixant le fer isolé d'une transferrine.

Les principales propriétés physico-chimiques du glycopeptide N2, dont quelques unes sont déjà décrites dans l'article, sont exposées en détail dans les pages suivantes.

## II. - PRINCIPALES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU GLYCOPEPTIDE N2

### A. - Comportement électrophorétique du glycopeptide N2

L'électrophorèse à pH 8,0 en gel de polyacrylamide réticulé à 5 %, sous une tension de 100 volts et pendant 4 heures, montre une migration du glycopeptide N2 vers la cathode, plus rapide encore que celle du fragment N-trp. Le glycopeptide N2 se caractérise donc par un pHI plus acide que celui du lobe N-terminal.

Ce phénomène peut être expliqué par la disparition, dans le glycopeptide N2, des deux résidus d'arginine N-terminaux du fragment N-trp (résidus n° 3 et 4) (Fig. 11, p.58) ainsi que cela est confirmé dans le paragraphe suivant. En effet, nous avons pu constater que la coupure tryptique des trois premiers résidus d'acides aminés de la lactotransferrine humaine (LTF-3) : Gly, Arg et Arg, entraîne une différence sensible de la migration électrophorétique de la LTF-3 par rapport à celle de la lactotransferrine native ; l'absence des résidus d'arginine n° 3 et 4 est donc susceptible d'entraîner, elle aussi, un comportement plus acide du glycopeptide N2 par rapport à celui du fragment N-trp. De plus, il peut se produire dans le glycopeptide N2 une externalisation de certaines zones à caractère acide, masquées dans le

cas du fragment N-trp.

## B. - Composition en acides aminés et masse moléculaire du glycopeptide N2

La connaissance de la séquence primaire complète de la lactotransferrine humaine (METZ-BOUTIGUE *et al.* (147)) permet maintenant de localiser précisément le glycopeptide N2. La séquence N-terminale, déterminée au séquenceur automatique, est la suivante : Thr -His -(Tyr)<sub>2</sub>- Ala - Val - ; le premier résidu d'acide aminé correspond au résidu n° 91 (Fig. 1 , p.10 ). L'utilisation des carboxypeptidases A et B a permis de déterminer l'enchaînement C-terminal du glycopeptide N2 : Val - Val - Ala - Arg ; le dernier acide aminé correspond au résidu n° 257 (Fig. 1 , p. 10 ). La figure 18 , p. 92 , situe la position du glycopeptide N2 dans la chaîne peptidique de la lactotransferrine humaine.

Dans l'article présenté aux pages 83 à 89 , nous attribuons au glycopeptide N2 une masse moléculaire de 18.500 daltons. La connaissance de la séquence primaire de la lactotransferrine et la parfaite localisation du glycopeptide N2 sur la chaîne peptidique (du résidu n° 91 au résidu n° 257) permettent d'en donner la composition en acides aminés (Tableau VIII, p. 93 ) et d'en calculer la masse moléculaire exacte soit 18.335 daltons sans tenir compte de la masse moléculaire du glycanne.

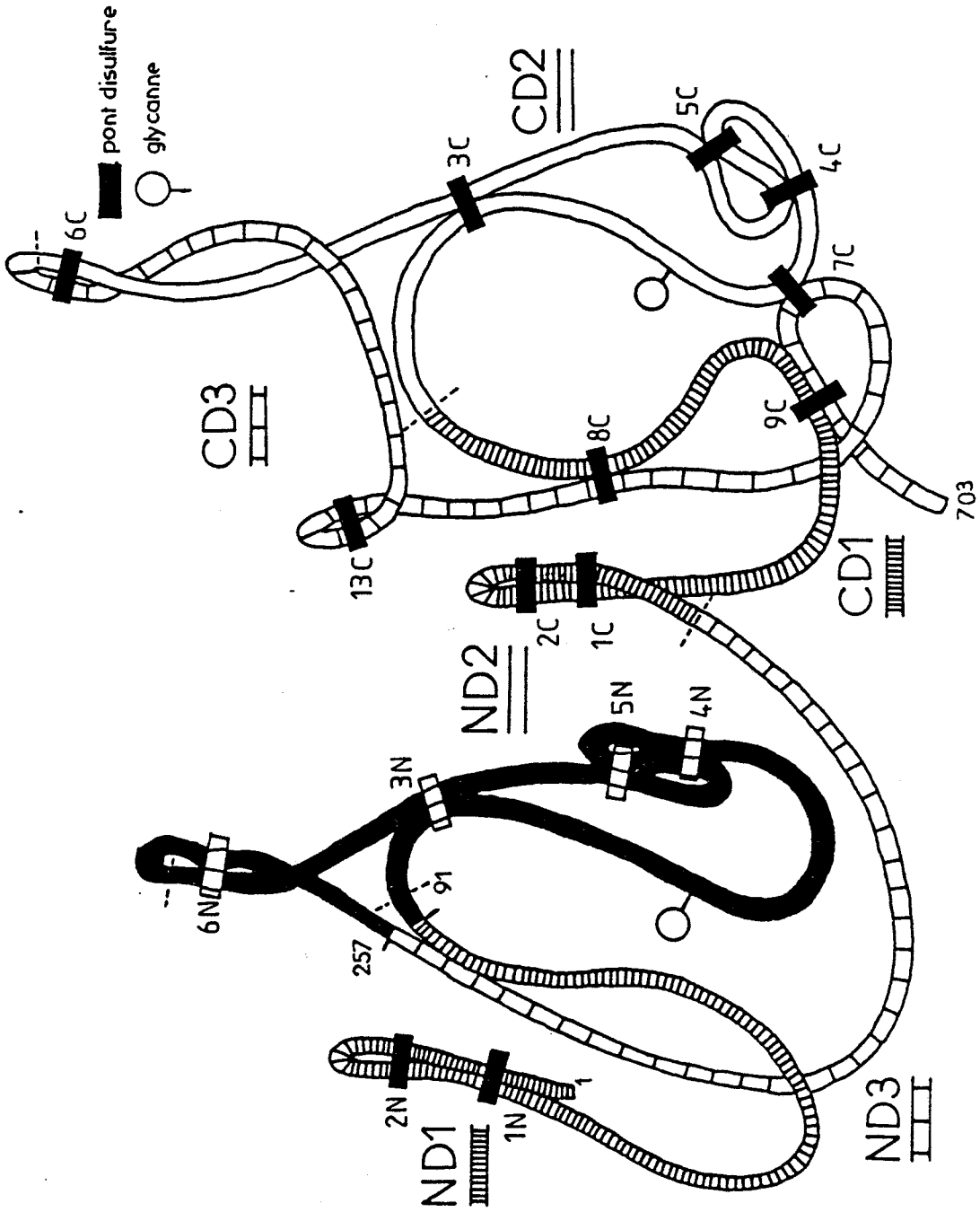
## C. - Composition centésimale et molaire en oses du glycopeptide N2

La composition centésimale et molaire en oses du glycopeptide N2 est reportée dans le tableau IX , p. 94 . Ainsi que nous le constatons, cette composition est identique à celle du fragment N-trp, elle est caractéristique d'un glycanne N-acétyl lactosaminique de la lactotransferrine humaine.

## D. - Fixation du fer par le glycopeptide N2

### 1. Propriétés du complexe glycopeptide N2 - Fe<sup>3+</sup>

Le glycopeptide N2 est obtenu saturé en fer après hydrolyse tryptique du fragment N-trp théoriquement dépourvu de fer, (désaturé en fer par l'acide acétique 10 % (v:v)). Ainsi que nous l'exposons dans l'article, pages 83 à



- Figure 18 -

Localisation du glycopeptide N2 sur la chaîne peptidique de la lactotransferrine humaine.

TABLEAU VIII

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES ET MASSES MOLECULAIRES  
CALCULEES DE LA LACTOTRANSFERRINE ET DU GLYCOPEPTIDE N2

Acides aminés	Lactotransferrine humaine	Glycopeptide N2
Gln	28	3
Trp	11	2
Glu	42	11
Arg	46	10
Thr	31	8
Tyr	20	4
Ile	16	3
Pro	34	11
Ala	63	16
Ser	50	10
Asp	38	9
Phe	32	11
Gly	56	14
His	9	4
Lys	46	11
Leu	61	14
Cys	32	8
Val	49	12
Asn	33	6
Mét	6	0
Nombre de résidus	703	167
Masse moléculaire	77646	18335



TABLEAU IX - COMPOSITIONS CENTESIMALES ET MOLAIRES EN OSES DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE ET DU GLYCOPEPTIDE N2.

OSES	LACTOTRANSFERRINE HUMAINE		GLYCOPEPTIDE N2	
	%	MOLES/MOLE DE PROTEINE	%	MOLES/MOLE DE PROTEINE
NEU AC	0,9	2,3	1,3	0,8
GAL	0,9	4,2	2,0	2,1
MAN	1,3	6,0	2,9	3,0
GLC NAC	2,3	8,3	4,9	4,1
FUC	0,5	2,2	1,1	1,3

89 , 0,056 ion ferrique par molécule de N-trp est encore présent dans la fraction contenant le N-trp. Le rendement d'obtention du glycopeptide N2 serait en relation directe avec le taux de fer résiduel dans la fraction du N-trp. En effet, les hydrolyses tryptiques du N-trp réalisées avec l'apport préalable d'aliquotes de  $Fe^{3+}$  sous forme du complexe NTA -  $Fe^{3+}$ , possèdent un rendement d'obtention du N2 proportionnel à la quantité de fer ajoutée. Pour un rapport de un ion  $Fe^{3+}$  par molécule de N-trp, le rendement atteint 30 %.

Obtenu sous sa forme native, le N2 possède une coloration "jaune dorée", son analyse en spectrophotométrie dans le visible révèle une bande d'absorption centrée à 420 nm. Ce glissement de 35 nm par rapport à la bande d'absorption de la lactotransferrine humaine pourrait être interprété, selon TSAO *et al.* (1989) par le fait d'une structure du complexe N2 -  $Fe^{3+}$  différente de celle de la lactotransferrine native. A 420 nm et lorsque le glycopeptide N2 fixe 0,9  $Fe^{3+}$  par molécule, on mesure  $E_{1\text{p}100}^{1\text{cm}} = 0,2$ .

## 2. Réversibilité de la fixation du fer par le glycopeptide N2

Après désaturation du glycopeptide par baisse du pH (essais à pH 6,0, 4,0 et 2,0) et en présence de 1 % (p:v) d'EDTA, puis vérification par spectrophotométrie de la désaturation en fer et dessalage sur colonne Pharmacia PD - 10 dans  $NaHCO_3$  50 mM, nous avons tenté de resaturer en fer le glycopeptide N2. Aucune des méthodes classiques de saturation en fer utilisant la complexe NTA -  $Fe^{3+}$  ou le complexe citrate -  $FeCl_3$  n'a permis la resaturation du glycopeptide N2.

La non réversibilité de la fixation du fer par le glycopeptide N2 peut s'expliquer de plusieurs manières :

- la méthodologie utilisée pour la désaturation en fer du glycopeptide N2 a entraîné une trop grande dénaturation du site de fixation du fer qui, dans la protéine native, se trouverait être stabilisé par les domaines ND1 et ND3 ;

- tous les ligands du fer ne sont peut-être pas présents dans le glycopeptide N2. En effet, dans la partie "Généralités", nous avons vu qu'il existait 3 résidus de tyrosine et 2 résidus d'histidine homologues dans toutes les moitiés N- et C- terminales des transferrines, tous présents dans

le glycopeptide N2 sauf une des tyrosines (résidus n° 83) (Fig. 8 , p. 37 ) qui n'est pas présente dans le glycopeptide N2, et interdit peut être la fixation réversible du métal.

#### E. - Analyse en résonance paramagnétique électronique du glycopeptide N2

La coloration jaune du glycopeptide N2, inhabituelle pour un complexe fer-transferrine, nous a d'abord fait penser qu'il s'agissait d'un complexe formé avec l'ion  $\text{Cu}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{2+}$ . L'analyse du N2 par résonance paramagnétique électronique, réalisée grâce au *Professeur LHOSTE*, démontre par la présence dans le spectre (Fig. 19, p.97 ) d'un grand pic vers 1500 G et d'un second pic plus petit à 720 G, que nous sommes bien en présence d'un complexe ferrique orthorhombique à haut spin, caractéristique des transferrines.

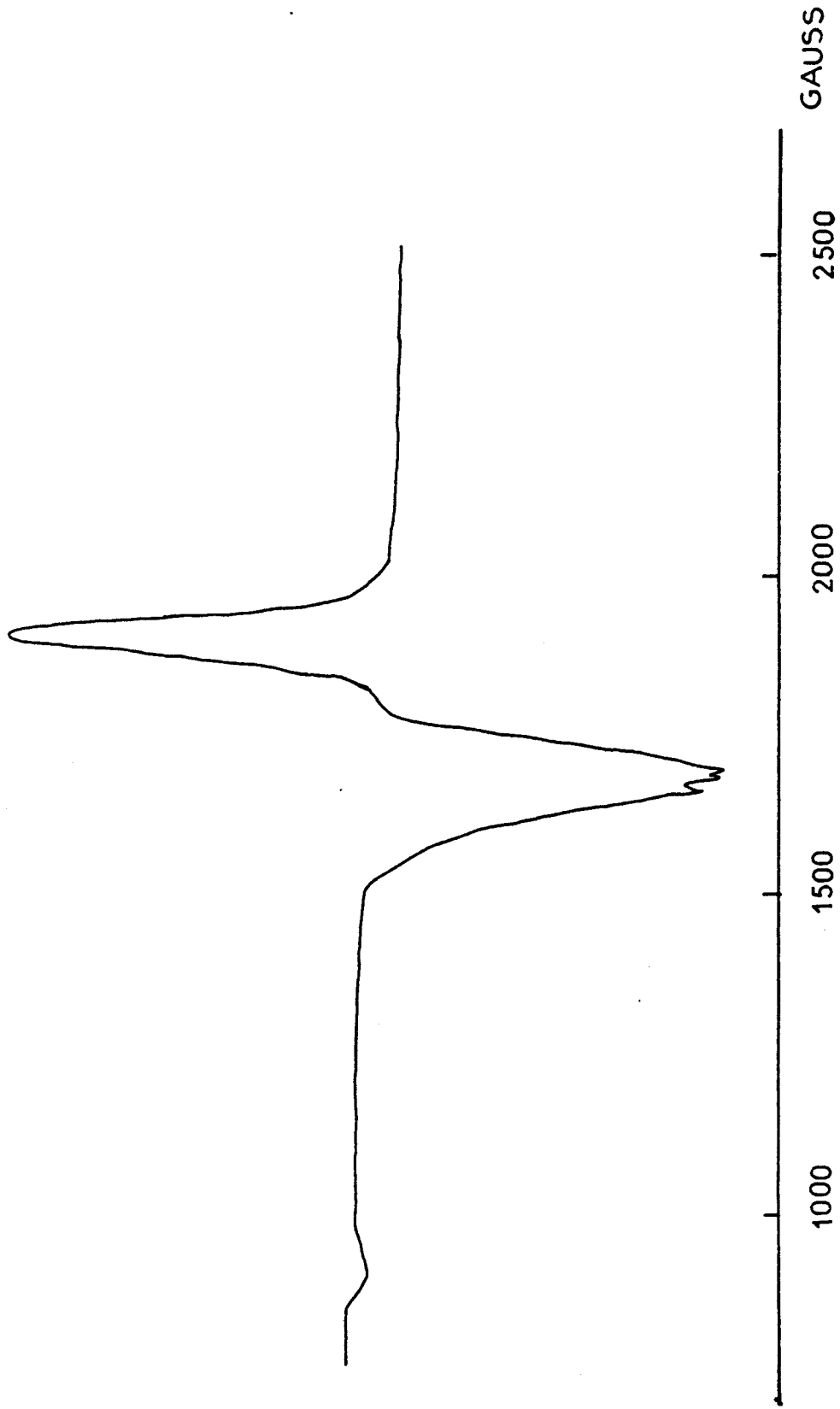
#### F. - Etudes par dichroïsme circulaire du glycopeptide N2

Nous avons analysé en dichroïsme circulaire le glycopeptide N2 sous sa forme native saturée à 90 % et le même glycopeptide désaturé en fer après traitement dans un tampon formiate de sodium 1% (v:v) pH 5,0, EDTA 1% (p:v), dessalage sur colonne Pharmacia PD - 10 et lyophilisation.

##### 1. Spectres entre 180 et 250 nm

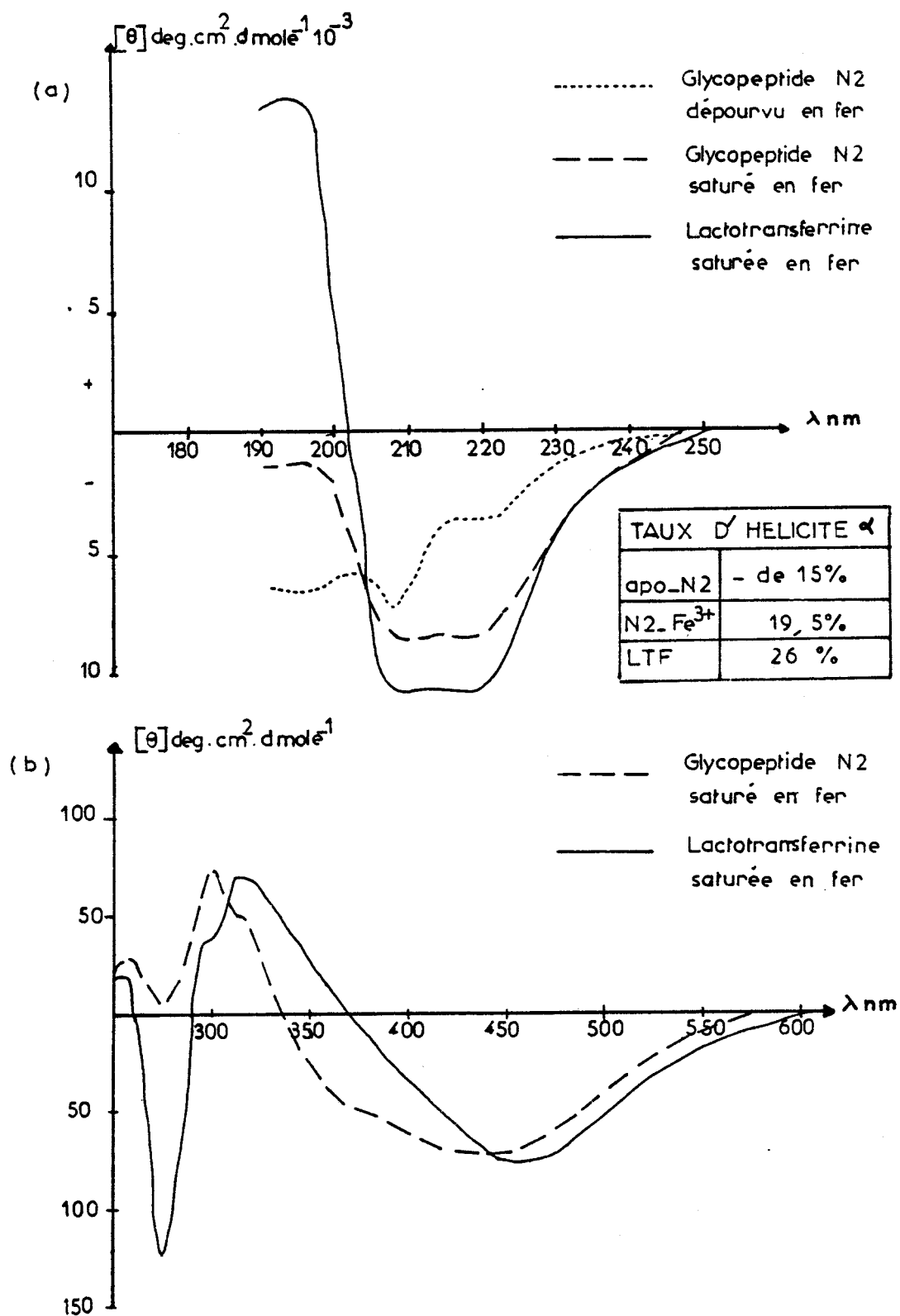
Le glycopeptide N2 saturé en fer présente un spectre dichroïque (Fig. 20 p. 98 ) où les deux bandes centrées à 210 et 220 nm traduisent un taux d'hélicité  $\alpha$  de 19,5 %, plus élevé donc que celui du fragment N-trp saturé en fer (12 %). On retrouve également la bande caractéristique des structures en feuillets plissés (bande à 215 nm) et celle représentative des structures désorganisées (bande à 198 nm) mais cette dernière reste très faible.

Le glycopeptide N2 dépourvu de fer possède un spectre où les taux de structures désorganisées se sont accrus (bande importante centrée à 198 nm), au détriment des structures organisées. En particulier, le taux de structures hélicoïdales semble descendu en dessous de 15 % (Fig. 20 , p.98 ). Cette désorganisation des structures secondaires peut expliquer la non réversibilité de fixation du métal.



- Figure 19 -

Spectre de résonance paramagnétique électronique du glycopeptide N2 natif.



- Figure 20 -

Spectres dichroïques comparés de la lactotransferrine humaine (LTF) saturée en fer et du glycopeptide N2 dépourvu et saturé en fer (a) entre 180 et 250 nm et (b) entre 250 et 600 nm.

## 2. Spectres entre 250 et 600 nm

Le spectre entre 250 et 600 nm du glycopeptide N2 saturé ou dépourvu de fer (Fig. 20 , p. 98 ) montre la présence de toutes les bandes décrites pour la lactotransferrine native et les fragments N-trp et C-trp mais il possède la particularité de présenter une bande négative à 276 nm très faible traduisant un enfouissement ou masquage important des ponts disulfures dans le glycopeptide N2. La bande majeure du spectre est celle due au tryptophane (centrée à 291 nm).

## G. - Cristallisation du glycopeptide N2

L'étude de la conformation spatiale constitue l'étape finale de l'étude structurale d'une protéine. La connaissance de la conformation est rendue possible par la cristallisation de la protéine puis analyse des cristaux par rayonnement aux rayons X.

Les derniers travaux de cristallisation de la lactotransferrine humaine remontent à 1977 où *BAKER* et *RUMBALL* (13) décrivent l'obtention des cristaux par dialyse de la protéine contre une solution à 10 % (v:v) d'éthanol. Aucune suite n'a été donnée à leurs travaux préliminaires.

L'isolement du glycopeptide N2 nous a permis d'envisager sa cristallisation, laquelle rendrait possible une analyse fine de la conformation du site de fixation du métal de la lactotransferrine.

La méthodologie utilisée pour les essais de cristallisation du glycopeptide N2 est décrite dans l'appendice technique.

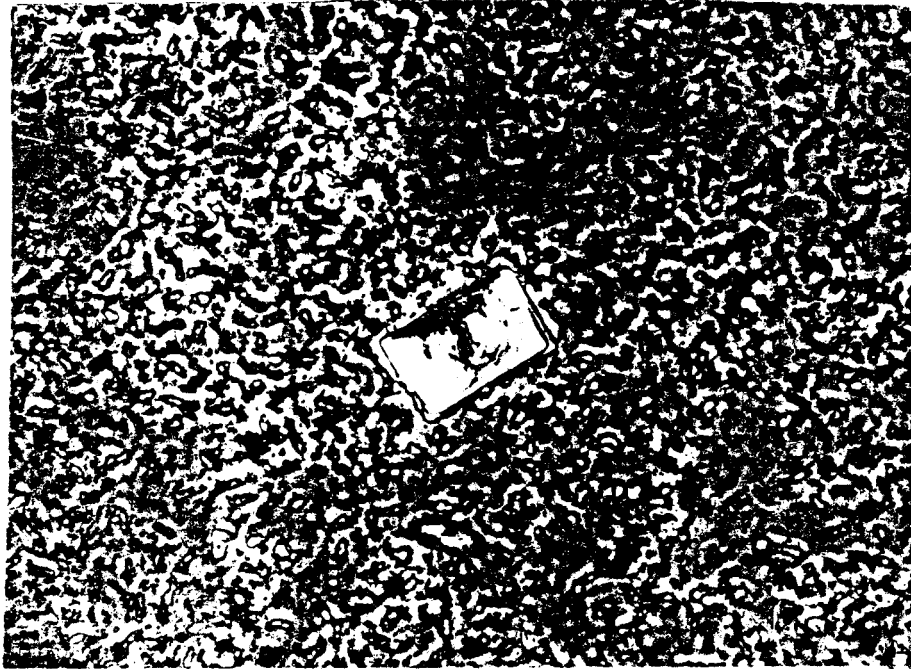
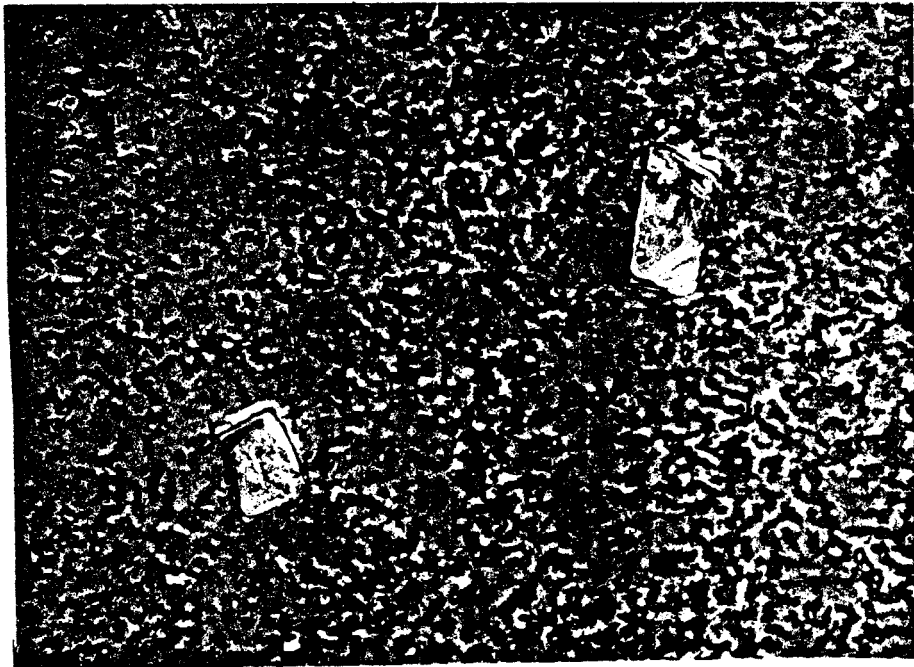
Ainsi que le montre le tableau X , p. 100 , le MPD, le sulfate d'ammonium et le PEG permettent la cristallisation du glycopeptide N2. Une concentration en PEG de 1 à 4 % (p:v) donne les meilleurs résultats et permet l'obtention de nombreux cristaux de couleur jaune dont la croissance, qui s'effectue réellement dans les trois dimensions, est maximale au bout de 2 à 3 mois. Ces cristaux possèdent des formes très variables (Fig. 21 , p. 101 ) ; leurs dimensions n'excèdent pas 0,08 mm et ne permettent pas encore d'envisager leur analyse par diffraction aux rayons X.

TABLEAU X - RESULTATS DES ESSAIS DE CRISTALLISATION  
DU GLYCOPEPTIDE N2

TEMPERATURE	AGENT PRECIPITANT	CONCENTRATION FINALE EN AGENT PRECIPITANT	OBSERVATIONS
+ 20°C	SULFATE D AMMONIUM	CONC. 20 % (P:V) 20 % (P:V) CONC. 40 % (P:V) 40 % (P:V) CONC.	○ — △ — ┘
+ 4°C	2 - METHYL PENTANEDIOL	CONC. 19 % (V:V) 19 % (V:V) CONC. 25 % (V:V) 25 % (V:V) CONC.	○ — ○ — △ — ┘
+ 20°C	POLYETHYLENE GLYCOL 6000	CONC. 1 % (P:V) 1 % (P:V) CONC. 4 % (P:V) 4 % (P:V) CONC.	○ — ○ — ⊕ — ┘

ABREVIATIONS ET SYMBOLES : CONC. : CONCENTRATION ;

- : RIEN
- : GLOBULES DE PROTEINE
- △ : CRISTAUX (moins de 0,05 mm de côté)
- ⊕ : CRISTAUX (entre 0,05 et 0,08 mm de côté)
- ┘ : PRECIPITE GRANULEUX.



- Figure 21 -

Cristaux du glycopeptide N2 obtenus par précipitation  
au polyéthylèneglycol 6000 à 4 % (p:v)



## H. - Conclusions

L'étude physico-chimique du glycopeptide N2 permet de définir un certain nombre de propriétés du site de fixation du métal qui n'avaient pu être décrites avant son isolement.

En particulier nous avons pu montrer que :

- 1) Le glycopeptide N2 possède une ionisation différente de celle du fragment N-trp dont il est issu.
- 2) Le glycopeptide N2 possède encore la propriété de fixer un ion ferrique mais non réversiblement. Cette fixation, étudiée en résonance paramagnétique électronique, met en évidence la présence d'un complexe ferrique orthorhombique à haut spin caractéristique des transferrines. La séquence peptidique du glycopeptide N2 possède 2 résidus de tyrosine (n° 93 et 191), 2 résidus d'histidine (n° 117 et 252), 1 résidu de tryptophane (n° 125), 2 résidus d'arginine et de lysine (n° 121 et 114), tous rencontrés en positions homologues dans les sites de fixation N- et C- terminaux des séro- et ovotransferrines (Fig. 1 , p. 10 ) et qui sont susceptibles de constituer les différents ligands du fer (voir p. 38 ). Seul un résidu de tyrosine (n° 83 ), en position conservée dans toutes les transferrines n'est pas présent dans le glycopeptide N2. L'absence de ce résidu de tyrosine n'empêche pas la fixation du fer du glycopeptide N2 mais pourrait expliquer la non-réversibilité de la fixation.
- 3) L'étude par dichroïsme circulaire du glycopeptide N2 saturé en fer met en évidence un taux de structures hélicoïdales de 19,5 % et un faible taux de structures désorganisées. En revanche, la désaturation en fer du glycopeptide N2 entraîne une augmentation du taux de structures désorganisées et une baisse du taux de structures hélicoïdales qui pourrait également expliquer la non-réversibilité de la fixation du fer.
- 4) Le glycopeptide N2 peut être cristallisé par précipitation au polyéthylène glycol 6000 de 1 % à 4 % (p:v) de concentration. Les cristaux obtenus ont une croissance dans les trois dimensions ; leur

taille maximale au bout de 2 à 3 mois (jusque 0,08 mm de côté), ne permet pas encore d'envisager leur analyse par diffraction aux rayons X. La modification de quelques paramètres de cristallisation tels que la nature, la force ionique et le pH du milieu de cristallisation sont en cours d'investigation afin d'optimiser la croissance des cristaux. L'étude de ces cristaux par diffraction aux rayons X permettrait d'envisager l'analyse fine de la conformation du site de fixation du fer.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE  
ET SECONDAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

I. - CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

Lors de notre arrivée au Laboratoire, seule 75 % de la séquence peptidique de la lactotransferrine humaine, déterminée en collaboration avec l'équipe du *Professeur JOLLES*, était connue. Notre objectif a été de poursuivre avec *Joël MAZURIER*, le travail entrepris par celui-ci dans la détermination de la structure protéique de la molécule.

En ce qui concerne la structure primaire, nous devions isoler, d'une part, des peptides obtenus après hydrolyse enzymatique de la lactotransferrine afin de déterminer des séquences peptidiques encore inconnues, et d'autre part, les peptides contenant un résidu de cystine permettant la localisation des ponts disulfures.

A. - Critère de choix des peptides

La méthodologie pour obtenir de courts peptides est classique, elle consiste à couper la protéine à l'aide de protéases puis à isoler les peptides libérés après différentes étapes de chromatographie et/ou d'électrophorèse. Après vérification de l'homogénéité des fractions (par la dansylation), celles-ci sont soumises au test du cyanure/nitroprussiate pour détecter la présence de cystine. Elles sont ensuite analysées par chromatographie en phase gazeuse pour déterminer la composition en acides aminés et vérifier la présence de cystine. Au terme de ces étapes, les quantités de peptides disponibles pour la détermination de séquence au laboratoire du *Professeur JOLLES* sont souvent très faibles. Notre choix parmi ces peptides s'est donc essentiellement porté sur ceux obtenus en quantités importantes.

## B. - Isolement de peptides renfermant de la cystine en vue de la localisation des ponts disulfures de la lactotransferrine

### 1. Rappel des connaissances sur la position des ponts disulfures des transferrines

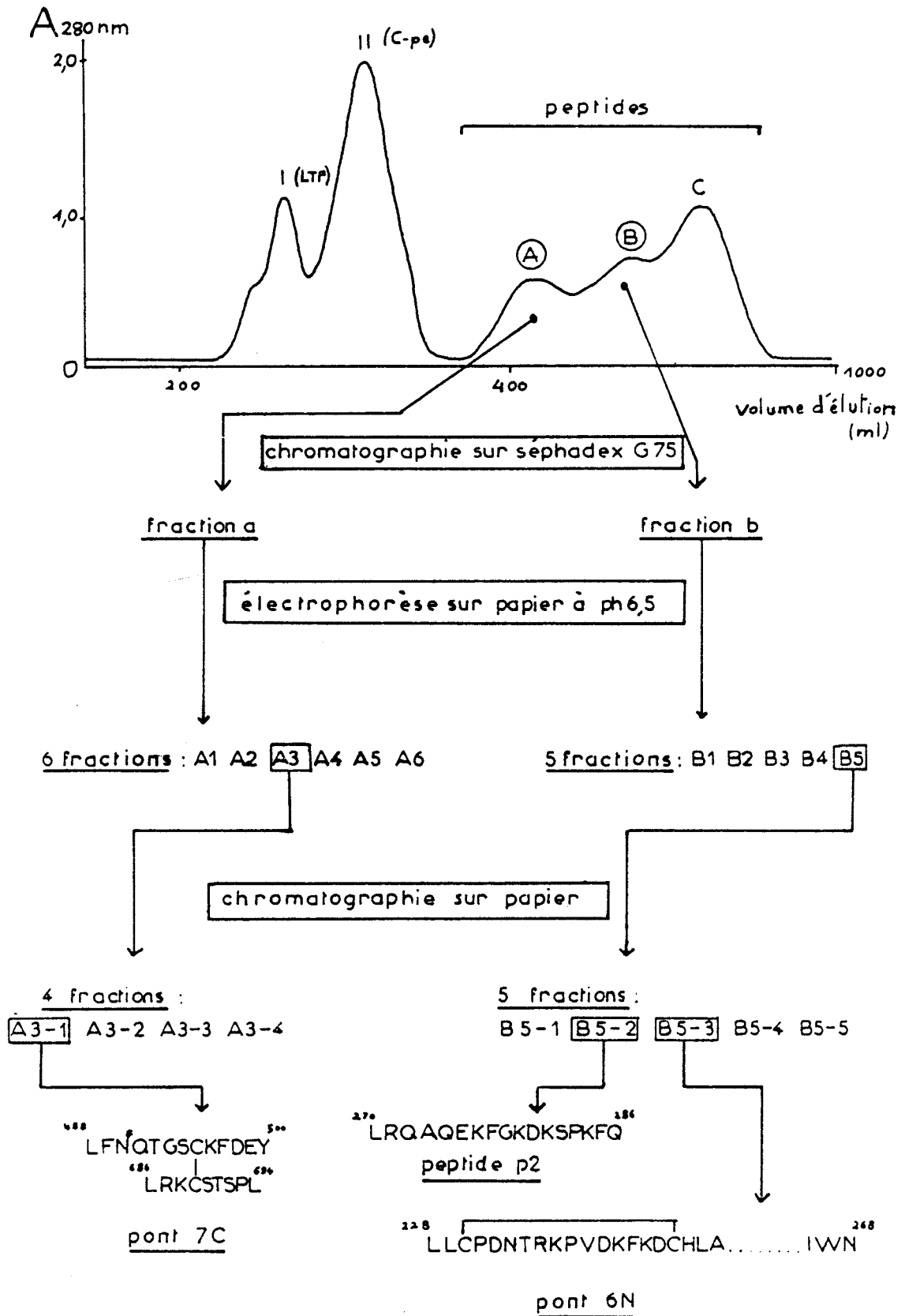
Ainsi que nous l'avons décrit dans la partie "Généralités", l'ovotransferrine de poule possède le plus petit nombre de demi-cystines : 30 résidus répartis à raison de 12 dans la moitié N-terminale et 18 dans la moitié C-terminale ; 10 ponts disulfures sur les 15 ponts disulfures qui existent dans la molécule ont pu être directement caractérisés jusqu'à ce jour. La sérotransferrine humaine possède 38 demi-cystines c'est-à-dire 19 ponts disulfures dont 6 ont été caractérisés.

En ce qui concerne le nombre de demi-cystines de la lactotransferrine humaine, MAZURIER *et al.* (139) l'estiment à 34 résidus. Jusqu'à maintenant, aucun pont disulfure n'a pu être caractérisé directement ; leur localisation, donnée dans la figure 2 , p. 12 , est simplement déduite par analogie avec celle des autres transferrines.

Notre travail, en parallèle avec celui entrepris par le groupe du Professeur JOLLES, a consisté à isoler des peptides renfermant un ou plusieurs ponts disulfures en vue de confirmer directement la position des ponts disulfures sur la lactotransferrine humaine.

### 2. Isolement de peptides issus de l'hydrolysats pepsique de la lactotransferrine

Après hydrolyse pepsique d'une solution à 5 % (p:v) de lactotransferrine saturée en fer (protocole de LINE *et al.* (116)), l'hydrolysats est fractionné sur colonne de Séphadex G 75 dans  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,1M. 5 fractions sont collectées : la première (I) correspond à de la lactotransferrine intacte, la seconde (II) à la moitié C-terminale de la molécule (fragment C-pe de 40.000 daltons), les trois fractions suivantes sont appelées A, B et C et contiennent chacune un mélange de peptides (Fig. 22 , p. 106 ). La fraction contient essentiellement des sels, des acides aminés libres et de très courts peptides, elle n'a pas été étudiée.



- Figure 22 -

Isolement et caractérisation des peptides obtenus par hydrolyse pepsique de la lactotransferrine humaine

a) Etude de la fraction A

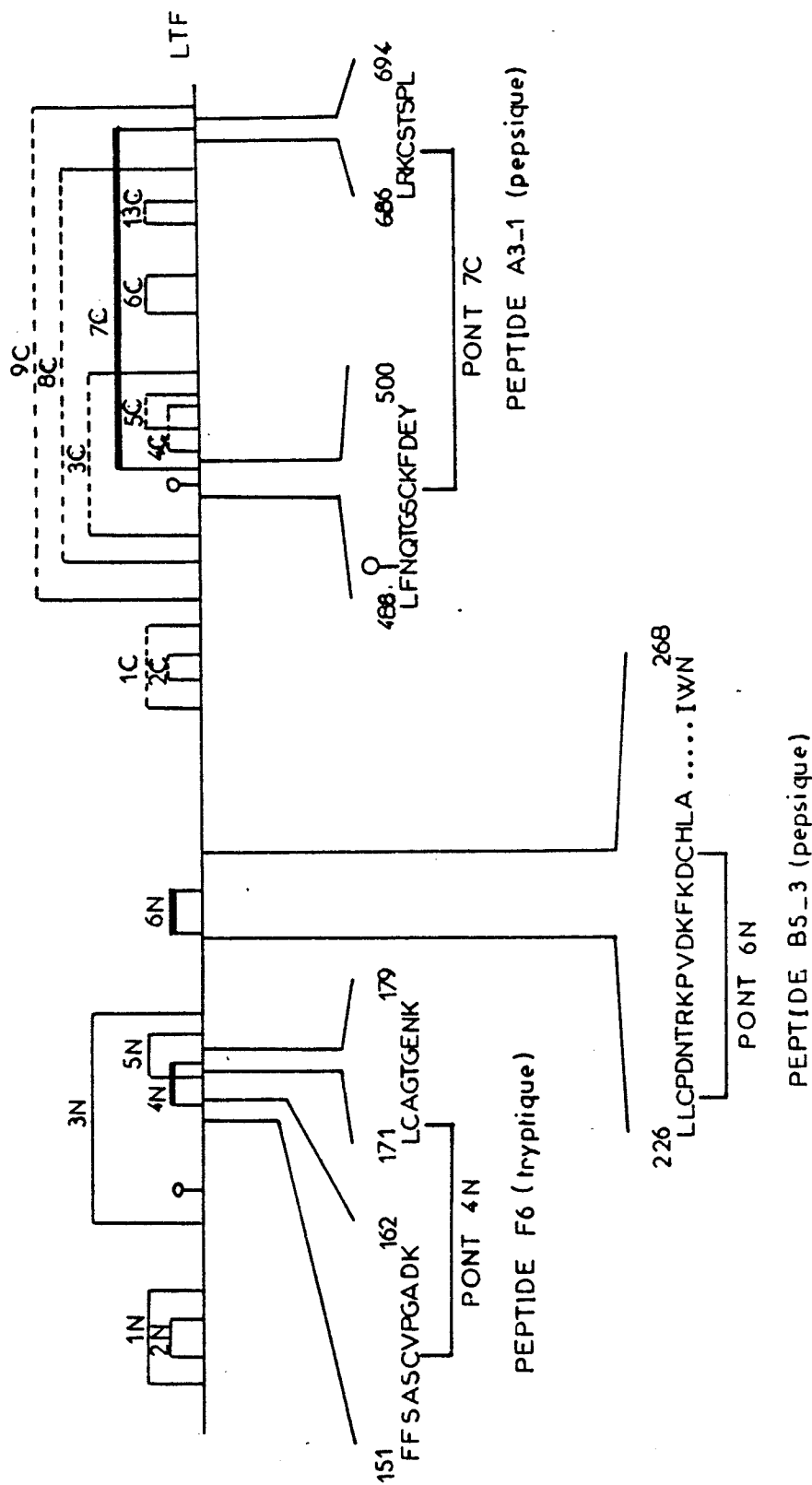
La fraction A, après électrophorèse sur papier à pH 6,5, donne 6 fractions. La 3e fraction (A3), majeure et très positive au test cyanure/nitroprussiate, est chromatographiée sur papier WHATMAN n° 3 et donne 4 fractions; seule la première fraction (A 3 - 1) est positive au test cyanure/nitroprussiate. Cette fraction dont la dansylation donne la Leucine comme acide aminé N-terminal, a été caractérisée au séquenceur automatique. Elle contient un peptide dont la structure est donnée dans la figure 22 , p. 106 . Le peptide permet de localiser le pont disulfure 7C situé dans la région C-terminale de la molécule (Fig. 23 , p. 108 ).

b) Etude de la fraction B

La fraction B, après électrophorèse sur papier à pH 6,5, donne 5 fractions. La 5e fraction (B5), majeure et positive au test cyanure/nitroprussiate, est chromatographiée sur papier WHATMAN n° 3 et donne à nouveau 5 fractions. La 3e fraction (B 5 - 3) contient un peptide à cystine commençant par la Leucine et dont la séquence peptidique est représentée dans la figure 22 , p. 106 . Ce peptide B 5-3, appartenant à l'extrémité C-terminale de la moitié N-terminale, permet de positionner le pont disulfure 6N, il permet également d'exclure l'existence du pont disulfure 14N décrit par MAZURIER *et al.* (139). Enfin, il constitue le peptide P1 utilisé par METZ-BOUTIGUE *et al.* (147) pour réenchaîner les peptides T8 et T9 dans la détermination de la séquence primaire de la lactotransferrine (Fig. 23 , p.108 ).

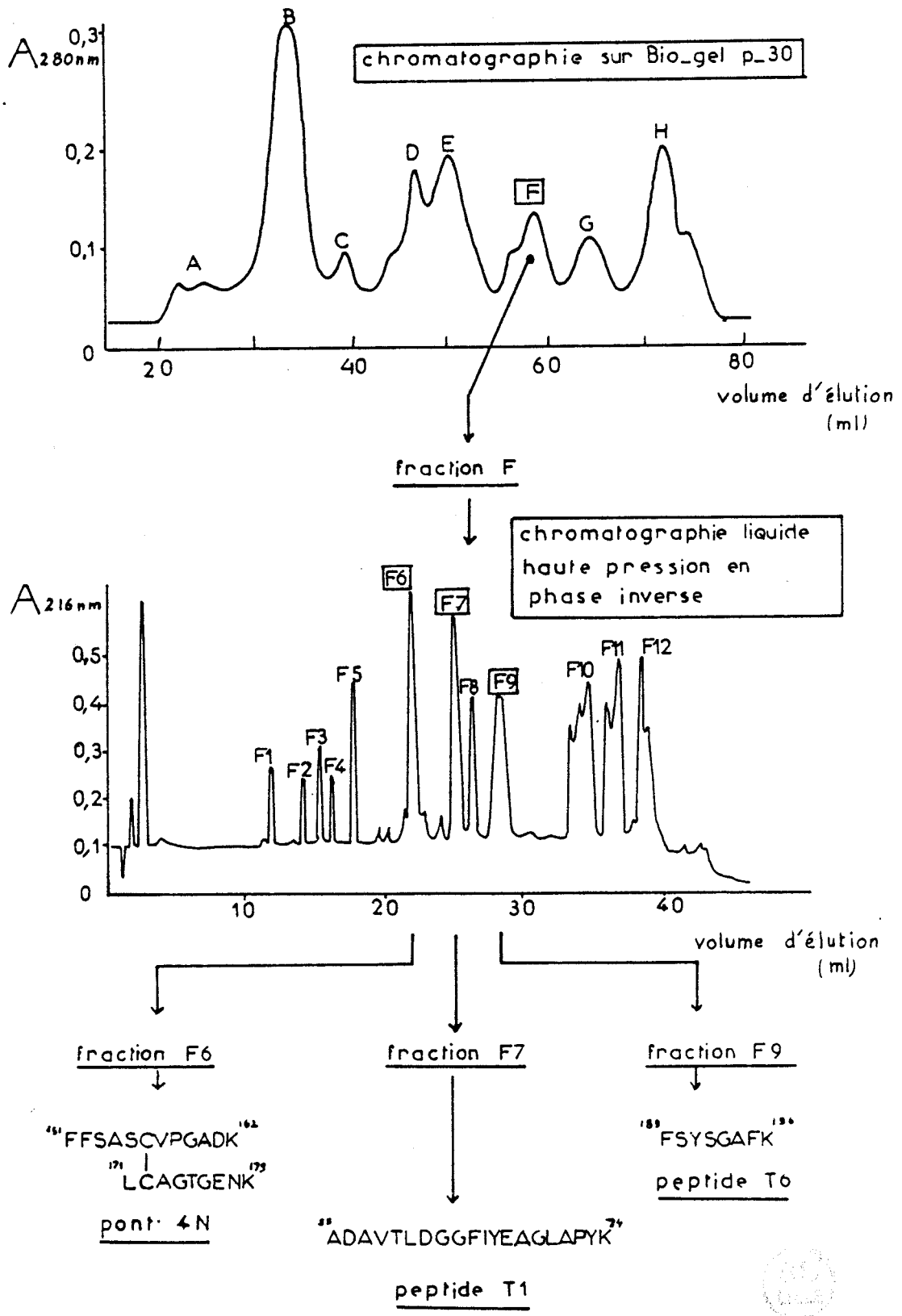
3. Isolement de peptides issus de l'hydrolysate tryptique du fragment N-trp

Après hydrolyse tryptique du fragment N-trp (fragment de 30.000 daltons appartenant à la région N-terminale (voir p. 59 )) pendant 4H à 37°C dans  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M (rapport enzyme/substrat de 1/50), l'hydrolysate est fractionné sur colonne de Bio-Gel P30 dans  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM. Le fractionnement donne 9 pics numérotés de A à H (Fig. 24 , p. 109 ). L'analyse du pic F renfermant la quantité la plus importante de ponts disulfures a été réalisée. Ce pic contient un mélange de peptides qui est fractionné en chromatographie liquide



- Figure 23 -

Localisation des peptides à cystine isolés de la lactotransferrine humaine (LTF) (□ : pont disulfure caractérisé par nos travaux ; ▢ : pont disulfure caractérisé par METZ-BOUJIGUE et al. (147) ; ▣ : pont disulfure non caractérisé ; ○ glycane).



- Figure 24 -

Isolement et caractérisation des peptides obtenus  
par hydrolyse tryptique du fragment N-trp



à haute pression (CLHP) sur colonne de phase inverse (Fig. 24 , p.109 ). Le 6e pic (F6), en quantité majeure dans la fraction et positif au test cyanure/nitroprussiate, renferme un peptide bicaténaire. Ce peptide commence par la phénylalanine et la leucine ; sa séquence qui est donnée dans la figure 24 p.109 , permet de positionner le pont disulfure 4N de la région N-terminale de la molécule (Fig. 23 , p. 108 ).

#### 4. Conclusion

Nos travaux ont permis l'isolement de 3 peptides contenant chacun un résidu de cystine (Fig. 23 , p. 108 ). Ces 3 peptides sont les suivants :

- le peptide A 3-1 de nature bicaténaire localisé du résidu 488 au résidu 500 et du résidu 686 au résidu 694 et renfermant un pont disulfure : le pont 7C situé dans la région C-terminale de la lactotransferrine humaine.
- le peptide B 5-3 de nature monocaténaire localisé du résidu 228 au résidu 268 et renfermant le pont disulfure 6N (région N-terminale). Ce peptide permet d'exclure l'existence du pont disulfure 14N décrit par MAZURIER *et al.* (139) et permet également le réenchaînement de deux peptides (T8 et T9) obtenus par METZ-BOUTIGUE *et al.* (147) par hydrolyse tryptique du fragment BrCN (Fig. 23 , p.108 ).
- le peptide F6 de nature bicaténaire localisé du résidu 151 au résidu 162 et du résidu 171 au résidu 179. Il renferme le pont disulfure 4N de la région N-terminale de la lactotransferrine humaine.

#### C. - Isolement de peptides ne renfermant pas de cystine en vue du réenchaînement de fragments protéiques de lactotransferrine

##### 1. Rappel des connaissances actuelles de la séquence primaire de la lactotransferrine

Ainsi que nous le développons dans la partie "Généralités", la détermination de la séquence primaire de la lactotransferrine humaine a été entreprise, dès 1974, au Laboratoire en collaboration avec le groupe de P. JOLLES.

La coupure au bromure de cyanogène de la lactotransferrine a permis l'obtention de 7 fragments BrcN : FI, FII, FIII, FIV, FV', FVI et FVII (fig. 25 p. 112 ). Quatre fragments ont été séquencés complètement : FIII, FIV, FVI et FV', tandis que les fragments FI et FII, plus longs, et le fragment FVII ont nécessité des coupures complémentaires par diverses protéases telles que la trypsine et la protéase V8 de *Staphylococcus aureus*. Ces peptides obtenus par protéolyse des fragments BrcN FI, FII et FVII ainsi que ceux obtenus par protéolyse des fragments C-pe et N-trp, ont permis de compléter la détermination de la séquence primaire et de réenchaîner les séquences connues. Nos travaux sont une contribution à ces études d'isolement de peptides permettant le réenchaînement de séquences connues. Ils ont permis l'élucidation de la séquence primaire complète de la lactotransferrine humaine (METZ-BOUTIGUE *et al.* (147)).

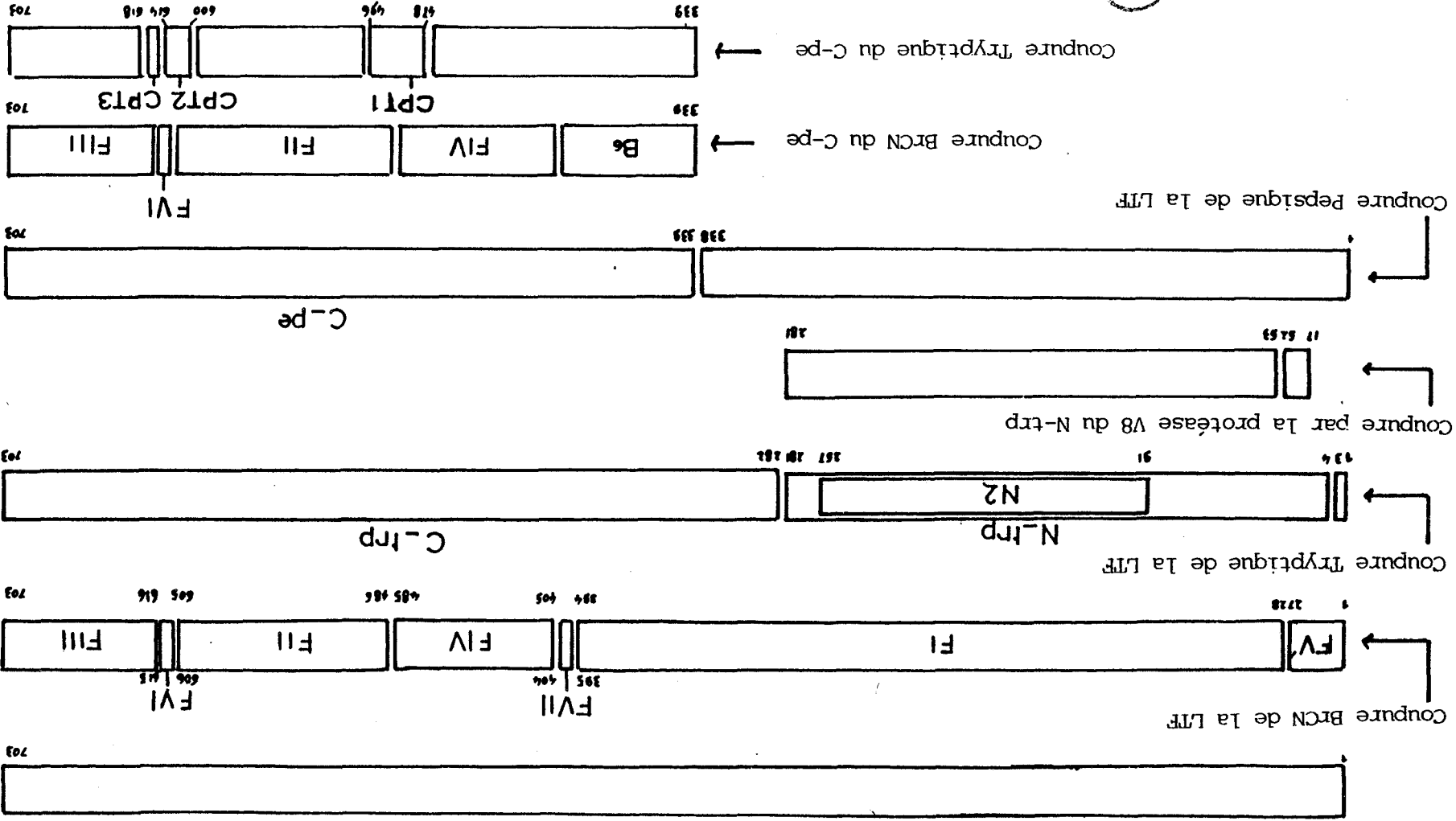
## 2. Isolement de peptides issus de l'hydrolysats pepsique de la lactotransferrine

Comme nous l'avons décrit précédemment, aux pages 56 à 58 , l'hydrolysats pepsique de la lactotransferrine humaine (protocole de LINE *et al.* (116)) donne 5 fractions après chromatographie sur colonne de Séphadex G75 dans  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,1 M (Fig. 22 , p.106 ). La fraction B est soumise à une électrophorèse à pH 6,5 et donne 5 fractions (p. 107 ). La 5e fraction (B5), en quantité majeure, est chromatographiée sur papier WHATMAN n° 3 et permet l'obtention de 5 nouvelles fractions dont la 2e (B5-2) contient un peptide monocaténaire commençant par la leucine. Ce peptide commence au résidu 270 et se termine au résidu 286 (Fig. 22 , p.106 ) et correspond au peptide P2 décrit par METZ-BOUTIGUE *et al.* (147). Ce peptide, situé dans le fragment FI permet le réenchaînement des peptides CT8, T12 , T13, T14 , C8 et C9 (Fig. 26 , p. 114 ).

## 3. Isolement de peptides issus de l'hydrolysats tryptique du fragment N-trp

Ainsi que nous l'exposons aux pages 83 à 89 , l'hydrolysats tryptique du fragment N-trp, chromatographié sur colonne de Bio-Gel P-30 (Fig. 24 , p. 109 ), donne 9 fractions. La fraction F, après chromatographie en phase

LTF



- Figure 25 -

Stratégie utilisée par METZ-BOUQTIGUE et al. (147) pour la détermination de la séquence primaire de la lactotransferrine humaine (LTF).

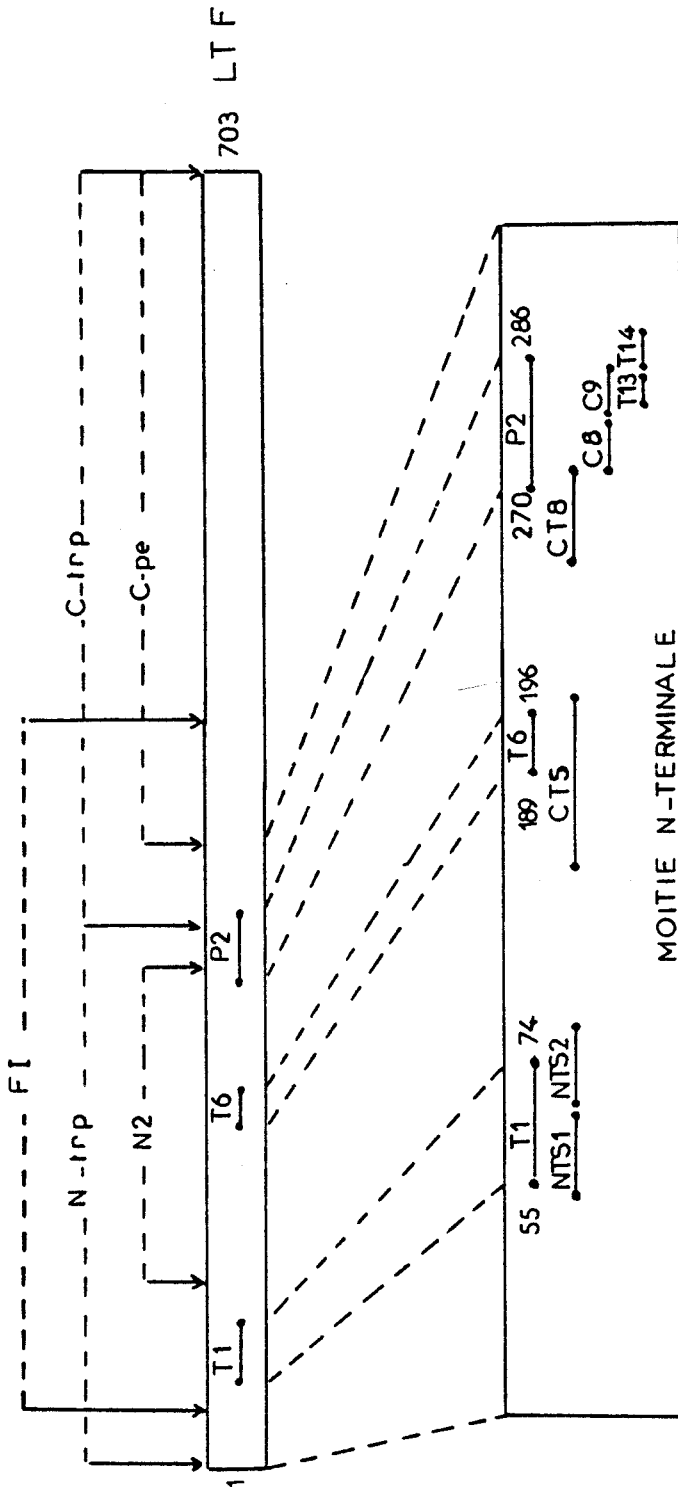
liquide à haute pression sur colonne de phase inverse (Fig. 24 , p. 109 ) donne 12 fractions. La 7e fraction (F7) et la 9e fraction (F9) fournissent chacun un peptide commençant en N-terminal par l'alanine et la phénylalanine, respectivement. Le peptide F7 commence au résidu 55 et se termine au résidu 74 tandis que le peptide F9 commence au résidu 189 et se termine au résidu 196 (les séquences sont données dans la figure 24 , p. 109 ). Les peptides F7 et F9 correspondent aux peptides T1 et T6 décrits par METZ-BOUTIGUE *et al.* (147)). Le peptide T1 permet le réenchaînement des deux fragments NTS1 et NTS2 obtenus par coupure tryptique et la protéase V8 du fragment N-trp tandis que le peptide T6 confirme la séquence C-terminale du fragment CT5 (Fig. 26 , p. 114 ).

#### 4. Conclusion

Nos travaux ont permis l'isolement de 3 peptides que METZ-BOUTIGUE *et al.* (147) ont appelés peptides P2, T1 et T6. le peptide P2 permet le réenchaînement de plusieurs autres peptides : CT8, T12 , T13, T14 , C8 et C9. Le peptide T1 réenchaine les deux peptides NTS1 et NTS2 alors que le peptide T6 permet la confirmation du peptide CT5.

#### D. - Conclusions

Les travaux que nous avons réalisés : d'une part, l'isolement de 3 peptides à cystine permettant le positionnement de 3 ponts disulfures (ponts 4N, 6N et 7C) et l'infirmité de l'existence du pont 14N et d'autre part, l'isolement de 3 peptides permettant le réenchaînement des séquences de fragments protéiques, s'inscrivent en complément indispensable de ceux de Mme METZ-BOUTIGUE du Laboratoire du Professeur JOLLES. Actuellement, tous les ponts disulfures de la région N-terminale et deux de la région C-terminale de la lactotransferrine humaine sont caractérisés directement (Fig. 2 , p. 12 ). Les ponts disulfures dont la position n'a pu être démontrée sont néanmoins facilement localisables par analogie avec la sérotransferrine humaine et l'ovotransferrine humaine. La lactotransferrine humaine ne possède qu'un pont disulfure supplémentaire par rapport à l'ovotransferrine de poule : le pont C13 qui est aussi présent dans la moitié C-terminale de la sérotransferrine humaine.



- NTS1 et NTS2 : peptides du N-trp (protéase V8)
- CT5 et CT8 : peptides du FI après citraconylation (trypsine)
- C8 et C9 : peptides du FI (chymotrypsine)
- T13 et T14 : peptides du FI (trypsine)

- Figure 26 -

Localisation sur la lactotransferrine humaine (LTF) de 3 peptides (T1, T6, et P2) permettant le réenchaînement des peptides isolés par METZ-BOUTIGUE *et al.* (147) (NTS1, NTS2, CT5, CT8, C8, C9, T13, et T14).

Tous les résultats que nous avons décrits figurent dans la publication rendant compte de la détermination de la séquence complète de la lactotransferrine humaine (METZ-BOUTIGUE *et al.* (147)).

## II. - ETUDE THEORIQUE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

Durant ces dix dernières années, des méthodes de prédiction des topologies et des structures secondaires des protéines ont été développées afin de déduire la structure tertiaire de ces protéines à partir de leur séquence en acides aminés. Nous avons utilisé plusieurs de ces méthodes de calcul pour déterminer la structure secondaire de la lactotransferrine humaine. Ces études ont été réalisées afin, d'une part, de mettre en évidence d'éventuelles homologies structurales à l'intérieur de la molécule de la lactotransferrine humaine, et, d'autre part, de proposer un schéma de la conformation du site de fixation du fer.

### A. - Choix des méthodes de calcul

Deux concepts sont à l'origine des différentes méthodes de détermination des structures secondaires des protéines calculées sur la base de leur séquence d'acides aminés. L'un de ces concepts repose sur l'extrapolation de paramètres structuraux issus de l'analyse statistique par diffraction aux rayons X de plusieurs dizaines de protéines connues ; les méthodes les plus connues qui utilisent ces analyses statistiques sont celles de CHOU et FASMAN (51) et de GARNIER *et al.* (75). L'autre concept repose sur l'étude de la potentialité de contacts hydrophobes le long de la chaîne peptidique : la méthode la plus utilisée est celle de LIM (115) mais celle-ci, qui définit les zones hydrophobes comme privilégiant les structures hélicoïdales ou en feuillets plissés et les zones hydrophiles comme privilégiant les coudes  $\beta$  est contestée (CID *et al.* (52)) car elle exclut la possibilité de structures hélicoïdales ou en feuillets plissés hydrophiles et externes.

Les deux méthodes de calcul des structures secondaires que nous avons retenues sont donc celles de CHOU et FASMAN (51) et de GARNIER *et al.* (75).

La méthode de *CHOU et FASMAN* (51) est la méthode la plus utilisée car elle est, d'une part, la plus ancienne, et, d'autre part, la plus simple à mettre en oeuvre (un seul facteur est utilisé pour définir l'aptitude de chaque acide aminé à figurer dans une structure en hélice  $\alpha$  ou dans une structure en feuillets plissés  $\beta$ ).

La méthode de *GARNIER et al.* (75) affecte, pour chaque résidu d'acide aminé et pour chaque type de structure secondaire (hélices  $\alpha$ , feuillets plissés  $\beta$  ou coudes  $\beta$ ), 17 paramètres différents. Un de ces paramètres est propre à la nature de l'acide aminé dans la position qu'il occupe dans la chaîne peptidique, tandis que les autres paramètres répercutent la présence de cet acide aminé sur ses 8 plus proches voisins de part et d'autre de sa position. Cette méthode, par sa complexité, réclame un traitement informatique.

Nous avons informatisé la méthode de *CHOU et FASMAN* (51) et celle de *GARNIER et al.* (75) et nous avons comparé leurs résultats dans la détermination de la structure secondaire de la lactotransferrine humaine. A quelques différences près dont nous reparlerons dans le paragraphe suivant, les deux méthodes ont apporté des résultats identiques.

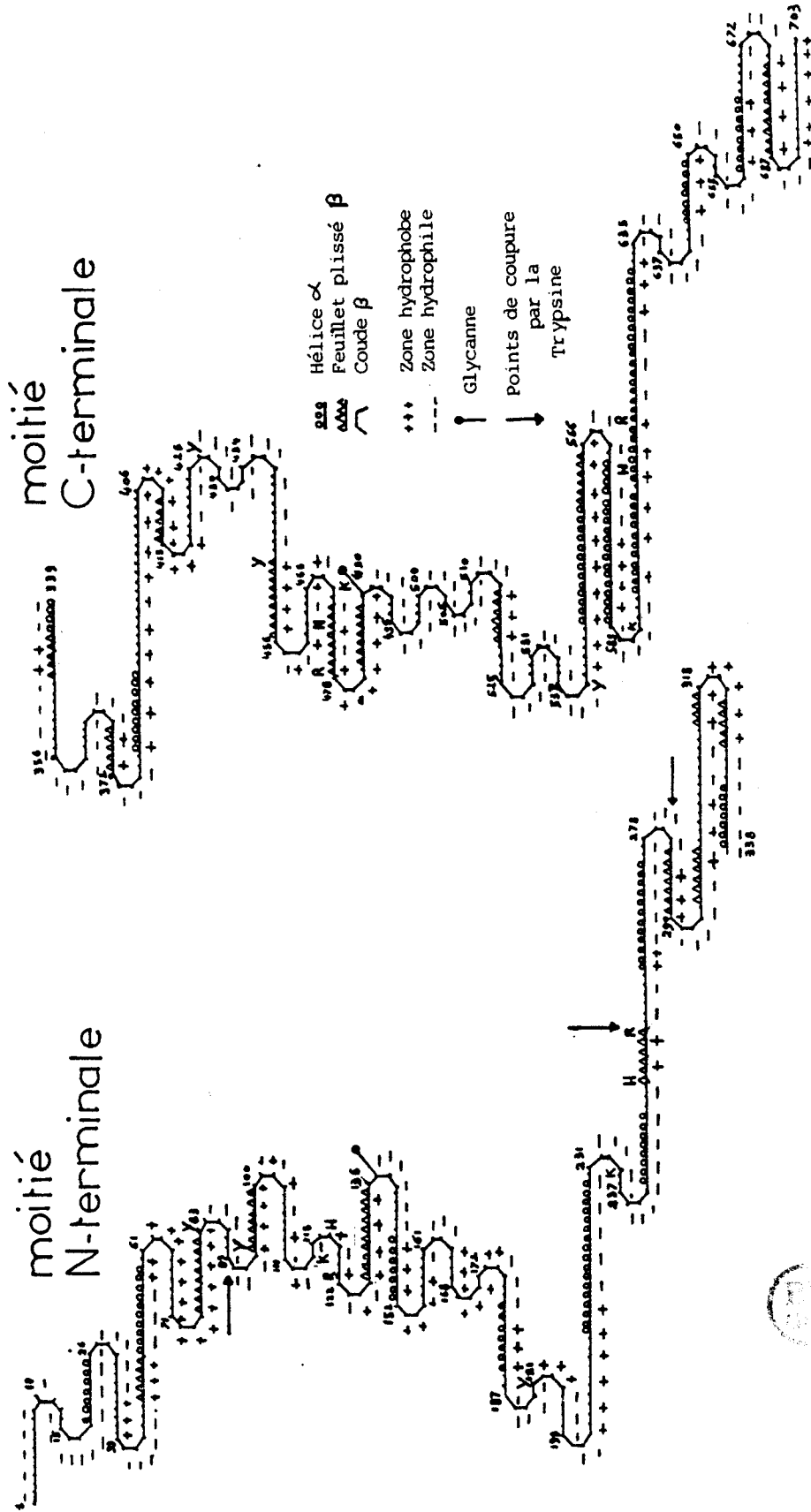
Par ailleurs, nous avons utilisé la méthode de *KYTE et DOOLITTLE* (107) afin de déterminer, par le calcul, les régions hydrophiles et hydrophobes de la chaîne peptidique. D'après ces auteurs, cette méthode montre une correspondance entre les zones hydrophobes et les zones enfouies à l'intérieur de la molécule. Elle permet de précieux renseignements dans l'évaluation de la structure des protéines.

## B. - Structure secondaire de la lactotransferrine humaine

La figure 27 , p. 117 , expose les résultats du calcul des structures secondaires de la lactotransferrine humaine d'après la méthode de *GARNIER et al.* (75), ainsi que le résultat des calculs des zones hydrophobes et hydrophiles d'après la méthode de *KYTE et DOOLITTLE* (107).

### 1. Localisation des structures secondaires

En premier lieu, l'observation du schéma des structures secondaires de la lactotransferrine humaine montre de grandes homologues dans la nature et



- Figure 27 -

Prédiction des structures secondaires (Méthode de GARNIER *et al.* (75)) et des zones hydrophobes et hydrophiles (Méthode de KYTE *et* DOOLITTLE (107)) des moitiés N- et C- terminales de la lactotransferrine humaine.



dans la localisation des structures secondaires des 2 lobes N- et C- terminaux. D'une part, si l'on compare les taux de structures secondaires pour chaque lobe N- et C- terminal, ceux-ci semblent très voisins (coudes  $\beta$  : 28 et 30 % ; feuillets plissés  $\beta$  : 18 et 20 % ; hélice  $\alpha$  : 22 et 28 %) ; nous noterons simplement que le lobe N- terminal semble un peu moins organisé que le lobe C- terminal, son taux d'hélicité, en particulier, est plus faible (22 % au lieu de 28 %). La désorganisation plus importante du lobe N-terminal peut expliquer la plus grande labilité du fer du site de fixation N-terminal par rapport au site de fixation C-terminal. D'autre part, si l'on considère la disposition des différentes structures secondaires le long de la chaîne peptidique de chacun des deux lobes, celle-ci présente de nombreuses homologies. En particulier, de nombreux ligands probablement impliqués dans la fixation du fer (voir la partie "Généralités") se situent dans des structures secondaires analogues (Tyr 83 et 427 dans des coudes  $\beta$  ; Tyr 91 et 540 dans des feuillets plissés ; Trp 125 et 481 dans des coudes  $\beta$  ; Tyr 191 et 540 dans des coudes  $\beta$ ). De même, chaque glycanne se situe, d'après la méthode de GARNIER *et al.* (75) dans un coude  $\beta$  (selon la méthode de CHOU *et FASMAN* (51), la probabilité d'existence d'un glycanne de la moitié N-terminale dans un coude  $\beta$  est cependant peu probable).

Par ailleurs, nous remarquerons que les régions C-terminales des 2 lobes N- et C- terminaux contiennent une proportion importante de structures en hélice  $\alpha$ , et particulièrement dans la région C-terminale du lobe C-terminal (résidus 547 à 666).

## 2. Localisation des zones hydrophiles et hydrophobes

En ce qui concerne la localisation des zones hydrophiles et des zones hydrophobes, nous noterons que les structures en feuillets plissés  $\beta$  ou en hélice  $\alpha$  sont presque toujours de nature hydrophobe, sauf dans le cas de quelques structures en hélice  $\alpha$  du lobe N-terminal (résidus 19 à 25, 213 à 230, 241 à 249, 254 à 275, 332 à 342) qui possèdent un caractère hydrophile, probablement des structures présentes à la surface de la protéine.

Les ligands présumés du fer, sauf dans le cas des histidines homologues 117 et 472, des arginines homologues 121 et 477, des lysines homologues 114 et 468 et de la tyrosine 427, se situent toujours à la limite d'une zone

très hydrophobe et d'une zone très hydrophile, cette dernière pouvant correspondre à la zone d'accès du site de fixation du fer.

L'extrémité N-terminale de la lactotransferrine possède un caractère très hydrophile qui indique une externalisation importante de cette région qui possède 4 résidus d'arginine en positions 2, 3, 4 et 5. L'externalisation de cette extrémité basique peut expliquer le caractère basique global de la lactotransferrine humaine (pHI voisin de 8,2).

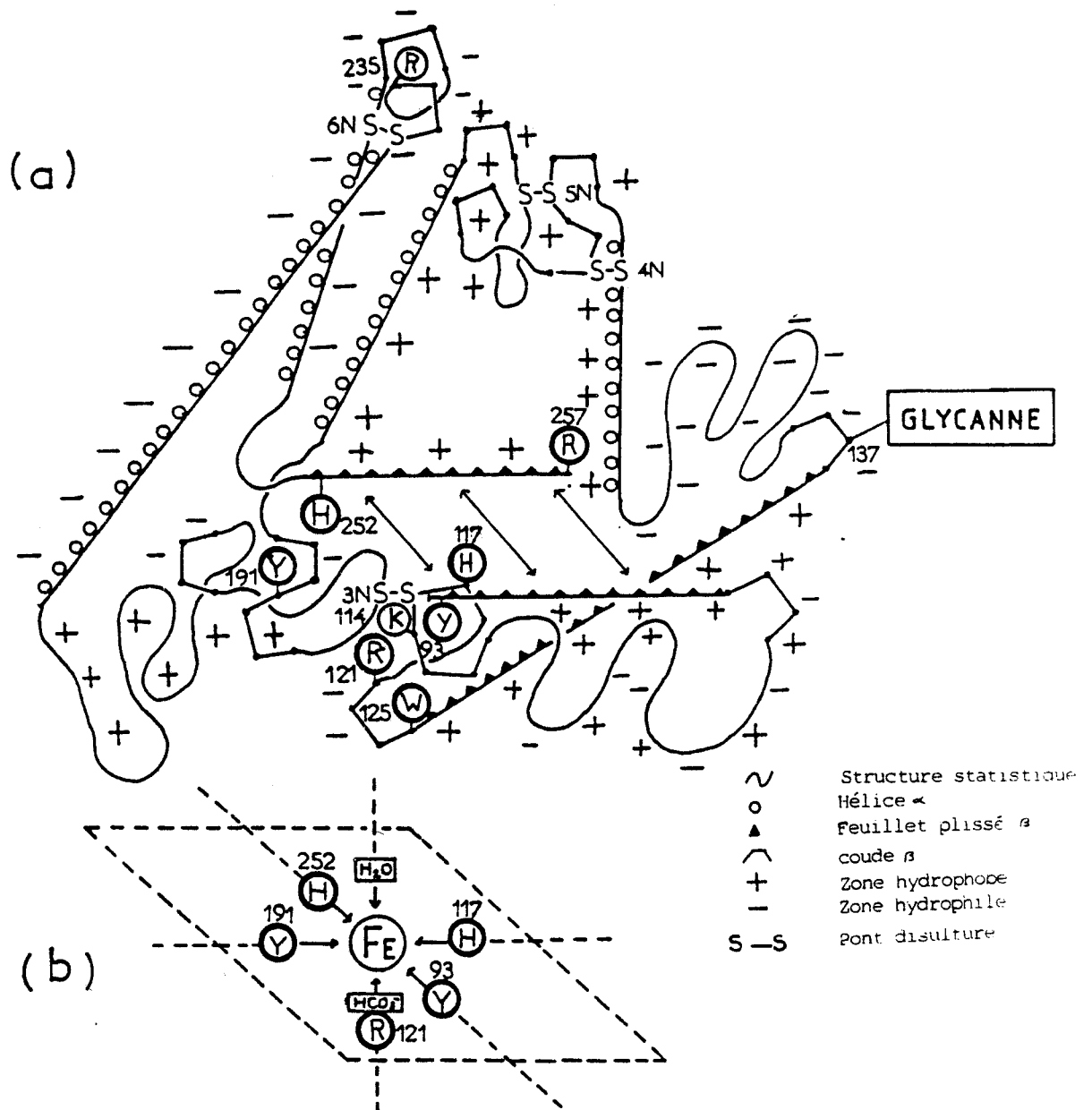
En ce qui concerne les possibilités, décrites antérieurement, d'interactions hydrophobes dans la région "inter-lobes", nous noterons l'existence d'une large zone hydrophobe dans la partie N-terminale du lobe C-terminal (résidu 377 à 418) ainsi que quelques zones hydrophobes dans l'extrémité C-terminale du lobe N-terminal (résidus 265 à 270, 283 à 289, 297 à 306, 316 à 319, 322 à 329). Toutes ces zones hydrophobes sont susceptibles d'intervenir dans l'interaction des fragments N-trp et C-trp.

A propos des sites de coupure par la trypsine, nous remarquerons qu'ils se situent dans des zones hydrophiles (résidus 91 et 257 dans le cas de l'obtention du glycopeptide N2 et résidu 281 dans le cas de l'obtention des fragments N-trp et C-trp). Ces zones sont donc probablement situées à la surface de la protéine ; dans 2 cas (résidus 91 et 281), elles sont situées dans un coude  $\beta$ .

### C. - Conformation hypothétique du site de fixation du fer contenu dans le glycopeptide N2

Dans la figure 28a, p. 120, nous proposons un schéma hypothétique de l'organisation des structures secondaires du glycopeptide N2. Ce schéma n'a d'autre prétention que de proposer une spatialisation des structures secondaires du glycopeptide N2 sur la base de contraintes structurales entraînées par la position des ponts disulfures, l'externalisation des zones hydrophiles et surtout le positionnement des ligands du fer. En vue de clarifier le schéma, quelques distorsions sont apportées dans les dimensions des différentes structures secondaires sur la chaîne peptidique.

Ainsi que nous l'avons décrit (p. 33 à 39), les ligands possibles du fer, situés en positions homologues dans les sites de fixation du fer de la lacto- et sérotransferrine humaines et de l'ovotransferrine de poule, sont



- Figure 28 -

Hypothèse (a) de l'organisation des structures secondaires du glycopeptide N2 et (b) de la position des ligands du site de fixation du fer (Y : tyrosine H : histidine , R : arginine ; K : lysine ; W tryptophane).

au nombre de : 2 tyrosines en positions 93 et 191, 2 histidines en positions 117 et 252, 1 acide aminé basique du type lysine en position 114 ou de type arginine en position 121 ou 235 ou 257.

Dans la tentative de mise en place des ligands du fer, nous constatons, d'une part, que la présence du pont disulfure 3N place en vis-à-vis 2 ligands éloignés de 75 résidus d'acides aminés : l'histidine 117 et la tyrosine 191. D'autre part, la tyrosine 93 et l'histidine 252, situés à chaque extrémité du glycopeptide N2, nécessitent un rapprochement dans l'espace, rendu possible par une association des structures en feuillets plissés  $\beta$  qui les contiennent. Dans le cas d'une association parallèle de ces feuillets plissés  $\beta$ , la tyrosine 93 et l'histidine 252 se positionnent en vis-à-vis tandis que l'arginine 257, située à l'autre extrémité des feuillets plissés  $\beta$ , est exclue du site de fixation du fer.

Ainsi que le propose le schéma hypothétique de la cage de fixation du fer (Fig. 28b, p. 120), le fer pourrait être complexé dans un même plan par les tyrosines 93 et 191 et par les histidines 117 et 252. La cinquième coordination du fer pourrait être assurée par l'ion bicarbonate lié à la lysine 114 ou plus probablement, selon ROGERS *et al.* (180), par une arginine : l'arginine 121. L'arginine 235, par sa position extérieure au site de fixation, semble exclue de la fixation du bicarbonate. La sixième coordination serait réalisée par une molécule d'eau (Travaux de KOENIG *et al.* (106).

Nous remarquerons que le tryptophane 125, bien que ne semblant pas participer à la fixation du fer, est très proche du site de fixation, ce qui rend possible la modification de ses propriétés spectrales (Travaux de TAN *et* WOODWORTH (209), TOMIMATSU *et al.* (212)).

#### D. - Conclusions

Nos travaux ont permis le calcul de la structure secondaire de la lactotransferrine humaine ainsi que le calcul des zones hydrophiles et hydrophobes de la protéine. Ces travaux apportent de précieux renseignements qui ne pourront être exploités efficacement que lorsque sera rendue possible l'analyse par diffraction aux rayons X de la conformation de la lactotransferrine humaine et du glycopeptide N2. Néanmoins, dans le cas du glycopeptide N2, le respect de certaines contraintes structurales nous ont permis de

proposer sa conformation hypothétique et plus particulièrement celle de la "cage" de fixation du fer où nous montrons que seules 2 tyrosines, 2 histidines, 1 arginine et une molécule d'eau sont susceptibles de lier l'ion ferrique.

---

CONCLUSIONS GENERALES

Les conclusions que nous pouvons tirer de notre travail, qui a consisté, d'une part, à isoler et étudier les différents domaines structuraux susceptibles de constituer la lactotransferrine humaine et d'autre part, à participer à la détermination des séquences primaire et secondaire complètes de la lactotransferrine, sont les suivantes :

I. - Nous avons isolé et caractérisé 5 fragments de la lactotransferrine : un fragment de 40.000 daltons obtenu par hydrolyse pepsique (C-pe) et correspondant à la moitié C-terminale de la molécule, 2 fragments de 45.000 et 40.000 daltons obtenus par hydrolyse par la protéase V8 de *Staphylococcus aureus* (C-V8<sub>1</sub> et C-V8<sub>2</sub>) correspondant également à la région C-terminale de la protéine et enfin 2 fragments de 30.000 et 50.000 daltons obtenus par hydrolyse tryptique N-trp et C-trp qui correspondent aux régions N- et C- terminales de la lactotransferrine. L'isolement de ces différents fragments met en évidence sur la lactotransferrine, 3 zones de sensibilité à la protéolyse, toutes situées dans la région N-terminale.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'étude des propriétés physicochimiques des fragments N-trp et C-trp obtenus avec un rendement important et qui représentent les deux lobes N- et C- terminaux de la lactotransferrine humaine. L'étude de leurs propriétés physicochimiques a permis de mettre en évidence les points suivants :

1. - Une différence d'ionisation caractérise chaque fragment N-trp et C-trp, le N-trp possédant un caractère plus acide que le C-trp.
2. - Les deux fragments N-trp et C-trp possèdent chacun un glycanne identique de type N-acétyllactosaminique.
3. - Les fragments N-trp et C-trp fixent réversiblement un ion ferrique.
4. - L'analyse par dichroïsme circulaire révèle un taux d'hélicité  $\alpha$  du fragment N-trp très inférieur (12 %) à celui du fragment C-trp (21,6 %) et à celui de la lactotransferrine (26 %).

5. - De puissantes interactions, probablement de type hydrophobe, maintiennent unis les lobes N- et C-terminaux de la lactotransferrine. Ces interactions semblent concerner la zone "interlobes" de la protéine ; elles sont réversibles et induisent des contraintes structurales particulièrement localisées dans le lobe N-terminal (modification de structures hélicoïdales). La réassociation des fragments N-trp et C-trp ne se réalise que lorsque ces fragments sont saturés en fer.

II. - Nous avons isolé par hydrolyse tryptique ménagée du fragment N-trp, un glycopeptide de 18.500 daltons capable de fixer un ion ferrique. Ce glycopeptide N2, le plus petit fragment isolé d'une transferrine et encore capable de fixer le fer, est susceptible de correspondre au domaine ND2 dont l'existence est sous-entendue par l'hypothèse de l'hexaplication d'un gène ancestral codant pour les transferrines. Nous avons pu mettre en évidence quelques unes de ses propriétés physicochimiques :

1. - Le glycopeptide N2 possède un caractère encore plus acide que le fragment N-trp dont il est issu.
2. - Il possède un glycanne de type N-acétyllactosaminique.
3. - L'analyse par résonance paramagnétique électronique du glycopeptide N2 natif met en évidence un spectre caractéristique de la fixation du fer par les transferrines.
4. - Le glycopeptide N2 fixe un ion ferrique mais dans les conditions que nous avons utilisées, cette fixation n'est pas réversible. Cette non-réversibilité peut s'expliquer, d'une part, par les conditions utilisées pour sa désaturation en fer et qui ont entraîné sa dénaturation, ou, d'autre part, par l'absence possible d'un ligand du fer dans le glycopeptide.
5. - L'analyse par dichroïsme circulaire du glycopeptide N2 révèle des taux de structures hélicoïdales différents en fonction de sa saturation en fer.



6. - La cristallisation du glycopeptide N2 est possible. Celle-ci permettra, dans un avenir proche, d'étudier la conformation du site de fixation du fer par la diffraction aux rayons X.

III. - Nous avons contribué à la détermination de la structure primaire complète et de la structure secondaire de la lactotransferrine humaine en collaboration avec l'équipe du *Professeur JOLLES*. En particulier :

1. - Nous avons isolé 3 peptides qui ont permis le réenchaînement de plusieurs autres peptides et fragments lors de la détermination de la séquence primaire de la lactotransferrine.
2. - Nous avons isolé 3 peptides renfermant de la cystine qui nous ont permis de caractériser les positions de 3 ponts disulfures : 4N, 6N et 7C et d'infirmier l'existence du pont 14N.
3. - Nous avons déterminé, par le calcul, les structures secondaires de la lactotransferrine, ainsi que la localisation des zones hydrophobes et hydrophiles sur la chaîne peptidique. Les renseignements apportés par ces travaux ne pourront être totalement exploitables que lors des études de la conformation de la lactotransferrine et du glycopeptide N2 par diffraction aux rayons X. Cependant, ils permettent déjà de proposer la configuration du site de fixation du glycopeptide N2 où 2 tyrosines, 2 histidines, 1 arginine et 1 molécule d'eau viendraient lier l'ion ferrique.

Les travaux que nous avons réalisés ouvrent un champ d'investigations important tant au point de vue de l'aspect structural que de l'aspect biologique. Ils permettent d'envisager en particulier :

1. - L'isolement des autres domaines de la lactotransferrine.
2. - L'étude de la conformation du site de fixation du fer du glycopeptide N2 par analyse en diffraction aux rayons X.

3. - Les rôles biologiques joués par les différents fragments que nous avons obtenus, en particulier dans leurs interactions avec les récepteurs membranaires de la lactotransferrine humaine ; ceci afin de déterminer, à l'échelle moléculaire, la nature exacte des interactions entre la lactotransferrine et ses récepteurs.

---

BIBLIOGRAPHIE

- 1 AASA (R.) *et* AISEN (P.) - (1968) J. Biol. Chem., 243, 2399 - 2404
- 2 AASA (R.), MALMSTROM (B.G.), SALTMAN (P.) *et* WANNGARD (T.) - (1963) Biochim. Biophys. Acta , 75, 203 - 222
- 3 ABOLA (J.E.) *et* WOOD (M.K.) - (1979) In abstracts of 4th International Conference on Proteins of Iron Metabolism - DAVOS.
- 4 ADDISON (J.M.), FITTON (J.E.), LEWIS (W.G.), MAY (K.) *et* HARRISON (P.M.) - (1983) F.E.B.S. Letters, 164, 139-144
- 5 AISEN (P.), AASA (R.), MALMSTROM (B.) *et* WANNGARD (T.) - (1967) J. Biol. Chem., 242, 2484
- 6 AISEN (P.) *et* LEIBMAN (A.) - (1971) Biochim. Biophys. Acta , 257, 314 - 323
- 7 AISEN (P.) *et* LISTOWSKY (I.) - (1980) Ann. Rev. Biochem., 49, 357 - 393
- 8 AL HILAL (P.), BAKER (E.), CARLISLE (C.H.), GORINSKI (B.), HORSBURG (R.L.), LINDLEY (P.F.), MOSS (D.S.), SCHNEIDER (H.) *et* STIMPSON (R.) - (1976) J. Mol. Biol., 108, 255 -257
- 9 AMBRUSO (D.R.) *et* JOHNSTON (R.B.) - (1981) J. Clin. Invest., 67, 352 - 360
- 10 ARNOLD (R.R.), RUSSEL (J.E.), CHAMION (W.J.), BREWER (M.) *et* GAUTHIER (J.J.) (1982) Infect. Immunity, 35, 792
- 11 AUBERT (J.B.), BISERTE (G.) *et* LOUCHEUX-LEFEBVRE (M.H.) - (1976) Arch. Biochem. Biophys., 175, 410 - 418
- 12 BAGBY (G.C.), RIGAS (V.D.), BENNET (R.M.), VANDENBARK (A.A.) *et* GAREWAL (H.S.) - (1981) J. Clin. Invest., 68, 56
- 13 BAKER (E.N.) *et* RUMBALL (S.V.) - (1977) J. Mol. Biol., 111, 207 - 210
- 14 BANYARD (S.H.), STAMMERS (D.K.) *et* HARRISON (P.M.) - (1978) Nature, 271, 282 - 284
- 15 BARKAN (G.) - (1927) Z. Physiol. Chem., 171, 194
- 16 BATES (G.W.) *et* SCHLABACH (M.R.) - (1973) J. Biol. Chem., 248, 3228 - 3232
- 17 BATES (G.W.), WORKMAN (E.F.) *et* SCHLABACH (M.R.) - (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun., 50, 84

- 18 BAUSE (E.), HETTKAMP (H.) *et* LEGLER (G.) - (1982) *Biochem. J.*, 203, 761 - 768
- 19 BEELEY (J.G.) - (1976) *Biochem. J.*, 159, 335 - 345
- 20 BEELEY (J.G.) - (1979) In *glycoconjugates* (Eds R. Schauer, P. Boer, E. Buddecke, M. F. Kramer, J. F. G. Vliegenthart *et* H. Wiegandt), pp. 712 - 713 - *Gt. Publ.*, STUTTGARD
- 21 BENNET (R.M.), EDDIE-QUATEY (A.C.) *et* HOLT (P.J.L.) - (1973) *Arthr. Rheum.*, 16, 186
- 22 BENNET (R.M.) *et* KOKOCINSKI (T.) - (1978) *Brit. J. Haematol.*, 39, 509
- 23 BERESFORD (C.H.), NEALE (R.J.) *et* BROOKS (O.G.) - (1971) *Lancet*, 1, 568 - 572
- 24 BEZKOROVAINY (A.) - (1966) *Biophys. Biochim. Acta* , 126, 286
- 25 BEZKOROVAINY (A.) *et* GROHLICH (D.) - (1971) *Biochem. J.*, 123, 125 - 126
- 26 BEZKOROVAINY (A.) *et* GROHLICH (D.) - (1972) *Biochim. Biophys. Acta* , 263, 645
- 27 BISERTE (G.), HAVEZ (R.) *et* CUVELIER (R.) - (1963) *Exp. Annu. Bioch. Med.*, 25, 85
- 28 BLANC (B.) - (1964) *Thèse Doct. ès Sciences*, éd. Médecine et Hygiène, GENEVE
- 29 BLUARD-DECONINCK (J.M.), MASSON (P.L.), OSINSKI (P.A.) *et* HEREMANS (J.F.) - (1974) *Biochim. Biophys. Acta* , 365, 311 - 317
- 30 BLUARD-DECONINCK (J.M.), WILLIAMS (J.), EVANS (R.W.), VAN SNICK (J.), OSINSKI (P.A.) *et* MASSON (P.L.) - (1978) *Biochem. J.* 171, 321 - 327
- 31 BOCK (K), ARNARP (J.) *et* LÖNNGREN (J) - (1982) *Eur. J. Biochem.*, 129, 171 - 178
- 32 BOXER (L.A.), BJORKSTEN (B.), BJORK (J.), YANG (H.H.), ALLEN (J.M.) *et* BAEHNER (R.L.) - (1982) *J. Lab. Clin. Med.*, 99, 867
- 33 BOXER (L.A.), HAAK (R.A.), YANG (H.H.), WOLACH (J.B.), WHITCOMB (J.A.), BUTTERICK (C.J.) *et* BAEHNER (R.L.) - (1982) *J. Clin. Invest.*, 7, 1049
- 34 BRINES (R.D.) *et* BROCK (J.H.) - (1983) *Biochim. Biophys. Acta* , 759, 229 - 235
- 35 BRISSON (J.R.) *et* CARVER (J.P.) - (1983) *Biochemistry* , 129, 171 - 178
- 36 BRISSON (J.R.) *et* CARVER (J.P.) - (1983) *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, 61, 1067 - 1078

- 37 BROCK (J.H.) *et* ARZABE (F.R.) - (1976) F.E.B.S. Letters, 69/1, 63 - 66
- 38 BROEKHUYSE (R.N.) - (1974) Invest. Ophthalmol., 13, 550
- 39 BROXMEYER (H.E.), SMITHYMAN (A.), EGER (R.R.), MEYERS (P.A.) *et* DE SOUSA (M.) - (1978) J. Exp. Med., 148, 1052 - 1067
- 40 BRUNE (J.E.L.), MARTIN (S.R.), BOYD (B.S.), PALMOUR (R.M.) *et* SUTTON (H.E.) (1978) Tex. Rep. Biol. Med., V36, 47 - 61
- 41 BULLEN (J.J.), ROGERS (H.J.) *et* GRIFFITHS (E.) - (1974) In "Microbial Iron Metabolism" - (J.B. Nielands Eds.), Academic Press, NEW YORK - p. 517
- 42 BULLEN (J.J.), ROGERS (H.J.) *et* LEIGH (L.) - (1972) Brit. Med. J., 1, 69 - 75
- 43 CAMPBELL (E.J.) - (1982) Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 6941 - 6945
- 44 CAMPBELL (R.F.) *et* CHASTEEN (N.D.) - (1977) J. Biol. Chem., 252, 5996 - 6001
- 45 CANNON (J.L.) *et* CHASTEEN (N.D.) - (1975) Biochemistry , 14, 4573 - 4577
- 46 CASTNER (J.), NEWELL (G.S.), MOLTON (W.C.) *et* STICHTER (C.P.) - (1960) J. Chem. Phys., 32, 668
- 47 CHASTEEN (N.D.) - (1977) Coord. Chem. Rev., 22, 1 - 36
- 48 CHASTEEN (N.D.) - (1983) Trends Biochem. Sci., 8, 272 - 275
- 49 CHASTEEN (N.D.), WHITE (L.K.) *et* CAMPBELL (R.F.) - (1977) Biochemistry , 16, 363 - 368
- 50 CHERON (A.) - (1975) Thèse Doct. ès Sci., LILLE
- 51 CHOU (P.Y.) *et* FASMAN (G.D.) - (1974) Biochemistry , 13, 211 - 245
- 52 CID (H.), BUNSTER (M.), ARRIAGADA (E.) *et* CAMPOS (M.) - (1982) F.E.B.S. Letters , 150, 247 - 254
- 53 CLEMENTE (F.), RIBEIRO (T.) COLOMB (E.), FIGARELLA (C.) *et* SALES (H.) - (1971) Biochim. Biophys. Acta , 251, 456
- 54 COOK (J.D.), MARSAGLIA (G.) *et* ESCHBACH (J.) - (1970) J. Clin. Invest., 49 197 - 205
- 55 COX (T.M.), MAZURIER (J.), SPIK (G.), MONTREUIL (J.) *et* PETERS (T.F.) - (1979) Biochim. Biophys. Acta , 588, 120 - 128

- 56 DEISENHOFER (J.) - (1981) *Biochemistry* , 20, 2361 - 2370
- 57 DEISENHOFER (J.), COLMAN (P.M.), EPP (O.) et HUBER (R.) - (1976) *Z. Physiol. Chem.*, 357, 1421 - 1434
- 58 DE SOUSA (M.) - (1978) *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 32, 393 - 409
- 59 DE VET (B.) et VAN GOOL (J.) - (1974) *Acta. Med. Scand.*, 196, 393 - 402
- 60 DONOVAN (J.W.), BEADSLEE (R.A.) et ROSS (K.P.) - (1976) *Biochem. J.*, 153, 631 - 639
- 61 DONOVAN (J.W.) et ROSS (K.) - (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 6026
- 62 DORLAND (L.), HAVERKAMP (J.), Vliegenthart (J.), SPIK (G.), FOURNET (B.) et MONTREUIL (J.) - (1979) *Eur. J. Biochem.*, 100, 569 - 574
- 63 DOUY (A.) et GALLOT (B.) - (1980) *Biopolymers* , 19, 493 - 507
- 64 DOWLE (G.B.), SCHACHTER (D.) et SHENKER (H.) - (1960) *Am. J. Physiol.*, 198 609
- 65 DRYSDALE (J.W.) - (1977) *CIBA Symp.*, 51, 41 - 57
- 66 DRYSDALE (J.W.), AROSIO (P.) et ADELMAN (T.) - (1975) *In Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine - CRICHTON ed.*, AMSTERDAM., 359 - 366
- 67 DUBACH (R.), CALLENDER (S.T.E.) et MOORE (C.V.) - (1948) *Blood* , 3, 526 - 542
- 68 ELLEMAN (T.C.) et WILLIAMS (J.) - (1970) *Biochem. J.*, 116, 515 - 535
- 69 ESPARZA (I.) et BROCK (J.H.) - (1980) *Biochim., Biophys., Acta*, 622, 297-307
- 70 EVANS (R.W.) et WILLIAMS (J.) - (1978) *Biochem. J.*, 173, 543 - 552
- 71 FAUST (C.H.), TENGEDY (R.P.) - (1971) *Immunochemistry* , 8, 211
- 72 FEENEY - (1951) *Biochim. Biophys. Acta.*, 34, 196
- 73 FORTH (W.) et RUMMEL (W.) - (1973) *Physiological Reviews* , 53/3, 746 - 753
- 74 GABER (B.P.), MISKOWSKI (V.) et SPIRO (T.G.) - (1974) *J. Amer. Chem. Soc.*, 96, 6868
- 75 GARNIER (J.), OSGUTHORPE (D.J.) et ROBSON (B.) - (1978) *J. Mol. Biol.*, 120 97 - 120

- 76 GORINSKI (B.), HORSBURGH (C.), LINDLEY (P.F.), MOSS (D.S.), PARKAV (M.)  
et WATSON (J.C.) - (1979) *Nature* , 281, 157 - 158
- 77 GRAHAM (I.) et WILLIAMS (J.) - (1975) *Biochem. J.*, 145, 263 - 279
- 78 GRANICK (S.) - (1954) *Bull. N.Y. Acad. Med.*, 30, 81
- 79 GUTTERIDGE (J.M.C.), PATERSON (S.K.), SEGAL (A.W.) et HALLIWELL (B.) -  
(1981) *Biochem. J.*, 199, 259 - 261
- 80 HABER (F.) et WEISS (J.) - (1934) *Proc. R. Soc. Edinb.*, 147, 332 - 351
- 81 HAHN (P.F.), JONES (E.), LOWE (R.L.), MENEELY (G.R.) et PEACOCK (W.) -  
(1945) *Amer. J. Physiol.*, 143, 191
- 82 HARRIS (D.C.) - (1977) *Biochemistry* , 16, 560 - 564
- 83 HARRIS (D.C.), GRAY (G.A.) et AISEN (P.) - (1974) *J. Mol. Chem.*, 249, 5261
- 84 HASHIZUME (S.), KURODA (K.) et MURAKAMI (H.) - (1983) *Biochim. Biophys.*  
*Acta* , 763, 377 - 382
- 85 HEAPHY (S.) et WILLIAMS (J.) - (1982) *Biochem. J.*, 205, 611 - 617
- 86 HECKMAN (A.M.) et RUKME (P.) - (1969) *Fert., Steril.*, 20, 312
- 87 HELBOCK (H.J.) et SALTMAN (P.) - (1967) *Biochim. Phyophys. Acta* , 135, 979
- 88 HEUSTERPREUTE (M.) et CRICHTON (R.R.) - (1981) *F.E.B.S. Letters* , 129,  
322 - 327
- 89 HORWITZ (D.A.), BAKKE (A.C.), ABO (W.) et NISHIYA (K.) - (1984) *J. Immu-*  
*nol.*, 132, 2370 - 2374
- 90 HUBER (R.) - (1976) *Trends Biochem. Sci.*, 1, 174 - 178
- 91 HUBER (R.) - (1980) *Klin. Wochenschr.*, 58, 1217 - 1231
- 92 HUBER (R.), DEISENHOFER (J.), COLMAN (P.M.), MATSUSHIMA (M.) et PALM (W.) -  
(1976) *Nature* , 264, 415 - 420
- 93 HUEBERS (H.A.), HUEBERS (E.), CSIBA (E.), RUMMEL (W.) et FINCH (C.A.) -  
(1983) *Blood* , 61, 283 - 290
- 94 HUEBERS (H.A.), HUEBERS (E.), FINCH (C.A.) et MARTIN (A.W.) - (1982) *J.*  
*Comp. Physiol.*, 148, 101 - 109
- 95 IZHAR (M.), NUCHAMOWITZ (Y.) et MIRELMAN (D.) - (1982) *Infect. Immunity* ,  
35, 1110 - 1118
- 96 JELTSCH (J.M.) et CHAMBON (P.) - (1982) *Eur. J. Biochem.*, 122, 291 - 295



- 97 JOHANSSON (B.) - (1960) Acta. Chem. Scand., 14, 510
- 98 JOLLES (J.), MAZURIER (J.), BOUTIGUE (M.H.), SPIK (G.), MONTREUIL (J.) et JOLLES (P.) - (1976) F.E.B.S. Letters , 69, 27 - 31
- 99 JORIEUX (S.) - (1983) Thèse Doct. 3e cycle - LILLE
- 100 JORIEUX (S.), SPIK (G.), MAZURIER (J.), NAVARRO (J.), ROMOND (C.) et MONTREUIL (J.) - (1983) Annales de Nestlé - (sous presse)
- 101 KAMPSCHMIDT (R.F.) et PULLIAM (L.A.) - (1975) Res. J. Reticuloendoth. Soc., 17, 162 - 169
- 102 KEUNG (W.M.), AZARI (P.) et PHILLIPS (J.L.) - (1982) J. Biol. Chem., 257, 1177 - 1183
- 103 KIJLSTRA (A.) et BROERSMA (L.) - (1984) Clin. Exp. Immunol., 55, 459 - 464
- 104 KINGSTON (I.B.) et WILLIAMS (J.) - (1975) Biochem. J., 147, 463 - 472
- 105 KIRKPATRICK (C.H.), GREEN (J.), RICH (R.R.) et SCHADE (A.L.) - (1971) J. Infect. Dis., 124, 539
- 106 KOENIG (S.) et SCHILLINGER (W.) - (1969) J. Biol. Chem., 244, 3283
- 107 KYTE (J.) et DOOLITTLE (R.F.) - (1982) J. Mol. Biol., 157, 105 - 132
- 108 LAUFBERGER (V.) - (1937) Bull. Soc. Chim. Biol., 19, 1575 - 1582
- 109 LAURELL (C.B.) et INGELMAN (B.) - (1947) Acta. Chem. Scand., 1, 770
- 110 LEFFELL (M.S.) et SPITZNAGEL (J.K.) - (1972) Infect. Immunity , 6, 761 - 765
- 111 LEGER (D.), TORDERA (V.), SPIK (G.), DORLAND (L.), HAVERKAMP (J.) et VLIEGENTHART (J.F.G.) - (1978) F.E.B.S. Letters , 93, 255 - 260
- 112 LEGRAND (D.) MAZURIER (J.), METZ-BOUTIGUE (M.H.), JOLLES (J.), JOLLES (P.), MONTREUIL (J.) et SPIK (G.) - (1984) Biochim. Biophys. Acta , 787, 90 - 96
- 113 LEHRER (S.S.) - (1969) J. Biol. Chem., 244, 3613 - 3617
- 114 LESTAS (A.) - (1976) Brit. J. Haematol., 32, 341 - 350
- 115 LIM (V.I.) - (1974) J. Mol. Biol., 88, 873 - 894
- 116 LINE (W.F.), SLY (D.A.) et BEZKOROVAINY (A.) - (1976) Int. J. Biochem., 7, 203 - 208

- 117 LINEBACK-ZINS (J. *et* BREW (K.)) - (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 708 - 713
- 118 LUK (C.K.) - (1971) *Biochemistry* , 10, 2838 -2844
- 119 MAC CLELLAND (D.B.L.), Mc GRATH (J.) *et* SAMSON (R.R.) - (1978) *Acta Paediatr. Scand.*, S 271, 3
- 120 MAC GILLIVRAY (R.T.A.) *et* BREW (K.) - (1975) *Science* , 190, 1306 - 1307
- 121 MAC GILLIVRAY (R.T.A.), MENDEZ (E.) *et* BREW (K.) - (1977) In *Proteins of Iron Metabolism* (E.B. Brown, P. Aisen, J. Fielding, R.R. Crichton, Eds. ) - Grune and Stratton, NEW YORK., pp. 133 - 141
- 122 MAC GILLIVRAY (R.T.A.), MENDEZ (E.), SHEWALE (J.G.), SINHA (C.K.), LINEBACK-ZINS (J.) *et* BREW (K.) - (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 3543 - 3553
- 123 MAC GILLIVRAY (R.T.A.), MENDEZ (E.), SINHA (S.K.), SUTTON (M.R.) , LINEBACK-ZINS (J.) *et* BREW (K.) - (1982) - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79, 2504 - 2508
- 124 MAKEY (D.G.), SEAL (V.S.)*et* MALMQUIST (J.) - (1976) *Biochim. Biophys. Acta* , 453, 250 - 256
- 125 MARTIN (A.W.), HUEBERS (E.) *et* WEBB (J.M.) - (1983) In *Structure and Function of Iron Storage and Transport Proteins* (Urushizaki (I.), Aisen (P.), Listowsky (I.) and Drysdale (J.W.) eds., Elsevier Biochemical, NEW YORK - pp. 259 - 260
- 126 MARX (J.J.M.), LIGDEUR (M.C.), GEERTSEMA (J.) *et* SCHUURMAN (H.J.) - (1984) *Abstracts of the Iron Club Meeting*, 10 - 13 juillet, RENNES, FRANCE
- 127 MASSON (P.L.) - (1970) "La Lactotransferrine", *Collection Médico Monographies d'Agrégés*, (S.A. Arscia Eds.), BRUXELLES - pp. 93
- 128 MASSON (P.L.) *et* HEREMANS (J.F.) - (1966) In "Protides of Biological Fluids" (H. Peeters Eds.), Elsevier, AMSTERDAM - 14, p. 115
- 129 MASSON (P.L.) *et* HEREMANS (J.F.) - (1971) *Comp. Biochem. Physiol.*, 39 B, 119
- 130 MASSON (P.L.), HEREMANS (J.F.), PROGNOT (J.) *et* WAUTERS (G.) - (1966) *Thorax* , 21, 538
- 131 MASSON (P.L.), HEREMANS (J.F.) *et* SCHÖNNE (E.) - (1969) *J. Exp. Med.*, 130 643
- 132 MATSUMOTO (A.), YOSHIMA (H.), TAKASAKI (S.) *et* KOBATA (A.) - (1982) *J. Biochem.*, 91, 143
- 133 MAZURIER (J.) - (1980) *Thèse Doct. ès Sci.* - LILLE

- 134 MAZURIER (J.), AUBERT (J.P.), LOUCHEUX-LEFEBVRE (M.H.) *et* SPIK (G.) - (1976) F.E.B.S. Letters , 66, 238 - 242
- 135 MAZURIER (J.), LEGER (D.), MONTREUIL (J.) *et* SPIK (G.) - (1984) Soumis à Biochim. Biophys. Acta
- 136 MAZURIER (J.), LEGER (D.), TORDERA (V.), MONTREUIL (J.) *et* SPIK (G.) - (1981) Eur. J. Biochem., 119, 537 - 543
- 137 MAZURIER (J.), LHOSTE (J.M.), MONTREUIL (J.) *et* SPIK (G.) - (1983) Biochim. Biophys. Acta , 745, 44 - 49
- 138 MAZURIER (J.), LHOSTE (J.M.), SPIK (G.) *et* MONTREUIL (J.) - (1977) F.E.B.S. Letters , 81, 371 - 375
- 139 MAZURIER (J.), METZ-BOUTIGUE (M.H.), JOLLES (J.), SPIK (G.), MONTREUIL (J.) *et* JOLLES (P.) - (1983) Experientia , 39, 135 - 141
- 140 MAZURIER (J.) *et* SPIK (G.) - (1980) Biochim. Biophys. Acta , 629, 399 - 408
- 141 MAZURIER (J.), SPIK (G.) *et* MONTREUIL (J.) - (1974) F.E.B.S. Letters , 48 262 - 265
- 142 MAZURIER (J.), SPIK (G.) *et* MONTREUIL (J.) - (1984) Abstracts of the Iron Club Meeting, 10 - 13 juillet - RENNES, FRANCE
- 143 MEARES (C.F.) *et* LEDBETTER (J.E.) - (1977) Biochemistry , 16, 5178
- 144 METCALF (D.) - (1974) In : Control of proliferation in animal cells. - R. Baserga Eds., Cold Spring Harbor Laboratory - NEW YORK - pp. 887 - 905
- 145 METZ-BOUTIGUE (M.H.), JOLLES (J.), JOLLES (P.), MAZURIER (J.), SPIK (G.) *et* MONTREUIL (J.) - (1980) Biochim. Biophys. Acta , 622, 308 - 314
- 146 METZ-BOUTIGUE (M.H.), JOLLES (J.), MAZURIER (J.), SPIK (G.), MONTREUIL (J.) *et* JOLLES (P.) - (1982) F.E.B.S. Letters , 142, 107 - 110
- 147 METZ-BOUTIGUE (M.H.), JOLLES (J.), MAZURIER (J.), SCHOENTGEN (F.), LEGRAND (D.), SPIK (G.), MONTREUIL (J.) *et* JOLLES (P.) - (1984) Eur. J. Biochem., sous presse
- 148 METZ-BOUTIGUE (M.H.), JOLLES (J.), MAZURIER (J.), SPIK (G.), MONTREUIL (J.) *et* JOLLES (P.) - (1978) Biochimie , 60, 557 - 561
- 149 METZ-BOUTIGUE (M.H.), JOLLES (J.), MAZURIER (J.), SPIK (G.), MONTREUIL (J.) *et* JOLLES (P.) - (1981) F.E.B.S. Letters , 132, 239 - 242
- 150 METZ-BOUTIGUE (M.H.), MAZURIER (J.), JOLLES (J.), SPIK (G.), MONTREUIL (J.) *et* JOLLES (P.) - (1981) Biochim. Biophys. Acta , 670, 243 - 254

- 151 MEYER (B.) - (1983) Proc. 7th Intern. Symp. on Glycoconjugates (A. Chester, D. Heinegard, A. Lundblad, D. Svenson Eds.) Rhams, Lund - p. 126
- 152 MINATO (N.L.), REID (H.), CANTOR (H.), LENGYL (P.) et BLOOM (B.) - (1980) J. Exp. Med., 152, 126
- 153 MOGUILEVSKI (N.), RETEGUI (L.A.), COURTOY (P.J.), CASTRACANE (C.E.) et MASSON (P.L.) - (1984) Laboratory Invest., 50, 335 - 340
- 154 MONTREUIL (J.) - (1975) Pure and Appl. Chem., 42, 431 - 477
- 155 MONTREUIL (J.) - (1980) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 37, 157
- 156 MONTREUIL (J.) - (1983) Biochem. Soc. Trans., 11, 134
- 157 MONTREUIL (J.) - (1984) Pure and Appl. Chem., 56, 859 - 877
- 158 MONTREUIL (J.), FOURNET (B.), SPIK (G.) et STRECKER (G.) - (1978) C.R. Acad. Sci. PARIS., 287D, 837 - 840
- 159 MONTREUIL (J.) et MULLET (S.) - (1960) C.R. Acad. Sci. PARIS., 250, 1736
- 160 MONTREUIL (J.), SPIK (G.) et CHOSSON (A.) - (1962) C.R. Acad. Sci. PARIS., 255, 3493
- 161 MONTREUIL (J.), TONNELAT (J.) et MULLET (S.) - (1960) Biochim. Biophys. Acta, 45, 413 - 421
- 162 MOORE (C.V.), DUBACH (R.), MINNINCH (V.) et ROBERTS (H.K.) - (1944) J. Clin. Invest., 23, 755
- 163 MORGAN (O.S.), BANKAY (J.) et QUASH (G.A.) - (1975) W. I. Med. J., XXIV, 46
- 164 NAGASAWA (T.), KIYOSAWA (I.) et KUWAHARA (K.) - (1972) J. Dairy Sci., 55, 1651
- 165 NAGY (B.) et LEHRER (S.S.) - (1972) Arch. Biochem. Biophys., 148, 27 - 36
- 166 NEUBERGER (A.) et MARSHALL (R.D.) - (1969) In Carbohydrates and their Roles (Eds. H.W. Schultze, R.F. Cain, R.W. Wrolstead) - Avi, Westport, Conn., USA - pp. 115 - 132
- 167 ORAM (J.D.) et REITER (B.) - (1968) Biochim. Biophys. Acta, 170, 351
- 168 OSEAS (R.), YANG (H.H.), BAEHNER (R.L.) et BOXER (L.A.) - (1981) Blood, 57, 939
- 169 OUCHTERLONY (O.) - (1949) Acta. Pathol. Microbiol. Scand., 26, 507
- 170 PEKAREK (R.S.), BOSTIAN (K.A.), BARTELONY (P.J.), CALIA (F.M.) et BEISEL (W.R.) - (1969) Amer. J. Med. Sci., 258, 14 - 25

- 171 PERRAUDIN (J.P.) *et* PRIEELS (J.P.) - (1982) *Biochim. Biophys. Acta* , 718  
42 - 48
- 172 PHILLIPS (J.L.) *et* AZARI (P.) - (1972) *Arch. Biochem. Biophys.*, 151, 445
- 173 PRIEELS (J.P.), PIZZO (S.V.), GLASGOW (L.R.), PAULSON (J.C.) *et* HILL (R.L.)  
(1978) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75, 2215
- 174 PRINCIOTTO (J.V.) *et* ZAPOLSKI (E.J.) - (1975) *Nature* , 255, 87 - 88
- 175 RADEMACHER (T.W.), HOMANS (S.W.), FERNANDES (D.L.), DWEK (R.A.), MIZUOCHI  
(T.), TANIGUCHI (T.) *et* KOBATA (A.) - (1983) *Biochem. Soc. Trans.*,  
11, 132 - 134
- 176 REITER (B.), BROCK (J.H.) *et* STEEL (E.D.) - (1975) *Immunology* , 28, 83
- 177 RETEGUI (L.A.), MOGUILEVSKI (N.), CASTRACANE (C.E.) *et* MASSON (P.L.) -  
(1984) *Laboratory Invest.*, 50, 323 - 328
- 178 RIVIER (D.), PAGE (N.) *et* ISLIKER (H.) - (1983) *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*  
134C, 25
- 179 ROGERS (H.J.) - (1976) *Immunology* , 30, 425 - 433
- 180 ROGERS (T.B.), BØRESEN (T.) *et* FEENEY (R.E.) - (1978) *Biochemistry* , 17,  
1105 - 1109
- 181 ROGERS (T.B.), GOLD (R.A.) *et* FEENEY (R.E.) - (1977) *Biochemistry* , 16,  
2299 - 2305
- 182 ROGERS (H.J.) *et* SYNGE (C.) - (1978) *Immunology* , 34, 19 - 28
- 183 ROSENEV-MORTREFF (M.V.), SOETEWEEY (F.), LAMOTE (R.) *et* PEETERS (H.) -  
(1971) *Biopolymers* , 10, 1039
- 184 RUKME (P.), VISSER (D.), KWA (H.G.) *et* HART (A.A.M.) - (1971) *Folia. Med.*  
*Neerl.*, 14, 156
- 185 SCHADE (A.) *et* CAROLINE (L.) - (1944) *Science* , 100, 14
- 186 SCHADE (A.), REINHART (R.W.) *et* LEVY (H.) - (1949) *Arch. Biochem.*, 20, 170
- 187 SCHLABACH (M.R.) *et* BATES (G.W.) - (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 2182 - 2188
- 188 SHEWALE (J.G.) *et* BREW (K.) - (1982) *J. Biol. Chem.*, 257, 9406 - 9415
- 189 SIIMES (M.A.), VVORI (E.) *et* KUITUNEN (P.) - (1979) *Acta. Pediatr. Scand.*,  
68, 29 - 31
- 190 SPIK (G.) - (1971) *Ann. Nutr. Alim.*, 25, A81 - A134
- 191 SPIK (G.), BAYARD (B.), FOURNET (B.), STRECKER (G.), BOUQUELET (S.) *et*  
MONTREUIL (J.) - (1975) *F.E.B.S. Letters* , 50, 296 - 299

- 192 SPIK (G.), BRUNET (B.), MAZURIER-DEHAINE (C.), FONTAINE (G.) et MONTREUIL (J.) - (1982) Acta. Pediatr., 71, 979
- 193 SPIK (G.), CHERON (A.), MONTREUIL (J.) et DOLBY (J.) - (1978) Immunology , 33, 663 - 671
- 194 SPIK (G.), DEBRUYNE (V.) et MONTREUIL (J.) - (1982) Falk Symposium n° 34 on Structural Carbohydrate in the Liver, BASEL, p. 42
- 195 SPIK (G.), FOURNET (B.), BAYARD (B.), VANDERSYPPE (R.), STRECKER (G.), BOUQUELET (S.), CHARET (P.) et MONTREUIL (J.) - (1974) Arch. Intern. Physiol. Biochim., 82, 791
- 196 SPIK (G.), FOURNET (B.) et MONTREUIL (J.) - (1979) C.R. Acad. Sci. PARIS - 288, 967 - 970
- 197 SPIK (G.), MAZURIER (J.), LEGRAND (D.), DEBRUYNE (V.) et MONTREUIL (J.) - (1983) In Structure and function of Iron Storage and Transport Proteins (Urushizaki (I.), Aisen (P.), Listowski (I.) and Drysdale (J.W.) Eds.) - Elsevier, AMSTERDAM - pp. 223 - 230
- 198 SPIK (G.), MONSIGNY (M.) et MONTREUIL (J.) - (1966) C.R. Acad. Sci., PARIS 263, 893 - 896
- 199 SPIK (G.) et MONTREUIL (J.) - (1983) Bull. Eur. Physiopathol. Resp., 19, 123 - 130
- 200 SPIK (G.), STRECKER (G.), FOURNET (B.), BOUQUELET (S.), MONTREUIL (J.), DORLAND (L.), VAN HALBEEK (H.) et VLIAGENTHART (J.F.G.) - (1982) Eur. J. Biochem., 121, 413 - 419
- 201 SPIK (G.), VANDERSYPPE (R.), FOURNET (B.), BAYARD (B.), CHARET (P.), BOUQUELET (S.), STRECKER (G.) et MONTREUIL (J.) - (1973) In Actes du Colloque Intern. n° 221 sur les Glycoconjugués - CNRS, PARIS - pp. 111 - 130
- 202 SPIK (G.), VANDERSYPPE (R.), FOURNET (B.), CHARET (P.), BOUQUELET (S.), STRECKER (G.) et MONTREUIL (J.) - (1974) Actes Coll. Intern. n° 221, 483 - 500
- 203 SPIK (G.), VANDERSYPPE (R.), MONTREUIL (J.), TETAERT (D.) et HAN (K.K.) - (1974) F.E.B.S. Letters , 38, 213 - 216
- 204 STARKENSTEIN (E.) - (1934) In Handbick des Exptl. Pharmacology, (A. Heffter et W. Heurner Ed.), BERLIN - pp. 682 - 686
- 205 STEPHENS (S.), DOLBY (J.B.), MONTREUIL (J.) et SPIK (G.) - (1980) Immunology , 41, 597 - 603
- 206 SUTTON (B.J.) et PHILLIPS (D.C.) - (1983) Biochem. Soc. Trans., 11, 130 - 132
- 207 TAN (A.H.) - (1971) Can. J. Biochem., 49, 1971 - 1975

- 208 TAN (A.T.) *et* WOODWORTH (R.C.) - (1969) *Biochemistry* , 819, 3711 - 3716
- 209 TAN (A.T.) *et* WOODWORTH (R.C.) - (1970) *J. Polym. Sci. Part C.*, 599
- 210 TERENT (A.), HALL (R.), GREN (R.), VENGE (P.) *et* BERGSTROM (K.) - (1981) *Sroke* , 12, 40
- 211 TEUWISSEN (B.), MASSON (P.L.), OSINSKI (P.) *et* HEREMANS (J.F.) - (1972) *Eur. J. of Biochem.*, 31, 239 - 245
- 212 TOMIMATSU (Y.) *et* DONOVAN (J.W.) - (1976) *F.E.B.S. Letters* , 71/2, 299 - 302
- 213 TOMIMATSU (Y.), KINT (S.) *et* SCHERER (J.R.) - (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 54, 1067
- 214 TOMIMATSU (Y.) *et* VICKERY (L.E.) - (1972) *Biochim. Biophys. Acta* , 285, 72 - 83
- 215 TURNBULL (A.) - (1974) *In Iron in Biochemistry and Medecine*, (A. Jacobs and Worwood Ed.), Acad. Press, LONDON - pp. 370 - 404
- 216 UZAN (G.), FRAIN (M.), PARK (I.), BESMOND (C.), HAESSEN (G.), TREPAT (J.S.), ZAKIN (M.M.) *et* KAHN (A.) - (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 119, 273 - 281
- 217 VAN GUT (H.), VAN GOOL (J.), LADIGES (N.C.J.J.) *et* BOERS (W.) - (1975) *Quat. J. Exp. Physiol.*, 60, 79
- 218 VAN HALBECK (H.), DORLAND (L.), VLIEGENTHART (J.F.G.), SPIK (G.), CHERON (A.) *et* MONTREUIL (J.) - (1981) *Biophys. Biochim. Acta* , 685, 293-296
- 219 VAN SNICK (J.L.), MARKOWETZ (B.) *et* MASSON (P.L.) - (1977) *J. Exp. Med.*, 146, 817 - 827
- 220 VEERHUIS (R.) *et* KIJLSTRA (A.) - (1982) *Exp. Eye Res.*, 34, 257
- 221 VENTURA (M.), BASTOS ARAGAO (J.) *et* IKEMOTO (H.) - (1973) *An. Acad. Brasil. Liène* , 45, 450 - 452
- 222 VLIEGENTHART (J.F.G.), VAN HALBECK (H.) *et* DORLAND (L.) - (1981) *Pure and Appl. Chem.*, 53, 45 - 77
- 223 WARIN (V.), BAERT (R.), FOURET (G.), STRECKER (G.), SPIK (G.), FOURNET (B.) *et* MONTREUIL (J.) - (1979) *Carbohydr. Res.*, 76, 11 - 22
- 224 WARIN (V.), PEREZ (S.) *et* MONTREUIL (J.) - (Résultats non publiés)
- 225 WARNER (R.C.) *et* WEBER (I.) - (1952) *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 5094 - 5101
- 226 WEINBERG (E.D.) - (1974) *Science* , 184, 952 - 956

- 227 WILLIAMS (J.) - (1982) *Biochem. J.*, 201, 647 - 651
- 228 WILLIAMS (J.) - (1974) *Biochem. J.*, 141, 745 - 752
- 229 WILLIAMS (J.) - (1975) *Biochem. J.*, 149, 237 - 244
- 230 WILLIAMS (J.), ELLEMAN (T.C.), KINGSTON (J.B.), WILKINS (A.G.) *et* KUHN (K.A.) - (1982) *Eur. J. Biochem.*, 122, 297 - 303
- 231 WILLIAMS (J.), GRACE (S.A.) *et* WILLIAMS (J.M.) - (1982) *Biochem. J.*, 201 417 - 419
- 232 WINDLE (J.J.), WIERSEMA (A.K.), CLARK (J.R.) *et* FEENEY (R.E.) - (1963) *Biochemistry*, 216, 1341 - 1346
- 233 WINTERBOURN (C.C.) - (1983) *Biochem. J.*, 210, 15 - 19
- 234 WOODWORTH (R.C.) *et* BROWN-MASSON (A.) - (1983) In *Structure and Function of Iron Storage and Transport Proteins* (Urushizaki (I.), Aisen (P.), Listowski (I) and Drysdale (J.W.), Eds), Elsevier, AMSTERDAM, pp. 247-251
- 235 WOODWORTH (R.) *et* SCHADE (A.) - (1961) *Biochim. Biophys. Acta*, 47, 403
- 236 WUSTEFELD (C.) *et* CRICHTON (R.R.) - (1982) *F.E.B.S. Letters*, 150, 43 - 48
- 237 WYLLIE (J.L.) *et* KAUFMAN (N.) - (1971) *Brit. J. Haematol.*, 20, 321 - 327
- 238 YANG (F.), LUM (J.B.), Mc GILL (J.R.), MOORE (C.M.), NAVLOR (S.L.), VAN BRAGT (P.H.), BALDWIN (W.D.) *et* BOWMAN (B.H.) - (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81, 2752 - 2756
- 239 YEM (Y.), IWAI (S.) *et* FEENEY (R.) - (1979) *Biochemistry*, 18, 882 - 889
- 240 YON (J.M.) - (1978) *Biochimie*, 60, 581 - 591
- 241 YOSHINO (Y.), HISAYASU (S.), ORIMO (H.) *et* HIRAI (Y.) - (1983) In *Structure and Function of Iron Storage and Transport Proteins* (Urushizaki (I.), Aisen (P.), Listowski (I.), Drysdale (J.W.) Eds.) - Elsevier, AMSTERDAM - pp. 419 - 421
- 242 ZWEIER (J.L.) - (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 13759 - 13760
- 243 ZWEIER (J.L.) - (1978) *J. Biol. Chem.*, 253/21, 7616 - 7621
- 244 ZWEIER (J.L.) *et* AISEN (P.) - (1977) *J. Biol. Chem.*, 252, 6090 - 6096



---

APPENDICE TECHNIQUE

## I. - PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

### A. - Préparation de la lactotransferrine humaine native

Depuis que *MONTREUIL et MULLET* (18) et *MONTREUIL et al.* (19) ont décrit, en 1960, le premier procédé de préparation de la lactotransferrine humaine, d'autres méthodes ont été proposées. Elles 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* (9), *LONNERDAL et al.* (14) et *BLACKBERG et al.* (2) ont proposé des méthodes de fractionnement directement par chromatographie d'affinité du lactosérum. La méthode que nous utilisons actuellement au Laboratoire est une méthode dérivée de celle mise au point par *CHERON et al.* (3) pour la préparation de la lactotransferrine bovine.

#### 1. Préparation du lactosérum

Le lait humain est délipidé par centrifugation pendant 45 mn à 20000 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 20000 g pendant 45 mn.

#### 2. Chromatographie du lactosérum

Le lactosérum (6l) est chromatographié à 4°C sur une colonne de SP-Sépha-dex (8 x 40 cm) stabilisée dans de l'acétate de sodium 0,22 M. La colonne est ensuite lavée par 6l 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.

#### 3. 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 environ de 1g de lactotransferrine par litre de lactosérum.

### B. - Préparation de l'apolactotransferrine

L'apolactotransferrine est préparée à partir de la molécule native d'après une méthode mise au point par MAZURIER *et* SPIK (16).

La lactotransferrine native est dissoute dans un tampon formiate de sodium 0,2 M, phosphate de sodium 0,2 M, EDTA (Ethylène Diamine Tétracétate de Sodium) 40 mM, pH 4,0 afin d'obtenir une concentration maximale de 0,5 % (p:v). Après incubation de 24 heures, la solution est dialysée 3 jours à +4°C contre de l'eau puis lyophilisée.

### C. - Préparation de la lactotransferrine saturée en métal

La protéine native est dissoute à raison de 0,5 à 20 mg/ml dans un tampon acétate de sodium, bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 8,8 selon la méthode d'AZARI *et* BAUGH (1). Le fer est additionné sous forme de citrate ferrique préparé en dissolvant 260 mg de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) dans 100 ml de tampon citrate de sodium, bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 8,6.

La fixation des ions ferriques est réalisée en additionnant de 1,25 à 50  $\mu\text{l}$  de solution de citrate ferrique (soit 60  $\mu\text{g}$  de fer pour 100  $\mu\text{l}$  de solution) par ml de la solution de protéine.

L'incubation à température ambiante est d'au moins 3 heures.

La solution est ensuite dialysée contre de l'eau puis contre une solution d'acétate de sodium 250 mM.

La purification finale est effectuée par fixation de la protéine sur colonne de SP - Séphadex, lavage par une solution d'acétate de sodium 400 mM puis 500 mM.

La fraction éluée par l'acétate de sodium 500 mM contient la lactotransferrine saturée, purifiée. Elle est ensuite dialysée contre de l'eau pendant 2 jours puis lyophilisée.

## II. - PREPARATION DES FRAGMENTS DE LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

### A. - Microméthodes d'hydrolyse enzymatique de la lactotransferrine humaine

#### 1. Principe

Des cinétiques d'hydrolyses sur la lactotransferrine saturée en fer et sur l'apolactotransferrine ont été réalisées en l'absence ou en présence d'urée 2M ou 4M. Les hydrolyses subissent directement, après arrêt de la réaction par variation du pH et séchage sous vide, une électrophorèse en gel de polyacrylamide avec sodium dodecyl sulfate (SDS).

#### 2. Protéases utilisées

Nous avons utilisé les enzymes suivants :

- *Pepsine SIGMA*, deux fois cristallisée puis lyophilisée, 1 mg de protéine entraîne une variation de densité optique à 280 nm de 2,53 par minute avec l'hémoglobine pour substrat dans un volume de 15 ml.
- *Papaïne SIGMA*, 35 U/mg de protéine. Deux fois cristallisée, en suspension dans un tampon acétate de sodium 0,05 M, pH 4,5 contenant 0,01 % de thymol.
- *Protéase V8 de Staphylococcus aureus MILES* à 600 U/mg de protéine à pH 7,8, avec la caséine pour substrat.
- *Ficine SIGMA* à 19 U/mg de protéine, deux fois cristallisée en suspension dans un tampon de chlorure de sodium 2,0 M, cystéine 0,03 M, pH 5,0.
- *Trypsine stérile WORTHINGTON* à 190 U/mg de protéine.
- *Chymotrypsine SIGMA* à 10 U/mg de protéine, isolée du pancréas de boeuf, cristallisée trois fois et lyophilisée.

### 3. Mode opératoire

Toutes les hydrolyses ont suivi un protocole expérimental identique, seuls les tampons d'incubation diffèrent d'une hydrolyse à l'autre.

Le protocole expérimental est le suivant :

- a) Deux séries de tubes sont préparées, l'une pour l'hydrolyse de la lactotransferrine saturée en fer et l'autre pour celle de la protéine dépourvue de fer.
- b) 4 mg d'apolactotransferrine ou de lactotransferrine saturée en fer sont dissous dans 400 µl de tampon contenant de l'urée 2M ou 4M ou sans urée.
- c) Les tubes sont mis à pré-incuber une heure au bain-marie à 37°C pour permettre la dénaturation de la lactotransferrine par l'urée.
- d) Au temps 0, l'enzyme, en solution dans un volume de tampon n'excédant pas 25 µl, est ajouté au milieu d'incubation dans un rapport de 1:50 (p:p).
- e) A des temps de 1 mn, 5 mn, 1 h et 4 h, 100 µl du contenu de chaque tube sont prélevés auxquels est ajouté un volume variable, selon la nature de l'hydrolyse effectuée, d'acide acétique ou de soude de manière à arrêter la réaction enzymatique.
- f) Chaque tube est ensuite séché à l'excicateur sous vide et en présence de soude.

Les tampons et les conditions d'arrêt des réactions enzymatiques spécifiques aux différents types de protéases utilisées sont décrits ci-dessous :

#### a) Hydrolyse pepsique

- Tampons : glycolle/HCl 0,1 M, pH 2,85, sans urée ou en présence d'urée 2M ou 4M.

- Arrêt par 10 µl de soude 0,2N amenant le pH à 8,0 .

b) Hydrolyse par la protéase V8

- Tampons : . phosphate de sodium 0,1 M, pH 4,0, sans urée ou en présence d'urée 2M ou 4M.

. phosphate de sodium 0,1 M, pH 6,1, sans urée ou en présence d'urée 2M ou 4M.

- Arrêt par 10 µl ou 15 µl d'acide acétique concentré amenant le pH à 3,0.

c) Hydrolyse par la papaïne

- Tampons : . citrate de sodium, bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 6,2, sans urée ou en présence d'urée 2M ou 4M.

L'enzyme est activé une heure à 37°C dans du citrate de sodium 0,1 M, pH 6,2, KCN 15 mM.

- Arrêt par 2 µl de soude 0,2N amenant le pH à 9,0.

d) Hydrolyse par la ficine

- Tampons : . tris/HCl 0,1 M, pH 6,8, cystéine 5mM, EDTA 1mM, glycérol à 10 % (v:v), sans urée ou en présence d'urée 2M ou 4M.

- Arrêt par 3 µl de soude 3N amenant le pH à 9,0.

e) Hydrolyse par la trypsine ou la chymotrypsine

- Tampons : . tris/HCl 0,1 M, pH 8,2, sans urée ou en présence d'urée 2M ou 4M.

. tris/HCl 0,1 M, pH 8,2, acétate de calcium 25 mM.

- Arrêt par addition de 1  $\mu$ l d'acide acétique concentré amenant le pH à 4,0.

#### 4. Analyse des hydrolysats par électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS

Tous les hydrolysats obtenus sont analysés en électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS et avec ou sans 1 % (p:v) de  $\beta$ -mercaptoéthanol selon le procédé de DAVIS (5) (voir p. 14 ). La coloration des gels utilise le colorant à l'Amidoschwartz.

Le calcul des masses moléculaires des fragments obtenus se fait par rapport à un témoin de masses moléculaires commercialisé par PHARMACIA et comprenant : la ribonucléase de 13.700 daltons ; le chymotrypsinogène A de 25.000 daltons ; l'ovalbumine de 43.000 daltons ; la sérumalbumine de 67.000 daltons et le Blue Dextran 2000 de 2.000.000 daltons.

#### B. - Hydrolyses enzymatiques préparatives

##### 1. Hydrolyse pepsique de la lactotransferrine

Nous avons repris le protocole mis au point par LINE *et al.* (13) : 180 mg de lactotransferrine saturée, dissous dans 3,6 ml de tampon glycoColle/HCl 0,1 M, pH 2,85, sont incubés à 37°C pendant trois heures 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 au moyen de soude 3N.

##### 2. Hydrolyse de la lactotransferrine par la protéase V8

100 mg de lactotransferrine saturée en fer sont dissous dans 10 ml de tampon phosphate de sodium, citrate de sodium 0,1 M, pH 4,0, ainsi que 2 mg de protéase dans 1 ml du même tampon. Afin d'équilibrer la température des tubes, les solutions sont pré-incubées une demi-heure à 37°C.

Les deux solutions sont mises en contact 6 mn à 37°C puis la réaction est arrêtée en ajustant le pH à 3,0 à l'aide d'acide acétique à 50 % (v:v).

##### 3. Hydrolyse tryptique de la lactotransferrine

100 mg de lactotransferrine saturée en fer sont dissous dans 10 ml de tampon tris/HCl 0,1 M, pH 8,2, acétate de calcium 250 mM. 2 mg de trypsine

sont ajoutés au milieu avant incubation à 37°C pendant 4 ou 8 h. La réaction est arrêtée en amenant le pH à 5,0 par l'acide acétique à 50 % (v:v).

#### 4. Hydrolyse tryptique du fragment N-trp

Une solution de 1 % (p:v) du fragment N-trp dépourvu de fer dans le bicarbonate d'ammonium 0,1 M, pH 7,8, est soumise à l'hydrolyse par la trypsine dans un rapport 1:50 (p:p), pendant 3 h à 37°C. L'hydrolysate est immédiatement injecté sur colonne de tamisage moléculaire après élimination du précipité par centrifugation.

#### C. - Méthodes d'isolement des fragments protéiques

Les hydrolysats pepsiques, tryptiques et par la protéase V8 de la lactotransferrine sont chromatographiés par filtration sur colonne de Séphadex G75 fine (2,5 x 150 cm) montés dans du bicarbonate d'ammonium 0,1 M avec un débit de 5 ml/h et un volume d'injection de 4 ml pour l'hydrolysate pepsique et de 11 ml pour les hydrolysats tryptique et par la protéase V8.

L'hydrolysate tryptique de la lactotransferrine est également chromatographié sur colonne de Bio-Gel P60 (6 x 150 cm) dans l'acide acétique à 10 % (v:v) avec un débit de 15 ml/h et un volume d'injection de 11 ml.

L'hydrolysate tryptique du fragment N-trp dépourvu de fer est chromatographié sur colonne de Bio-Gel P30 (2 x 100 cm) dans le bicarbonate de sodium 0,05 M avec un débit de 4 ml/h et un volume d'injection de 4 ml.

#### D. - Préparation des fragments de lactotransferrine saturés en fer

##### 1. Saturation par le complexe fer-citrate

La méthode utilisée pour saturer en fer les fragments de lactotransferrine est celle, déjà décrite (p. 2 ), de AZARI et BAUGH (1) Le fer est additionné au fragment protéique dissous dans un tampon acétate-bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 8,6, à une concentration en protéine de 10 mg/ml.

##### 2. Saturation par le complexe fer-nitrilotriacétate

Le fragment protéique est dissous à 1 % (p:v) 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 (NTA), soit 1,005 mg de NTA neutralisé par 63 mg de NaOH et complété à 1,5 ml par de l'eau.
- *Solution B* : solution de  $FeCl_3 \cdot (6H_2O)$ , soit 7,14  $\mu g/ml$  d'eau
- *Solution C* : 15 volumes de A et 10 volumes de B.

Des aliquotes de la solution C sont ajoutées à la solution du fragment protéique jusqu'à saturation complète en fer suivie en spectrophotométrie à 465 nm sur un spectrophotomètre *VARIAN Cary 219*.

### III. - PREPARATION DE PEPTIDES DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE EN VUE DE LA CARACTERISATION DES PONTS DISULFURES

#### A. - Hydrolyses enzymatiques

Les peptides utilisés pour caractériser les ponts disulfures sont libérés après hydrolyse pepsique de la lactotransferrine avec ou sans fer ou après hydrolyse tryptique du fragment N-trp. Les protocoles expérimentaux de ces hydrolyses sont décrits au paragraphe IIB de l'appendice technique.

#### B. - Chromatographie de tamisage moléculaire

L'hydrolysats pepsique de la lactotransferrine est chromatographié par filtration sur colonne de Séphadex G75 fine (2,5 x 150 cm) montée dans du bicarbonate d'ammonium 0,1 M avec un débit de 5 ml/heure et un volume d'injection de 4 ml.

L'hydrolysats tryptique du fragment N-trp est chromatographié sur colonne de Bio-Gel P30 (2 x 100 cm) dans une solution de bicarbonate de sodium 0,05 M avec un débit de 4 ml/heure et un volume d'injection de 4 ml.

Toutes les fractions sont lyophilisées.

### C. - Chromatographie liquide en haute pression

Les fractions peptidiques sont chromatographiées en chromatographie liquide à haute pression (CLHP) sur colonne de phase inverse C18 5 $\mu$  (colonne MCH-5 VARIAN de 12 cm de long). 1mg de chaque fraction peptidique est dissous dans 100  $\mu$ l de solution d'acide trifluoroacétique 0,1 % (v:v). On procède par plusieurs injections de 10  $\mu$ l de la solution de peptides sur la colonne de phase inverse équilibrée dans l'acide trifluoroacétique 0,1 % (v:v) à un débit de 1 ml/mn. L'élution des peptides est réalisée par un gradient croissant en acétonitrile (CH<sub>3</sub>CN) : 0 % CH<sub>3</sub>CN  $\xrightarrow{5mn}$  0 %  $\xrightarrow{15mn}$  20 %  $\xrightarrow{10mn}$  20 %  $\xrightarrow{10mn}$  40 %  $\xrightarrow{5mn}$  40 %  $\xrightarrow{5mn}$  80 %.

Les fractions sont collectées dans des piluliers de verre très propres et séchées sous vide dans un excicateur contenant de la soude en pastilles.

### D. - Chromatographie sur papier

La chromatographie sur papier des différentes fractions peptidiques est réalisée sur papier WHATMAN n° 3 (40 x 60 cm). 30 mg environ de chaque fraction sont dissous dans 500  $\mu$ l de solution de bicarbonate d'ammonium 50 mM, déposés sur une ligne de dépôt de 30 cm et séchés.

La migration est effectuée en chromatographie descendante pendant 16 h dans une cuve close par le mélange m butanol/pyridine/acide acétique/eau (7,5 : 5 : 1,5 : 6) (v:v).

Après migration, deux bandes de papier latérales de 5 cm sont découpées et révélées à la ninhydrine à 1 % (méthode de KOLB (11)) afin de localiser les fractions chromatographiées.

Les fractions sont éluées par de l'eau puis lyophilisées.

### E. - Electrophorèse sur papier

L'électrophorèse sur papier des fractions peptidiques est réalisée sur papier WHATMAN n° 3 (40 x 60 cm) à pH 6,5 (1,4 l d'eau, 90 ml de pyridine, pH ajusté à 6,5 avec l'acide acétique concentré) selon le principe de l'électrophorèse en cuve en toit. 30 mg de chaque fraction sont dissous dans 500  $\mu$ l

de bicarbonate d'ammonium 50 mM, déposés sur une ligne de dépôt de 30 cm et séchés. La migration dure 16 h à 5 volts/cm. Les bandes latérales sont révélées à la ninhydrine (méthode de KOLB (11)). Les fractions sont éluées par de l'eau et lyophilisées.

#### IV. - ANALYSE CHIMIQUE

##### A. - Dosage des protéines

Les concentrations en protéines ont été mesurées par la méthode de LOWRY *et al.* (15) ou, dans le cas de la lactotransferrine dépourvue de fer et saturée en fer, d'après leur absorbance à 280 nm soit :  $E_{1\text{cm}}^{1\text{p}100}$  : 11,0 et 14,3, respectivement.

Dans la méthode de LOWRY *et al.* (15) on utilise 3 solutions :

- Solution A :  $\text{NaCO}_3$  2 % dans NaOH 0,1N.
- Solution B : sulfate de cuivre,  $5\text{H}_2\text{O}$  à 0,5 % dans le tartrate de Na, K 1 %.
- Solution C : 50 ml de la solution A additionnée de 1 ml de la solution B.

A 0,1 ml d'une solution de protéine sont ajoutés 0,5 ml de la solution C. Le mélange est agité puis laissé au repos pendant 10 mn. Sont ajoutés ensuite 50  $\mu\text{l}$  du réactif de Folin-ciocalten, préalablement dilué au 1/2. La solution est laissée 30 mn à l'obscurité après agitation puis lue à 750 nm.

##### B. - Dosage du fer

###### 1. Principe

Après rupture de la liaison fer-lactotransferrine par l'acide chlorhydrique et déprotéinisation par l'acide trichloracétique, l'ion ferrique est réduit en ion ferreux par l'acide thioglycolique. L'ion ferreux forme avec la bathophénanthroline disulfonée un complexe rose dont l'intensité de coloration est proportionnelle à la concentration en fer.

## 2. Mode opératoire

3 solutions sont utilisées :

- *Solution étalon de fer* 3 mg/ml (53,7  $\mu$ mol/l)

- *Solution déprotéinisante*

. acide trichloracétique	612 mmol/l
. acide chlorhydrique	2,1 mol/l
. acide thioglycolique	433 mmol/l

- *Solution chromogène*

. bathophénanthroline disulfonée	466 $\mu$ mol/l
. acétate de sodium	2 mol/l

1 ml de la solution à analyser est introduit dans un tube en verre lavé à l'acide nitrique, auquel est ajouté 1 ml de solution déprotéinisante. Après un repos de 5 mn, le tube est porté au bain-marie à 75°C pendant 10 mn puis ensuite est centrifugé afin d'éliminer le flocculat qui s'est formé (15 mn à 3000 t/mn).

1 ml du surnageant est mélangé à 1 ml de la solution chromogène. Après un repos du mélange de 5mn, l'intensité de la coloration est lue à 535 nm.

### C. - Détermination de la composition en acides aminés des peptides de la lactotransferrine

La composition en acides aminés des peptides obtenus après protéolyse de la lactotransferrine est déterminée selon le procédé de ZANETTA et VINCEN-  
DON (23).

10 mmoles de peptides sont dissous dans 100  $\mu$ l d'HCl 5,6N contenant 0,5 mM de norleucine (témoin interne). Le tout est scellé sous vide dans un tube en verre et mis à l'étuve à 105°C pendant 16 et 24 h.

Après ouverture, le tube est séché sous vide contre NaOH, le contenu est repris par 1 ml d'éthanol pour être transféré dans un tube à méthanolysé.

Après séchage du contenu du tube sous courant d'azote, celui-ci est repris par 200 µl de méthanol/HCl 1,25N et laissé à 80°C pendant 15 mn. Après séchage sous azote, 200 µl d'alcool isoamylique/HCl 1,25N sont ajoutés au contenu du tube qui est ensuite chauffé 2 h à 105°C. Un nouveau séchage sous azote est suivi d'une addition de 100 µl d'acétonitrile et de 20 µl d'anhydride heptafluorobutyrique et d'un chauffage à 150°C pendant 10 mn.

Enfin, après refroidissement, le liquide est séché sous azote jusqu'à ne plus obtenir qu'une goutte d'environ 50 µl reprise ensuite par 100 µl d'acétonitrile. L'injection de 2 µl du mélange d'acides aminés dérivés est réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse *VARIAN 2400*.

Les paramètres de la chromatographie sont les suivants : gradient isocratique à 95°C pendant 3 mn puis gradient de 95 à 245°C à raison de 4°C par mn ; débit d'azote (gaz vecteur) : 20 ml/heure ; température injecteur et détecteur : 265°C.

Les temps de rétention et les facteurs de réponse des différents acides aminés sont mesurés grâce à l'utilisation d'un mélange témoin de N(0) heptafluorobutyrate isoamylesters d'acides aminés.

#### D. - Composition molaire en glucides

Les rapports molaires des glucides sont déterminés par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse, selon le procédé décrit par *ZANETTA et al.* (22). Cette technique est modifiée par *FOURNET et al.* (communication personnelle) est appliquée au dosage des microquantités. Une quantité de protéines contenant 5 à 10 µg de glucides est introduite dans une pipette Pasteur bouchée, extrêmement propre. 1 à 2 µg de mésoinositol sont ajoutés. Le tout est lyophilisé dans un tube à méthanolyse. Le méthanol/HCl 0,5 M est additionné au produit dès l'ouverture du lyophilisateur à l'extérieur de la pipette dans le tube à méthanolyse. La méthanolyse est conduite 24 h à 80°C. Le méthanol est ensuite séché sous azote après refroidissement du tube. 20 µl de dichlorométhane et 20 µl d'anhydride trifluoroacétique sont ajoutés à l'aide d'une pipette *Corning* et d'un aspirateur automatique. L'extérieur de la pipette est saturé avec le dichlorométhane et l'anhydride trifluoroacétique. La trifluoroacétylation est faite 4 h à 6 h à 37°C ou une nuit à température ambiante. L'analyse des dérivés trifluoroacétylés se fait par chromatographie en phase gazeuse sur colonne OV210 avec un gradient de température de 110 à 240°C à raison de 6°C/mn suivi d'un palier à 240°C pendant

5 minutes et un débit d'azote de 20 ml/h.

#### E. - Détermination des acides aminés N- et C- terminaux

L'acide aminé en position N-terminale des fragments est déterminé par la technique de dansylation selon *HARTLEY* (8).

L'acide aminé en position C-terminale des fragments est déterminé par l'utilisation d'une carboxypeptidase A. Le fragment (100 mM) est mis 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.

Les acides aminés libérés sont analysés par chromatographie en phase gazeuse après dérivation selon le protocole décrit précédemment au paragraphe IV C.

#### F. - Détermination de la séquence des fragments

La détermination de la séquence des fragments protéiques a été réalisée au Laboratoire des protéines du *Professeur JOLLES* à Paris.

La dégradation récurrente d'*EDMAN* (5) est effectuée sur un séquenceur automatique *BECKMAN 890C* comme décrit par *METZ-BOUTIGUE et al.* (17).

#### G. - Détection des résidus de cystine dans les peptides de la lactotransferrine

Cette méthode est une technique de révélation spécifique de la cystine (*KOLB* (11)).

On prépare 2 réactifs :

- *Réactif 1* : 1,5 g de nitroprussiate de sodium est dissous dans 5 ml d'acide sulfurique 2N avant d'ajouter 95 ml de méthanol et 10 ml d'ammoniaque à 28 % (v:v). La solution est agitée et filtrée sur papier.
- *Réactif 2* : 2 g de cyanure de sodium sont dissous dans 5 ml d'eau. La solution est complétée à 100 ml avec du méthanol.

La bande de papier à révéler est trempée dans le réactif 1 puis séchée doucement et trempée, encore légèrement humide, dans le réactif 2.

Une coloration rose, très fugace, est observée après quelques minutes de séchage à température ambiante si la fraction contient de la cystine. La méthode est sensible à environ 1 µg de cystine.

## V. - ANALYSE PHYSIQUE

### A. - Immunodiffusion radiale double

La technique d'immunodiffusion radiale double permet de déterminer l'identité antigénique de fragments protéiques. L'anticorps et l'antigène diffusent dans l'agarose et forment un arc de précipitation. Lorsque les arcs de précipitation de deux antigènes se rejoignent sans se croiser, on considère qu'ils possèdent des déterminants antigéniques identiques. Lorsque ces arcs de précipitation se croisent, on considère qu'ils possèdent des déterminants antigéniques différents.

Cette technique est utilisée selon la méthode d'OUCHTERLONY (20) avec un antisérum de lapin anti-lactotransferrine humaine afin de déterminer l'identité antigénique des fragments de lactotransferrine.

### B. - Electrophorèse en gel de polyacrylamide

#### 1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS est réalisée d'après la méthode de DAVIS (5), l'appareillage et la méthodologie utilisés sont ceux décrits par KERCKAERT (10).

4 solutions sont préparées :

- Solution 1A : 36,3 g Tris qsp 100 ml H<sub>2</sub>O pH 8,9
- Solution 2A : 48 g d'acrylamide et 1,28 g de bisacrylamide qsp 100 ml
- Solution 3A : 0,5 g de persulfate d'ammonium + 4,5 ml d'H<sub>2</sub>O
- Solution C : Dodécylsulfate de sodium (SDS) 20 % (p:v)

Deux gels superposés sont coulés entre deux plaques de verre. Le gel

inférieur de réticulation 7,5 % comprend 6,25 ml de 1A, 7,5 ml de 2A, 36 ml d'H<sub>2</sub>O, 37,5 µl de TEMED, 37 µl de 3A et 250 µl de C. Le gel supérieur à 5 % comprend 2,5 ml de 1A, 2 ml de 2A, 15,4 ml d'H<sub>2</sub>O, 15 µl de TEMED, 150 µl de 3A et 100 µl de C.

L'échantillon est dissous dans un tampon dont la composition est la suivante : SDS (10 % (p:v)), glycérol (20 % (v:v)), 1A (10 % (v:v)), avec ou sans 2-mercaptoéthanol 5 % (v:v).

L'électrophorèse est réalisée dans un tampon Tris 0,025 M, Gly 0,18 M, SDS 1 % (v:v), pH 8,6 à raison de 8V/cm pendant 4 heures.

## 2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide sans SDS

L'appareillage et la méthode sont les mêmes que ceux utilisés pour l'électrophorèse avec SDS mais cette électrophorèse se caractérise par l'absence de SDS dans le gel, dans le tampon d'électrophorèse et dans le tampon d'échantillon ainsi que par la présence d'un seul gel de réticulation à 5 %. Le pH du tampon d'électrophorèse est ajusté à 8,0. L'électrophorèse est réalisée à raison de 5V/cm pendant 4 heures.

## C. - Analyse par dichroïsme circulaire

Les concentrations en protéines ont été mesurées par la méthode *LOWRY et al.* (15). Les spectres ont été obtenus à partir de protéines dissoutes à une concentration de 0,1 % dans NaF 0,214 M, de telle manière que l'absorbance soit toujours inférieure, en ultraviolet, à 1,5.

Nous avons utilisé un dichrographe *JOBIN et YVON R.J. Marck III* informatisé par un ordinateur *APPLE II* 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 ( $\theta$ ), exprimée en degré/cm<sup>2</sup>/dmol<sup>-1</sup>, nous avons utilisé une masse moléculaire moyenne pour un résidu d'acide aminé de 111.



## VI. - METHODES RELATIVES AUX ETUDES DE CRISTALLISATION DU GLYCOPEPTIDE N2

### A. - Principe

Il existe plusieurs techniques pour cristalliser une protéine : par diffusion de vapeur, par dialyse etc. En revanche, le principe est commun à toutes : placer la protéine dans des conditions de pH, de force ionique, de concentration en protéine et en agents précipitants telles que la protéine se trouve dans un état conformationnel particulier permettant une association moléculaire selon un ordonnement régulier, de nature cristalline. La conjonction des paramètres favorables, proches de ceux de la précipitation, ne peut être définie que d'une manière empirique.

Dans tous les cas, la recherche des paramètres de cristallisation d'une protéine est longue car l'apparition des cristaux est très lente (parfois plusieurs mois).

### B. - Matériel et méthode

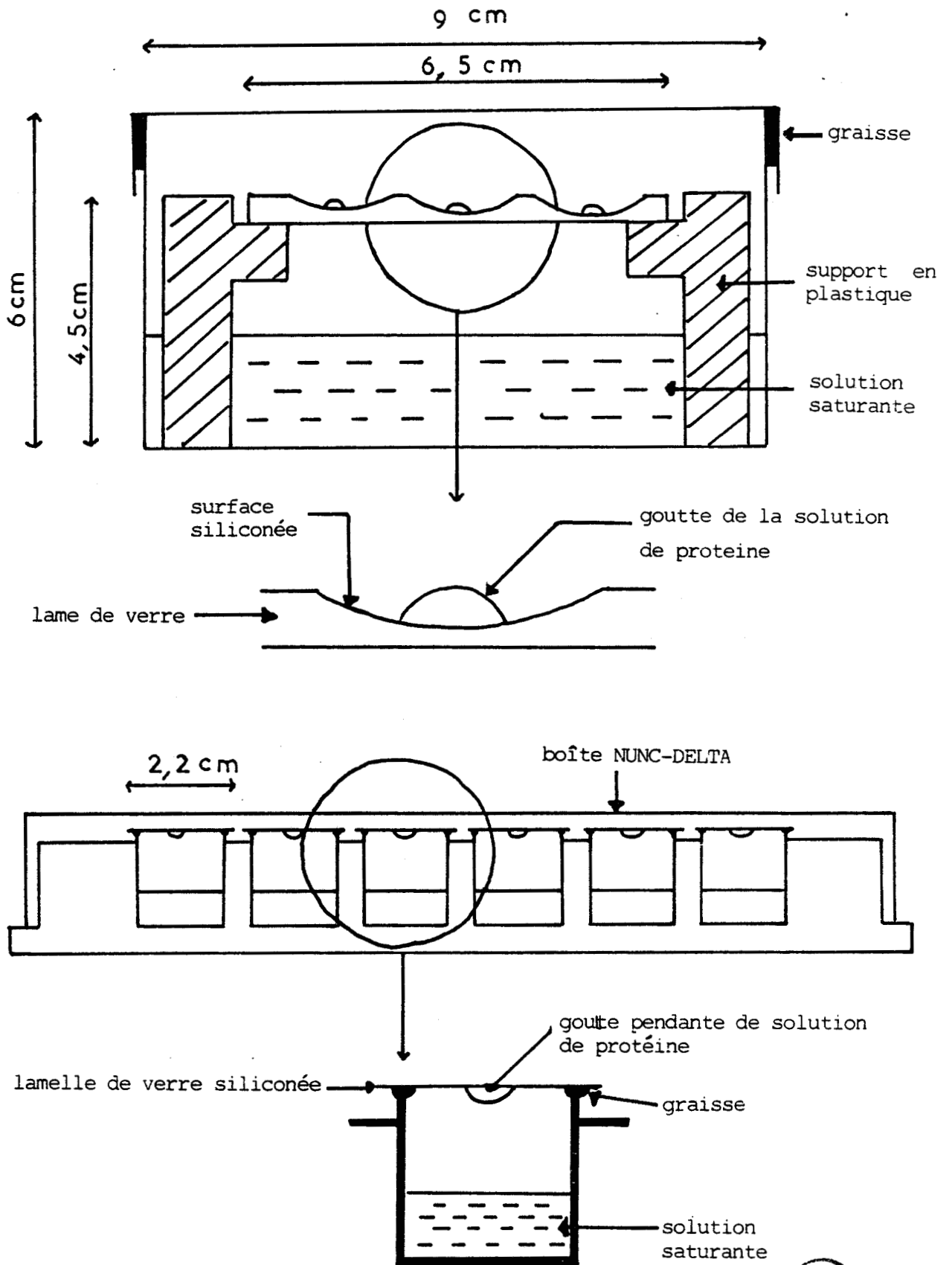
#### 1. Préparation du glycopeptide N2

Le glycopeptide N2 utilisé pour la cristallisation est obtenu juste après hydrolyse du N-trp par la trypsine et élution sur colonne de Bio-Gel P30 dans du bicarbonate d'ammonium 50 mM. Il est conservé dans le tampon d'élution de la colonne. Son homogénéité est vérifiée par électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS.

#### 2. Matériel et méthode utilisés pour la cristallisation

Une seule technique a été utilisée pour les essais de cristallisation : la technique par diffusion de vapeur. Cette technique consiste à augmenter très lentement la concentration de l'agent précipitant dans la solution de protéine par évaporation de celle-ci.

Des boîtes en plastique de dimensions 9 x 6 x 5 cm sont utilisées ; elles sont rendues hermétiquement closes par l'emploi de graisse à vide autour du couvercle. Dans chacune de ces boîtes, une lame de verre de 6,5 x 4 cm est posée sur un support en plastique de 4,5 cm de hauteur (Fig. 29 , p.17 ).



- Figure 29 -



Matériel utilisé pour les essais de cristallisation du glycopeptide N2

Cette plaque qui possède 6 dépressions est enduite d'une solution aux silicones (*SURFASIL* de chez *PIERCE*) afin de lui conférer des propriétés hydrofuges.

La technique consiste à déposer dans chaque dépression de la lame de verre une goutte de 10 à 40  $\mu$ l de la solution de protéine contenant l'agent précipitant. Le compartiment inférieur de la boîte est rempli avec 25 ml d'une solution de l'agent précipitant de concentration supérieure à celle qui existe dans les gouttes de la solution de protéine. Après fermeture de la boîte, il s'établit un équilibre très lent, par évaporation, entre la concentration de l'agent précipitant dans la goutte et celle dans le réservoir. On peut, de cette manière, arriver à cerner la zone de concentration en agent précipitant qui permette la cristallisation.

Selon le même principe, nous avons utilisé un autre type de matériel constitué par des boîtes de culture cellulaire *NUNC-Delta* de 24 cupules de 2 cm<sup>3</sup> (Polylabo) et des lamelles de microscope de 2,2 x 2,2 cm traitées par la solution siliconée. 1 ml de la solution d'agent précipitant est versé dans chaque cupule. L'ouverture de chaque cupule est graissée avec de la graisse à vide et recouverte de la lamelle de verre où l'on a déposé la solution de protéine en goutte pendante (Fig. 29 , p. 17 ).

Nous avons fixé à un ou deux la plupart des paramètres utilisés pour la cristallisation, seules la nature et la concentration de l'agent précipitant ont retenu notre attention et ont fait l'objet des différents essais de cristallisation du glycopeptide N2.

Les différents paramètres que nous avons utilisés figurent dans le Tableau XI , p. 19 .

## VII. - METHODES DE CALCUL DES STRUCTURES SECONDAIRES ET DES ZONES HYDROPHOBES ET HYDROPHILES DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

Les méthodes que nous avons utilisées pour la détermination des structures secondaires de la lactotransferrine humaine sont celles de *CHOU et FASMAN* (4) et de *GARNIER et al.* (7) La méthode de détermination des zones hydrophobes et hydrophiles est celle très utilisée, de *KYTE et DOOLITTLE* (12).

TABLEAU XI - PARAMETRES UTILISES POUR LES ESSAIS  
DE CRISTALLISATION DU GLYCOPEPTIDE N2.

NATURE DES PARAMETRES	PARAMETRES	
CONCENTRATION EN PROTEINE. VOLUME DE LA GOUTTE..... NATURE DU TAMPON..... pH ..... TEMPERATURE ..... AGENTS PRECIPITANTS :	1 MG/ML 20,30 OU 40 µL $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 50 mM 7,8 + 4°C OU +20°C	
	VALEUR MINIMUM (DANS LA GOUTTE)	VALEUR MAXIMUM (DANS LE RESERVOIR)
-SULFATE D'AMMONIUM (S.A.)	10 % (P:V)	50 % (P:V)
-2 METHYL PENTANEDIOL (M.P.D.)	5 % (V:V)	30 % (V:V)
-POLYETHYLENE GLYCOL 6000 (P.E.G.)	0,5 % (P:V)	15 % (P:V)

Nous avons réalisé les différents calculs sur un micro-ordinateur SINCLAIR ZX81 de 64 Koctets, utilisé avec un logiciel personnel.

Dans les paragraphes suivants, nous ne décrivons que les principes des méthodes de calcul utilisées. Nous renvoyons aux articles mentionnés ci-dessus pour la connaissance des facteurs attribués à chaque acide aminé pour chaque méthode de calcul.

#### A. - Méthode de CHOU et FASMAN (4)

##### 1. Recherche des zones hélicoïdales et des zones en feuillets plissés $\beta$

La méthode consiste à attribuer à chaque acide aminé un facteur  $p\alpha$  ou  $p\beta$  traduisant son aptitude à participer à une structure en feuillets plissés. Ces facteurs ont été déterminés par une étude statistique sur plusieurs protéines. De manière à localiser une région hélicoïdale en en feuillets plissés, on transporte tout au long de la chaîne un groupe de, respectivement, 6 ou 5 résidus décalés d'un acide aminé à chaque déplacement.

Pour déterminer  $\langle p\alpha \rangle$  et  $\langle p\beta \rangle$ , on calcule, pour une zone définie, la moyenne arithmétique des facteurs relatifs à une structure en hélice  $\alpha$  ou en feuillets plissés  $\beta$  des acides aminés concernés tout en respectant les points suivants :

- 1) Tout segment de six résidus au moins, d'une chaîne d'acides aminés avec  $\langle p\alpha \rangle \geq 1,03$  et  $\langle p\alpha \rangle > \langle p\beta \rangle$  est prévu comme ayant une structure en hélice  $\alpha$ .
- 2) Tout segment de cinq résidus au moins, d'une chaîne d'acides aminés avec  $\langle p\beta \rangle \geq 1,05$  et  $\langle p\beta \rangle > \langle p\alpha \rangle$  est prévu comme ayant une structure en feuillets plissés  $\beta$ .
- 3) Un résidu de proline ne peut figurer à l'intérieur d'une hélice mais peut exister à l'extrémité N-terminale de celle-ci.
- 4) Les résidus acides (Asp et Glu) préfèrent l'extrémité hélicoïdale N-terminale tandis que les résidus basiques (His, Lys, Arg) préfèrent l'extrémité hélicoïdale C-terminale.

- 5) Les résidus d'acide glutamique et de proline sont rarement présents dans une structure en feuillets  $\beta$ .

## 2. Recherche des coudes $\beta$

On attribue à chaque acide aminé quatre facteurs différents ( $F_i, F_{i+1}, F_{i+2}, F_{i+3}$ ) selon sa place dans un tétrapeptide :  $i, i+1, i+2, i+3$ , et selon les paramètres conformationnels spécifiques à chaque résidu. Ces facteurs ont été calculés statistiquement à l'aide de 12 protéines différentes.

Pour chaque tétrapeptide d'une chaîne peptidique, on peut calculer la probabilité relative pour qu'il ait une conformation en coude  $\beta$  :  $pt = F_i \times (F_{i+1}) \times (F_{i+2}) \times (F_{i+3})$ . Si  $pt \geq 0,5 \times 10^{-4}$ , le tétrapeptide peut être retenu comme pouvant engendrer un  $\beta$  turn.

### B. - Méthode de GARNIER *et al.* (7)

La méthode de GARNIER *et al.* (7) constitue l'application numérique de la méthode théorique de ROBSON *et SUZUKI* (21).

En étudiant la séquence de 25 protéines, les auteurs de cette méthode ont pu attribuer à chaque acide aminé des paramètres correspondant à une structure en hélice  $\alpha$ , en feuillets plissés  $\beta$  ou en coude  $\beta$ .

Ils attribuent à chaque acide aminé et pour chaque structure, 17 facteurs, l'un propre à la nature de l'acide aminé, et 16 facteurs venant répercuter la présence de l'acide aminé dans la chaîne sur ses huit résidus voisins, de part et d'autre de sa position.

Pour chaque résidu d'acide aminé et pour chaque structure, on doit donc effectuer la somme arithmétique du facteur propre à chaque résidu à sa position 0 avec les facteurs de ses 16 plus proches voisins selon leur position (-8 à +8) par rapport à cet acide aminé. Une telle méthode de calcul qui utilise 1020 facteurs numériques différents dont 17 à additionner pour chaque résidu d'acide aminé, justifie pleinement l'usage de l'informatique pour le traitement des données.

C. - Méthode de KYTE et DOOLITTLE (12)

KYTE et DOOLITTLE définissent une échelle de valeur allant de + 4,5 à - 4,5 traduisant le caractère plus ou moins hydrophobe de chaque résidu d'acide aminé (la valeur + 4,5 est attribuée au résidu le plus hydrophobe : la leucine ; la valeur - 4,5 est attribuée à l'arginine). L'établissement de cette échelle de valeurs est réalisé par compilation de données expérimentales issues de la littérature.

A chaque acide aminé correspond une valeur de + 4,5 à - 4,5, la méthode consiste à calculer la moyenne arithmétique des 7 valeurs d'un segment de 7 résidus d'acides aminés et à reporter cette moyenne au niveau du 4<sup>e</sup> résidu d'acide aminé. On déplace ensuite ce segment de 7 acides aminés d'une position sur la chaîne peptidique en avançant de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, et on effectue le même calcul que précédemment. Cette opération est réalisée autant de fois qu'il existe d'acides aminés sur la chaîne peptidique.

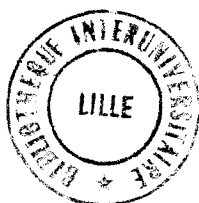
La valeur moyenne attribuée à chaque acide aminé permet le tracé d'un graphique qui met en évidence les zones hydrophobes et hydrophiles de la protéine.

---

BIBLIOGRAPHIE APPENDICE TECHNIQUE



- 1 AZARI (P.) *et* BAUGH (R.F.) - (1967) Arch. Biochem. Biophys., 118, 138 - 144
- 2 BLACKBERG (L.) *et* HERNELL (O.) - (1980) F.E.B.S. Letters., 109/2, 180 - 184
- 3 CHERON (A.), MAZURIER (J.) *et* FOURNET (B.) - (1977) C.R. Acad. Sci. PARIS - 284, 585 - 588
- 4 CHOU (P.Y.) *et* FASMAN (G.D.) - (1974) Biochemistry., 13, 211 - 245
- 5 DAVIS (B.) - (1964) Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 404 - 427
- 6 EDMAN (P.) *et* BEGG (G.) - (1967) Eur. J. Biochem., 1, 80 - 91
- 7 GARNIER (J.), OSGUTHORPE (D.J.) *et* ROBSON (B.) - (1978) J. Mol. Biol., 120, 97 - 120
- 8 HARTLEY (R.) - (1970) Biochem. J., 119, 805 - 822
- 9 HAUPT (H.) *et* BAUDNER (S.) - (1973) Hoppe-Jeyler's Z. Physiol. Chem., 354, 944 - 948
- 10 KERCKAERT (J.P.) - (1978) Anal. Biochem. J., 84, 354 - 360
- 11 KOLB (J.J.) - (1951) Anal. Chem., 23, 823
- 12 KYTE (J.) *et* DOOLITTLE (R.F.) - (1982) J. Mol. Biol., 157, 105 - 132
- 13 LINE (W.F.), SLY (D.A.) *et* BEZKOROVAINY (A.) - (1976) Int. J. Biochem., 7, 203 - 208
- 14 LONNERDAL (B.), CARLSSON (J.) *et* PORATH (J.) - (1977) F.E.B.S. Letters., 75/1, 89 - 93
- 15 LOWRY (O.H.), ROSEBROUGH (N.J.), FARR (A.L.) *et* RANDALL (R.J.) - (1951) J. Biol. Chem., 193, 265
- 16 MAZURIER (J.) *et* SPIK (G.) - (1980) Biochim. Biophys. Acta., 629, 339 - 408
- 17 METZ-BOUTIGUE (M.H.), MAZURIER (J.), JOLLES (J.), SPIK (G.), MONTREUIL (J.) *et* JOLLES (P.) - (1981) Biophys. Biochim. Acta., 670, 243-254
- 18 MONTREUIL (J.) *et* MULLET (S.) - (1960) C.R. Acad. Sci. PARIS - 250, 1736 - 1737
- 19 MONTREUIL (J.), TONNELAT (J.) *et* MULLET (S.) - (1960) Biochim. Biophys. Acta., 45, 413 - 421
- 20 OUCHTERLONY (O.) - (1949) Acta. Pathol. Microbiol. Scand., 26, 507
- 21 ROBSON (B.) *et* SUZUKI (E.) - (1976) J. Mol. Biol., 107, 357 - 367
- 22 ZANETTA (J.P.), BRECKENBRIDGE (W.C.) *et* VINCENDON (G.) - (1972) J. Chromatogr., 69, 291
- 23 ZANETTA (J.P.) *et* VINCENDON (G.) - (1973) J. Chromatogr., 76, 91 - 99



## R E S U M E

La lactotransferrine humaine (hLTF) est une glycoprotéine bilobée de 80 kDa qui fixe réversiblement 2  $Fe^{3+}$  et est présente dans les sécrétions muqueuses et dans les cellules immuno-compétentes. Elle joue un rôle important dans le métabolisme du fer et dans les mécanismes moléculaires de défense antibactérienne. Nos travaux sont une contribution à l'étude de la structure primaire et de la conformation spatiale de cette glycoprotéine. Ils ont apporté les résultats suivants:

1 - L'hydrolyse trypsique ménagée de la hLTF permet d'isoler 2 fragments (N-trp et C-trp) correspondant aux 2 lobes N- et C-terminaux de la protéine. L'hydrolyse pepsique de la molécule et l'hydrolyse trypsique du fragment N-trp a fourni 6 peptides qui ont permis, d'une part, de réenchaîner dans l'ordre les peptides par coupure par le bromure de cyanogène et, d'autre part, de préciser la position de 4 ponts disulfure. Ces travaux, réalisés en collaboration avec l'équipe du Professeur P. JOLLES, ont contribué à la détermination de la séquence primaire complète des 703 acides aminés de la hLTF.

2 - Les fragments N-trp et C-trp fixent encore réversiblement le fer. Ils présentent, d'autre part, des différences structurales très marquées et ils sont capables de se réassocier en un complexe non-covalent qui présente toutes les caractéristiques de la hLTF.

3 - L'hydrolyse trypsique ménagée du fragment N-trp conduit à l'isolement d'un glycopeptide N-2 de 18 kDa. Il appartient au domaine ND-2 de la hLTF et représente la plus petite structure qui soit encore capable de fixer le fer. Le fait de l'avoir, en outre, cristallisé, permet d'envisager l'étude de sa conformation par diffraction des rayons X.

4 - La définition par le calcul de la structure secondaire probable de la protéine, l'analyse des acides aminés impliqués dans la fixation du fer et présents en positions homologues dans les séro-, lacto- et ovotransferrines et la construction de modèles moléculaires permettent de proposer un schéma provisoire de la configuration de la "cage de fixation" du métal.

MOTS CLEFS: Lactotransferrine ou Lactoferrine (humaine); Protéolyse  
Structure primaire; Structure secondaire; Conformation;  
Site de fixation du fer.