

N° d'ordre : 366

50376  
1989  
157

50376  
1989  
157

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE FLANDRES ARTOIS

Spécialité : BIOCHIMIE

par

Didier COLAVIZZA



## STRUCTURE PRIMAIRE PARTIELLE DE LA LACTOTRANSFERRINE DE VACHE PAR L'APPLICATION DE METHODES CHIMIQUES ET ENZYMATIQUES ET PAR CLONAGE D'UN ADN COMPLEMENTAIRE

Présentée le 8 Juin 1989 devant la Commission d'Examen

Président :	J. MONTREUIL
Rapporteur :	J. DOLY
Rapporteur :	Y. BOULANGER
Examineur :	J.P. ZALTA
Examineur :	A. TARTAR
Examineur :	G. SPIK

Ce travail a été réalisé sous la direction de Madame le Professeur Geneviève SPIK dans le Laboratoire de Chimie Biologique (Directeur : Professeur Jean MONTREUIL) de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois (Unité Mixte du CNRS n° 111 : Relations structure - fonction des constituants membranaires).

A *Patricia et Hélène,*

. Avec tout mon amour.

A *mes Parents et Grands-Parents,*

A *mon Frère,*

Avec toute mon affection.  
Que ce travail soit pour eux  
un témoignage de ma profonde  
reconnaissance.

*A mes Beaux-Parents,*

*A mes Amis.*

A *Geneviève,*

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre équipe et de m'avoir fait découvrir les joies que procure la Recherche. J'ai toujours trouvé auprès de vous beaucoup de gentillesse, de disponibilité ainsi que de précieux conseils. Je vous en suis sincèrement reconnaissant. Soyez assurée de mon amitié.

A *Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL,*

Vous m'avez fait l'honneur de bien vouloir m'accepter dans votre Laboratoire et de me confier ce travail que j'ai réalisé avec le plus grand plaisir. Pendant toutes ces années, j'ai pu apprécier la clarté de votre enseignement, votre dynamisme et votre haute compétence scientifique. Je voudrais vous exprimer ma plus vive gratitude pour la confiance que vous m'avez témoignée et pour la formation que j'ai pu acquérir. Permettez-moi de joindre à ma profonde reconnaissance mon respectueux attachement.

A *Madame le Docteur Janine DOLY,*

Vous avez suivi nos travaux avec beaucoup d'intérêt et de bienveillance en nous prodiguant de précieux conseils. Vous m'avez fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse. Soyez remerciée et assurée de ma profonde reconnaissance.

A *Monsieur le Professeur Yves BOULANGER,*

Vous avez bien voulu me faire l'honneur de juger cette thèse. Je vous prie de bien vouloir trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

*A Monsieur le Professeur Jean-Pierre ZALTA,*

Vous m'avez accueilli dans votre Laboratoire pour m'initier aux techniques de la Génétique Moléculaire. J'ai pu apprécier votre haute compétence scientifique et les nombreux conseils que vous m'avez donnés. Je vous remercie pour l'accueil chaleureux que vous m'avez réservé et pour la formation de qualité que j'ai pu acquérir. Malgré vos nombreuses occupations, vous avez bien voulu participer à ce jury. Qu'il me soit permis ici de vous exprimer toute ma gratitude et mon profond respect.

*A Monsieur le Professeur André TARTAR,*

Votre collaboration a été essentielle pour la détermination des séquences peptidiques. Je vous remercie vivement pour l'efficacité et la rapidité avec lesquelles ces analyses ont été réalisées et pour les nombreux conseils que vous nous avez donnés. Je suis honoré de votre présence dans ce jury et vous prie de trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

*A Annick,*

Nous avons pris ensemble le même "Optimist" il y a presque trois ans pour traverser l'océan "Génétique" et découvrir, contre vents et marées, la "Lacto" désirée. J'ai pu apprécier pendant ces années tes nombreuses qualités de chercheur, ton enthousiasme et ton éternelle bonne humeur. J'ai appris beaucoup de choses avec toi. Sois assurée de ma reconnaissance et de ma profonde amitié.

*A Monique,*

Il manquait une voile à notre embarcation... et tu es venue te joindre à nous. Outre ta haute compétence technique et ta maîtrise du séquençage de l'ADN, j'ai beaucoup apprécié tes grandes qualités humaines et ta volonté de réussir. Sois assurée de ma très grande sympathie.

*A Jean-Pierre,*

Tes compétences techniques et ta rigueur ont été très précieuses pour la réalisation de ce travail. Ta minutie et ton souci de la perfection ont été pour moi un exemple lorsque tu m'as initié aux techniques immuno-chimiques. Je te remercie très sincèrement et sois assuré de ma très grande amitié.



Mes remerciements s'adressent également à :

- Messieurs F. AMALRIC, G. BOUCHE et H. BOURBON qui ont assuré ma formation au C.R.B.G.C. de Toulouse.
- P. MAES pour son amicale et fructueuse collaboration.
- Dominique pour la mise au point d'un programme informatique d'aide au séquençage de l'ADN.
- Catherine qui a guidé mes premiers pas lors de mon arrivée au Laboratoire.
- Bernadette, Didier et Mazu pour leur accueil au "103" et leurs conseils.
- Ben, Bruno et Weili qui ont été mes principaux compagnons de route durant cette thèse.
- Madame CELEN qui a assuré l'iconographie et la reproduction du mémoire.
- Mesdames DONDEYNE et MOERMAN pour leur gentillesse et leur dévouement.
- Sylvie qui a tapé ce mémoire dans la bonne humeur.

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

*Je dédie cette thèse à la mémoire de mon  
Grand-Père qui a beaucoup compté dans mon  
éducation et ma réussite scolaire.*

# SOMMAIRE

Page

## - INTRODUCTION -

## - GENERALITES -

### REPARTITION DU FER DANS L'ORGANISME ROLE DES LACTOTRANSFERRINES

I.	LE FER DANS L'ORGANISME HUMAIN	4
	A. Répartition et importance du fer dans l'organisme	4
	B. Les formes de réserve	4
	C. Les formes de transport : les transferrines	5
II.	ROLE BIOLOGIQUE DES LACTOTRANSFERRINES	6
	A. Rôle de la lactotransferrine dans la nutrition martiale et dans l'absorption intestinale du fer	6
	B. Rôle de la lactotransferrine dans les mécanismes de défense anti-infectieuse	8
	1. Rôle de la lactotransferrine dans l'immunité humorale	9
	2. Rôle de la lactotransferrine dans l'immunité à médiation cellulaire	10
	a) Mobilisation des cellules immunocompétentes	10
	b) Déclenchement de l'hyposidérémie inflammatoire	11
	c) Régulation de la myélopoïèse	11

### ETUDE STRUCTURALE ET CONFORMATIONNELLE DES LACTOTRANSFERRINES

I.	STRUCTURE COVALENTE DES LACTOTRANSFERRINES	14
	A. Structure de la chaîne peptidique	14
	1. Structure primaire des lactotransferrines	14
	a) Lactotransferrine humaine	14
	b) Lactotransferrine murine	15
	c) Lactotransferrines d'autres espèces	17
	2. Nombre et localisation des ponts disulfures	17
	3. Homologies de séquences avec les autres transferrines	18
	B. Structure de la fraction glycanique	19
	1. Structure des glycanes de la lactotransferrine humaine	19
	2. Structure du glycanne de la lactotransferrine de Souris	20

	Page
3. Structure des glycanes de la lactotransferrine de Vache.	20
II. STRUCTURE CONFORMATIONNELLE DES LACTOTRANSFERRINES	28
A. Mise en évidence de domaines structuraux	28
B. Données cristallographiques	29
III. LES SITES DE FIXATION DU FER	33
A. Propriétés générales	33
B. La différence entre les deux sites	34
C. Le modèle	34

### ETUDE STRUCTURALE DES GENES DES TRANSFERRINES

I. ETUDE COMPAREE DES ARNm DE DIFFERENTES TRANSFERRINES	37
A. Etude de la structure des ARN messagers de transferrines	37
1. Séquence de l'ARN messager de l'ovotransferrine de Poule	38
2. Séquence de l'ARN messager de la sérotransferrine humaine	38
3. Séquence de l'ARN messager de la mélanotransferrine humaine	39
4. Séquence de l'ARN messager de la lactotransferrine de Souris	40
5. ARN messagers d'autres transferrines séquencés partiellement	40
a) L'ARN messager de la lactotransferrine humaine	41
b) L'ARN messager de la sérotransferrine de Rat	41
c) L'ARN messager de la sérotransferrine de Souris	41
B. Homologies de séquences des ARNm des différentes transferrines	42
II. ETUDE COMPAREE DE LA STRUCTURE DES GENES DES TRANSFERRINES	45
A. Localisation chromosomique	45
B. Structure des gènes de la sérotransferrine humaine et de l'ovotransferrine de Poule	45
C. Structure d'un oncogène apparenté au gène des transferrines : le gène Blym 1	50

### REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES DES TRANSFERRINES

I. REGULATION DE L'EXPRESSION DU GENE DE LA SEROTRANSFERRINE ET DE L'OVOTRANSFERRINE	53
A. Spécificité tissulaire de l'expression du gène des transferrines	54
B. Régulation de l'expression du gène de la sérotransferrine en fonction du taux de fer	54

	Page
C. Régulation de l'expression du gène de la sérotransferrine et de l'ovotransferrine par les oestrogènes	57
D. Régulation de l'expression du gène de la sérotransferrine par l'AMP cyclique	60
II. REGULATION DE L'EXPRESSION DU GENE DE LA LACTOTRANSFERRINE	61
III. CONCLUSION	63

## - TRAVAUX PERSONNELS -

<b>DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE PARTIELLE DE LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE PAR L'APPLICATION DE METHODES CHIMIQUES ET ENZYMATIQUES</b>	
I. ISOLEMENT ET ETUDE DES FRAGMENTS N- ET C- TERMINAUX DE LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE	65
A. Isolement et caractérisation des fragments tryptiques de la lactotransferrine bovine	65
1. Mode opératoire	65
2. Résultats	66
a) Isolement des fragments tryptiques de la lactotransferrine bovine	66
b) Détermination de la séquence N-terminale des fragments isolés	69
3. Discussion	71
B. Etude de la fixation du fer par les fragments isolés	72
1. Méthode	72
2. Résultats et discussion	72
C. Etude de la partie glycanique des fragments isolés	73
1. Mode opératoire	73
2. Résultats et discussion	73
D. Conclusion	75
II. ETUDE DU FRAGMENT N-TERMINAL DE LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE - ISOLEMENT ET PROPRIETES D'UN GLYCOPEPTIDE DE 20 kDa OBTENU PAR HYDROLYSE TRYPTIQUE MENAGEE DU FRAGMENT N-TERMINAL SATURE EN FER	76
A. Isolement et caractérisation d'un glycopeptide de 20 kDa obtenu par hydrolyse tryptique ménagée du fragment N-terminal saturé en fer	76
1. Mode opératoire	76
2. Résultat et discussion	77
a) Isolement du glycopeptide de 20 kDa	77
b) Détermination de la séquence N-terminale	77
B. Etude de la partie glycanique	80
1. Matériel et méthodes	80

	Page
2. Résultats et discussion	80
C. Etude de la fixation du fer	82
1. Matériel et méthodes	82
2. Résultats	84
a) Dosage du fer	84
b) Stabilité du complexe glycopeptide-Fe <sup>3+</sup> vis-à-vis de la protonation	84
c) Réversibilité de la fixation du fer par le glycopeptide de 20 kDa.	86
d) Influence de la présence du glycanne sur la saturation en fer	86
III. ETUDES REALISEES SUR LE FRAGMENT C-TERMINAL DE LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE	87
A. Hydrolyse trypsique ménagée du fragment C-terminal de la lactotransferrine bovine	87
B. Hydrolyse du fragment C-terminal de la lactotransferrine bovine par le bromure de cyanogène	88
1. Matériel et méthodes	89
2. Résultats	89
3. Discussion	91
C. Localisation des glycanne portés par le fragment C-terminal de la lactotransferrine bovine	95
1. Matériel et méthodes	95
2. Résultats	95
3. Discussion	96
D. Hydrolyse trypsique totale du fragment C-terminal de 45 kDa	101
CONCLUSION	101
 <b>CLONAGE ET SEQUENCAGE D'UN ADN COMPLEMENTAIRE CODANT POUR LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE</b>  	
I. STRATEGIE GENERALE DE CLONAGE	108
A. Choix du matériel de départ	109
B. Choix de la sonde	110
1. Les sondes acides nucléiques	110
2. Les sondes anticorps	111
C. Choix du vecteur	110
II. PREPARATION DES ARN CELLULAIRES TOTAUX DE DIFFERENTS TISSUS BOVINS - RECHERCHE D'ARN MESSAGERS CODANT POUR LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE	112
A. Principe	112
1. Choix des tissus	112
2. Choix de la sonde	113
B. Matériels et méthodes	114
1. Matériels	114
a) Prélèvement des tissus	114
b) Préparation des leucocytes	115

	Page
c) Préparation des sondes	115
α Synthèse de sondes oligonucléotidiques	115
β Préparation d'une sonde d'ADNc de la lactotransferrine humaine	117
γ Préparation d'une sonde d'ADNc de la sérotransferrine humaine	117
d) Marquage des sondes	118
2. Méthodes	119
a) Préparation des ARN totaux	119
b) Analyse des ARN préparés	119
c) Recherche d'ARNm codant pour la lactotransferrine bovine	120
C. Résultats et discussion	120
1. Préparation des ARN cellulaires totaux	120
2. Isolement des ARNm poly A+ - Recherche d'ARN messenger codant pour la lactotransferrine	122
a) Recherche d'ARN messenger de la lactotransferrine a l'aide des sondes oligonucléotidiques	122
b) Hybridation des ARNm poly A en présence des ADNc de la lactotransferrine et de la sérotransferrine humaines	124
D. Conclusion	125
III. CONSTRUCTION DES LIBRAIRIES D'ADN COMPLEMENTAIRES	125
A. Synthèse des molécules d'ADNc double brin	125
1. Principe	125
2. Matériels et méthodes	125
3. Résultats et discussion	126
B. Genèse des extrémités Eco RI - Fractionnement en taille des ADNc	128
1. Principe	128
2. Matériels et méthodes	130
a) Méthylation des sites Eco RI internes et ligation des adaptateurs Eco RI	130
b) Digestion par Eco RI - Elimination des molécules d'adaptateurs	130
3. Résultats	131
C. Clonage dans le bactériophage λgt 10	131
1. Principe	131
2. Matériels et méthodes	133
3. Résultat	133
D. Encapsidation - Titration des librairies	134
1. Principe	134
2. Matériels et méthodes	134
3. Résultats	135
IV. CRIBLAGE DE LA LIBRAIRIE "GLANDE SALIVAIRE" - ANALYSE DES CLONES RECOMBINANTS SELECTIONNES	135
A. Criblage de la librairie "Glande Salivaire"	135
1. Criblage par la sonde d'ADNc de la lactotransferrine humaine	137
a) Méthode	137
b) Résultat	138

	Page
2. Criblage différentiel par les sondes d'ADNc de la lactotransferrine et de la sérotransferrine humaines	138
B. Analyse des clones recombinants	140
1. Principe	140
2. Méthodes	140
3. Résultats et discussion	141
C. Conclusion	144
V. SEQUENCAGE DES ADN COMPLEMENTAIRES - DETERMINATION DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE DE LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE	144
A. Principe	146
1. Clonage dans le bactériophage M13	146
2. Détermination de la séquence d'un ADN cloné	146
B. Matériel et méthodes	147
1. Clonage dans le bactériophage M13	147
2. Détermination de la séquence d'ADN	148
C. Résultats : séquençage du clone C-1	148
CONCLUSION	149

- CONCLUSION GENERALE -

- BIBLIOGRAPHIE -



## SOMMAIRE APPENDICE TECHNIQUE

	Page
<b>PREMIERE PARTIE - PREPARATION ET ETUDE DES FRAGMENTS DE LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE</b>	
I. PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE	A-1
A. Préparation de la lactotransferrine saturée en fer	A-1
1. Préparation du lactosérum	A-1
2. Chromatographie du lactosérum	A-2
3. Purification de la lactotransferrine	A-2
B. Préparation de l'apolactotransferrine	A-2
II. PREPARATION DES FRAGMENTS TRYPSIQUES DE LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE	A-3
A. Préparation des fragments N- et C- terminaux	A-3
B. Préparation du glycopeptide N-2	A-4
III. HYDROLYSE DU FRAGMENT C-TERMINAL PAR LE BROMURE DE CYANOGENE	A-4
A. Réduction et alkylation	A-4
B. Hydrolyse par le bromure de cyanogène	A-5
IV. PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES	A-6
A. Hydrolyse trypsique totale	A-6
B. Chromatographie d'affinité sur colonne de concanavaine-A Sepharose	A-6
V. ETUDE DU GLYCOPEPTIDE N-2	A-7
A. Etude de la partie glycanique	A-7
1. Déglycosylation	A-7
2. Chromatographie des glycannes sur couche mince	A-8
B. Etude de la fixation du fer	A-8
1. Stabilité du complexe glycopeptide N-2-Fe <sup>3+</sup> en fonction du pH	A-8
2. Réversibilité de la fixation du fer par le glycopeptide N-2	A-8
3. Influence de la présence du glycanne sur la saturation en fer	A-9
VI. TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE DOSAGE	A-9
A. Techniques d'analyse	A-9
1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide	A-9
2. Détermination de la séquence N-terminale des fragments	A-10
B. Techniques de dosage	A-10

1. Dosage des protéines	A-10
2. Dosage du fer	A-10
3. Composition molaire en monosaccharides	A-11

**DEUXIEME PARTIE - CLONAGE D'UN ADNc CODANT POUR  
LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE**

I. SOUCHES BACTERIENNES ET MILIEUX DE CULTURE UTILISES	A-12
A. Caractéristiques des souches utilisées	A-12
B. Composition des milieux de culture	A-12
II. COMPOSITION DES SOLUTIONS ET TAMPONS COURAMMENT UTILISES	A-15
III. TECHNIQUES D'ISOLEMENT ET DE PURIFICATION DES ARN	A-16
A. Préparation des ARN cellulaires totaux	A-16
B. Purification des ARNm poly A+	A-17
IV. MARQUAGE DES SONDAS	A-18
A. Marquage des fragments d'ADN double brin	A-18
B. Marquage des sondes oligonucléotidiques	A-19
V. CONSTRUCTION DES LIBRAIRIES D'ADN COMPLEMENTAIRES	A-19
A. Synthèse des ADNc double brin	A-19
B. Méthylation des sites Eco RI internes et ligation des adaptateurs Eco RI	A-20
C. Digestion par Eco RI - Elimination des monomères d'adaptateurs	A-21
D. Clonage dans le bactériophage $\lambda$ gt 10	A-22
VI. CRIBLAGE DES LIBRAIRIES	A-23
A. Transfection de la souche d' <i>E. coli</i> C 600 hfl par le bactériophage $\lambda$ gt 10	A-23
1. Préparation des bactéries compétentes	A-23
2. Transfection	A-23
B. Criblage	A-24
VII. TECHNIQUES DE PREPARATION DE L'ADN	A-24
A. Préparation de l'ADN du bactériophage	A-24
B. Préparation de l'ADN plasmidique	A-25
C. Préparation de l'ADN simple brin du bactériophage M13	A-26
VIII. ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE	A-27
A. Electrophorèse de l'ARN en gel d'agarose dénaturant	A-27
B. Electrophorèse de l'ADN	A-28
C. Elution d'un fragment d'ADN	A-28

	Page
IX. TRANSFERT PAR CAPILLARITE DES ACIDES NUCLEIQUES SUR MEMBRANE DE NITROCELLULOSE	A-29
A. Transfert de l'ADN	A-29
B. Transfert de l'ARN	A-29
X. TECHNIQUES D'HYBRIDATION	A-29
A. Hybridation en présence des sondes oligonucléotidiques	A-29
B. Hybridation en présence de la sonde d'ADNc de la lactotransferrine humaine	A-30
XI. UTILISATION DES ENZYMES DE RESTRICTION	A-31
A. Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction	A-31
B. Préparation d'un insert d'ADN après digestion par un (des) enzyme(s) de restriction	A-31
XII. SOUS-CLONAGE DE FRAGMENTS D'ADN	A-31
A. Vecteurs utilisés	A-31
B. Ligation	A-32
C. Préparation des bactéries compétentes	A-32
D. Transformation des bactéries compétentes	A-34
1. Transformation des bactéries JM 101 par le plasmide pUC 18	A-34
2. Transformation des bactéries JM 105 par la forme répliquative du bactériophage M13	A-34
XIII. SEQUENCAGE DES FRAGMENTS D'ADN CLONES	A-35

#### BIBLIOGRAPHIE

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

ADNc	ADN complémentaire
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
BET	Bromure d'éthidium
BrCN	Bromure de cyanogène
CsCl	Chlorure de césium
dATP	2'-Désoxyadénosine-5'-triphosphate
dCTP	2'-Désoxycytidine-5'-triphosphate
ddNTP	2',3'-Didésoxynucléoside-5'-triphosphate
DTT	Dithiothréitol
dGTP	2'-Désoxyguanosine-5'-triphosphate
DNase	Désoxyribonucléase
dNTP	2'-Désoxynucléoside-5'-triphosphate
dTTP	2'-Désoxythymidine-5'-triphosphate
EDTA	Ethylène Diamine Tétracétate de Sodium
HEPES	Acide N-2-hydroxyméthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
kb	kilobase (1000 paires de bases)
LTF	Lactotransferrine
MES	Acide [2 (N-morpholino) éthane] sulfonique
OTF	Ovotransferrine
pb	paire de bases
PEG	Polyéthylèneglycol
RNase	Ribonucléase
SAB	Serum Albumine Bovine
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
STF	Sérotransferrine
U	Unité
XGal	5-Bromo-4-chloro-indolyl- $\beta$ -D-galactoside

## CODE DES ACIDES AMINES

---

A	Alanine	(Ala)
C	Cystéine	(Cys)
D	Acide aspartique	(Asp)
E	Acide glutamique	(Glu)
F	Phénylalanine	(Phe)
G	Glycine	(Gly)
H	Histidine	(His)
I	Isoleucine	(Ile)
K	Lysine	(Lys)
L	Leucine	(Leu)
M	Méthionine	(Met)
N	Asparagine	(Asn)
P	Proline	(Pro)
Q	Glutamine	(Gln)
R	Arginine	(Arg)
S	Sérine	(Ser)
T	Thréonine	(Thr)
V	Valine	(Val)
W	Tryptophane	(Trp)
Y	Tyrosine	(Tyr)

## Introduction

## INTRODUCTION

La découverte de la lactotransferrine dans le lait de Femme par MONTREUIL en 1960 (MONTREUIL et MULLET, 1960 ; MONTREUIL *et al.*, 1960) a été le point de départ des recherches entreprises au Laboratoire - au sein de l'équipe du Professeur G. SPIK - sur la détermination de la structure primaire et du rôle des transferrines et de leurs récepteurs.

Les lactotransferrines sont des glycoprotéines, de la classe des transferrines, de masse moléculaire voisine de 80 kDa qui ont la propriété de fixer, réversiblement, deux ions ferriques en deux sites spécifiques de la molécule. La détermination de la structure primaire de la lactotransferrine humaine, entreprise en 1974 au Laboratoire - en collaboration avec l'équipe du Professeur P. JOLLES - a été achevée en 1984 (METZ-BOUTIGUE *et al.*, 1984). D'après ces résultats, la lactotransferrine humaine est constituée d'une chaîne polypeptidique unique de 703 acides aminés, portant un glycanne de type N-acétyllactosaminique sur chacun des deux lobes, et présentant 70 % d'homologie de séquence avec la chaîne polypeptidique de la lactotransferrine de Souris (PENTECOST *et al.*, 1987). Récemment, les travaux de BAKER *et al.* (1987) sur la cristallisation et la diffraction aux rayons X de la lactotransferrine humaine, ont pu fournir une image de la structure tridimensionnelle de la molécule. Ces auteurs ont montré, en particulier, que la lactotransferrine possédait une forme bilobée, chaque lobe étant constitué de deux domaines à l'interface desquels se trouve un ion ferrique. Des études similaires, réalisées sur la sérotransferrine de Lapin (BAILEY *et al.*, 1988) ont montré que le modèle tridimensionnel de cette dernière était très proche de celui décrit pour la lactotransferrine humaine. Ces résultats sont certes un aboutissement, mais aussi un départ

vers l'étude des relations qui existent entre la structure conformationnelle des transferrines et leurs fonctions.

Parmi les fonctions biologiques des transferrines, l'activité bactériostatique est une des plus importantes. L'activité bactériostatique des lactotransferrines, suggérée dès 1960 par MONTREUIL *et al.*, a été démontrée, pour les lactotransferrines humaine et bovine vis-à-vis de nombreuses souches bactériennes, par différents auteurs. La démonstration de cette activité a conduit à l'idée d'utiliser les lactotransferrines en tant que médicament dans le traitement des infections d'origine bactérienne. La lactotransferrine de Vache pouvant être obtenue plus facilement que la lactotransferrine humaine, un projet d'utilisation de la lactotransferrine bovine dans un but thérapeutique a été proposé, en collaboration avec la firme pharmaceutique CASSENNE. La réalisation de ce projet rendait nécessaire la connaissance approfondie des propriétés structurales de la lactotransferrine de Vache. C'est en ce sens qu'a été entreprise la détermination de la structure primaire de la lactotransferrine de Vache.

L'étude de la lactotransferrine de Vache a débuté, au Laboratoire, au début des années 70 par l'isolement et la définition des principales propriétés physico-chimiques de la lactotransferrine présente dans le lait de Vache (CHERON *et al.*, 1975 ; CHERON *et al.*, 1977). Depuis, ces études ont été reprises et ont abouti à la mise au point d'un protocole de purification à l'échelle industrielle et à la mise en évidence d'une très grande hétérogénéité structurale de la fraction glycanique (SPIK *et al.*, 1985 ; SPIK *et al.*, 1988). Concernant la structure primaire de la chaîne polypeptidique, seuls les 5 premiers acides aminés N-terminaux étaient connus.

Notre travail a donc consisté en la détermination de la structure primaire de la lactotransferrine de Vache. Cette détermination a été réalisée grâce à l'application de deux types de méthodologies. Dans un premier temps, sur la base de résultats acquis au Laboratoire sur la détermination

de la structure primaire de la lactotransferrine humaine par l'application de méthodes chimiques et enzymatiques (METZ-BOUTIGUE *et al.*, 1984), nous avons entrepris une étude similaire sur la lactotransferrine de Vache. Plus particulièrement, nous avons utilisé le protocole mis au point par LEGRAND *et al.* (1984) et isolé 2 fragments N- et C- terminaux de la lactotransferrine de Vache ainsi qu'un fragment glycopeptidique de 20 kDa. De plus, nous avons, en collaboration avec le Laboratoire du Professeur TARTAR, déterminé la séquence N-terminale de nos fragments et localisé les 3 sites de glycosylation présents dans le lobe C-terminal de la molécule.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés au clonage de l'ADN complémentaire de la lactotransferrine bovine. Nous avons, dans ce but, recherché des tissus exprimant en grande quantité un ARN messager spécifique et construit des bibliothèques d'ADNc. Les résultats que nous avons obtenus concernent le clonage et le séquençage d'un ADN complémentaire d'un ARN messager codant pour la lactotransferrine produite par la glande sous-maxillaire bovine.

Ces résultats, bien que partiels, apportent la preuve de l'existence d'une forte homologie de structure avec la lactotransferrine humaine et fournissent quelques précisions sur la localisation des glycanes le long de la chaîne peptidique. Par ailleurs, le clonage et le séquençage d'un ADNc partiel de la lactotransferrine ouvrent la perspective du clonage du gène de la lactotransferrine bovine, et de l'étude de la régulation de l'expression de ce gène.



# Généralités

# REPARTITION DU FER DANS L'ORGANISME

## ROLE DES LACTOTRANSFERRINES

### I. LE FER DANS L'ORGANISME HUMAIN

#### A. Répartition et importance du fer dans l'organisme

Le fer est un des oligoéléments les plus importants pour la vie et la croissance des organismes. Il joue notamment un rôle essentiel comme cofacteur des enzymes intervenant dans les mécanismes d'oxydo-réduction des chaînes respiratoires et, par sa présence dans l'hémoglobine, assure le transport de l'oxygène vers les tissus. La quantité de fer contenue dans un organisme humain adulte est de l'ordre de 4 à 5 g répartis entre deux compartiments principaux, représentés par les formes actives et par les formes de réserve. L'importance de cette répartition dans l'organisme nécessite un moyen de transport et de régulation constitué par un troisième compartiment qui représente 0,2 % de la totalité du fer : il s'agit des transferrines.

#### B. Les formes de réserve

Le foie constitue l'organe de réserve le plus important puisqu'il renferme, dans ses cellules parenchymateuses, environ 1/3 des réserves de fer de l'organisme, le métal se répartissant pour 2/3 dans la ferritine et pour 1/3 dans l'hémosidérine.

La ferritine est une protéine soluble d'une masse moléculaire de 445.000 daltons, constituée de deux parties : un noyau minéral d'hydroxyde et de phosphate ferreux, et une enveloppe protéique, formée de 24 protomères composés chacun de 174 acides aminés (HEUSTERSPREUTE et CRICHTON, 1981). Les ferritines renferment deux types de protomères en proportions variables selon les tissus. Les structures primaires de ferritines d'origines diverses ont été déterminées (voir revue générale de CRICHTON et CHARLOTEAUX-WAUTERS, 1987).

L'hémosidérine, quant à elle, est une protéine insoluble contenant encore plus de fer que la ferritine. Cependant, le métal est moins disponible que celui de la ferritine (WYLLIE *et al.*, 1971). Cette protéine serait produite par dégradation et agrégation intralysosomique de la ferritine.

### C. Les formes de transport : les transferrines

Les transferrines constituent une famille importante de glycoprotéines qui interviennent dans le transport du fer. Elles ont en commun une masse moléculaire voisine de 80.000 daltons et la propriété de fixer réversiblement deux ions  $Fe^{3+}$ . Elles sont présentes dans les tissus et dans de nombreux liquides physiologiques de Vertébrés (AISEN *et al.*, 1980) et d'Invertébrés (HUEBERS *et al.*, 1982). On distingue :

- *Les ovotransferrines* (ou conalbumines) que l'on trouve dans le blanc d'oeuf des Oiseaux. La découverte de l'ovotransferrine remonte à OSBORNE (1899), mais son rôle dans la fixation du fer n'a été mis en évidence qu'en 1944 par SCHADE et CAROLINE.

- *les sérotransferrines* qui sont les transporteurs de fer du sang. Elles ont été caractérisées pour la première fois par BARKAN (1927), mais leur rôle ferrifixeur n'a été mis en évidence qu'en 1946 par SCHADE et

CAROLINE, puis par LAURELL (1947). Pour plus de détails sur le rôle des sérotransferrines, nous renvoyons le lecteur aux revues générales de LANE (1976), AISEN et BROWN (1977), HERSHKO (1977) et BROCK (1985).

- *Les lactotransferrines.* En 1939, SORENSEN et SORENSEN signalent la présence d'une protéine rouge dans le lait de Vache. Ce n'est qu'en 1960 que la lactotransferrine fut isolée et caractérisée par MONTREUIL et MULLET (1960) et MONTREUIL *et al.* (1960) à partir du lait de Femme, et par GROVES (1960) à partir du lait de Vache. Cette glycoprotéine a longtemps été considérée comme une protéine exclusivement lactée. Depuis, elle a été caractérisée dans d'autres liquides et milieux d'excrétion (voir revue générale de SPIK et MONTREUIL, 1983) ainsi que dans certaines cellules, comme les leucocytes neutrophiles (MASSON *et al.*, 1969). Dans ces cellules, la lactotransferrine est localisée dans les granules secondaires et serait un marqueur de différenciation de la lignée granulocytaire (RADO *et al.*, 1984).

- *La mélanotransferrine,* qui est une protéine membranaire (également dénommée antigène P97) isolée des cellules de mélanome humain (BROWN *et al.*, 1982). Bien que cette protéine fixe réversiblement le fer, on ne connaît pas encore sa fonction exacte.

## II. ROLE BIOLOGIQUE DES LACTOTRANSFERRINES

### A. Rôle de la lactotransferrine dans la nutrition martiale et dans l'absorption intestinale du fer

L'enfant nourri au sein n'a normalement pas besoin d'un apport supplémentaire de fer avant l'âge de 4 à 6 mois. Par contre, celui-ci s'avère nécessaire dans le cas d'une alimentation précoce au lait de Vache. En effet, non seulement le lait de Femme contient plus de fer que le lait de

Vache (0,8 mg/l et 0,46 mg/l, respectivement) (BLANC, 1981) mais le métal est encore mieux assimilé que celui présent dans le lait de Vache. Cette différence d'assimilation ne pouvant s'expliquer que par l'existence d'une spécificité d'absorption, plusieurs auteurs ont recherché quel était le mécanisme de l'absorption intestinale du fer (voir les revues générales de FORTH et RUMMEL, 1973, de CONRAD, 1987 et de SPIK, 1988).

Un mécanisme faisant intervenir la sérotransferrine a été proposé par HUEBERS et *al.* (1983) selon lequel l'aposérotransferrine de rat, présente dans la lumière intestinale, captait le fer puis était internalisée par l'entérocyte. Ce mécanisme supposait donc l'existence d'un récepteur entérocytaire spécifique de la sérotransferrine. Cette hypothèse a été infirmée par la démonstration de l'absence de récepteur de la sérotransferrine humaine à la surface de la bordure en brosse des entérocytes humains ou de Lapin (MARX *et al.*, 1984 ; MAZURIER *et al.*, 1985). Les travaux récents de HU *et al.* (1987) confirment l'absence de fixation de la sérotransferrine murine sur les entérocytes de Souris.

Le second mécanisme fait intervenir la lactotransferrine comme principal partenaire dans la nutrition martiale. Les travaux de SIIMES *et al.* (1979) montrent que le fer lié à la lactotransferrine est mieux absorbé par l'intestin que les sels de fer. Chez l'adulte, le fer apporté par l'alimentation est libéré dans l'estomac sous l'effet du pH et par l'action protéolytique de la pepsine. Par contre, dans l'estomac du nourrisson, où la protéolyse est faible et le pH voisin de 4, la lactotransferrine conserve son fer (SPIK *al.*, 1971). En 1982, SPIK *et al.* ont montré que les selles de nourrissons alimentés au sein ou par du lait artificiel complémenté en lactotransferrine humaine, renfermaient de la lactotransferrine. De plus, cette "coprolactotransferrine" avait conservé ses propriétés ferrifixatrices bien que la molécule ait subi une protéolyse.

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle la lactotransferrine était responsable de l'apport du fer au niveau de l'intestin du nourrisson, des recherches ont été entreprises au Laboratoire en vue de caractériser un récepteur spécifique. Une collaboration avec le groupe du Pr. PETERS (COX *et al.*, 1979) a conduit à la démonstration que des biopsies prélevées au niveau du jejunum étaient capables d'incorporer, *in vitro*, du  $^{59}\text{Fe}^{3+}$  complexé à la lactotransferrine. Dans les mêmes conditions, le  $^{59}\text{Fe}^{3+}$  complexé à la séro- ou à l'ovotransferrine n'était pas incorporé. Un peu plus tard, MAZURIER *et al.* (1985) ont caractérisé un récepteur spécifique de la lactotransferrine au niveau des microvillosités intestinales de Lapin. Enfin, HU *et al.* (1987) ont récemment montré que la lactotransferrine murine se fixait spécifiquement sur des vésicules de la bordure en brosse du duodenum de Souris.

Il apparaît donc à présent bien établi que la lactotransferrine est responsable de l'apport du fer au niveau de l'entérocyte du nourrisson. Toutefois, le mécanisme de la captation et de l'internalisation du fer reste à définir.

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

La large répartition des transferrines a depuis longtemps été à l'origine des recherches entreprises sur le rôle biologique de ces glycoprotéines. Dès 1944, SCHADE et CAROLINE ont montré que l'ovotransferrine du blanc d'oeuf inhibait la croissance d'*Escherichia coli* et d'autres bactéries, et que cette inhibition était levée par l'addition de fer dans le milieu. En 1960, MONTREUIL *et al.* ont suggéré, pour la première fois, l'existence d'une activité bactériostatique jouée par la lactotransferrine, en plus de son rôle nutritionnel d'apport du fer au nourrisson. Depuis, de

nombreuses fonctions ont été attribuées à la lactotransferrine qui peuvent être regroupées en deux catégories :

- rôle dans l'immunité humorale ;
- rôle dans l'immunité à médiation cellulaire.

Pour plus de détails, nous renvoyons aux revues générales de REITER (1975) et de SPIK et MONTREUIL (1983).

### 1. Rôle de la lactotransferrine dans l'immunité humorale.

Lorsqu'un organisme est infecté par une bactérie, il met en oeuvre, non seulement des mécanismes spécifiques relevant de l'immunité, mais aussi des mécanismes non spécifiques faisant intervenir le fer. Dans ce cas, l'inhibition de la croissance des bactéries est due à un mécanisme de fer-riprivation fondé sur une compétition entre les chélateurs synthétisés par les bactéries, d'une part, et les protéines fixatrices du fer synthétisées par l'hôte, d'autre part. Un tel mécanisme a été étudié pour l'entérochiline (sidérophore produit par *Escherichia coli*) et la sérotransferrine (CARRANO et RAYMOND, 1979). Il s'agit d'un mécanisme réversible, car une addition de fer au milieu suffit à lever l'inhibition. L'effet bactériostatique de la lactotransferrine a été démontré, *in vitro*, pour différentes souches d'*Escherichia coli* (BULLEN *et al.*, 1972 ; REITER *et al.*, 1975 ; SPIK *et al.*, 1978), et de Staphylocoques (MASSON *et al.*, 1966), et pour *Pseudomonas aeruginosa* (MASSON *et al.*, 1966), *Bacillus stearothermophilus* et *Bacillus subtilis* (ORAM et REITER, 1968) et pour *Candida albicans* (KIRKPATRICK *et al.*, 1971). Cette activité n'est effective que pour des lactotransferrines partiellement saturées ou apo (c'est-à-dire sans fer), et dépend du pH du milieu, du rapport molaire entre transferrines et sidérophores, et de la concentration du milieu en ions citrate et bicarbonate (CARRANO et RAYMOND, 1979).

Par ailleurs, les travaux réalisés par ARNOLD *et al.* (1982) rendent compte d'une activité bactéricide de l'apolactotransferrine dissoute dans l'eau distillée. Cette bactéricidie a été mise en évidence sur un grand nombre de microorganismes Gram (+), Gram (-), aérobies ou anaérobies et des Levures. L'apolactotransferrine doit, cependant, être en contact direct avec la paroi bactérienne pour que cette bactéricidie soit observée.

Enfin, l'action bactériostatique de la lactotransferrine peut être potentialisée par son association avec du lysozyme (PERRAUDIN et PRIEELS, 1982) et avec des immunoglobulines A de sécrétion (BULLEN *et al.*, 1972 ; SPIK *et al.*, 1978 ; STEPHENS *et al.*, 1980).

## 2. Rôle de la lactotransferrine dans l'immunité à médiation cellulaire

### a) Mobilisation des cellules immunocompétentes

Les trois principales cellules intervenant dans l'immunité sont les lymphocytes, les leucocytes neutrophiles et les macrophages. Les leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) synthétisent de la lactotransferrine qui est ensuite stockée dans les granules secondaires. Lors de l'infection par une bactérie, LEFELL et SPITZNAGEL (1972) ont montré que 60 % de la lactotransferrine était "dégranulée". Cette lactotransferrine, retrouvée dans le plasma, attirerait les macrophages et les lymphocytes qui possèdent des récepteurs spécifiques de la lactotransferrine (DE SOUSA, 1978). Enfin, par un second mécanisme, 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 membranaires de ces deux protéines. Par ailleurs, la lactotransferrine contenue dans les granules intacts (40 %) est libérée par fusion, lors de la phagocytose de



la bactérie, avec la vacuole de phagocytose pour constituer le phagolysosome. A ce niveau, la lactotransferrine exerce une activité bactéricide par ferriprivation à l'intérieur de la vacuole et augmenterait le taux de radicaux libres par l'apport de fer complexé.

*b) Déclenchement de l'hyposidérémie inflammatoire*

Un autre rôle important de la lactotransferrine concerne l'hyposidérémie inflammatoire. En effet, il est actuellement bien admis que, lors d'une infection, la sidérémie baisse brutalement (WEINBERG, 1974) avec une augmentation concomitante du fer de réserve dans le foie et les macrophages (PEKAREK *et al.*, 1969), qui a pour effet d'inhiber la croissance des bactéries par ferriprivation. Un mécanisme représentant les différentes étapes de l'hyposidérémie inflammatoire a été proposé (Fig. 1, p. 12). Dans un premier temps, les leucocytes activés libèrent dans le sang un "leukocytic endogenous mediator" ou LEM (KAMPSCHMIDT *et al.*, 1975) qui a été identifié au "leukocytic pyrogen" ou LEP. Des études récentes (OPPENHEIN, 1986 ; HEYLAR, 1987) suggèrent que ce facteur ne serait autre que l'interleukine 1. Outre son rôle pyrogène, ce facteur entraîne une dégranulation des leucocytes et donc une libération de lactotransferrine dans le milieu extracellulaire. Selon VAN SNICK *et al.* (1977), la lactotransferrine ainsi libérée sous la forme d'apo-protéine capterait le fer de la sérotransferrine et le transférerait, par le biais d'un récepteur spécifique, dans le macrophage où le fer serait stocké sous forme de ferritine. L'ensemble de ces mécanismes sont décrits sous le vocable d'"immunité nutritionnelle".

*c) Régulation de la myélopoïèse*

Enfin, la lactotransferrine joue un rôle dans la régulation de la myé-

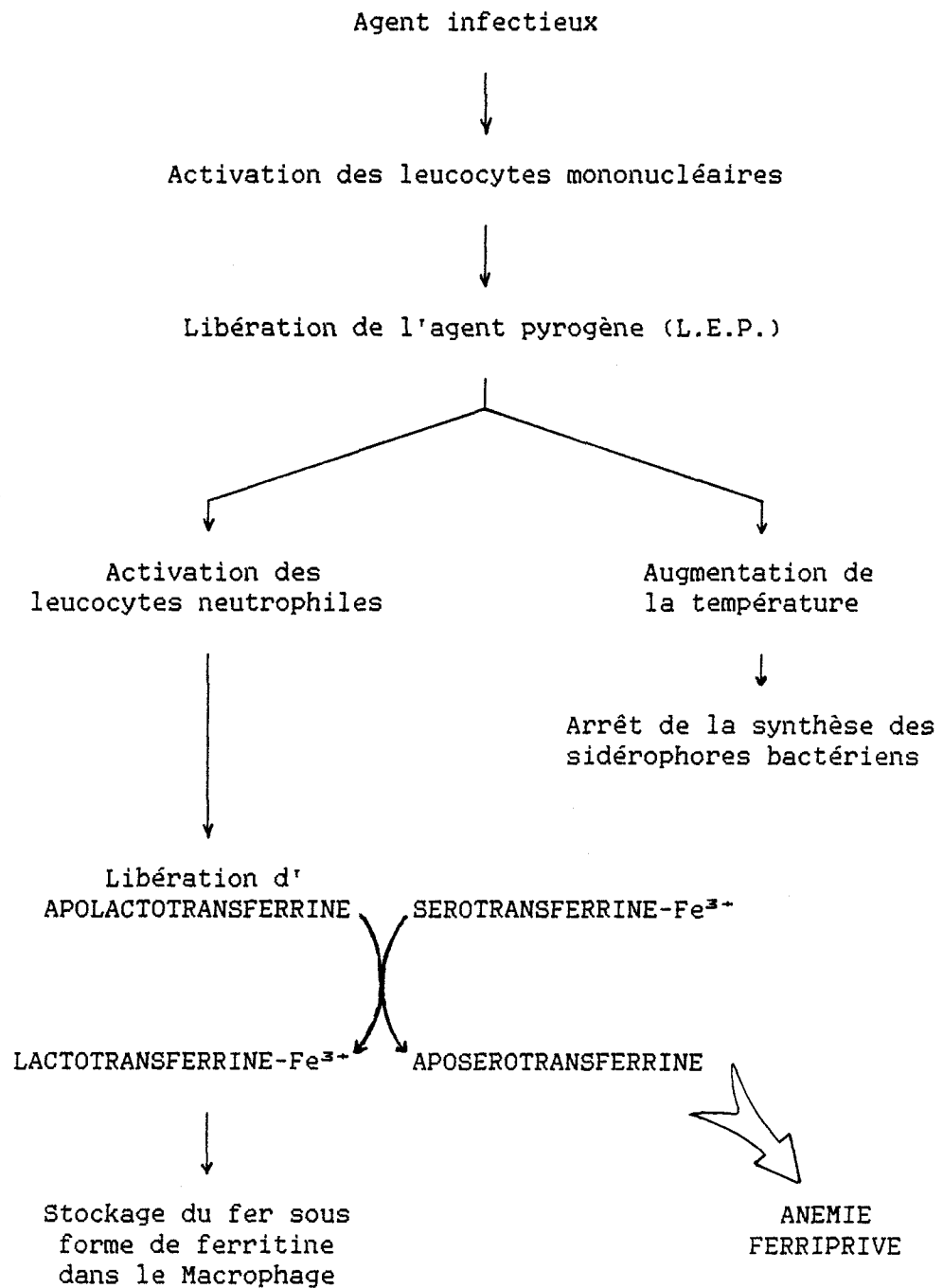


Fig. 1 : Schéma récapitulatif de l'intervention des transferrines lors d'une agression microbienne. (D'après la revue générale de SPIK et MONTREUIL, 1983).

lopoièse (voir la revue générale de BROXMEYER *et al.*, 1985), dans la cytotoxicité des monocytes et des cellules "Natural Killers" (NK) (HORWITZ *et al.* 1984). Récemment, il a été démontré que la lactotransferrine intervient également comme facteur de croissance des lignées lymphocytaires B et T humaines (HASHIZUME *et al.*, 1983). MAZURIER *et al.* (1989) ont confirmé ces résultats en montrant que la lactotransferrine humaine possédait une activité de facteur de croissance pour les lymphocytes humains stimulés par la phytohémagglutinine. Selon ces auteurs, des récepteurs pour la lactotransferrine s'expriment lors d'une stimulation par la phytohémagglutinine.

# ETUDE STRUCTURALE ET CONFORMATIONNELLE DES LACTOTRANSFERRINES

## I. STRUCTURE COVALENTE DES LACTOTRANSFERRINES

### A. Structure de la chaîne peptidique

Les progrès récents réalisés dans les techniques chimiques de micro-séquençage des protéines et l'apport du génie génétique pour déterminer la structure primaire des protéines sur la base de la séquence nucléotidique de leur ADN complémentaire, ont permis l'étude fine de la fonction d'un bon nombre de protéines et glycoprotéines. La détermination de la structure primaire d'une protéine est, en effet, une étape essentielle dans la définition de sa structure tridimensionnelle et dans la compréhension de sa fonction. C'est ainsi que ces dernières années, les séquences de plusieurs transferrines ont été établies entièrement par ces deux moyens d'approche.

#### 1. Structure primaire des lactotransferrines

Deux séquences complètes de lactotransferrines ont été décrites à ce jour : celles de la lactotransferrine humaine (METZ-BOUTIGUE *et al.*, 1984) et de la lactotransferrine de Souris (PENTECOST *et al.*, 1987).

##### a) Lactotransferrine humaine

L'étude de la structure primaire de la lactotransferrine humaine a été

entreprise, dès 1974 au Laboratoire, en collaboration avec le Laboratoire du Professeur Pierre JOLLES. Les premiers résultats remontent en effet à 1976 avec la publication d'une séquence N-terminale de 24 acides aminés (JOLLES *et al.*). La coupure de la lactotransferrine humaine par le bromure de cyanogène est la méthode qui a permis réellement de progresser dans la détermination de la structure primaire. Cette approche a été réalisée par MAZURIER *et al.* (1974), puis par METZ-BOUTIGUE *et al.* (1981, 1982) qui ont isolé les sept "fragments BrCN" de la lactotransferrine humaine et les ont alignés avec des séquences connues de la sérotransferrine humaine. Les études entreprises au Laboratoire par LEGRAND *et al.* (1984, 1987) ont permis d'obtenir d'autres fragments par coupure trypsique. Ces travaux, en collaboration avec l'équipe de P. JOLLES ont conduit à la détermination de la séquence peptidique complète des 703 résidus d'acides aminés de la chaîne polypeptidique unique (METZ-BOUTIGUE *et al.*, 1984).

b) Lactotransferrine murine

La structure primaire de la lactotransferrine de Souris a été réalisée récemment par PENTECOST *et al.* (1987) qui ont isolé la protéine majeure produite par les cellules de l'utérus de Souris après induction par des hormones oestrogènes. L'ADN complémentaire codant pour cette protéine induite a été cloné, séquencé et identifié à la lactotransferrine de Souris. En effet, cette séquence de 701 acides aminés présente 70 % d'homologie avec la lactotransferrine humaine et approximativement 56 % d'homologie avec la sérotransferrine humaine. L'enchaînement des acides aminés des lactotransferrines humaine et murine est représenté, de manière comparée, dans la figure 2 p. 16.

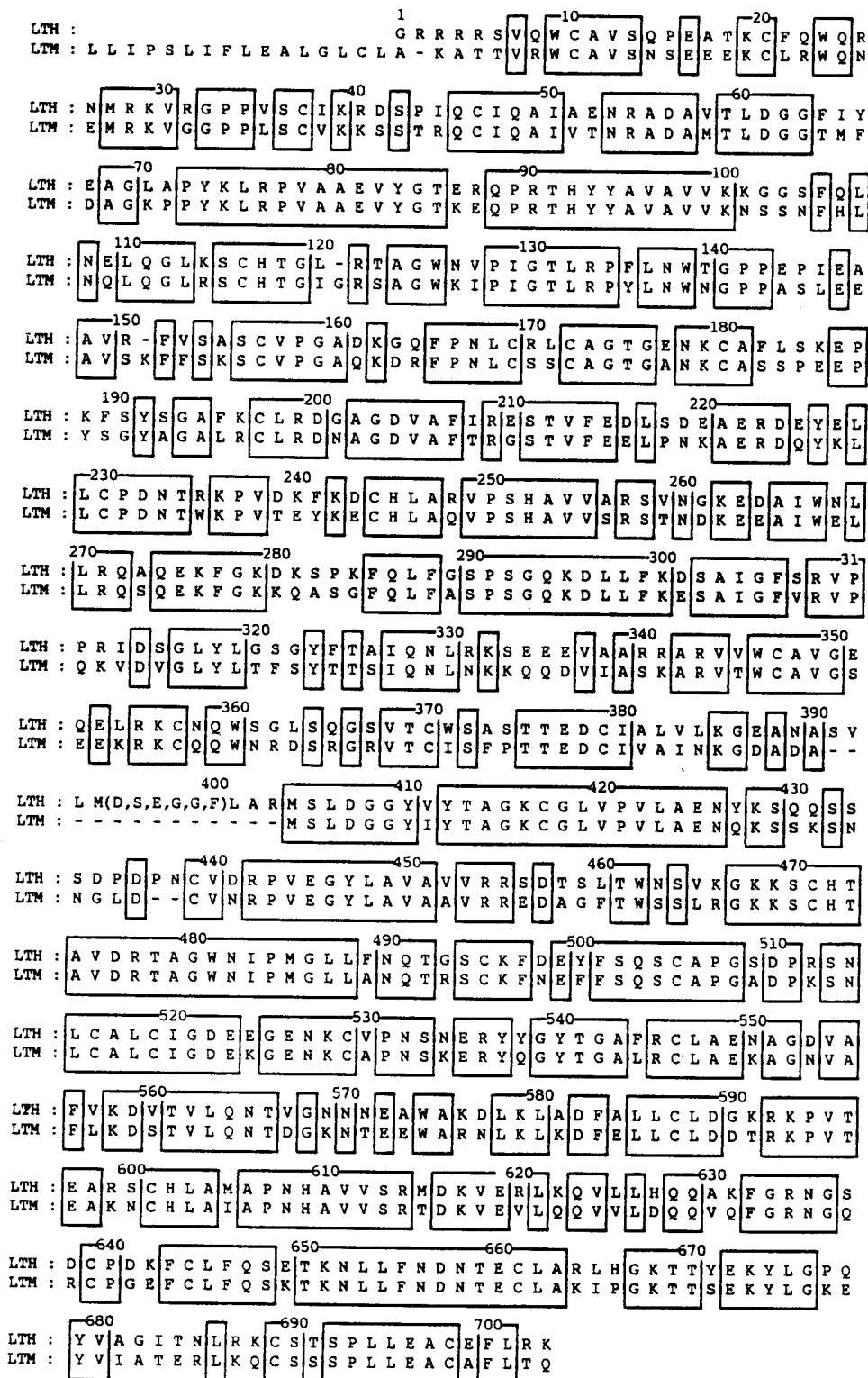


Fig. 2 : Comparaison des structures covalentes des lactotransferrines humaine (LTH) et murine (LTM). [D'après METZ-BOUTIGUE *et al.* (1984) et PENTECOST *et al.* (1987)].

c) Lactotransferrines d'autres espèces

Parmi les autres lactotransferrines en cours d'étude, nous pouvons citer les travaux de JOLLES *et al.* (1984) sur la détermination de la séquence N-terminale de la lactotransferrine de Jument.

En ce qui concerne les données de structure primaire de la lactotransferrine de Vache, elles sont très restreintes. Celles-ci seront exposées dans la partie "Résultats Personnels", comparativement aux résultats de notre étude.

2. Nombre et localisation des ponts disulfures

Une des caractéristiques fondamentales des transferrines est la présence de ponts disulfures retrouvés en des positions homologues. Ces derniers jouent un rôle très important dans la conformation de la protéine et dans le maintien de cette dernière. Aucune étude réalisée sur les transferrines n'a révélé la présence de résidus de cystéine dans la chaîne peptidique, montrant ainsi que tous les résidus sont impliqués dans la formation de ponts disulfures.

La lactotransferrine humaine possède 32 résidus de cystéine ; 12 sont situés dans la moitié N-terminale et 20 dans la moitié C-terminale. Ces 32 résidus contribuent à la formation de 16 ponts disulfures : 6 ponts dans la moitié N-terminale et 10 ponts dans la moitié C-terminale. La présence d'un nombre plus important de ponts disulfures dans la moitié C-terminale pourrait expliquer la plus grande résistance de ce fragment à la dénaturation et à la protéolyse. Sur ces 16 ponts disulfures, 8 ont vu leur position précisée (METZ-BOUTIGUE *et al.*, 1984).

Quant aux lactotransferrines de Vache et de Souris, aucun résultat sur le nombre et la position de ponts disulfures n'a été relaté à ce jour.

### 3. Homologies de séquences avec les autres transferrines

La connaissance de plusieurs séquences de transferrines et la comparaison de celles-ci avec les séquences des lactotransferrines connues font apparaître de nombreuses zones d'homologies (METZ-BOUTIGUE *et al.*, 1984). Ces homologies sont de l'ordre de 59 % entre la lactotransferrine et la sérotransferrine humaines, et de 49 % entre la lactotransferrine humaine et l'ovotransferrine de Poule. La sérotransferrine humaine est, quant à elle, à 51 % homologue à l'ovotransferrine de Poule (METZ-BOUTIGUE *et al.*, 1984). Enfin, la publication récente de la séquence de la lactotransferrine de Souris (PENTECOST *et al.*, 1987) fait état de 70 %, 56 % et 49 % d'homologies respectivement avec la lactotransferrine humaine, la sérotransferrine humaine et l'ovotransferrine de Poule.

Des homologies de séquences internes peuvent également être mises en évidence en superposant les moitiés N- et C- terminales de chaque transferrine. Ces homologies internes sont respectivement de 37 %, 41 % et 33 % pour la lactotransferrine humaine, la sérotransferrine humaine et l'ovotransferrine de Poule (METZ-BOUTIGUE *et al.*, 1984). Elles intéressent non seulement des acides aminés impliqués directement dans la conformation de la molécule (cystéine, proline), mais aussi des acides aminés basiques, hydrophobes ou aromatiques dont certains sont impliqués dans la fixation des métaux (voir paragraphe III). La démonstration de ces homologies internes a été décrite pour la première fois par MAC GILLIVRAY et BREW (1975) et par WILLIAMS (1975) pour la sérotransferrine humaine et l'ovotransferrine de Poule. Ces auteurs mettent en évidence la présence de deux lobes possédant chacun un site de fixation du fer. Les travaux de LINE *et al.* (1976) sur la lactotransferrine humaine aboutissent à la même conclusion en ce qui concerne l'organisation de la molécule en deux lobes. Depuis, ces observations ont été confirmées par divers travaux : MAC GILLIVRAY *et*



*al.* (1977, 1982, 1983) pour la sérotransferrine humaine ; WILLIAMS *et al.* (1982), JELTSCH et CHAMBON (1982) pour l'ovotransferrine de Poule ; METZ-BOUTIGUE *et al.* (1978, 1981, 1982, 1984), MAZURIER *et al.* (1983) pour la lactotransferrine humaine. Elles ont abouti à une hypothèse selon laquelle les transferrines proviendraient d'un gène précurseur unique dérivant lui-même de la duplication d'un gène ancestral (WILLIAMS, 1982). Cependant, MAC GILLIVRAY *et al.* (1982) et JELTSCH et CHAMBON (1982) ont mis en évidence quatre zones d'homologies internes dans la sérotransferrine humaine et l'ovotransferrine de Poule, et, sur cette base, ces auteurs ont émis l'hypothèse d'une éventuelle tétraplication d'un gène ancestral. Toutefois, METZ-BOUTIGUE *et al.* (1981), MAZURIER *et al.* (1983) et METZ-BOUTIGUE *et al.* (1984) sont plus en faveur d'une hexaplication en se fondant sur l'existence de six domaines présentant des homologies de séquence.

## **B. Structure de la fraction glycanique**

Toutes les transferrines connues jusqu'à ce jour sont des glycoprotéines. Toutes possèdent un ou plusieurs glycannes conjugués par une liaison N-glycosidique à la chaîne peptidique au niveau d'une séquence code Asn-X-Thr (Ser). Cependant le nombre, la nature et la localisation de ces glycannes varient d'une transferrine à une autre (SPIK *et al.*, 1985 ; SPIK *et al.*, 1988).

### **1. Structure des glycannes de la lactotransferrine humaine**

La nature glycoprotéinique de la lactotransferrine humaine a été démontrée par MONTREUIL et MULLET, dès 1960. La présence de deux glycannes liés N-glycosidiquement à été mise en évidence par SPIK *et al.* (1973) et confirmée par METZ-BOUTIGUE *et al.* (1980). Un glycanne est situé dans la

région N-terminale et est porté par l'asparagine 137 (METZ-BOUTIGUE *et al.*, 1984). Le second est situé dans la région C-terminale (asparagine 490) dans une position homologue à celle du glycanne de l'ovotransferrine de Poule (MAZURIER *et al.*, 1983 ; METZ-BOUTIGUE *et al.*, 1984 ; MONTREUIL *et al.*, 1985). Ces glycannes sont de type N-acétyllactosaminique, mono ou disialylé, fucosylé en  $\alpha$ -1,6 sur la N-acétylglucosamine du point d'attache. En outre, la structure monosialylée peut porter un second résidu de fucose lié en  $\alpha$ -1,3 à la N-acétylglucosamine-5 (SPIK *et al.*, 1982) (Voir Fig. 3, p. 21). D'autres structures plus complexes, de nature polyfucosylée ont été retrouvées en très petite quantité (MATSUMOTO *et al.*, 1982).

Enfin, DERISBOURG (1987) a montré qu'une lactotransferrine humaine isolée de leucocytes humains se distinguait de celle du lait par l'absence de fucose lié en  $\alpha$ -1,3.

## 2. Structure du glycanne de la lactotransferrine de Souris

La lactotransferrine de Souris possède un glycanne de type N-acétyllactosaminique disialylé, fucosylé en  $\alpha$ -1,6 de la N-acétylglucosamine du point d'attache (LECLERCQ *et al.*, 1987). La position de ce glycanne n'a pas été précisée, mais on peut noter la présence de deux sites de glycosylation au niveau des résidus d'asparagine 100 et 475 (PENTECOST *et al.*, 1987).

## 3. Structure des glycannes de la lactotransferrine de Vache

Bien que plusieurs structures aient été publiées, le nombre et la localisation des glycannes de la lactotransferrine de Vache ne sont pas connus avec certitude. En effet, la très grande micro-hétérogénéité des structures et la présence de glycannes de type oligomannosidique a rendu cette approche délicate.



La composition centésimale et molaire en glucides de la lactotransferrine de Vache a été déterminée par GROVES (1960), CASTELLINO *et al.* (1970), CHERON (1975), MALIET et PLANTEY (1977) et CODDEVILLE (1986). Les résultats sont présentés dans le Tableau I, p. 23. CODDEVILLE (1986) a montré que cette composition variait en fonction de la période de lactation. En effet, les glycanes d'une lactotransferrine de Vache isolée d'un lait stabilisé renferment beaucoup plus d'hexosamines qu'une lactotransferrine de colostrum ou de sécrétion sèche (Tableau II, p. 24) ; les glycanes de type oligomannosidique représenteraient, respectivement, 50 et 80 % de la fraction glycanique de la lactotransferrine de Vache isolée du lait stabilisé et du colostrum.

Par ailleurs, CODDEVILLE (1986) a décrit l'existence de glycanes de type N-acétyllactosaminique biantenné, plus ou moins fucosylé, où un résidu de galactose est remplacé par de la N-acétylgalactosamine. Ces glycanes, présents uniquement dans le lait stabilisé ne représenteraient que 3 % du mélange total des glycopeptides isolés (Fig. 4, p. 25). Les différentes structures des glycanes de type oligomannosidique décrits par VAN HALBEEK *et al.* (1981), SPIK *et al.* (1985) et SPIK *et al.* (1988) sont données dans la Fig. 5, p. 26.

En ce qui concerne la localisation de ces glycanes, seul CHERON (1975) a proposé un schéma préliminaire en déterminant la séquence peptidique au voisinage de deux glycanes présents sur deux glycopeptides obtenus après hydrolyse trypsique et pronasique (Fig. 6, p. 27).

- TABLEAU I -

COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE EN MONOSACCHARIDES  
DE LA LACTOTRANSFERRINE DE VACHE

Composition centésimale	a	b	c	d
Oses neutres	4,73	5,60	5,60	5,60
Osamines	2,28	-	2,70	2,98
Acides sialiques	0,13	-	0,60	0,75
Composition molaire				
Mannose	-	15-16	24,4	24
Galactose	-	5-6	2	8
Fucose	0	0	0,4	0,6
N-acétylglucosamine	-	10-11	8,3	)
N-acétylgalactosamine	-	0	1,2	) 10,5*
Acide N-acétylneuraminique	-	1	0,7	0,9

- a) GROVES (1960)
- b) CASTELLINO et *al.* (1970)
- c) CHERON (1975)
- d) MALIET et PLANTEY (1977)

(\*) Rapport N-acétylglucosamine/N-acétylgalactosamine, déterminé par la méthode de GARDELL (1953), après six heures d'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 4N.

- TABLEAU II -

**COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE EN MONOSACCHARIDES  
DE LACTOTRANSFERRINES DE VACHE  
ISOLEES A DIFFERENTS STADES DE LA LACTATION  
(D'après CODDEVILLE, 1986)**

Monosaccharides	Composition centésimale des lactotransferrines de Vache isolées à partir de			
	Sécrétion sèche	colostrum		Lait
		1 <sup>ère</sup> traite	6 <sup>ème</sup> traite	
Oses neutres	8,30	7,60	6,50	5,50
Osamines	4,60	4,60	4,30	5,10
Acide sialique	0	0,25	0,60	0,55
TOTAL	12,90	12,35	11,40	11,15
	Composition molaire en glucides des lactotransferrines de Vache			
Fucose	0	0,20	0,10	0
Galactose	0,34	0,60	0,30	0,40
Mannose	4,90	3,50	3,90	3
GalNac	0	0	0,20	0,40
GlcNac *	2	2	2	2
NeuAc	0,10	0,10	0,20	0,20

(\*) Les rapports molaires ont été calculés sur la base de deux résidus de N-acétylglucosamine.

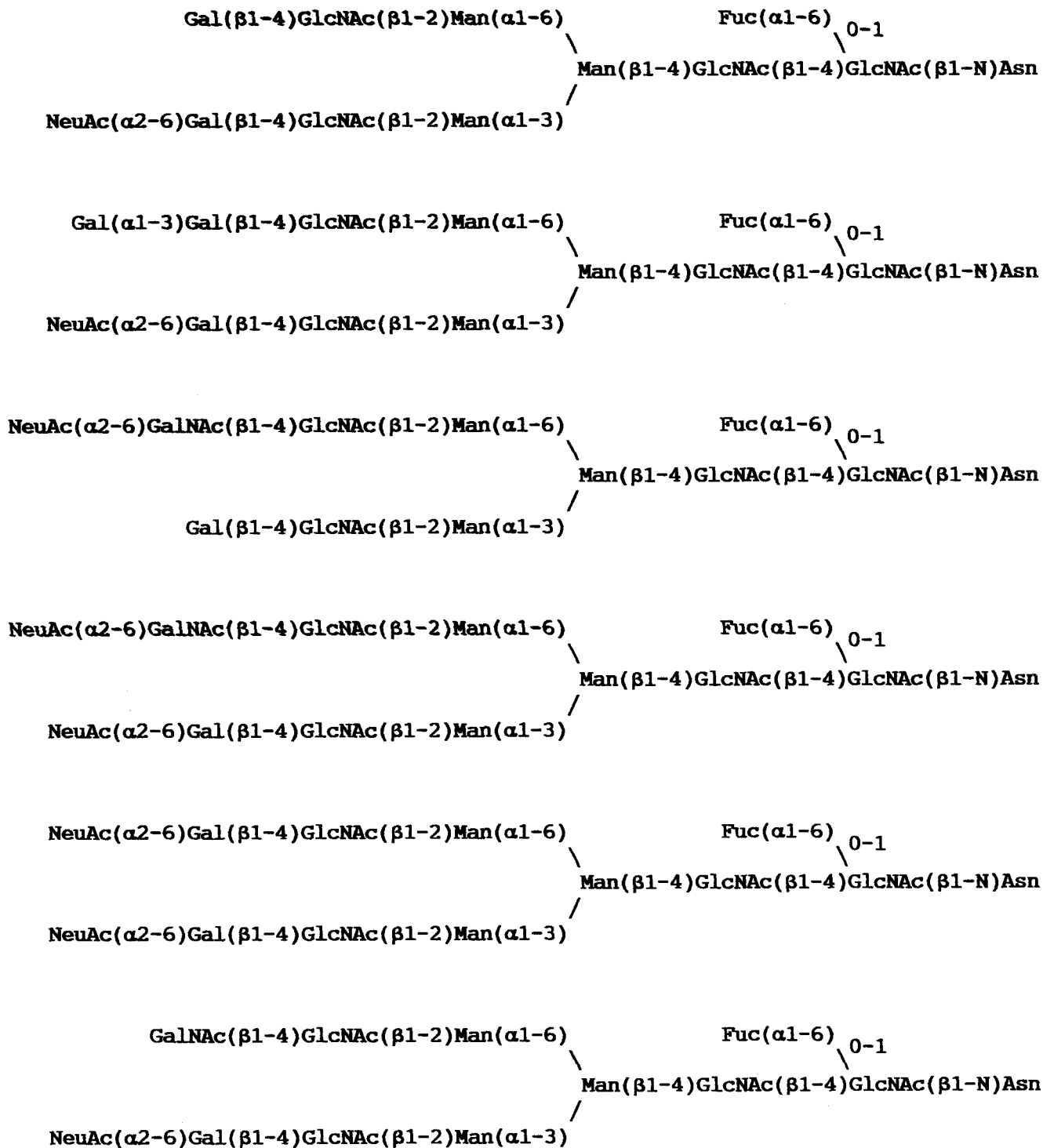


Fig. 4 : Structure des glycanes de type N-acétyllactosaminique isolés de la lactotransferrine de Vache. (SPIK *et al.*, 1985 ; SPIK *et al.*, 1988).

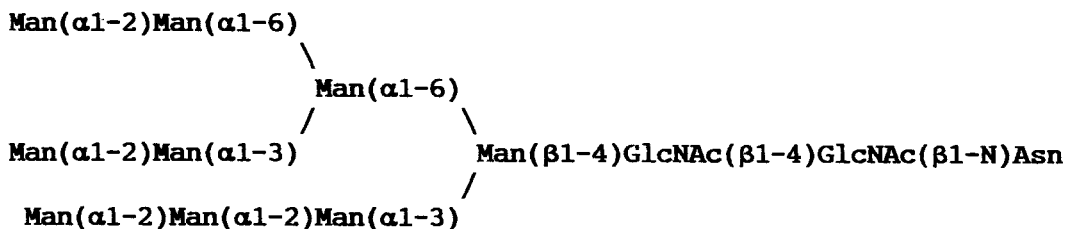
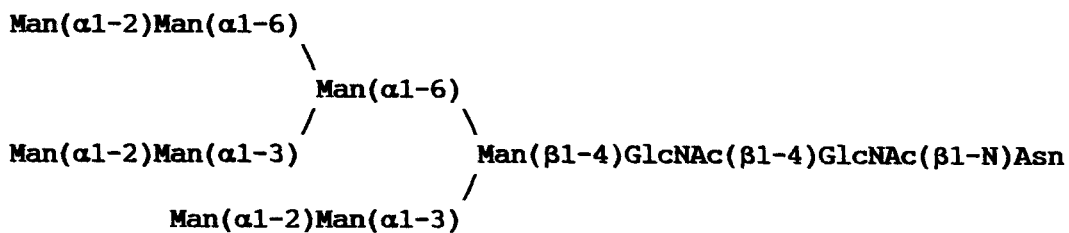
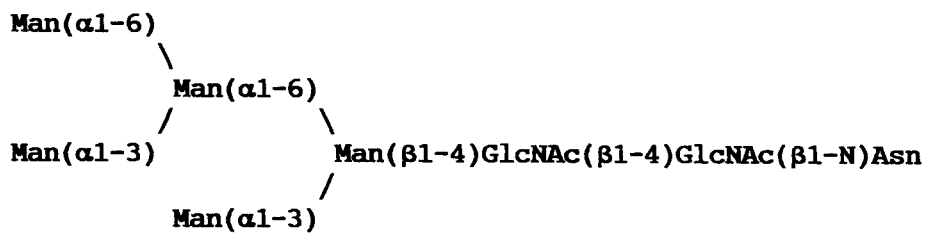
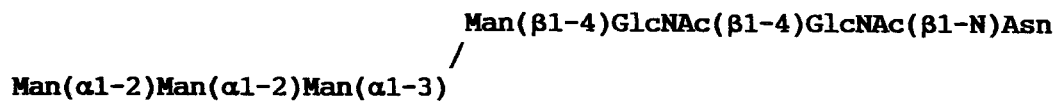


Fig. 5 : Structure des glycanes de type oligomannosidique de la lactotransferrine de Vache.  
(D'après VAN HALBEEK *et al.*, 1981 et CODDEVILLE, 1986).



A

Glycane I



Asn - Asn - Ser - Arg - Trp

Glycane II



Ileu - Val - Gln - Asn - Gln - Ser - Gly - Val - Thr

B

Glycane I (\*)



Ala ————— Asn - Asn - Ser - Arg - Trp

Glycane II (\*)



Ileu - Val - Gln - Asn - Gln - Ser - Gly - Val - Thr

Fig. 6 : Structure de deux glycopeptides de la lactotransferrine de Vache (A) et position de ces glycopeptides dans la chaîne peptidique de la lactotransferrine de Vache. (D'après CHERON, 1975).

## II. STRUCTURE CONFORMATIONNELLE DES LACTOTRANSFERRINES

### A. Mise en évidence de domaines structuraux

Les hypothèses concernant l'origine commune des transferrines et l'existence d'une du-, tétra- ou hexaplication d'un gène ancestral ont ouvert la voie à toute une série d'études visant à isoler les domaines structuraux des transferrines. En effet, l'existence de plusieurs domaines autorisait la recherche de sites de clivage favorisés au niveau de régions interdomaines moins structurées. Concernant les lactotransferrines, les principaux résultats ont été obtenus grâce à l'étude de la lactotransferrine humaine. Les premiers travaux sur l'isolement de domaines de la lactotransferrine humaine remontent à 1976 quand LINE *et al.* décrivent la préparation d'un peptide d'une masse moléculaire de 39,5 kDa. Ce fragment a été identifié à la moitié C-terminale de la molécule par BLUARD-DECONINCK *et al.* (1978).

En 1984, LEGRAND *et al.* ont isolé, avec un bon rendement, à partir d'hydrolysats tryptiques de lactotransferrine humaine saturée en fer, deux fragments de 30 kDa et 50 kDa qui ont été identifiés, respectivement, aux fragments N- et C- terminaux de la molécule. Ils portent tous deux un glycanne et conservent la propriété de fixer réversiblement un ion  $Fe^{3+}$ . En soumettant le fragment N-tryptique (30 kDa) à une nouvelle hydrolyse par la trypsine, LEGRAND *et al.* (1984) ont obtenu un glycopeptide de 18,5 kDa qui fixe encore le fer, mais non d'une manière réversible.

Enfin, en 1986, LEGRAND *et al.* ont démontré qu'il était possible de réassocier les deux fragments N- et C- terminaux saturés en fer, en les mélangeant, dans des proportions équimolaires, dans une solution de pH neutre. L'isolement du complexe peut d'ailleurs être obtenu lorsqu'un hydrolysat tryptique de lactotransferrine humaine diferrique est chromato-

graphié en conditions non dissociantes. Ces résultats montrent l'existence d'une forte interaction inter-domaines, non covalente et réversible.

Enfin, BROCK *et al.* (1976) ont montré que l'hydrolyse de la lactotransferrine de Vache par la trypsine génère cinq fragments de masses moléculaires variant de 25 à 52,7 kDa. Cependant, aucun d'entre eux n'a été isolé. BRINES et BROCK (1983) ont suggéré l'existence d'interactions non covalentes entre les domaines, expliquant ainsi la difficulté de l'isolement de ces fragments.

### **B. Données cristallographiques**

Les études cristallographiques des transferrines ont été entreprises par trois groupes : AL HILAL *et al.* (1976), GORINSKY *et al.* (1979) et BAILEY *et al.* (1988) sur la sérotransferrine de Lapin ; ABOLA *et al.* (1979) sur l'ovotransferrine de Poule et BAKER *et al.* (1977), ANDERSON *et al.* (1987) et BAKER *et al.* (1987) sur la lactotransferrine humaine.

Le premier modèle moléculaire d'une transferrine décrit a été celui de la sérotransferrine de Lapin, proposé par GORINSKY *et al.* (1979) et obtenu par diffraction d'un cristal de sérotransferrine de Lapin aux rayons X avec une résolution de 6 Å. Cette étude a montré que la sérotransferrine de Lapin se présentait sous la forme d'un ovoïde de 95x60x50 Å et était constituée de deux lobes occupant des volumes quasi identiques. Chaque lobe, dont les axes forment un angle de 30°, est creusé d'une cavité ouverte sur l'axe de symétrie.

Ce sont cependant les résultats d'ANDERSON *et al.* (1987) et de BAKER *et al.* (1987) sur la lactotransferrine humaine qui ont permis de faire un grand pas dans la connaissance de la structure tridimensionnelle des transferrines. Un schéma réalisé à partir des données recueillies par la diffraction X et représentant le repliement dans l'espace de la chaîne peptidique

de la lactotransferrine humaine a été proposé (Fig. 7, p. 31). Il montre que la lactotransferrine humaine possède une forme bilobée comprenant un lobe N-terminal (résidus 1 à 332) et un lobe C-terminal (résidus 344 à 703) reliés entre eux par une hélice de trois tours (résidus 333 à 343). Chaque lobe porte un site de fixation du fer et la distance entre les deux ions ferriques est de 42 Å. Les conformations de ces deux lobes sont pratiquement identiques. Ces auteurs montrent que chacun d'eux est constitué de deux domaines structuraux comprenant chacun environ 160 résidus d'acides aminés. Le site de fixation du fer est situé à l'interface des deux domaines. Enfin, il est intéressant de noter que le domaine N-II du lobe N-terminal de la lactotransferrine humaine (BAKER *et al.*, 1987) correspond exactement au glycopeptide N-2 (résidus 91 à 257) obtenu par LEGRAND *et al.* (1984) par hydrolyse trypsique ménagée du lobe N-terminal de la lactotransferrine humaine (voir Fig. 8, p. 32).

Par ailleurs, les premiers résultats de diffraction aux rayons X de la lactotransferrine de Vache ont été signalés par NORRIS *et al.* (1986). Cependant, l'absence de données de structure primaire ne leur ont pas permis de proposer un modèle tridimensionnel de la chaîne peptidique.

Enfin, récemment, BAILEY *et al.* (1988) ont obtenu une résolution à 3,3 Å par diffraction aux rayons X de la sérotransferrine de Lapin. Bien que la structure primaire de cette transferrine ne soit pas élucidée entièrement, ces auteurs montrent d'importantes similitudes avec la structure tridimensionnelle de la lactotransferrine humaine (ANDERSON *et al.*, 1987 ; BAKER *et al.*, 1987).

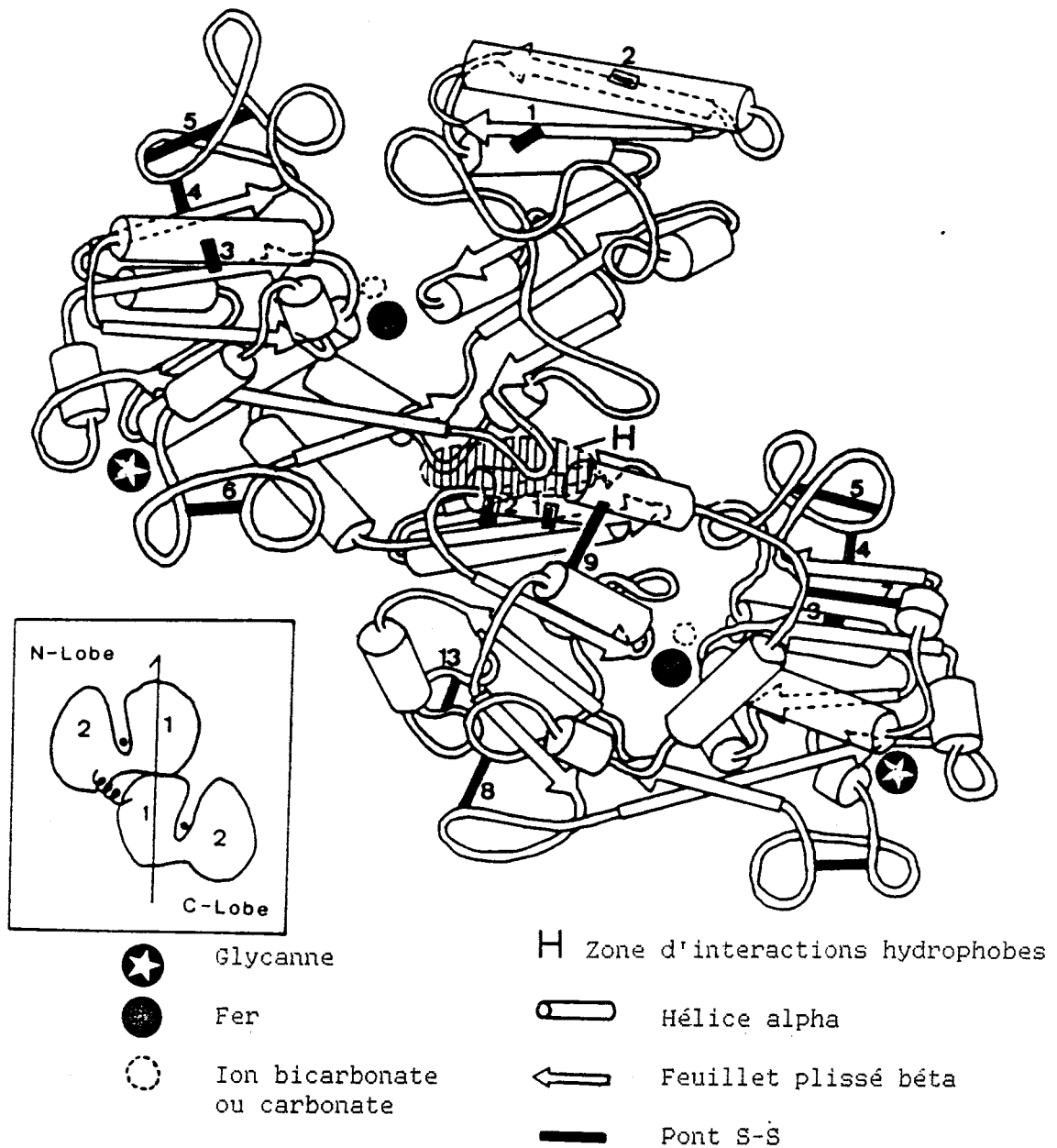


Fig. 7 : Schéma conformationnel de la chaîne peptidique de la lactotransferrine humaine.  
(D'après BAKER *et al.*, 1987).

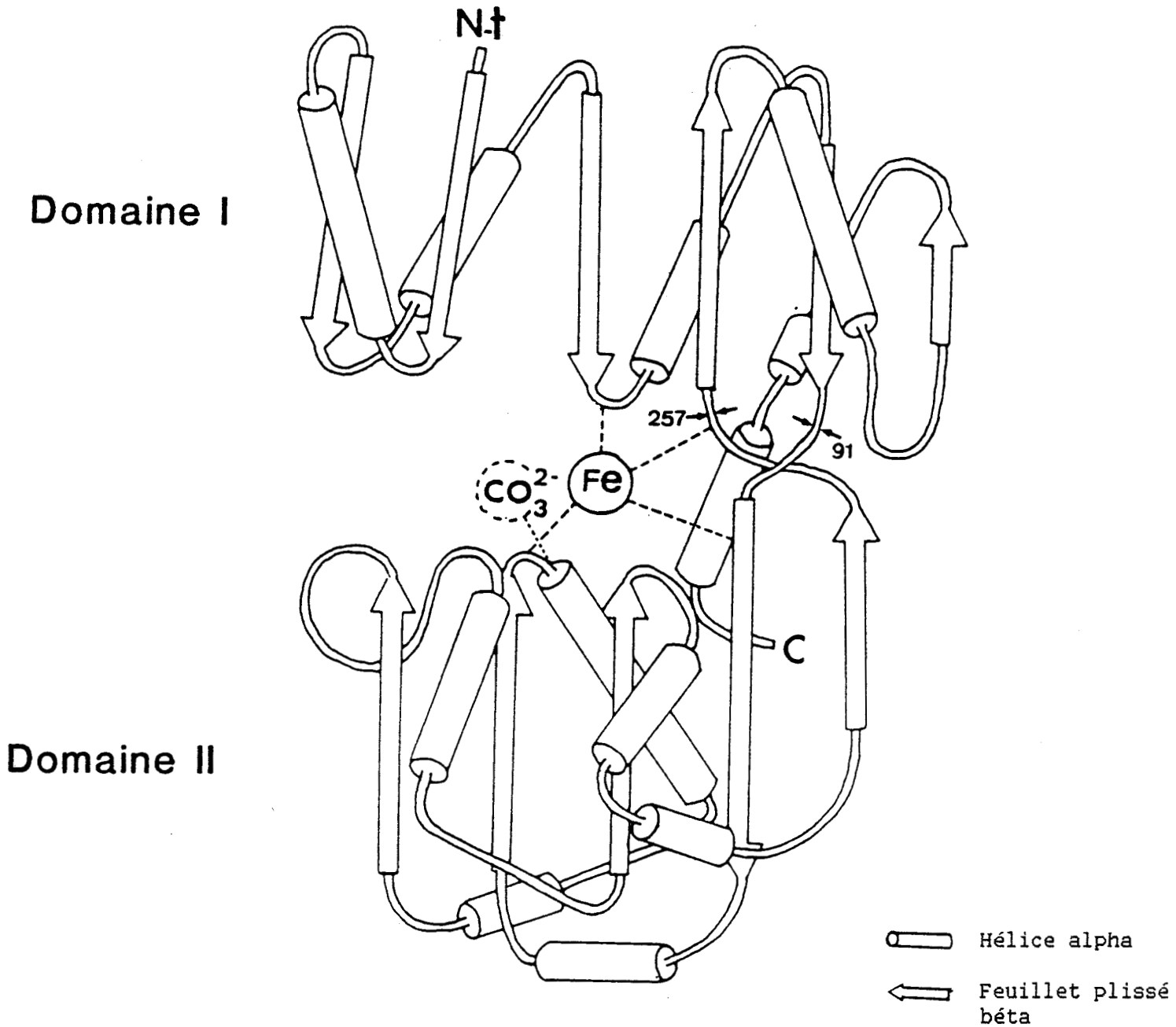


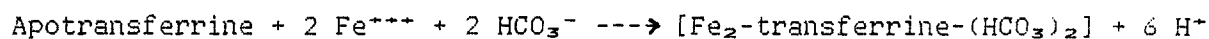
Fig. 8 : Localisation des points de coupure trypsique du lobe N-terminal de la lactotransferrine humaine, conduisant à la libération du glycopeptide N-2. (D'après BAKER *et al.*, 1987).

### III. LES SITES DE FIXATION DU FER

Depuis la découverte des transferrines et de leurs fonctions, de nombreux travaux ont été entrepris afin de préciser la conformation et le mécanisme d'action des sites de fixation du fer et d'identifier les acides aminés impliqués comme ligands du métal. De nombreux modèles ont été proposés à ce jour, assez proches de la réalité il est vrai, mais, une fois encore, ce sont les données de la cristallographie qui ont donné le modèle exact de la configuration du site de fixation du fer des transferrines. Pour plus de détails, nous renvoyons à la revue générale de LEGRAND *et al.* (1988).

#### A. Propriétés générales

Les transferrines fixent réversiblement deux atomes de fer par molécule en développant une coloration rose saumon dont le maximum d'absorption se situe à 465 nm (LAURELL et INGELMAN, 1947). La fixation de chaque ion métallique nécessite celle d'un ion bicarbonate et la libération de trois protons selon l'équation :



Les transferrines fixent préférentiellement le fer mais aussi d'autres cations, divalents ou trivalents. Cependant, c'est le fer sous forme  $\text{Fe}^{3+}$  qui a la plus forte affinité, alors que le  $\text{Fe}^{2+}$  n'est pas fixé. Dans des conditions physiologiques, la constante d'association du complexe  $\text{Fe}_2$ -sérotransferrine est de l'ordre de  $10^{24} \text{ M}^{-1}$  (AISEN et LEIBMAN, 1968). A pH 6,4, la lactotransferrine humaine fixe le fer avec une constante d'association apparente de près de 300 fois plus élevée que celle de la sérotransferrine humaine (AISEN *et al.*, 1971).

## B. La différence entre les deux sites

Plusieurs études réalisées sur les transferrines ont montré que les deux sites de fixation du fer n'étaient pas équivalents vis-à-vis de la protonation. Cette différence de comportement a été étudiée pour la lactotransferrine humaine par MAZURIER *et al.* (1980) qui ont démontré l'existence d'un site "acido-labile", situé dans le lobe N-terminal abandonnant son fer à pH 6, et d'un site "acido-stable", situé dans le lobe C-terminal et qui libère son fer à pH 4.

En 1981, MAZURIER *et al.*, par des expériences de carbéthoxylation, ont mis en évidence des différences d'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. Selon ces auteurs, la différence de stabilité entre les deux sites de fixation de fer serait due à l'existence d'un plus grand nombre de ponts disulfure dans la partie C-terminale de la molécule qui rend ainsi cette région plus compacte.

## C. Le modèle

Dès 1963, WINDLE *et al.* ont proposé un schéma du site de fixation du fer des transferrines sur la base d'analyses par résonance paramagnétique électronique de l'ovotransferrine de Poule et de la sérotransferrine humaine. Dans ce site hypothétique, le fer était hexacoordonné à trois résidus de tyrosine, à deux atomes d'azote et à un ion bicarbonate. Depuis, de nombreuses études chimiques et spectroscopiques ont permis d'affiner ce schéma. Mais, une fois encore, ce sont les résultats de la diffraction X qui ont pu donner la meilleure définition des sites de fixation du fer des transferrines (Fig. 9, p. 35). Ces travaux ont été réalisés par ANDERSON *et*



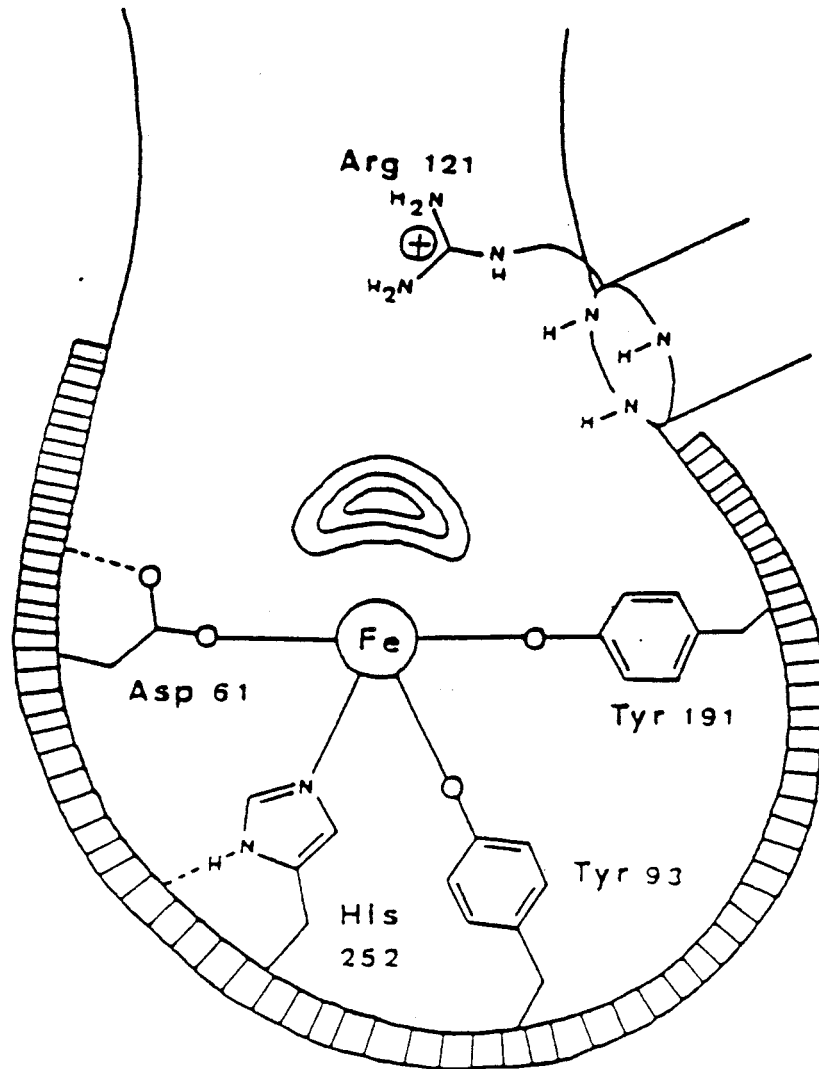


Fig. 9 : Représentation schématique du site de fixation du fer de la lactotransferrine humaine. (D'après BAKER et al., 1987).

*al.* (1987) et BAKER *et al.* (1987) sur la lactotransferrine humaine et par BAILEY *et al.* (1988) sur la sérotransferrine de Lapin.

Selon ces données, les sites de fixation du fer sont identiques dans chacun des lobes et sont situés à l'interface des domaines N-I et N-II, C-I et C-II constituant les deux lobes N- et C- terminaux. Le fer semble enfoui à 10 Å de la surface de la protéine, ce qui expliquerait, selon BAKER *et al.* (1987), la grande stabilité du complexe lactotransferrine-Fe<sup>3+</sup>. Les ligands du fer sont identiques dans les deux sites et sont au nombre de 4. Il s'agit de : Asp-61, Tyr-93, Tyr-191 et His-252 pour le site du lobe N-terminal, et de Asp-407, Tyr-447, Tyr-540 et His-609 pour le site du lobe C-terminal. L'analyse structurale n'a pas été suffisamment résolutive pour identifier avec certitude le dernier ligand du fer. Cependant, une tache peu définie sur la carte des densités électroniques pourrait correspondre à l'ion bicarbonate et/ou à une molécule d'eau. S'il s'agit de l'ion bicarbonate, il serait adjacent au résidu d'arginine 121 ou 477 selon le site, et ce résidu pourrait être impliqué dans la fixation de l'anion bicarbonate.

## **ETUDE STRUCTURALE DES GENES DES TRANSFERRINES**

L'importance du rôle joué par les transferrines dans l'organisme, ainsi que l'hypothèse de l'origine commune et de l'évolution de ces glycoprotéines ont rendu nécessaire l'étude de leurs gènes et de leurs régulations. En effet, le clonage et le séquençage d'un gène sont maintenant le préalable nécessaire à l'analyse fine de la régulation et de l'expression de celui-ci. Concernant les transferrines, cette étude devrait permettre, non seulement de comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation du métabolisme du fer, mais aussi d'apporter les données nécessaires à la confrontation des différentes hypothèses avancées quant à l'évolution des transferrines. Cette approche a été rendue possible ces dernières années grâce à l'utilisation des techniques issues de la génétique moléculaire.

### **I. ETUDE COMPAREE DES ARNm DE DIFFERENTES TRANSFERRINES**

#### **A. Etude de la structure des ARN messagers de transferrines**

La première approche de l'étude des gènes des transferrines a été réalisée par le clonage des ADN complémentaires des ARN messagers des transferrines. Cette étape est, en général, nécessaire à l'étude d'un gène car elle permet, par l'isolement de clones recombinants, de confectionner des sondes spécifiques. Le clonage d'un ADN complémentaire autorise en outre la détermination de la séquence peptidique d'une protéine qui se

trouve, dans bien des cas, facilitée. De plus, il s'agit d'une démarche relativement plus aisée car, en général, la taille du messenger reste assez petite comparée à celle du gène qui, en raison de la présence d'introns, peut atteindre une taille très importante compliquant ainsi la tâche du séquençage.

### 1. Séquence de l'ARN messenger de l'ovotransferrine de Poule

La première détermination de la séquence nucléotidique d'une transferrine a été celle de l'ovotransferrine de Poule, d'abord partiellement (COCHET *et al.*, 1979), puis entièrement (JELTSCH et CHAMBON, 1982). L'ARN messenger de l'ovotransferrine de Poule est constitué de 2.376 nucléotides dont 182 représentent la région 3'-OH non codante et 75 sont non traduits dans la région 5'-P. L'ARNm de l'ovotransferrine code donc pour une préprotéine de 705 acides aminés puisqu'il existe une séquence "leader" de 19 acides aminés. Concernant la séquence codante, elle est en parfait accord avec celle déterminée par les méthodes classiques de séquençage de protéines (WILLIAMS *et al.*, 1982). On peut noter cependant quelques variations pouvant provenir, soit d'un problème inhérent à la technique de séquençage, soit à l'existence de variants génétiques connus pour l'ovotransferrine (OGDEN *et al.*, 1962).

### 2. Séquence de l'ARN messenger de la sérotransferrine humaine

La séquence de l'ARN messenger de la sérotransferrine humaine a été précisée par criblage d'une librairie d'ADNc de foie humain, à l'aide d'une sonde oligonucléotidique synthétique déduite de la séquence peptidique de la sérotransferrine humaine (MAC GILLIVRAY *et al.*, 1983). Cette séquence a été déterminée d'abord partiellement (un kb du côté 3'-OH terminal) par

UZAN *et al.* (1984), puis entièrement par YANG *et al.* (1984). L'ARNm est constitué d'une chaîne de 2.324 bases représentant une courte séquence 5'-P non traduite (30 bases) suivie d'une séquence codant pour 19 résidus d'acides aminés correspondant à un peptide signal, généralement rencontré dans le cas des protéines excrétées. Enfin, elle est terminée par une séquence de 171 nucléotides non-sens, suivie d'une queue polyadénylée.

Le produit de la traduction de cette séquence nucléotidique est en accord avec la séquence décrite par MAC GILLIVRAY *et al.* (1983) à quelques résidus d'acides aminés près. Cette légère divergence peut être imputée à l'existence d'un polymorphisme génétique existant pour la transferrine (WANG *et al.*, 1966) ou aux aléas de l'expérimentation.

### 3. Séquence de l'ARN messager de la mélanotransferrine humaine

La mélanotransferrine humaine (WOODBURY *et al.*, 1980 ; BROWN *et al.*, 1982) découverte récemment, a suscité un grand intérêt au plan structural puisque cette dernière présente une séquence N-terminale fortement homologue à la sérotransferrine humaine et fixe réversiblement le fer (BROWN *et al.*, 1982).

La structure primaire de la mélanotransferrine a été abordée par ROSE *et al.* (1986) par le clonage de son ADN complémentaire. Ces auteurs ont isolé une fraction enrichie en messagers spécifiques en isolant la fraction polysomique d'un extrait cellulaire de mélanome humain par chromatographie d'immuno-affinité. La séquence complète de l'ARN messager de la mélanotransferrine a pu être déterminée grâce au recoupement de plusieurs clones d'ADNc recombinants. Cet ARN messager présente une taille de 4 kb, comprenant deux régions non traduites de 60 et 1667 nucléotides en 5'-P et 3'-OH, respectivement. La partie codante, représentant un cadre de lecture ouvert de 2.224 nucléotides, est caractérisée par une région codant pour un pep-

tide signal de 19 résidus d'acides aminés et d'une partie codant les 25 résidus C-terminaux, de nature hydrophobe, correspondant vraisemblablement à un peptide d'ancrage.

#### 4. Séquence de l'ARN messager de la lactotransferrine de Souris

La séquence de l'ARN messager de la lactotransferrine de Souris a été entreprise par TENG *et al.* (1986) qui ont montré que, lorsque l'on soumettait un utérus de Souris à l'action des oestrogènes, une glycoprotéine majeure d'environ 70 kDa était sécrétée par celui-ci. Ces auteurs ont essayé vainement de la caractériser en comparant sa séquence N-terminale avec les banques de données de séquences de protéines. Ils se sont alors attachés à produire des anticorps contre cette nouvelle glycoprotéine afin d'envisager le clonage de son ADN complémentaire. C'est ainsi qu'en criblant une librairie d'expression en  $\lambda$ gt 11 construite à partir d'ARNm isolés de cellules utérines stimulées par les oestrogènes, que PENTECOST *et al.* (1987) ont isolé un ADNc complet codant pour cette glycoprotéine. La séquence de cette dernière se révéla être, sans ambiguïté, la lactotransferrine de Souris.

Le clone correspondant était constitué de 2.224 pb incluant un cadre de lecture ouvert de 2.000 pb. Bien que la séquence codante soit apparemment complète, ce clone ne renferme pas la totalité du message. Cependant, par des expériences de transfert par capillarité, PENTECOST *et al.* (1987) estiment la taille de cet ARNm à environ 2,6 kb et montrent qu'il est d'une taille supérieure à l'ARNm de la sérotransferrine de Souris.

#### 5. ARN messagers d'autres transferrines séquencés partiellement

D'autres ARN messagers codant pour une transferrine sont en cours

d'étude. C'est le cas du messager de la lactotransferrine humaine, de la sérotransferrine de Rat et de la sérotransferrine de Souris.

a) L'ARN messager de la lactotransferrine humaine

Un ADNc partiel de 1.023 pb a été isolé par l'équipe de RADO *et al.* (1987) d'une librairie d'ADNc, préparée à partir d'ARN messagers isolés de leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles obtenus chez des patients atteints de leucémie granulocytaire chronique. Cet ADNc couvre l'extrémité 3'-OH terminale du messager de la lactotransferrine humaine et correspond à la région codante des 275 acides aminés C-terminaux de la molécule (résidus 428 à 703). La région 3'-OH non traduite représente, quant à elle, 174 nucléotides, hormis la queue poly-A. Cette séquence est, à deux résidus près, conforme à celle publiée en 1984, par METZ-BOUTIGUE *et al.*

b) L'ARN messager de la sérotransferrine de Rat

Un ADNc codant pour la sérotransferrine de Rat a été isolé d'une librairie d'ADNc de foie de Rat (ALDRED *et al.*, 1984 ; HUGGENVICK *et al.*, 1987). Celui-ci, d'une taille de 1.540 pb, correspond à la partie codante du lobe N-terminal et à 50 % du lobe C-terminal de la molécule.

c) L'ARN messager de la sérotransferrine de Souris

Un ADNc de 492 pb a été isolé d'une librairie d'expression construite à partir d'ARNm de foie de Souris par l'équipe qui a cloné l'ADNc de la lactotransferrine de Souris (PENTECOST *et al.*, 1987). Cet ADNc code pour 164 acides aminés s'alignant sur les résidus 263 à 394 de la sérotransferrine humaine (MAC GILLIVRAY *et al.*, 1983).

Récemment, CHEN et BISSELL (1987) ont décrit l'isolement et la caractérisation d'un clone d'ADNc couvrant la quasi totalité du messenger de la sérotransferrine de souris. Ce dernier a été isolé d'une librairie d'ADN complémentaires construite à partir d'ARNm isolés de cellules épithéliales de glande mammaire de Souris en lignée continue. Cet ADNc est homologue à 100 % à la région correspondante du clone de PENTECOST *et al.* (1987), et respectivement, à 83 % et 81 % pour les séquences nucléotidiques et peptidiques de la sérotransferrine humaine (YANG *et al.*, 1984 ; MAC GILLIVRAY *et al.*, 1983).

#### B. Homologies des séquences des ARNm des différentes transferrines

A partir des données actuellement disponibles, nous constatons que la taille des ARN messagers et que le rapport régions non traduites/régions codantes sont très proches, excepté pour la mélanotransferrine humaine. En effet, cette dernière présente une taille d'ARNm presque deux fois supérieure à celle des autres transferrines. Cette différence est due à la présence d'une région 3'-OH non-traduite, exceptionnellement importante (1.667 bases) et correspondant à un exon entier (ROSE *et al.*, 1986). L'étude du gène de cet antigène membranaire de la classe des transferrines apportera certainement des renseignements intéressants sur la particularité de cette "transferrine intégrée" et sur les modalités de son expression.

Quant à l'hypothèse de l'origine commune de ces transferrines, celle-ci est nettement renforcée par la conservation des zones d'homologies déjà décrites au chapitre I (1<sup>ère</sup> partie) et que l'on retrouve au niveau nucléotidique.

Concernant les théories avancées sur l'évolution des transferrines, deux démonstrations ont été apportées.



La première a été proposée par JELTSCH et CHAMBON (1982) à partir de la séquence nucléotidique de l'ARNm de l'ovotransferrine de Poule. Ces auteurs ont montré que l'homologie intéressant les moitiés N- et C-terminales de l'ovotransferrine de Poule se retrouvait au niveau de l'ARN messager puisqu'il était possible de superposer les deux blocs nucléotidiques correspondants (nucléotides 134-934 et 1134-1934). Par ailleurs, les résultats de ces auteurs sont en faveur d'une tétraplication d'un gène ancestral puisqu'ils montrent l'alignement possible de quatre blocs d'acides aminés et de nucléotides correspondants (Voir Fig. 10, p. 44) présentant des homologies. Ces zones d'homologies, incluent les résidus d'histidine et d'arginine impliqués dans les sites de fixation du fer.

La seconde étude a été effectuée par YANG *et al.* (1984) à partir du messenger de la sérotransferrine humaine. Par analyse statistique déterminée par SARGENT *et al.* (1981), YANG *et al.* (1984) ont montré l'existence de trois blocs d'homologies incluant les résidus de tyrosine et d'histidine impliqués dans les sites de fixation du fer (MAC GILLIVRAY *et al.*, 1983). Le taux de divergence des nucléotides constituant les codons de même résidus d'acides aminés, retrouvés dans les moitiés N- et C-terminales, est de 50 %. Ce taux est très élevé si on le compare à celui de 1 % rencontré pour le gène de l'haptoglobine humaine (YANG *et al.*, 1983) qui est également le produit d'une duplication intragénique. Cependant, ce taux de divergence peut s'expliquer par le fait que les transferrines seraient le produit d'une duplication d'un gène ancestral apparu il y a quelques 500 millions d'années chez les Prochordés (WILLIAMS, 1982).

A	I	116	<u>His</u> ThrGlyLeuGly <u>Arg</u> SerAlaGlyTrpAsnIlePro <u>Ile</u> GlyThr <u>Leu</u> Leu	133
	II	250	<u>His</u> AlaValValAla <u>Arg</u> AspAspAsnLysValGluAsp <u>Ile</u> TrpSerPhe <u>Leu</u>	267
	III	455	<u>His</u> ThrAlaValGly <u>Arg</u> ThrAlaGlyTrpValIleProMetGly--- <u>Leu</u> Ile	471
	IV	597	<u>His</u> AlaValValVal <u>Arg</u> ProGluLysAlaAsnLys--- <u>Ile</u> ArgAsp <u>Leu</u> Leu	608
B	I	479	<u>CACACGGGGCUGGGCAGGUCUGCGGGCUGGAACAUCCCAUUGGGACACUCCUC</u>	532
	II	881	<u>CACGCCGUCGUGGCUCGGGAUGACAACAAGGUUGAAGAUUCUGGAGCUUCCUC</u>	934
	III	1496	<u>CACACCGCUGUGGGGAGGACUGCUGGCUGGGUCAUCCCAUGGGC---UUGAUU</u>	1546
	IV	1907	<u>CACGCUGUGGUCGUGCGCCCGGAGAAAGCAAACAAA---AUCGUGAUCUGCUG</u>	1957

C

	COMPARAISON DES QUATRE REGIONS					
	I/II	I/III	I/IV	II/III	II/IV	III/IV
Longueur en nucléotides	54/54	54/51	54/51	54/51	54/51	51/51
Nombre de codons délétés	-/-	-/1	-/1	-/1	-/1	1/1
Nombre de codons homologues	2	6	2	2	2	1
Nombre de nucléotides homologues	24	36	34	24	25	20
Pourcentage d'homologie	44	67	44	44	46	37

Fig. 10 : Comparaison des séquences peptidiques et nucléotidiques suggérant la tétraplication du gène de l'ovotransferrine de Poule. (D'après JELTSCH et CHAMBON, 1982).

- A : Séquences peptidiques correspondant aux résidus 116-133, 250-267, 455-471 et 592-608 de l'ovotransferrine de Poule.  
 B : Séquence des codons correspondants.  
 C : Homologies des séquences nucléotidiques.

Les acides aminés et les nucléotides soulignés sont rencontrés au moins trois fois dans les quatre blocs d'homologie.

## II. ETUDE COMPAREE DE LA STRUCTURE DES GENES DES TRANSFERRINES

### A. Localisation chromosomique

Les études réalisées sur le clonage des transferrines ont permis, par l'isolement d'ADNc spécifiques, d'entreprendre l'étude des gènes et de leur localisation. C'est ainsi que, par des expériences d'hybridation in situ, YANG *et al.* (1984), SELIGMAN *et al.* (1986) et TENG *et al.* (1987) ont localisé respectivement la sérotransferrine, la mélanotransferrine et la lactotransferrine sur le grand bras du chromosome 3 humain. Par ailleurs, TENG *et al.* (1987) ont montré que, chez la Souris, le gène de la lactotransferrine est localisé sur le chromosome 9 qui serait l'équivalent du chromosome 3 humain (NAYLOR *et al.*, 1986).

### B. Structure des gènes de la sérotransferrine humaine et de l'ovotransferrine de Poule

Deux gènes de transferrine ont été séquencés intégralement : il s'agit du gène de la sérotransferrine humaine et de celui de l'ovotransferrine de Poule.

La séquence du gène de l'ovotransferrine de Poule a été déterminée par COCHET *et al.* (1979) et par JELTSCH (1982). Le gène est constitué de 10.567 pb et est organisé en 17 exons séparés par 16 introns. Leurs tailles et leurs positions respectives sont présentées dans la figure 11, p. 46 et dans le tableau III, p. 47.

La structure du gène de la sérotransferrine humaine a été déterminée partiellement par PARK *et al.* (1985) et achevée par SCHAEFFER *et al.* (1987 a). Il correspond à une taille totale de 33.500 pb et est organisé, comme celui de l'ovotransferrine de Poule, en 17 exons séparés par 16

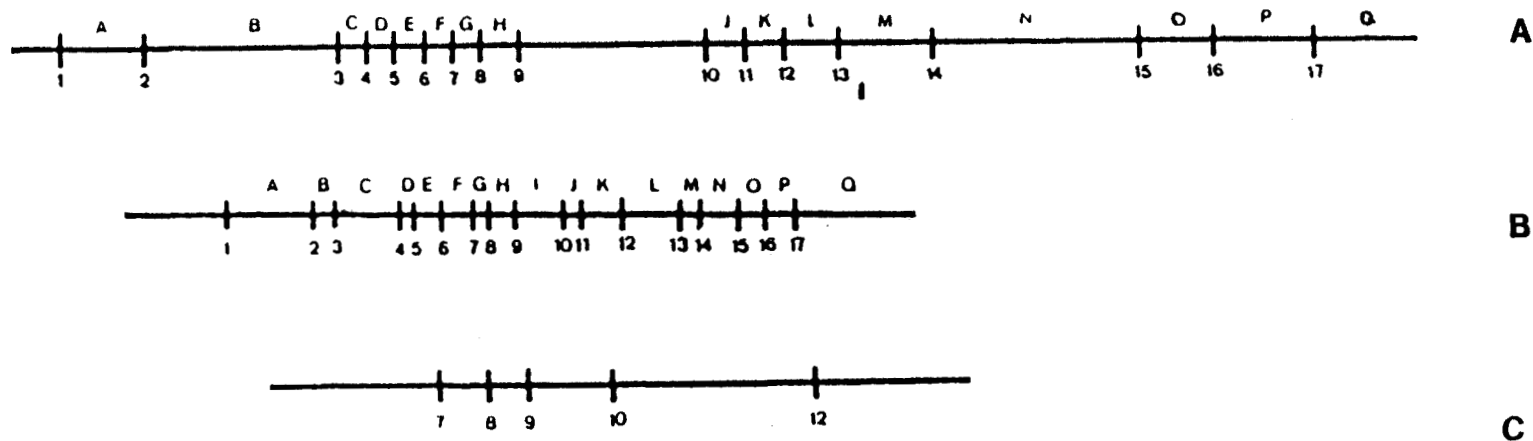


Fig. 11 : Position des exons et des introns dans le gène de la sérotransferrine humaine (A), le gène de l'ovotransferrine de Poule (B) et le segment partiel du pseudogène de la sérotransferrine humaine (C). Les lettres correspondent aux introns et les chiffres et nombres aux exons. (D'après SCHAEFFER *et al.*, 1987).

- TABLEAU III -

REPARTITION DES INTRONS ET DES EXONS DANS LES GENES  
DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE ET DE L'OVOTRANSFERRINE DE POULE  
(D'après SCHAEFFER *et al.*, 1987)

Exon	Taille des exons		Taille des introns		Intron
	pb		pb		
	S	O	S <sup>a</sup>	O <sup>b</sup>	
1	93	119	≈ 1000	1313	A
2	173	164	≈ 1000	317	B
3	106	109	≈ 290	986	C
4	177	192	≈ 685	190	D
5	133	136	≈ 810	396	E
6	56	56	≈ 625	489	F
7	179	170	≈ 765	124	G
8	178	187	≈ 1070	573	H
9	155	155	≈ 1900	757	I
10	94	94	≈ 900	215	J
11	33	36	≈ 1800	633	K
12	156	156	≈ 1400	749	L
13	136	145	≈ 2400	269	M
14	65	65	≈ 5300	448	N
15	185	185	≈ 1600	323	O
16	190	187	≈ 2600	418	P
17	206	221			

S - Gène de la sérotransferrine humaine.

O - Gène de l'ovotransferrine de Poule.

a - Déterminé par cartographie de restriction et par des séquences partielles.

b - déterminés par séquençage (JELTSCH, 1982).

introns. Leurs distributions respectives, comparativement à celles de l'ovotransferrine de Poule, sont rassemblées dans la figure 11, p. 46 et dans le tableau III, p. 47.

Enfin, SCHAEFFER *et al.* (1987 a), au cours de leur étude, ont défini la structure partielle d'un pseudogène apparenté au gène de la sérotransferrine. Ce dernier présente de très fortes homologues de séquence avec les exons 7, 8, 9, 10 et 12 du gène de la sérotransferrine (65 % et 72 % au niveau des séquences peptidique et nucléotidique, respectivement). Par ailleurs, ce pseudogène n'est pas apparenté au gène de la lactotransferrine humaine puisque le taux d'homologie avec la séquence peptidique correspondante n'est que de 35 %. Ce pseudogène, enfin, a été localisé sur le chromosome 3 comme le gène de la sérotransferrine (YANG *et al.*, 1983).

Afin de démontrer l'existence d'une origine commune des transferrines, SCHAEFFER *et al.* (1987 a) ont comparé les structures des deux gènes de l'ovo- et de la sérotransferrine (Voir Tableau IV, p. 49). De toute évidence, ces deux gènes présentent une répartition introns - exons comparable, voire identique. Cependant, la taille des introns est très différente, expliquant ainsi la différence de taille de ces deux gènes (3 fois plus grand pour le gène de la sérotransferrine humaine). Des études en cours sur la détermination de la structure du gène de la sérotransferrine de Rat seraient en faveur d'une répartition similaire (LEVIN *et al.*, résultats non publiés).

Les résultats présentés dans le Tableau IV, p. 49 montrent sans ambiguïté que ces deux gènes ont une origine commune. Ils proviendraient, comme l'ont montré PARK *et al.* (1985), d'un gène ancestral provenant lui-même de la duplication interne d'un gène précurseur. Ces conclusions deviennent à présent évidentes compte tenu de la très forte homologie existant entre les paires d'exons comparés pour chacun des deux gènes. Elles confirment les hypothèses avancées par WILLIAMS *et al.* (1982) sur l'évolution des transfer-

- TABLEAU IV -

COMPARAISON DES EXONS CORRESPONDANT AUX DEUX PARTIES DES GENES  
DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE ET DE L'OVOTRANSFERRINE DE POULE  
(D'après SCHAEFFER *et al.*, 1987)

	Résidus d'acides aminés codés*		taille des exons (pb)		% d'homologie			
					Acides aminés		Nucléotides	
	S	O	S	O	S	O	S	O
2	- 4 --> 53	- 4 --> 50	173	164	38	28	40	49
9	332 --> 382	335 --- 385	155	155				
3	54 --> 90	51 --> 87	106	109	43	48	50	51
10	383 --> 414	386 --> 417	94	94				
4	91 --> 149	88 --> 151	177	192	50	47	56	60
12	426 --> 477	429 --> 481	156	156				
5	150 --> 193	152 --> 196	133	136	41	35	47	46
13	478 --> 522	482 --> 529	136	145				
6	194 --> 212	197 --> 215	56	56	48	61	53	61
14	523 --> 544	530 --> 551	65	65				
7	213 --> 271	216 --> 271	179	170	45	39	50	50
15	565 --> 605	552 --> 612	185	185				
9	272 --> 331	272 --> 334	178	187	36	32	43	41
16	606 --> 669	613 --> 675	190	187				

S = Gène de la sérotransferrine humaine.

O = Gène de l'ovotransferrine de Poule.

\* = Numérotation des séquences peptidiques selon YANG *et al.* (1984) et JELTSCH (1982).

rines.

Enfin, PARK *et al.* (1985) ont proposé un schéma selon lequel aurait pu s'opérer la duplication de l'ancêtre génique des transferrines. Ce gène ancestral aurait contenu 10 exons (l'exon 1 codant pour une séquence signal et l'exon 10 pour la région 3'-OH du gène) (Fig. 12, p. 51). La duplication serait intervenue par un mécanisme de crossing-over entre des séquences présentes au niveau des introns limités par les exons 1-2 et 9-10. Ce nouveau gène de 18 exons aurait évolué en perdant l'exon 4 dans la région 5'-P. Une autre alternative serait la duplication d'un gène ancestral de 9 exons suivi de l'insertion d'un 17<sup>e</sup> exon dans la moitié 3'-OH. Ces deux mécanismes aboutissent à la configuration actuelle de 17 exons, 16 introns connue pour l'ovotransferrine de Poule et la sérotransferrine humaine.

### C. Structure d'un oncogène apparenté au gène des transferrines : le gène Blym 1

Un oncogène décrit en 1983 par GOUBIN *et al.* a été isolé à partir de cellules de lymphomes obtenues par transformation de lymphocytes B par un rétrovirus : le LLV (Lymphoid Leukosis Virus). Ce gène, actif dans les cellules transformées, code pour une séquence de 58 acides aminés dont 20 présentent une position homologue avec des résidus présents dans l'extrémité N-terminale des transferrines. La même zone oncogène a été caractérisée sous forme active dans des lignées cellulaires obtenues chez des malades atteints du lymphome de Burkitt (DIAMOND *et al.*, 1983 ; DIAMOND *et al.*, 1984). Ce gène Blym 1 humain code pour une séquence de 65 résidus d'acides aminés présentant 33 % d'homologie avec le produit du gène Blym 1 aviaire. Les zones d'homologies entre le produit du gène Blym 1 de Poulet et la séquence N-terminale des transferrines sont retrouvées également dans le cas du gène Blym 1 humain. Néanmoins, les séquences nucléotidiques des



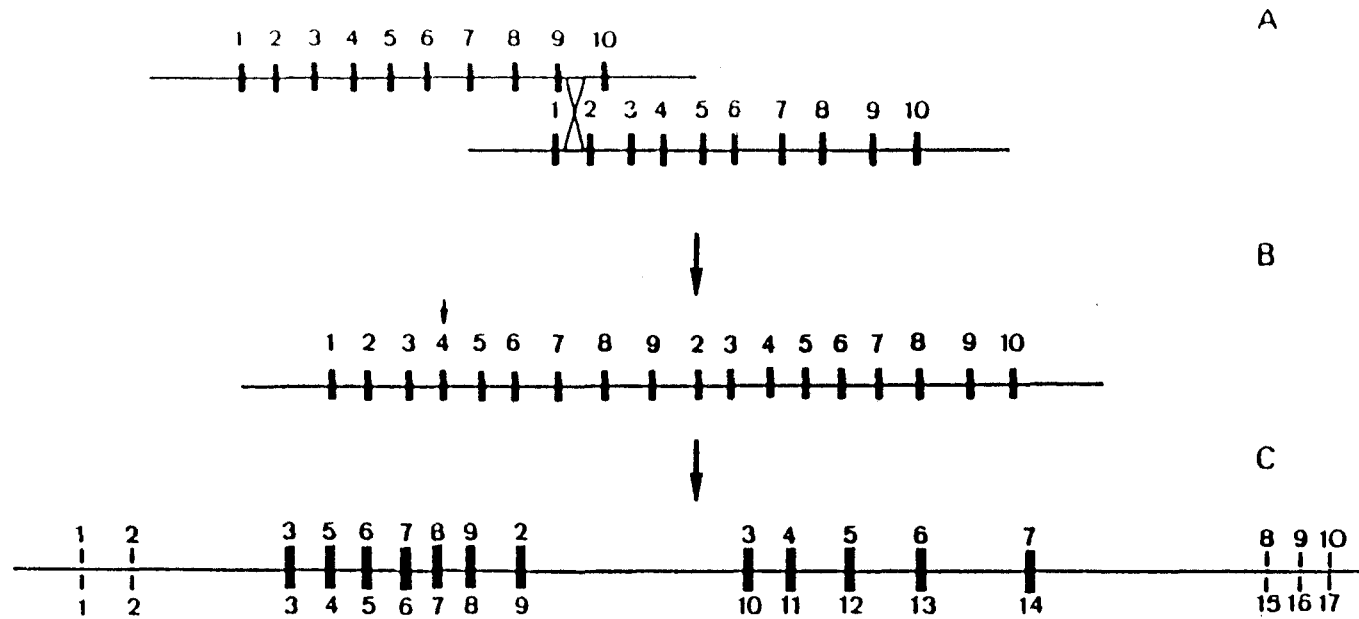


Fig. 12 : Hypothèse de l'origine du gène de la sérotransferrine par duplication d'un gène ancestral précurseur. (D'après PARK *et al.*, 1985).

- A - Duplication du gène ancestral par crossing-over.
- B - Gène précurseur de la sérotransferrine.
- C - Gène de la sérotransferrine actuelle.

Les chiffres et nombres correspondent aux exons.

gènes Blym 1 sont beaucoup trop divergentes de celles des transferrines pour que l'on puisse en déduire une phylogénie commune. Cependant, les zones d'homologie conservées des produits de ces deux gènes avec les transferrines suggèrent que ces protéines pourraient avoir une fonction dont le mécanisme serait apparenté à celui d'une transferrine (DIAMOND *et al.*, 1984).

## REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES DES TRANSFERRINES

L'importance et la diversité des rôles joués par les transferrines ont suscité un très grand intérêt pour l'étude de leurs gènes et de leurs régulations. Grâce au développement récent des techniques du génie génétique, une approche moléculaire de ces régulations a pu être entreprise. Cette approche, à l'heure actuelle, a surtout concerné la sérotransferrine qui reste incontestablement la protéine la plus étudiée du groupe des transferrines. Néanmoins, le clonage récent d'ADNc codant pour les lactotransferrines humaine et murine (RADO *et al.*, 1987 ; PENTECOST *et al.*, 1987) a permis l'étude de leurs gènes et quelques résultats ont déjà été obtenus sur l'expression de ceux-ci.

### I. REGULATION DE L'EXPRESSION DU GENE DE LA SEROTRANSFERRINE ET DE L'OVOTRANSFERRINE

Le taux de synthèse de la sérotransferrine et de l'ovotransferrine en relation avec leur fonction au niveau de différents tissus, a été étudié intensivement [Voir les revues générales de MORGAN (1983) et de BROCK (1985)]. Cependant, "l'approche nucléique" de la régulation de l'expression des gènes de ces deux glycoprotéines n'a été entreprise que vers la fin des années 70. Les premiers résultats remontent à 1980 avec la démonstration de l'existence d'un gène unique codant pour la sérotransferrine et l'ovotransferrine du Poulet (LEE *et al.*, 1980).

Le clonage des ADNc spécifiques des séro- et ovotransferrine de Poulet et la détermination récente des structures complètes des gènes de l'ovotransferrine de Poule et de la sérotransferrine humaine, ont ouvert la voie à l'étude de la régulation de ces gènes. Nous nous proposons, dans ce chapitre, de faire le point sur les nouveaux résultats acquis dans ce domaine grâce aux techniques dérivant du génie génétique.

#### A. Spécificité tissulaire de l'expression du gène des transferrines

Les résultats obtenus sur la régulation de l'expression du gène de la sérotransferrine sous l'influence de divers facteurs laissaient supposer que l'expression de celui-ci était spécifique du tissu. Chez des souris, MAC KNIGHT *et al.* (1983) ont introduit avec succès le gène de l'ovotransferrine de Poule, par micro-injection, dans les noyaux d'ovules fécondés de Souris. Ces ovules ont ensuite été réimplantés chez des souris en état de gestation. 15 à 30 % des souriceaux nouveau-nés avaient, dans leurs chromosomes, des séquences du gène de l'ovotransferrine. Sur 5 des 7 souris transgéniques étudiées, le gène de l'ovotransferrine de Poule était exprimé préférentiellement dans le foie et de l'ovotransferrine était retrouvée dans le sérum des souris. Ces expériences, bien que préliminaires, montrent qu'il existe certainement une région du gène de l'ovotransferrine responsable de la spécificité tissulaire de l'expression de ce gène.

#### B. Régulation de l'expression du gène de la sérotransferrine en fonction du taux de fer

LAURELL (1947) a été le premier à observer que la capacité plasmatique de fixation du fer (ou plutôt la concentration en sérotransferrine) augmentait dans des cas d'anémie ferriprive et décroissait dans des conditions de

surcharge en fer. Depuis, cette observation a été confirmée par de nombreux travaux et il est maintenant admis que le taux de fer disponible régule la synthèse de la sérotransferrine (Voir la revue générale de MORGAN, 1983), ainsi que l'expression du récepteur membranaire de cette dernière (MULLER-EBERHARD *et al.*, 1988).

La première question posée était de savoir si la régulation de l'expression du gène de la sérotransferrine faisait intervenir un mécanisme pré- ou post- transcriptionnel. Un problème identique avait déjà été étudié à propos de la régulation du gène de la ferritine qui est la protéine responsable du stockage du fer dans les cellules. La synthèse de cette dernière, à la différence de la sérotransferrine, est augmentée en présence d'un taux élevé de fer. Un mécanisme de régulation avait été suggéré par ZHRINGER *et al.* (1976) selon lequel un état de surcharge en fer provoquait le départ d'un répresseur présent au niveau du gène de la ferritine, augmentant ainsi l'efficacité de la transcription. Concernant la sérotransferrine, une étude sur l'activité transcriptionnelle a été entreprise par MAC KNIGHT *et al.* (1980 a) chez le Poulet. Ces auteurs ont constaté que, lorsque l'on soumettait des Poulets à une alimentation carencée en fer, le taux de transferrine sérique augmentait ainsi que le taux de synthèse dans le foie. Par des expériences d'hybridation moléculaire avec un ADN complémentaire spécifique, MAC KNIGHT *et al.* (1980 a, 1980 b) ont montré que cette augmentation de la synthèse de sérotransferrine était associée à une augmentation proportionnelle du taux d'ARN messagers codant pour la sérotransferrine. Cette activité transcriptionnelle s'accroît d'environ 2,5 fois après trois semaines d'alimentation sans fer (par rapport à un lot témoin de Poulets nourris normalement). Une analyse de la répartition cellulaire des ARN messagers montrait que plus de 90 % de ceux-ci étaient retrouvés dans la fraction polysomique. Ces données ont conduit ces auteurs à la conclusion que la régulation de l'expression du gène de la sérotransferrine, au niveau du

foie, était fonction du taux d'ARNm et ne dépendait pas d'une stimulation de la traduction de messagers pré-existants dans la cellule.

Par ailleurs, MAC KNIGHT *et al.* (1980 b) ont montré que, comparative-ment, le taux d'ARN messagers codant pour l'albumine était inchangé et qu'aucune modification de l'activité transcriptionnelle du gène de la sérotransferrine n'était observée au niveau d'autres organes, en particulier de l'oviducte (lieu de synthèse de l'ovotransferrine). Il apparaît donc que la chute du taux de fer a un effet direct sur la synthèse hépatique de sérotransferrine (par stimulation de la transcription) et que cet effet est à la fois spécifique du gène de la sérotransferrine et du tissu.

Des études similaires entreprises par TUIL *et al.* (1985) sont en contradiction avec les résultats de MAC KNIGHT *et al.* (1980 a, 1980 b). En effet, après avoir soumis des Rats à une alimentation dépourvue de fer, ces derniers ne constatent pas d'augmentation notable du taux d'ARN messagers spécifiques de la sérotransferrine au niveau du foie.

Enfin, par des recherches assistées par ordinateur, ADRIAN *et al.* (1986) caractérisent 5 séquences consensus de 7 nucléotides (2 dans la région 5'- flanquante et 3 dans le premier intron) identiques à des régions promotrices du gène de la métallothionine (STUART *et al.*, 1985) répondant à une stimulation par le zinc. Dans le cas particulier du gène de la métallothionine, deux MRE (Metallothionein Regulatory Element) au moins sont nécessaires pour stimuler la transcription contrôlée par le zinc (SEARLE *et al.*, 1985) alors que KARIN *et al.* (1984) montrent qu'une seule copie suffit pour obtenir un effet avec le cadmium. Enfin, il faut noter que, dans le cas de la métallothionine, le taux de métal influe positivement sur l'activité transcriptionnelle du gène alors que, dans le cas de la sérotransferrine, le fer aurait un effet inverse. Des études sont actuellement menées par SCHAEFFER *et al.* (1987 b) afin de démontrer l'intervention de ces séquences consensus dans la régulation du gène de la sérotransferrine. Ces auteurs

ont construit une série de vecteurs d'expression contenant différentes portions de la région 5'- promotrice du gène de la sérotransferrine. Ces séquences ont été insérées en amont de la partie codante du gène de la Chloramphenicol Acyl Transferase (CAT). Ces expérimentations ont pour but de déterminer l'action de différents facteurs sur ces régions régulatrices, par visualisation directe de l'effet du produit de traduction du gène de la CAT.

Les recherches qui ont été entreprises sur la régulation du gène de la sérotransferrine en fonction du taux de fer ont, comme nous venons de le décrire, abouti à des résultats contradictoires à propos d'une simple stimulation de l'activité transcriptionnelle. Cependant, l'augmentation du taux de synthèse de sérotransferrine existe bien et les auteurs sont unanimes à ce sujet. Bien qu'aucun mécanisme moléculaire n'ait encore été proposé, la connaissance récente de la séquence totale des gènes de la sérotransferrine humaine et de l'ovotransferrine de Poule devrait permettre d'entreprendre cette étude.

### C. Régulation de l'expression du gène de la sérotransferrine et de l'ovotransferrine par les oestrogènes

La synthèse de la sérotransferrine est, comme dans le cas de nombreuses autres protéines plasmatiques, sous la dépendance des hormones oestrogènes. Cette observation, faite pour la première fois en 1947 par LAURELL, a été confirmée par de nombreuses expériences et, pour plus de détails, nous renvoyons le lecteur à la revue générale de MORGAN (1983).

Le mécanisme moléculaire de l'action des oestrogènes sur la synthèse de sérotransferrine a été activement étudié chez le Poulet où le produit de la traduction du gène de la sérotransferrine donne naissance à la sérotransferrine (dans le foie) et à l'ovotransferrine (dans l'oviducte) (LEE

*et al.*, 1980). L'administration d'oestrogènes à des Poulets entraîne une augmentation du taux de synthèse de l'ovotransferrine et d'autres protéines de l'oeuf au niveau des cellules glandulaires de l'oviducte (PALMITER, 1972). Cette synthèse accrue est due à une stimulation de l'activité transcriptionnelle du gène de la sérotransferrine au niveau de l'oviducte (PALMITER *et al.*, 1976). De même, il a été observé, dans de moindres proportions, une augmentation conjointe du taux d'ARNm de sérotransferrine au niveau du foie (LEE *et al.*, 1978). L'augmentation de l'activité transcriptionnelle du gène de la sérotransferrine dans les deux tissus a été estimée à 1,5 - 2 fois pour le foie et à 6 - 8 fois pour l'oviducte.

En 1975, MORGAN avait suggéré que le gène de la sérotransferrine pouvait être activé indirectement en créant un état de déficience en fer aiguë par fuite de fer au niveau du foie. Bien que la réponse du foie à une stimulation par les oestrogènes entraîne effectivement une chute du taux de fer hépatique (MORGAN, 1975 ; MAC KNIGHT *et al.*, 1980 b), l'augmentation du taux d'ARN messagers codant pour la sérotransferrine n'est pas levée totalement lorsque les Poulets, sous traitement hormonal, sont soumis à une alimentation supplémentée en fer ou à une injection intraveineuse de ferritine. Par ailleurs, MAC KNIGHT *et al.* (1980 b) ont constaté, qu'en fait, la chute du taux de fer et la stimulation par les oestrogènes, avaient un effet synergique sur l'activité transcriptionnelle du gène de la sérotransferrine. Ces observations sont très certainement en faveur de l'existence de deux mécanismes distincts de régulation de l'expression du gène par ces deux facteurs. Un schéma résumant les effets du fer et des oestrogènes sur l'expression du gène de la sérotransferrine a été proposé par MORGAN (1983) (Fig. 13, p. 59).

Enfin, tout comme dans le cas de la régulation de l'expression du gène en fonction du taux de fer, TUIL *et al.* (1985) aboutissent à des résultats contradictoires. Ces auteurs montrent, en effet, qu'aucune stimulation de



FOIE

OVIDUCTE

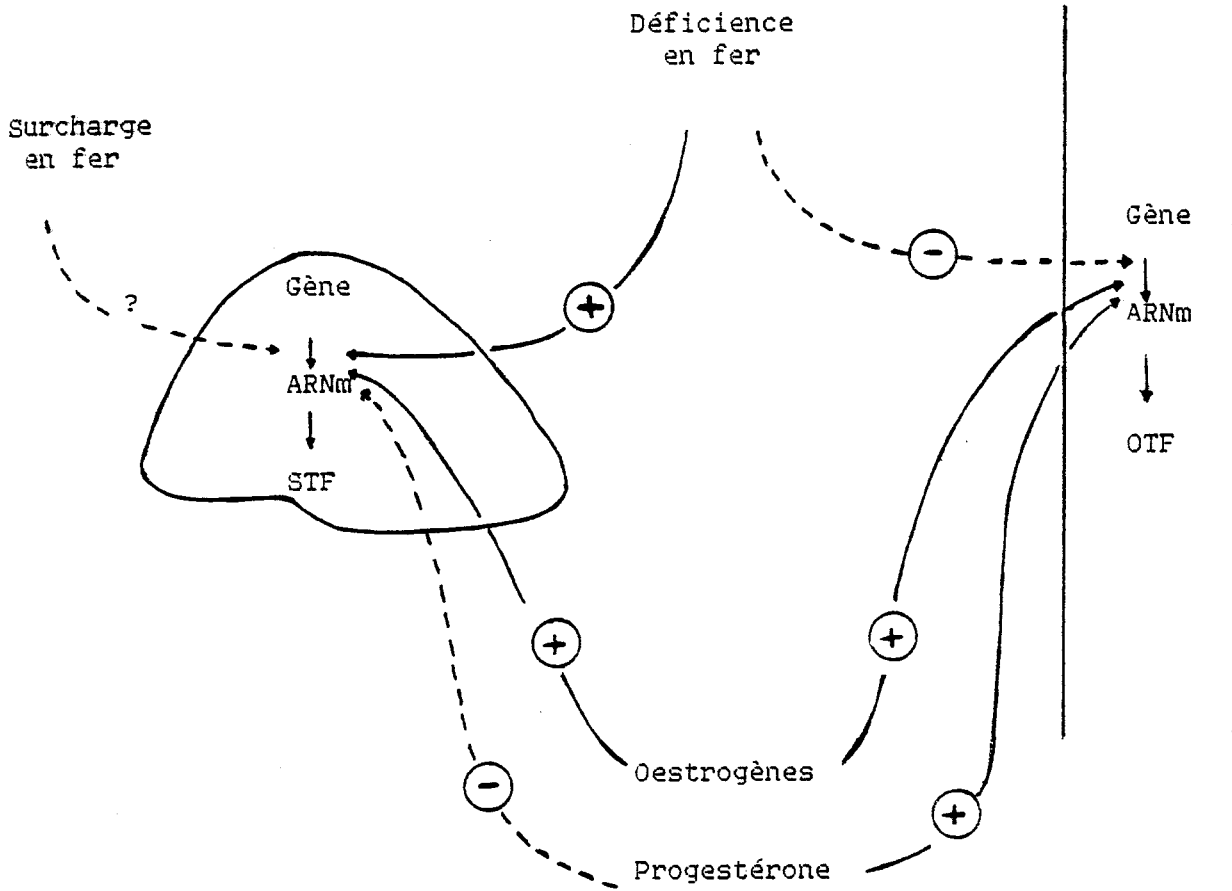


Fig. 13 : Représentation schématique de la régulation de l'expression du gène de la sérotransferrine au niveau du foie et de l'oviducte de Poulet. (D'après MORGAN, 1983).

l'activité transcriptionnelle du gène de la sérotransferrine n'est constatée chez des rats soumis à un traitement par les oestrogènes.

Récemment, par la recherche de séquences consensus dans la région 5'-promotrice du gène de la sérotransferrine humaine, ADRIAN *et al.* (1986) ont caractérisé 3 séquences présentant de très fortes homologues avec un site de fixation pour un récepteur d'hormones glucocorticoides. Ces séquences de 12 pb sont de 75 à 83 % identiques aux 12 des 14 pb du site de fixation du récepteur des glucocorticoides caractérisé au niveau de la région 5'-promotrice du gène de la métallothionine (KARIN *et al.*, 1984). VON DER AHE (1985) a montré que les récepteurs des hormones glucocorticoides, des oestrogènes et de la progestérone pourraient interagir au niveau de mêmes séquences d'ADN.

#### D. Régulation de l'expression du gène de la sérotransferrine par l'AMP cyclique

L'AMP cyclique (AMPC) est connu depuis longtemps comme second messager de nombreuses hormones peptidiques. Son rôle dans la régulation de l'expression du gène de la sérotransferrine a été étudié par TUIL *et al.* (1985). Ces auteurs ont montré que l'injection d'AMP cyclique à des Rats provoquait une inhibition quasi-totale, mais brève, de l'activité transcriptionnelle du gène de la sérotransferrine dans le foie du Rat. Cette inhibition atteint 95 % de la valeur témoin 30 minutes après le traitement. Un effet analogue est obtenu lors de l'injection de glucagon à ces animaux, à la place de l'AMPC (rappelons que le glucagon, comme l'adrénaline, stimule le système adénylcyclasique). D'un point de vue physiologique, une sécrétion normale de glucagon peut être obtenue lorsqu'on soumet des animaux à une alimentation riche en protéines. Dans ce cas, la sécrétion est importante et continue et il s'ensuit un blocage de l'activité transcription-

nelle de certains gènes. Cette action n'est réversible que si la sécrétion du glucagon s'arrête. VAULONT *et al.* (résultats non publiés) ont montré que le taux de transcription du gène de la sérotransferrine n'était pas affecté chez des animaux alimentés par un régime protéique très riche. L'effet du glucagon - et donc de l'AMPc - sur l'activité transcriptionnelle du gène de la sérotransferrine n'est que transitoire et, en conséquence, peu important d'un point de vue physiologique, comparativement à la demi-vie de l'ARNm et plus encore à la sérotransferrine elle-même.

Enfin, au niveau moléculaire, LUCERO *et al.* (1986) ont identifié un site potentiel de régulation du gène de la sérotransferrine humaine par l'AMP cyclique dans la région 5'- promotrice.

## II. REGULATION DE L'EXPRESSION DU GÈNE DE LA LACTOTRANSFERRINE

L'étude de la régulation de l'expression du gène de la lactotransferrine a pu être entreprise grâce au clonage récent de deux ADNc codant pour les lactotransferrines humaine et murine.

L'équipe de RADO *et al.* (1987) qui s'est intéressée au clonage de la lactotransferrine humaine, cherchait à mettre en évidence un marqueur de différenciation de la granulocytopoïèse. La lactotransferrine contenue dans les granules secondaires des leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) (MASSON *et al.*, 1969) est, lors de processus inflammatoires entraînant une hyposidérémie, libérée par dégranulation (VAN SNICK, 1977). En 1984, RADO *et al.* avaient montré que la lactotransferrine était présente dans les granulocytes neutrophiles et était absente au stade blastique ou promyélocytaire. La question que s'était posée cette équipe, était de savoir si le mécanisme impliqué dans la régulation de la synthèse de lactotransferrine était pré- ou post-transcriptionnel. Le clonage d'un ADNc

codant pour la lactotransferrine humaine a permis, par hybridation moléculaire, de relier le taux de synthèse de lactotransferrine au taux d'ARN messager. Pour réaliser cette étude, la difficulté majeure était de pouvoir préparer des fractions d'ARN messagers de ces différents types cellulaires qui existent en "mélange" dans la moelle osseuse. Pour se faire, RADO *et al.* (1987) ont travaillé sur des prélèvements sanguins obtenus chez des malades atteints de leucémie touchant différents stades de différenciation de la lignée granulocytaire (stades myéloblaste, promyélocyte et granulocyte). Par ailleurs, une étude parallèle a été menée sur des cellules en lignées continues (HL-60 et PLB-985) qui sont des lignées présentant la capacité de se différencier, en présence d'inducteurs, respectivement selon la voie granulocytaire ou monocytaire. Les résultats de cette étude ont montré que la présence d'ARN messagers de la lactotransferrine n'était détectable qu'au niveau de stades postérieurs au stade promyélocyte. La présence de lactotransferrine dans ces mêmes cellules indique que le mécanisme régulant la synthèse de lactotransferrine durant la granulocytopoïèse est vraisemblablement d'ordre transcriptionnel. Enfin, ces auteurs n'ont pu caractériser d'ARNm spécifiques après induction par le DMSO ou par l'acide cis-rétinoïque des lignées HL-60 ou PL-985 en culture, bien que d'autres marqueurs de différenciation soient présents. Ces résultats indiquent que l'absence de synthèse de lactotransferrine est vraisemblablement en relation avec l'arrêt de différenciation causé par le processus de transformation maligne.

Les études récentes de PENTECOST *et al.* (1987) ont montré que la lactotransferrine était la protéine majeure produite par les cellules utérines de Souris soumises à un traitement par les oestrogènes. Cette stimulation a un effet direct sur l'activité transcriptionnelle du gène de la lactotransferrine puisque l'ARN messager de la lactotransferrine est représenté majoritairement dans ces cellules. Il s'agit du premier cas décrit de l'expression de la lactotransferrine par des cellules utérines stimulées

par des hormones oestrogènes. En effet, les résultats de LEE *et al.* (1978) et de MAC KNIGHT *et al.* (1980 b) font état d'une stimulation de l'activité transcriptionnelle du gène de la sérotransferrine chez le Poulet par les oestrogènes. Des études immunohistologiques (TOURVILLE *et al.*, 1970 ; MASSON, 1970) avaient déjà mis en évidence la lactotransferrine humaine au niveau des cellules glandulaires de l'endomètre humain, ce qui permet de penser qu'il puisse exister une stimulation de sécrétion de la lactotransferrine humaine sous l'effet des oestrogènes.

### III. CONCLUSION

Les résultats obtenus sur la régulation des gènes des transferrines sont encore, aujourd'hui, trop restreints pour pouvoir proposer un mécanisme. En effet, celui proposé par l'équipe de MAC KNIGHT (1980 b), fondé sur un processus simple de régulation pré-transcriptionnelle du gène de la sérotransferrine par le taux de fer, a été infirmé quelques années plus tard par les résultats de TUIL *et al.* (1985). Cependant, le séquençage récent du gène de la sérotransferrine humaine (PARK *et al.*, 1985; SCHAEFFER *et al.*, 1987 a) et plus particulièrement de la région 5'- promotrice du gène (ADRIAN *et al.*, 1986) a permis une nouvelle étude par la recherche de séquences consensus assistée par ordinateur. C'est ainsi que ADRIAN *et al.* (1986) et LUCERO *et al.* (1986) ont identifié des sites potentiels de régulation par divers facteurs.

Des études sont actuellement en cours par SCHAEFFER *et al.* (1987 b) afin de démontrer l'intervention de ces séquences consensus dans la régulation du gène de la sérotransferrine.

## Travaux Personnels

# DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE PARTIELLE DE LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE PAR L'APPLICATION DE METHODES CHIMIQUES ET ENZYMATIQUES

La détermination de la structure primaire d'une protéine nécessite la préparation de peptides directement séquençables. Toutefois, dans le cas d'une protéine de masse moléculaire aussi importante que la lactotransferrine bovine (environ 80 kDa), il est préférable, dans un premier temps, de chercher à isoler les domaines constituant cette dernière. L'isolement des domaines structuraux de la lactotransferrine bovine, entreprise en 1976 par BROCK *et al.* par hydrolyse trypsique ménagée, a conduit à la mise en évidence de 5 fragments de masse moléculaire comprise entre 25000 et 52700. Aucun de ces fragments n'avait pu cependant être isolé, en raison, vraisemblablement, de l'existence d'interactions non covalentes entre les domaines (BRINES ET BROCK, 1983). Aussi avons-nous débuté notre étude sur la détermination de la structure primaire de la lactotransferrine bovine en appliquant le protocole d'hydrolyse et de dissociation des deux lobes mis au point par LEGRAND *et al.* (1984, 1986) pour la lactotransferrine humaine. Enfin, l'étude particulière des deux lobes N- et C- terminaux de la lactotransferrine bovine a été entreprise en appliquant différentes méthodes d'approche (chimiques et enzymatiques).

Les résultats que nous avons obtenus ont été regroupés dans les paragraphes suivants :

- I. Isolement des fragments N- et C- terminaux de la lactotransferrine bovine et étude de leurs propriétés.

II. Etude du fragment N-terminal - Isolement et étude des propriétés d'un glycopeptide de 20 kDa.

III. Etude du fragment C-terminal.

L'ensemble des données de structure primaire obtenues fera l'objet d'un récapitulatif présenté dans la conclusion.

## I. ISOLEMENT ET ETUDE DES FRAGMENTS N- ET C- TERMINAUX DE LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE

La première étude entreprise sur l'isolement des domaines structuraux de la lactotransferrine bovine a été la recherche, par hydrolyse trypsique ménagée, d'un site de clivage favorisé permettant l'isolement des moitiés N- et C- terminales de la molécule.

### A. Isolement et caractérisation des fragments trypsiniques de la lacto - transferrine bovine

#### 1. Mode opératoire

La lactotransferrine bovine saturée en fer (voir p. A-1) est soumise à une hydrolyse trypsique ménagée dans les conditions définies p. A-3. L'hydrolysate est ensuite chromatographié sur un support de tamisage moléculaire en conditions dissociantes et non dissociantes. Deux supports chromatographiques ont été utilisés :

- une colonne de Sephadex G-75 équilibrée dans une solution de  $\text{NH}_4 \text{HCO}_3$  0,05 M pour la chromatographie non dissociante ;
- une colonne de Bio-Gel P-60 équilibrée dans une solution d'acide acétique à 10 p 100 (v:v) pour la chromatographie réalisée en condi-



tions dissociantes.

Les protocoles expérimentaux sont détaillés dans l'Appendice technique p. A-3. La séquence N-terminale de chaque fragment isolé a été déterminée par dégradation récurrente d'EDMAN. Ces travaux ont été réalisés au Laboratoire de Chimie des Biomolécules de l'Institut Pasteur de Lille (Directeur : Prof. André TARTAR).

## 2. Résultats

### a. Isolement des fragments tryptiques de la lactotransferrine bovine

L'hydrolyse tryptique ménagée de la lactotransferrine bovine, analysée en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et réductrices, révèle la présence de 4 fragments de masses moléculaires estimées à 80, 52, 45 et 30 kDa. Aucune modification dans la masse moléculaire des fragments n'a été constatée en présence ou en l'absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol suggérant ainsi qu'aucun fragment ne dérive d'un polypeptide pluricaténaire (Fig. 14, p. 67).

L'hydrolysate, chromatographié sur colonne de Sephadex G-75 équilibrée dans une solution de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  fournit une fraction majeure (B) et deux fractions mineures (A et C) (Fig. 15, p. 68). L'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide du contenu de ces trois fractions révèle la présence, dans les fractions A et B de 3 fragments de 80, 52, et 30 kDa, et, dans la fraction C, d'un fragment majeur de 45 kDa. La fraction majeure (B) représente près de 80 % de la masse de lactotransferrine de départ hydrolysée.

Le profil chromatographique de l'hydrolysate tryptique de la lactotransferrine diférique bovine sur Bio-Gel P-60 équilibrée dans une solution d'acide acétique à 10 % est présenté dans la Fig. 15, p. 68. Le chromato-

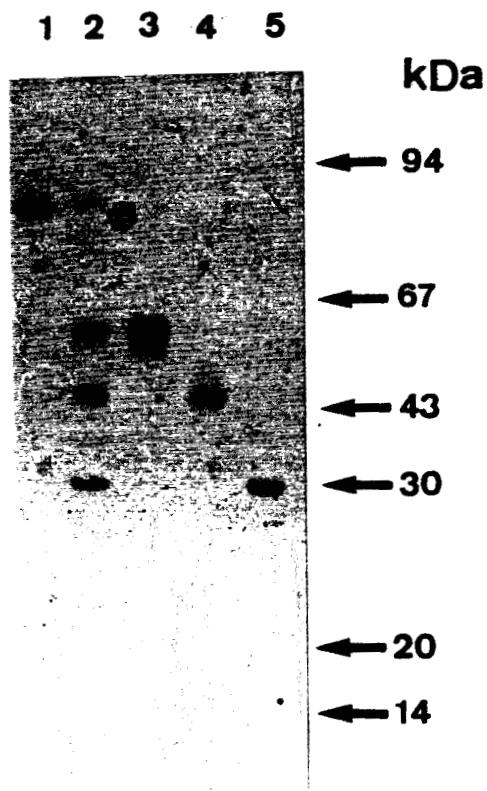
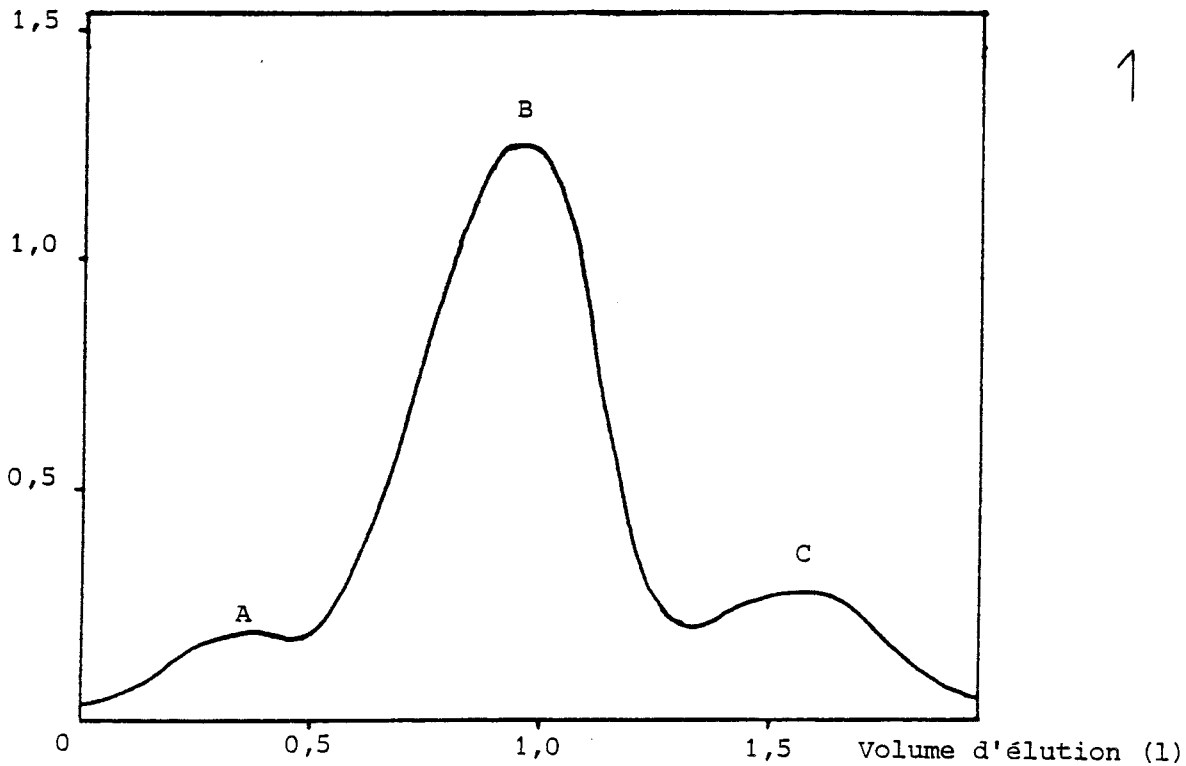


Fig. 14 : Analyse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et réductrices de la lactotransferrine bovine et de ses fragments tryptiques : (1) lactotransferrine intacte ; (2) hydrolysats tryptiques de la lactotransferrine ; (3) Fragment de 52 kDa ; (4) Fragment de 45 kDa ; (5) Fragment de 30 kDa.

Abs<sub>280nm</sub>



Abs<sub>280nm</sub>

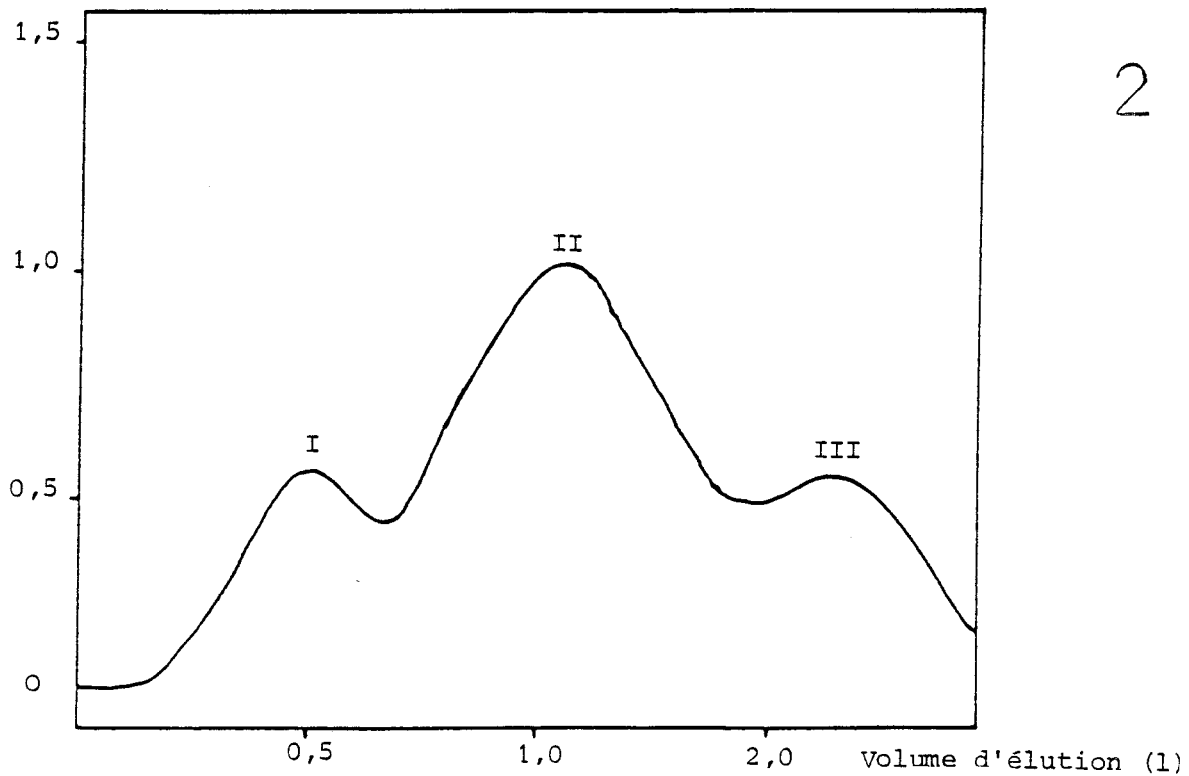


Fig. 15 : Chromatographie de l'hydrolysats trypsique de la lactotransferrine bovine.

(1) : Chromatographie sur colonne de Sephadex G-75 équilibrée dans une solution de  $\text{NH}_4 \text{HCO}_3$  0,05 M.

(2) : Chromatographie sur colonne de Bio-Gel P-60 équilibrée dans une solution d'acide acétique à 10 % (v:v).

gramme montre la présence de 3 fractions majeures notées I, II, III. Ces 3 fractions, analysées sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et réductrices révèlent que la fraction I renferme un fragment de 80 kDa correspondant vraisemblablement à de la lactotransferrine non hydrolysée ; que la fraction II contient, en mélange, 2 fragments de 52 et 45 kDa, et que la fraction III correspond à un fragment unique de masse moléculaire voisine de 30 kDa. Le pourcentage relatif de chacune de ces fractions est d'environ 30, 40 et 20 % - respectivement - de la quantité de lactotransferrine hydrolysée et chromatographiée. Les fractions I et III, rechromatographiées dans les mêmes conditions fournissent des fragments homogènes sur gel de polyacrylamide. Par contre, le recyclage du pic II ne permet pas une séparation efficace des 2 fragments de 52 et 45 kDa (étant données leurs masses moléculaires voisines). L'analyse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et réductrices des différents fragments purifiés est présentée dans la Fig. 14, p 67.

*b. Détermination de la séquence N-terminale des fragments isolés*

Les séquences N-terminales de la lactotransferrine bovine et de ses fragments tryptiques (52, 45 et 30 kDa) sont présentées dans la Fig. 16, p.70.

La lactotransferrine intacte, les fragments I et III isolés sur colonne de Bio-Gel P-60 possèdent une séquence N-terminale identique. Par contre, les séquences N-terminales des fragments de 52 et 45 kDa de la fraction intermédiaire (II) diffèrent entre elles et de celle de la lactotransferrine.

**3. Discussion**

<u>Lactotransferrine</u> <u>intacte et</u> <u>fraction I</u>	<table border="0"> <tr> <td style="text-align: right;">1</td> <td></td> <td style="text-align: right;">5</td> <td></td> <td style="text-align: right;">10</td> <td></td> <td style="text-align: right;">15</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Ala-Pro-Arg-Lys-Asn-Val-Arg-Trp-Cys-Thr-Ile-Ser-Gln-Pro-Glu-</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">16</td> <td></td> <td style="text-align: right;">20</td> <td></td> <td style="text-align: right;">25</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>Trp-Phe-Lys-Cys-Arg-Arg- ? -Gln- ? -Arg-</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	1		5		10		15		Ala-Pro-Arg-Lys-Asn-Val-Arg-Trp-Cys-Thr-Ile-Ser-Gln-Pro-Glu-						16		20		25				Trp-Phe-Lys-Cys-Arg-Arg- ? -Gln- ? -Arg-																			
1		5		10		15																																					
	Ala-Pro-Arg-Lys-Asn-Val-Arg-Trp-Cys-Thr-Ile-Ser-Gln-Pro-Glu-																																										
16		20		25																																							
	Trp-Phe-Lys-Cys-Arg-Arg- ? -Gln- ? -Arg-																																										
 <u>Fragment 30 kDa</u>	<table border="0"> <tr> <td style="text-align: right;">1</td> <td></td> <td style="text-align: right;">5</td> <td></td> <td style="text-align: right;">10</td> <td></td> <td style="text-align: right;">15</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Ala-Pro-Arg-Lys-Asn-Val-Arg-Trp-Cys-Thr-Ile-Ser-Gln-Pro-Glu-</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">16</td> <td></td> <td style="text-align: right;">20</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>Trp-Phe-Lys-Cys-Arg-</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	1		5		10		15		Ala-Pro-Arg-Lys-Asn-Val-Arg-Trp-Cys-Thr-Ile-Ser-Gln-Pro-Glu-						16		20						Trp-Phe-Lys-Cys-Arg-																			
1		5		10		15																																					
	Ala-Pro-Arg-Lys-Asn-Val-Arg-Trp-Cys-Thr-Ile-Ser-Gln-Pro-Glu-																																										
16		20																																									
	Trp-Phe-Lys-Cys-Arg-																																										
 <u>Fragment 52 kDa</u>	<table border="0"> <tr> <td style="text-align: right;">1</td> <td></td> <td style="text-align: right;">5</td> <td></td> <td style="text-align: right;">10</td> <td></td> <td style="text-align: right;">15</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Ser-Phe-Gln-Leu-Phe-Gly-Ser-Pro-Pro-Gly-Gln-Arg-Asp-Leu-Leu-</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">16</td> <td></td> <td style="text-align: right;">20</td> <td></td> <td style="text-align: right;">25</td> <td></td> <td style="text-align: right;">30</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Phe-Lys-Asp-Ser-Ala-Leu-Gly-Phe-Leu-Arg-Ile-Pro-Pro-Lys-Thr-</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">31</td> <td></td> <td style="text-align: right;">35</td> <td></td> <td style="text-align: right;">40</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>Asp- ? -Ile-Leu-Tyr-Leu-Gly-Ser-Thr-? - Ser-Asp-Thr-</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	1		5		10		15		Ser-Phe-Gln-Leu-Phe-Gly-Ser-Pro-Pro-Gly-Gln-Arg-Asp-Leu-Leu-						16		20		25		30		Phe-Lys-Asp-Ser-Ala-Leu-Gly-Phe-Leu-Arg-Ile-Pro-Pro-Lys-Thr-						31		35		40				Asp- ? -Ile-Leu-Tyr-Leu-Gly-Ser-Thr-? - Ser-Asp-Thr-					
1		5		10		15																																					
	Ser-Phe-Gln-Leu-Phe-Gly-Ser-Pro-Pro-Gly-Gln-Arg-Asp-Leu-Leu-																																										
16		20		25		30																																					
	Phe-Lys-Asp-Ser-Ala-Leu-Gly-Phe-Leu-Arg-Ile-Pro-Pro-Lys-Thr-																																										
31		35		40																																							
	Asp- ? -Ile-Leu-Tyr-Leu-Gly-Ser-Thr-? - Ser-Asp-Thr-																																										
 <u>Fragment 45 kDa</u>	<table border="0"> <tr> <td style="text-align: right;">1</td> <td></td> <td style="text-align: right;">5</td> <td></td> <td style="text-align: right;">10</td> <td></td> <td style="text-align: right;">15</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Tyr-Thr-Arg-Val-Val-Trp-Cys-Ala-Val-Gly-Pro-Glu-Glu-Gln-</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">16</td> <td></td> <td style="text-align: right;">20</td> <td></td> <td style="text-align: right;">25</td> <td></td> <td style="text-align: right;">30</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Lys-Lys-Cys-Gln-Gln-Trp-Ser-Gln-Gln-Ser-Gly-Gln- ? -Val-</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">31</td> <td></td> <td style="text-align: right;">35</td> <td></td> <td style="text-align: right;">40</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>Thr-Cys-Trp-Ser-Ala-Ser-Thr-Thr-Asp-Asp-</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	1		5		10		15		Tyr-Thr-Arg-Val-Val-Trp-Cys-Ala-Val-Gly-Pro-Glu-Glu-Gln-						16		20		25		30		Lys-Lys-Cys-Gln-Gln-Trp-Ser-Gln-Gln-Ser-Gly-Gln- ? -Val-						31		35		40				Thr-Cys-Trp-Ser-Ala-Ser-Thr-Thr-Asp-Asp-					
1		5		10		15																																					
	Tyr-Thr-Arg-Val-Val-Trp-Cys-Ala-Val-Gly-Pro-Glu-Glu-Gln-																																										
16		20		25		30																																					
	Lys-Lys-Cys-Gln-Gln-Trp-Ser-Gln-Gln-Ser-Gly-Gln- ? -Val-																																										
31		35		40																																							
	Thr-Cys-Trp-Ser-Ala-Ser-Thr-Thr-Asp-Asp-																																										

Fig. 16 : Détermination des séquences N-terminales de la lactotransferrine bovine et des fragments tryptiques de 52, 45 et 30 kDa présents dans les fractions II et III isolées par chromatographie de gel filtration sur colonne de Bio-Gel P-60.

Le protocole d'hydrolyse par la trypsine mis au point pour la lactotransferrine humaine (LEGRAND *et al.*, 1984) a été appliqué à la lactotransferrine bovine et a permis d'isoler 3 fragments de 52, 45 et 30 kDa. Ces fragments ont été caractérisés par leur séquence N-terminale. Quant à la fraction I, elle a été identifiée à de la lactotransferrine non hydrolysée. Nous avons pu constater que, contrairement à la lactotransferrine humaine, la lactotransferrine bovine "trypsinée" n'est pas amputée de ses 3 premiers résidus (bien que l'acide aminé en position 3 soit une arginine).

Le fragment de 30 kDa présente une séquence N-terminale identique à celle de la lactotransferrine intacte. Ce fragment correspond donc à la partie N-terminale de la molécule et est analogue au fragment N-trypsique de la lactotransferrine humaine décrit par LEGRAND *et al.* (1984).

En ce qui concerne les fragments de 52 et 45 kDa, ils pourraient correspondre à deux formes plus ou moins longues du fragment C-terminal. En effet, LEGRAND *et al.* (1987) ont caractérisé 2 sites de clivage favorisés dans la lactotransferrine humaine, l'un obtenu avec la trypsine et l'autre avec la pepsine. On peut donc supposer, dans la mesure où ces fragments diffèrent par leur séquence N-terminale, que, dans le cas de la lactotransferrine bovine, ces deux coupures soient réalisées par la trypsine. Les fragments de 52 et 45 kDa seraient alors équivalents aux fragments C-trypsique et C-pepsique décrits par LEGRAND (1987) pour la lactotransferrine humaine.

Enfin, si l'hydrolysate trypsique est chromatographié dans des conditions non dissociantes, nous obtenons une fraction majeure (B). Cette dernière renferme la lactotransferrine non hydrolysée et les fragments 52 kDa et 30 kDa qui restent associés. Le fragment de 30 kDa étant la partie N-terminale de la molécule, nous avons ici un résultat en faveur de l'identité du fragment 52 kDa à la partie C-terminale de la lactotransferrine bovine. La frac-

tion A correspond, quant à elle, aux fragments polymérisés retrouvés sous forme d'un pic d'exclusion lors de la chromatographie. En ce qui concerne la fraction C, elle contient majoritairement le fragment de 45 kDa. On peut donc supposer que lorsque ce fragment est obtenu, il ne reste pas associé sous forme d'un complexe stable. LEGRAND *et al.* (1986) ont observé le même phénomène à partir de la lactotransferrine humaine. Ils ont, en effet, montré que la zone peptidique responsable des interactions entre les domaines correspondait aux acides aminés 282 à 339 (numérotation des résidus selon METZ-BOUTIGUE *et al.*, 1984). Cette zone correspond à la partie manquante du fragment C-peptique de la lactotransferrine humaine (par rapport au fragment C-trypsique).

## **B. Etude de la fixation du fer par les fragments isolés**

### **1. Méthode**

Un essai de resaturation en fer a été effectué sur chaque fragment isolé, dans les conditions définies p. A-3. La quantité de fer fixé par molécule de fragment est ensuite estimée par dosage par le réactif à la bathophénantroline (Kit Biopack - Fer, Biotrol).

### **2. Résultats et discussion**

Les 3 fragments tryptiques de 52, 45 et 30 kDa isolés de la lactotransferrine bovine se sont tous trois resaturés en fer. La quantité de métal fixé a été estimée, pour chaque fragment, à 1 atome de fer par mole de fragment. Cette resaturation en fer confère aux fragments de 52 et 45 kDa un maximum d'absorbance dans le visible centré sur 450 nm, et, pour le fragment 30 kDa, un maximum d'absorbance centré sur 430 nm.

LEGRAND *et al.* (1984) ont montré que les lobes N- et C- terminaux de la lactotransferrine humaine étaient capables de fixer, réversiblement, un atome de fer. Les fragments obtenus par hydrolyse trypsique ménagée de la lactotransferrine bovine et correspondant aux parties N- et C- terminales de la molécule (voir discussion plus haut) semblent donc avoir le même comportement, vis-à-vis de la saturation en fer, que les lobes N- et C- terminaux isolés de la lactotransferrine humaine.

### C. Etude de la partie glycanique des fragments isolés

#### 1. Mode opératoire

La présence de monosaccharides sur les fragments isolés a été visualisée par le réactif au phénol-sulfurique (DUBOIS *et al.*, 1956). La détermination des compositions centésimale et molaire a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et triméthylsilylation (KAMERLING *et al.*, 1975) (voir Appendice technique, p. A-11).

#### 2. Résultats et discussion

La présence de monosaccharides ayant été révélée sur chaque fragment, nous avons déterminé les compositions centésimale et molaire en monosaccharides de chacun d'entre eux. Les résultats sont rassemblés dans le tableau V, p. 74. Le nombre de glycannes porté par chaque fragment a été estimé sur la base de la détermination de la composition centésimale en monosaccharides - en prenant 80.000 pour la masse moléculaire totale de la lactotransferrine bovine -.



- TABLEAU V -

COMPOSITION CENTESIMALE ET MOLAIRE EN MONOSACCHARIDES DE  
LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE ET DE SES FRAGMENTS TRYPSIQUES

Monosaccharides	Lacto- transferrine bovine		Fragment 52 kDa		Fragment 45 kDa		Fragment 30 kDa	
	%	Mol.*	%	Mol.*	%	Mol.*	%	Mol.*
Gal	0,3	0,5	0,2	0,6	0,3	0,6	-	-
Man	6,5	4	6,4	4,9	7,8	4,4	3,6	7,4
Gal NAc	0,8	0,3	0,5	0,4	0,4	0,3	-	-
Glc NAc	1,4	2	2,4	2	3	2	1,2	2
Neu Ac	0,9	0,2	0,7	0,1	1	0,1	-	-
Fuc	traces	-	traces	-	traces	-	-	-
Oses totaux	9,9	-	10,2	-	12,5	-	4,8	-
Nombre de glycannes	4 ou 5		3 ou 4		3 ou 4		1	

(\*) Composition molaire déterminée sur la base de 2 résidus de N-acétyl-glucosamine.

La présence d'une hétérogénéité glycanique démontrée pour la lactotransferrine bovine (CHERON *et al.*, 1977 ; SPIK *et al.*, 1985 ; CODDEVILLE, 1986 ; et SPIK *et al.*, 1988) n'a pas permis la détermination exacte du nombre de glycanes sur la molécule. En effet, les compositions centésimales variant de 9 à 12 % selon les auteurs ne permettent pas d'avancer un nombre exact de glycanes portés par la molécule. Les résultats que nous avons obtenus sur la détermination de la composition centésimale et molaire de chaque fragment nous permettent d'apporter quelques précisions. Ainsi, le pourcentage de 6 % obtenu pour le fragment N-terminal (30 kDa) permet d'affirmer que ce fragment ne porte qu'un seul glycanne qui, en raison de sa composition molaire en monosaccharides, est de nature oligomannosidique. Quant aux 2 fragments de 52 et 45 kDa, identifiés à la partie C-terminale de la molécule, les résultats obtenus permettent de penser que le fragment de 45 kDa porterait 3 ou 4 glycanes d'une masse moléculaire moyenne de 1400. La même composition étant retrouvée dans le fragment de 52 kDa, il semble donc que ce dernier ne porte pas de glycanne supplémentaire. Quant à la nature de ces glycanes, les compositions molaires montrent l'existence d'une importante hétérogénéité liée à la présence de glycanes de types oligomannosidique et N-acétyllactosaminique.

#### **D. Conclusion**

L'hydrolyse trypsique ménagée de la lactotransferrine a conduit à l'isolement de 3 fragments de nature glycopeptidique fixant réversiblement un ion ferrique :

- Un fragment de 30 kDa, identifié par sa séquence N-terminale à la partie N-terminale de la lactotransferrine. Ce fragment porte un glycanne unique de nature oligomannosidique et est analogue au fragment N-trypsique décrit par LEGRAND *et al.* (1984) pour la lactotrans-

ferrine humaine.

- Un fragment de 52 kDa, s'associant sous forme d'un complexe stable avec le fragment de 30 kDa, identifié à la partie C-terminale de la molécule et analogue au fragment C-trypsique décrit par LEGRAND *et al.* (1984).
- Un fragment de 45 kDa qui serait analogue au fragment C-pepsique de la lactotransferrine humaine (LEGRAND *et al.*, 1984). Ce fragment porterait les 3 ou 4 glycanes présents dans la partie C-terminale de la lactotransferrine.

## II. ETUDE DU FRAGMENT N-TERMINAL DE LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE - ISOLEMENT ET PROPRIETES D'UN GLYCOPEPTIDE DE 20 kDa OBTENU PAR HYDROLYSE TRYPSIQUE MENAGEE

L'hydrolyse trypsique ménagée du fragment N-terminal saturé en fer de la lactotransferrine humaine a conduit à l'obtention d'un glycopeptide (appelé glycopeptide N-2) de 18,5 kDa. Ce fragment correspond à la plus petite partie d'une lactotransferrine capable de fixer, réversiblement, un ion ferrique (LEGRAND *et al.*, 1984 ; LEGRAND, 1987). Le fragment N-terminal de la lactotransferrine bovine venant d'être isolé et caractérisé, il nous a semblé opportun d'entreprendre l'isolement d'un fragment analogue au glycopeptide N-2 isolé de la lactotransferrine humaine.

### A. Isolement et caractérisation d'un glycopeptide de 20 kDa par hydrolyse trypsique ménagée du fragment N-terminal saturé en fer

#### 1. Mode opératoire

Le fragment N-terminal (30 kDa) provenant de l'hydrolyse trypsique ménagée de la lactotransferrine est resaturé en fer dans les conditions définies p. A-3. Il est ensuite soumis à une hydrolyse par la trypsine (voir p. A-4). L'hydrolysate est alors directement chromatographié sur colonne de Bio-Gel P-30 équilibrée dans une solution de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,05 M (voir p. A-4).

## 2. Résultats et discussion

### a. Isolement du glycopeptide de 20 kDa

L'hydrolysate trypsique du fragment N-terminal (30 kDa) de la lactotransferrine bovine, chromatographié sur colonne de Bio Gel P-30, a fourni 8 fractions (Fig. 17, p. 78). La fraction 2 (majeure) renferme un composé de couleur jaune orangée. L'analyse de cette fraction en électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et réductrices a permis de montrer qu'il s'agissait d'un fragment homogène, monocaténaire, de masse moléculaire apparente voisine de 20 kDa (Fig. 18 p. 79). Seule l'étude de ce fragment a été poursuivie. Le rendement de la purification de ce dernier est de l'ordre de 25 % de la masse du fragment N-terminal (30 kDa) soumis à l'hydrolyse.

### b. Détermination de la séquence N-terminale

L'analyse de la séquence N-terminale du fragment de 20 kDa isolé a fourni le résultat suivant :

1	5	10	15
Glu-Ser-Pro-Gln-Thr-His-Tyr-Tyr-Ala-Val-Ala-Val-Val-Lys-Lys-Gly-Gly-Asn			

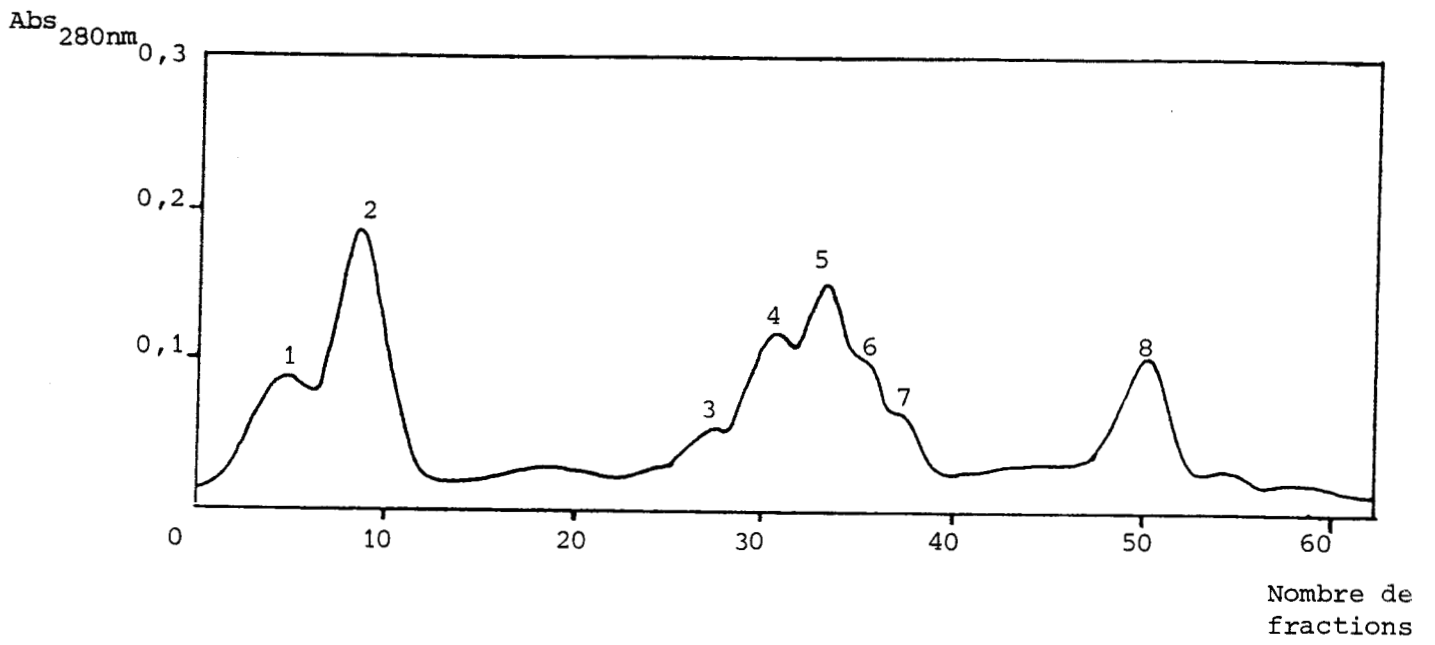


Fig. 17 : Chromatographie sur colonne Bio-Gel P-30 de l'hydrolysat trypsique du fragment N-terminal (30 kDa) saturé en fer de la lactotransferrine bovine.

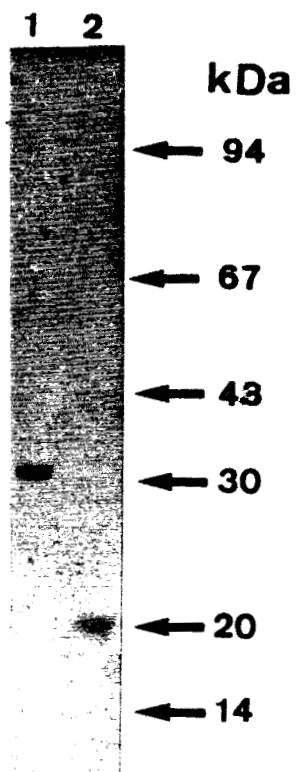


Fig. 18 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et réductrices du fragment N-terminal de 30 kDa (1) et du fragment de 20 kDa (2).

Si nous comparons cette séquence N-terminale avec celle du fragment N-terminal ou de la lactotransferrine intacte, nous constatons que l'hydrolyse trypsique a eu pour effet d'éliminer un fragment au moins dans sa partie N-terminale. Ce résultat est à rapprocher de celui obtenu par LEGRAND et *al.* (1984) sur l'isolement du glycopeptide N-2 par hydrolyse trypsique du fragment N-terminal de la lactotransferrine humaine. En effet, notre fragment de 20 kDa pourrait correspondre à l'analogue du glycopeptide N-2 isolé de la lactotransferrine humaine.

## B. Etude de la partie glycannique

### 1. Matériel et méthodes

La nature glycopeptidique du fragment de 20 kDa a été déterminée par le réactif au phénol-sulfurique (DUBOIS et *al.*, 1956). Les compositions centésimale et molaire en monosaccharides ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et triméthylsilylation (KAMERLING et *al.*, 1975) (voir p. A-11). La déglycosylation du fragment de 20 kDa a été effectuée par l'endo-N-acétylglucosaminidase H isolée de *Streptomyces griseus* selon TARENTINO et MALEY (1974) (voir p. A-7). La séparation des oligosaccharides libérés a été obtenue par chromatographie sur couche mince (PALO et SAVOLEINEN, 1972) (voir p. A-8).

### 2. Résultats et discussion

Les compositions centésimale et molaire en monosaccharides du fragment de 20 kDa sont présentés dans le tableau VI, p. 81 en comparaison de celles obtenues pour le fragment N-terminal de la lactotransferrine bovine (30 kDa). Ces résultats montrent sans ambiguïté que l'unique glycanne, de nature

- TABLEAU VI -

COMPOSITIONS CENTESIMALE ET MOLAIRE DU GLYCOPEPTIDE DE 20 kDa  
ET DU FRAGMENT N-TERMINAL (30 kDa) DE LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE

	Fragment Nt(30kDa)		Fragment 20 kDa	
	%	Mol.*	%	Mol.*
Galactose	-	-	-	-
Mannose	3,6	7,4	5,6	7,6
N-acétylgalactosamine	-	-	-	-
N-acétylglucosamine	1,2	2	1,9	2
Acide N-acétylneuraminique	-	-	-	-
Oses totaux	4,8	-	7,5	-

(\* ) Composition molaire déterminée sur la base de 2 résidus de N-acétylglucosamine.



oligomannosidique, du fragment N-terminal est porté par le glycopeptide de 20 kDa. Si nous rapprochons ce résultat de celui obtenu par LEGRAND *et al.* (1984) sur la nature du glycanne porté par le glycopeptide N-2 de la lactotransferrine humaine, nous constatons une différence importante concernant la partie glycanne de notre fragment de 20 kDa. En effet, ce dernier porte un glycanne de type oligomannosidique alors que celui porté par le glycopeptide N-2 humain est de nature N-acétyllactosaminique.

La déglycosylation de ce glycopeptide, effectuée par l'endo-N-acétylglucosaminidase H, suivie de la séparation des oligosaccharides libérés par chromatographie sur couche mince, révèle la présence d'oligosaccharides dont le nombre de résidus de mannose varie de 5 à 9. Ce résultat indique qu'un glycanne présentant des structures variables peut être fixé sur un seul site de glycosylation. La figure 19, présentée p. 83 montre le résultat d'une déglycosylation effectuée sur des glycopeptides de 20 kDa isolés de lactotransferrines provenant de lait stabilisé et de colostrum. Les oligosaccharides séparés dans les deux cas par chromatographie sur couche mince montrent la même hétérogénéité et une prédominance des structures de 8 à 9 résidus de mannose. Il semble donc que la composition du glycanne porté par le lobe N-terminal de la lactotransferrine bovine ne subisse pas de modification au cours de la lactation.

### C. Etude de la fixation du fer

#### 1. Matériel et méthodes

Le dosage du fer fixé sur le fragment de 20 kDa a été effectué par le réactif à la bathophénantroline en utilisant le kit de dosage Biopack - Fer (Biotrol).

La stabilité du complexe glycopeptide - Fe<sup>3+</sup> vis-à-vis de la protona-

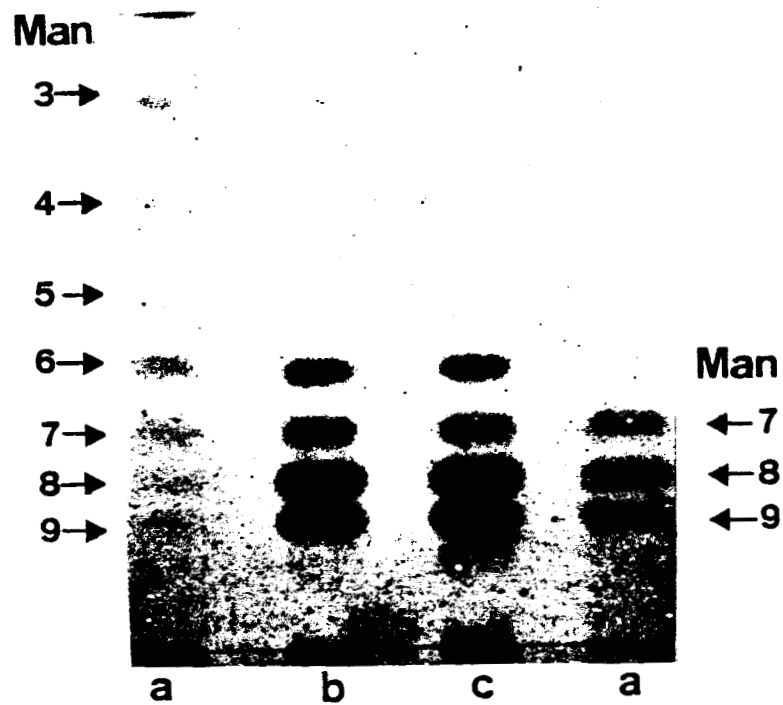


Fig. 19 : Chromatographie sur couche mince des oligosaccharides libérés par déglycosylation du glycopeptide de 20 kDa.  
a - témoin  
b - glycopeptide isolé de la lactotransferrine du lait stabilisé  
c - glycopeptide isolé de la lactotransferrine du colostrum.

tion a été étudiée en incubant le fragment de 20 kDa dans des solutions tampon de pH variant de 5,6 à 7,8 (voir p. A-8).

La réversibilité de la fixation du fer a été caractérisée en effectuant un cycle de désaturation - resaturation dans les conditions décrites p. A-8.

L'influence de la présence du glycanne sur la saturation en fer a été déterminée en dosant le fer fixé au fragment avant et après déglycosylation. Le fragment est d'abord saturé en présence de fer radioactif (p. A-9), déglycosylé (voir p. A-7) puis chromatographié sur colonne Sephadex G-25 (PD-10 de chez Pharmacia) pour éliminer le fer libre. La quantité de fer restant fixée au fragment est déterminée par comptage de la radioactivité sur un compteur LKB (Wallac Compugamma).

## 2. Résultats

### a. Dosage du fer

Le dosage du fer par le réactif à la bathophénantroline révèle que le glycopeptide de 20 kDa renferme une mole de fer par mole de protéine. Cette fixation de fer confère à ce fragment un maximum d'absorbance dans le visible centré sur 415 nm. Le coefficient d'extinction molaire, déterminé par spectrophotométrie sur une solution à 1 p. 100 (p:v) a pour valeur :

$$\epsilon_{415 \text{ nm}} = 1900 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}.$$

### b. Stabilité du complexe glycopeptide - Fe<sup>3+</sup> vis-à-vis de la protonation

La Fig. 20, p. 86, rend compte de la stabilité du complexe glycopep-

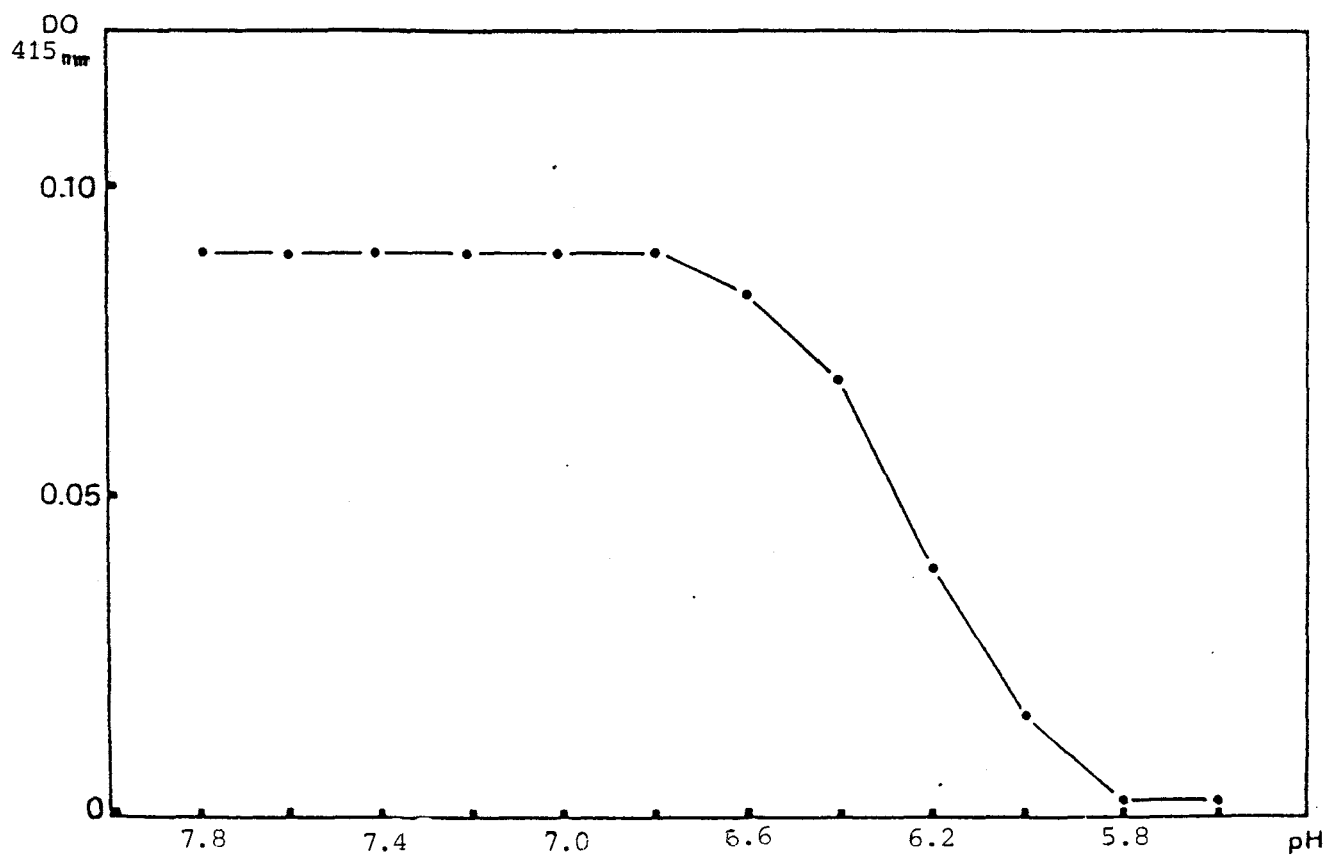


Fig. 20 : Stabilité du complexe glycopeptide 20 kDa-Fe<sup>3+</sup> en fonction du pH.

tide -  $\text{Fe}^{3+}$  en fonction du pH. La courbe traduit la chute de la densité optique à 415 nm intervenant lors de la désaturation en fer. Nous constatons que le complexe métallique reste stable jusque pH 6,8 pour devenir complètement désaturé à pH 6.

*c. Réversibilité de la fixation du fer par le glycopeptide de 20 kDa*

Le dosage du fer sur le fragment de 20 kDa resaturé en fer après désaturation a permis de montrer que ce fragment était capable de se resaturer en fer à 90 %. Cette resaturation se traduit par la restitution du maximum d'absorbance dans le visible à 415 nm. La fixation du fer par le glycopeptide de 20 kDa est donc réversible.

*d. Influence de la présence du glycanne sur la saturation en fer*

Lorsque le fragment de 20 kDa saturé en fer est soumis à une déglycosylation par l'endo-N-acétylglucosaminidase H, la perte du glycanne s'accompagne d'une chute simultanée du fer fixé à la molécule. En effet, après chromatographie sur colonne de Sephadex G-25, nous n'avons retrouvé aucune partie du fer radioactif dans la fraction exclue et donc, associée au glycopeptide. Le glycanne porté par ce fragment de 20 kDa est donc indispensable à la fixation du métal. Des résultats analogues ont été obtenus en déglycosylant le glycopeptide N-2 de la lactotransferrine humaine (LEGRAND, communication personnelle).

### III. ETUDES REALISEES SUR LE FRAGMENT C-TERMINAL DE LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE

Les études qui ont été entreprises sur le fragment C-terminal de la lactotransferrine bovine visaient à atteindre 2 objectifs :

- Obtenir le maximum de données sur la séquence peptidique. En plus de l'apport de résultats nouveaux, le séquençage du fragment C-terminal est surtout intéressant pour la synthèse de sondes oligonucléotidiques et la vérification des séquences d'ADNc qui seront obtenues lors du clonage de la lactotransferrine bovine.
- Préciser la localisation des glycanes, qui seraient au nombre de trois ou quatre dans le fragment C-terminal, par la recherche des sites de glycosylation.

Afin d'aborder ces deux thèmes, il était nécessaire de préparer de plus petits fragments du fragment C-terminal. Nous avons donc, dans un premier temps, vérifié l'identité des deux fragments de 52 et 45 kDa à la partie C-terminale de la lactotransferrine, et tenté une hydrolyse de ce même fragment C-terminal par le bromure de cyanogène.

Enfin, dans un second temps, nous avons entrepris la recherche des sites de glycosylation en effectuant des hydrolyses totales des différents fragments localisés dans la partie C-terminale de la molécule.

#### A. Hydrolyse trypsique ménagée du fragment C-terminal de la lactotransferrine bovine

Comme nous l'avons dit dans le paragraphe I, l'hydrolyse trypsique ménagée de la lactotransferrine bovine saturée en fer génère 3 fragments dont 2, 52 et 45 kDa, ont été identifiés à la partie C-terminale de la molécule. Ces deux formes du fragment C-terminal résulteraient de l'exis-

tence de deux points de clivage particulièrement sensibles comme l'ont montré LEGRAND *et al.* (1986) pour la lactotransferrine humaine. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons soumis le fragment de 52 kDa resaturé en fer (voir p. A-3) à une nouvelle hydrolyse trypsique dans les conditions décrites p. A-3. Nous avons ainsi pu montrer que cette nouvelle hydrolyse trypsique générait un fragment de taille analogue au fragment C-terminal de 45 kDa. L'identité de ce fragment a été vérifiée par la démonstration de l'existence d'une séquence N-terminale identique.

Par contre, ce fragment C-terminal de 45 kDa est particulièrement insensible à une nouvelle hydrolyse par la trypsine. Nous obtenons le même résultat, que le fragment soit saturé ou non en fer. Par ailleurs, l'analyse en gel de polyacrylamide - en conditions dénaturantes et réductrices - ne révèle qu'une seule bande montrant ainsi qu'il n'y a aucune coupure à l'intérieur du fragment. Cette remarquable insensibilité à l'hydrolyse trypsique est sûrement le résultat de la présence d'un nombre important de ponts disulfures rendant ainsi ce fragment très compact.

Dans la mesure où ce fragment de 45 kDa pouvait être obtenu en grande quantité par une seconde hydrolyse du mélange 52 kDa et 45 kDa resaturé en fer (pic II du chromatogramme présenté à la p. 68), nous avons mené toutes nos études sur le fragment C-terminal en utilisant ce fragment de 45 kDa comme produit de départ. Par ailleurs, pour la recherche des sites de glycosylation, il ne s'avérait pas nécessaire de réaliser cette étude sur le fragment de 52 kDa puisque nous avons montré (voir p. 73) que les 3 ou 4 glycanes présents sur le fragment C-terminal étaient portés par le fragment de 45 kDa.

**B. Hydrolyse du fragment C-terminal de la lactotransferrine bovine par le bromure de cyanogène**

La remarquable insensibilité du fragment C-terminal de la lactotransferrine à une nouvelle hydrolyse trypsique nous a amené à rechercher un autre moyen permettant de couper ce fragment. Nous avons, de ce fait, tenté une hydrolyse chimique du fragment C-terminal de 45 kDa par le bromure de cyanogène.

### 1. Matériel et méthodes

Le fragment C-terminal de 45 kDa a été réduit et alkylé selon le protocole décrit p. A-4 et soumis à une hydrolyse par le bromure de cyanogène (p. A-5). L'hydrolysate est concentré à l'évaporateur rotatif (pour éliminer l'excès de BrCN n'ayant pas réagi) puis chromatographié directement sur une colonne de Bio-Gel P-60 (4x150 cm) équilibrée dans de l'acide acétique à 10 %.

### 2. Résultats

Le profil d'élution de l'hydrolysate BrCN chromatographié sur Bio-Gel P-60 est présenté dans le Fig. 21, p. 90. 5 fractions, notées de I à V, ont été obtenues et analysées en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et réductrices.

- La fraction I contient un fragment d'une masse moléculaire apparente de 45 kDa correspondant au fragment C-terminal n'ayant pas été hydrolysé.
- Les fractions II et III renferment, respectivement, un fragment majoritaire de 30 kDa et 25 kDa (notés B4 et B3).
- Les fractions IV et V contiennent, quant à elles, un fragment pur de 18 kDa (fraction IV) et un fragment pur de 5 kDa (fraction V) notés respectivement B1 et B2.



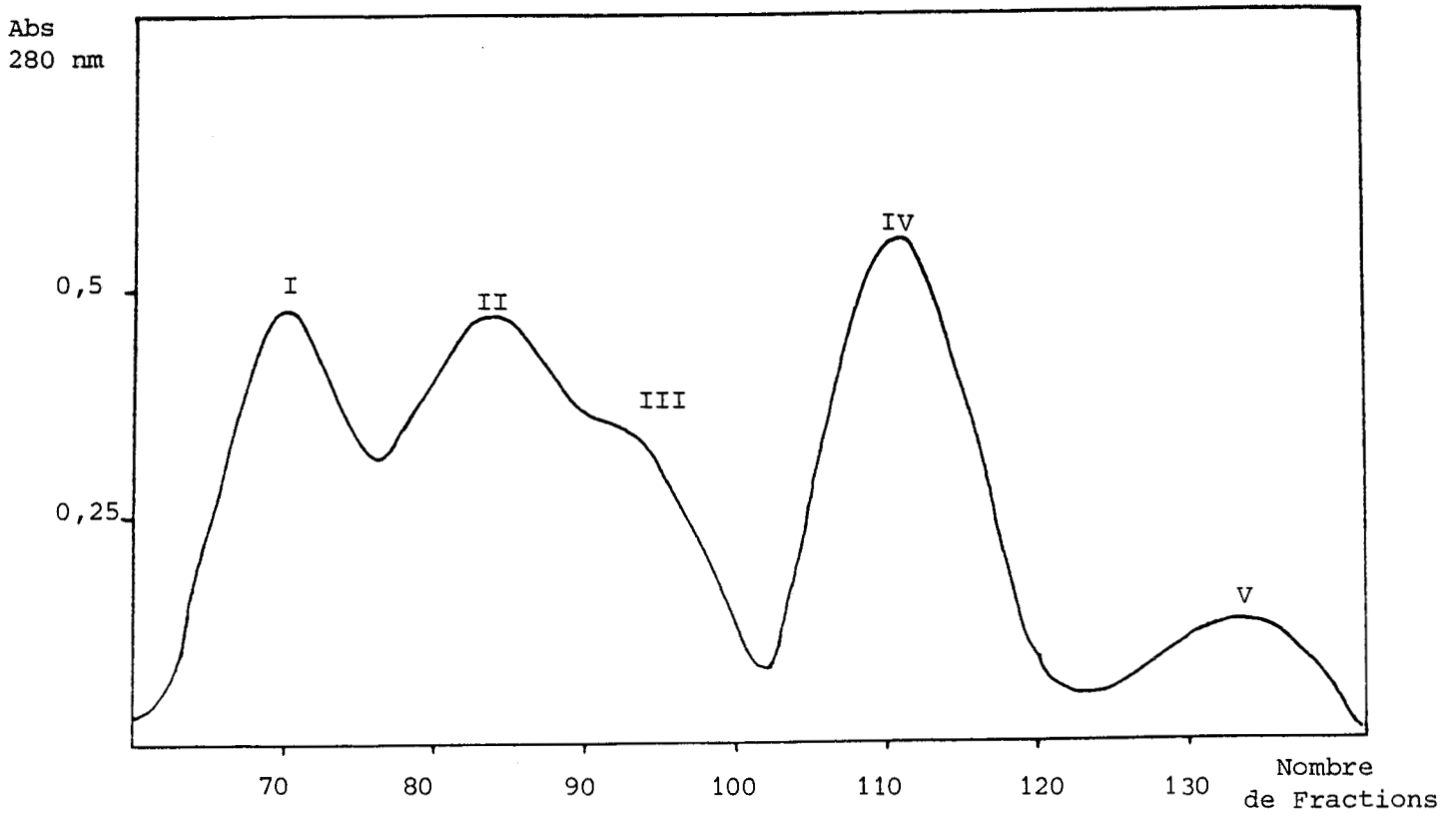


Fig. 21 : Chromatographie sur colonne de Bio-Gel P-60 d'un hydrolysate BrCN du fragment C-terminal de 45 kDa.

Les 4 fragments B1 à B4 ont été purifiés par une nouvelle chromatographie réalisée dans des conditions similaires et les séquences N-terminales de ces fragments ont été déterminées. Les résultats sont présentés dans la Fig. 22, p. 92.

La fraction IV, renfermant le fragment B1, possède une séquence N-terminale identique à celle du fragment C-terminal de 45 kDa intact. Ce fragment correspond donc à la partie N-terminale du fragment C-terminal de 45 kDa.

Les fractions II et III, renfermant respectivement les fragments B4 et B3 présentent des séquences N-terminales différant entre elles et différentes de celle obtenue pour le fragment B1. Cependant, la séquence N-terminale du fragment B3 s'aligne sur la séquence N-terminale du fragment B4, à partir du résidu n°25.

Quant au fragment B2, il est constitué d'une séquence de 25 acides aminés s'alignant sur la séquence N-terminale du fragment B4.

Tous ces fragments ont présenté une réaction positive avec le réactif au phénol sulfurique (DUBOIS *et al.*, 1956) montrant ainsi que tous les fragments obtenus sont de nature glycopeptidique.

### 3. Discussion

La détermination des séquences N-terminales des fragments BrCN a permis de caractériser 2 coupures réalisées par le bromure de cyanogène à l'intérieur du fragment C-terminal (45 kDa) de la lactotransferrine bovine.

Une coupure semble avoir été obtenue de façon spécifique (après un résidu de méthionine), sans toutefois que cela soit vérifiable. Cette coupure libèrerait, en aval du résidu de méthionine, un fragment d'une masse moléculaire apparente de 30 kDa (fragment B4).

Une deuxième coupure a été obtenue, lors de l'hydrolyse, mais n'est

Fragment B1 :           1                           5                           10                           15  
(18 kDa)           Tyr-Thr-Arg-Val-Val-Trp-Cys-Ala-Val-Gly-Pro-Glu-Glu-Gln-Lys-  
                  16                           20                           25                           30  
                  Lys-Cys-Gln-Gln-Trp-Ser-Gln-Gln-Ser-Gly-Gln- ? -Val-Thr-Cys-  
                  31                           35  
                  Trp-Ser-Ala-Ser-Thr-Thr-Asp-Asp-

Fragment B2 :           1                           5                           10                           15  
(5 kDa)           Gly-Leu-Ile-Val- ? -Gln-Thr-Gly-Ser-Cys-Ala-Phe-Asp-Glu-Phe-  
                  16                           20                           25  
                  Phe-Ser-Gln-Ser-Cys-Ala-Pro-Gly-Ala-Asp-COOH

Fragment B3 :           1                           5                           10                           15  
(25 kDa)           Pro-Lys-Ser-Val-Leu-Cys-Ala-Leu-Cys-Ala-Gly-Phe-Asp-Gln-Gly-  
                  16                           20                           25                           30  
                  Leu-Asp-Lys-Cys-Val-Pro-Asn-Ser-Lys-Glu-Lys-Tyr-Tyr-Gly-Tyr-  
                  31                           35  
                  Thr-Gly-Ala-Phe-Arg-Cys-Leu-Ala-

Fragment B4 :           1                           5                           10                           15  
(30 kDa)           Gly-Leu-Ile-Val- ? -Gln-Thr-Gly-Ser-Cys-Ala-Phe-Asp-Glu-Phe-  
                  16                           20                           25                           30  
                  Phe-Ser-Gln-Ser-Cys-Ala-Pro-Gly-Ala-Asp-Pro-Lys-Ser-Val-Leu-  
                  31                           35                           40  
                  Cys-Ala-Leu-Cys-Ala-Gly-Asp-Asp-Gln-Gly-

Fig. 22 : Séquences N-terminales des fragments BrCN isolés par chromatographie sur colonne de Bio-Gel P-60.

pas spécifique du BrCN, puisqu'elle intervient entre un résidu d'aspartique et un résidu de proline. Ce type de coupure est dû aux conditions d'hydrolyse menée dans l'acide formique à 70 %. Cette déduction a été faite grâce à l'alignement de la séquence N-terminale du fragment B3 sur la séquence du fragment B4 (voir ci-dessus).

En ce qui concerne le fragment B1, sa séquence N-terminale s'aligne sur celle du fragment C-terminal intact. Enfin, le fragment B2 correspond à un enchaînement de 25 résidus s'alignant sur la séquence N-terminale du fragment B4. La masse apparente de 5 kDa constatée pour ce fragment est due à la présence d'un glycanne caractérisé par le réactif au phénol sulfurique (DUBOIS *et al.*, 1956).

Ainsi, globalement, l'hydrolyse par le bromure de cyanogène du fragment C-terminal de 45 kDa génèrerait une coupure libérant deux fragments de masses apparentes 18 et 30 kDa. Le fragment de 30 kDa serait recoupé à 25 résidus de l'acide aminé N-terminal au niveau d'une séquence dipeptidique Asp-Pro. Un schéma récapitulant les déductions que nous venons d'exposer est proposé dans la Fig. 23, p. 94.

En ce qui concerne la localisation des glycanes du fragment C-terminal de la lactotransferrine bovine, nous pouvons constater que l'hydrolyse réalisée par le bromure de cyanogène constitue la méthode de choix pour aborder cette étude. En effet, les fragments B1, B2 et B3, constituant le fragment de 45 kDa sont tous trois glycosylés. Dans le chapitre I, nous avons montré que le fragment C-terminal - et plus précisément le fragment de 45 kDa - portait 3 ou 4 glycanes. Les compositions en monosaccharides effectuées sur chaque fragment BrCN ont permis de montrer que chacun d'eux ne portait qu'un seul glycanne. L'hydrolyse par le bromure de cyanogène permet donc de couper le fragment de 45 kDa en 3 glycopeptides porteurs chacun d'un glycanne unique. Enfin, les résidus n°27 du fragment B1 et n°5 du fragment B2 non caractérisés lors du séquençage, pourraient tous deux

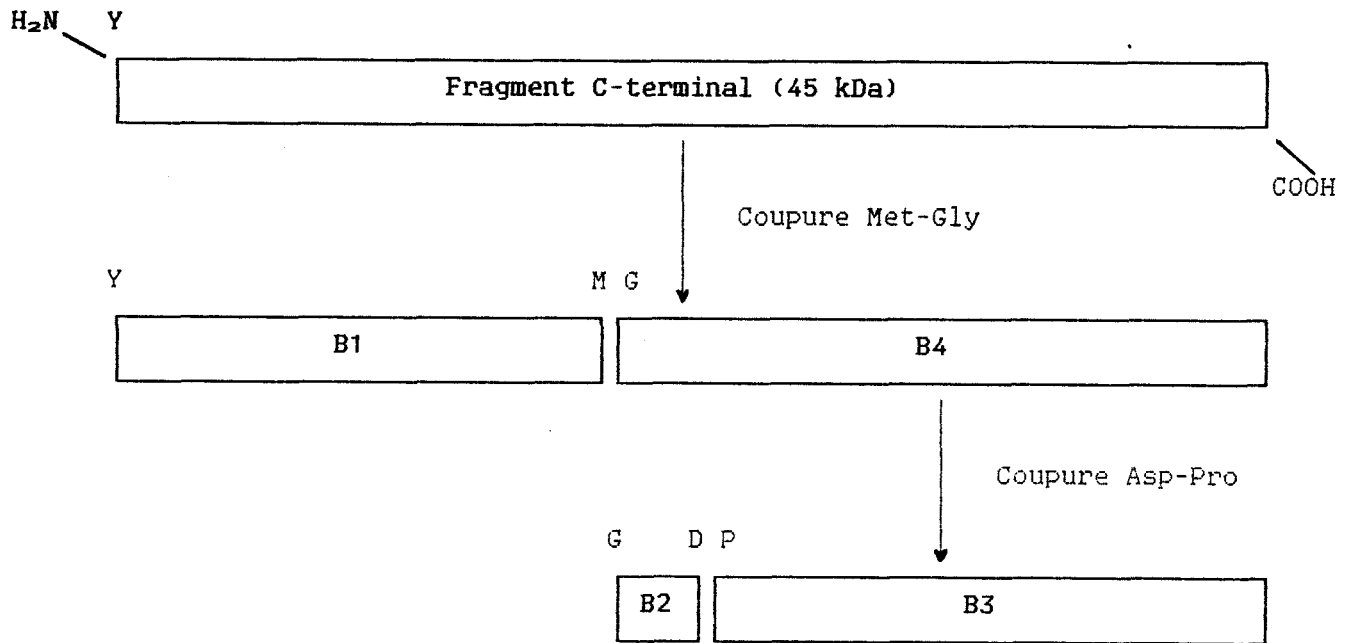


Fig. 23 : Schéma hypothétique du résultat de l'hydrolyse du fragment C-terminal (45 kDa) par le bromure de cyanogène.

correspondre à un résidu d'asparagine et figurer un site de glycosylation. En effet, ces derniers sont situés à deux résidus d'une thréonine (voir Fig. 22, p. 92). Pour le fragment B2 en particulier, il ne peut s'agir que du site de glycosylation puisqu'il n'y a aucune autre séquence code Asn-X-Thr (Ser) dans les 25 résidus d'acides aminés le constituant.

### C. Localisation des glycannes portés par le fragment C-terminal de la lactotransferrine bovine

La localisation des glycannes dans le fragment C-terminal de 45 kDa a été réalisée par l'isolement des glycopeptides et la détermination de la séquence en acides aminés au voisinage du point d'attache du glycanne. Cette étude a été menée sur les 3 fragments BrCN précédemment décrits, porteurs chacun d'un glycanne unique.

#### 1. Matériel et méthodes

Les glycopeptides BrCN B1, B2 et B3 ont été soumis à une hydrolyse par la trypsine dans les conditions définies p. A-6. Les hydrolysats sont d'abord chromatographiés sur une colonne de Bio-Gel P-6 équilibrée en tampon Con-A (voir p. A-6) pour éliminer les peptides de masse moléculaires importantes provenant d'une hydrolyse incomplète. Les fractions incluses sur la colonne de Bio-Gel P-6 sont ensuite chromatographiées sur une colonne de concanavaline-A immobilisée (10 x 1,5 cm) selon la méthode décrite p. A-6. Les glycopeptides fixés sur la colonne sont ensuite récupérés par des concentrations croissantes d' $\alpha$ -D-méthyl-glucoside.

#### 2. Résultats

Trois fractions ont été obtenues après chromatographie sur colonne de concanavaline-A immobilisée :

- Une fraction A non retenue sur la colonne correspondant aux peptides (non glycosylés). L'absence de monosaccharides a été vérifiée par réaction avec le réactif au phénol/sulfurique.
- Une fraction B, retenue sur la colonne et éluée par une solution d' $\alpha$ -D-méthyl-glucoside 0,02 M.
- Une fraction C, retenue sur la colonne et éluée par une solution d' $\alpha$ -D-méthyl-glucoside 0,2 M.

Les pourcentages relatifs des fractions B et C, obtenues après chromatographie sur concanavaline-A immobilisée des 3 hydrolysats des fragment B1, B2 et B3, ont été rassemblés dans le tableau VII, p.97.

La composition molaire en monosaccharides de chaque fraction con-A a été déterminée. Elle est présentée dans le tableau VIII, p. 98.

Enfin, la séquence en acides aminés de ces mêmes fractions glycopeptidiques a été réalisée afin de déterminer le point d'attache du glycanne. Ces séquences sont données dans la Fig. 24, p. 99.

### 3. Discussion

Les résultats que nous avons obtenus sur la localisation des 3 glycanes portés par le fragment C-terminal de la lactotransferrine bovine nous amènent à tirer plusieurs conclusions.

Le premier glycanne du fragment C-terminal est porté par le résidu d'Asn situé à 27 résidus de l'acide aminé N-terminal (Tyr) du fragment C-terminal de 45 kDa. Ce glycanne est de nature variable et contient dans un rapport 3:1 des structures de type oligomannosidique et N-acétyllactosaminique. Les glycanes de type oligomannosidique renferment un nombre moyen de résidus de mannose voisin de 5. Ces glycanes, pouvant être qualifiés de

- TABLEAU VII -

COMPOSITION RELATIVE DES FRACTIONS GLYCOPEPTIDIQUES  
OBTENUES APRES CHROMATOGRAPHIE DES HYDROLYSATS  
DES FRAGMENTS B1, B2 ET B3 SUR CONCANAVALINE-A IMMOBILISEE

	Fragment B1	Fragment B2	Fragment B3
Fraction B (1)	25 %	100 %	-
Fraction C (2)	75 %	-	100 %

- (1) Fraction éluée par l' $\alpha$ -D-méthylglucoside 0,02 M renfermant des glycopeptides de type N-acétyllactosaminique.
- (2) Fraction éluée par l' $\alpha$ -D-méthylglucoside 0,2 M renfermant des glycopeptides de type oligomannosidique.



- TABLEAU VIII -

COMPOSITION MOLAIRE EN MONOSACCHARIDES DES GLYCOPEPTIDES  
OBTENUS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR CONCANAVALINE-A IMMOBILISEE  
DES HYDROLYSATS DES FRAGMENTS B1, B2 ET B3

	Fragment B1		Fragment B2		Fragment B3	
	B(1)	C(2)	B(1)	C(2)	B(1)	C(2)
Fuc	0,4	-	0,2	-	-	-
Gal	1,1	-	1,1	-	-	-
Man	3	5	3	-	-	7,5
GalNAc	0,3	-	0,7	-	-	-
GlcNAc	3,2	2	3,5	-	-	2
NeuAc	-	-	-	-	-	-

(1) Fraction Con A (B) éluée par une solution d' $\alpha$ -D-méthylglucoside 0,02 M. Les rapports molaires ont été déterminés sur la base de 3 résidus de mannose.

(2) Fraction Con A (C) éluée par une solution d' $\alpha$ -D-méthylglucoside 0,2 M. Les rapports molaires ont été déterminés sur la base de 2 résidus de N-acétylglucosamine.

Site de glycosylation : Ser-Gln-Gln-Ser-Gly-Gln-Asn-Val-Thr-Cys-  
du fragment B1 \*  
(n°1)

Site de glycosylation : Ile-Val-Asn-Gln-Thr-Gly-Ser-  
du fragment B2 \*  
(n°2)

Site de glycosylation : Asn-Asp-Thr-Val-Trp-Glu-Asn-  
du fragment B3 \*  
(n°3)

(\*) : Point d'attache du glycanne.

Fig. 24 : Détermination de la séquence en acides aminés au voisinage du point d'attache des glycanes présents sur les 3 sites de glycosylation du lobe C-terminal.

glycannes "oligomannosidiques légers" sont donc en cours de maturation. Concernant les glycannes de type N-acétyllactosaminique, nous pouvons signaler la présence de résidus de N-acétylgalactosamine.

Le second glycanne, caractérisé sur le fragment BrCN B2, est porté par le résidu d'Asn n°5 de ce fragment. La chromatographie sur Con-A n'ayant fourni qu'une seule fraction éluée par de l' $\alpha$ -D-méthyl-gluco-side 0,02 M, nous pouvons conclure que ce site de glycosylation ne porte que des glycannes de type N-acétyllactosaminique. Il est intéressant de noter la valeur non négligeable des résidus de GalNAC. Des structures de type N-acétyllactosaminique contenant de la N-acétylgalactosamine ont été décrites par SPIK *et al.* (1985) et SPIK *et al.* (1988) (voir p. 25).

Enfin, la séquence déterminée au voisinage du troisième glycanne ne permet pas, par ces seules données, de replacer le glycanne au sein du fragment B3. Comme le montrent les résultats du tableau VIII, p. 98, ce troisième site de glycosylation ne porte que des glycannes de type oligomannosidique. Le nombre moyen de résidus de mannose étant de 7-8, nous pouvons donc considérer que les glycannes portés par ce site renferment un pourcentage important de structures en début de maturation (c'est-à-dire avec un nombre élevé de résidus de mannose).

Les résultats que nous avons obtenus sur la détermination des sites de glycosylation et sur la nature des glycannes portés par ces sites, nous permettent de conclure que la microhétérogénéité glycannique de la lactotransferrine bovine n'est pas le résultat d'une distribution identique des différentes structures au niveau de chaque site. En effet, il semble exister une certaine spécificité de structure au niveau de chaque site. Ces structures "plus ou moins" matures sont certainement le résultat d'une accessibilité des différents sites aux enzymes, plus ou moins facilitée par la conformation. Ainsi, le site n°2 renfermant exclusivement des structures de type N-acétyllactosaminique serait le plus accessible aux enzymes et donc, porterait les structures les plus matures de la molécule.

**D. Hydrolyse trypsique totale du fragment C-terminal de 45 kDa**

La détermination de la séquence en acides aminés du lobe C-terminal de la lactotransferrine bovine a également été entreprise par l'isolement et le séquençage de peptides obtenus après hydrolyse totale du fragment par la trypsine. Ces peptides, obtenus par la méthode décrite p. A-6, ont été préparés et séquencés dans le Laboratoire du Pr. TARTAR.

Deux peptides trypsiques ont été isolés par H.P.L.C. et séquencés. La séquence en acides aminés de ces pics, notés A et B, est donnée dans la Fig. 25, p. 102. Nous pouvons remarquer sur le peptide A la présence de 2 acides aminés caractérisés simultanément en positions 7 et 8. Ces résultats sont très certainement en faveur de l'existence de variants génétiques déjà décrits pour certaines transferrines (voir le chapitre "Généralités").

- **CONCLUSION** -

**ALIGNEMENT DES SEQUENCES PEPTIDIQUES DETERMINEES DE LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE AVEC LA SEQUENCE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE**

Le taux d'homologie important existant entre les séquences des différentes transferrines nous a amené à confronter nos séquences peptidiques de la lactotransferrine bovine avec la séquence de la lactotransferrine humaine.

Le résultat de cette confrontation est présenté dans la Fig. 26, p.104. Le taux d'homologie existant entre ces deux lactotransferrines a permis de resituer, sans ambiguïté, les séquences que nous avons déterminées. Nous

Peptide A :           1                  5                  10                  15  
Lys-Pro-Val-Thr-Glu-Ala-Gln-Ser-Cys-His-Leu-Ala-Val-Ala-Pro-  
16                  20  
Asn-His-Ala-Val-Val-Ser-Arg-COOH

Peptide B :           1                  5                  10                  15  
Leu-Gly-Gly-Arg-Pro-Thr-Tyr-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gly-Thr-Glu-Tyr-  
16                  20  
Val-Thr-Ala-Ile-Ala-Asn-Leu-Lys-COOH

Fig. 25 : Séquences peptidiques des peptides tryptiques A et B du lobe C-terminal du 45 kDa isolés par H.P.L.C.



Fig. 26 : Alignement des séquences peptidiques de la lactotransferrine bovine avec la séquence de la lactotransferrine humaine (numérotation des résidus selon METZ-BOUTIGUE *et al*, 1984).

A - Lactotransferrine intacte et fragment N-terminal (30 kDa).  
B - Glycopeptide N-2 (20 kDa).  
C - Fragment C-terminal (52 kDa).  
D - Fragment C-terminal (45 kDa) et fragment BrCN B1.

E - Fragments BrCN B2 et B3.  
F & G - Peptides tryptiques du fragment C-terminal de 45 kDa.

avons ainsi pu montrer que :

- Les fragments de 52 kDa et 45 kDa correspondent à deux formes plus ou moins importantes du fragment C-terminal de la lactotransferrine bovine. Les fragments de 52 kDa et 45 kDa sont analogues, respectivement, aux fragments C-trypsique et C-pepsique décrits par LEGRAND *et al.* (1984, 1987) à partir de la lactotransferrine humaine.
- Le fragment de 20 kDa provenant de l'hydrolyse trypsique du fragment N-terminal (30 kDa) est analogue au glycopeptide N-2 de la lactotransferrine humaine obtenu par LEGRAND *et al.* (1984) dans les mêmes conditions.
- Le schéma proposé pour le remplacement des fragments BrCN dans le fragment C-terminal s'est avéré exact. Ainsi, comme nous l'avons prédit, il existe vraisemblablement un résidu de méthionine avant la glycine N-terminale du fragment B2. Cette méthionine présente dans la lactotransferrine humaine (position 485) l'est également dans la lactotransferrine murine (PENTECOST *et al.*, 1987), dans la sérotransferrine humaine (MAC GILLIVRAY *et al.*, 1983) et l'ovotransferrine de poule (WILLIAM *et al.*, 1982).
- Les trois sites de glycosylation caractérisés dans le lobe C-terminal s'alignent respectivement sur les acides aminés n° 367, 490, et 559 de la lactotransferrine humaine. Seul le site n°2, s'alignant sur l'Asn n°490 et portant des glycanes de type N-acétyllactosaminique, est commun avec la lactotransferrine humaine. Des trois sites présents dans le lobe C-terminal de la lactotransferrine humaine, seul ce site est glycosylé. Il est également intéressant de noter que les deux autres sites de glycosylation de la lactotransferrine bovine ne sont retrouvés -dans des positions analogues - chez aucune transferrine.

Toutes ces données de structure primaire ont été regroupées dans un schéma final, figurant dans la molécule totale de la lactotransferrine bovine, toutes les séquences déterminées et la position des glycanes localisés (Fig. 27, p. 106).

Enfin, nous avons rassemblé dans un schéma récapitulatif les fragments isolés lors de notre étude (Fig. 28, p.107).



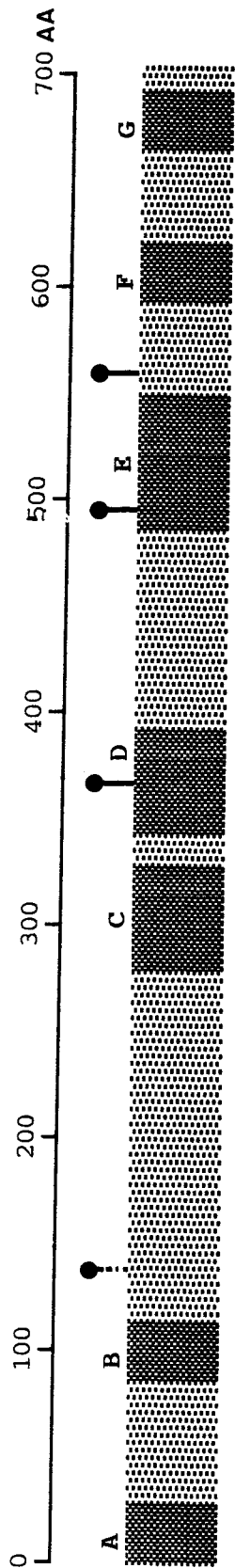


Fig. 27 : Représentation schématique des séquences peptidiques déterminées de la lactotransferrine bovine (A, B, ... G : voir légende de la Fig. 26, p. 103).

- : Glycane dont le site de glycosylation a été précisé.
- ⋮ : Glycane dont le site de glycosylation reste à définir.

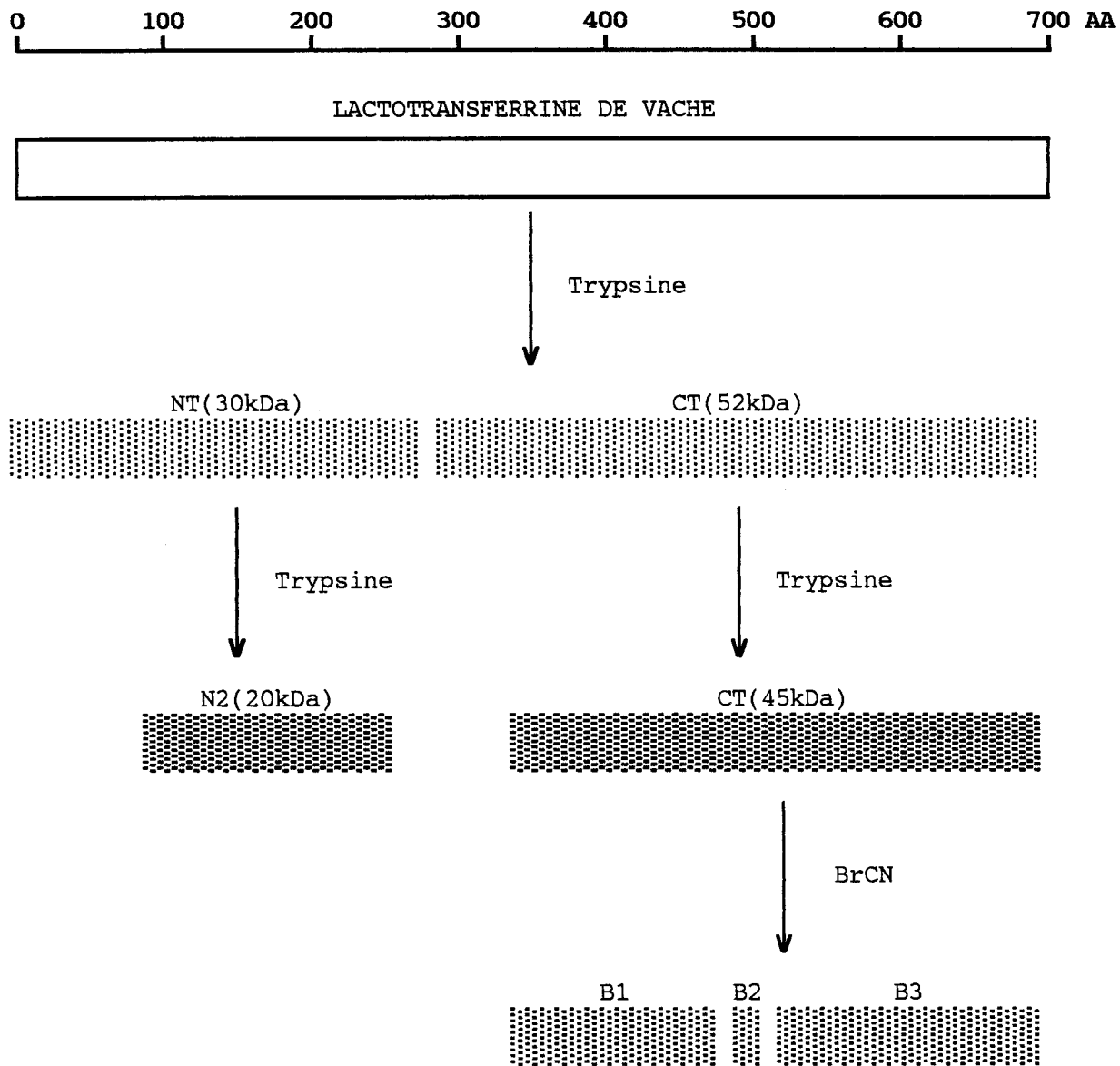


Fig. 28 : Schéma récapitulatif de la préparation des fragments analysés, isolés de la lactotransferrine bovine.

## **CLONAGE ET SEQUENCAGE D'UN ADN COMPLEMENTAIRE CODANT POUR LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE**

L'apport considérable des techniques dérivant de la génétique moléculaire a créé un véritable bouleversement dans les méthodes de détermination de la structure primaire des protéines. En particulier, le temps nécessaire à la détermination de cette structure est nettement diminué. Si l'on se réfère à la lactotransferrine humaine (METZ-BOUTIGUE *et al.*, 1984), sa structure a été entreprise en 1974 dans notre Laboratoire et celui du Pr. P. JOLLES et s'est achevée en 1984. C'est pourquoi nous avons entrepris, parallèlement à nos travaux sur la partie protéique, la détermination de la structure primaire de la lactotransferrine bovine via le clonage de son ADN complémentaire.

### **I. STRATEGIE GENERALE DE CLONAGE**

Les principes généraux de clonage seront rappelés de façon brève et porteront surtout sur les points spécifiques de notre étude sur le clonage de l'ADNc de la lactotransferrine bovine. Pour une étude plus détaillée sur les principes et les techniques de clonage, nous renvoyons le lecteur aux revues générales suivantes : cDNA Cloning, Vol. I, Vol. II et Vol. III (GLOVER D. M., 1985) ; Transcription and translation (HAMES B. D. et HIGGINS S. J., 1986) ; Molecular cloning (MANIATIS *et al.*, 1982) ; Nucleic acid hybridisation (HAMES B. D. et HIGGINS S. J., 1985).

Le clonage d'un ADNc codant pour une protéine donnée consiste en la construction d'une librairie de clones d'ADNc synthétisés à partir des ARN messagers isolés de cellules productrices de cette protéine, puis en la sélection, dans cette librairie, des clones recherchés. Lorsque l'on décide de "cloner", il est nécessaire de mettre au point une stratégie de clonage adaptée à la protéine dont on veut cloner l'ADNc.

Cette stratégie doit définir :

- la **cellule de départ** pour l'isolement des ARN messagers ;
- la **sonde** qui servira à sélectionner les clones recombinants pour la protéine recherchée ;
- le **vecteur** qui sera le mieux adapté.

#### A. Choix du matériel de départ

La construction d'une librairie d'ADN complémentaires nécessite, dans un premier temps, la préparation de la fraction ARNm polyadénylée de cellules exprimant la protéine à cloner. Pour purifier ces ARNm poly A+, trois contraintes vont guider le choix du matériel cellulaire :

- celui-ci doit exprimer au plus haut niveau cette protéine de sorte que, dans la population d'ARNm, celui codant la protéine recherchée soit représenté dans une proportion très importante ;
- le matériel choisi doit être suffisamment abondant pour que la préparation des ARNm soit techniquement possible ;
- le rendement de la préparation des ARNm poly A+ doit être non seulement quantitativement mais aussi qualitativement élevé.

Enfin, en fonction du type de sonde utilisé (acides nucléiques ou anticorps), il sera possible de rechercher la présence d'un messenger spécifique par des expériences d'hybridation moléculaire ou de traduction in vitro.

## B. Choix de la sonde

Afin de rechercher, parmi les clones recombinants, ceux qui ont inséré une séquence d'ADNc codant pour la protéine à cloner, il est nécessaire de disposer de sondes qui serviront au criblage des bibliothèques. En fonction des disponibilités matérielles au début de l'expérience, il est possible d'envisager deux types de clonage :

- cloner dans un vecteur d'expression (par exemple le bactériophage  $\lambda$ gt 11) et sélectionner les clones recombinants à l'aide d'anticorps spécifiques de la protéine à étudier (HUYNH *et al.*, 1985) ;
- cloner dans un vecteur classique (du type bactériophage  $\lambda$ gt 10) et sélectionner les clones recombinants par hybridation avec des sondes d'acides nucléiques (HUYNH *et al.*, 1985).

### 1. Les sondes acides nucléiques

Pour une revue détaillée sur l'utilisation des sondes d'acides nucléiques dans les expériences d'hybridation, nous renvoyons le lecteur à la revue générale de MEINKOTH et WAHL (1984) et à l'ouvrage de HAMES et HIGGINS (1985).

Les sondes d'acides nucléiques utilisées pour le criblage des bibliothèques d'ADNc sont en général de deux types :

- il peut s'agir d'un ADNc provenant du clonage de la même protéine mais à partir d'ARNm provenant d'une espèce animale différente ;
- il peut s'agir d'oligonucléotides de synthèse déduits de séquences peptidiques connues de la protéine à étudier.

Dans les deux cas, la recherche d'un ADNc codant pour la protéine à étudier s'effectuera par une réaction d'hybridation de séquences d'ADN complémentaires. Ces sondes pourront également servir pour la détection de la

présence d'un ARN messager spécifique dans la fraction ARNm poly A préparée.

## 2. Les sondes anticorps

L'utilisation des sondes anticorps n'est envisageable que dans le cas de clonages dans des vecteurs d'expression (type  $\lambda$ gt 11). Dans le  $\lambda$ gt 11, les ADNc clonés sont transcrits puis traduits sous forme d'une protéine hybride avec la  $\beta$ -galactosidase (HUYNH *et al.*, 1985). Ils peuvent alors être détectés par une réaction immunologique spécifique.

Lorsque ce mode de criblage est choisi, il est nécessaire de disposer de très bons anticorps. L'utilisation des anticorps polyclonaux est préférable aux anticorps monoclonaux. Toutefois, il faudra s'assurer de la monospécificité des anticorps par la recherche du nombre de molécules reconnues par ces anticorps dans un lysat cellulaire total.

Enfin, si les anticorps sont satisfaisants, il sera alors possible de rechercher la présence de l'ARN messager à étudier par des expériences de traduction *in vitro* dans des systèmes acellulaires (réticulocytes de Lapin) (MANIATIS *et al.*, 1982) ou cellulaires (oocytes de Xenopus) (MANIATIS *et al.*, 1982 ; COLMAN, 1984).

## C. Choix du vecteur

Le choix du vecteur est en fait conditionné par le type de sonde utilisé. En particulier, s'il s'agit de sondes anticorps, il faudra faire appel à un vecteur d'expression.

Les vecteurs les plus utilisés pour la construction de bibliothèques d'ADNc peuvent être d'origine phagique ou plasmidique. Les bactériophages présentent l'intérêt de fournir un grand nombre de recombinants et donc d'augmenter la chance de cloner l'ADNc spécifique de la protéine à étudier.

Ils offrent, par ailleurs, l'avantage d'une utilisation très souple permettant le criblage d'un grand nombre de clones à la fois.

Les plasmides ont, quant à eux, une efficacité de clonage moindre mais présentent l'avantage d'éviter les étapes de sous-clonage pour produire l'insert.

## II. PREPARATION DES ARN CELLULAIRES TOTAUX DE DIFFERENTS TISSUS BOVINS - RECHERCHE D'ARN MESSAGERS CODANT POUR LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE

### A. Principe

#### 1. Choix des tissus

Le choix des tissus a été effectué en fonction de la capacité de ces derniers à synthétiser de la lactotransferrine (voir la partie "Généralités"). Nous avons ainsi sélectionné quatre tissus :

- La glande mammaire :

La lactotransferrine présente dans le lait de Vache (GROVES, 1960) est synthétisée par les cellules acineuses de la glande mammaire.

- La glande sous-maxillaire :

La présence de lactotransferrine dans la salive humaine (MASSON, 1970) et dans la salive bovine (MORRISON et ALLEN, 1975) suggère que sa synthèse est réalisée par les glandes salivaires. Notre choix s'est porté plus particulièrement sur la glande sous-maxillaire puisque cette dernière produit chez l'Homme la quantité la plus importante de lactotransferrine (MASSON, 1970).

- Les cellules endométriales de l'utérus :

La présence de lactotransferrine humaine a été signalée au niveau de l'endomètre de la Femme (TOURVILLE, 1970 ; MASSON, 1970). Par ailleurs, c'est à partir de ce tissu que PENTECOST *et al.* (1987) ont cloné l'ADNc de la lactotransferrine de Souris après stimulation préalable de ces cellules par les oestrogènes. L'obtention de ce tissu chez la Vache, dans les mêmes conditions de stimulation hormonale, est envisageable auprès d'équipes de recherche travaillant sur la fécondation in vitro.

- Les leucocytes :

La lactotransferrine a été mise en évidence dans les leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles (MASSON *et al.*, 1969). Il s'agit de cellules qui peuvent être facilement obtenues en grande quantité.

2. Choix de la sonde :

Lorsque nous avons entrepris le clonage de la lactotransferrine bovine, nous disposions de deux types d'informations fondamentales :

- plusieurs séquences d'ADNc de transferrine étaient connues, en particulier celles des lactotransferrines humaine et murine ;
- quelques séquences peptidiques de la lactotransferrine bovine avaient été déterminées lors de notre étude sur la structure de la protéine (voir 1<sup>ère</sup> partie des Résultats).

La connaissance de ces deux informations nous a fait opter pour l'utilisation de sondes d'acides nucléiques - plutôt que de sondes anticorps - pour la détection d'ARNm (ou d'ADNc) codant pour la lactotransferrine bovine.

Les deux types de sondes d'acides nucléiques qui ont été employés sont:

- deux sondes oligonucléotidiques synthétiques ;



- deux sondes d'ADNc codant pour la lactotransferrine et la sérotransferrine humaines.

Leur description est détaillée dans le paragraphe suivant.

## **B. Matériels et méthodes**

### **1. Matériels**

#### **a) Prélèvement des tissus**

Les tissus nous ont été fournis par l'abattoir du Centre National de Recherches en Zootechnologie (CNRZ) de l'INRA de Jouy-en-Josas<sup>(\*)</sup>. Ils ont été prélevés sur deux Vaches post-mortem. Le pis et la glande salivaire proviennent d'une Vache lactante sans traitement particulier. Par contre, l'endomètre a été prélevé sur une Vache se trouvant sous stimulation par les oestrogènes. La date d'abattage correspond à la date d'ovulation de cette dernière. Les quantités prélevées sont de l'ordre de 100-200 g pour le pis et la glande salivaire. Par contre, nous ne pouvons estimer la quantité de cellules endométriales prélevées car ces dernières ont été obtenues par "grattage" au scalpel de la partie du tissu se trouvant à la face luminale.

Les tissus ont été immédiatement plongés dans une solution d'extraction d'ARN renfermant des inhibiteurs de RNases, à + 4°C.

---

*(\*) Nous remercions vivement le personnel de l'abattoir et en particulier MR. FEVRE pour l'aide qu'ils nous ont apportée et la possibilité qui nous a été offerte de pouvoir manipuler les tissus sur place.*

*b) Préparation des leucocytes*

Les leucocytes bovins totaux ont été obtenus à partir de 10 l de sang de Boeuf prélevé aux abattoirs de Lille. Le sang est centrifugé à 5000 g pendant 5 mn à 4°C et les cellules sont prélevées à la pipette à l'interface du culot rouge et du plasma. Elles sont ensuite directement introduites dans la solution inhibitrice de RNases. Il faut toutefois noter que le temps écoulé entre la mort de l'animal et l'introduction des cellules dans la solution inhibitrice de RNases est de l'ordre de 2 h.

*c) Préparation des sondes*

$\alpha$ -Synthèse de sondes oligonucléotidiques

Lorsque nous nous sommes intéressés à la synthèse de sondes oligonucléotidiques, nous avons deux possibilités pour les définir :

- choisir une séquence nucléotidique au niveau de zones très conservées des ARNm des transferrines et synthétiser la séquence complémentaire exacte ;
- définir des séquences nucléotidiques par déduction de séquences peptidiques de la lactotransferrine bovine.

Les séquences peptidiques de la lactotransferrine bovine qui avaient été déterminées au moment de la synthèse des sondes ne nous permettaient pas d'obtenir des oligonucléotides faiblement dégénérés. Aussi, nous sommes-nous orientés vers la première alternative. Nous avons donc recherché des zones d'homologie en comparant les séquences de la lactotransferrine humaine, de la lactotransferrine murine et de la sérotransferrine humaine. Deux sondes de 35 et 23 nucléotides (sondes 35-mer et 23-mer) ont été déduites. Elles sont présentées dans la Fig. 29, p. 116.

La sonde 35-mer est située dans la partie la plus éloignée de la

485

A : Trp-Asn-Ile-Pro-Met-Gly-Leu-Leu

B : TGG AAT ATC CCC ATG GGC CTG CTC

C : TGG AAC ATC CCC ATG GGC CTG CTC

D : TGG AAC ATC CCC ATG GGC CTG CTC

Sonde

23-mer : AAC TTA TAG GGG TAC CCG GAC GA  
G

655

660

A : Asn-Leu-Leu-Phe-Asn-Asp-Asn-Thr-Glu-Cys-Leu-Ala

B : AAC CTT CTG TTC AAT GAC AAC ACT GAG TGT CTG GCC

C : AAC CTT CTG TTC AAT GAC AAC ACT GAG TGT CTG GCC

D : GAC CTT CTG TTC AGA GAT GAC ACA GTA TGT TTG GCC

Sonde

35-mer : TG GAA GAC AAG TTA CTG TTG TGA CTC ACA GAC CGG

- A : Séquence peptidique de la lactotransferrine humaine (METZ-BOUTIGUE *et al.*, 1984).
- B : Séquence nucléotidique de l'ARNm de la LTF humaine (RADO *et al.*, 1987).
- C : Séquence nucléotidique de l'ARNm de la LTF murine (PENTECOST *et al.*, 1987).
- D : Séquence nucléotidique de l'ARNm de la STF humaine (YANG *et al.*, 1984).

Fig. 29 : Dédution de sondes oligonucléotidiques complémentaires à des zones d'homologie déterminées par comparaison des ARNm des LTF humaine et murine et de la STF humaine.

région codante en 3'-OH (correspondant aux acides aminés 652 à 663 de la lactotransferrine humaine). Elle est 100 % homologue aux deux séquences de lactotransferrine humaine et murine et 75 % homologue à celle de la sérotransferrine humaine.

La sonde de 23-mer est, à un nucléotide près, 100 % homologue aux séquences des trois transferrines précédemment citées. Elle correspond à la partie codante des acides aminés 481 à 488 de la lactotransferrine humaine.

Ces sondes ont été synthétisées au Centre de Recherches en Biologie et Génétique Cellulaires du CNRS de Toulouse.

*β-Préparation d'une sonde d'ADNc de la lactotransferrine humaine*

Le taux d'homologie important (environ 70 %) existant entre les séquences nucléotidiques des ARNm des lactotransferrines humaine et murine (RADO *et al.*, 1986 ; PENTECOST *et al.*, 1987) nous a amenés à penser que l'ARNm de la lactotransferrine bovine devait également avoir une structure proche de ces deux séquences. Nous avons ainsi obtenu, auprès du Dr. RADO<sup>(\*)</sup> un ADNc de 0,9 Kb codant pour la partie C-terminale de la lactotransferrine humaine (acides aminés 439-703). Ce dernier est inséré au site Pst I d'un plasmide de type pUC 18 (voir p. A-31).

Ce plasmide a été préparé à partir d'une culture de la bactérie compétente (TG 1) et l'ADNc a été récupéré après hydrolyse par l'enzyme Pst I (voir p. A-31).

*γ -Préparation d'une sonde d'ADNc de la sérotransferrine humaine*

Comme nous l'avons signalé un peu plus haut, l'existence d'une homologie relativement importante entre les séquences nucléotidiques de la lacto-

---

(\*) Nous remercions vivement le Dr. RADO pour la fourniture de cet ADNc.

transferrine et de la sérotransferrine humaines nous exposait au risque de sélectionner un ADNc codant pour la sérotransferrine - si cette dernière était exprimée par la cellule de départ -.

En effet, l'utilisation d'une sonde d'ADNc de lactotransferrine en système hétérologue (humain-bovin) nous obligeait à l'utiliser dans des conditions de stringence d'hybridation pas trop élevées, augmentant ainsi le risque d'une réaction "croisée" avec un ADNc de la sérotransferrine par exemple. Nous avons donc jugé utile de parfaire nos expériences de criblage des bibliothèques par un criblage terminal en présence d'une sonde d'ADNc codant pour la sérotransferrine humaine. Cette dernière nous a été fournie par le Dr A. KAHN<sup>(\*)</sup>. Il s'agit d'un ADNc de 1 Kb codant pour la région C-terminale de la sérotransferrine humaine (acides aminés 402-679). Cet ADNc nous a été fourni inséré au site Pst I d'un plasmide de type pBR 322. La préparation de cet ADNc est comparable à celle de l'ADNc de la lactotransferrine humaine (voir p. A-31).

*d) Marquage des sondes*

Le marquage des sondes a été effectué à l'aide de précurseurs radioactifs. Il s'agit du  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP pour les sondes oligonucléotidiques et de l' $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP pour les sondes d'ADNc. Les protocoles de marquage sont décrits p. A-18 et A-19.

---

(\*) Nous adressons nos vifs remerciements au Dr. KAHN pour le don de cette sonde.

## 2. Méthodes

### a) Préparations des ARN totaux

Les prélèvements de tissus à partir de pis et de glande salivaire ont été d'abord découpés en cubes d'environ 2 cm d'épaisseur puis introduits dans une solution d'isothiocyanate de guanidine. Les morceaux ont été broyés au Polytron et l'extraction des ARN totaux a été réalisée selon la technique décrite par MANIATIS *et al.* (1982) (voir p. A-16).

Les cellules prélevées par "grattage" de l'endomètre de Vache et les leucocytes obtenus à partir de 10 l de sang selon le protocole décrit p. 115 sont introduits dans une solution d'isothiocyanate de guanidine puis broyés au Polytron. L'extraction des ARN est réalisée comme décrit ci-dessus.

### b) Analyse des ARN préparés

Les ARN totaux préparés selon les méthodes décrites ci-dessus sont analysés quantitativement et qualitativement.

La quantité d'ARN obtenue est estimée par une mesure de l'absorbance à 260 nm et le degré de pureté apprécié par la détermination du rapport des densités optiques à 260 et 280 nm.

La qualité des préparations est ensuite déterminée par électrophorèse en présence d'hydroxyméthyl mercure (voir p. A-27). Cette qualité est considérée comme satisfaisante quand les échantillons présentent deux bandes intenses d'ARN ribosomiques 18S et 28S.

c) Recherche d'ARNm codant pour la lactotransferrine bovine

1 µg des fractions ARNm poly A sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose en présence d'hydroxyméthyl mercure (voir p. A-27) puis transférés sur membrane de nitrocellulose par capillarité (MANIATIS *et al.*, 1982) (voir p. A-29).

Les ARN ainsi transférés sont soumis à une hybridation en présence des sondes oligonucléotidiques ou des ADNc de la lactotransferrine et de la sérotransferrine humaines marqués au <sup>32</sup>P (voir p. A-29 et A-30).

C. Résultats et discussion

1. Préparation des ARN cellulaires totaux

Les résultats des préparations d'ARN totaux à partir des différents tissus bovins étudiés sont rassemblés dans le tableau IX, p. 121. Le pis, la glande salivaire et l'endomètre ont fourni une quantité d'ARN variant de 8 à 70 mg. Cette quantité est largement suffisante pour envisager le clonage. Par contre, dans le cas des leucocytes, la quantité de 0,5 mg est extrêmement faible. Ceci peut s'expliquer par l'existence d'une dégradation importante résultant du temps trop long écoulé entre la mort de l'animal et l'introduction des cellules dans le milieu inhibiteur de RNases.

Concernant la qualité des ARN obtenus, elle a été estimée satisfaisante pour les différentes préparations, exception faite pour celle des ARN isolés du pis. En effet, dans ce cas, il y a absence totale des deux bandes d'ARN ribosomiques suggérant que les ARN messagers ont été fort probablement dégradés.

- TABLEAU IX -

ANALYSES QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DES ARN TOTAUX  
ISOLES DE DIFFERENTS TISSUS BOVINS

Tissus	Quantité d'ARN (mg)	$\frac{D_{0260}}{D_{0280}}$	Qualité des ARN estimée sur gel d'agarose
Pis	55	2,0	absence d'ARN 18S/28S
Glande sous-maxillaire	70	1,9	bonne
Endomètre	8	1,9	bonne
Leucocytes	0,5	1,9	bonne



## 2. Isolement des ARNm poly A - Recherche d'ARN messenger codant pour la lactotransferrine

Le rendement de la purification des ARNm poly A+ par 2 chromatographies sur colonne d'oligo (dT) cellulose a été de l'ordre de 1 %.

Nous n'avons constaté, en électrophorèse, aucune bande résiduelle d'ARN ribosomique, montrant ainsi l'efficacité de la purification.

### a) Recherche d'ARN messenger de lactotransferrine à l'aide des sondes oligonucléotidiques

Le résultat de l'hybridation de nos préparations d'ARN avec les sondes oligonucléotidiques est présenté dans la Fig. 30, p. 123.

Nous constatons que les fractions ARNm poly A+ isolées de la glande salivaire, de l'endomètre et du pis s'hybrident avec ces sondes oligonucléotidiques.

La fraction ARNm poly A isolée de la glande salivaire est celle qui fournit le signal le plus intense. Ce signal se présente sous forme de deux bandes de tailles voisines de 2500 et 2300 pb - la bande de 2500 pb étant nettement plus importante. Ces deux bandes pourraient correspondre à deux tailles différentes d'un même ARN messenger ou encore aux ARN messagers respectifs de la lactotransferrine et de la sérotransferrine. En effet, ces sondes ont été établies à partir de séquences communes à leurs deux ARNm, il est donc possible d'obtenir une hybridation avec ces deux ARN messagers s'ils sont exprimés tous deux dans la cellule.

La fraction ARNm poly A isolée de l'endomètre ne donne qu'une seule bande après hybridation avec les sondes oligonucléotidiques. Cette bande, d'une taille approchant 2500 pb, migre à la même hauteur que celle de 2500 pb décrite précédemment pour la glande salivaire. Toutefois, le signal est

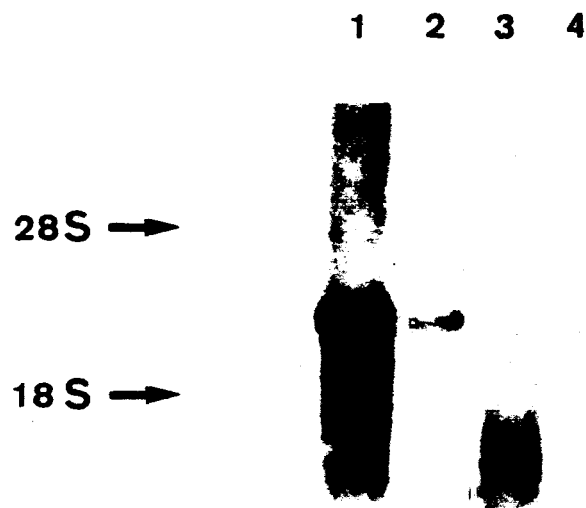


Fig. 30 : Recherche de la présence d'un ARNm codant pour la lactotransferrine bovine dans différents tissus. Hybridation en présence de sondes oligonucléotidiques marquées au  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ .

- 1 - ARNm poly A isolés de la glande salivaire.
- 2 - ARNm poly A isolés de l'endomètre.
- 3 - ARNm poly A isolés du pis.
- 4 - ARNm poly A isolés des leucocytes.

Marqueurs 28 S : 4713 nucléotides.

18 S : 1879 nucléotides.

beaucoup moins intense que dans le cas précédent.

En ce qui concerne les ARNm poly A isolés du pis, nous constatons la présence d'un signal d'hybridation sous forme d'une "trainée" de masse moléculaire inférieure aux bandes caractérisées précédemment. Ce résultat traduit, comme nous l'avions prédit plus haut, la présence d'une dégradation importante des ARN isolés de ce tissu.

Enfin, nous n'avons caractérisé aucun signal d'hybridation avec les ARNm poly A isolés des leucocytes. Nous pouvons, à cet égard, rappeler la très faible quantité d'ARN que nous avons obtenue. L'absence d'une hybridation spécifique avec les sondes oligonucléotidiques peut s'expliquer par une dégradation importante occasionnée par le temps nécessaire à l'isolement des cellules ou simplement par l'absence de l'ARN messager de la lactotransferrine à ce stade de maturation des cellules.

*b) Hybridation des ARNm poly A en présence des ADNc de la lactotransferrine et de la sérotransferrine humaines*

Des résultats identiques à ceux décrits par les sondes oligonucléotidiques ont été obtenus avec l'ADNc de la lactotransferrine humaine. La seule remarque que nous puissions faire est la disparition du signal d'hybridation à 2300 pb rencontré avec les ARNm poly A de la glande salivaire. En effet, l'ADNc de la lactotransferrine humaine, utilisé dans des conditions de stringence plus élevées que celles employées avec les oligonucléotides (voir p. A-30), ne révèle qu'une seule bande à 2500 pb. Par contre, dans les mêmes conditions de stringence, nous n'avons obtenu aucun signal d'hybridation avec la sonde d'ADNc de la sérotransferrine humaine.

## **D. Conclusion**

Notre étude sur la recherche d'ARNm codant pour la lactotransferrine bovine nous a amené à sélectionner la glande sous-maxillaire et l'endomètre comme tissus candidats pour le clonage de l'ADNc de la lactotransferrine bovine. La révélation d'une bande d'environ 2500 pb par les sondes oligonucléotidiques et l'ADNc de la lactotransferrine humaine est en effet en faveur de la présence d'un ARN messager spécifique exprimé par les cellules de ces tissus.

Nous avons donc choisi de construire deux bibliothèques d'ADN complémentaires dans le bactériophage  $\lambda$ gt 10 à partir des ARNm poly A+ isolés de la glande sous-maxillaire et des cellules endométriales de l'utérus de Vache.

## **III. CONSTRUCTION DES BIBLIOTHÈQUES D'ADN COMPLÉMENTAIRES**

La construction d'une bibliothèque d'ADN complémentaires peut aujourd'hui être considérée comme une technique bien éprouvée. Le nombre impressionnant de molécules clonées à ce jour et l'intervention de sociétés spécialisées commercialisant des kits de clonage font que la construction d'une bibliothèque d'ADN complémentaires ne représente plus une étape limitante.

### **A. Synthèse des molécules d'ADNc double brin**

#### **1. Principe**

Afin de pouvoir manipuler les séquences d'ARN messagers, les rendre détectables, les cloner, il est nécessaire de convertir ces séquences d'ARNm en ADN double brin. Cette conversion s'effectue en deux étapes. La

première étape consiste à synthétiser une molécule d'ADN simple brin complémentaire de l'ARNm par action d'une transcriptase réverse. Dans un second temps, la molécule d'ARNm hybridée à l'ADNc monobrin est hydrolysée par l'action d'une endonucléase, puis remplacée par une molécule d'ADN identique. Cette technique, décrite par GUBLER et HOFFMAN (1983) fait suite aux travaux d'OKAYAMA et BERG (1982).

## 2. Matériels et méthodes

Pour la synthèse de nos molécules d'ADNc, il nous a semblé opportun de faire appel à un kit de synthèse d'ADNc vendu dans le commerce. L'utilisation de tels kits, grâce à des contrôles rigoureux réalisés avant commercialisation, permet une minimisation des risques d'échecs. En plus, de nombreuses étapes se trouvent standardisées et les problèmes éventuels peuvent être appréhendés plus facilement.

Le kit de synthèse que nous avons utilisé est commercialisé par la Société Amersham. Ce dernier correspond à une application directe de la technique décrite par GUBLER et HOFFMAN (1983). Il présente l'avantage de réaliser toutes les étapes de synthèse dans un même tube, minimisant ainsi les pertes. Les conditions expérimentales utilisées sont celles indiquées par le fournisseur. Elles sont résumées p. A-19.

## 3. Résultats et discussion

Les résultats de la synthèse de molécules d'ADNc double brin à partir de 5 µg d'ARNm poly A isolés de la glande sous-maxillaire et de l'endomètre ont été rassemblés dans le tableau X, p. 127. Les rendements de rétrotranscription de 25 % et 23 % obtenus respectivement avec les ARNm de glande salivaire et d'endomètre peuvent être estimés très satisfaisants (le four-

- TABLEAU X -

RENDEMENTS DE SYNTHÈSE D'ADN COMPLÉMENTAIRES OBTENUS  
APRÈS RETROTRANSCRIPTION D'ARN<sup>m</sup> POLY A ISOLES DE GLANDE  
SOUS-MAXILLAIRE ET D'ENDOMETRE BOVINS

Tissu	Quantité d'ARN de départ (µg)	Quantité d'ADNc simple brin (µg)	Quantité d'ADNc double brin (µg)	Rendement de rétro- transcri- tion (%)	Rendement de conver- sion 1 <sup>er</sup> /2 <sup>er</sup> brin (%)
Glande salivaire	5	1,25	2,65	25	110
Endomètre	5	1,15	2,30	23	100

nisseur indique une valeur comprise entre 15 % et 30 %). Le doublement de la quantité d'ADN obtenue lors de la conversion ADN simple brin/ADN double brin témoigne également de la bonne marche de notre expérience.

Une fraction aliquote des ADNc double brin néosynthétisés a été analysée en gel d'agarose en présence, comme marqueurs de masses moléculaires, de l'ADN de  $\lambda$  digéré par l'enzyme Hind III. L'autoradiographie de ce gel, présentée Fig. 31, p. 129 montre que la taille des ADNc synthétisés est très élevée et que la moyenne des tailles est centrée sur 1-1,5 kb. Nous pouvons également remarquer que les ADNc synthétisés à partir des ARNm de l'endomètre possèdent une taille supérieure à ceux provenant de la rétrotranscription des ARNm de la glande salivaire.

Ces résultats montrent que la qualité de nos préparations d'ARN semble correcte. D'autre part, nous pouvons considérer que le kit de synthèse d'ADNc que nous avons utilisé est un excellent outil. En effet, nous avons obtenu, sur plusieurs essais, des résultats reproductibles.

## **B. Genèse des extrémités Eco RI - Fractionnement en taille des ADNc**

### **1. Principe**

Afin de pouvoir cloner les ADNc néosynthétisés au niveau du site Eco RI du bactériophage  $\lambda$ gt 10, il est nécessaire de générer des bouts collants Eco RI à chaque extrémité des molécules d'ADNc. Cette étape a lieu après la méthylation des molécules d'ADNc par l'enzyme Eco RI méthylase (qui vise à protéger d'éventuels sites Eco RI internes). Elle s'effectue par une simple ligation de molécules adaptatrices ("linkers") renfermant un site Eco RI. La genèse des bouts collants Eco RI est alors obtenue par une hydrolyse consécutive par l'enzyme de restriction Eco RI. Cependant, afin d'éviter la formation de faux recombinants, il convient de séparer les

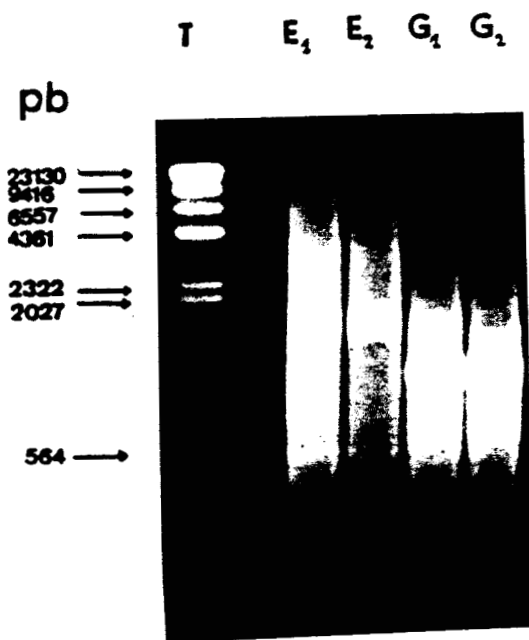


Fig. 31 : Analyse sur gel d'agarose des ADNc synthétisés à partir d'ARNm poly A isolés de la glande salivaire et de l'endomètre.

E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> : Endomètre.

G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> : Glande salivaire.

T : Marqueur de masses moléculaires  $\lambda$  Hind III.



molécules d'ADNc à bouts collants Eco RI des monomères d'adaptateurs libérés. Cette séparation est obtenue par une chromatographie de gel filtration. De plus, en utilisant un support de chromatographie approprié, il est possible, en plus de l'élimination des monomères d'adaptateurs, d'obtenir une séparation en taille des molécules d'ADNc. Nous pouvons donc, à ce niveau, éliminer les molécules d'ADNc de faible masse moléculaire ou ne cloner qu'une fraction particulière d'ADNc.

## 2. Matériels et méthodes

### a) Méthylation des sites Eco RI internes et ligation des adaptateurs Eco RI

Les ADNc précipités et séchés sont repris par de l'eau et soumis à l'action de l'enzyme Eco RI méthylase dans les conditions décrites p. A-20.

Les ADNc méthylés sont alors mis en présence d'adaptateurs Eco RI et soumis à l'action de la T4 DNA ligase selon le protocole défini p. A-20.

### b) Digestion par Eco RI - Elimination des molécules d'adaptateurs

Le ligat précédemment obtenu est hydrolysé par l'enzyme Eco RI dans les conditions décrites p. A-21. L'hydrolysat est dénaturé (10 min. à 65°C) puis chromatographié directement sur une colone de 2 ml de Bio-Gel A-50m (Biorad) comme décrit p. A-21.

La radioactivité contenue dans les fractions collectées est estimée par un comptage par effet Cerenkov. Les fractions retenues sont précipitées par de l'éthanol en présence de la quantité d'ADN de  $\lambda$ gt 10 nécessaire pour le clonage (voir p. A-22).

### 3. Résultat

Les fractions obtenues après chromatographie de nos molécules d'ADNc sur colonne de Bio-Gel A-50m ont été analysées sur gel d'agarose à 0,7 % puis autoradiographiées (Fig. 32, p. 132). Les ADNc collectés dans les tubes 1 à 7 ont été rassemblés. Les quantités d'ADNc correspondants ont été estimées par un comptage par effet Cerenkov. Elles représentent respectivement 247 et 299 ng pour l'endomètre et la glande salivaire.

#### C. Clonage dans le bactériophage $\lambda$ gt 10

##### 1. Principe

Le vecteur de clonage que nous avons choisi est le bactériophage  $\lambda$ gt 10 (voir revue générale de HUYNH et *al.*, 1985). il s'agit d'un vecteur qui a été spécialement mis au point pour la construction et le criblage de bibliothèques d'ADN complémentaires. Il présente l'avantage de posséder un site unique de clonage Eco RI situé dans un gène particulier : le gène CI. Ce dernier code pour un répresseur du cycle lytique du bactériophage. Le clonage d'un ADNc à l'intérieur de ce gène a pour conséquence d'inhiber la synthèse d'un répresseur actif et donc, d'induire un cycle de lyse obligatoire de la bactérie. Par contre, les bactériophages n'ayant pas inséré des molécules d'ADNc étrangers provoqueront l'induction d'un cycle lysogène avec insertion de l'ADN phagique dans le génome bactérien. L'utilisation d'une souche d'*Escherichia coli* portant la mutation hfl (haute fréquence de lysogénéisation) renforce le caractère discriminant entre les clones recombinants et les bactériophages sauvages.

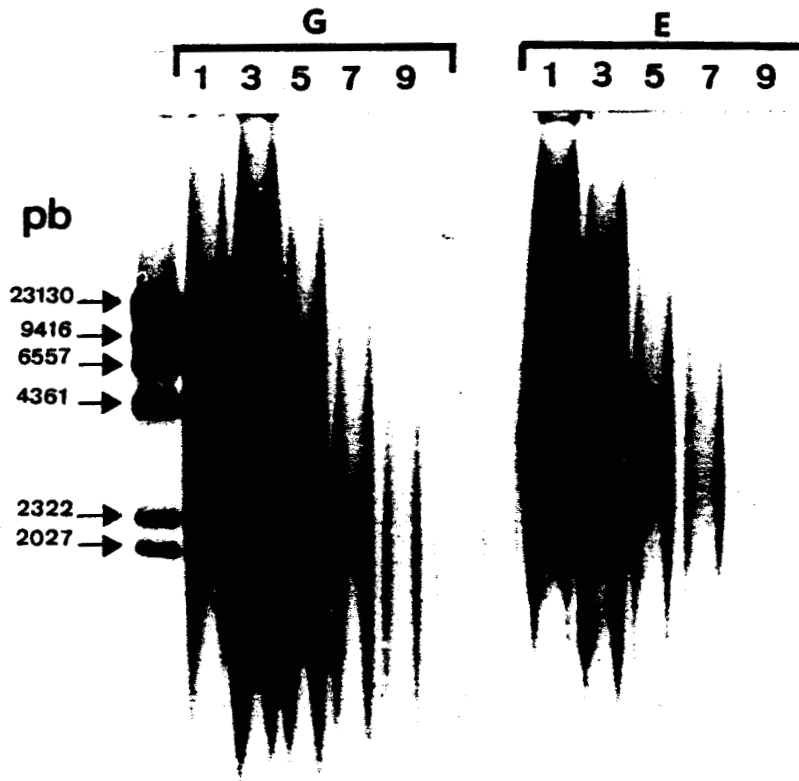


Fig. 32 : Fractionnement en taille des molécules d'ADNc synthétisés à partir des ARNm poly A isolés de la glande salivaire et de l'endomètre. (Marqueurs de masses moléculaires :  $\lambda$  Hind III).

## 2. Matériels et méthodes

L'ADN de  $\lambda$ gt10 que nous avons utilisé pour le clonage de nos ADNc est commercialisé par la Société Promega Biotech. Il présente l'avantage d'être proposé "prêt à l'emploi", c'est-à-dire que les sites "cos" ont été protégés par ligation et les extrémités Eco RI générées et déphosphorylées (pour forcer le clonage des molécules d'ADNc qui sont, elles, phosphorylées).

Pour le clonage des molécules d'ADNc issus de la glande salivaire et de l'endomètre bovins, nous avons incorporé 1  $\mu$ g d'ADN de  $\lambda$ gt 10. Les conditions de ligation pour la ligase du bactériophage T4 sont celles définies p. A-22.

## 3. Résultat

Après 16 heures d'incubation pour effectuer la ligation, nous avons contrôlé, avant l'étape ultime de l'encapsidation, l'efficacité de la ligation. Nous avons ainsi déposé une fraction aliquote (1  $\mu$ l) du ligat sur un gel d'agarose très peu réticulé (0,3 %). Nous avons observé, dans le cas de la glande salivaire et de l'endomètre, que la migration dans le gel était diminuée par rapport à celle d'un témoin correspondant aux bras de  $\lambda$ gt 10 sans ADNc. Cette migration diminuée est le résultat de la concatémérisation des molécules d'ADN qui ne peut avoir lieu que s'il y a eu ligation des molécules d'ADNc. Les molécules d'ADN phagiques peuvent donc être encapsidées.

## D. Encapsulation - Titration des librairies

### 1. Principe

La phase terminale de la construction d'une librairie d'ADNc correspond à l'encapsulation des molécules d'ADN phagiques. Elle correspond à la synthèse in vitro de la capside virale réalisée par des enzymes et des précurseurs présents dans des extraits d'encapsulation. Ces extraits peuvent être préparés au Laboratoire, mais sont aussi commercialisés par plusieurs sociétés. Dans ce dernier cas, ils offrent en général une efficacité d'encapsulation élevée et standard, et ne risquent pas de compromettre la suite des expérimentations.

Une fois l'encapsulation réalisée, le titre est déterminé par un étallement sur boîte et le pourcentage de recombinants vrais (c'est-à-dire le pourcentage de bactériophages ayant inséré effectivement une séquence d'ADNc) est estimé par une expérience d'hybridation.

### 2. Matériels et méthodes

Les extraits d'encapsulation que nous avons utilisés sont les extraits "Gigapack Gold" commercialisés par la Société "Stratagene". Leur efficacité maximale d'encapsulation est donnée pour  $2 \cdot 10^9$  p.f.u. (plaque form unit) par  $\mu\text{g}$  d'ADN.

Les réactions d'encapsulation sont réalisées sur  $4 \mu\text{l}$  du ligat précédemment obtenu, dans les conditions indiquées par le fournisseur.

Le titre des librairies ainsi confectionnées est déterminé par des dilutions sériées des librairies puis transfection de la souche hôte C600 hfl (voir p. A-23). Cependant, afin d'estimer le pourcentage de recombinants vrais, une réplique sur filtre de nitrocellulose est effectuée sur

200 plages de lyse environ. Cette dernière est soumise à une hybridation en présence de sondes d'ADNc simple brin "très fortement marquées". Ces sondes d'ADNc monobrin "très chaudes" sont obtenues dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la synthèse des ADNc simple brin par la reverse transcriptase. Cependant, le dCTP n'est ajouté cette fois que sous sa forme radiomarquée (voir p. A-19). L'hybridation et les lavages sont effectués dans les conditions définies p. A-30.

### 3. Résultats

Les titres des librairies d'ADNc issus de la glande salivaire et de l'endomètre sont donnés dans le tableau XI, p. 136.

Le pourcentage de recombinants vrais déterminé par hybridation a été estimé à 30 % dans les deux cas. Cette valeur correspond bien évidemment à une valeur par défaut. Elle peut être considérée comme satisfaisante et témoigne du succès de notre clonage.

## IV. CRIBLAGE DE LA LIBRAIRIE "GLANDE SALIVAIRE" - ANALYSE DES CLONES RECOMBINANTS SELECTIONNES

### A. Criblage de la librairie "Glande Salivaire"

La première librairie que nous avons décidé de cribler est celle construite à partir des ARNm poly A isolés de la glande salivaire bovine. La mise en évidence d'un signal nettement plus marqué, par la sonde d'ADNc de la lactotransferrine humaine, que dans le cas des ARNm poly A isolés de l'endomètre nous a fait opter pour ce choix.

- TABLEAU XI -

TITRATION DES LIBRAIRIES D'ADNc CONSTRUITES A PARTIR  
D'ARN ISOLES DE LA GLANDE SALIVAIRE ET DE L'ENDOMETRE DE BOVINS

Librairie	Nombre total de recombinants de la librairie (1)	Nombre de recombinants par $\mu\text{g}$ d'ADN	Nombre de recombinants par $\mu\text{g}$ d'insert	Pourcentage de recombinants vrais (2)
Glande salivaire	$5 \cdot 10^5$	$6,6 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^6$	30 %
Endomètre	$1,25 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^5$	$10^6$	30 %

(1) Titration effectuée sur C600 hfl.

(2) Déterminée par une sonde ADNc simple brin marquée au  $^{32}\text{P}$ .

### 1. Criblage par la sonde d'ADNc de la lactotransferrine bovine

La comparaison de la séquence nucléotidique de l'ADNc partiel de la lactotransferrine humaine avec celle de l'ADNc de la lactotransferrine murine et de la sérotransferrine humaine a montré que la séquence de la lactotransferrine humaine présentait une homologie de l'ordre de 70 % et 50 % avec celle de la lactotransferrine murine, d'une part, et celle de la sérotransferrine humaine, d'autre part. De ce fait, il nous a semblé plus opportun d'entreprendre le criblage de nos bibliothèques avec la sonde de lactotransferrine humaine plutôt qu'avec les oligonucléotides de synthèse. En effet, cet ADNc sera très certainement plus spécifique d'un ADNc de la lactotransferrine bovine et permettra de travailler avec des stringences d'hybridation beaucoup plus élevées.

#### a) Méthode

Des étalements de  $10^4$  bactériophages par boîte de Pétri (diamètre 15 cm) sont réalisés dans les conditions définies p. A-23. Après une culture de 18 heures à 37°C, deux empreintes de chaque boîte sont effectuées sur des filtres de nitrocellulose. Les filtres sont traités dans les conditions décrites p. A-24, puis, soumis à une hybridation en présence de la sonde d'ADNc de la lactotransferrine humaine marquée au  $^{32}\text{P}$  (voir p. A-30).

Les plages de lyse correspondant à des signaux positifs retrouvés aux mêmes endroits sur les deux empreintes sont prélevées puis mises à diffuser dans les conditions définies p. A-24. Les clones positifs sont purifiés par trois criblages successifs réalisés dans les mêmes conditions (sur boîte de Pétri de diamètre 9 cm).



*b) Résultat*

Nous avons effectué un criblage de la librairie "Glande Salivaire" sur  $2,5 \cdot 10^5$  recombinants (soit environ la moitié du nombre total de recombinants de la librairie). Ce criblage nous a permis d'isoler douze clones positifs présentant une forte hybridation avec la sonde d'ADNc de la lactotransferrine humaine. Après trois criblages successifs, nous avons obtenus des clones purs.

*2. Criblage différentiel par les sondes d'ADNc de la lactotransferrine et de la sérotransferrine humaines*

Comme nous disposions d'un ADNc de 1 kb codant pour la région C-terminale de la sérotransferrine humaine, nous avons soumis, dans les conditions définies précédemment, nos clones purifiés à une hybridation en présence des deux sondes d'ADNc de la lactotransferrine et de la sérotransferrine humaines.

Le résultat que nous avons obtenu est identique pour tous les clones isolés. L'hybridation, en présence de l'ADNc de la lactotransferrine humaine, donne un signal d'hybridation très important alors que, en présence de l'ADNc de la sérotransferrine, nous n'obtenons qu'une hybridation de l'ordre du bruit de fond. Le résultat de l'hybridation de l'un des clones est présenté Fig. 33, p. 139.

Il n'est pas possible, à ce stade, de tirer des conclusions mais nous pouvons affirmer, d'ores et déjà, que les clones sélectionnés ont inséré un ADNc dont la séquence nucléotidique est vraisemblablement plus proche d'un ADNc de lactotransferrine que de sérotransferrine humaines.

A

B



Fig. 33 : Criblage différentiel d'un clone purifié par les ADNc de la lactotransferrine (A) et de la sérotransferrine (B) humaines.

## B. Analyse des clones recombinants

### 1. Principe

Afin de déterminer la taille des ADNc clonés, il est nécessaire de préparer une quantité importante d'ADN phagique de chaque clone. Le bactériophage est donc cultivé en quantité importante et son ADN isolé. L'ADNc inséré est, quant à lui, obtenu après une simple hydrolyse par l'enzyme Eco RI. L'hydrolysats peut alors être analysé en électrophorèse sur gel d'agarose et la taille de l'ADNc est déterminée. Par ailleurs, après transfert par capillarité sur membrane de nitrocellulose, il sera possible de s'assurer de la spécificité de l'hybridation avec l'ADNc de la lactotransferrine humaine.

### 2. Méthodes

Les clones à étudier sont amplifiés sur des boîtes de milieu de culture contenant de l'agarose, et les bactériophages récupérés par élution (voir p. A-24). Ils sont ensuite purifiés par un gradient de chlorure de césium et l'ADN phagique préparé selon la technique décrite par MANIATIS *et al.* (1982) (voir p. A-24). La quantité d'ADN est estimée par une mesure de l'absorbance à 260 nm. Les ADNc sont ensuite produits en hydrolysant l'ADN phagique par l'enzyme Eco RI dans les conditions décrites p. A-31. Les hydrolysats sont alors soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 0,7 % (voir p. A-28) afin d'estimer la taille des ADNc. Le gel est coloré au Bromure d'Ethidium, transféré sur membrane de nitrocellulose selon la technique de SOUTHERN (1975) (décrite p. A-29) puis soumis à une hybridation avec l'ADNc de la lactotransferrine humaine (voir p. A-30).

### 3. Résultats et discussion

Nous avons rassemblé dans le tableau XII, p. 142, tous les renseignements relatifs à la détermination des tailles des ADNc.

Comme nous pouvons le constater, plusieurs clones semblent posséder un ou plusieurs sites Eco RI internes. En confrontant le résultat de l'électrophorèse avant et après hybridation avec la sonde d'ADNc de la lactotransferrine humaine, nous pouvons avancer quelques déductions.

- Clones 1-2, 4-3, 6-1, H-1, H-2 : ils ne donnent qu'une seule bande en électrophorèse et en hybridation. Ces clones ont donc inséré un ADNc ne contenant pas de site Eco RI interne ou trop proche d'une extrémité pour qu'il soit détectable.

- Clone 3-3, 3-4, 6-2, B-1, C-2, F-1 : correspondent à des clones présentant un site interne Eco RI ou à l'insertion "tête-bêche" de 2 ADNc dans le même bactériophage. Les hydrolyses sont plus ou moins complètes d'un clone à un autre. Certaines bandes, non visualisées par coloration au BET, n'ont été caractérisées que par l'hybridation. Il n'est possible, pour aucun de ces clones de prévoir une orientation par rapport à la queue poly A car toutes les bandes sont révélées par la sonde.

- Clone C-1 : correspond au clone ayant inséré l'ADNc de la plus grande taille de tous les clones sélectionnés. L'hydrolyse totale fournit deux bandes visibles par coloration au BET de 860 et 1100 pb. Par contre, par hybridation, nous avons pu caractériser quatre bandes : 860 pb, 960 pb, 1200 pb et 2060 pb (voir Fig. 34, p. 143). Une fois encore, ceci est dû à une hydrolyse qui n'est pas à 100 % totale. Toutefois, il faut noter que la bande majeure de 1100 pb n'est pas relevée par la sonde. Nous pouvons donc déduire que, vraisemblablement, le clone C-1 possède deux sites Eco RI internes, distants de 100 pb, la totalité du clone faisant 2060 pb. La cartographie physique préliminaire de ce clone C-1 est présentée dans la

- TABLEAU XII -

DETERMINATION DE LA TAILLE DES ADNc DES CLONES SELECTIONNES

Clone	Taille des ADNc <sup>(1)</sup> (pb)	Taille des ADNc révélés par l'hybridation <sup>(2)</sup> (pb)	Taille totale estimée de l'ADNc (pb)
1-2	860	860	860
3-3	960 1150	960 1150	1150
3-4	660 780	660 780 1440	1440
4-3	1100	1100	1100
6-1	410	410	410
6-2	540	540 640	640
B-1	1100	1100 690	1100
C-1	860 1100	860 960 1200 2060	2060
C-2	1000	1000 950	1000
F-1	660 720	660 720	720
H-1	1100	1100	1100
H-2	1100	1100	1100

(1) Tailles déterminées avant hybridation.

(2) Tailles déterminées après hybridation avec l'ADNc de la lactotransferrine humaine.

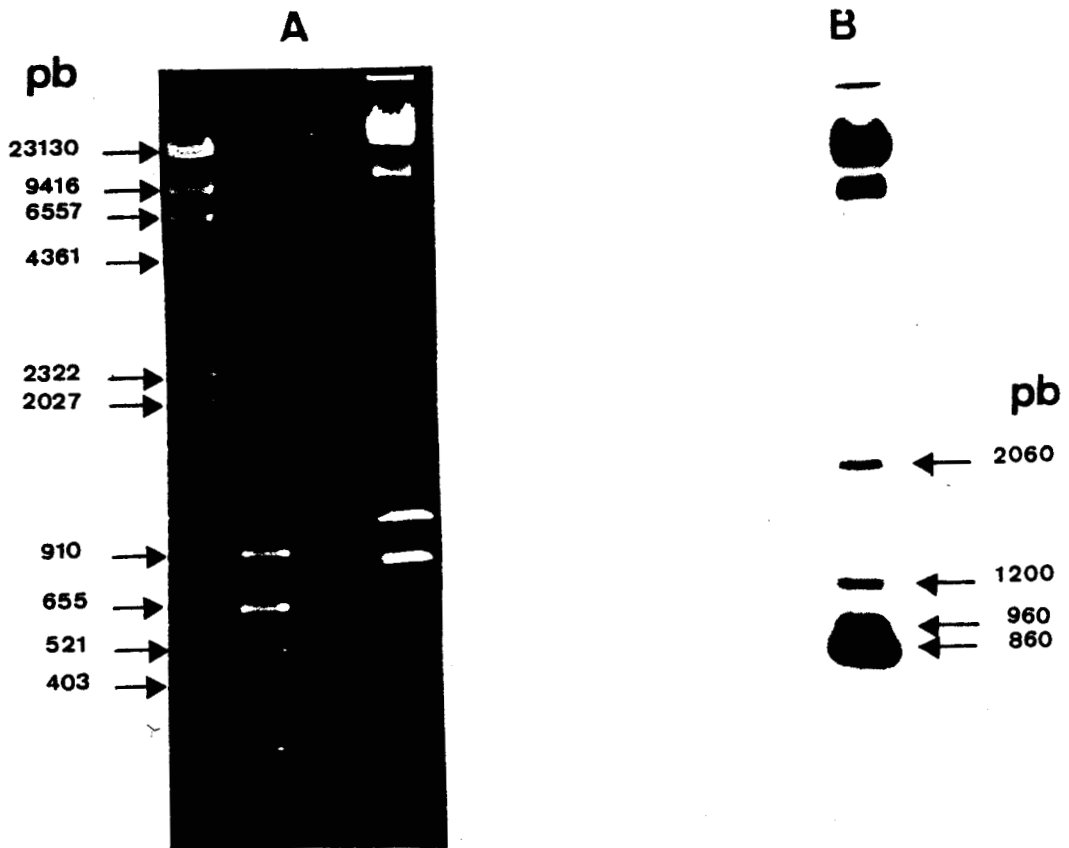


Fig. 34 : Caractérisation du clone C-1 par électrophorèse sur gel d'agarose avant hybridation (A) et après hybridation en présence de l'ADNc de la lactotransferrine humaine (B).

Fig. 35, p. 145. Ainsi, la bande de 860 pb serait située du côté de la queue poly A puisqu'elle est révélée par la sonde. Par contre, la bande de 1100 pb ne serait pas révélée puisque non couverte (ou pas suffisamment) par l'ADNc de la lactotransferrine humaine.

### C. Conclusion

Les résultats du criblage de la moitié des recombinants de la librairie "Glande Salivaire" peuvent être résumés comme suit :

- Nous avons obtenu 12 clones présentant une forte hybridation avec la sonde d'ADNc de la lactotransferrine humaine.
- Ces 12 clones ont présenté une hybridation de l'ordre du bruit de fond en présence d'un ADNc codant pour la sérotransferrine humaine.
- La taille des ADNc clonés varie de 0,4 à 2 kb. Autrement dit, nous n'avons pas encore sélectionné un ADNc complet.
- Les ADNc clonés présentent 0,1 ou 2 sites Eco RI internes selon le clone et la taille.

### V. SQUENCAGE DES ADN COMPLEMENTAIRES - DETERMINATION DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE DE LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE

Le but poursuivi étant la détermination de la structure primaire de la lactotransferrine bovine, les ADNc clonés caractérisés précédemment ont été séquencés. La technique de séquençage d'ADN que nous avons utilisée est celle mise au point en 1977 par SANGER *et al.*. Il s'agit d'une méthode de synthèse réalisée par une ADN polymérase en présence de terminateurs d'élongation de chaînes : les didésoxynucléosides triphosphates (ddNTP).

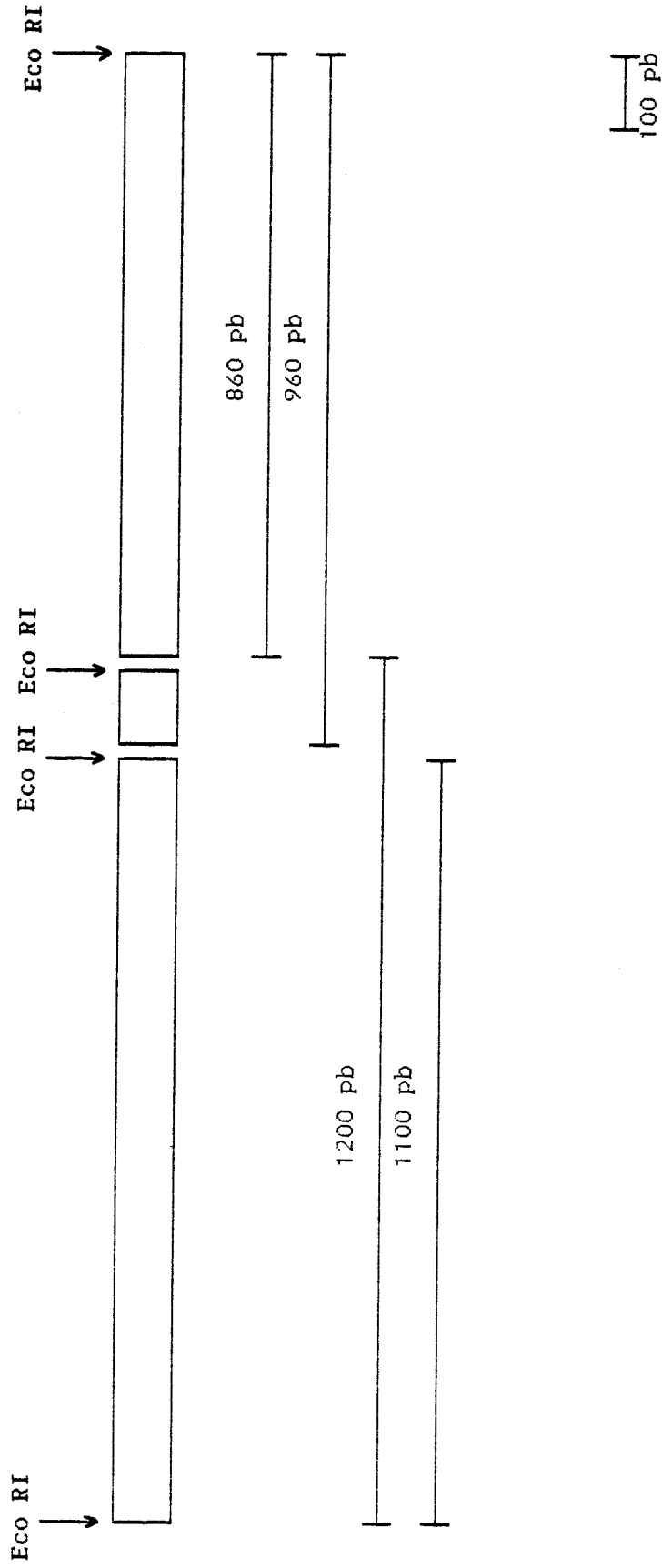


Fig. 35 : Cartographie physique préliminaire du clone C-1 de 2060 pb.



## A. Principe

La détermination de la séquence de l'ADN par la technique utilisant les didéoxynucléosides peut être divisée en deux étapes :

- une étape de sous-clonage dans un vecteur approprié : le bactériophage M13 ;
- une étape de séquençage proprement dite.

### 1. Clonage dans le bactériophage M13

Le bactériophage M13 (MESSING, 1977) est un bactériophage filamenteux ayant la particularité de présenter un stade infectieux (dans le cycle de transfection) sous forme de particule virale renfermant un ADN monocaténaire. Ces bactériophages ne poussent que sur des souches d'*Eschericia coli* "mâles" possédant un facteur F codant pour le pilus qui est le récepteur du phage. Une fois dans la bactérie, le génome phagique est répliqué et converti en un intermédiaire double brin (appelé forme répllicative RF). C'est cette forme qui est isolée pour les sous-clonages. Il est possible, à ce stade du cycle infectieux (forme RF) d'introduire une molécule d'ADN étrangère au niveau d'un site de clonage multiple généré dans l'ADN du phage M13. La molécule d'ADN de M13 recombinée pourra alors être introduite par transformation dans une bactérie compétente et propager le message sous forme d'ADN monocaténaire une fois le cycle de propagation du phage induit.

### 2. Détermination de la séquence d'un ADN cloné

Le fait de disposer d'une molécule d'ADN simple brin renfermant l'ADNc à séquencer peut être mis à profit en utilisant cette dernière comme matrice pour la synthèse d'un brin complémentaire. La synthèse de ce brin

d'ADN complémentaire commence à partir d'une courte amorce (ou "primer M13") qui est préalablement hybridée en amont de l'ADNc à séquencer. Elle est réalisée par action d'une ADN polymérase. Les enzymes les plus utilisés sont le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli*, la reverse transcriptase et la T7 ADN polymérase (Sequenase).

L'idée de SANGER *et al.* (1977) a été d'ajouter lors de l'élongation des chaînes d'ADN, des analogues de nucléotides : les didésoxynucléotides. Ces derniers ont pour effet, à chaque fois qu'ils sont incorporés, d'arrêter la synthèse. L'utilisation d'un rapport bien déterminé dNTP/ddNTP permet d'arrêter la synthèse à tous les stades de l'élongation. Les fragments d'ADN obtenus sont alors séparés sur gel d'acrylamide dénaturant permettant une résolution au nucléotide près. La séquence est alors lue, après autoradiographie, de bas en haut du gel.

## **B. Matériel et méthodes**

### **1. Clonage dans le bactériophage M13**

Pour le clonage de nos molécules d'ADNc dans le bactériophage M13, nous avons fait appel au kit de clonage M13 commercialisé par la Société Amersham.

Les ADNc à séquencer sont préparés dans les conditions décrites p. A-24. Ils sont alors purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose (voir p. A-29). Les bandes correspondant aux ADNc sont découpées et le matériel est récupéré après dissolution de l'agarose selon la méthode du kit "Gene-clean" (Bio 101) (voir p. A-28).

Toutes les étapes de clonage dans le bactériophage M13 et de préparation des matrices ont été réalisées selon les indications fournies par le revendeur (voir p. A-31 à A-34 et p. A-26).

## 2. Détermination de la séquence d'ADN

La séquence des ADNc a été déterminée en utilisant un kit de séquençage (kit "Sequenase") commercialisé par la Société U.S.B. Le mode opératoire est celui donné par le fournisseur (voir p. A-35).

### C. Résultats : Séquençage du clone C-1

Le clone que nous avons choisi de séquencer en premier lieu est le clone C-1. Ce clone possède l'ADNc de la plus grande taille - parmi les clones isolés - et présente l'avantage de générer - par la présence de deux sites Eco RI internes - trois fragments de 100, 860 et 1100 pb (voir Fig. 35, p. 145). Ces fragments peuvent facilement être clonés à l'intérieur du bactériophage M13 et n'obligent pas d'établir préalablement une cartographie de restriction du clone C-1.

Le fragment de 860 pb, fournissant une hybridation avec l'ADNc de la lactotransferrine humaine, a été séquencé intégralement. La séquence de ce fragment et sa traduction en acides aminés sont présentés dans la Fig. 36, p. 150. La stratégie ayant permis la détermination de la séquence complète de ce fragment est donnée dans la Fig. 37, p. 151.

La mise en évidence d'une queue poly A à l'une des extrémités nous a renseigné sur l'orientation du clone et sur la position du fragment 860 pb à l'intérieur de C-1. Les différentes possibilités de traduction (trois phases de lecture du brin sens et du brin complémentaire) ont été analysées. La séquence présentée dans la Fig. 36, p. 150, possède le cadre de lecture ouvert le plus long.

La traduction en acides aminés de cette séquence a été confrontée avec les séquences de lactotransferrine bovine que nous avons obtenues par l'application des méthodes chimiques et enzymatiques. La Fig. 38 présentée

p. 152, rend compte de cette comparaison et de l'alignement de cette séquence avec la séquence totale de la lactotransferrine humaine. Comme nous pouvons le constater, la séquence peptidique déterminée par le clonage est à deux résidus près (résidus 509 et 678 selon la numérotation de la lactotransferrine humaine) 100 % homologue avec les séquences de la lactotransferrine bovine déterminées chimiquement. Quant à l'homologie avec la séquence de la lactotransferrine humaine, elle est de l'ordre de 75 %. Ces résultats montrent donc sans ambiguïté, que le fragment de 860 pb du clone C-1 code bien pour une séquence de lactotransferrine bovine. Quant aux fragments de 100 et 1100 pb, complétant le clone C-1, leur étude est actuellement en cours.

#### CONCLUSION

En résumé de notre étude sur le clonage de la lactotransferrine bovine, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- Parmi les tissus qui ont été étudiés, trois ont fourni un signal d'hybridation en présence d'une sonde d'ADNc de la lactotransferrine humaine. Il s'agit de la glande sous-maxillaire, du pis et de l'endomètre.
- Deux librairies d'ADNc ont été construites à partir des ARNm poly A isolés de la glande sous-maxillaire et de l'endomètre.
- La librairie d'ADNc de la glande sous-maxillaire a été criblée à l'aide de la sonde d'ADNc de la lactotransferrine humaine (et ce pour la moitié des recombinants). Ce criblage nous a permis d'isoler 12 clones positifs renfermant des ADNc de tailles variant de 0,4 à 2 kb.

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100																												
TTT	AGT	CAG	AGC	IGT	GCC	CCT	GGG	CGT	GAC	CGG	AAA	TCC	AGA	CTC	IGT	GCC	TTG	TGT	GCT	GGC	BAT	GAC	CAG	GGC	CTG	GAC	AAG	TGT	GTG	CCC	AAAC	TCT	AAG	GAG	AAG		
Phe	Ser	Gln	Ser	Cys	Ala	Pro	Gly	Arg	Asp	Pro	Lys	Ser	Arg	Leu	Cys	Ala	Leu	Cys	Ala	Gly	Asp	Asp	Gln	Gly	Leu	Asp	Lys	Cys	Val	Pro	Asn	Ser	Lys	Glu	Lys		
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210																											
TAC	TAT	GCC	TAT	ACC	GGG	GCT	TTC	AGG	TGC	CTG	GCT	GAG	GAC	GTT	GGG	GAC	GTT	GCC	TTT	GTG	AAA	AAC	GAC	ACA	GTC	TGG	GAG	AAC	ACG	AAT	GGA	GAG	AGC	ACT	GCA		
Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ala	Phe	Arg	Arg	Cys	Leu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Asp	Val	Ala	Phe	Val	Lys	Asn	Asp	Thr	Val	Trp	Glu	Asn	Thr	Asn	Gly	Glu	Ser	Thr	Ala	
220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320																											
GAC	TGG	GCT	AAG	AAC	TTG	AAT	CGT	GAG	GAC	TTC	AGG	TTG	CTC	TGC	CTC	GAT	GGC	ACC	AGG	AAG	CCT	GTG	ACG	GAG	GCT	CAG	AGC	TGC	CAC	CTG	GCG	GTC	GCC	CCG	AAT		
Asp	Trp	Ala	Lys	Asn	Leu	Asn	Arg	Glu	Asp	Phe	Arg	Leu	Leu	Cys	Leu	Asp	Gly	Thr	Arg	Lys	Pro	Val	Thr	Glu	Ala	Gln	Ser	Cys	His	Leu	Ala	Val	Ala	Pro	Asn		
330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430																											
CAC	GCT	GTG	GTG	TCT	CGG	ABC	GAT	AGG	GCA	GCA	CAC	GTG	AAA	CAG	GTG	CTC	CTC	CAC	CAG	CAG	GCT	CTG	TTT	GGG	AAA	AAT	GGA	AAA	AAC	TGC	CCG	GAC	AAG	TTT	TGT		
His	Ala	Val	Val	Ser	Arg	Ser	Arg	Ser	Asp	Arg	Ala	Ala	His	Val	Lys	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Phe	Gln	Gln	Lys	Asn	Gly	Lys	Asn	Cys	Pro	Asp	Lys	Phe	Cys
440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540																											
TTG	TTC	AAA	TCT	GAA	ACC	AAA	AAC	CTT	CTG	TTC	AAT	GAC	AAC	ACT	GAG	TGT	CTG	GCC	AAA	CTT	GGG	AGA	CCA	ACA	CCS	TAT	GAA	GAA	TAT	TTG	GGG	ACA	GAG	TAT	GTC		
Leu	Phe	Lys	Ser	Glu	Thr	Lys	Asn	Leu	Leu	Phe	Asn	Asp	Asn	Thr	Glu	Cys	Leu	Ala	Lys	Leu	Gly	Arg	Pro	Thr	Tyr	Glu	Glu	Tyr	Leu	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val			
550	560	570	580	590	600	610	620	630	640																												
ACG	GCC	ATT	GCC	AAC	CTG	AAA	TGC	TCA	ACC	TCC	CCG	CTT	CTG	GAA	GCC	TGC	GCC	TTC	CTG	ACG	AGG	TAA	AGC	CTG	CAA	AGA	AGC	TAG	CCT	GCC	TCC	CTG	GGC	CTC			
Thr	Ala	Ile	Ala	Asn	Leu	Lys	Cys	Ser	Thr	Ser	Pro	Leu	Leu	Glu	Ala	Cys	Ala	Phe	Leu	Thr	Arg																
650	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750																											
AGC	TCC	TCC	CTG	CTC	TCA	GCC	CCA	ATC	TCC	AGG	CGC	GAG	GGG	CCT	TCC	TCT	CCC	TTC	CTG	AAG	TGC	GAT	TTT	TGC	CAA	GCT	CAT	CAG	TAT	TTA	CAA	TTC	CCT	GCT	GTC		
ATT	TTA	GCA	AGA	AAT	AAA	ATT	AGA	AAT	GCT	GTT	GAT	TTT	CAT	TCC	CTA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA
760	770	780	790	800	810	820	830																														

Fig. 36 : Détermination de la séquence nucléotidique du fragment de 860 pb du clone C-1.  
La traduction en acides aminés correspond au cadre de lecture ouvert le plus long.

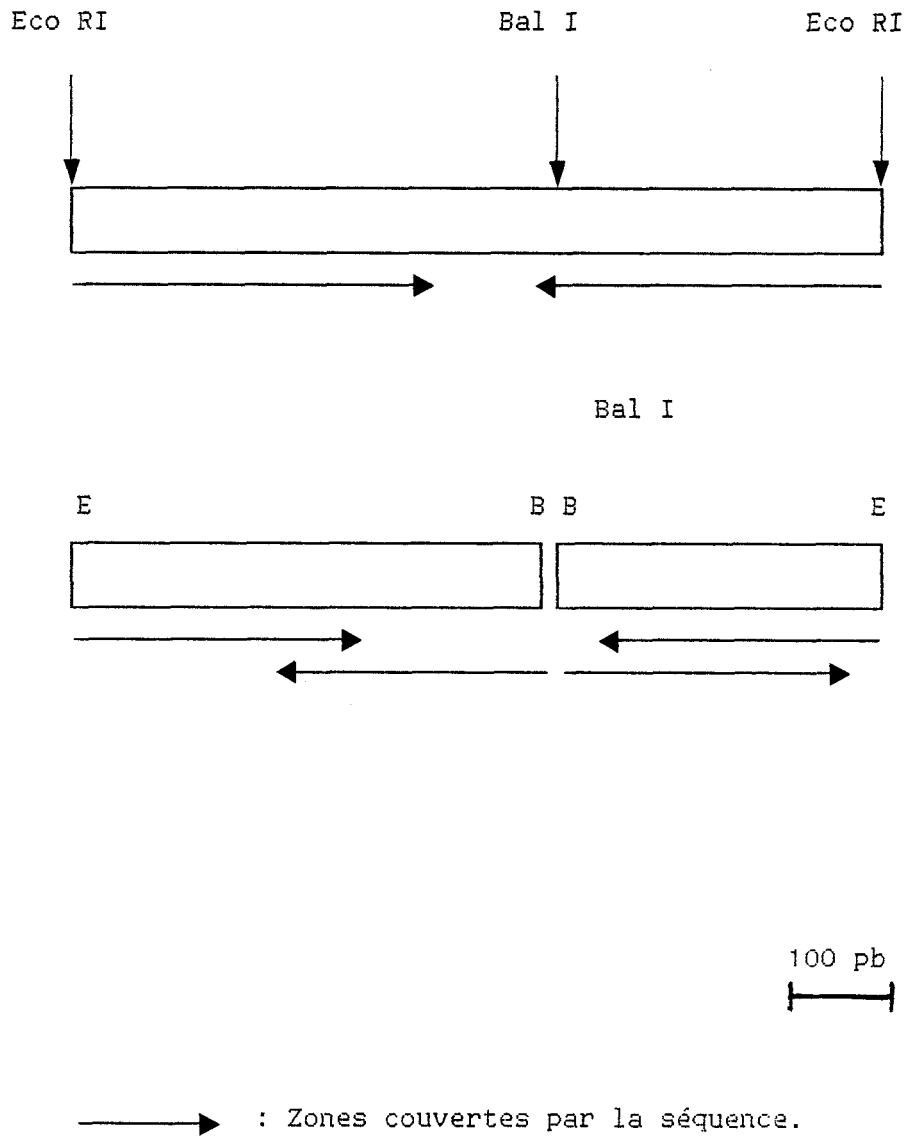


Fig. 37 : Stratégie de séquençage du fragment 860 pb du clone C-1.



Fig. 38 : Alignement des séquences peptidiques partielles de la lactotransferrine bovine déterminées par clonage [LTFb (1)] et par les méthodes chimiques [LTFb (2)] avec la séquence peptidique correspondante de la lactotransferrine humaine [LTFh].

- Le clone le plus important en taille (clone C-1) a été séquencé sur 860 pb. La traduction en acides aminés de cette séquence nucléotidique, confrontée avec nos séquences peptidiques de la lactotransferrine bovine et avec la séquence de la lactotransferrine humaine, a permis de montrer qu'il s'agissait bien de la lactotransferrine bovine.

Nous avons donc atteint notre but qui était de cloner l'ADNc de la lactotransferrine bovine. L'étude n'est cependant pas terminée puisqu'il reste plus des 2/3 de la molécule à séquencer.

Par ailleurs, la séquence que nous avons obtenue correspond à celle de la lactotransferrine synthétisée par la glande sous-maxillaire. Nous devons donc maintenant apporter la preuve que la lactotransferrine est le produit de l'expression d'un ARN messager unique pour que la séquence que nous avons obtenue soit conforme à celle de la lactotransferrine isolée du lait de Vache.



## **Conclusion Générale**

## CONCLUSION GENERALE

Les conclusions que nous pouvons tirer de notre travail, qui a consisté à déterminer la structure primaire partielle de la lactotransferrine de Vache, peuvent être résumées de la manière suivante :

1. L'hydrolyse trypsique ménagée de la lactotransferrine saturée en fer a permis l'isolement de 3 fragments de nature glycopeptidique de 52, 45 et 30 kDa. La détermination des séquences N-terminales de ces fragments et leur alignement avec la structure primaire de la lactotransferrine humaine a montré que les fragments 52 et 45 kDa correspondaient à deux formes plus ou moins importantes du fragment C-terminal de la lactotransferrine. Ces derniers sont analogues, respectivement, aux fragments C- trypsique et C-pepsique de la lactotransferrine humaine, caractérisés par LEGRAND *et al.* (1984, 1987). Quant au fragment de 30 kDa, il correspond au fragment N-terminal et est analogue au fragment N-trypsique de la lactotransferrine humaine.
2. Une seconde hydrolyse trypsique du fragment N-terminal (30 kDa) resaturé en fer a conduit à l'isolement d'un glycopeptide de 20 kDa dont la séquence N-terminale s'aligne sur celle du glycopeptide N-2 de la lactotransferrine humaine, caractérisée par LEGRAND *et al.* (1984). L'étude particulière de ce fragment a permis de montrer qu'il portait l'unique glycanne de nature oligomannosidique du fragment N-terminal de la lactotransferrine bovine. Par ailleurs, ce glycopeptide de 20 kDa est capable, tout comme le glycopeptide N-2 de la lactotransferrine humaine, de fixer réversiblement un atome

de fer par molécule. La présence du glycanne est, de plus, nécessaire à la fixation du métal.

3. L'hydrolyse chimique du fragment C-terminal (45 kDa) par le bromure de cyanogène génère deux coupures : une coupure spécifique après un résidu de méthionine (position 485 selon la numérotation de la lactotransferrine humaine) et une coupure non-spécifique au niveau d'une séquence Asp-Pro (positions 510-511). Ces deux coupures ont permis d'isoler 3 fragments porteurs chacun d'un glycanne.
4. L'étude de la composition molaire en monosaccharides des glycanes présents sur les 3 fragments BrCN a permis de montrer que la nature des structures glycaniques n'était pas identique sur chaque site de glycosylation. Ainsi, un premier glycanne, porté par le résidu d'Asn n° 467 (selon la numérotation de la lactotransferrine humaine) renferme dans un rapport 3:1 des structures de type oligomannosidique et N-acétyllactosaminique, alors que le second et le troisième sites de glycosylation, correspondant aux résidus d'Asn n° 490 et 559 portent, respectivement, des glycanes de types N-acétyllactosaminique et oligomannosidique.
5. La détermination de la séquence N-terminale des différents fragments et peptides que nous avons isolés, a été à l'origine de la connaissance de la séquence de 229 acides aminés de la chaîne polypeptidique de la lactotransferrine de Vache.
6. La poursuite de la détermination de la séquence peptidique de la lactotransferrine bovine a été réalisée par le clonage et le séquençage d'un ADN complémentaire. Les résultats que nous avons obtenus sont les suivants :
  - Plusieurs tissus ont été testés pour leur capacité à produire un ARN messenger spécifique de la lactotransferrine bovine. Deux tissus ont présentés un signal d'hybridation positive en présence

d'une sonde d'ADNc de la lactotransferrine humaine : il s'agit de la glande sous-maxillaire et de l'endomètre de Vache soumis à une stimulation par les oestrogènes. Deux bibliothèques d'ADNc ont été construites à partir d'ARNm poly A+ isolés de ces tissus.

- Le criblage de la bibliothèque d'ADNc de la glande sous-maxillaire a fourni 12 clones positifs renfermant des ADNc de tailles variant de 0,4 à 2 kb.
- Le séquençage de 860 pb du clone le plus important (clone C-1 de 2 kb) a permis de montrer que la traduction en acides aminés de ce dernier correspondait bien à une séquence de la lactotransferrine bovine. La séquence nucléotidique représente une partie non codante de 192 nucléotides, et une partie codante de 606 nucléotides correspondant aux 202 acides aminés C-terminaux de la lactotransferrine bovine. Cette séquence peptidique est conforme aux séquences partielles déterminées chimiquement et présente une homologie de 75 % avec la séquence peptidique de la lactotransferrine humaine.
- En résumé, l'application conjointe des deux méthodes utilisées pour la détermination de la structure primaire de la lactotransferrine bovine porte donc, à ce jour, à 338 le nombre d'acides aminés connus de la molécule - soit environ la moitié -. Ces résultats ont été récapitulés dans la Figure 39, p. 157.

Les travaux que nous avons réalisés jusqu'alors n'ont malheureusement pas conduit à l'élucidation complète de la structure primaire de la lactotransferrine bovine. Toutefois, les méthodes d'isolement des différents fragments que nous possédons et le clonage d'un ADNc de la lactotransferrine bovine devrait, dans un avenir proche, permettre de déterminer la structure primaire entière de la lactotransferrine de Vache.

1 10 20 30 40 50 60  
 LTH : G R R R R R S V Q W C A V S Q P E A T K C F Q W Q R N N R K V R G P P V S C 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  
 LTB(1):  
 LTB(2): A P R K N V R W C T I S Q P E W F K C R R ? Q ? R

70 80 90 100 110 120  
 LTH : 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 Y Y A V A V V K K G G S F Q L N E L Q G L K S C H T G L R T A G W N V P  
 LTB(1):  
 LTB(2): E S P Q T H Y Y A V A V V K K G G N

130 140 150 160 170 180 190  
 LTH : I G T L R P F L N W T G P P E P I E A A V R F F S A S C V P G A D K G Q F P 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  
 LTB(1):  
 LTB(2):

200 210 220 230 240 250  
 LTH : G A F K C L R D G A G 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 K P V D K F K D C H L A R V P S H A V V A  
 LTB(1):  
 LTB(2):

260 270 280 290 300 310 320  
 LTH : R S V N G K E D A I W N L L R Q A Q 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 P R I D S G L Y L G  
 LTB(1):  
 LTB(2): S F Q L F G S P P G Q R D L L F K D S A L G F L R I P P K T D ? I L Y L G

330 340 350 360 370 380  
 LTH : S G Y F T A I Q N L R K S E E E V A A R R A R V V W C A V G E Q E L R K C N Q W S G L S Q G S V T C W S A S T T E D C I A L V L  
 LTB(1):  
 LTB(2): S T Y T R V V W C A V G P E E Q K K C Q Q W S Q Q S G Q ? V T C W S A S T T D D

390 400 410 420 430 440  
 LTH : K G E A N A S V L M (D,S,E,G,G,F) L A R M S L D G G Y V Y T A G K C G L V P V L A E N Y K S Q Q S S D P D P N C V D R P V E G Y L  
 LTB(1):  
 LTB(2):

450 460 470 480 490 500 510  
 LTH : A V A V V 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 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  
 LTB(1):  
 LTB(2): G L I V ? Q T G S C A F D E F F S Q S C A P G A D P K

520 530 540 550 560 570  
 LTH : S 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 D V A F V K D V T V L Q N T V G N N N E A W A K  
 LTB(1): S R L C A L C A G D D Q G L D K C V P N S K E K Y Y G Y T G A F R C L A E D V G D V A F V K N D T V W E N T N G E S T A D W A K  
 LTB(2): S R L C A L C A G D D Q G L D K C V P N S K E K Y Y G Y T G A F R C L A E

580 590 600 610 620 630 640  
 LTH : D L K L A D F A L L C L D G K R 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 K F G R N G S D C P  
 LTB(1): N L N R E D F R L L C L D G T R K P V T E A Q S C H L A V A P N H A V V S R S D R A A H V K Q V L L H Q Q A L F G K N G K N C P  
 LTB(2): K P V T E A Q S C H L A V A P N H A V V S R

650 660 670 680 690 700  
 LTH : D K F C L F Q S E T K N L L F N D N T E C L A R L H 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 P L L E A C E F L R K  
 LTB(1): D K F C L F K S E T K N L L F N D N T E C L A K L G G R P T Y E G Y L G T A Y V T A I A N L K K C S T S P L L E A C A F L T R  
 LTB(2): L G G R P T Y E E Y L G T E Y V T A I A N L K

Fig. 39 : Récapitulatif des séquences peptidiques déterminées par clonage [LTB (1)] et chimiquement [LTB (2)] - Alignement avec la séquence totale de la lactotransferrine humaine (LTH). (METZ-BOUTIGUE *et al.*, 1984).

A plus long terme, il serait intéressant de poursuivre l'étude de la lactotransferrine de Vache par la définition de sa structure tridimensionnelle. En effet, cette dernière serait peut-être en mesure d'expliquer pourquoi la lactotransferrine de Vache semble glycosylée sur tous ses sites de glycosylation alors que la lactotransferrine humaine ne possède que 2 glycanes bien que 4 sites soient présents sur la molécule. Enfin, le clonage d'un ADNc codant pour la lactotransferrine bovine ouvre la porte au clonage du gène, et à l'étude des mécanismes impliqués dans la régulation de son expression au niveau des différents tissus renfermant la lactotransferrine.

## Bibliographie

- ABOLA J.E. et WOOD M.K. (1979) In Abstracts of 4th International Conference on Proteins of Iron Metabolism - Davos
- ADRIAN G.S., KORINEK B.W., BOWMAN B.H. et YANG F. (1986) *Gene*, 49, 167-175
- AISEN P. et BROWN E.B. (1977) *Semin. Haematol.*, 14, 31-53
- AISEN P. et LEIBMAN A. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, 257, 314-323
- AISEN P. et LISTOWSKY I. (1980) *Ann. Rev. Biochem.*, 49, 357-393
- ALDRED A.R., HOWLETT G.J. et SCHREIBER G. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122, 960-965
- 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
- ANDERSON B.F., BAKER H.M., DODSON E.J., NORRIS G.E., RUMBALL S.V., WATERS J. M. et BAKER E.N. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 1769-1773
- ARNOLD R.R., RUSSEL J.E., CHAMPION W.J., BREWER M. et GAUTHIER J.J. (1982) *Infect. Immunity*, 35, 792-799
- BAILEY J., EVANS R.W., GARRAT R.C., GORINSKY B., HASNAIN S., HORSBURGH C., JHOTI H., LINDLEY P.F., MYDIN A., SARRA R. et WATSON J.L. (1988) *Biochem.*, 27, 5804-5812
- BAKER E.N. et RUMBALL S.V. (1977) *J. Mol. Biol.*, 111, 207-210
- BAKER E.N., RUMBALL S.V. et ANDERSON B.F. (1987) *Trends Biochem. Sci.* 12, 350-353
- BARKAN G. (1927) *Z. Physiol. Chem.*, 171, 194
- BLANC B. (1981) *Wld Rev. Nutr. Diet.*, 36, 1-89
- 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
- BRINES R.D. et BROCK J.H. (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, 759, 229-235
- BROCK J.H. (1985) in "Metalloproteins Part. 2 : Metal proteins with non-redox roles". (P. Harrison ed.) - *Topics in Molecular and Structural Biology*, pp. 183-261
- BROCK J.H., ARZABE F., LAMPREAVE F., PINEIRO A. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 446, 214-225
- BROWN J.P., HEWICK R.M., HELLSTROM I., HELLSTROM K.E., DOOLITTLE R.F. et DREYER W.J. (1982) *Nature*, 296, 171-173
- BROXMEYER H.E., JULIANO L., WAHEED A. et SHADDUCK R.K. (1985) *J. Immunol.*, 135, 3224-3231
- BULLEN J.J., ROGERS H.J., LEIGH L. (1972) *Brit. Med. J.*, 1, 69-75



- CARRANO C.J. et RAYMOND K.N. (1979) J. Amer. Soc., 101, 5401-5404
- CASTELLINO F.J., FISH W.W., MANN K.G. (1970) J. Biol. Chem., 245, 4269-4275
- CHEN L.H. et BISSELL M.J. (1987) J. Biol. Chem., 262, 17247-17250
- CHERON A. (1975) Thèse de Doctorat ès Sciences - Lille
- COCHET M., GANNON F., HEN R., MAROTEAUX L., PERRIN F. et CHAMBON P. (1979) Nature, 282, 567-574
- CODDEVILLE (B.) (1986) Thèse de Doctorat de l'Université de Lille
- COLMAN A. et MORSER J. (1979) Cell, 17, 517
- CONRAD M.E. (1987) in "Physiology of the Gastrointestinal Tract", 2<sup>nd</sup> ed., (Johnson L.R. ed.) pp. 1437-1453, Raven Press, New York
- COX T.M., MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J. et PETERS T.F. (1979) Biochim. Biophys. Acta, 588, 120-128
- CRICHTON R.R. et CHARLOTEAUX-WAUTERS M. (1987) Eur. J. Biochem., 164, 485-506
- DERISBOURG P. (1987) D.E.A. - Lille
- DE SOUSA M. (1978) Symp. Soc. Exp. Biol., 32, 393-409
- DIAMOND A., COOPER G.M., RITZ J. et LANE M.A. (1983) Nature, 305, 112-116
- DIAMOND A., DEVINE J.M. et COOPER G.M. (1984) Science, 225, 516-519
- DUBOIS M., GILLE K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. et SMITH F. (1956) Anal. Biochem., 28, 350
- FORTH W. et RUMMEL W. (1973) Physiol. Rev., 53, 746-753
- GLOVER D.M. (1985) Practical Approach Series, IRL Press, Oxford
- GORINSKY B., HORSBURGH C., LINDLEY P.F., MOSS D.S., PARKAV M. et WATSON J.C. (1979) Nature, 281, 157-158
- GOUBIN G., GOLDMAN D.S., LUCE J., NEIMAN P.E. et COOPER G.M. (1983) Nature, 302, 114-119
- GROVES M.L. (1960) J. Amer. Chem. Soc., 82, 3345-3350
- GUBLER U. et HOFFMAN B.J. (1983) Gene, 25, 263-269
- HAMES B.D. et HIGGINS S.J. (1985) Practical Approach Series, IRL Press, Oxford
- HAMES B.D. et HIGGINS S.J. (1986) Practical Approach Series, IRL Press, Oxford
- HASHIZUME S., KURODA K. et MURAKAMI H. (1983) Biochim. Biophys. Acta, 763, 377-382
- HERSHKO P. (1977) Haematol., 10, 105-148

- HEUSTERSPREUTE M. et CRICHTON R.R. (1981) FEBS Lett., 129, 322-327
- HEYLAR L. et SHERMAN A.R. (1987) Am. J. Clin. Nutr., 46, 346-352
- HORWITZ D.A., BAKKE A.C., ABO W. et NISHIYA K. (1984) J. Immunol., 132, 2370-2374
- HU W.L., MAZURIER J., SAWATZKI G., MONTREUIL J. et SPIK G. (1987) Biochem. J., 249, 435-441
- HUEBERS H.A., HUEBERS E., CSIBA E. RUMMEL W. et FINCH C.A. (1983) Blood, 61, 283-290
- HUEBERS H.A., HUEBERS E., FINCH C.A. et MARTIN A.W. (1982) J. Comp. Physiol. 148, 101-109
- HUGGENVIK J.I. IDZERDA R.L., HAYWOOD L., LEE D.C., MAC KNIGHT G.S. et GRISWOLD M. D. (1987) Endocrinology, 120, 332-340
- HUYNH T.V., YOUNG R.A. et DAVIS R.W. in "DNA cloning. Vol. I - A practical approach" pp. 49-78, D. M. Glover ed., IRL Press, Oxford
- JELTSCH J.M. (1982) Thèse de Doctorat ès Sciences - Strasbourg
- JELTSCH J.M. et CHAMBON P. (1982) Eur. J. Biochem., 122, 291-295
- JOLLES J., DONDA A., AMIGUET P. et JOLLES P. (1984) FEBS Lett., 176, 185-188
- JOLLES J., MAZURIER J., BOUTIGUE M.H., SPIK G., MONTREUIL J. et JOLLES P. (1976) FEBS Lett., 69, 27-31
- KAMPSCHMIDT R.F. et PULLIAM L.A. (1975) Res. J. Reticuloendoth. Soc., 17, 162-169
- KARIN M., HASLINGER A., HOLTGREVE H., RICHARDS R.I., KRAUTER P., WESTPHAL H. M. et BEATO M. (1984) Nature, 308, 513-519
- KIRKPATRICK C.H., GREEN J., RICH R.R. et SCHADE A.L. (1971) J. Infect. Dis., 124, 539-544
- LANE R.S. (1976) in "Structure and function of plasma proteins" (A.C. Allison, ed.) 2, pp. 53-78
- LAURELL C.B. et INGELMAN B. (1947) Acta. Chem. Scand., 1, 770
- LECLERCQ Y., SAWATZKI G., WIERUSZESKI J.M., MONTREUIL J. et SPIK G. (1987) Biochem. J., 247, 571-578
- LEE D.C., MAC KNIGHT G.S. et PALMITER R.D. (1978) J. Biol. Chem., 253, 3494-3503
- LEE D.C., MAC KNIGHT G.S. et PALMITER R.D. (1980) J. Biol. Chem., 255, 1442-1450
- LEFELL M.S. et SPITZNAGEL J.K. (1972) Infect. Immunity, 12, 813-820
- LEGRAND D. (1987) Thèse de Doctorat de l'Université de Lille

- LEGRAND D., MAZURIER J., AUBERT J.P., LOUCHEUX-LEFEBVRE M.H., MONTREUIL J. et SPIK G. (1986) *Biochem. J.*, 236, 839-844
- LEGRAND D., MAZURIER J., METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., JOLLES P., MONTREUIL J. et SPIK G. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*, 787, 90-96
- LEGRAND D., MAZURIER J. MONTREUIL J. et SPIK G (1988) *Biochimie* 70, 1185-1195
- LINE W.F., SLY D.A. et BEZKOROVAINY A. (1976) *Int. J. Biochem.*, 7, 203-208
- LUCERO M.A., SCHAEFFER E., COHEN G.N. et ZAKIN M.M. (1986) *Nucl. Acids Res.*, 14, 8692
- MAC GILLIVRAY R.T.A. et BREW K. (1975) *Science*, 190, 1306-1307
- 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
- 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
- MAC GILLIVRAY R.T.A., MENDEZ E., SINHA C.K., SUTTON M.R., LINEBACK-ZINS J. et BREW K. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 2504-2508
- MAC KNIGHT G.S., HAMMER R.F., KUENZEL E.A. et BRINSTER R.L. (1983) *Cell*, 34, 335-341
- MAC KNIGHT G.S., LEE D.C., HEMMAPLARDH D., FINCH C.A. et PALMITER R.D. (1980 a) *J. Biol. Chem.*, 255, 144-147
- MAC KNIGHT G.S., LEE D.C., HEMMAPLARDH D., FINCH C.A. et PALMITER R.D. (1980 b) *J. Biol. Chem.*, 255, 148-153
- MALLET A.M., PLANTEY M.C. (1977) D.E.A - Lille
- MANIATIS T., FRITSCH E.F. et SAMBROOK J. (1982) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- MARX J.J.M., LIGDEUR M.C., GEERTSEMA J. et SCHUURMAN H.J. (1984) Abstract of the Iron Club Meeting, Rennes, France
- MASSON P.L. (1970) "La Lactoferrine", Collection Médico Monographies d'Agrégés, (S.A. Arscia Eds.), Bruxelles - pp.93
- MASSON P.L., HEREMANS J.F. (1966) in "Protids of Biological Fluids, vol. 14, pp. 115-142, H. Peters Ed., Elsevier, Amsterdam
- MASSON P.L., HEREMANS J.F. et SCHONNE E. (1969) *J. Exp. Med.*, 130, 643-658
- MATSUMOTO A., YOSHIMA H., TAKASAKI S. et KOBATA A. (1982) *Biochem. J.*, 91, 143-152
- MAZURIER J., LEGER D., TORDERA V., MONTREUIL J. et SPIK G. (1981) *Eur. J. Biochem.*, 119, 537-543

- MAZURIER J., LEGRAND D., HU W.L., MONTREUIL J. et SPIK G. (1989) Eur. J. Biochem., 179, 481-487
- MAZURIER J., LHOSTE J.M., MONTREUIL J. et SPIK G. (1983) Biochim. Biophys. Acta, 745, 44-49
- MAZURIER J., METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., SPIK G., MONTREUIL J. et JOLLES P. (1983) Experientia, 39, 135-141
- MAZURIER J., MONTREUIL J. et SPIK G. (1985) Biochim. Biophys. Acta, 821, 453-460
- MAZURIER J. et SPIK G. (1980) Biochim. Biophys. Acta, 629, 399-408
- MAZURIER J., SPIK G. et MONTREUIL J. (1974) FEBS Lett., 48, 262-265
- MEINKOTH J. et WAHL G. (1984) Anal. Biochem., 138, 267-284
- MESSING J., GRONENBORN B. MULLER-HILL B. et HOFSCHEIDER P. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 3642-3646
- METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J. et JOLLES P. (1978) Biochimie, 60, 557-561
- METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., JOLLES P., MAZURIER J., SPIK G. et MONTREUIL J. (1980) Biochim. Biophys. Acta, 622, 308-314
- METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J. et JOLLES P. (1981) FEBS Lett., 132, 239-242
- METZ-BOUTIGUE M.H., MAZURIER J., JOLLES J., SPIK G., MONTREUIL J. et JOLLES P. (1981) Biophys. Biochim. Acta, 670, 243-254
- METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J. et JOLLES P. (1982) FEBS Lett., 142, 107-110
- METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., MAZURIER J., SCHOENTGEN F., LEGRAND D., SPIK G., MONTREUIL J. et JOLLES P. (1984) Eur. J. Biochem., 145, 659-676
- MONTREUIL J., MAZURIER J., LEGRAND D et SPIK G. (1985) in "Proteins of iron storage and transport", pp. 25-38, Spik *et al.* ed., Elsevier, Amsterdam
- MONTREUIL J. et MULLET S. (1960) C.R. Acad. Sci. Paris, 250, 1736-1737
- MONTREUIL J., TONNELAT J. et MULLET S. (1960) Biochim. Biophys. Acta, 45, 413-421
- MORGAN E.H. (1975) Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci., 60, 233-247
- MORGAN E.H. (1983) In "Synthesis and secretion of transferrin" - Glauman (H.), Peters Jr. T. and Redman C. Eds. ; Plasma Protein Secretion by the Liver, Academic Press, London
- MORRISON M. et ALLEN P.Z. (1965) Arch. Biochem. Biophys., 111, 126-133
- MULLER-EBERHARD U., LIEM H.H., GRASSO J.A., GRIFFHORN-KATZ S., DEFALCO M.G. et KATZ N.R. (1988) J. Biol. Chem., 263, 14753-14756

- NAYLOR S.L., ELLIOT R.W. BROWN J.A. et SHOWS T.B. (1986) Am. J. Hum. Genet., 34, 235-244
- NORRIS G.E., ANDERSON B.F., BAKER E.N., BAKER H.M., GARTNER A.L., WARD J. et RUMBALL S.V. (1986) J. Mol. Biol., 191, 143-145
- OGDEN A.L., MORTON J.R., GILMOUR D.G. et Mc DERMID E.M. (1962) Nature, 195, 1026-1028
- OKAYAMA H. et BERG P. (1982) Mol. Cell. Biol., 2, 161-170
- OPPENHEIM J.J., KOVACS E.J., MATSUSHIMA K. et DURUM S.K. (1986) Immunology Today, 7 45-56
- ORAM J.D. et REITER B. (1968) Biochim. Biophys. Acta, 170, 351-365
- OSBORNE T.B.J. (1899) J. Am. Chem. Soc., 21, 477
- PALMITER R.D. (1972) J. Biol. Chem., 247, 6459-6461
- PARK I., SCHAEFFER E., SIDOLI A., BARALLE F.E., COHEN G.N. et ZAKIN M. M. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 3149-3153
- PEKAREK R.S., BOSTIAN K.A., BARTELONY P.J., CALIA F.M. et BEISEL W.R. (1969) Amer.J. Med. Sci., 258, 14-25
- PENTECOST B.T. et TENG C.T. (1987) J. Biol. Chem., 262, 10134-10139
- PERRAUDIN J.P., PRIEELS J.P. (1982) Biochim. Biophys. Acta, 718, 42-48
- RADO T.A., BOLLEKENS J., ST. LAURENT G., PARKER L. et BENZ E.J.Jr. (1984) Blood, 64, 1103-11094
- RADO T.A., WEI X. et BENZ E.J.Jr. (1987) Blood, 70, 989-993
- REITER B., BROCK J.H., STEEL E.D. (1975) Immunology, 28, 83-95
- ROSE T.M., PLOWMAN G.D., TELOW D.B., DREYER W.J., HELLSTROM K.E. et BROWN J.P. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 1261-1265
- SANGER F., NICKLEN S. et COULSON A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467
- SARGENT T.D., YANG M. et BONNER J. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 243-246
- SCHADE A. et CAROLINE L. (1944) Science, 100, 14
- SCHADE A. et CAROLINE L. (1946) Science, 104, 340-341
- SCHAEFFER E., BRUNEL F., BOISSIER F., COHEN G.N. et ZAKIN M.M. (1987 b) in Abstract of 8<sup>th</sup> International Conference on Proteins of Iron Transport and Storage, Québec, Canada
- SCHAEFFER E., LUCERO M.A., JELTSCH J.M., PY M.C. LEVIN M.J., CHAMBON P., COHEN G. N. et ZAKIN M.M. (1987 a) Gene, 56, 109-116

- SEARLE P.F., STUART G.W. et PALMITER R.D. (1985) Mol. Cell. Biol., 5, 1480-1489
- SELIGMAN P.A., BUTLER C.D., MASSEY E.J., KAUR J.A., BROWN J.P., PLOWMAN G.D. MILLER Y. et JONES C. (1986) Am. J. Hum. Genet., 38, 540-548
- SIIMES M.A., VVORI E. et KUITUNEN P. (1979) Acta Pediatr. Scand., 68, 29-31
- SORENSEN L. et SORENSENS.P.L. (1939) C.R. Travaux Lab. Calberg Ser. Chim., 23, 55
- SOUTHERN E.M. (1975) J. Mol. Biol., 98, 503-517
- SPIK G. (1971) Ann. Nutr. Alim., 25, A81-A134
- SPIK G., BRUNET B., MAZURIER-DEHAINE C., FONTAINE G. et MONTREUIL J. (1982) Acta.Pediatr., 71, 979-985
- SPIK G., CHERON A., MONTREUIL J. et DOLBY J.M. (1978) Immunology, 35, 663-671
- SPIK G., CODDEVILLE B. et MONTREUIL J. (1988) Biochimie, 70, 1459-1469
- SPIK G., CODDEVILLE B., LEGRAND D., MAZURIER J., LEGER D., GOAVEC M. et MONTREUIL J. (1985) in "Proteins of iron storage and transport", pp. 47-52, Spik et al. ed., Elsevier, Amsterdam
- SPIK G. et MONTREUIL J. (1983) Bull. Eur. Physiopathol. Resp., 19, 123-130
- SPIK G., STRECKER G., FOURNET B., BOUQUELET S., MONTREUIL J., DORLAND L., VAN HALBEEK H. et Vliegenthart J.F.G. (1982) Eur. J. Biochem., 121, 413-419
- 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
- STEPHENS S., DOLBY J.B., MONTREUIL J. et SPIK G. (1980) Immunology, 41, 597-603
- STUART G.W., SEARLE P.F. et PALMITER R.D. (1985) Nature, 317, 828-831
- TENG C.T., PENTECOST B.T., MARSHALL A., SOLOMON A., BOWMAN B.H., LALLEY P.A. et NAYLOR S.L. (1987) Somat. Cell and Mol. Gen., 13, 689-693
- TENG C.T., WALKER M.P., BHATTACHARYYA S.N., KLAPPER D.G., DIAUGUSTINE R.P. et MACLACHLAN J.A. (1986) Biochem. J., 240, 413-422
- TOURVILLE D.R., OGRA S.S., LIPPES J. et TOMASI T.B.Jr. (1970) Am. J. Obstet. Gynecol., 108, 1102-1108
- TUIL D., VAULONT S., LEVIN M.J., MUNNICH A., MOGUILLEWSKY M., BOUTON M.M., BRISSOT P., DREYFUS J.C. et KAHN A. (1985) FEBS Lett., 189, 310-314
- 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
- VAN HALBEEK H., DORLAND L., Vliegenthart J.F.G., SPIK G., CHERON A. et MONTREUIL J. (1981) Biophys. Biochim. Acta, 685, 293-296

- VAN SNICK J.L., MARKOWETZ B. et MASSON P.L. (1977) J. Exp. Med., 146, 817-827
- VON DER AHE D., JANICH S., SCHEIDERETT C., RENKAWITZ R., SCHÜTZ G. et BEATO M. (1985) Nature, 313, 706-709
- WANG A.C., SUTTON H.E. et RIGGS A. (1966) Am. J. Hum. Genet., 18, 454-458
- WEINBERG E.D. (1974) Science, 184, 952-956
- WILLIAMS J. (1975) Biochem. J., 149, 237-244
- WILLIAMS J. (1982) Trends Biochem. Sci., 7, 394-397
- WILLIAMS J., ELLEMAN T.C., KINGSTON J.B., WILKINS A.G. et KUHN K.A. (1982) Eur. J. Biochem., 122, 297-303
- WINDLE J.J. WIERSEMA A.K., CLARK J.R. et FEENEY R.E. (1963) Biochemistry, 216, 1341-1346
- WOODBURY R.G., BROWN J.P., YEH M.Y., HELLSTROM I. et HELLSTROM K.E. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 2183-2187
- WYLLIE J.C. (1971) Brit. J. Haematol, 37, 16-24
- YANG F., BRUNE J.L., BALDWIN D., BARNETT D.R. et BOWMAN B.H. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 5875-5879
- YANG F., LUM J.B., Mc GILL J.R., MOORE C.M., NAYLOR S.L., VAN BRAGT P.H., BALDWIN W.D. et BOWMAN B.H. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 2752-2756
- ZHRINGER J., BALIGA B.S. et MUNRO H.N. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 857-861

## Appendice Technique



- PARTIE I -

**PREPARATION ET ETUDE DES FRAGMENTS  
DE LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE**

**I. PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE**

La méthode que nous avons utilisée est dérivée de celle décrite par CHERON *et al.* (1977). Cette technique a été modifiée en 1984 au cours de notre D.E.A.

**A. Préparation de la lactotransferrine saturée en fer**

**1. Préparation du lactosérum**

Le lactosérum que nous avons utilisé est un lactosérum obtenu après précipitation de la caséine par l'acide chlorhydrique. Ce lactosérum nous a été fourni par les fromageries BEL (Vendôme). Le lactosérum est additionné de 16 g d'acétate de sodium (pour ajuster la force ionique à celle du gel) et est amené à pH 7,5 par addition de  $\text{NH}_4\text{OH}$  1M. La lactotransferrine contenue dans le lactosérum est alors saturée en fer par addition de 1 ml d'une solution de sel ferrique, obtenue en dissolvant 232 mg de chlorure ferrique,  $6 \text{ H}_2\text{O}$  dans 100 ml d'une solution 0,1 M en citrate de sodium et 0,1 M en bicarbonate de sodium (pH 8,2) par l. de lactosérum (AZARI et BAUGH, 1967).

## 2. Chromatographie du lactosérum

Le lactosérum est chromatographié par un procédé de "batch absorption". Un échangeur de cations, le SP-Sephadex (Pharmacia), préalablement gonflé dans une solution d'acétate de sodium 0,22 M, est ajouté au lactosérum à raison de 50 ml de gel par l. Le mélange est agité mécaniquement à 4°C pendant 4 h. Le gel, récupéré par décantation et filtration, est ensuite lavé par des solutions d'acétate de sodium 0,22 M et 0,35 M (10 volumes de chacune). La lactotransferrine est éluée par une solution d'acétate de sodium 1 M. Cette fraction, contenant la lactotransferrine, est dialysée 2 jours contre de l'eau puis lyophilisée.

## 3. Purification de la lactotransferrine

La purification de la lactotransferrine est obtenue par une nouvelle chromatographie d'échange d'ions. Le même support (SP-Sephadex équilibré dans de l'acétate de sodium 0,22 M) est utilisé mais la chromatographie est réalisée sur une colonne (10 x 30 cm). L'éluion s'effectue par paliers de molarités croissantes en acétate de sodium (0,265 M ; 0,35 M ; 0,4 M ; 0,5 M et 1 M). La lactotransferrine est éluée à partir de 0,5 M. Les fractions contenant la lactotransferrine sont dialysées 2 jours contre de l'eau puis lyophilisées.

La lactotransferrine est, à ce stade, électrophorétiquement et immuno-électrophorétiquement pure.

Le rendement pondéral varie de 20 à 80 mg/l de lactosérum.

## B. Préparation de l'apolactotransferrine

L'apolactotransferrine (lactotransferrine sans fer) peut être obtenue

à partir de la lactotransferrine native ou saturée en fer. La désaturation est réalisée selon le protocole décrit par MAZURIER et SPIK (1980) pour la lactotransferrine humaine.

La lactotransferrine, native ou diférique, est dissoute dans un tampon formiate de sodium 0,2 M, phosphate de sodium 0,2 M, EDTA 0,04 M, pH 4,0 à une concentration maximale de 0,5 % (p:v). La solution est laissée une nuit à température ambiante, dialysée 2 jours contre de l'eau (à + 4°C) puis lyophilisée.

## II. PREPARATION DES FRAGMENTS TRYPSIQUES DE LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE

### A. Préparation des fragments N- et C- terminaux

Le protocole que nous avons utilisé est dérivé de celui mis au point en 1984 par LEGRAND *et al.* pour la préparation des fragments tryptiques de la lactotransferrine humaine.

1 g de lactotransferrine bovine saturée en fer est dissous dans 50 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M (pH 8,2), acétate de calcium 0,025 M. 20 mg de trypsine (Sigma) sont ajoutés au milieu avant incubation à 37°C pendant 4 h. L'hydrolysate est alors chromatographié pour séparer les fragments générés. Deux types de chromatographies sont utilisés :

1. Une chromatographie en conditions non dissociantes sur une colonne (10 x 150 cm) de Sephadex G-75 fine (Pharmacia) équilibrée dans une solution de bicarbonate d'ammonium 0,05 M. Dans ce cas l'hydrolysate est déposé tel quel sur la colonne et le développement de la chromatographie s'effectue à 40 ml/h.
2. Une chromatographie en conditions dissociantes sur une colonne (10 x 150 cm) de Bio-Gel P-60 (Biorad) équilibrée dans une solution

d'acide acétique à 10 p 100 (v:v). L'hydrolysate, avant chromatographie, est d'abord ajusté à 10 p 100 en acide acétique. Le débit de la colonne est également de 40 ml/h. Dans ce cas, les fragments sont obtenus sous forme apo (sans fer). Si la resaturation en fer des fragments est souhaitée, la fraction contenant le fragment à resaturer est dialysée une nuit contre de l'eau puis ajustée à pH 8,2 par une solution de bicarbonate de sodium à 1 M. La resaturation est obtenue en ajoutant une quantité adéquate de la solution d'AZARI et BAUGH (1967).

#### B. Préparation du glycopeptide N-2

La méthode que nous avons utilisée dérive de celle décrite par LEGRAND et *al.* (1984).

Le fragment N-terminal (fraction III) resaturé comme il est décrit ci-dessus est concentré à 2 p 100 (p:v) sur une cellule à concentration sous pression Amicon (membranes Diaflo). Il est ensuite soumis à une nouvelle hydrolyse par la trypsine dans un rapport enzyme/substrat de 1:50, pendant 3 h à 37°C. L'hydrolysate est ensuite directement chromatographié sur une colonne de Bio-Gel P-30 (2 x 150 cm) équilibrée dans une solution de bicarbonate d'ammonium 0,05 M. Le débit est de 5 ml/h et le volume d'injection inférieur à 5 ml.

### III. HYDROLYSE DU FRAGMENT C-TERMINAL PAR LE BROMURE DE CYANOGENE

#### A. Réduction et alkylation

Afin d'obtenir un bon rendement de coupure, il est nécessaire de

réduire les ponts disulfures par un agent réducteur et de bloquer les fonctions thiols libérées par un réactif alkylant, tels que le dithiothréitol (DTT) et l'iodoacétamide. Le protocole de réduction et d'alkylation est le suivant :

La protéine (ou le polypeptide) est dissoute (à 5 p 100) dans un tampon Tris-HCl (pH 8,2), urée 8 M, EDTA 0,03 M. Le DTT est ajouté à raison de 100 excès molaire. La solution est laissée sous azote pendant 15 min., puis incubée 16 h à température ambiante à l'obscurité. L'alkylation est obtenue par addition de l'iodoacétamide recristallisé qui est ajouté grain par grain à la solution. Le pH de cette dernière est ajusté (au cours de l'alkylation) à 8,2 par une solution de NaOH 2M. L'absence de SH libres est vérifiée par le réactif au nitroprussiate. La protéine réduite et alkylée est alors dessalée sur une colonne de Bio-Gel P-30 (2 x 100 cm) équilibrée dans une solution d'acide acétique à 10 p 100, puis lyophilisée.

#### B. Hydrolyse par le bromure de cyanogène

L'hydrolyse du fragment C-terminal réduit et alkylé a été effectuée selon GROSS et WITKOP (1961).

Le fragment réduit et alkylé est dissous dans une solution d'acide formique à 70 p 100. Le bromure de cyanogène (BrCN) est ajouté à la solution à raison de 200 excès molaire. Le mélange est laissé 48 h. à température ambiante sous agitation douce. A la fin de la réaction, 10 volumes d'eau refroidie à +4°C sont ajoutés au mélange. L'excès de BrCN n'ayant pas réagi est éliminé à l'évaporateur rotatif et les fragments BrCN sont lyophilisés, repris par une solution d'acide acétique à 10 p 100, puis chromatographiés sur une colonne de Bio-Gel P-60 (2,5 x 150 cm) équilibrée dans une solution d'acide acétique à 10 p 100.

### III. PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES

La détermination des sites de glycosylation et de la nature des glycanes présents sur ces sites nécessite la préparation de glycopeptides. Ces préparations ont été effectuées à partir de fragments BrCN. Ces fragments, qui sont déjà réduits et alkylés, peuvent être hydrolysés complètement par la trypsine. Les fractions glycopeptidiques sont purifiées par chromatographie sur colonne de concanavoline-A Sepharose.

#### A. Hydrolyse trypsique totale

Le fragment BrCN est dissous à 1 % (p:v) dans un tampon Guanidine-HCl 0,1 M (pH 8,2),  $\text{CaCl}_2$  0,025 M. La trypsine est ajoutée dans un rapport 1:50 (p:p) et l'hydrolyse est réalisée à 37°C sous agitation douce pendant 24 h. La trypsine est ensuite dénaturée par chauffage à +70°C pendant 10 min et l'hydrolysats est chromatographié sur une colonne de Bio-Gel P-6 (2 x 50 cm) afin d'éliminer les fragments incomplètement digérés.

Cette chromatographie permet également de changer de tampon et de récupérer les peptides et glycopeptides dans un tampon Con-A (voir ci-dessous) permettant le passage direct sur colonne de concanavoline-A immobilisée.

#### B. Chromatographie d'affinité sur colonne de concanavoline-A immobilisée

Le fractionnement des glycopeptides a été réalisé sur colonne (1x5 cm) de concanavoline-A Sepharose 4B (Pharmacia) équilibrée dans le tampon : acétate de sodium 0,005 M,  $\text{MnCl}_2$  0,001 M,  $\text{MgCl}_2$  0,001 M,  $\text{CaCl}_2$  0,001 M, NaCl

0,1 M, pH 6,5 selon le protocole décrit par KRUSIUS *et al.* (1976). L'élu-tion des glycopeptides est obtenue par le même tampon mais contenant des molarités croissantes en  $\alpha$ -D-méthylglucoside ( $\alpha$ -D-CH<sub>3</sub>Glc). Ainsi une mola-rité de 0,02 M en  $\alpha$ -D-CH<sub>3</sub>Glc permet l'élu-tion de glycopeptides portant des glycanes de type N-acétyllactosaminique. Une molarité de 0,2 M en  $\alpha$ -D-CH<sub>3</sub>Glc permet d'éluer des glycopeptides portant des glycanes de type oligo-mannosidique. Les fractions Con-A obtenues sont concentrées à l'évaporateur rotatif. L' $\alpha$ -D-CH<sub>3</sub>Glc est éliminé par chromatographie sur colonne de Bio-Gel P-2 (1,5 x 30 cm) équilibrée dans l'eau. Le développement de la chroma-tographie est suivi par repérage des glycopeptides à l'orcinol sulfurique (solution d'orcinol à 0,2 % dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 %) après dépôt de fractions ali-quotes sur plaques de Silicagel G-60 (MERCK). Les fractions glycosylées sont lyophilisées.

## V. ETUDE DU GLYCOPEPTIDE N-2

### A. Etude de la partie glycanique

#### 1. Déglycosylation

La déglycosylation du fragment de 20 kDa (glycopeptide N-2) a été effectuée par l'endo-N-acétylglucosaminidase H isolée de *Streptomyces griseus* selon TARENTINO et MALEY (1974). Cette enzyme hydrolyse spécifique-ment les N-glycanes de type oligomannosidique entre les deux résidus de N-acétylglucosamine du point d'attache.

1 mg de glycopeptide est hydrolysé par 20 mU d'enzyme (AS = 30 U/mg) en présence d'un tampon phosphate 0,2 M/citrate 0,1 M pH 5,5 pendant 24 h à 37°C.

## 2. Chromatographie des glycanes sur couche mince

La séparation des oligosaccharides libérés par hydrolyse enzymatique a été obtenue par chromatographie sur couche mince selon la méthode décrite par PALO et SAVOLEINEN (1972).

Les oligosaccharides en solution sont déposés à la micropipette sur une plaque de Silicagel G-60 (MECRK). Quatre migrations successives sont réalisées en cuve contenant le solvant : N-butanol / acide acétique / eau (2:1:1, v/v). Les oligosaccharides sont révélés par le réactif à l'orcinol sulfurique. Leur migration est comparée à celle d'oligosaccharides mannosidiques témoins.

### B. Etude de la fixation du fer

#### 1. Stabilité du complexe glycopeptide N-2-Fe<sup>3+</sup> en fonction du pH

Le glycopeptide N-2 est réparti, à une concentration finale de 1 mg/ml, dans 12 tubes contenant des solutions tampon HEPES 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> 0,005 M de pH 7,8 à 6,6 et de tampon MES 0,1 M, NaHCO<sub>3</sub> 0,005 M de pH 6,4 à 5,6. L'absorbance des solutions est lue à 415 nm, pour chaque tube, après une nuit d'incubation à température ambiante.

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

Le glycopeptide N-2 est dissous à une concentration de 1 mg/ml dans un tampon MES 0,1 M, NaHCO<sub>3</sub> 0,005 M pH 5,5 et laissé 2 h. à température ambiante. Après vérification de la désaturation en fer du glycopeptide N-2 par mesure de l'absorbance à 415 nm (densité optique nulle), le pH de la solution est remonté à 7,8 par addition d'une solution de NaOH 0,5 M. Une



nouvelle mesure de l'absorbance à 415 nm rend compte du taux de resaturation.

### 3. Influence de la présence du glycanne sur la saturation en fer

Le glycopeptide N-2, désaturé comme il est décrit ci-dessus, est chromatographié sur une colonne de Sephadex G-25 (PD 10) (Pharmacia) - pour éliminer le fer libre - équilibrée en tampon HEPES 0,1 M, NaHCO<sub>3</sub> 0,005 M, pH 7,5. Le glycopeptide N-2 est ensuite resaturé en fer par addition de la quantité de fer appropriée (dont 10 % sous forme radiomarquée <sup>59</sup>Fe<sup>3+</sup>). L'excès de fer non fixé est éliminé par une nouvelle chromatographie sur PD-10 et le taux de saturation est déterminé par mesure de l'absorbance à 415 nm et par comptage de la radioactivité fixée. Le glycopeptide est ensuite soumis à une déglycosylation dans les conditions décrites ci-dessus (p. A-7). Le fer libéré lors de la déglycosylation est éliminé par chromatographie sur PD-10 et le taux de saturation est déterminé à nouveau.

## VI. TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE DOSAGE

### A. Techniques d'analyse

#### 1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS est réalisée d'après la méthode de DAVIS (1964). L'appareillage utilisé est commercialisé par la Société Biorad.

Le gel inférieur est constitué d'un gel de réticulation variable (de 7,5 à 15 % selon la résolution attendue) ou en gradient (de 5 à 20 %). Le

gel supérieur est un gel réticulé à 5 % d'acrylamide. L'électrophorèse est réalisée dans un tampon Tris 0,025 M, Glycine 0,18 M, SDS 1 % (p:v) pH 8,6 à raison de 8 V/cm pendant 4 h. L'échantillon est dissous dans un tampon avec ou sans 2-mercaptoéthanol.

## 2. Détermination de la séquence N-terminale des fragments

La détermination de la séquence N-terminale des fragments protéiques a été réalisée au Laboratoire de Chimie des Biomolécules de l'Institut Pasteur de Lille (Directeur : Pr. A. TARTAR).

La dégradation récurrente d'EDMAN est effectuée sur un microséquen-  
ceur phase gaz 470 A couplé à un appareil de H.P.L.C. 120 A de chez Applied Biosystems.

## B. Techniques de dosage

### 1. Dosage de protéines

Les concentrations des protéines en solution ont été déterminées par la méthode de LOWRY *et al.* (1951) ou, dans le cas de la lactotransferrine seule apo ou saturée en fer, d'après son absorbance à 280 nm soit :  
 $E = 11,2$  pour l'apotransferrine et  $E = 14,6$  pour la lactotransferrine diférique (CHERON, 1975).

### 2. Dosage du fer

Après rupture de la liaison fer/lactotransferrine par l'acide chlorhydrique et déprotéinisation par l'acide trichloracétique, l'ion ferrique libéré 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. Ces solutions sont disponibles sous forme d'un kit : Kit Biopack-Fer (Biotrol).

### 3. Composition molaire en monosaccharides

La composition molaire en monosaccharides a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et triméthylsilylation selon la méthode décrite par KAMERLING *et al.* (1975). Cette technique permet de doser des quantités de l'ordre de 1 à 5 µg de monosaccharides.

Aux échantillons à doser est ajouté 1 g de mésoinositol (témoins internes) en solution à 1 µg/ml. Après lyophilisation, la méthanolyse est réalisée par 250 µg de CH<sub>3</sub>OH/HCl 0,5 M pendant 24 h. à +80°C dans un tube hermétiquement fermé. La solution est ensuite neutralisée par du carbonate d'argent ajouté grain par grain, puis N-réacétylée par 10 µl d'anhydride acétique. Après une nuit à température ambiante et à l'obscurité, le tube est centrifugé. Le surnageant, introduit dans une pipette Pasteur scellée à une extrémité, est délipidé 3 fois par 200 µl d'heptane puis évaporé sous azote. Le résidu sec est repris par 25 µl de pyridine et 25 µl de B.S.T.F.A. (Bis Silyl Trifluoro Acétamide). Après 3 h. de réaction à température ambiante, les monosaccharides sont analysés en chromatographie phase gazeuse sur colonne capillaire (0,2 mm x 25 m) remplie de silicone OV 201. La température est programmée de +120°C à +240°C à raison de +2°C/mn. Le débit du gaz vecteur (He) est de 1 ml/mn, la pression d'entrée étant de 0,6 bars.

## - PARTIE II -

## CLONAGE DE LA LACTOTRANSFERRINE BOVINE

I. SOUCHES BACTERIENNES ET MILIEUX DE CULTURE UTILISESA. Caractéristiques des souches utilisées

Les principales caractéristiques et conditions d'utilisation des souches bactériennes sont rassemblées dans le tableau XIII p. A-13 .

B. Composition des milieux de culture

<u>Milieu LB</u>		<u>Milieu 2 x TY</u>	
Bactotryptone	10 g	Bactotryptone	16 g
Extrait de levure	5 g	Extrait de levure	10 g
NaCl	5 g	NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O qsp	1 l	H <sub>2</sub> O qsq	1 l
pH	7,5	pH	7,5
. pré-culture et cultures		. culture de la bactérie JM 105	
des différentes souches		pour l'obtention du bactériophage M13.	
d'E. coli.			

CARACTERISTIQUES DES SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES

NOM	MILIEU(X) de CULTURE	GENOTYPE	UTILISATION	REF.
JM 101	LB	<i>E. coli</i> K12 ; $\delta$ lac pro, thi, sup E, F'tra D36, pro AB, lac I <sup>s</sup> Z M15	. Transformation et propagation des plasmides de type pUC <sub>9</sub> .	MESSING <i>et al.</i> , (1981)
HB 101	LB	<i>E. coli</i> F-, hod S20 (rB <sup>-</sup> , mB <sup>-</sup> ) rec A13, ara-14, pro A2, lac Y1, gal K2, rps L20 (Sm <sup>r</sup> ), xyl <sup>-</sup> , mt1-1, sup E <sub>44</sub> , -	. Transformation et propagation des plasmides de type pBR 322.	BOYER <i>et al.</i> , (1969)
JM 105	2TY	<i>E. coli</i> K12, $\delta$ lac Pro, thi, Str A, end A, sbc B15, hsd R4, F'tra D36, pro AB, lac I <sup>s</sup> Z $\delta$ M15	. Transfection et amplification du bactériophage M 13 (pour le séquençage).	MESSING <i>et al.</i> , (1981)
C 600 hf1	LB	hsd R <sup>-</sup> , hsd M <sup>+</sup> , sup E, thr, leu, thi, lac Y1, ton A21, r <sub>k</sub> <sup>+</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> , mcr A (-), mcr B (+), hf1 A150 [chr :: Tn10].	. Transfection et amplification du bactériophage $\phi$ 10.	HUYNH <i>et al.</i> , (1985)

Milieu minimum (boîtes)

Agarose	15 g
H <sub>2</sub> O	900 ml
M9 (10 x)	100 ml
Mg SO <sub>4</sub> 1 M	1 ml
CaCl <sub>2</sub> 0,1 M	1 ml
Thiamine HCl 1 M	1 ml
20 % Glucose	10 ml

- . Sélection des souches  
"mâles" de JM 101 et  
JM 105

Milieu M9 (10 x)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	60 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g
NH <sub>4</sub> Cl	10 g
NaCl	5 g

- . constitution du milieu  
minimum

Milieu LAM

Bactotryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	2,5 g
Mg SO <sub>4</sub>	2,32 g
NaOH 5 M	0,6 ml
H <sub>2</sub> O qsq	1000 ml
pH	7,5

- . Culture du bactériophage λ  
sur *E. coli* C 600 hfl.

Milieu LAM (Boîtes)

Bactoagar (ou agarose)	12 g
LAM	1 l

Milieu LAM (Gélose molle)

Bactoagar (ou agarose)	7 g
LAM	1 l

- . Culture et amplification du  
bactériophage sur boîte  
(l'agarose est utilisé pour  
les préparations d'ADN de λ).

Milieu H

Bactotryptone	10 g
NaCl	8 g
Bactoagar	12 g

- . Culture sur boîte du bactériophage M13.

Milieu H (gélose molle)

Bactotryptone	10 g
NaCl	8 g
Bactoagar	8 g

## II. COMPOSITION DES SOLUTIONS ET TAMPONS COURAMMENT UTILISES

Nous avons, pour plus de commodité, rassemblé les principales solutions et tampons utilisés couramment. Ces solutions seront rappelées dans le texte par la présence d'un astérisque (\*). Les solutions n'apparaissant pas dans ce chapitre seront décrites dans le paragraphe correspondant.

### . TE

Tris-HCl (pH 8)	0,01 M
EDTA (pH 8)	0,001 M

### . TB

Acide borique	0,05 M
Borate de sodium	0,005 M
Sulfate de sodium	0,01 M
EDTA	0,001 M
pH	8,2

### . TBE

Tris-borate	0,089 M
Acide borique	0,089 M
EDTA	0,002 M
pH	7,0

### . TAE

Tris-acétate	0,04 M
EDTA	0,001 M
pH	8,0

### . SSC 20 x

NaCl	3 M
Citrate de sodium (Na) <sub>3</sub>	0,3 M
pH	7,0

### . TM 10-10

Tris-HCl (pH 8)	0,01 M
Mg SO <sub>4</sub>	0,01 M

### . Denhardt 50 x

Ficoll	5 g
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	5 g
Serum albumine bovine (SAB)	5 g
H <sub>2</sub> O qsp	500 ml

Tampons d'utilisation des enzymes de restriction

<u>. Tampon faible</u>		<u>. Tampon moyen</u>	
Tris-HCl (pH 7,5)	0,001 M	NaCl	0,05 M
MgCl <sub>2</sub>	0,01 M	Tris-HCl (pH 7,5)	0,01 M
Dithiothréitol (DTT)	0,001 M	MgCl <sub>2</sub>	0,01 M
		DTT	0,001 M

<u>. Tampon fort</u>	
NaCl	0,1 M
Tris-HCl (pH 7,5)	0,01 M
MgCl <sub>2</sub>	0,01 M
DTT	0,001 M

III. TECHNIQUES D'ISOLEMENT ET DE PURIFICATION DES ARNA. Préparation des ARN cellulaires totaux (MANIATIS et al., 1982)Tampon d'extraction

Isothiocyanate de guanidine	4	M
Citrate de sodium (pH 7,0)	0,005	M
β-mercaptoéthanol	0,1	M
Sarkosyl	0,5	M

Le tissu - ou les cellules - est mis en suspension dans 5 volumes de tampon et homogénéisé au Polytron dans un becher sur de la glace (pour éviter l'échauffement). 1 g de chlorure de césium est ajouté pour 2,5 ml d'homogénat et mis sous agitation jusqu'à complète dissolution. L'ensemble



est ensuite déposé sur un coussin de 1,2 ml de  $C_{60}Cl$  5,7 M dans du 0,1 M EDTA (pH 7,5), dans un tube Beckman pour rotor SW 50-1. Les tubes sont centrifugés 12 h à 35000 tr/mn à +20°C. Dans ces conditions l'ARN précipite et est retrouvé au fond du tube. Le surnageant est éliminé et les ARN sont séchés sous vide.

Les ARN sont repris par un tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), 5 mM EDTA, 1 % SDS et soumis à 5 extractions : 1 extraction par 1 volume de phénol saturé en Tris-HCl 10 mM pH 8 ; 2 extractions par un volume de mélange (v:v) de phénol/chloroforme ; 2 extractions par de l'éther méthylique saturé en eau. La phase aqueuse est ajustée à 0,3 M en acétate de sodium par un ajout d'acétate de sodium 3 M puis précipitée par 2,5 volumes d'éthanol absolu à -20°C. La précipitation des ARN est obtenue après 2 h à -80°C ou une nuit à -20°C.

Les ARN précipités sont récupérés par une centrifugation en tubes Corex à 15000 g, à +4°C pendant 20 min., puis séchés sous vide. Les ARN sont enfin repris par le tampon de fixation sur colonne d'oligo (dT) cellulose. La quantité d'ARN obtenus est estimée par une mesure de l'absorbance à 260 nm. La qualité de la purification est déterminée par mesure du rapport des densités optiques à 260 nm et 280 nm.

#### B. Purification des ARNm poly A + (AVIV et LEDER, 1972)

<u>Tampon de fixation</u>		<u>Tampon d'élution</u>	
Tris-HCl	0,01 M (pH 8,0)	Tris-HCl	0,01 M (pH 8,0)
NaCl	0,5 M	SDS	0,05 % (p:v)
SDS	0,5 % (p:v)	EDTA	0,001 M
EDTA	0,001 M		

500 mg d'oligo (dT) cellulose (Sochibo) mis à gonfler dans le tampon d'élution permettent de préparer une colonne de 3 ml sur laquelle pourront être purifiés 10 mg d'ARN totaux.

Les ARN totaux repris dans l'eau sont amenés à une concentration de 2 mg/ml. Ils sont alors dénaturés pendant 5 min. à 65°C puis rapidement mélangés à un volume égal de tampon de fixation deux fois concentré. Les ARN sont déposés sur la colonne d'oligo (dT) équilibrée dans le tampon de fixation. La fixation sur la colonne s'effectue en 2 étapes, le premier éluat étant recyclé. Après lavage de la colonne par 10 volumes de tampon de fixation, les ARN sont élués par 3 volumes de tampon d'élution. L'éluat est ajusté à 0,5 M en NaCl et recyclé sur la colonne. La seconde chromatographie est menée comme la première. L'éluat final est amené à 0,3 M en acétate de sodium et précipité par 2,5 volumes d'éthanol.

#### IV. MARQUAGE DES SONDÉS

Les sondes utilisées (ADNc ou oligonucléotides) ont été marquées en utilisant des précurseurs radioactifs. Les précurseurs radioactifs ont été achetés auprès de la Société Amersham. Il s'agit de l' $\alpha$ - $^{32}\text{P}$  dCTP pour les sondes double brin et du  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  ATP pour les sondes oligonucléotidiques.

##### A. Marquage des fragments d'ADN double brin

Les fragments d'ADN double brin (sondes ADNc en particulier) ont été marqués au  $^{32}\text{P}$  par la méthode du déplacement de brèche ("Nick-translation") (MANIATIS *et al.*, 1982).

Le radiomarquage d'environ 200 ng d'ADN est effectué dans un volume final de 30  $\mu\text{l}$ , en tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,2,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, DTT 1 mM,

sérum albumine bovine (SAB) 100 µg/ml, en présence de dGTP, dATP, dTTP à 1 mM, de 30 µCi d' $\alpha$ - $^{32}$ P dCTP (3000Ci/mmmole), de 5 U de DNA polymérase I (Appligène) et de 10 pg de DNase I (Calbiochem). Le mélange réactionnel est incubé pendant 5 min. à 37°C pour favoriser l'activité de la DNase I puis pendant 3 h. à 15°C. L'ADN radiomarqué est ensuite séparé de l' $\alpha$ - $^{32}$ P dCTP non incorporé par une chromatographie sur colonne de 1 ml de Sephadex G-50 (Pharmacia) équilibrée dans du TE<sup>(\*\*)</sup>. Les activités spécifiques obtenues sont de l'ordre de 10<sup>8</sup> cpm/µg. La sonde marquée est conservée à -20°C jusqu'à l'utilisation. Elle est dénaturée à +100°C pendant 2 min. puis refroidie rapidement dans de la glace fondante avant l'emploi.

#### B. Marquage des sondes oligonucléotidiques

Les sondes oligonucléotidiques sont marquées au  $^{32}$ P à leurs extrémités 5'-OH par la polynucléotide kinase du phage T4 (MANIATIS *et al*, 1982).

1 µg d'oligonucléotide est incubé dans 50 µl de tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, DTT 5 mM, spermidine 0,1 mM, EDTA 0,1 M en présence de 100 µCi d'ATP  $\gamma$ - $^{32}$ P (3000 Ci/mmmole) et de 5 U de polynucléotide kinase de T4 (Appligène) pendant 30 min. à +37°C. La réaction est arrêtée par l'addition d'EDTA à 20 mM final. L'oligonucléotide marqué est extrait par 1 volume de phénol, 1 volume de mélange (v:v) de phénol/chloroforme puis 1 volume de chloroforme. La concentration en acétate d'ammonium est ajustée à 2,5 M et l'oligonucléotide est précipité par 3 volumes d'éthanol en présence de 5 µg d'ARNt entraîneur.

### V. CONSTRUCTION DES LIBRAIRIES D'ADN COMPLEMENTAIRES

#### A. Synthèse des ADNc double brin

La synthèse des molécules d'ADNc double brin a été réalisée en utilisant le kit de synthèse d'ADNc commercialisé par le Société Amersham qui fait appel à la technique décrite par GUBLER et HOFFMAN(1983).

Les synthèses ont été effectuées à partir de 5 µg de nos préparations d'ARNm poly A+. Le premier brin d'ADN complémentaire est obtenu par l'action de la transcriptase réverse isolée du Virus du Myéloblastome Aviaire (AMV). L'ADNc est ensuite rendu double brin par l'action conjointe de la RNase H et de l'ADN polymérase I. Enfin les extrémités des ADNc double brin sont rendues franches par une étape supplémentaire faisant intervenir l'ADN polymérase isolée du bactériophage T4.

La quantité d'ADNc néosynthétisée et le rendement de la rétrotranscription sont estimés par comptage de la radioactivité incorporée sous forme d'un dNTP marqué en  $\alpha$  par le  $^{32}\text{P}$ . La taille des ADNc est contrôlée sur gel d'agarose suivie d'une autoradiographie.

#### B. Méthylation des sites Eco RI internes et ligation des adaptateurs Eco RI

Les ADNc précipités sont repris par 15 µl d'eau et le mélange réactionnel suivant est réalisé :

ADNc	15 µl	<u>10 x Méthylase</u>		
10 x Méthylase	2 µl			
S-adénosyl méthionine (SAM)	2 µl	Tris-HCl	pH 8,0	1 M
Eco RI méthylase	1 µl	EDTA	pH 8,0	0,001 M

L'ensemble est incubé à 37°C pendant 30 min., extrait par un mélange (v:v) de phénol/chloroforme puis par 2 volumes d'éther.

1 µg d'adaptateurs Eco RI est ajouté à la phase aqueuse contenant les ADNc et l'ensemble est précipité par 4 volumes d'éthanol après ajustement de la concentration en acétate d'ammonium à 2,5 M final. La précipitation est effectuée 1 h. à - 70°C.

Les ADNc précipités et séchés sont repris par 7 µl d'H<sub>2</sub>O et le mélange réactionnel suivant est réalisé :

ADNc méthylés	7 µl
Tampon ligase 5 x	2 µl
ADN ligase du phage T4	1 µl (1 U/µl)

Tampon ligase 5 x

Tris-HCl pH 7,6	0,25 M
MgCl <sub>2</sub>	0,05 M
ATP	0,05 M
Dithiothréitol	0,05 M
SAB	0,5 mg/ml

La ligation est conduite pendant 16 h. à + 15°C.

C. Digestion par Eco RI - Elimination des monomères d'adaptateurs

Le ligat précédemment obtenu est amené à 88 µl par addition d'H<sub>2</sub>O et l'action de la ligase est inhibée par chauffage à 65°C pendant 10 min.. 10 µl de tampon moyen\* 10 x sont alors ajoutés ainsi que 1 µl d'Eco RI (100 U/µl). Le mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 2 h 30 min. Un nouvel ajout de 1 µl d'Eco RI (100 U/µl) est réalisé et l'incubation est de nouveau conduite 2 h 30 min. à 37°C. La réaction est arrêtée par l'addition de 2 µl d'EDTA 0,5 M et de 12 µl de SDS à 10 %.

L'élimination des monomères d'adaptateurs libérés lors de l'hydrolyse par Eco RI est obtenue par chromatographie de tamisage moléculaire. Les ADNc, dénaturés 10 min. à 65°C, sont déposés sur une colonne de 2 ml de Bio-Gel A-50 m (Biorad) équilibrée dans du Tris-HCl 0,05 M, LiCl 0,4 M. Le développement de la chromatographie est suivi par repérage à l'ictomètre de la radioactivité éluée. Les fractions retenues sont précipitées à l'éthanol en présence de bras de  $\lambda$ gt 10 Eco RI déphosphorylés (Promega Biotech) à raison de 1  $\mu$ g pour 100 ng d'ADNc.

#### D. Clonage dans le bactériophage $\lambda$ gt 10

Les ADNc et les bras de phage sont soumis à l'action de la ligase dans les conditions suivantes :

ADNc + bras de $\lambda$	7 $\mu$ l
Tampon ligase 5 x	2 $\mu$ l
ADN ligase du phage T4	1 $\mu$ l (1 U/ $\mu$ l)

Le mélange réactionnel est incubé 16 h. à + 15°C.

Après ligation, les ADN de phages recombinés sont empaquetés in vitro par des extraits "Gigapack gold" (Stratagene) selon les indications du fournisseur. La détermination du titre des bibliothèques est effectuée par transfection de la souche hôte d'E. coli C600 hfl dans les mêmes conditions que pour le criblage (voir paragraphe suivant).

## VI. CRIBLAGE DES LIBRAIRIES

### A. Transfection de la souche d'E. coli C600 hfl par le bactériophage $\lambda_{qt 10}$

#### 1. Préparation des bactéries compétentes

Une culture d'une nuit de la bactérie indicatrice C600 hfl est réalisée en inoculant 20 ml de milieu LB\* contenant 0,2 % (p:v) de maltose par une colonie bactérienne prélevée à l'ose. Après la culture, réalisée sous agitation vive à 37°C, les bactéries sont récupérées par centrifugation à 3000 tr/mn pendant 10 min. et reprises par 10 ml de MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Conservées à +4°C, les bactéries sont utilisables pendant 5 jours.

#### 2. Transfection

100  $\mu$ l d'une dilution de la librairie  $\lambda_{qt 10}$  sont mis en présence de 100  $\mu$ l (ou 300  $\mu$ l) de bactéries compétentes (selon que l'étalement soit réalisé sur boîtes de Pétri de 9 cm ou de 14 cm de diamètre). L'adsorption des phages est réalisée à température ambiante pendant 25 min. 3,5 ml (ou 7 ml) de gélose LAM\* molle sont versés sur le mélange phages-bactéries. Après homogénéisation du tube par retournement, le contenu est versé directement sur une boîte de Pétri ( $\emptyset$  9 ou 14 cm) contenant du milieu gélosé LAM\* préchauffé à 37°C. Après solidification de la gélose molle, la boîte est incubée la nuit à 37°C. En général, les grandes boîtes ( $\emptyset$  14 cm) sont utilisées lors du premier criblage et peuvent recevoir de l'ordre de 10<sup>4</sup> phages par boîte. Les petites boîtes ( $\emptyset$  9 cm) peuvent recevoir jusqu'à 10<sup>3</sup> phages et sont utilisées pour les criblages suivants.

## B. Criblage

Après une culture de 18 h., les boîtes de Pétri sont recouvertes d'une membrane de nitrocellulose du diamètre approprié. Après un contact de 30 secondes, les membranes sont retirées puis déposées successivement dans une solution de dénaturation (NaOH 0,25 M, NaCl 1,5 M) pendant 1 min. ; une solution de neutralisation (Tris-HCl 1 M pH 8,0, NaCl 1,5 M) pendant 1 min ; une solution de 2 x SSC\* pendant 5 min. Lors du premier criblage, les empreintes sont effectuées en double de manière à s'assurer de la spécificité d'un signal d'hybridation éventuel. Les membranes de nitrocellulose sont séchées sur du papier filtre, puis sont portées à +80°C pendant 2 h. dans une étuve. Elles sont ensuite soumises à une préhybridation suivie d'une hybridation dont les conditions sont définies au paragraphe X, p. A-29.

Les plages de lyse ayant fourni un signal d'hybridation positif sont prélevées et mises à diffuser dans 500 µl de TM 10-10\* stérile contenant 1 % de CHCl<sub>3</sub>. Deux nouveaux criblages de ces phages sélectionnés sont réalisés dans des conditions identiques. Enfin, un dernier étalement de 200 phages permet de s'assurer de la pureté du clone. Les ADN phagiques sont ensuite extraits comme décrit en VII-A.

## VII. TECHNIQUES DE PREPARATION DE L'ADN

### A. Préparation de l'ADN du bactériophage (MANIATIS *et al.*, 1982)

Les bactériophages sélectionnés sont amplifiés sur de grandes boîtes de Pétri contenant du LAM\* et de l'agarose. Dix grandes boîtes (Ø 14 cm) contenant 3.10<sup>4</sup> phages chacune sont ainsi préparées pour l'amplification.



Les phages sont récupérés par élution en déposant 15 ml de TM 10-10\* stérile sur chaque boîte. Les boîtes sont agitées sur une table oscillante pendant 5 h. et les éluats sont récupérés à la pipette.

Les éluats sont d'abord traités par du chloroforme à 1% (v:v) (30 min) puis soumis à l'action de la DNase I et de la RNase A (1 µg/ml) pendant 30 min. à 37°C. Les phages sont ensuite précipités dans du polyéthylèneglycol (PEG) 10 % (p:v), NaCl 1 M pendant 1 h. sur la glace. Après centrifugation à 15000 g, le culot phagique est repris par un volume minimum de TM 10-10\*. La concentration en CsCl est ajustée à 4 M et l'éluat est ensuite soumis à une ultracentrifugation à l'équilibre à 350000 g dans un rotor VTi 65 sur centrifugeuse Beckman L8 pendant 4 h. La bande phagique est récupérée à l'aide d'une seringue et mise à dialyser 2 fois 1 h. et 1 nuit contre un tampon Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0), NaCl 0,01 M, MgCl<sub>2</sub> 0,01 M.

L'ADN phagique est ensuite préparé en hydrolysant la capsidie du phage par une solution d'EDTA 0,02 M, SDS 0,5 % contenant de la protéinase K à 50 µg/ml pendant 1 h. à 65°C. L'ADN est ensuite extrait par 2 fois 1 volume de mélange (v:v) de phénol/chloroforme et par 2 fois 1 volume de chloroforme. La phase aqueuse est ajustée à 0,3 M en acétate de sodium (pH 5,2) et précipitée par 2,5 volumes d'éthanol à -20°C. L'ADN précipité est récupéré par centrifugation, lavé par de l'éthanol à 70 %, séché et repris par de l'eau.

#### B. Préparation de l'ADN plasmidique

Les préparations d'ADN plasmidiques ont été obtenues par la méthode de lyse alcaline décrite par BIRNBOIM et DOLY (1979).

3 à 5 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline sont ensemencés par une colonie bactérienne portant le plasmide. Après une culture d'une nuit, la suspension bactérienne est centrifugée 30 sec. à

12000 g. Le culot est repris par une solution de glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), lysozyme 2 mg/ml et laissé 5 min. à température ambiante. 200 µl d'une solution de NaOH 0,2 M, SDS 1 % (p:v) sont ajoutés et le mélange est agité jusqu'à clarification puis laissé 5 min. sur la glace. 150 µl d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 sont ajoutés et l'incubation sur la glace est poursuivie 5 min. Après centrifugation à 12000 g à 4°C pendant 5 min., le surnageant est récupéré et extrait par un volume égal de phénol/chloroforme puis par un volume de chloroforme. L'ADN plasmidique est précipité par 2,5 volumes d'éthanol à - 20°C une nuit (ou - 70°C pendant 20 min.). L'ADN est récupéré par centrifugation, lavé par de l'éthanol à 70 %, séché et repris par 30 µl d'eau. L'ARN présent dans la préparation est détruit par l'action de la RNase A (1 µg/ml final) 15 min. à 37°C.

Il est possible d'extrapoler cette technique à des volumes plus importants (20 ml par exemple) pour une préparation de plasmide plus conséquente.

### C. Préparation de l'ADN simple brin du bactériophage M13

Après insertion des molécules d'ADN à séquencer dans l'ADN double brin du bactériophage M13, la forme virale est préparée en vue d'obtenir un ADN monocaténaire qui servira de matrice pour le séquençage. Sa préparation est réalisée comme suit : 1,5 ml d'une dilution au 1/100 d'une culture de nuit des bactéries compétentes (JM 105) dans le 2xTY sont infectés par une plaque claire (voir XII-D-2) prélevée à l'aide d'un cure-dent stérile. Les tubes sont agités vigoureusement 5 à 7 h. à 37°C et centrifugés 5 min. à 13500 g. Les particules virales contenues dans le surnageant sont précipitées par du polyéthylèneglycol (PEG) 6000 à 4 % et NaCl à 0,5 M final. Après une incubation de 15 min. à température ambiante, et centrifugation à 13500 g, le culot est débarrassé de toute trace du mélange PEG/NaCl et repris par 100 µl de TE<sup>\*\*</sup>. L'ADN monocaténaire est ensuite extrait plusieurs fois au phénol,

au phénol/chloroforme (v:v) puis au chloroforme. Enfin, l'ADN est précipité par 2,5 volumes d'éthanol en présence d'acétate de sodium à 0,3 M final pH 5,2. L'ADN précipité et séché est ensuite repris par 10 à 20  $\mu$ l d' $H_2O$  et la quantité est estimée sur gel d'agarose après coloration au bromure d'éthidium (BET).

#### VIII. ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE

##### A. Electrophorèse de l'ARN en gel d'agarose dénaturant

La technique d'électrophorèse de l'ARN que nous avons utilisée fait appel à un agent dénaturant des structures appariées : l'hydroxyméthylmercure ( $CH_3HgOH$ ). Cette technique a été décrite par BAILEY et DAVIDSON (1976).

##### Tampon d'électrophorèse 10 x

Acide borique	0,5 M
Tétraborate sodique	0,05 M
Sulfate de sodium	0,1 M
EDTA (pH 8,2)	0,01 M
pH	8,2

Pour un minigel à 1 % en agarose, 0,5 g d'agarose sont dissous dans 44 ml d'eau en portant le mélange au point de surfusion. La température est ramenée à +55°C et 5 ml de tampon d'électrophorèse 10 x ainsi qu'1 ml d'une solution de  $CH_3HgOH$  1 M sont ajoutés à l'agarose. Le gel est immédiatement coulé. Les échantillons d'ARN à analyser sont dénaturés dans l'eau pendant 5 min. à +65°C puis sont déposés sur gel après avoir ajouté 1/5 de volume

de tampon de dépôt (50 % glycérol, 0,25 % xylène cyanol, 0,25 % bleu de bromophénol). L'électrophorèse est réalisée sous une tension de 10 volts/cm pendant 45 min. La coloration des ARN est obtenue en incubant le gel pendant 20 min. dans une solution 0,5 M acétate d'ammonium, 1 µg/ml bromure d'éthidium (BET).

#### B. Electrophorèse de l'ADN (MANIATIS *et al.*, 1982)

Différentes concentrations en agarose peuvent être utilisées selon la taille des fragments à séparer. L'agarose est dissous dans le tampon d'électrophorèse (TAE\* ou TBE\*) avant d'être porté au point de surfusion. La température est abaissée à +55°C avant coulage. Le tampon TBE est utilisé pour les électrophorèses de routine tandis que le TAE est utilisé lorsque l'élution d'un fragment est souhaitée après électrophorèse.

La migration est effectuée sous 100 volts pendant 45 min.. La coloration des fragments d'ADN est obtenue soit après immersion dans une solution à 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium (BET), soit par incorporation de la même quantité de BET directement dans l'agarose avant la gélification. La visualisation des bandes est obtenue sous un éclairage ultra-violet (à 312 nm).

#### C. Elution d'un fragment d'ADN

La récupération d'un fragment d'ADN inclus dans l'agarose a été effectuée en utilisant le kit d'élution "Geneclean" commercialisé par la firme BIO 101. Le protocole suivi est celui du fournisseur. Il permet l'élution d'un fragment d'ADN inclus dans l'agarose en moins d'une heure.

## IX. TRANSFERT PAR CAPILLARITE DES ACIDES NUCLEIQUES SUR MEMBRANE DE NITRO-CELLULOSE

### A. Transfert de l'ADN (Southern Blot) (MANIATIS *et al.*, 1982)

Les fragments d'ADN à analyser sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gel d'agarose selon la technique décrite en VIII-B.

Après l'électrophorèse, le gel est immergé dans une solution de dénaturation (NaOH 0,2 M, NaCl 0,6 M) pendant 1 h. Une membrane de nitrocellulose préalablement trempée dans du 20 x SSC\* est alors déposée sur le gel et l'ADN est transféré par capillarité pendant 16 h. à température ambiante selon la technique de SOUTHERN (1975). Après transfert, la membrane est rincée dans une solution de 2 x SSC\*, séchée sur papier filtre et portée à +80°C pendant 2 h. La membrane est alors prête pour l'hybridation.

### B. Transfert de l'ARN (Northern Blot)

Les ARN à analyser sont séparés en gel d'agarose dénaturant en présence d'hydroxyméthylmercure selon la technique décrite en VIII-A. Les ARN sont ensuite transférés sur membrane de nitrocellulose selon la technique de SOUTHERN (1975). A la différence de la technique précédente pour le transfert de l'ADN, le gel ne subit pas de traitement alcalin.

## X. TECHNIQUES D'HYBRIDATION

### A. Hybridation en présence de sondes oligonucléotidiques

Les filtres ( $\varnothing$  85 ou 135 mm) ou les membranes de nitrocellulose sont

réhydratés dans du 2 x SSC\* après cuisson à +80°C. Ils sont ensuite soumis à une préhybridation de 4 h. à +42°C dans le milieu d'hybridation (6 x SSC\*, 10 x Denhardt\*, 0,1 % NP40, 100 µg/ml sperme de saumon) suivi d'une hybridation de 16 h. à +42°C dans le même milieu contenant les deux sondes oligonucléotidiques 23-mer et 35-mer en mélange, à raison de 1 µg pour 100 ml de milieu. Le marquage est effectué comme décrit en IV-B.

Après l'hybridation, les filtres ou les membranes de nitrocellulose sont lavés 4 fois 15 min. dans une solution de 6 x SSC\*, 0,1 % SDS à +42°C et 1 fois dans une solution de 6 x SSC\*, 0,1 % SDS à +55°C. Les filtres ou les membranes sont alors séchés sur papier filtre puis autoradiographiés à -70°C.

#### B. Hybridation en présence de la sonde d'ADNc de la lactotransferrine humaine

Les filtres ou les membranes de nitrocellulose, réhydratés dans le 2 x SSC\* comme décrit au X-A sont préhybridés 4 h. à +42°C dans le milieu d'hybridation (50 % formamide, 5 x SSC\*, 0,1 M phosphate pH 7,4, 5 x Denhardt\*, 100 µg/ml DNA sperme de saumon) puis hybridés 16 h. dans le même milieu à +42°C en présence de la sonde d'ADNc de la lactotransferrine humaine marquée au <sup>32</sup>P comme décrit en IV.A.

Après l'hybridation, les membranes de nitrocellulose sont lavées 4 fois 10 min. dans du 2 x SSC\*, 0,1 % SDS et 3 fois 10 min. dans du 0,2 x SSC\*, 0,1 % SDS à 42 °C puis 1 fois dans du 0,2 x SSC\*, 0,1 % SDS à +55°C. Les membranes sont séchées sur papier filtre puis autoradiographiées à -70°C.

## XI UTILISATION DES ENZYMES DE RESTRICTION

### A. Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction

De façon générale, 3 unités d'enzymes sont utilisées pour hydrolyser 1  $\mu\text{g}$  d'ADN. L'ADN est mis en solution dans le tampon adéquat (voir II) à raison de 1  $\mu\text{g}/20\mu\text{l}$  et la digestion est obtenue après 2 h. à  $+37^{\circ}\text{C}$  (sauf cas particuliers comme Sma I qui demande un tampon spécial et une température de  $+30^{\circ}\text{C}$ ).

### B. Préparation d'un insert d'ADN après digestion par un (des) enzyme(s) de restriction

Après digestion par un ou plusieurs enzymes de restriction, les fragments d'ADN sont séparés sur un gel d'agarose à bas point de fusion. Après électrophorèse (voir VIII-B) et repérage de l'insert sous U.V., la bande d'agarose est découpée au scalpel et l'insert est récupéré par élution à l'aide du kit "Geneclean" (BIO 101) (VIII-C).

## XII. SOUS-CLONAGE DE FRAGMENTS D'ADN

### A. Vecteurs utilisés

Deux types de vecteurs ont été utilisés pour le sous-clonage de nos fragments d'ADNc clonés dans le bactériophage  $\phi$  10. Il s'agit d'un vecteur plasmidique (type pUC) et d'un vecteur phagique (le bactériophage M13).

Le pUC (VIERA et MESSING, 1982) est un plasmide de 2,7 kb portant un gène de résistance à l'ampicilline et un site de clonage multiple

permettant l'utilisation de plusieurs enzymes de restriction pour la préparation des fragments d'ADN à insérer. Ce plasmide, ayant pour cellule hôte la bactérie JM 101 (voir I-A), permet l'amplification de fragments d'ADN dans cette souche.

Le bactériophage M13 (MESSING, 1983) est un bactériophage filamenteux de 6,5 kb ayant la particularité de posséder, dans son cycle de multiplication, un stade infectieux sous forme de particules virales renfermant un ADN monocaténaire.

Les cartes de restriction respectives du plasmide pUCg et du bactériophage M13 sont présentées à la Fig. (source BRL).

### B. Ligation

Le vecteur utilisé est digéré par un ou plusieurs enzymes de restriction appropriés puis incubé dans un rapport molaire 1:1 avec le fragment d'ADN à sous-cloner dans le tampon de ligation (Tris-HCl 0,05 M pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 0,01 M, ATP 0,001 M, Dithiothréitol 0,01 M, SAB 0,1 mg/ml). La ligation est obtenue après addition d'1 U d'ADN ligase de T4 (Appligène) et incubation à +15°C pendant 16 h. Le volume réactionnel ne doit pas excéder 10 µl. En général, la quantité de vecteur utilisé par transformation est de 100 ng.

### C. Préparation des bactéries compétentes

Avant transformation, il est nécessaire de rendre les bactéries compétentes. La préparation des cellules d'*E. coli* compétentes (JM 101 ou JM 105) est réalisée extemporanément.

Une pré-culture d'une nuit de la souche *E. coli* choisie est diluée au 1/50 dans 40 ml de milieu LB\* et cultivée à +37°C sous agitation jusqu'à



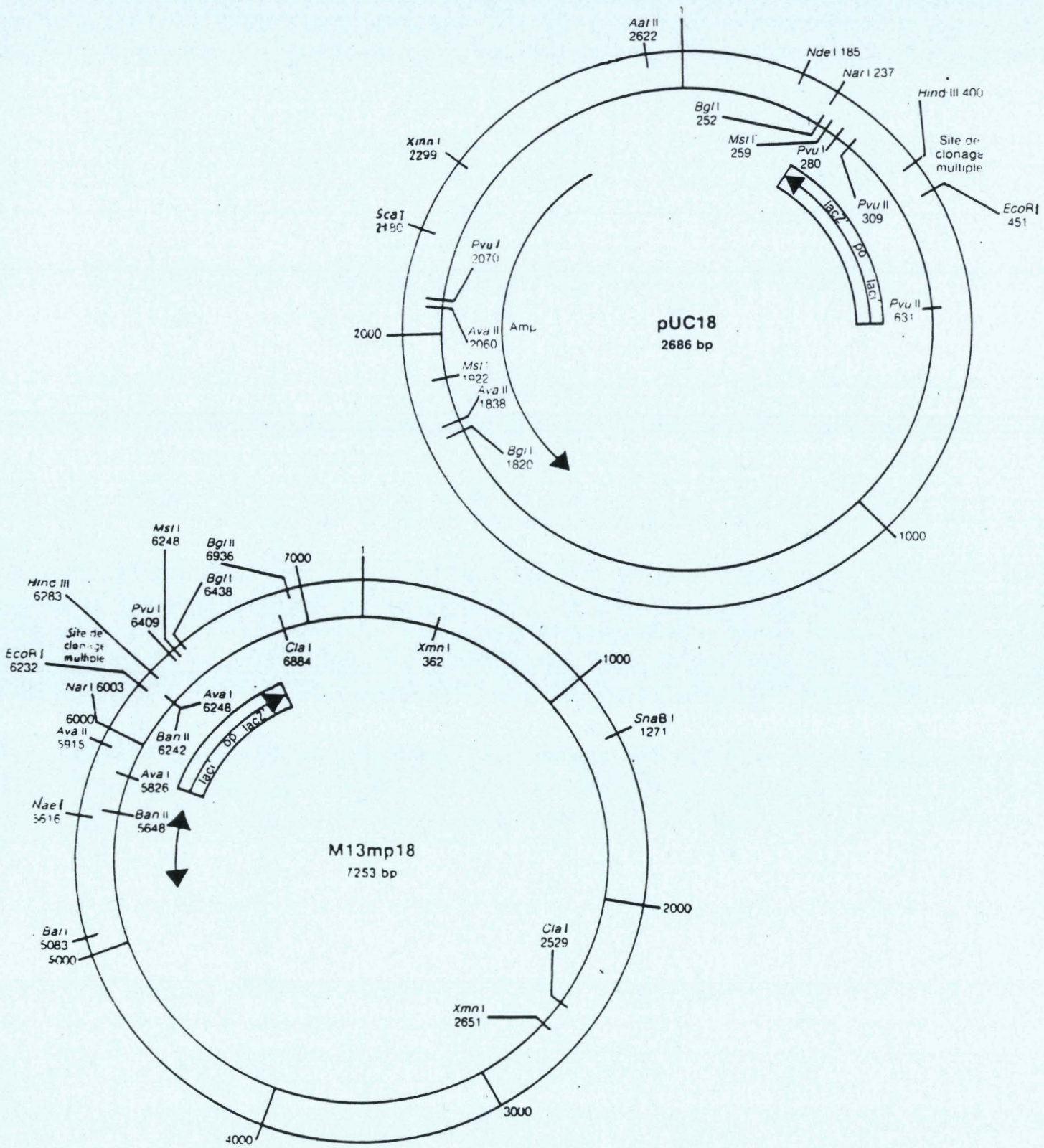


Fig. 40 : Cartographie de restriction du plasmide pUC<sub>18</sub> et du bactériophage M13.

D.O 600 nm = 0,6. La culture est alors centrifugée 10 min. à 3500 tr/mn et le culot est repris par 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,05 M glacé. Cette suspension est laissée 20 min. dans la glace, centrifugée de nouveau 10 min. à 3500 tr/mn et le culot bactérien est finalement repris par 5 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,05 M glacé. Ces bactéries, laissées au moins une heure sur la glace, sont alors compétentes pour la transformation. Elles peuvent être utilisées pendant 48 h.

#### D. Transformation des bactéries compétentes

##### 1. Transformation des bactéries JM 101 par le PUC<sub>18</sub>

200 µl de la suspension de cellules compétentes sont incubés en présence d'un demi volume du ligat précédemment obtenu (XII-B). Le contact entre l'ADN et les bactéries est obtenu en laissant ce mélange sur la glace pendant 20 min. La transformation est réalisée par un choc thermique à +42°C pendant 3 min.

Les bactéries transformées sont ensuite incubées pendant 60 min. à +37°C en milieu LB\* sans antibiotique (pour permettre l'expression de la résistance à l'antibiotique) puis étalées sur milieu LB gélosé contenant l'antibiotique, en présence d'IPTG et de XGal, et sont incubées à +37°C pendant une nuit.

##### 2. Transformation des bactéries JM 105 par la forme réplivative du bactériophage M13

200 µl de la suspension de cellules compétentes sont incubées en présence d'un demi volume de ligat (forme réplivative + ADN insert). Le mélange est laissé 1 h. sur la glace puis porté à +42°C pendant 3 min. (choc thermique). 200 µl de culture microbienne fraîche (D<sub>600</sub> nm = 0,7),

(choc thermique). 200  $\mu$ l de culture microbienne fraîche ( $DO_{600\text{ nm}} = 0,7$ ), 3 ml de milieu H\* (gélose molle) maintenu à +45°C, 800  $\mu$ g de X-Gal et 950  $\mu$ g d'ITPG sont ensuite ajoutés aux bactéries transformées. L'ensemble est ensuite coulé sur boîte de milieu H\* et incubé 16 h. à +37°C. Les plages claires correspondent aux bactériophages ayant insérés l'ADN insert.

### XIII. SEQUENCAGE DES FRAGMENTS D'ADN CLONES

Les fragments d'ADN clonés ont été séquencés par la méthode de terminaison de chaînes décrite par SANGER *et al.* (1977). L'ADN à séquencer est d'abord cloné dans le bactériophage M13 (MESSING *et al.*, 1977) (voir XII). La forme infectieuse du bactériophage, contenant l'ADN sous forme monocaténaire, est produite et l'ADN est isolé comme il est décrit p. A-26.

Les réactions de séquence ont été effectuées à partir du kit de séquençage "Sequenase" commercialisé par U.S.B. Corp. (Cleveland, USA). Ce kit fait appel à la DNA polymérase isolée du bactériophage T7 pour les réactions de synthèse. Le protocole que nous avons utilisé est celui préconisé par le fabricant. A la fin des réactions, les fragments d'ADN néosynthétisés sont dénaturés 2 min. à +95°C puis sont soumis à une électrophorèse sur un gel d'acrylamide à 6 % contenant 50 % d'urée (p:v). Des temps de migration de 2 à 7 h. permettent de séquencer de 350 à 400 bases. La migration est effectuée dans le système BRL modèle S2. Après électrophorèse, le gel est séché puis autoradiographié une nuit à température ambiante.

- AVIV H. et LEDER P. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 1408-1412
- AZARI P. et BAUGH R.F. (1967) Arch. Biochem. Biophys., 118, 138-144
- BAILEY J.M. et DAVIDSON N. (1976) Anal. Biochem., 70, 75-79
- BIRNBOIM H.C. et DOLY J. (1979) Nucl. Acids Res., 7, 1513-1523
- BOYER H.W. et ROULLAND-DUSSOIS D. (1969) J. Mol. Biol., 41, 459-472
- CHERON A. (1975) Thèse de Doctorat ès Sciences - Lille
- CHERON A., MAZURIER J. et FOURNET B. (1977) C. R. Acad. Sci. Paris, 284, 585-588
- COLAVIZZA D. (1984) D.E.A - Lille
- DAVIS B. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404-427
- GROSS E; et WITKOP J. (1961) J. Am. Chem. Soc., 83, 1510-1511
- GUBLER U. et HOFFMAN B.J. (1983) Gene, 25, 263-269
- HUYNH T.V., YOUNG R.A. et DAVIS R.W. in "DNA Cloning. Vol. I - A practical approach" pp. 49-78, D.M. Glover ed., IRL Press, Oxford
- KAMERLING J.P., GERWIG G.J., VLIEGENTHART J.F.G. et CLAMPS J.R. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265
- KRUSIUS T., FINNE J. et RAUVALA H. (1976) FEBS Lett., 71, 117-120
- LEGRAND D., MAZURIER J., METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., JOLLES P., MONTREUIL J. et SPIK G. (1984) Biochim. Biophys. Acta., 787, 90-96
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265
- MAZURIER J. et SPIK G. (1980) Biochim. Biophys. Acta., 629, 399-408
- MANIATIS T., FRISTSCH E.F. et SAMBROOK J. (1982) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- MESSING J. (1983) Methods Enzymol., 101, 20-78
- MESSING J., CREA R. et SEEBURG P.H. (1981) Nucl. Acids Res., 9, 309-321
- MESSING J., GRONENBORN B., MULLER-HILL B. et HOFSCHEIDER P. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 3642-3646
- PALO J. et SAVOLEINEN H. (1972) J. Chromatogr., 65, 447-450
- SANGER F., NICKLEN S. et COULSON A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467
- SOUTHERN E.M. (1975) J. Mol. Biol., 98, 503-517

TARENTINO A.L. et MALEY F. (1974) J. Biol. Chem., 249, 811-817

VIERA J. et MESSING J. (1982) Gene, 19, 259



## R E S U M E

La lactotransferrine (LTF) bovine est une glycoprotéine monocaténaire de 80 kDa, qui fixe réversiblement 2 atomes de fer et qui renferme des glycanes de type oligomannosidique et N-acétyllactosaminique. La détermination de sa structure primaire a été effectuée par l'application, d'une part, de méthodes chimiques et enzymatiques et, d'autre part, par le clonage et le séquençage d'un ADN complémentaire (ADNc). Les résultats obtenus peuvent se résumer de la manière suivante :

1. La détermination de la séquence N-terminale de 7 fragments de la LTF bovine, obtenus par hydrolyse protéolytique ménagée et par action du BrCN, a conduit à la connaissance de l'enchaînement de 229 acides aminés. Par ailleurs, la détermination de la séquence peptidique au voisinage des sites de glycosylation a permis de localiser 3 glycanes sur la chaîne polypeptidique et de montrer que chacun de ces sites était occupé par des glycanes de structure bien définie.

2. Le criblage d'une librairie d'ADNc a fourni 12 clones renfermant des ADNc de 0,4 à 2kb. Le séquençage d'un clone de 860pb a conduit à la détermination des 202 acides aminés C-terminaux de la LTF bovine.

En conclusion, notre étude a permis de déterminer la moitié de la séquence peptidique de la LTF bovine et de confirmer l'existence d'une homologie importante avec les séquences peptidiques des LTF humaine et murine.