

gen 2004244

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

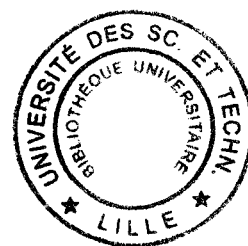
pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Spécialité : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

Valérie SALMON



Production de la lactoferrine humaine
par différents systèmes d'expression.

Applications à l'étude de son site d'interaction avec des
cibles moléculaires.

Soutenue le 8 Décembre 1997 devant la commission d'examen :

Président :	A VERBERT	Professeur
Rapporteurs :	G. DEVAUCHELLE	Directeur de Recherche INRA
	R. CRICHTON	Professeur
Examineurs :	V. GRUBER,	Docteur
	G. SPIK	Professeur
	D. LEGRAND	Chargé de Recherche CNRS, USTL

Ce travail a été réalisé sous la direction du Professeur Geneviève Spik dans le Laboratoire de Chimie biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (unité mixte du CNRS n°111 : Relations Structure-Fonction des constituants membranaires ; directeur : Professeur André Verbert). Il a bénéficié d'une Allocation de Recherche du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

A mes parents,

A Cécile,

A Emmanuel,

*Avec toute mon affection et mon infinie gratitude pour m'avoir
épaulée, réconfortée et encouragée tout au long de mes études.*

Professeur Geneviève Spik,

Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire et de m'avoir fait découvrir la Recherche au sein de votre groupe. Merci aussi pour la confiance que vous m'avez témoignée, ainsi que pour votre disponibilité à mon égard.

Professeur André Verbert,

Je vous remercie de m'avoir acceptée dans l'UMR que vous dirigez. Vous m'avez ainsi permis de travailler dans une atmosphère de bonne humeur au sein d'un laboratoire inoubliable. Je vous suis également reconnaissante d'avoir accepté la présidence du jury de cette Thèse.

Professeur Gérard Devauchelle,

Professeur Robert Crichton,

Malgré vos nombreuses occupations, vous m'avez fait l'honneur de juger cette Thèse et je vous en remercie profondément.

Docteur Véronique Gruber,

Tu as suivi nos travaux avec intérêt au travers de nos nombreux contacts, et je te suis reconnaissante pour tes conseils ainsi que pour ta présence et ta critique sur ce travail.

Docteur Dominique Legrand,

Je te remercie de m'avoir confié la suite de tes travaux et de m'avoir orientée vers la Biologie Moléculaire tout en me laissant la liberté des « manips ». Ton expérience sur la Lactoferrine, et en particulier sur sa structure, m'a été très profitable.

Je tiens à remercier tous ceux qui, par leur aide ou leur amitié ont contribué à la réalisation de cette Thèse, et en particulier les membres du groupe de Geneviève, qui m'ont supportée toutes ces années et avec qui j'ai partagé le pire et le meilleur.

Un grand merci, entre autre à :

Monique, pour mon initiation à la B.M.,

Bertrand, pour la baculo-mania,

Marie-Christine, pour l'analyse des protéines,

Norika, pour son dévouement à la mutagenèse,

Bernadette, pour la partie sucre,

Mathieu, pour son aide en informatique,

Eric, Sabine pour leurs précieux conseils,

D'autres encore, qui m'ont apporté une partie indissociable de ma vie au C9, leur gentillesse et leur amitié que je garde même s'ils sont partis : Agnès, Thierry, Ikram, Guy ...et bien d'autres encore...

Abréviations

ACIDES AMINES

A (Ala)	:	alanine
C (Cys)	:	cystéine
D (Asp)	:	acide aspartique
E (Glu)	:	acide glutamique
F (Phe)	:	phénylalanine
G (Gly)	:	glycine
H (His)	:	histidine
I (Ile)	:	isoleucine
K (Lys)	:	lysine
L (Leu)	:	leucine
M (Met)	:	méthionine
N (Asn)	:	asparagine
P (Pro)	:	proline
Q (Gln)	:	glutamine
R (Arg)	:	arginine
S (Ser)	:	sérine
T (Thr)	:	thréonine
V (Val)	:	valine
W (Trp)	:	tryptophane
Y (Tyr)	:	tyrosine

MONOSACCHARIDES

Fuc	:	fucose
Gal	:	galactose
GalNAc	:	N-acétylgalactosamine
GlcNAc	:	N-acétylglucosamine
Man	:	mannose
NeuAc	:	acide N-acétylneuraminique

DIVERS

BHK	:	Baby Hamster Kidney
COUP	:	Chicken Ovalbumin Upstream Promoteur
EDTA	:	Ethylenediaminetétraacétate disodique
EGF	:	Epidermal Growth Factor
ELISA	:	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ERE	:	Estrogen Responsive Element
FITC	:	Isothiocyanate de fluorescéine
hLf	:	Lactoferrine humaine
Kd	:	Constante de dissociation
kDa	:	Kilodalton
LDL	:	Low Density Lipoprotein

LRP	:	Lipoprotein Receptor Protein	
NK	:	Natural Killer	
PBS	:	Phosphate Buffer Saline	
rhLf	:	Lactoferrine humaine recombinante	
SAST	:	Sulfosuccinimidyl 2-(p-azidosalicylamido)	ethyl-1,3-
dithiopropionate			
SDS	:	Dodécyl sulfate de sodium	
Tris	:	Tris (hydroxyméthyl) amino méthane	

Sommaire

Généralités

La lactoferrine

I. Biosynthèse et distribution de la lactoferrine

A) Distribution tissulaire et cellulaire	13
1- La lactoferrine des milieux de sécrétions	13
2- La lactoferrine issue des leucocytes	13
a- La lactoferrine leucocytaire	13
b- La lactoferrine sérique	14
3- La lactoferrine tissulaire	14
B) Gène et régulation génique de la lactoferrine	14
1- Régulation au cours de la différenciation	15
2- Régulation par voie hormonale	15

II. Structure de la lactoferrine

A) Structure protéique	18
1- Structure primaire	20
2- Structure tridimensionnelle	20
3- Les sites de fixation de fer	20
B) Structure des glycanes	21
C) Etude du site d'interaction de la lactoferrine avec ses ligands	22
1- Zone d'interaction avec le récepteur lymphocytaire	22
2- Zone d'interaction avec les protéoglycanes	23
3- Zone d'interaction avec le récepteur des LDL	23
4- Zone d'interaction avec les parois bactériennes	24

III. Rôles de la lactoferrine

A) Rôles physiologiques de la lactoferrine	24
1- Rôle dans l'absorption intestinale du fer	25

2- Rôle anti-bactérien et anti-fongique	26
a- Activité anti-bactérienne	26
b- Activité anti-fongique	27
3- Rôle anti-viral	28
4- Rôle dans la réponse inflammatoire	28
a- Rôle dans la migration des cellules immunitaires	28
b- Rôle dans l'hyposidérémie inflammatoire	28
c- Rôle dans l'activité bactéricide des leucocytes	29
d- Rôle dans l'activation du complément	30
5- Rôle dans la production de cytokines et dans la régulation de la myélopoïèse	30
6- Rôle dans l'activité cytotoxique des monocytes et des cellules NK	31
7- Rôle dans la prolifération cellulaire	32
8- Rôle dans la maturation des lymphocytes	33
9- Activité facteur de transcription	33
10- Rôle dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire	34
B) Lactoferrine et pathologies	35
1- Marqueur de cancérisation	36
2- Lactoferrine et dégranulation des neutrophiles	36
3 - Déficience en lactoferrine	36
4- Lactoferrine et maladies autoimmunes	36
5- Lactoferrine et désordres neurodégénérateurs	36
IV. Les récepteurs de la lactoferrine	
A) Récepteurs des cellules de mammifères	37
1- Récepteurs hépatocytaires	37
2- Récepteurs entérocytaires	38
3- Récepteurs des neutrophiles	39
4- Récepteurs des monocytes et des macrophages	40
5- Récepteurs lymphocytaires	40
6- Récepteur plaquettaire	42
7- Récepteur des cellules épithéliales de glande mammaire	42
8- Les protéoglycannes	43

B) Récepteurs bactériens	44
C) Devenir du complexe lactoferrine/récepteur	44
1- Fixation sans endocytose	44
2- Transcytose de la lactoferrine	45
3- Endocytose de la lactoferrine	45
a- Les hépatocytes	46
b- Les lymphocytes	47

Les protéines recombinantes

I. Les différents types d'expression

A) Le système procaryote	48
B) Les levures	49
C) Les cellules de mammifères	50
D) Le système baculovirus	51
1- Le cycle naturel du baculovirus	51
2- Application aux biotechnologies	53
a- Techniques d'expression de protéines hétérologues	53
b- Modifications post-traductionnelles	55
E) Les animaux transgéniques	56
F) Les plantes transgéniques	56
1- <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , plasmide Ti et plante	56
a- Intégration d'un ADN exogène dans le génome végétal	56
b- Mécanisme biologique de l'interaction <i>Agrobacterium T./</i> plante	57
2- Application aux biotechnologies	59
a- Les vecteurs binaires d'expression	59
b- Les taux d'expression	60
c- Les promoteurs	60
d- L'adressage des protéines chez les végétaux	59
e- La maturation des protéines recombinantes	63

II. Protéines recombinantes et glycosylation : problèmes et perspectives

A) Importance de la glycosylation	64
1- Effets sur la solubilité	64
2- Effets sur la résistance à la protéolyse	65
3- Effets sur l'antigénicité	65
4- Effets pharmacocinétiques	65
5- Effets directs sur l'activité biologique	66
B) Les systèmes d'expression et leur glycosylation	67
1- Les levures	67
2- Les cellules de mammifères	67
3- Les cellules d'insectes	68
4- Les cellules végétales	69

III. Clonage et expression de la lactoferrine

A) Expression par des cellules de mammifères	72
B) Expression par les levures	73
C) Expression par les animaux transgéniques	73
D) Expression par les cellules végétales	74

Travaux personnels

Objectifs	76
Expression de la lactoferrine humaine dans les cellules BHK	
I. Introduction	79
II. Constructions des vecteurs	80
A) Clonage de l'ADNc de la lactoferrine	80
B) Construction du vecteur d'expression	80
III. Expression et purification de la lactoferrine recombinante	
A) Transfection et sélection des clones cellulaires recombinants	81
B) Production et purification de la lactoferrine recombinante	81
C) Analyse de la structure glycanique de la lactoferrine recombinante	82
1- Introduction	82
2- Résultats et conclusion	83
a- Résultats	83
b- Conclusion	83
Expression de la lactoferrine humaine par le système baculovirus / cellules d'insecte	
I. Introduction	86
II. Résultats	87
A) Construction des plasmides	87
B) Transfection, sélection d'un clone viral recombinant et expression de la lactoferrine	88

C) Purification	90
D) Analyse de la lactoferrine recombinante	90
1- Analyse de la séquence N-terminale	90
2- Détermination de la masse moléculaire par spectrométrie de masse	92
3- Analyse de la fraction glycanique	92
4- Analyse spectroscopique UV/visible	94
5- Analyse de la fraction	94
6- Fixation aux cellules lymphoblastiques T Jurkat	94
III. Conclusion	96

Expression de la lactoferrine humaine dans du tabac transgénique

I. Introduction	98
II. Résultats	
A) Construction des vecteurs binaires d'expression	100
1- Construction du plasmide pBIOC21	100
2- Construction du plasmide pBIOC21-PSLf-Lf	101
3- Construction du plasmide d'expression pBIOC21-PSSp-Lf	103
B) Détection des lactoferrines recombinantes et sélection des transformants	105
1- Sélection des transformants	105
2- Analyse en SDS-PAGE des protéines recombinantes	107
C) Analyse des caractéristiques biochimiques des lactoferrines recombinantes Lf1 et Lf2	107
1- Analyse de la séquence N-terminale	107
2- Comportement chromatographique et purification de la Lf2	109
3- Analyse par spectrométrie de masse en mode MALDI/TOF	109
4- Composition de la fraction glycanique	111

5- Expériences de fixation aux cellules lymphoblastiques T Jurkat et entérocytaires HT29-18C1	111
a- Fixation aux cellules Jurkat	113
b- Fixation aux cellules HT29-18C1	113
III. Conclusion	115

Expression de lactoferrines mutées dans les cellules BHK et dans le système baculovirus/cellules d'insecte

I. Description des régions mutées	117
II. Mutagenèse dirigée et expression des protéines	119
A) Mutagenèse dirigée	119
B) Expression des ADNc mutés de lactoferrine humaine et purification des protéines	120
III. Application à l'étude des interactions de la lactoferrine avec ses cibles cellulaires et moléculaires	
A) Interactions de la lactoferrine avec le récepteur lymphocytaire	123
1- Rôle de la région 1-5 de la lactoferrine humaine dans les interactions	
a- Introduction	123
b- Résultats	123
2- Rôle des régions 28-34 et 39-42 dans les interactions	128
3- Conclusion	131
B) Interactions de la lactoferrine avec les LPS	131
1- Introduction	131
2- Résultats et conclusion	132

Discussion 134

Appendice technique 140

Bibliographie 152

Généralités

La Lactoferrine

Introduction

Les transferrines forment une famille de glycoprotéines monocaténaires d'environ 80 kDa possédant la propriété de fixer réversiblement deux ions ferriques. Cette famille comprend :

- La sérotransferrine, principalement localisée dans le sang mais également dans d'autres milieux biologiques. Son rôle consiste essentiellement à transporter le fer de l'organisme des formes de stockage aux formes actives (Schade et Caroline, 1946).

- La lactoferrine présente dans le lait, d'où elle a d'ailleurs été isolée pour la première fois par Montreuil *et al.* en 1960. Elle est également présente dans les sécrétions biologiques ainsi que dans les granules secondaires des neutrophiles.

- La mélanotransferrine (p97), protéine membranaire isolée de mélanomes humains (Brown *et al.*, 1982).

I. Biosynthèse et distribution de la lactoferrine

A) Distribution tissulaire et cellulaire

La lactoferrine est une protéine présente largement dans l'organisme à des concentrations fort variables. Sa biosynthèse est d'origine diverse puisqu'elle est à la fois un produit de sécrétion des cellules épithéliales, un composé des granules des leucocytes neutrophiles qui la déversent dans le sang, et enfin un constituant de certains tissus.

neutrophiles.

1 ~ La lactoferrine des milieux de sécrétion

Après sa découverte dans le lait de Femme, la lactoferrine fut mise en évidence dans les laits de nombreuses autres espèces animales comme la vache, la chèvre, la truie ou encore la souris (Masson et Heremans, 1971), mais à des concentrations fort variables. Dans le lait de Femme, la concentration de lactoferrine est de 1 à 2 g/l, celle-ci est particulièrement élevée dans le colostrum, puis diminue au cours de la lactation. Dans le lait, la lactoferrine est présente principalement sous forme apo, c'est-à-dire non saturée en fer (Lønnerdal et Forsum, 1985).

La lactoferrine est également présente dans la plupart des autres sécrétions. Ainsi, elle a été mise en évidence dans la salive, la bile, le suc pancréatique et les sécrétions de l'intestin grêle. On la retrouve également dans la plupart des mucus comme les sécrétions bronchiques, les sécrétions vaginales, nasales et intestinales (Masson, 1970).

2 ~ La lactoferrine issue des leucocytes

a- La lactoferrine leucocytaire

La lactoferrine est présente dans les leucocytes neutrophiles où elle est localisée dans les granules secondaires ne contenant pas de myelopéroxydase (Masson *et al.*, 1969). Elle est synthétisée au cours de la granulopoïèse du stade promyélocytaire au stade métamyélocytaire (Rado *et al.*, 1984).

b- La lactoferrine sérique

Lors de la dégranulation des neutrophiles, la lactoferrine se retrouve dans le plasma (Rado *et al.*, 1984) à une concentration très faible (de 0,4 à 2 mg/l), comparativement à celle de la sérotransferrine (2 à 3 g/l). Cette concentration peut considérablement augmenter dans certains cas pathologiques où elle peut atteindre

22 mg/l dans des cas de leucémie myéloïde chronique (Benett et Mohla *et al.*, 1976).

3 ~ La lactoferrine tissulaire

Des études immunohistologiques réalisées par Mason et Taylor en 1978 ont révélé l'existence de la lactoferrine dans la glande mammaire lactante, le tractus gastrointestinal et les bronches. En 1970, Tourville *et al.* l'ont identifiée dans l'endomètre.

La biosynthèse de la lactoferrine utérine est soumise à la régulation par les oestrogènes (Teng *et al.*, 1986 ; Pentecost et Teng, 1987). Ces résultats suggèrent un rôle important de la lactoferrine lors des processus de reproduction. Par la suite, la lactoferrine a également été mise en évidence dans les tissus de l'estomac (Luqmani *et al.*, 1991), et dans le cerveau (Leveugle *et al.*, 1994).

B) Gène et régulation génique de la lactoferrine

Le gène de la lactoferrine humaine a été localisé sur le chromosome 3 aux loci q 21- q 23 (Teng *et al.*, 1987). Récemment, Siebert *et al.*, (1997) ont identifié une forme alternative d'ARNm de lactoferrine, qui est exprimée dans plusieurs types tissulaires et qui provient d'un épissage alternatif du gène de la lactoferrine. La traduction de ce nouvel ARN n'a pas été démontrée. Néanmoins, si elle existe, elle engendrerait une lactoferrine déletée de son peptide signal et des 25 premiers résidus de la protéine mature.

A ce jour, la structure du gène de la lactoferrine n'est pas encore totalement élucidée. En revanche, la compréhension de sa régulation a fait l'objet de nombreux travaux.

Si la moelle osseuse, la glande mammaire et l'utérus sont les lieux principaux de biosynthèse de la lactoferrine, la régulation de cette synthèse est tissu-spécifique. Ainsi, l'expression de la lactoferrine dans les neutrophiles matures est réalisée au cours de la différenciation terminale, alors que dans les glandes

mammaires lactantes et les organes femelles de reproduction, l'expression est sous contrôle hormonal.

1 ~ Régulation au cours de la différenciation

L'étude du taux d'ARNm codant pour la lactoferrine à différents stades de la différenciation de la lignée granulocytaire de patients atteints de leucémie, a montré que les messagers n'étaient détectables qu'au stade granulocyte (Rado *et al.*, 1984). Il semblerait que la lactoferrine joue un rôle dans le programme génétique conduisant à un granulocyte mature normal (Rado *et al.*, 1987).

Récemment enfin, la régulation du gène de la lactoferrine a été étudiée sur la lignée murine 32 D C13. Sous l'influence du G-CSF, celle-ci se différencie en granulocytes matures et augmente l'expression du gène de la lactoferrine (Valtieri *et al.*, 1987). De plus Friedman *et al.* (1991) ont montré que lors de la différenciation myéloïde terminale de cette lignée, la vitesse d'initiation de la transcription du gène de la lactoferrine est multiplié par 9.

2 ~ Régulation par voie hormonale

Dans la glande mammaire lactante et les organes reproducteurs, la lactoferrine est régulée par voie hormonale. La sécrétion de lactoferrine utérine est sous contrôle oestrogénique (Teng, 1986, Pentecost et Teng, 1987). Ainsi, la synthèse de lactoferrine est sous contrôle de la prolactine dans le tissu mammaire (Green et Pastewka, 1978) bien qu'il semble exister une corrélation entre le nombre de récepteurs aux oestrogènes et le taux d'ARNm de lactoferrine dont les quantités respectives sont inversement proportionnelles (Campbell *et al.*, 1992).

Après de nombreuses études réalisées *in vitro*, l'expression de la lactoferrine a été étudiée *in vivo*, en particulier dans l'utérus de souris. C'est ainsi que des souris traitées aux oestrogènes par trois injections répétées voient leur taux d'ARNm multiplié par 300 (Pentecost et Teng, 1987). D'autres études ont alors été menées lors du cycle hormonal naturel (Walmer *et al.*, 1992; Newbold *et al.*, 1992). Au début du cycle, le taux de messagers de la lactoferrine est bas et on ne trouve pas de trace de lactoferrine dans le fluide luminal utérin. Lors du pic d'oestradiol, le taux

de messagers et de lactoferrine atteint son maximum et la protéine est présente dans le fluide utérin. Cette augmentation des ARNm de la lactoferrine provient non seulement d'une augmentation de la synthèse des messagers, mais aussi de l'augmentation du nombre de cellules les synthétisant. Lors de la seconde partie du cycle, lorsque la progestérone est sécrétée en quantité importante, le taux de lactoferrine diminue, tout comme celui de ses ARNm. Ces travaux montrent donc l'influence du cycle hormonal sur la synthèse de lactoferrine.

La caractérisation du promoteur du gène codant la lactoferrine de souris (Liu et Teng, 1991) a mis en évidence la séquence consensus ERE (Estrogen-Responsive Element) de réponse aux oestrogènes, séquence chevauchant un élément COUP (Chicken ovalbumin upstream promoteur) (Fig. 1). Ce module composite, situé de -349 à -329 du site d'initiation de transcription, est à la fois le site de fixation des récepteurs aux oestrogènes ainsi que d'un facteur de transcription COUP, qui entre en compétition pour la fixation sur cette séquence nucléaire. Ainsi, une réduction du facteur de transcription COUP entraîne une augmentation de la réponse aux oestrogènes et réciproquement (Liu *et al.*, 1993). Par la suite, Yang *et al.*, (1996) ont réussi à délimiter plus précisément les zones de fixation des facteurs de transcription. Nelson *et al.* (1991) ont également démontré que l'expression du gène de la lactoferrine de l'utérus murin est régulée par l'EGF, via la présence d'un EGF Responsive Element localisé de -80 à -60 en amont du site d'initiation de la lactoferrine murine (Shi *et al.*, 1994). Néanmoins, une CRE (AMPC Response Element) et une séquence ATAAA (TATA box imparfaite) seraient indispensables à l'action de l'EGF (Teng, 1995 ; Shi *et al.*, 1996).

Chez l'homme, une séquence imparfaite ERE a été mise en évidence (Teng *et al.*, 1992). Il semblerait néanmoins que les mécanismes de régulation par les oestrogènes des gènes de la lactoferrine humaine et murine soient différents. Shi et Teng (1996) ont examiné les niveaux relatifs des messagers des ER et des COUP-TF en fonction de ceux de lactoferrine dans différents tissus. Le taux d'ARNm de lactoferrine est dépendant des oestrogènes uniquement dans les organes reproducteurs. Néanmoins, ces hormones n'affectent pas l'expression des messagers des ER et COUP-TF dans le tissu utérin. Ceci confirme que le COUP n'est pas le seul élément de régulation de la lactoferrine.

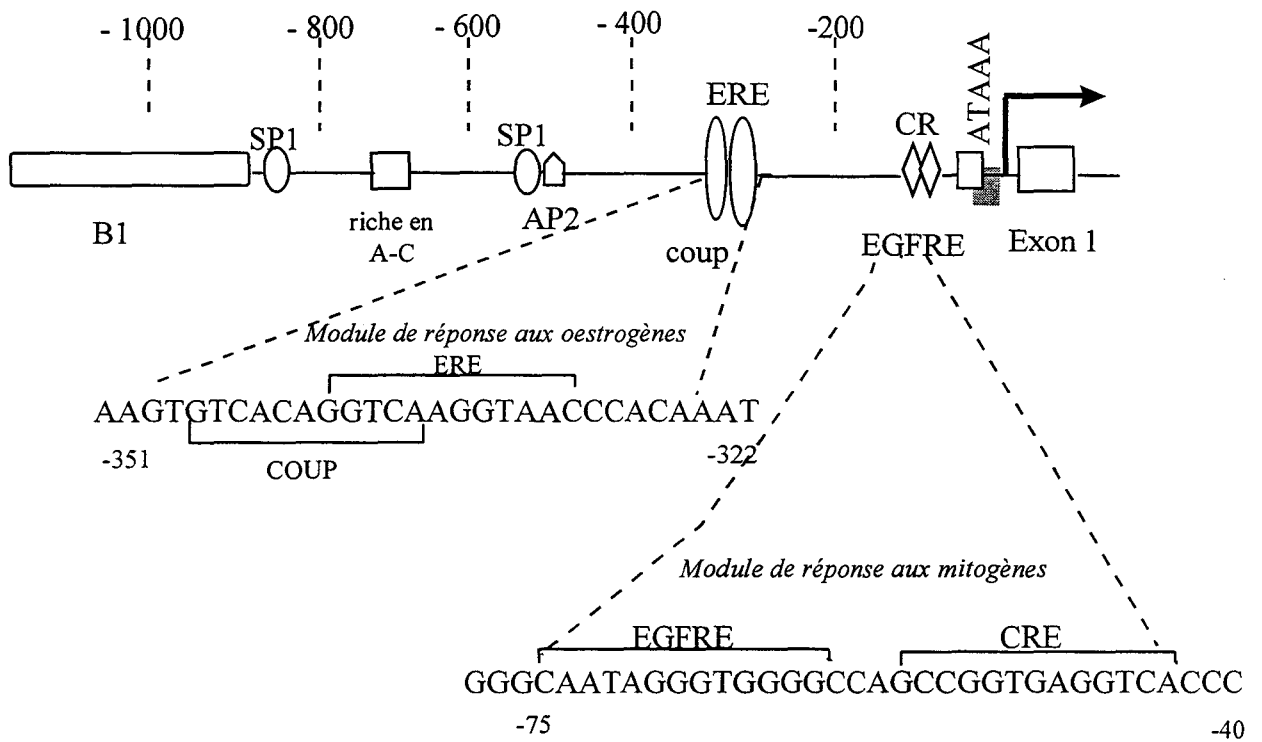


Fig. 1 : Représentation schématique des éléments de régulation en 5' du gène de la lactoferrine murine (Teng, 1995)

II. Structure de la lactoferrine

Les transferrines présentent un ensemble de caractères communs dont le principal est celui d'être des glycoprotéines monocaténares et bilobées, possédant une masse moléculaire proche de 80 kDa, et capables de fixer réversiblement deux ions ferriques.

A) Structure protéique

1 ~ Structure primaire

L'étude de la séquence de la lactoferrine humaine a tout d'abord été établie au Laboratoire en collaboration avec le laboratoire du Professeur Jollès, à partir de fragments obtenus par hydrolyse enzymatique ou chimique de la lactoferrine isolée du lait (Metz-Boutigue *et al.*, 1984). Cette séquence a révélé 37% d'homologie entre les moitiés N et C terminales qui constituent les deux lobes de la protéine. Cette séquence a été quelque peu corrigée par des données cristallographiques (Anderson *et al.* 1989).

Plus récemment, l'ADNc de la lactoferrine de glande mammaire a été cloné (Powell et Ogden, 1990, Rey *et al.*, 1990). Ces auteurs ont révélé la séquence de cette protéine de 692 acides aminés, et confirmé ainsi la séquence publiée précédemment par Metz-Boutigue *et al.*, en 1984. Les ADNc d'autres espèces ont également pu être séquencés : il s'agit de la lactoferrine de souris (Pentecost et Teng 1987), de vache (Pierce *et al.*, 1991) et de truie (Lydon *et al.*, 1992).

Il est intéressant de noter que l'étude comparative de la séquence peptidique de la lactoferrine et de la sérotransferrine met en évidence 59% d'identité entre les deux transferrines (Mazurier *et al.*, 1983 ; Metz-Boutigue *et al.*, 1984). Ces observations sont en faveur de la duplication d'un gène ancestral (Metz Boutigue *et al.*, 1984).

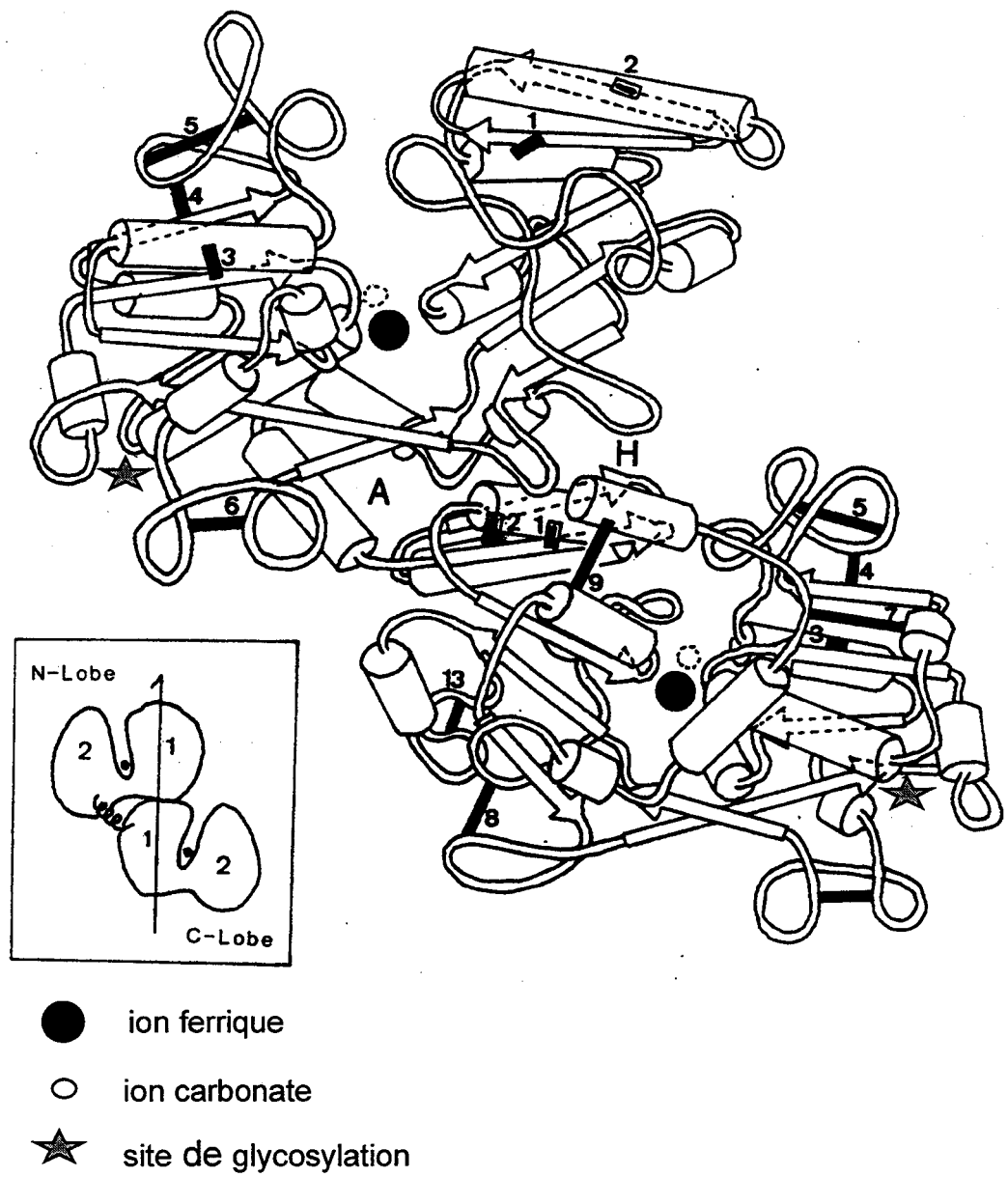


Fig 2 : Représentation schématique de la lactoferrine humaine (Baker et al., 1987)

2 ~ Structure tridimensionnelle

La lactoferrine et la sérotransferrine possèdent non seulement une structure primaire, mais aussi une conformation spatiale très proches. Ainsi, leur chaîne polypeptidique est formée de 2 lobes (lobe N terminal et lobe C terminal) reliés par un petit peptide en hélice α (Legrand *et al.*, 1986, Anderson *et al.*, 1987) (Fig.2).

Par hydrolyse trypsique de la lactoferrine humaine, Legrand *et al.*, (1986) ont obtenu le fragment N trypsique (N-t) de 30 kDa (résidus d'acides aminés 4 à 283), et le fragment C trypsique (C-t) de 50 kDa (résidus d'acides aminés 284 à 692). En proportion équimolaire, ces fragments sont capables de se réassocier en un complexe non covalent N-t/C-t qui possède des propriétés électrophorétiques et spectroscopiques voisines de celle de la lactoferrine humaine (Legrand *et al.*, 1986). Chaque lobe de la lactoferrine humaine est constitué de 2 domaines à l'interface desquels se trouve le site de fixation du fer. Les deux domaines 1 et 2 possèdent la même organisation structurale basée sur l'alternance de feuillets β et d'hélice α (Anderson *et al.*, 1987, 1989; Baker *et al.*, 1987). Ainsi, le lobe N-term est constitué des domaines NI (résidus 1 à 90) et NII (résidus 91 à 253) alors que le lobe C-term est formé des lobes CI (acides aminés 347 à 433) et CII (acides aminés 437 à 577). Le domaine NI est mobile et peut pivoter de 30° par rapport au domaine NII. Cette rotation s'effectue autour des résidus His⁹¹ et Pro²⁵¹ localisés entre les deux feuillets β et les deux hélices α (Anderson *et al.*, 1989) ce qui explique que la lactoferrine puisse adopter deux conformations : une conformation ouverte préférentiellement rencontrée sous la forme apo-protéine et une conformation fermée essentiellement rencontrée chez la ferriprotéine.

3 ~ Les sites de fixation du fer

Hormis la mélanotransferrine, les transferrines peuvent fixer de manière réversible 2 ions ferriques en développant une coloration rose saumon dont le maximum d'absorption est centré à 465 nm. La fixation de chaque ion ferrique nécessite celle d'un ion carbonate. A pH 6,4, la constante d'association pour le complexe $[\text{Fe}^{3+}]_2$ -transferrine est de l'ordre de 10^{24} M^{-1} mais diminue avec le pH

(Aisen et Leibman, 1971). La lactoferrine a une affinité pour le fer ferrique 200 fois plus forte que celle de la sérotransferrine (Aisen et Liebman, 1971). Des études par diffraction des rayons X de la lactoferrine humaine à 3,5 Å (Anderson *et al.*, 1987; Baker *et al.*, 1987), à 2,8 Å (Anderson *et al.*, 1989) et 2,2 Å (Haridas *et al.*, 1995) ont montré que chaque ion ferrique est coordonné à 2 résidus de Tyr, d'His, à 1 Asp et ion carbonate. Ces acides aminés sont les mêmes dans chacun des 2 lobes :

-Asp⁶¹, Tyr⁹³, Tyr¹⁹³, His²⁵⁴, dans le lobe N-t

-Asp³⁹⁶, Tyr⁴³⁶, Tyr⁵⁰⁹, His⁵⁷⁸ dans le lobe C-t.

Les 2 sites de fixation du fer de la lactoferrine possèdent une forte affinité pour ce métal. Cependant, la libération du fer est réalisée à des pH différents. Ainsi, le lobe N-t libère son fer à pH 5,8 (lobe acido-labile), alors que le lobe C-t (lobe acido-stable) relargue son fer à pH 4 (Mazurier et Spik, 1980). Cette différence de stabilité peut s'expliquer par un plus grand nombre de ponts disulfures dans le C-t, d'où une structure plus compacte (Mazurier *et al.*, 1981, Baker *et al.*, 1987; Baker *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1989). Par ailleurs, l'analyse cristallographique de l'apolactoferrine (Anderson *et al.*, 1990, Haridas *et al.*, 1995) démontre que la fixation du fer induit des changements conformationnels dans la molécule.

Dans l'apo-protéine, le site de fixation du lobe N-t est largement ouvert et se referme lors de la fixation du Fe³⁺, ce qui est dû à la flexibilité des chaînes polypeptidiques reliant les 2 domaines (Anderson *et al.*, 1989 et Baker *et al.*, 1991). La protéine devient alors plus compacte et moins sensible à la dégradation protéolytique.

B) Structure des glycannes

De nombreuses études sur la structure primaire des glycannes des transferrines ont été réalisées dans notre laboratoire. Une grande diversité a été mise en évidence, d'une part, au niveau du nombre et de la localisation des sites de glycosylation et d'autre part, au niveau de la structure primaire des glycannes des transferrines (Spik *et al.*, 1982, 1994).

En ce qui concerne la structure des glycannes, la lactoferrine isolée du lait de Femme porte 3 sites de glycolysation qui sont l'Asn¹³⁸, l'Asn⁴⁷⁹ et l'Asn⁶²⁴, le

premier étant situé dans le lobe N-t et les deux autres dans le C-t. La glycosylation s'effectue préférentiellement sur 2 sites (Asn¹³⁸ et Asn⁴⁷⁹) dans 85 % des molécules alors que la glycosylation d'un site (Asn⁴⁷⁹) et des trois sites simultanément se produit dans 5 et 9 % des cas respectivement (van Berkel *et al.*, 1996). Les glycanes de la lactoferrine sont de type N-acétylglucosaminique mono ou disialylés et fucosylés (Spik *et al.*, 1982). Les résidus de fucose sont branchés en α -1,6 sur la N-acétylglucosamine du point d'attache ou en α -1,3 sur la N acétylglucosamine 5' de l'antenne. La lactoferrine leucocytaire diffère de la précédente par l'absence totale de fucose (Derisbourg *et al.*, 1990).

C) Etude du site d'interaction de la lactoferrine avec ses ligands

Les interactions entre la lactoferrine et ses différents ligands cellulaires s'effectuent par l'intermédiaire de plusieurs types de fixation plus ou moins spécifiques et plus ou moins affins selon les cellules.

1 ~ Zone d'interaction avec le récepteur lymphocytaire

La localisation du site d'interaction de la lactoferrine humaine avec le récepteur des lymphocytes humains activés a été déterminée en grande partie. Dans un premier temps, l'étude de la fixation de différents fragments protéolytiques, obtenus par hydrolyse ménagée de la lactoferrine a montré que seul le fragment N-t était capable de se fixer sur le récepteur lymphocytaire (Rochard *et al.*, 1989). L'hydrolyse ménagée du fragment N-terminal a conduit à l'obtention de nombreux fragments dont le peptide de 6 kDa, c'est-à-dire comprenant les résidus 4 à 52, qui a permis une inhibition significative de la fixation de la lactoferrine sur son récepteur. Ce site de fixation est constitué de 2 feuillets β reliés par des structures en hélice α . Ces résultats préliminaires sont confirmés par l'étude de l'interaction de la lactoferrine modifiée et des cellules lymphoblastiques Jurkat. La fixation du FITC sur le résidu Lys²⁶⁴ ou la fixation du SASD sur le résidu Lys⁷⁴ modifient les propriétés de fixation du ligand sur son récepteur en masquant la région 4-52 de la

molécule. L'analyse par modélisation moléculaire de cette zone 4-52 de la protéine suggère que 2 zones (résidus 28-34 et 38-45) sont probablement impliquées dans le site d'interaction avec le récepteur lymphocytaire (Legrand *et al.*, 1991, 1992). Des études approfondies sur cette région en modélisation moléculaire ont permis de déterminer précisément les implications possibles des acides aminés de cette zone. Ainsi, la sélectivité de l'interaction serait due aux acides aminés Arg³, Gln⁷, Asn¹³, Gln²³, Arg²⁴, Ser³⁸, Gln⁵⁰ et Asn⁵⁵, alors que l'affinité de fixation ferait intervenir les acides aminés Pro¹⁴, Phe²⁰, Asp⁴³, Ser⁴⁴, Pro⁴⁵ et Gln⁴⁷ (Elass *et al.*, 1996a, b).

2 ~ Zone d'interaction avec les protéoglycannes

Les GAGs (glycosaminoglycannes) sont des polysaccharides anioniques qui se trouvent à la surface de la plupart des cellules et dans la matrice extra-cellulaire. Les protéoglycannes représentent un groupe de molécules qui se caractérisent par une attache covalente de un ou plusieurs GAG(s) à un core protéique. La lactoferrine est capable de se fixer aux polysaccharides anioniques. Cette propriété a été utilisée pour purifier la lactoferrine par chromatographie sur héparine Sepharose (Blackberg et Hernell, 1980). Plus récemment, la chromatographie d'affinité de la lactoferrine sur GAG a été réalisée (Zou *et al.*, 1992). Les travaux de Mann *et al.*, (1994) ont établi que les GAGs se fixent sur une région de la lactoferrine humaine qui a été localisée dans les 33 premiers résidus. Deux séquences de la lactoferrine agissent en synergie dans cette fixation : G¹RRRRS⁶ et R²⁸KVR³¹. En effet, ces séquences sont en réalité très proches d'un point de vue conformationnel et l'ensemble forme une région très basique que l'on retrouve sur d'autres protéines. Ces travaux ont été confirmés par ceux de Wu *et al.* (1995) pour qui les Arg^{5, 25, 28, 31} et la Lys²⁹ forment le site de fixation aux protéoglycannes.

3 ~ Zone d'interaction avec le récepteur des apolipoprotéines de faible densité (LRP)

Une analyse de la séquence de l'Apo E reconnue par le Lipoprotein receptor-related protein (LRP) et de la lactoferrine a permis à Huettinger *et al.*, (1992) de

montrer que le site de reconnaissance du récepteur de l'Apo E: Arg-X-X-Arg-Lys-Arg (résidus 142-147) était en partie retrouvé dans la lactoferrine: Arg-X-X-Arg-Lys-Val (résidus 25-30). Cette étude a été reprise en comparant la structure tridimensionnelle du site de reconnaissance du récepteur de l'Apo E avec la structure 3D de la lactoferrine. La région 16-32 de la lactoferrine est très homologue dans sa conformation (hélice α) à la région 137-148 de l'Apo E avec une superposition presque exacte des résidus Arg¹⁴², Arg¹⁴⁵, Arg¹⁴⁷ du site actif.

4 ~ Zone d'interaction avec les parois bactériennes

La lactoferrine est capable d'interagir sur la paroi des bactéries., En effet, Appelmeik *et al.* (1994) avancent l'hypothèse selon laquelle la fixation de la lactoferrine s'effectuerait sur le lipide A des LPS, et qu'elle serait suivie par l'extraction de ces LPS de la membrane externe des bactéries, en les endommageant irrémédiablement. La région bactéricide de la lactoferrine humaine (lactoferricine A) et bovine (lactoferricine B) a été identifiée par Bellamy *et al* (1992a, b): elles sont toutes deux localisées dans une boucle du lobe N-terminal, comprenant 18 acides aminés, boucle formée par un pont disulfure entre les résidus de Cys 20 et 37 pour la lactoferrine humaine et 19 à 36 pour la lactoferrine bovine. En outre, Ellass-Rochard *et al.* (1995) ont démontré l'importance de la boucle formée par les résidus 28-34 de la lactoferrine humaine dans sa fixation aux LPS.

III. Rôles de la lactoferrine

A) Rôles physiologiques de la lactoferrine

Bien que la structure de la lactoferrine soit très semblable à celle de la sérotransferrine, les fonctions de ces deux protéines sont néanmoins profondément différentes (Iyer et Lønnerdal, 1993, Sanchez *et al.* 1992).

Alors que la sérotransferrine est principalement synthétisée par les hépatocytes qui la sécrètent et la libèrent dans le plasma, la lactoferrine est élaborée par les cellules épithéliales glandulaires et par les leucocytes neutrophiles

polymorphonucléaires. La concentration et la demi-vie plasmatique de ces deux protéines sont également très différentes. La concentration plasmatique de la sérotransferrine est d'environ 2,5 mg/ml et sa demi-vie est de plusieurs jours. Quant au taux de lactoferrine, il dépasse rarement 1 µg/ml et sa demi-vie n'est que de quelques minutes. De plus à l'état physiologique, la sérotransferrine possède un taux de saturation en fer de l'ordre de 30% alors que la lactoferrine circule principalement sous sa forme apo, c'est-à-dire non saturée en fer. Ainsi, alors que la sérotransferrine est incontestablement le principal transporteur de fer de l'ensemble des cellules de l'organisme, les rôles de la lactoferrine paraissent beaucoup moins clairs mais néanmoins très nombreux en particulier dans la défense de l'organisme.

1 ~ Rôle dans l'absorption intestinale du fer

L'hypothèse que la lactoferrine est impliquée dans l'absorption intestinale du fer est venue de l'observation que chez les nourrissons alimentés au lait maternel, l'incidence de la carence en fer est très faible (Saarinen et Siimes, 1977). De même, seuls ces enfants maintiennent un important stock de fer jusqu'à l'âge de 6 mois (Siimes *et al.*, 1984; Lönnerdal *et al.*, 1994), ce qui suggère une grande biodisponibilité du fer contenu dans le lait de Femme. Ainsi, le pourcentage d'absorption peut atteindre 81% au cours des trois premiers mois de la vie puis diminue rapidement. Parmi les différents constituants du lait de Femme, la lactoferrine est un des candidats pour expliquer, d'une part, l'importante biodisponibilité du fer du lait et d'autre part, la régulation de cette absorption (Spik, 1988). Cox *et al.* ont étudié dès 1979 l'implication de la lactoferrine sur l'absorption du fer par l'intestin humain. Le récepteur entérocytaire de la lactoferrine a été mis en évidence pour la première fois par Mazurier *et al.* (1985) chez le Lapin puis par Hu *et al.* (1988, 1990) chez la Souris. Enfin, Mikogami *et al.* (1994, 1995) ont étudié le récepteur entérocytaire humain et ont montré sur des cultures de cellules entérocytaires HT29 que le nombre de récepteurs de lactoferrine était doublé en présence de chélateur de fer. Cette augmentation est due à une synthèse *de novo* de récepteurs. L'expression du récepteur de la lactoferrine est donc régulée par le manque de fer et cette carence induit également une augmentation de l'internalisation du récepteur de la lactoferrine par les entérocytes.

Ainsi, le récepteur de la lactoferrine semble jouer un rôle dans la nutrition martiale en particulier en cas de carence en fer (Mikogami *et al.*, 1995). D'autres groupes tels que celui de Sanchez *et al.* (1996) ont travaillé sur une autre lignée entérocytaire, la lignée Caco 2 et ont mis en évidence une absorption du fer lié à la lactoferrine mais n'ont pas pu identifier de récepteurs spécifiques.

2 ~ Rôle antibactérien et antifongique

a- Activité antibactérienne

La lactoferrine est un agent anti-microbien dont l'action met en jeu plusieurs mécanismes. Le premier est l'effet bactériostatique de la lactoferrine par ferriprivation (Spik *et al.*, 1978). En séquestrant le fer du milieu environnant, la lactoferrine inhibe la division des bactéries, le fer étant un élément indispensable à la biosynthèse de l'ADN. De plus, un mécanisme d'action plus complexe faisant intervenir des anticorps a été démontré. En effet, l'activité bactériostatique de la lactoferrine augmente en présence d'IgA et d'IgG spécifiques des bactéries pathogènes (Spik *et al.*, 1978). Ces résultats ont souvent été confirmés par la suite et il a même été démontré que le complexe IgA-lactoferrine est stabilisé par des liaisons covalentes (ponts disulfures) (Akin *et al.*, 1994). En plus de l'activité bactériostatique, cet auteur démontre un pouvoir bactéricide du complexe pourvu que la lactoferrine soit sous sa forme apo.

D'autre part, le lysozyme peut associer son activité lytique pour les parois des bactéries Gram + à l'action de la lactoferrine (Perraudin et Prieels, 1982). Ainsi, dans le lait, la lactoferrine, le lysozyme et les anticorps peuvent agir en synergie lors d'une attaque microbienne (Bullen et Armstrong, 1979). D'autres études ont montré que la lactoferrine inhibe l'adhésion de souches enterotoxigéniques d'*E. coli* et évite ainsi l'hémagglutination induite par ces bactéries pathogènes (Giugliano *et al.*, 1995)

Le second effet antibactérien de la lactoferrine est lié à son pouvoir bactéricide (Revue générale, cf Spik et Montreuil, 1983). La lactoferrine se fixerait à la paroi des bactéries Gram - ce qui la déstabiliserait et provoquerait une libération des lipopolysaccharides (LPS) (Soukka *et al.*, 1991). Les parois

deviendraient ainsi plus fragiles et plus sensibles à l'action d'antibiotiques hydrophobes (Ellison *et al.*, 1988, 1991). Ces hypothèses ont été confirmées par l'utilisation de la microscopie électronique qui montre l'effet déstabilisateur de la lactoferrine sur les bactéries Gram -, dont *E. coli* (Yamauchi, *et al.* 1993).

Il a été également montré il y a peu de temps par Erdei *et al.* (1994) que la lactoferrine se fixe aux porines de différentes bactéries Gram- et notamment d'*E. coli*. Les porines permettant le passage des substances nutritives vitales pour la bactérie, la lactoferrine perturberait ainsi cette perméabilité des membranes.

b- Activité antifongique

Un effet antifongique de la lactoferrine humaine a été établi sur plusieurs souches de *Candida* (Soukka *et al.*, 1992; Nikawa *et al.*, 1993, 1994, 1995). Des études ont également été réalisées avec la lactoferrine bovine et ont démontré cette action à la fois sur des levures et sur des champignons filamenteux. L'effet de la lactoferrine bovine serait d'ailleurs supérieur à celui de l'apolactoferrine bovine entière et similaire à celui de la polymyxine B, un antibiotique de type peptide cationique connu pour ses propriétés de déstabilisation des membranes. La lactoferrine B interagirait directement à la surface du champignon en induisant ainsi des modifications de son ultrastructure (Bellamy *et al.*, 1994).

3 ~ Rôle antiviral

Récemment, plusieurs auteurs ont mis en évidence une activité antivirale de la lactoferrine humaine. En effet, certains types de virus pénètrent dans la cellule par un mécanisme qui fait intervenir une adsorption sur des protéoglycannes des membranes des cellules cibles (Neyts *et al.*, 1992, Compton *et al.*, 1993), suivi d'une fixation à un récepteur spécifique (Cooper *et al.*, 1991, Söderberg *et al.*, 1993) suivi de la fusion de la membrane virale avec celle de l'hôte. La lactoferrine se fixant aux héparanes sulfates des cellules grâce à sa forte basicité est ainsi capable d'inhiber l'adsorption de plusieurs types de virus. Des études *in vitro* très concluantes ont été réalisées avec le virus HIV (human immunodeficiency virus) et avec HCMV (human cytomegalovirus) avec une CI_{50} de l'ordre de 40µg/ml

(Harmsen *et al.* 1995). Des résultats semblables ont été obtenus avec le virus HSV-1 (herpes simplex virus type 1) (Marchetti *et al.*, 1996). Ces derniers travaux ont mis en évidence non seulement un blocage des récepteurs du virus (héparanes sulfates, protéoglycannes, récepteur LDL) mais aussi une possible interaction entre la lactoferrine et le virus. Le pouvoir anti-viral de la lactoferrine a également été étudié *in vivo*, en particulier contre l' α -cytomégalovirus, mais cette activité est due à une augmentation de la toxicité des cellules NK (Shimuzu *et al.*, 1996). Ces rôles récemment découverts représentent une nouvelle voie dans la prévention et la thérapie, en particulier pour les malades immunodéficients ou récidivistes vis à vis de ces infections virales.

4 ~ Rôle de la lactoferrine dans la réponse inflammatoire

a- Rôle dans la migration des cellules immunitaires sur le lieu de l'inflammation

Lors du processus inflammatoire, les neutrophiles vont adhérer aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et vont migrer vers le lieu d'inflammation. La lactoferrine libérée au cours de la dégranulation pourrait jouer un rôle dans cette motilité. De premières études ont émis l'hypothèse que la lactoferrine augmenterait la migration des cellules immunitaires (Oseas *et al.*, 1981, Boxer, *et al.*, 1982), mais cette théorie est maintenant controversée. En effet, dès 1984, Kijlstra *et al.* ont démontré une inhibition de la migration des granulocytes par la lactoferrine, puis Crouch *et al.*, (1992) ont établi l'effet indirect de la lactoferrine puisque celle-ci inhibe la synthèse d'IL2, de TNF α et d'IL1. Le TNF α étant un chémoattractant, la lactoferrine agirait par rétrocontrôle négatif en évitant une activation excessive des neutrophiles (Crouch *et al.*, 1992).

b- Rôle dans l'hyposidérémie inflammatoire

Lors d'une inflammation, les leucocytes activés libèrent dans le sang l'IL1 (Heylar *et al.*, 1987) qui stimule la dégranulation des leucocytes activés et provoque la libération d'une partie de de l'apo-lactoferrine, le reste étant déversé dans les

phagolysosomes (Leffel et Spitznagel, 1972). La lactoferrine serait alors capable de capter le fer du milieu ambiant et participerait ainsi aux mécanismes d'hyposidérémie inflammatoire (Van Snick et al., 1974), qui va permettre de limiter la croissance bactérienne.

c- Rôle dans l'activité bactéricide des leucocytes

La fraction de lactoferrine des granules qui est déversée dans les phagolysosomes des polynucléaires (Leffel et Spitznagel, 1972) permet d'accroître l'activité bactéricide de ces leucocytes (Bullen et Armstrong, 1979). La majeure partie du fer libéré dans les phagolysosomes et dans le milieu de culture après phagocytose d'*E. coli* est retrouvé fixée à la lactoferrine (Molloy et Winterbourn, 1990). Ainsi, au cours de la phagocytose, ces granulocytes convertissent en forte quantité l'O₂ en ions superoxydes et en peroxyde d'hydrogène H₂O₂. L'association de ces deux composés conduit à la formation de radicaux libres, puissants agents oxydants capables d'induire une peroxydation des lipides. Le fer interviendrait comme catalyseur de la réaction. Ambruso et Johnson (1981) ont montré que la lactoferrine pouvait augmenter la production de radicaux libres par les neutrophiles humains grâce à l'apport du fer lié à la protéine et ainsi amplifier la réponse inflammatoire à la peroxydation des lipides des membranes des bactéries phagocytées.

Ces résultats sont néanmoins controversés par d'autres auteurs qui proposent même un mécanisme inverse dans lequel l'apolactotransferrine exercerait un effet antagoniste en captant le fer du milieu et en évitant ainsi des dommages causés aux neutrophiles (Gutteridge *et al.*, 1981). Il a été démontré *in vivo* que la lactoferrine provenant de la dégranulation des neutrophiles stoppe la formation des radicaux libres extra-cellulaires en séquestrant immédiatement le fer qui catalyserait la formation de ces radicaux (Britigan *et al.*, 1986, 1989). Par cette action, la lactoferrine évite que les tissus ne soient endommagés. Par un mécanisme analogue, la lactoferrine inhibe la peroxydation des lipides et protège ainsi les membranes cellulaires sur lesquelles elle se fixe (Britigan *et al.*, 1991). Ces études ont ainsi démontré que la lactoferrine possède une activité anti-oxydante et anti-inflammatoire à la condition que la protéine soit sous sa forme privée de fer.

d- Rôle dans l'activation du complément

Le système du complément contient au moins 20 protéines interagissant dans un ordre de séquence donné, sous le contrôle de protéines de régulation. La lactoferrine fait partie des protéines capables de réguler l'activation du complément. En effet, la lactoferrine humaine isolée du lait (Morgan *et al.*, 1975) ou des larmes (Kijlstra et Jeurissen, 1981) inhibe l'activité hémolytique du complément.

Les protéines du complément forment deux cascades enzymatiques reliées entre elles, appelées voie classique et voie alterne. Les deux voies classique et alterne du complément donnent naissance à la convertase C4b2b pour la voie classique et à la C3bBb pour la voie alterne. La lactoferrine inhibe la formation de la convertase de la voie classique, mais n'a pas d'action sur la voie alterne. Cette action est rendue réversible par addition de fer ferrique dans le milieu de culture, ce qui semble indiquer que le rôle de la lactoferrine dans l'activation du complément est lié à la présence de fer (Kijlstra et Jeurissen, 1982). Ces résultats sont confirmés par la démonstration d'une activité inhibitrice de la lactoferrine dans la solubilisation par le complément de complexes immuns précipités (Kulics et Kijlstra, 1987).

5 ~ Rôle dans la production de cytokines et dans la régulation de la myélopoïèse

De nombreux rôles de la lactoferrine impliquent des mécanismes qui sont régulés par des cytokines. Les études de Crouch *et al.* (1992) montrent que la lactoferrine peut exercer un rétrocontrôle négatif sur certaines cytokines afin d'empêcher le recrutement et l'activation des leucocytes sur le lieu de l'inflammation. Ainsi, la lactoferrine est capable d'inhiber la libération d'IL-1 et de TNF α et donc indirectement celle d'IL-2. En effet, la production d'IL-2 par les lymphocytes T est dépendante de la sécrétion d'IL-1 par les monocytes (Durum *et al.*, 1984) et le TNF est partiellement responsable de cette production d'IL-1. D'autre part, la lactoferrine bovine injectée à des souris infectées par des lipopolysaccharides induit un taux élevé d'IL-6 qui va permettre d'inhiber la

libération de TNF- α responsable des lésions tissulaires durant le choc septique (Machnicki *et al.*, 1993). Néanmoins, Mattsby *et al.*, (1996) ont démontré une diminution de la sécrétion d'IL6 induite par des LPS sur des monocytes, en présence de lactoferrine.

L'hématopoïèse est un processus de développement dynamique et complexe régulé par un grand nombre de cytokines capables de stimuler ou d'inhiber la croissance des cellules souches hématopoïétiques. La lactoferrine libérée par les granules leucocytaires a été identifiée comme un inhibiteur de la production des colonies de granulocytes et de macrophages : selon les premiers travaux de Broxmeyer *et al.*, (1978), elle agirait directement en diminuant la libération de GM-CSF (facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages) synthétisé par les lymphocytes et les macrophages. Le mécanisme mis en jeu semble aujourd'hui plus complexe puisque la lactoferrine serait sans effet sur la production de GM-CSF lorsque les monocytes sont séparés des lymphocytes. Elle agirait en inhibant la libération de l'IL1 responsable elle-même de la libération du GM-CSF par les lymphocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Zucali *et al.*, 1989). De la même façon, la lactoferrine diminue la survie des cellules souches des granulocytes/macrophages et des érythrocytes en culture par inhibition de la libération de l'IL-1 nécessaire à la libération de certains facteurs de stimulation des colonies (Hangoc *et al.*, 1991).

6 ~ Rôle de la lactoferrine dans l'activité cytotoxique des monocytes et des cellules NK

La lactoferrine semble augmenter l'activité cytotoxique des cellules NK et des cellules LAK (Nishiga et Horwitz, 1982; Mc Cormick *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1991; Shau *et al.*, 1992). La lactoferrine agit aussi sur la cytotoxicité des monocytes (Mc Cormick *et al.*, 1991). En effet, elle augmente de manière significative l'activité cytotoxique des cellules NK vis à vis des cellules tumorales (Nishiga et Horwitz, 1982 ; Bezault *et al.*, 1994) et des cellules infectées par les rétrovirus (Lu *et al.*, 1991). La cause de cette stimulation par la lactoferrine de l'activité

cytotoxique des cellules NK, des lymphocytes mais aussi des cellules adhérentes peut être la conséquence, soit d'une activation des cellules tueuses à la suite de l'internalisation de la lactoferrine, soit d'une différenciation des cellules cibles qui deviendraient alors plus sensible à la lyse. Néanmoins, récemment, Shimizu *et al.* (1996) ont prouvé *in vivo* sur des souris BALB/c que l'augmentation de l'activité des cellules NK par l'administration de lactoferrine se fait via une activation des lymphocytes T, qui relargueraient des cytokines agissant sur les NK.

7 ~ Rôle dans la prolifération cellulaire

La lactoferrine exerce une activité facteur de croissance sur différentes cellules dans un milieu dépourvu de sérum de veau foetal. Cette activité a été mise en évidence notamment sur des lignées lymphocytaires humaines B et T (Hashizume *et al.*, 1983, Mazurier *et al.*, 1989) et vis à vis d'une lignée murine macrophagique (P388 DI) (Oria *et al.*, 1988). La lactoferrine stimule également l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN de cellules entérocytaires de rat (Nichols *et al.*, 1987, 1989) et de cellules fibroblastiques de souris BALB/c3T3 (Azuma *et al.*, 1989). D'autre part, il semble exister un effet synergique entre la lactoferrine et certains facteurs de croissance tel que l'EGF (epidermal growth factor) qui agissent sur la synthèse d'ADN et prolifération cellulaire (Tomoyuki *et al.*, 1995). En revanche, récemment, une inhibition de la croissance de cellules de glande mammaire par la lactoferrine bovine a été décrite (Hurley *et al.*, 1994).

Le rôle du fer dans l'activité facteur de croissance reste encore controversé : selon certains auteurs, la lactoferrine interviendrait en apportant le fer nécessaire à la prolifération cellulaire (Azuma *et al.*, 1989; Oguchi *et al.*, 1995); pour d'autres, le fer ne jouerait aucun rôle, l'activité mitogène n'étant due qu'à la protéine elle-même (Oria *et al.*, 1988; Byatt *et al.*, 1990; Nichols *et al.*, 1990; Bi *et al.*, 1994; Tomoyuki *et al.*, 1995). Selon Sün *et al.* (1991), la lactoferrine pourrait agir en tant qu'agent oxydant à la surface cellulaire. En effet, ces auteurs ont démontré que la NADH oxydo-réductase est l'enzyme impliquée dans la réduction du fer lié à la lactoferrine. Cette réaction s'accompagne simultanément d'une oxydation du NADH cytosolique en NAD⁺ et d'une libération d'H⁺ dans le milieu extérieur par l'intermédiaire de l'antiport Na⁺/ H⁺. Cette réaction menant à l'alcalinisation du cytoplasme, ce

phénomène pourrait être responsable de l'activité facteur de croissance de la lactoferrine. Ce mécanisme semble être le même que celui décrit pour la sérotransferrine dans la prolifération cellulaire.

Il faut noter néanmoins que dans de nombreux cas, l'activité facteur de croissance est observée à de fortes concentrations en lactoferrine, ou dans des cultures cellulaires privées d'autres facteurs de croissance.

8 ~ Rôle dans la maturation des lymphocytes

Zimecki *et al.*, (1991) ont démontré que des thymocytes immatures CD4⁻ CD8⁻ incubés en présence de lactoferrine acquièrent le marqueur CD4⁺ caractéristique des lymphocytes auxiliaires. Ces auteurs mettent également en évidence différents changements phénotypiques et fonctionnels de cellules B mis en présence de lactoferrine (Zimecki *et al.*, 1995). Un récepteur spécifique de la lactoferrine humaine a par ailleurs été caractérisé sur les lymphocytes activés (Mazurier *et al.*, 1989). Une différenciation des cellules lymphoblastiques T Jurkat cultivées en présence de 10% de serum de veau foetal a été démontrée par Bi *et al.* (1995). Les cellules se bloquent alors en phase G1 et acquièrent l'antigène CD4.

9 ~ Activité facteur de transcription

Il a été suggéré récemment que la lactoferrine pouvait être un facteur de transcription. En 1992, Garré *et al.* ont démontré la fixation de la lactoferrine sur les cellules leucocytaires K562, suivie d'une internalisation de la lactoferrine qui se retrouverait ensuite dans le noyau, fixée à l'ADN. Si l'affinité de la lactoferrine pour l'ADN est connue depuis longtemps, il semblerait néanmoins que cette interaction soit spécifique puisque He et Furmanski (1995) viennent de démontrer que la lactoferrine reconnaît préférentiellement 3 séquences spécifiques. De plus, les cellules K562 transformées par un plasmide contenant ces séquences consensus en amont du gène reporter CAT (chloramphenicol acetyl transferase) répondent à l'action de la lactoferrine saturée en fer, démontrant ainsi que la lactoferrine agirait comme facteur de transcription.

10 ~ Rôle dans l'inhibition de l'agrégation des plaquettes

En 1990, Mazoyer *et al.* ont démontré que la séquence KRDS localisée entre les acides aminés 39 à 42 du lobe N-terminal de la lactoferrine humaine est un homologue structural de la séquence RGDS du fibrinogène, molécule qui se fixe au récepteur GPIIbIIIa des plaquettes en induisant leur agrégation (Plow *et al.*, 1985)

In vitro, KRDS inhibe l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP et inhibe la fixation du fibrinogène aux plaquettes mais de façon moins importante que RGDS (Mazoyer *et al.*, 1990). Néanmoins, KRDS semble avoir un mode d'action différent de RGDS. En effet, contrairement à RGDS, KRDS ne s'oppose pas à la fixation d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'épitope du complexe GPIIbIIIa de la membrane plaquettaire (Mazoyer *et al.*, 1990). De plus, KRDS est un inhibiteur de la sérotonine induite par la thrombine, par un mécanisme indépendant de la phosphorylation protéique (Mazoyer *et al.*, 1990), alors que RGDS n'a aucun effet. Cette inhibition s'exerce sur des plaquettes de patients déficients en récepteur GPIIbIIIa, excluant donc que l'activité de KRDS soit due à la fixation du peptide sur le complexe GPIIbIIIa. Ces travaux ont amené Leveugle (1993) à étudier l'effet de la lactoferrine sur l'agrégation des plaquettes. La lactoferrine, à une concentration inférieure à 5 nM, c'est-à-dire à une concentration compatible à celle trouvée dans le plasma lors de la dégranulation leucocytaire, inhibe l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP. Une séquence du N-terminal, comprenant les résidus 20 à 37 de la lactoferrine possède encore cette propriété. Leveugle *et al.*, (1993) ont démontré également l'existence d'un récepteur spécifique de la lactoferrine à la surface des plaquettes, différent du complexe GPIIbIIIa. Les interactions de la lactoferrine avec ce récepteur pourraient être impliquées dans la seconde voie de l'agrégation des plaquettes. Un récepteur de la lactoferrine a par ailleurs été identifié par Nillesse *et al.* (1994) sur les mégacaryocytes de la lignée cellulaire Dami.

B) Lactoferrine et pathologies

1 ~ La lactoferrine, marqueur de cancérisation

La lactoferrine peut jouer un rôle en tant que marqueur dans l'étude du cancer. En particulier, une augmentation du taux de la lactoferrine sécrétée a été montrée dans les cancers gastro-intestinaux, du poumon et du sein (Herzen *et al.*, 1985). Pour les cancers de l'estomac, la détection immuno-histochimique de la lactoferrine semble être en relation avec l'augmentation de la demande en fer des cellules néoplasiques (Tuccari *et al.*, 1992).

2 ~ Lactoferrine et dégranulation des neutrophiles

La lactoferrine plasmatique provient de la dégranulation des neutrophiles activés lors de l'infection (Rado *et al.*, 1984). La lactoferrine peut donc servir de marqueur de la réapparition des neutrophiles suite à une greffe de la moelle osseuse (Suzuki *et al.*, 1991), ou encore de la dégranulation des neutrophiles dans le plasma de patients atteints de septicémie (Hayakawa *et al.*, 1993). Elle serait un composant clé dans la réponse inflammatoire de la prostate chez des patients souffrant d'infections répétées (Reese *et al.*, 1992).

3 ~ Déficience en lactoferrine

On a constaté une déficience en lactoferrine qui serait la conséquence de l'absence de granules spécifiques des neutrophiles (Lomax *et al.*, 1989). Dans ce cas, le patient atteint d'un défaut de la coagulation sanguine souffre de continuelles infections bactériennes. D'autre part, Parker *et al.* (1992) ont mis en évidence, chez des patients présentant une déficience en lactoferrine, une tendance à saigner due à une absence des hauts polymères du facteur von Willebrand.

4 ~ Lactoferrine et maladies auto immunes

La lactoferrine et la protéine hsp65 d'origine mycobactérienne possèdent des déterminants antigéniques communs, ce qui suggère que la lactoferrine serait un facteur de stimulation accessoire de l'auto-réactivité des cellules T associée à l'arthrite auto-immune induite par les mycobactéries (Esaguy *et al.*, 1993). D'autres études ont montré que l'apparition d'auto-anticorps anti-lactoferrine chez des patients souffrant de colite ulcéreuse ou de la maladie de Crohn pouvait contrecarrer les propriétés de la lactoferrine à la surface des muqueuses (Peen *et al.*, 1993). Par ailleurs, la présence d'anticorps anti-lactoferrine peut être corrélée à l'activité du lupus érythémateux et leur taux à la surface des muqueuses peut être utilisé comme marqueur de l'évolution de la maladie (Peen *et al.*, 1993).

5 ~ Lactoferrine et désordres neurodégénératifs

Osmand *et al.* (1991) puis Kawamata *et al.* (1993) ont mis en évidence une augmentation de l'expression de la lactoferrine dans les neurones de sujets âgés et plus encore chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. D'autre part, la détection immunochimique a montré une accumulation de lactoferrine dans le cortex cérébral de patients atteints de divers désordres neurodégénératifs (Leveugle *et al.*, 1994). La lactoferrine pourrait participer activement au processus de dégénération neuronale en capturant le fer présent en forte concentration dans le cerveau et en le délivrant à certains neurones par le biais de récepteurs spécifiques. L'accumulation de fer dans ces cellules peut engendrer la formation de radicaux libres, la peroxydation des lipides et la polymérisation de protéines, entraînant des dommages irréversibles. Cette hypothèse a été confirmée par Faucheux *et al.*, (1995) qui ont détecté la présence de récepteurs spécifiques de lactoferrine chez des patients Parkinsoniens, en particulier dans le mésencéphale où la perte de neurones dopaminergiques est sévère. Enfin, Leveugle *et al.*, (1996) ont décelé des variations de répartition intra-neuronale de lactoferrine chez des sujets Parkinsoniens en comparaison à des sujets sains.

IV. Les récepteurs de la lactoferrine

La lactoferrine possédant de nombreux rôles dans l'organisme, ses cellules cibles sont également très diverses. Ainsi, des interactions entre la lactoferrine sur un très grand nombre de cellules ont été mises en évidence. Sur chacun de ces types cellulaires, un récepteur spécifique de la lactoferrine a été plus ou moins bien caractérisé. Néanmoins, ces interactions varient fortement d'un site à l'autre, notamment en ce qui concerne leur nombre et leur affinité pour la lactoferrine. De plus, des sites de reconnaissance ont été découverts également à la surface d'eucaryotes inférieurs et de procaryotes.

A) Récepteurs de cellules de mammifères

1 ~ Récepteurs hépatocytaires

La lactoferrine sérique qui provient de la dégranulation des neutrophiles reste néanmoins à une concentration peu élevée, de l'ordre de 20 nM. En fait, la clairance de la lactoferrine est rapidement assurée par le foie, comme l'ont montré des injections intraveineuses de lactoferrine marquée à l' ^{125}I (Benett et Kokunski, 1979). Le type de cellule capturant la protéine est resté longtemps controversé, puisque son accumulation a été décrite respectivement dans les hépatocytes, les macrophages et les cellules endothéliales (Imber et Pizzo, 1983; Courtoy *et al.*, 1984; Moguilevski *et al.*, 1987).

Des travaux sur les hépatocytes isolés par Mc Abee et Esbensen (1991) ont précisé la nature du transport de la lactoferrine. Il existerait au niveau de ces cellules 2 populations de sites : des sites de haute affinité dépendant du calcium (K_d 20 nM; 10^6 sites/cellule) et des sites de basse affinité, indépendants du calcium (K_d 700 nM, 10^7 sites/cellule). Après fixation sur son récepteur à haute affinité, la lactoferrine serait internalisée par un mécanisme faisant intervenir la clathrine (Mc Abee, 1995).

Des études de Ziery *et al.*, (1992) sur les cellules parenchymateuses de foie ont démontré l'internalisation de la lactoferrine au niveau de ces cellules. Après

injection intra-veineuse de lactoferrine marquée, quelques minutes seulement suffisent à retrouver la quasi-totalité fixée au foie; cependant, l'internalisation est beaucoup plus lente : si 40% de la lactoferrine associée au foie est internalisée en 10 min, il faut attendre 180 min pour l'internalisation de 90% de la protéine marquée. Un fractionnement subcellulaire indique qu'après son internalisation, la lactoferrine est transportée dans les lysosomes. Sur ces cellules, le Kd est de 10 μ M et le nombre de sites est de $20 \cdot 10^6$ par cellule.

Ces résultats semblent confirmer ceux de Willnow (1992) qui montrent que la lactoferrine se fixe spécifiquement sur le LRP/ α_2 MR (LDL receptor related protein / α_2 Macroglobulin receptor) appelé plus simplement LRP. Ce LRP appartient à la famille des protéines membranaires fixant les LDL. Il s'agit d'une protéine ubiquitaire fixant de très nombreux ligands en plus des LDL, comme l' α_2 -macroglobuline et la lactoferrine. La fixation de la lactoferrine sur le LRP dépendrait du calcium et s'effectuerait sur la sous-unité de 515 kDa. La fixation de la lactoferrine au LRP est compétitive avec les LDL puisque la clairance des lipoprotéines portant l'apoE est diminuée par la présence de lactoferrine. En revanche, elle ne l'est pas avec α_2 -macroglobuline. Après internalisation, le complexe lactoferrine-LRP se retrouve dans les endosomes et ne se dissocie pas puisque la fixation maximale se produit à pH 5,8 (Meilinger *et al.*, 1995).

2 ~ Récepteurs entérocytaires

Cox *et al.* (1979) ont démontré *in vitro* que la lactoferrine était capable de céder son fer à des cellules de biopsies intestinales humaines, suggérant la présence d'un récepteur spécifique. Par la suite, les interactions de la lactoferrine ont été étudiées avec des vésicules membranaires de la bordure en brosse de l'intestin de Lapin (Mazurier *et al.*, 1985), de Souris (Hu *et al.*, 1988,1990) de Singe (Davidson et Lönnerdal, 1988) et enfin d'Homme (Kawakami et Lönnerdal, 1991). La fixation de la lactoferrine a également été démontrée sur une lignée entérocytaires (HT 29) dérivé d'un adénocarcinome humain colique par Roiron-Lagroux *et al.* (1989, 1994), Derisbourg *et al.* (1990) et Mikogami *et al.* (1994). Ce dernier a démontré le transport de la lactoferrine du pôle apical au pôle basolatéral. La fixation de la lactoferrine sur son récepteur entérocytaire n'est pas liée à son degré de saturation

en fer et elle est spécifique, c'est à dire qu'elle ne résulte pas d'interactions électrostatiques ou lectiniques. Cet auteur a également mis en évidence qu'une régulation de la synthèse du récepteur de la lactoferrine en fonction du taux intracellulaire de fer est possible et que cette augmentation du nombre de récepteurs induit une augmentation du taux de fer lié à la lactoferrine dans les entérocytes (Mikogami *et al.*, 1995).

Le récepteur enterocytaire a été caractérisé comme une protéine dont la masse moléculaire apparente varie de 100 à 130 kDa chez l'Homme et la Souris (Hu *et al.*, 1990; Kawakami et Lönnerdal, 1991).

Selon les travaux de Hu (1988, 1990), le récepteur intestinal murin est composé d'une chaîne monocaténaire de 130 kDa glycosylées, dont la masse des glycannes de type N-acétyllactosaminique est de 25 kDa. Sur les cellules de type HT 29, le nombre de sites est de l'ordre de $3 \cdot 10^6$ par cellule et le Kd d'environ 10^{-6} M (Roiron-Lagroux *et al.*, 1989; Mikogami *et al.*, 1993). En revanche, sur des entérocytes isolés d'intestin d'animaux d'espèces différentes, y compris chez le fœtus humain, si l'affinité est similaire, le nombre de site est de l'ordre de 10^{14} par cellule (Mazurier *et al.*, 1985; Hu *et al.*, 1988; Davidson et Lönnerdal, 1988; Kawakami et Lönnerdal, 1991). Il semblerait toutefois que la présence et la fonction du récepteur entérocytaire soient fortement dépendantes de l'âge des individus.

3 ~ Récepteur des neutrophiles

Les leucocytes polynucléaires neutrophiles synthétisent la lactoferrine à un stade primaire de leur maturation (Rado *et al.*, 1984). L'activation des leucocytes provoque la libération dans le milieu extra-cellulaire de la lactoferrine contenue dans les granules secondaires. Cette lactoferrine pourrait se fixer sur ces mêmes cellules. Ainsi, Maneva *et al.* (1983) ont en effet démontré l'existence de sites de haute affinité ($4 \cdot 10^4$ par cellule et d'un Kd de $0,44 \cdot 10^{-9}$ M), et des sites de faible affinité ($8 \cdot 10^4$ par cellule et d'un Kd de $160 \cdot 10^{-9}$ M).

En revanche, Birgens *et al.* (1984) n'ont mis qu'un type de récepteur, à raison de $4,6 \cdot 10^6$ sites pour un Kd de $200 \cdot 10^{-9}$ M.

4 ~ Récepteur des monocytes et des macrophages

Bien que la fixation de la lactoferrine ait été démontrée depuis de nombreuses années sur les monocytes et les macrophages (van Snick *et al.*, 1974), la nature et le rôle biologiques ne sont pas clairement définis.

Des travaux portant sur le métabolisme du fer des macrophages péritonéaux de souris et de monocytes humains ont montré que la lactoferrine était capable de céder son fer à la ferritine intracellulaire (Birgens *et al.*, 1988). C'est ainsi que ces auteurs suggèrent la présence d'un récepteur spécifique, alors que d'autres mettent en doute son existence (Moguilevski *et al.*, 1985; Goavec *et al.*, 1985), en estimant que la fixation est de type non spécifique, plus précisément de type lectinique ou électrostatique. Néanmoins Ismail *et al.*, (1993) démontrent que ce n'est pas le cas. Eda *et al.*, (1996) ont étudié la fixation de la lactoferrine sur les cellules THP1 différenciées en macrophages. Sur cette lignée, il semblerait y avoir deux types de sites de fixation. La fixation de la lactoferrine sur ces cellules est indépendante de la fixation du fer. L'interaction avec les récepteurs de la lactoferrine se ferait d'une part, grâce à une séquence peptidique de la lactoferrine et d'autre part, par le biais de sa partie glycanique (Eda *et al.*, 1996).

Les caractéristiques de fixation de la lactoferrine, déterminées par chaque équipe, sont très variables (Kd de 4,5 à 3560 nM).

5 ~ Récepteurs lymphocytaires

De nombreux travaux réalisés sur les lymphocytes ont permis d'établir la présence de récepteurs spécifiques de la lactoferrine à leur surface (Bennett et Davis, 1981).

Butler *et al.* (1990), par l'utilisation de la cytofluorimétrie en flux, montrent que la fixation de la lactoferrine à la surface des lymphocytes B est fonction de l'état de maturation de la cellule. Ainsi, les cellules pré-B représentatives d'un stade précoce de différenciation n'expriment pas de récepteurs de lactoferrine à leur surface, alors que les lymphocytes B immatures, représentatifs d'un stade plus tardif, fixent une quantité élevée de lactoferrine. Ce taux rediminue lors de la maturation de ces cellules en plasmocytes.

Les travaux de Gnezditskaya *et al.* (1984) montrent que le thymus humain possède une sous-population de lymphocytes possédant des récepteurs spécifiques de la lactoferrine et que leur présence dépend de la concentration intracellulaire en AMPc. De plus, ils ont les premiers décrit le rôle joué par la lactoferrine à la surface des thymocytes humains : *in vitro*, elle induit une augmentation de l'expression des récepteur à IgG ou à IgM (Gnezditskaya *et al.*, 1987). En 1991, Zimecki *et al.*, travaillant sur les thymocytes murins ont démontré l'existence d'un second rôle de la lactoferrine : en effet, l'incubation pendant une nuit de thymocytes immatures CD4⁺CD8⁻ avec la lactoferrine humaine permet à ces cellules d'acquérir l'antigène CD4 caractéristique des cellules auxiliaires. Ces auteurs mettent également en évidence différents changements phénotypiques et fonctionnels de cellules B mis en présence de lactoferrine (Zimecki *et al.*, 1995).

L'apparition à la surface des lymphocytes a été étudiée au laboratoire par Mazurier *et al.* (1989) par le biais d'un agent mitogène, la phytohémagglutinine (PHA). Celle-ci permet de mimer l'activation des lymphocytes lors d'une infection et de transformer ainsi les lymphocytes quiescents en lymphocytes activés. Ces travaux ont permis d'observer que les lymphocytes quiescents ne possèdent pas de récepteur pour la lactoferrine et que la PHA provoque l'apparition de récepteurs de haute affinité à la surface des lymphocytes circulants, récepteurs qui sont synthétisés au cours des deux premiers jours d'activation (Mazurier *et al.*, 1989). Les constantes de fixation et le nombre de sites de fixation sont respectivement de 80 nM et 200 000 lors des conditions d'activation à la PHA.

Le récepteur lymphocytaire de la lactoferrine été purifié sous la forme du complexe lactoferrine-récepteur par chromatographie d'affinité sur anticorps anti-lactoferrine. Il se présente sous la forme d'une glycoprotéine de masse moléculaire voisine de 105 kDa (Mazurier *et al.*, 1989, Leveugle *et al.*, 1993).

Leveugle *et al.*, (1993) ont également mis en évidence la présence d'une forme soluble du récepteur isolé du milieu de culture des lymphocytes activés. Celui-ci, purifié comme précédemment par chromatographie d'affinité, se présente sous la forme d'une glycoprotéine monocaténaire de MM apparente de 95 kDa, la différence de masse moléculaire avec le récepteur membranaire correspondant au domaine intramembranaire. Ces résultats ont été confirmés par Bi *et al.* (1994) qui ont purifié un récepteur membranaire de 105 kDa et un récepteur soluble de 95 kDa.

6 ~ Récepteur plaquettaire

La découverte d'une activité plaquettaire de la lactoferrine a amené à penser que celle-ci serait due à sa séquence K³⁹RDS⁴², séquence semblable à celle du fibrinogène, responsable de son activation agrégante par fixation du récepteur GPIIb/IIIa (Mazoyer *et al.*, 1990). De nombreux travaux comparant les activités des peptides RGDS du fibrinogène et de KRDS de la lactoferrine ont mis en évidence de profondes différences : en effet sur les plaquettes animales, KRDS est un inhibiteur de l'agrégation induite par l'ADP alors que RGDS n'a pas d'action significative (Drouet *et al.*, 1990). De plus, les modifications intracellulaires et morphologiques qu'induisent les deux peptides sont totalement différentes (Mazoyer *et al.*, 1990). Ainsi, ces travaux ont permis à leurs auteurs de conclure que la séquence KRDS de la lactoferrine et le térapeptide RGDS du fibrogène agissaient par des mécanismes différents et que KRDS ne se fixait pas à l'intégrine GpIIb/IIIa, récepteur du fibrinogène.

Au laboratoire, Leveugle *et al.* (1992) ont mis au point une technique d'identification du site de fixation sur les plaquettes. En effet, l'utilisation d'une nouvelle sonde fluorescente (lactoferrine marquée à la fluorescéine sur la partie glycanique) a montré une fixation spécifique de la lactoferrine sur les plaquettes, indépendant de son taux de saturation en fer. D'un point de vue biochimique, ce récepteur monocaténaire glycosylé de 105 kDa, semble très voisin du récepteur lymphocytaire. Il a en effet été décrit par Nillesse *et al.* (1994) qui l'ont mis en évidence principalement sur une sous-population de cellules mégacaryocytaires de la lignée Dami.

7 ~ Récepteur des cellules épithéliales de la glande mammaire

Dans notre laboratoire, Rochard *et al.* (1992) se sont intéressés à l'interaction entre la lactoferrine humaine et les différentes lignées cellulaires humaines de glande mammaire. Cette étude réalisée par cytofluorimétrie en flux met en évidence une fixation de la lactoferrine sur des cellules cancéreuses de

mastoses et de cellules issues de tissu sain de glande mammaire humaine. Chaque lignée fixe la lactoferrine mais avec des affinités faibles et très variables allant de 120 à 960 nM.

8 ~ Les protéoglycannes

Il est bien établi que la lactoferrine peut se fixer aux polysaccharides anioniques. Ainsi la chromatographie sur héparine immobilisée a été utilisée pour purifier cette protéine (Blackberg et Hernell, 1980). Plus récemment, Zou *et al.*, (1992) et Mann *et al.*, (1994) ont montré que la lactoferrine interagissait avec les glycosaminoglycannes via le domaine N-I et plus particulièrement les séquences GRRRRS de la lactoferrine en synergie avec la séquence RKWR (résidus 28-31) (Wu *et al.*, 1995). Bien qu'aucune expérimentation n'ait directement démontré la participation des protéoglycannes dans la fixation de la lactoferrine sur les cellules, de nombreux arguments sont en faveur de cette hypothèse. Ainsi les polysaccharides et les dextrans sulfatés sont des inhibiteurs compétitifs de la fixation de la lactoferrine sur les hépatocytes (McAbee et Esbensen 1991) et sur les macrophages (Imber et Pizzo 1983). Récemment, Pejler *et al.* (1996) ont démontré que cette fixation pouvait avoir une signification biologique. En effet, la protéase RMCP1 (Rat Mast Cell Protease 1) est naturellement liée aux héparines qui la stabilisent. Par son affinité pour cette dernière, la lactoferrine entre en compétition avec la RMCP1, la rendant alors très vulnérable aux attaques protéolytiques ce qui diminue son activité.

La fixation de la lactoferrine aux protéoglycannes pourrait également entraver la régulation négative de facteurs de coagulation comme la thrombine. Celle-ci est en effet inhibée par des composés hépariniques. Alors que leur activité anti-thrombique est augmentée en présence de GAG (Pratt *et al.*, 1994), elle est diminuée par la lactoferrine qui entraîne alors une prolongation de la coagulation (Wu *et al.*, 1995).

B) Récepteurs bactériens

Pour parer au manque de fer disponible dans l'organisme, des bactéries pathogènes ont développé des mécanismes variables qui leur permettent d'acquérir cet élément indispensable à leur réplication. Pour capturer le fer de l'environnement, beaucoup de bactéries synthétisent et sécrètent des sidérophores qui chélatent le fer, se fixent à des récepteurs bactériens et sont internalisés en libérant le fer. Certaines bactéries ne produisent pas de sidérophores mais acquièrent le fer par un autre mécanisme. Ainsi, les bactéries de la famille des *Neisseriaceae* possèdent des récepteurs qui leur permettent de capturer le fer grâce à la transferrine ou à la lactoferrine de leur hôte.

Le récepteur bactérien de la lactoferrine de la famille des *Neisseriaceae* a été abondamment décrit: il s'agit d'une protéine monocaténaire appelé LbpA qui possède de nombreuses homologies avec le récepteur TbpA des transferrines (Pettersen *et al.*, 1994, Quin *et al.*, 1994). Depuis peu, une autre protéine LbpB vient d'être mise en évidence (Bonnah *et al.*, 1995). LbpA a une masse moléculaire d'environ 100 kDa alors que LbpB est de 85 kDa (voir revue générale de Gray-Owen et Schryvers, 1996).

La capacité des bactéries pathogènes à utiliser le fer des transferrines jouerait probablement un rôle important dans la prolifération bactérienne au moment d'une infection.

C) Devenir du complexe lactoferrine/récepteur

L'étude du complexe lactoferrine/récepteur a été entreprise par de nombreux groupes. Les résultats obtenus par ces différents auteurs sont forts variables, souvent contradictoires et semblent dépendre du type cellulaire étudié.

1 ~ Fixation sans endocytose

De nombreux auteurs mettent en évidence une simple fixation de la lactoferrine sur son récepteur, sans endocytose. Ainsi, sur les cellules HT19 et en

particulier sur le sous-clone D4, la lactoferrine reste fixée à la surface cellulaire (Roiron-Lagroux et Figarella 1990).

Ismail et Brock (1993) ont mis en évidence que les cellules monocytaires de la lignée U937 fixent la lactoferrine à leur surface et relâchent alors le fer complexé. Ce processus n'est pas suivi d'endocytose.

Dans le cas des bactéries, la fixation de la lactoferrine n'est pas suivie d'endocytoses (Gray-Owen et Schryvers, 1996).

2 ~ Transcytose de la lactoferrine

En travaillant sur le clone 19A de la lignée HT29, Mikogami (1994) a mis en évidence par utilisation de la chambre de Ussing, qu'après fixation et internalisation de la lactoferrine, le transport de cette dernière est de type transcellulaire et non paracellulaire. En effet, la lactoferrine est transportée du côté apical vers le côté basolatéral via 2 voies intracellulaires: la voie majeure transporte 90% de la lactoferrine et conduit à la libération du fer de la lactoferrine, celle-ci étant dégradée et les fragments transportés vers le compartiment basolatéral. La voie mineure qui transporte les 10% restants, permet une transcytose de la lactoferrine intacte et saturée, c'est à dire son passage au pôle basolatéral. Ces derniers résultats sont compatibles avec la présence de lactoferrine maternelle dans le sang du nouveau-né.

3 ~ Endocytose de la lactoferrine

a- Les hépatocytes

Mc Abee et Esbensen (1991) ont démontré une internalisation de la lactoferrine sur des sites Ca^{2+} dépendant. Cette endocytose se ferait via des vésicules recouvertes de clathrine. La fixation et l'endocytose est fortement augmentée par la présence de fer dans le milieu de culture (Mc Abee et Ling, 1997). Ces auteurs ont conclu à une régulation post-transcriptionnelle du récepteur de la lactoferrine par le biais de la concentration intracellulaire en fer. Ziery *et al* (1993) ont montré que les premiers acides aminés de la lactoferrine étaient responsables

non seulement de la compétition de fixation des lipoprotéines portant l'apo E sur leur récepteur, mais aussi de l'internalisation de la lactoferrine .

b- Les lymphocytes

Sato *et al* (1990) ont observé par microscopie électronique que la lactoferrine est internalisée par les lymphocytes B puis excrétée dans le milieu extracellulaire. Récemment, au laboratoire, Bi *et al* (1994, 1995) ont démontré l'internalisation de la lactoferrine par les cellules lymphoblastiques T de la lignée Jurkat. En effet, après fixation de la lactoferrine à 4°C, l'incubation des cellules à 37°C induit immédiatement une internalisation de la lactoferrine, qu'elle soit sous forme apo ou diférique. Plus de 50% de la lactoferrine est internalisée en 30 minutes. Par analyse en microscopie confocale, en utilisant un marquage sur les sucres à la fluorescéine, la lactoferrine est visualisée principalement dans des vésicules. Après internalisation, les cellules Jurkat relarguent dans le milieu de culture à la fois des molécules intactes et dégradées de lactoferrine, ce qui suggère qu'une fraction (30-40%) de ligand est dégradée à chaque cycle d'endocytose.

Les protéines recombinantes

Il existe deux objectifs distincts pour lesquels la Biologie s'est intéressée aux protéines recombinantes.

Le premier est l'intérêt pharmaceutique de nombreuses protéines. En effet, certaines protéines possèdent des propriétés thérapeutiques essentielles : citons à titre d'exemple l'érythropoïétine, l'insuline ou encore les facteurs de coagulation. La demande internationale étant très forte, il est devenu impossible de purifier suffisamment de ces substances à partir de leur milieu de biosynthèse naturel (du sang ou des organes). De plus, les risques de contamination liés à ces milieux biologiques complexes ont rendu cette source de matière inexploitable. C'est ainsi que s'est développée, ces dernières années, la biotechnologie des protéines recombinantes, qui permet de produire des substances protéiques en grande quantité, à moindre coût, tout en limitant les risques de contamination.

La seconde application du génie génétique est la synthèse, cette fois en quantité plus limitée, de protéines faisant l'objet de recherches approfondies en ce qui concerne leur structure et leur fonction. Dans ce cadre, il apparaît que cette technique permet non seulement d'obtenir aisément une protéine rare ou très difficilement purifiable de son milieu naturel, mais aussi de pouvoir la modifier avec une extrême souplesse par mutagenèse dirigée.

Six hôtes principaux ont été envisagés pour la production de protéines exogènes : il s'agit du système procaryote, des levures, du système baculovirus-cellules d'insectes, des cellules de mammifères, des animaux transgéniques et enfin des plantes transgéniques.

Un système de production efficace nécessite de disposer d'un vecteur d'expression (plasmide ou virus) capable d'introduire ou de faire exprimer un gène dans une cellule hôte. Il s'agit d'une construction moléculaire comprenant un gène d'intérêt (ou son ADNc) sous le contrôle d'un promoteur et d'un terminateur reconnus par la cellule hôte. Elle peut éventuellement posséder des signaux

spécifiant des adressages particuliers de la protéine traduite, comme par exemple sa sécrétion. La cellule hôte idéale doit être capable d'exécuter les instructions fournies par le gène étranger et de réaliser les modifications post-traductionnelles permettant d'obtenir une protéine mature, conforme à la protéine naturelle. Cette notion est essentielle car toute modification de la structure pourra non seulement diminuer son activité biologique mais également lui conférer une certaine immunogénicité en cas d'usage thérapeutique.

Enfin, les cellules hôtes, dans le cas de culture cellulaire, doivent se prêter à la culture de masse à faible coût. Elles doivent être résistantes, peu exigeantes en éléments nutritifs et capables de se multiplier à haute densité.

I. Les différents systèmes de production

A) Le système procaryote

En clonant un ADNc d'une protéine d'intérêt dans un plasmide particulier en aval d'un promoteur fort, il est possible *à priori* de produire n'importe quelle protéine dans les procaryotes et en particulier chez *E. coli* pourvu qu'elle ne soit ni trop grande, ni trop petite, qu'il n'y ait pas trop de résidus de cystéine ou d'arginine (pour revue, cf Orfanoudakis et Egly, 1993). *E. coli* ne fait aucune des modifications post-traductionnelles nécessaires à la maturation des protéines d'eucaryotes. De plus, elle ne peut former de ponts disulfures dans son cytoplasme, et ses capacités sécrétoires sont très limitées (Model *et al.*, 1990). De bons résultats sont habituellement obtenus pour les protéines dont le nombre d'acides aminés varie de 100 à 200. Néanmoins, très souvent, les protéines recombinantes, lorsqu'elles sont produites, sont insolubles et se retrouvent dans des corps d'inclusion (Schein *et al.*, 1989). A ce stade, la purification est très difficile et amène le plus souvent à une dénaturation des protéines par l'utilisation d'agents chaotropiques. Malgré ces inconvénients majeurs, il n'en reste pas moins que *E. coli* est encore très utilisé non seulement en recherche, mais aussi pour la production industrielle de protéines

recombinantes. Les taux obtenus peuvent atteindre 5% des protéines totales voire 10% en fermenteur industriel, soit 1g/ litre. Néanmoins, ces taux restent des exceptions et l'obtention, en fiole de laboratoire, de 20 mg /litre est considéré comme un très bon rendement.

B) Les levures

Les levures offrent un double avantage: d'une part, elles possèdent la rapidité de croissance des procaryotes, et d'autre part, elles possèdent la machinerie cellulaire des modifications post-traductionnelles des eucaryotes, même si celle-ci est très simplifiée (pour revue, cf Cregg *et al.*, 1993). Les premières levures sélectionnées pour la production de protéines hétérologues ont été *Saccharomyces cerevisiae*, grâce aux nombreuses connaissances acquises sur sa génétique (Fleer *et al.*, 1992). Cependant, cette levure ne s'est pas montrée l'hôte idéal et, par la suite, d'autres levures dont la levure méthylotrophique *Pichia pastoris* ont été utilisées pour la production (Romanos *et al.*, 1992). Deux critères ont conditionné ce choix: sa possibilité d'adaptation en fermenteur et la présence de promoteurs régulés par le méthanol (AOX) qui peuvent être utilisés dans le contrôle de l'expression d'une protéine hétérologue. Dans ce cas, la croissance des levures est réalisée dans une source de carbone non méthanolique (glucose, glycérol ou éthanol). L'ajout de méthanol en phase finale de croissance, entraîne l'activation du promoteur AOX, ce qui permet la transcription d'un gène placé sous son contrôle (Tshopp *et al.*, 1987).

Pour augmenter la stabilité des souches exprimant la protéine hétérologue, les vecteurs d'expression sont intégrés dans le génome de *P. pastoris* par recombinaison homologue. Récemment, des méthodes de construction de souches à copies multiples de la cassette du gène d'expression ont été décrites (Clare *et al.*, 1991).

Les conditions de culture de *P. pastoris* sont particulières et nécessitent le plus souvent l'emploi de fermenteurs permettant de maîtriser à la fois le pH, l'aération des cultures et l'apport de la source carbonée (Romanos *et al.*, 1992). Le temps de culture pour l'obtention du pic de production de la protéine recombinante est classiquement de 150 à 200 heures après le remplacement du glycérol par le méthanol. Beaucoup d'efforts ont été faits pour permettre la sécrétion dans le milieu

de culture de la protéine étrangère. Cette sécrétion nécessite un peptide signal de sécrétion. Le peptide signal naturel de la protéine peut parfois être utilisé, mais ceci est loin d'être une généralité.

Les levures ont l'avantage de posséder la capacité de produire des protéines ayant subi des modifications post-traductionnelles telles que la maturation par protéolyse, la formation de ponts disulfures et la glycosylation .

Ainsi, le système de production par les levures permet l'obtention de plusieurs grammes de protéines recombinantes par litre de milieu de culture. Néanmoins, la forte antigénicité des glycoprotéines ne permet pas d'entrevoir d'applications en vue d'un usage thérapeutique des protéines hétérologues.

C) Les cellules de mammifères

L'expression dans des cellules de mammifères permet de s'affranchir des problèmes rencontrés dans les deux systèmes précédents. Elle présente l'énorme avantage de pouvoir exprimer un très grand nombre de protéines correctement conformées et maturées. La culture de cellules de mammifère permet une expression transitoire ou une expression stable des protéines recombinantes. Ces deux possibilités proviennent du choix du type de plasmide, le premier ne permettant pas l'intégration du gène exogène dans le génome de la cellule hôte, alors que le second le permet. Dans le cas de l'expression transitoire, le plasmide recombinant peut se répliquer de façon autonome et permettre la synthèse de la protéine hétérologue mais provoque rapidement la mort de la cellule (70 à 90 h après transfection) (Selden *et al.*, 1986). En cas d'expression stable, il est possible d'augmenter le taux d'expression de protéine hétérologue grâce à l'amplification génique. Cette technique met en jeu la sélection des clones de cellules qui amplifient progressivement les séquences transfectées. Un long travail d'amplification génique est nécessaire pour l'obtention de la protéine recombinante (de 6 à 12 mois). Ce clonage est effectué à l'aide d'une drogue qui, administrée en quantité croissante, permet de sélectionner les cellules possédant le plus grand nombre de copies du plasmide (Kaufman et Sharp, 1982, Kaufman *et al.*, 1985).

Les cellules d'ovaire de Hamster (CHO) représentent la souche la plus employée actuellement. Différents vecteurs d'expression d'origine virale (virus de

la vaccine, SV40, adenovirus, retrovirus) ont été développés pour introduire des gènes dans le génôme des CHO. D'autres cellules de mammifères ont été plus récemment étudiées, en particulier, les cellules de rein de Hamster nouveau-né (BHK) et les cellules de rein de singe (COS) pour la production de vaccin, d'interférons ou encore de facteurs de coagulation (Busby *et al.*, 1985).

Bien que ce type d'expression permette l'expression de protéines les plus conformes possibles aux protéines humaines, les cellules de mammifères ne sont pas adaptées à des besoins importants car les taux de production ne sont que de l'ordre du mg ou de la dizaine de mg après des mois d'amplification coûteuse.

D) Le système Baculovirus-cellules d'insecte

1 ~ Le cycle naturel du Baculovirus

Les baculovirus constituent un groupe de virus présents uniquement chez les arthropodes et qui font l'objet depuis quelques années d'applications particulières intéressantes en lutte biologique et comme système d'expression de gènes étrangers (pour revue, cf Devauchelle et Cerutti, 1993). Cette famille de virus est capable d'infecter plus de 600 espèces d'insectes ainsi que plusieurs crustacés. Différentes espèces de baculovirus peuvent infecter des larves de lépidoptères dont certains sont des ravageurs de culture. Si les baculovirus sont virulents contre certaines espèces, ils ne sont pathogènes ni pour les plantes, ni pour les vertébrés. Un des baculovirus les plus étudiés aujourd'hui est celui qui a été originalement isolé des larves de *Autographa californica*. Ce virus, connu sous le sigle AcNPV (ou AcMNPV), se multiplie dans les noyaux des cellules de plus de 30 espèces différentes de lépidoptères (Groner *et al.*, 1986).

Le cycle de réplication de ce virus, comme des autres baculovirus est relativement complexe (Granados, 1986, a,b). Un des aspects les plus curieux est la synthèse biphasique des deux formes différentes de virus : les particules virales extra-cellulaires qui vont bourgeonner de la cellule et les particules incluses dans des polyèdres. La polyédrine est une protéine structurale viro-codée qui constitue la matrice protéique cristallisée qui forme les corps d'inclusion. Ceux-ci protègent le virus des facteurs de l'environnement qui inactivent rapidement ses formes libres.

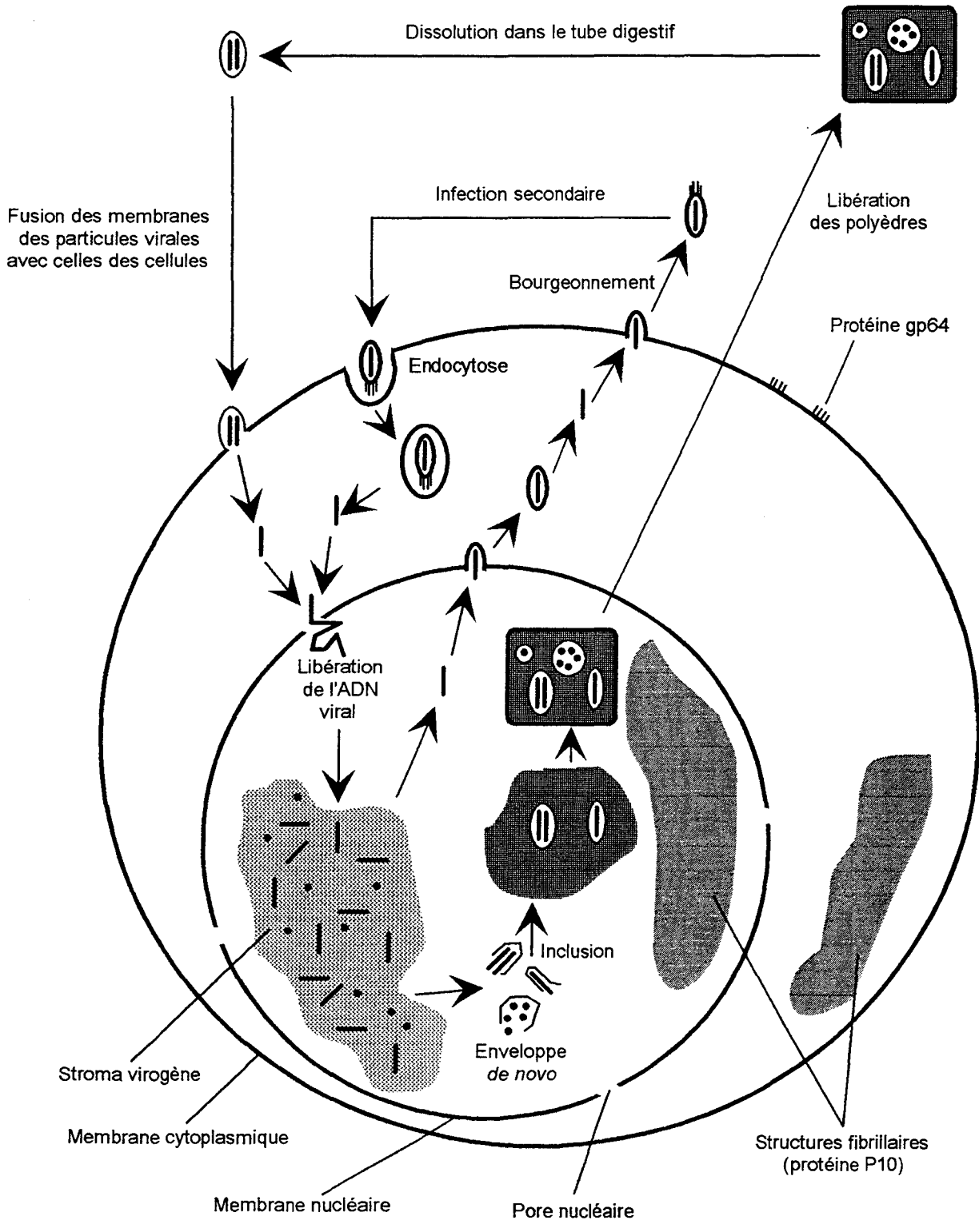


Fig. 3 : Schéma du cycle de multiplication des baculovirus de la polyédrose nucléaire (Chaabihi, Thèse, 1992)

Dans le milieu naturel, les larves ingèrent les polyèdres qui sont dissous dans le suc intestinal, les virions sont alors libérés et pénètrent dans les cellules par fusion membranaire ou par endocytose dans les cellules permissives et la nucléocapside est amenée jusqu'au noyau où elle libère son ADN. La transcription des gènes précoces peut alors commencer. La réplication de l'ADN commence 7h après l'infection, puis l'expression des gènes précoces est réprimée au bénéfice des gènes tardifs. Entre 10 et 48 h, des particules bourgeonnent à la surface des cellules et permettent, après leur libération d'infecter d'autres cellules. Les corps d'inclusion sont visibles à partir de la 18e heure et restent dans la cellule jusqu'à 4 à 5 jours au moment de la lyse cellulaire (Fig. 3).

2 ~ Application aux biotechnologies

a- Techniques d'expression

Le génie génétique a utilisé ce système pour exprimer des protéines hétérologues par le biais de ces cellules d'insectes infectées (pour revue, cf Summers et Smith, 1987, Luckow, 1990). Le gène de la polyédrine s'est montré intéressant à plus d'un titre puisque d'une part, le produit de ce gène n'est pas indispensable en culture cellulaire, et d'autre part, parce qu'il possède un promoteur constitutif fort. Il était dès lors possible de cloner un gène en aval du promoteur de la polyédrine et d'infecter des cellules en culture avec ce baculovirus recombinant. Des études ont été menées sur l'infection *in vitro* de cellules du lépidoptère *Spodoptera frugiperda*. Quatre phases dans l'expression des gènes d'AcNPV ont été caractérisées au niveau transcriptionnel et traductionnel (Miller *et al.*, 1988; Fraser *et al.*, 1989).

Les gènes de la phase précoce, qui nécessitent les produits de certains gènes de la phase très précoce sont activés de 5 à 7 h. Puis viennent les gènes tardifs exprimés entre 8 et 18 h, qui sont des protéines de structure. Deux gènes au moins, la polyédrine et le polypeptide P10 sont transcrits très tardivement, après 18 h (gènes tardifs-tardifs).

La construction de baculovirus recombinants exprimant un gène étranger est effectuée en général en deux étapes. L'ADN viral d'un baculovirus est composé

d'une molécule d'ADN bicaténaire d'environ 140 kbp. Cette taille imposante ne permet pas de manier de façon aisée cet ADN. L'introduction d'un gène étranger se fait donc par l'intermédiaire d'un vecteur qui permet une recombinaison homologe avec le génome viral. Ainsi, le gène étranger est inséré dans un plasmide possédant un site de polyclonage en aval du promoteur du gène de la polyédrine ou de la P10, entouré de séquences flanquantes de l'ADN du baculovirus : c'est le vecteur de transfert (Luckow et Summers, 1987).

Une culture de cellules d'insectes (lignées Sf9, Sf21 ou High Five le plus couramment) est cotransfectée avec le vecteur de transfert et l'ADN du virus sauvage. Il peut alors se produire une recombinaison entre les régions homologues du plasmide et du génome viral, ce qui conduit à l'obtention d'un virus recombinant ayant intégré le gène étranger. Différentes techniques de cotransfection ont été utilisées, citons la cotransfection au phosphate de calcium, la lipofection, l'électroporation. Le pourcentage de recombinants varie de 0,1 à 5% et différents facteurs semblent intervenir : la quantité et la proportion respective de plasmide et de virus, la longueur des régions flanquantes dans le vecteur de transfert et la taille du gène étranger. Les Baculovirus recombinants sont souvent identifiés par la morphologie des plages de lyse observées à faible grossissement sous le microscope. En effet, dans un tapis cellulaire, une cellule infectée ne se divise plus et rapidement elle produit des particules virales bourgeonnantes qui vont infecter les cellules voisines (Chaabihi *et al.*, 1992). Le travail de sous-clonage qui en découle est long et fastidieux, c'est pourquoi un ADN linéarisé de baculovirus est maintenant commercialisé. Dans ce cas, seule la recombinaison avec le gène étranger introduit dans le plasmide permet la recircularisation de l'ADN viral et donc sa réplication. Ainsi, seuls les virus ayant intégrés le gène étranger se multiplient dans le milieu et la sélection n'est alors plus une absolue nécessité. Néanmoins, un sous-clonage est vivement conseillé afin de s'assurer de la pureté du virus recombinant. Il est également nécessaire d'amplifier le clone viral sélectionné par plusieurs infections successives dans le but d'obtenir un stock de départ pur, le virus pouvant se montrer instable au cours du temps.

b - Modifications post- traductionnelles des protéines produites dans les cellules d'insectes

A quelques exceptions près, les protéines exprimées dans les cellules d'insectes sont solubles et possèdent une conformation identique à celle des protéines natives, ce qui implique un repliement correct et la formation de ponts disulfures (Luckow *et al.*, 1990). Les cellules d'insectes effectuent les modifications post-traductionnelles semblables à celles des vertébrés. Elles reconnaissent les peptides signaux homologues et hétérologues et les protéines matures sont sécrétées dans le milieu de culture. De la même façon, les signaux d'adressage aux différents compartiments cellulaires sont reconnus : adressage nucléaire, cytoplasmique ou membranaire. Les protéines produites peuvent être phosphorylées, myristilées, palmitoylées, carboxyméthylées, amidées ou acétylées correctement. Les assemblages en dimères, en complexe oligomérique et la formation de ponts disulfures se font de manière correcte dans les cellules d'insectes. Un des points les plus problématiques concerne la glycosylation des protéines. Une analyse détaillée des glycoprotéines exprimées dans les cellules d'insectes a montré des différences dans la taille et la structure des oligosaccharides par rapport à celle des glycoprotéines de plantes et de mammifères. Les glycoprotéines de mammifères exprimées dans les cellules Sf9 sont souvent plus légères, les chaînes oligosaccharidiques plus courtes. Le plus souvent, cette différence n'affecte pas ou peu l'activité biologique des protéines *in vitro*. Dans la très grande majorité des cas, il faut noter qu'après analyse des glycannes, on ne retrouve que du GlcNAc₂-Man₂ et des oligosaccharides tronqués (GlcNAc₂-Man₅, GlcNAc₂Man₃). Ce problème de glycosylation semble être encore aujourd'hui une des seules modifications post-traductionnelles que les cellules de *Spodoptera frugiperda* ne fassent pas de façon identique à celle des cellules de mammifères.

E) Les animaux transgéniques

Des protéines recombinantes sont également produites par des mammifères. Dans ce cas, le gène étranger est inséré dans le patrimoine génétique par microinjection dans le pronucleus de l'oeuf fécondé et ce dernier est ensuite

réimplanté dans l'utérus de la femelle (pour revue, cf Houdebine, 1995). Les premiers résultats sont apparus en 1982 où Palmitter *et al.* ont réussi à faire produire l'hormone de croissance de rat puis l'hormone de croissance humaine chez des souris transgéniques. S'il convient de noter que 90% des animaux transgéniques sont des souris, la technique de transgénèse est transposable à la majorité des autres mammifères (Hammer *et al.*, 1985). La protéine d'intérêt produite par les animaux transgéniques est sécrétée et peut être purifiée en particulier à partir du sang et du lait.

Pour obtenir une protéine qui n'est pas naturellement sécrétée dans le lait, les constructions géniques contiennent la séquence régulatrice d'une protéine du lait fusionnée au gène d'intérêt à exprimer. La présence d'introns est souvent nécessaire (Palmitter, *et al.*, 1991). Les terminateurs sont également primordiaux. Néanmoins, il n'existe pas de vecteur type défini, et chaque expérimentation est particulière.

Parmi les protéines humaines couramment produites par les mammifères, on peut citer les facteurs de coagulation VIII et IX, l' α_1 anti-trypsin, et l'activateur du plasminogène (Edert *et al.*, 1994) avec en moyenne une production de 10 mg de protéine recombinante par litre de lait (Stinnakre *et al.*, 1992).

F) Les plantes transgéniques

Récemment, dans le cadre d'une production de masse, un nouveau système de production a été envisagé : les plantes transgéniques. Celles-ci représentent une source de protéine considérable à faible coût et d'une grande sécurité vis à vis des contaminations virales et bactériennes. Plusieurs systèmes d'exploitation ont été envisagés : les plantes en champs, les cultures de cellules (en suspension ou immobilisées) et les cultures de racines.

1 ~ *Agrobacterium tumefaciens*, plasmide Ti et plante (pour revue: cf Waden, 1993)

a- Intégration d'un ADN exogène dans le génome végétal

Il est connu depuis de nombreuses années que *Agrobacterium tumefaciens* est responsable de tumeurs sur des plantes. En effet, durant l'induction de la tumeur, *Agrobacterium tumefaciens* transfère à la cellule végétale un morceau d'ADN d'un plasmide bactérien (appelé Ti pour Tumor Inducing plasmid). Ce phénomène existe également avec *Agrobacterium rhizogene* qui provoque des tumeurs différentes. Chez *Agrobacterium tumefaciens*, la séquence d'ADN transférée est nommée le T-DNA (Zambriski *et al.*, 1983, 1989). Ce fragment est délimité par 2 séquences répétées conservées de 24 paires de bases: les bordures. Celles-ci encadrent la région T. Ce T-DNA peut s'intégrer dans l'un des chromosomes de la plante. L'expression du gène localisé sur le T-DNA mène à la formation de protéines impliquées dans la production d'une auxine (l'acide indolo-acétique) et d'une cytokine (l'AMP isopentényl). Ces hormones végétales causent une tumeur caractérisée par la capacité de ces cellules infectées à proliférer sans limite de façon autonome.

b- Mécanisme biologique de l'interaction Agrobacterium tumefaciens / plante

Le procédé naturel de transfert de gènes par le biais d'*Agrobacterium tumefaciens* est initié par le relargage de composés phénoliques tels que l'acétosyringone, à partir de plantes blessées. Cela provoque une cascade d'événements incluant une chémotaxie de la bactérie vers la plante, ainsi que sa fixation à la paroi de celle-ci. De plus, l'acétosyringone induit l'expression des gènes de virulence *vir* codés par le plasmide Ti (Hooykas et Beijersbergen, 1994). Le gène *vir A* est exprimé constitutivement dans la bactérie. En présence d'acétosyringone, le produit de *vir A* s'autophosphoryle ce qui entraîne la phosphorylation du produit de *vir G* qui est également d'expression constitutive. Ce mécanisme produit une activation de la transcription des autres gènes *vir*. Les produits de ces gènes reconnaissent alors les bordures du T-DNA, ce qui induit une coupure simple brin en libérant la région T, qui est immédiatement protégé par des protéines issues de la région *vir* (Howard *et al.*, 1992). Le transfert de ce brin T est analogue au processus de conjugaison bactérienne (Fig. 4). Le mécanisme d'intégration dans le génome de la plante est encore mal connu bien qu'il apparaisse que le T-DNA s'intègre

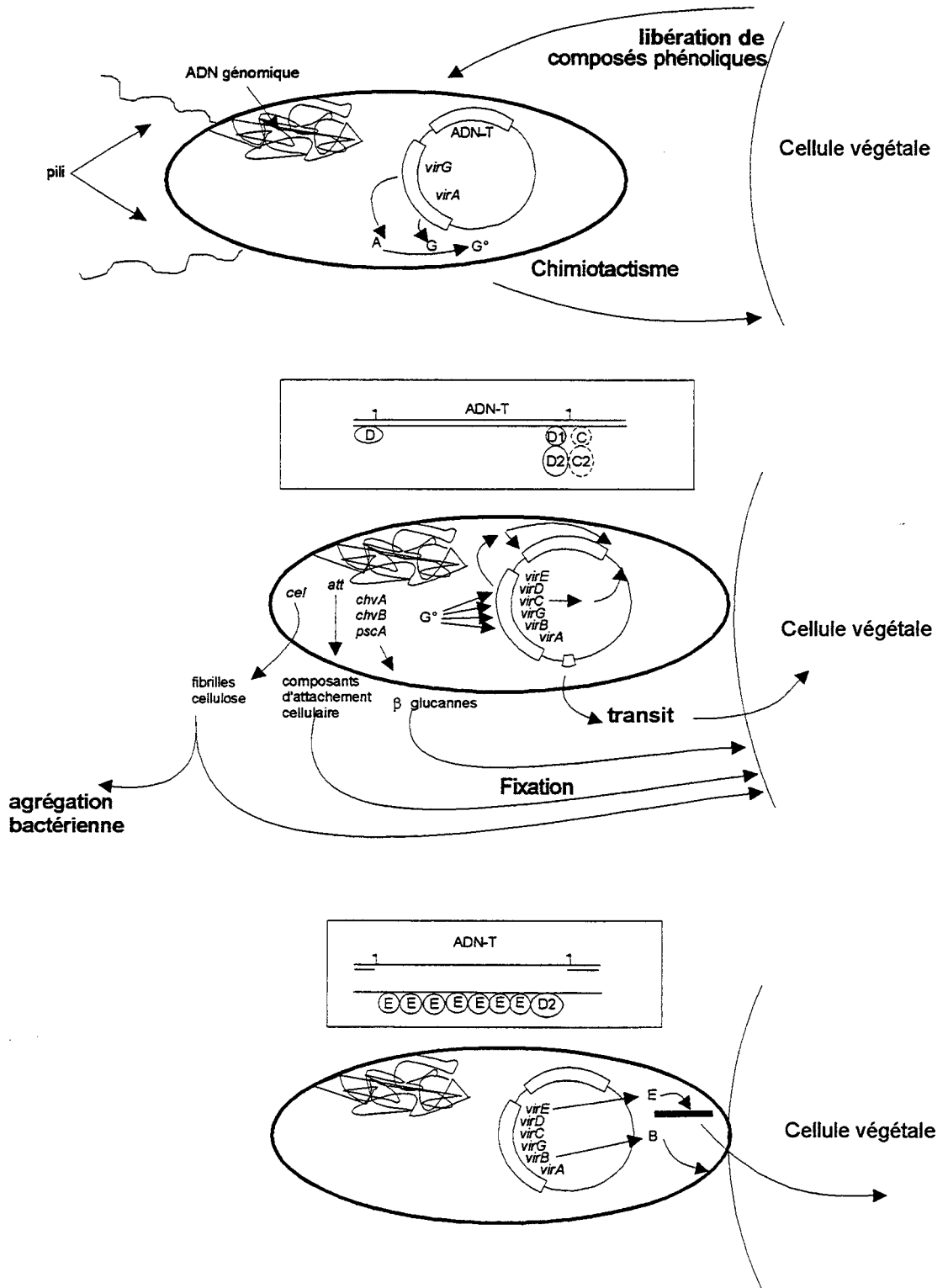


Fig. 4 : Passage de l'ADN T dans la cellule végétale

préférentiellement dans des régions où l'ADN peut être transcrit (Herman *et al.*, 1990). Cette intégration s'effectue par le biais d'un événement de recombinaison illégitime, et l'ADN exogène se maintient de façon stable une fois intégré. Le nombre de copies du T-DNA présentes dans les cellules transformées est généralement bas, variant de 1 à 10. Dans le cas de copies multiples, elles peuvent être localisées à différents endroits du génome ou au même locus, dans le même sens ou en sens inversé.

2 ~ Application aux biotechnologies

a- Les vecteurs binaires d'expression

L'utilisation d' *Agrobacterium tumefaciens* pour médier la production de plantes transgéniques provient des observations que le T-DNA ne joue pas de rôle dans le transfert de l'ADN ni dans son intégration dans le génome végétal (Caplan *et al.*, 1983). De plus, les gènes de virulence du plasmide Ti peuvent agir en *trans* et permettre le transfert et l'intégration d'un T-DNA d'un autre plasmide (Mc Bride *et al.*, 1990). Les vecteurs binaires sont des plasmides qui contiennent une origine de réplication pour *E. coli* et une pour *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan, 1984; Hoekema *et al.*, 1983). Ils contiennent également des marqueurs de sélection pour ces bactéries. Un ADN étranger peut être intégré dans un vecteur binaire derrière un promoteur fort comme le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (35S CaMV) (Odell *et al.*, 1985, 1988) entre les bordures qui permettent son intégration dans le génome hôte. Ces vecteurs recombinants sont alors introduits dans *Agrobacterium tumefaciens* qui possède déjà un plasmide Ti dont la région T a été déletée mais qui porte encore une région *vir* (Bevan, 1984). La transformation peut s'effectuer par culture de protoplaste ou par explant de tissus (An, 1985; Barton *et al.*, 1983). Pour cette dernière technique, des disques de feuilles sont mis en présence d' *Agrobacterium tumefaciens*, puis placés sur un milieu permettant l'initiation de bourgeons. Un antibiotique permet alors d'éliminer les bactéries restant et un herbicide ou un autre antibiotique permet éventuellement la sélection des cellules transformées. Celles-ci pourront régénérer des plantules produisant

peut-être la protéine étrangère, selon le lieu d'intégration dans le génome de l'hôte (Horsh *et al.*, 1985).

b- Les taux d'expression

Les rendements en protéines recombinantes obtenus jusqu'alors avec le système végétal sont faibles et représentent dans la plupart des cas 0,01% des protéines totales. Quelques auteurs rapportent des niveaux d'expression plus élevés, environ 1% (Hiatt *et al.*, 1989; Owen *et al.*, 1992). Ces taux de synthèse des protéines recombinantes sont liés principalement à l'efficacité de la transcription du gène, de la traduction des ARNm matures, à la stabilité des ARNm et enfin à la stabilité de la protéine produite. Afin d'atteindre des taux d'expression plus élevés, certains paramètres peuvent être optimisés. En particulier, il est possible de jouer sur l'intensité du promoteur cloné en amont du gène d'intérêt. D'autre part, il est important de contrôler le stockage *in vivo* de la protéine recombinante, en induisant son adressage dans un compartiment cellulaire choisi.

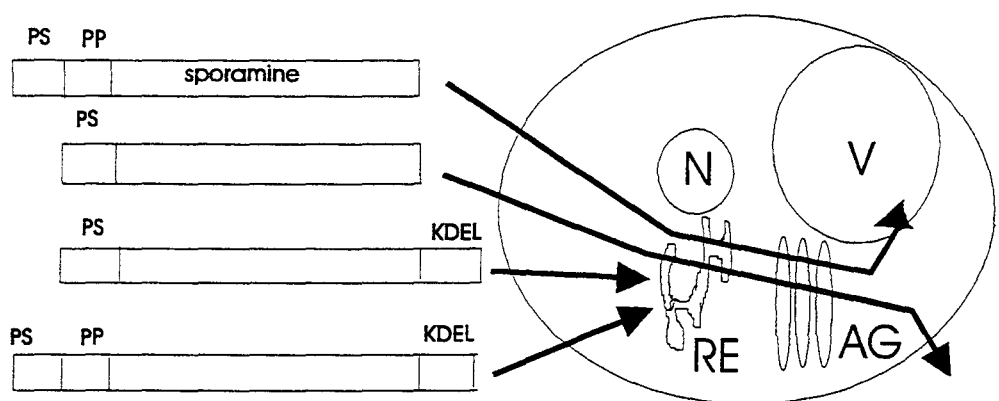
c- Les promoteurs

La transcription est sous le contrôle de séquences promotrices d'ADN nécessaires à son initiation. Le promoteur 35S choisi dans de nombreux travaux est responsable de la transcription de l'ARN 35S du CaMV (Odell *et al.*, 1985, 1988). Ce promoteur est le plus utilisé pour la production de plantes transgéniques. A titre d'exemple, la construction 35S NPTII permet une activité de l'enzyme 30 à 100 fois supérieure à celle obtenue avec la construction NOS NPTII (Sanders *et al.*, 1987). Néanmoins, pour améliorer les taux d'expression, certains auteurs suggèrent de placer la séquence codant pour la protéine hétérologue sous le contrôle de promoteurs «tissus spécifiques» tels que ceux rencontrés dans les organes riches en protéines comme les semences.

d- L'adressage des protéines chez les végétaux

La stabilité de la protéine synthétisée est essentielle pour obtenir des taux élevés de protéines recombinantes. Celle-ci varie en fonction du compartiment cellulaire dans lequel la protéine est stockée après sa maturation dans le réticulum endoplasmique. Par conséquent, la production en masse de protéine suppose la bonne maîtrise et l'orientation du transport intra-cellulaire des protéines dans la cellule végétale. Lorsque les protéines sont accumulées dans le cytoplasme, elles peuvent subir des attaques protéolytiques. Les compartiments cellulaires tels que le réticulum endoplasmique ou les vacuoles pourraient être des environnements plus stables, favorables à l'accumulation des protéines recombinantes. Pour orienter le transport des protéines recombinantes dans la cellule végétale, il existe différentes séquences peptidiques d'adressage d'origine végétale, qui sont associés à l'extrémité N ou C terminale de la protéine modèle (Duong *et al.*, 1987; Jones *et al.*, 1989). Elles permettent la rétention de la protéine hétérologue dans le réticulum endoplasmique ou son adressage dans la vacuole, ou bien encore son expression dans l'espace périplasmique. Les peptides KDEL et HDEL, dont la fonction est de retenir les protéines dans le réticulum endoplasmique, ont été identifiés du côté C-terminal de la protéine (Inohara *et al.*, 1989). Ainsi, une fusion de la viciline de pois avec le peptide KDEL, le tout sous le contrôle de promoteur 35S a été introduite chez le tabac par transformation génétique. Par comparaison avec la même construction sans le térapeptide, l'expression de la viciline est multipliée par un facteur 100, atteignant 2,5% des protéines totales de la feuille (Wandelt *et al.*, 1992) (Fig. 5).

Les séquences peptidiques responsables de l'adressage des protéines dans la vacuole ont été situées aux extrémités N- ou C-terminales de la protéine ou à l'intérieur même de la protéine. Ainsi la sporamine, protéine vacuolaire de la patate douce, présente, en plus d'un pré-peptide permettant l'entrée dans le système de sécrétion de la plante (peptide signal) une séquence N-terminale (propeptide de 19 acides aminés, composé principalement de résidus basiques) responsable de son accumulation dans les vacuoles (Matsuaka et Nakamura, 1991). Deux étapes protéolytiques sont impliquées dans la maturation de la protéine : la première étape est co-translationnelle et élimine le peptide signal en même temps que se déroule le transfert du polypeptide à travers le réticulum endoplasmique. La pro-sporamine migre alors à travers l'appareil de Golgi puis est exportée (Nakamura *et al.*, 1993).



- PP : propeptide de la sporamine permettant l'adressage vacuolaire
- PS : peptide signal de la sporamine permettant sa sécrétion (en l'absence du PP)
- KDEL ou HDEL : séquence de rétention dans le reticulum endoplasmique
- N : noyau
- RE : réticulum endoplasmique
- AG : appareil de Golgi
- V : vacuole

Fig. 5 : Représentation schématique de l'adressage des protéines dans le système végétal

La seconde étape est post-traductionnelle et clive le segment restant et la sporamine se retrouve au niveau de la vacuole (Hattori *et al.*, 1987, 1989). Ces résultats ont été confirmés par Matsuoka *et al.* (1991), qui, en retirant la séquence du propeptide par mutagenèse, ont permis la sécrétion de la sporamine dans le milieu extra-cellulaire. Pour la lectine de l'orge, la séquence est localisée à l'extrémité C-terminale de la protéine (Bednarek *et al.*, 1991). Dans certains cas, c'est probablement une partie interne qui permet l'adressage des protéines comme la patatine dans la vacuole de la cellule (Sonnevald *et al.*, 1991).

Ainsi, une connaissance approfondie des modes et des mécanismes de transport des protéines dans le système endomembranaire de sécrétion de la cellule végétale est un atout essentiel en vue d'améliorer le rendement de production des protéines recombinantes dans le système végétal.

e- La maturation des protéines recombinantes chez les végétaux

Chez les plantes, les différentes étapes de la maturation sont réalisées dans le système de sécrétion qui comprend principalement le réticulum endoplasmique, (RE), les endosomes et l'appareil de Golgi (Chrispeels *et al.*, 1991). Dès leur insertion dans la lumière du RE, les protéines subissent de nombreuses modifications co- et post-traductionnelles dont dépendra leur conformation. Des étapes de glycosylation et la formation des ponts disulfures sont également réalisées dans ce compartiment. Les protéines passent ensuite dans l'appareil de Golgi où elles subissent diverses étapes de phosphorylation et de glycosylation. Lorsqu'elles ont acquis leur forme mature, elles sont triées pour être sécrétées dans l'espace inter-cellulaire ou stockées dans des vacuoles. Récemment, une hémoglobine tétramérique fonctionnelle a été exprimée dans du Tabac transgénique démontrant ainsi la capacité des cellules végétales à conformer des protéines complexes (Dieryck *et al.*, 1997).

Conclusion

Ces différents systèmes d'expression ont chacun leurs propres limites. Ainsi, avec les hôtes génétiquement éloignés (bactéries et levures notamment), les étapes

de maturation post-traductionnelles des protéines exogènes, en particulier la glycosylation, sont souvent peu ou mal respectées. Or, beaucoup de molécules sont des glycoprotéines dont les sucres constitutifs affectent la conformation et interviennent dans l'activité biologique de la protéine et dans sa stabilité.

Avec les cellules animales, bien qu'à *priori* plus adaptées pour la transgénèse et l'expression de gènes humains, les niveaux d'expression atteints sont souvent très faibles. D'autre part, les cultures de cellules animales à grand volume sont coûteuses et délicates.

Quant aux animaux transgéniques (vaches, brebis) s'ils présentent des avantages certains (existence d'une maturation post-traductionnelle, taux d'expression élevés), ils sont réservés à une production de masse applicable uniquement à l'industrie et leur utilisation se heurte à de nombreux problèmes d'éthique.

II. Protéines recombinantes et glycosylation : problèmes et perspectives

(pour revue, cf Cumming, 1991, Jenkins et Curling, 1994)

A) Importance de la glycosylation

Alors que le génie génétique permet de contrôler parfaitement la séquence de la chaîne polypeptidique d'une glycoprotéine recombinante, il apparaît qu'il en va tout autrement de sa chaîne glycanique. En effet, la glycosylation fait intervenir une machinerie enzymatique très complexe, spécifique à chaque type cellulaire, et donc à chaque système d'expression. Ainsi, la glycosylation des protéines recombinantes est un problème crucial étant donné l'importance des rôles des glycannes, en ce qui concerne la conformation de la glycoprotéine, les processus de sécrétion, la clairance de la protéine et enfin son immunogénicité. Une glycosylation incorrecte peut avoir des effets néfastes à plusieurs niveaux:

1 ~ Effets sur la solubilité

D'une façon générale, les groupements hydroxyles des monosaccharides et les groupements carboxyliques des acides sialiques augmentent la solubilité des glycoprotéines. Ainsi, une absence de glycosylation ou même simplement de sialylation peut affecter la solubilité d'une glycoprotéine et peut apporter de graves problèmes lors des étapes de purification et de tests d'activité. Ceci a été démontré notamment avec le fibrinogène qui est insoluble lorsqu'il est déglycosylé (Nose et Wigzell, 1983; Leatherbarrow *et al.*, 1985)

2 ~ Effets sur la résistance à la protéolyse

Une mauvaise glycosylation peut diminuer la résistance aux protéases des protéines recombinantes, notamment en dévoilant des sites potentiels de clivage. Ce phénomène a d'ailleurs été remarqué dans le cas de l'érythropoïétine (Gold Wasseur, 1974), de l'activateur tissulaire du plasminogène (Wittwer, 1990) et de la lactoferrine recombinante (van Berkel *et al.*, 1995).

3~ Effets sur l'antigénicité

Les glycannes peuvent influencer l'immunogénicité des glycoprotéines de deux façons. Tout d'abord, le glycanne peut masquer un épitope antigénique d'une glycoprotéine (Skehel *et al.*, 1984; Caust *et al.*, 1987). L'absence d'une chaîne oligosidique peut ainsi dévoiler des zones immunogènes naturellement masquées. Le second mécanisme est lié à l'antigénicité des glycannes eux-mêmes (Gribben *et al.*, 1990). Dans les deux cas, l'apparition d'épitopes immunogènes est une conséquence dramatique pour une protéine à intérêt thérapeutique.

4 ~ Effets pharmacocinétiques

Il est bien établi que les glycannes peuvent affecter *in vivo* l'activité biologique des glycoprotéines circulantes en contrôlant leur clairance par deux

mécanismes distincts. Le premier s'opère par le biais d'un récepteur spécifique de type lectine membranaire, le second faisant intervenir le rein. Dans le premier cas, des récepteurs des asialoprotéines situés au niveau du foie (récepteurs à Man6P, à Fuc, à Gal/GalNAc, à Man/GlcNAc) (Ashwell et Harford, 1982; Sharon et Lis, 1989) sont capables de capter et d'internaliser très rapidement les glycoprotéines portant un galactose ou un mannose en position terminale non réductrice (Mc Farlane, 1983). Des glycoprotéines non ou incomplètement sialylées seront donc très rapidement éliminées par le foie. De la même façon, il existe des récepteurs à mannose et à N-acétylglucosamine au niveau des macrophages du foie et de la rate qui reconnaissent et éliminent les glycoprotéines possédant en fin de chaîne une acétylglucosamine ou une structure oligomannosidique. La demi-vie de la glycoprotéine peut alors être extrêmement réduite (Fukuda *et al.*, 1989).

5 ~ Effets directs sur l'activité biologique

Il se peut également que le glycanne lui-même porte la fonction biologique via l'interaction spécifique avec des molécules cibles. Ainsi, une modification de la glycosylation du récepteur de la transferrine altère la reconnaissance de son ligand (Hunt *et al.*, 1989). D'autre part, le GMCSF recombinant montre une plus forte affinité pour ses récepteurs lorsqu'il est déglycosylé (Moonen *et al.*, 1987) alors qu'une hyperglycosylation de cette molécule par les cellules COS réduit de 3000 fois son activité *in vitro* (LaBranche *et al.*, 1990). L'érythropoïétine recombinante a été fort étudiée. Aglycosylée, cette molécule est inactive (Sasaki *et al.*, 1987), alors que sous une forme hyperglycosylée par des cellules CHO, cette protéine voit son activité réduite *in vitro* (Takeushi *et al.*, 1989).

Les nombreuses implications des glycannes dans l'activité biologique d'une glycoprotéine nécessitent donc de choisir un système d'expression qui réponde au mieux aux nécessités imposées par l'expérimentation.

B) Les systèmes d'expression et leur glycosylation

Alors que les procaryotes ne permettent pas la biosynthèse de protéines recombinantes glycosylées, les systèmes utilisant des cellules eucaryotes quelles qu'elles soient le permettent, mais chacune avec leur spécificité.

1 ~ Les levures

Les N-glycannes des levures sont en général des oligosaccharides à taux élevé en mannose, avec des variations de longueur de chaîne suivant le type de levure. En effet, chez *S. cerevisiae*, le nombre de résidus de mannose est classiquement de 50 à 150, mais il peut toutefois être réduit à 30 chez *P. Pastoris* (Byrd *et al.*, 1982 ; Kuruzinska *et al.*, 1987 ; Grinna et Tshopp, 1989).

Les cellules de levure possèdent les premières étapes de glycosylation identiques à celles des cellules de mammifères. Néanmoins, l'hypermannosylation est une propriété commune à la plupart des souches de levures et compromet l'efficacité des protéines recombinantes (Herscovics et Orlean, 1993). Il apparaît toutefois que ces structures polymannosylées peuvent être évitées en exprimant la protéine d'intérêt dans des souches mutantes de levure (par exemple *mnn-9* ou *ngd-29*) chez lesquelles la N-glycosylation est réduite à un core oligosaccharidique comprenant un nombre limité de résidus de mannose (supérieur à Man₈GlcNAc₂) (Kniskern *et al.*, 1994 ; Lehle *et al.*, 1995).

2 ~ Les cellules de mammifères

En théorie, les espèces les plus proches de l'Homme phylogénétiquement ont une machinerie enzymatique très comparable. Cependant, chaque lignée cellulaire possède ses propres particularités et la glycosylation dépend d'une part, du type cellulaire utilisé et d'autre part, des conditions de culture. D'une façon générale, la plupart des cellules de mammifères expriment l' α 1-3 galactosyltransférase qui génère du Gal α 1,3-Gal β 1,4-GlcNAc. L'Homme fait partie des exceptions notables chez qui le gène est devenu inactif par suite d'une

mutation. Les cellules les plus couramment utilisées sont les cellules CHO chez lesquelles cette enzyme est également déficiente. Néanmoins, les CHO et les cellules BHK sont également déficients en α -2,6-sialyltransferase et synthétisent exclusivement des acides sialiques branchés en α -2,3, contrairement aux cellules humaines, qui possèdent les deux types d'enzyme (Lee *et al.*, 1989). Il faut noter cependant que les lignées CHO et BHK ont pu être modifiées génétiquement, ce qui a permis l'obtention de lignées exprimant des protéines recombinantes possédant à la fois des acides sialiques branchés en α -2,3 et en α -2,6 (Lee *et al.*, 1989, Grabenhorst *et al.*, 1995).

3 ~ Les cellules d'insectes

Les cellules d'insectes possèdent des structures glycaniques beaucoup plus simples que celles des mammifères. Leur système enzymatique est capable de greffer un précurseur $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ sur un site de N-glycosylation puis de le convertir en $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Ces cellules possèdent également une α mannosidase I (Jarvis, et Garcia, 1994; Ren *et al.*, 1995), une N-acétylglucosaminyltransferase I (Altman *et al.*, 1993a ; Velardo *et al.*, 1993) et une α mannosidase II (Altman *et al.*, 1995; Jarvis *et al.*, 1996) dont les activités sont nécessaires à la conversion du $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ en $\text{GlcNAc-Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Chez les eucaryotes supérieurs, une extension peut être greffée à cette structure par une N-acétylglucosaminyltransferase II, une galactosyltransferase et une sialyltransferase pour produire un complexe biantenné contenant un galactose suivi d'un acide sialique en position terminale (Kornfeld et Kornfeld, 1985). Les cellules d'insecte ne produisent généralement pas ces structures complexes, ce qui implique que le système enzymatique est soit absent, soit présent en trop faible quantité pour être efficace dans ces cellules. Le plus souvent, les N-glycannes sont des $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ avec ou sans fucose (Kubelka *et al.*, 1994).

Les cellules de lépidoptères présentent un faible taux d'activité N-acétylglucosaminyltransferase II (Altman *et al.*, 1993a). Ainsi, ces cellules sont théoriquement capables de produire trois intermédiaires contenant une GlcNAc en position terminale (sur chaque branche ou sur les deux branches du $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$),

chacun d'eux pouvant être modifié par une β 1-4-galactosyltransferase (Kornfeld et Kornfeld, 1985). Récemment, Jarvis et Finn (1996) ont construit un nouveau type de vecteur capable d'exprimer un gène en phase précoce d'infection, sous le contrôle du promoteur du gène *ie1*. En théorie, ce type de vecteur pourrait être utilisé pour modifier la voie de N-glycosylation des cellules d'insectes en permettant l'expression d'enzymes de maturation dès le début de l'infection, et qui pourrait être fonctionnels comme toute partie intégrante du complexe enzymatique cellulaire. Ces enzymes pourraient ainsi contribuer au processus de maturation d'un substrat en phase tardive d'infection. Jarvis et Finn (1996) ont ainsi cloné l'ADNc de la β 1,4-galactosyltransferase en aval du promoteur de *ie1*. L'activité de cette enzyme est détectable 4 h après infection et augmente pour atteindre un plateau 12 h après l'infection. La glycosylation de la protéine virale gp64, qui est exprimée 24 h après l'infection montre qu'au moins une chaîne oligosidique est galactosylée par l'enzyme. Ces résultats laissent entrevoir un possible contrôle de la glycosylation chez les cellules d'insectes.

4 ~ Les cellules végétales

Les glycanes végétaux présentent des différences majeures par rapport aux N-glycanes de protéines de mammifères, en particulier, la présence de fucose en α -1,3 et de xylose β -1,2, et l'absence d'acide sialique (Faye *et al.*, 1993) (Fig. 6). Ainsi, l'érythropoïétine (EPO) produite dans des cellules de Tabac n'a pas d'activité *in vivo*, probablement à cause de son taux de clairance (Matsumoto *et al.*, 1995). Les particularités structurales de glycanes de plantes leur confèrent une très forte immunogénicité qui interdit pour l'instant l'usage thérapeutique *in vivo* par injection de glycoprotéines recombinées par les plantes (Altmann *et al.*, 1993b ; Ma *et al.*, 1995). Néanmoins, il est possible d'envisager une maîtrise de la glycosylation permettant d'aboutir à des glycanes non immunogènes. Ainsi, en premier lieu, le RE pourrait être utilisé avantageusement comme compartiment de stockage des glycoprotéines recombinantes dans les cellules végétales. Non seulement parce que ces glycoprotéines présentent la plus grande stabilité dans le RE mais aussi car celles qui sont retenues n'ont probablement pas leurs glycanes maturés par les enzymes golgiennes, et donc ne sont pas encore rendues immunogènes. Dans une

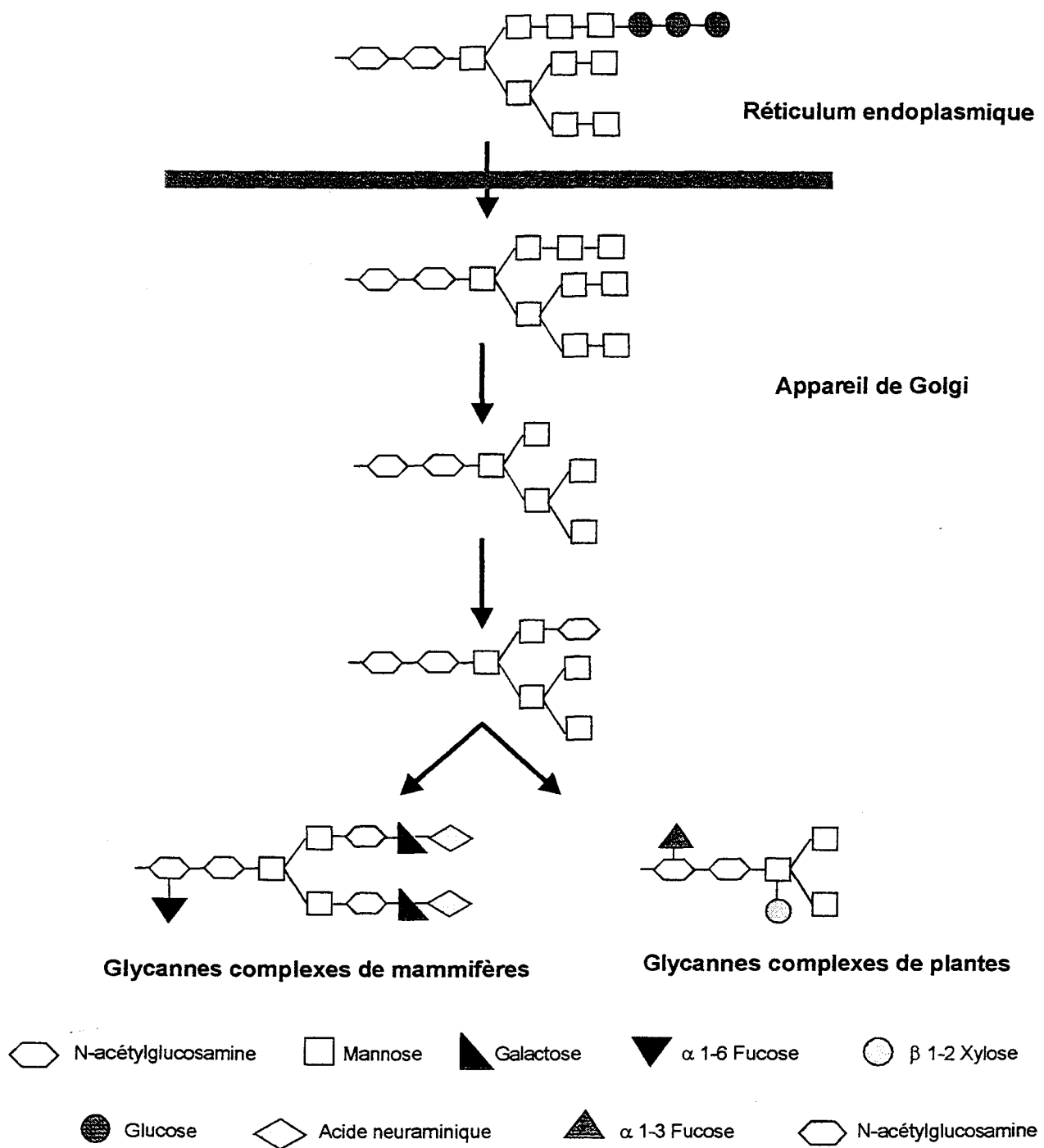


Fig. 6 : Biosynthèse des N-glycannes chez les plantes et chez les mammifères (Gomord et al., 1996)

seconde stratégie, l'utilisation de plantes déficientes en une ou plusieurs des enzymes golgiennes responsables de la maturation des glycanes complexes pourrait résoudre ce problème. Récemment, von Schaeven *et al.* (1993) ont isolé un mutant d'*Arabidopsis thaliana* qui, bien que déficient en N-acétylglucosaminyltransférase I (GNT I) et ne fabriquant plus de glycanes complexes, se développe normalement et présente un cycle végétatif complet. Ce mutant synthétise exclusivement des glycanes de type oligomannosidique principalement de la structure $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, également observée chez les mammifères. Les glycoprotéines qu'il produit ne sont donc pas immunogènes. Cette étude met également en évidence le rôle clé de la GNT I dans la biosynthèse des glycanes complexes chez les végétaux. Cet enzyme est maintenant une cible potentielle pour la stratégie d'inactivation de gènes dans des plantes de grande culture en vue de la production en masse de glycoprotéines non immunogènes. D'autre part, Lerouge *et al.*, (1996) ont démontré en inhibant la maturation des N-glycanes que les glycoprotéines dont la maturation s'est arrêtée au stade $\text{Glc}_3\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ sont exportées dans le compartiment extra-cellulaire des cellules de sycomore, ce qui suggère que les glycanes matures ne sont pas indispensables à la sécrétion des glycoprotéines chez les plantes.

Conclusion

La glycosylation, compte tenu des potentialités de chaque système d'expression à laquelle s'ajoute le problème des microhétérogénéités valables pour toute protéine glycosylée, s'avère une question cruciale concernant l'avenir et les limites des protéines recombinantes en particulier, pour celles destinées à usage thérapeutique.

III. Clonage et expression de la lactoferrine humaine

A l'heure actuelle, l'ADNc de la lactoferrine a été exprimé par plusieurs systèmes d'expression en système eucaryote.

A) Expression par des cellules de mammifères

La lactoferrine a été exprimée pour la première fois par Stowell *et al.* (1991) dans les cellules BHK. La protéine recombinante est sécrétée dans le milieu de culture à une concentration de 20 mg / litre de milieu. Le spectre d'absorption et la fixation du fer sont identiques à celle de la lactoferrine native. Dans notre laboratoire, nous avons également exprimé de la lactoferrine dans ce type de cellule (Legrand *et al.* 1995). Une analyse approfondie de la structure des glycanes a été réalisée par spectroscopie RMN-400 Mhz. Les structures identifiées correspondent à des glycanes biantennés de type N-acétyllactosaminique sous la forme disialylée en α -2,3 (80%) ou monosialylée en α -2,3 (20%). De plus, 70% du total des glycanes sont fucosylés en α -1,6 au résidu de GlcNAc lié à l'asparagine. Ainsi, à la vue de ces données, la protéine recombinante est très proche de la lactoferrine native isolée du lait ou des neutrophiles, mais elle présente toutefois des particularités structurales. Enfin, les propriétés de la lactoferrine en absence de glycosylation ont été étudiées par van Berkel *et al.* (1995) en exprimant la lactoferrine recombinante par des cellules de rein humain, en présence et en absence de tunicamycine. Par ce système, ils démontrent que les glycanes n'influencent ni la fixation du fer de la lactoferrine, ni sa fixation aux lipopolysaccharides bactériens. En revanche, les glycanes augmentent de façon considérable la résistance de la lactoferrine à la protéolyse.

B) Expression par des levures

La lactoferrine a également été exprimée dans les levures. Produite par *Aspergillus oryzae*, la lactoferrine est obtenue à raison de 25 mg/ litre de milieu de culture (Ward *et al.* , 1992a) alors qu'avec *Aspergillus niger*, ces mêmes auteurs obtiennent 5 mg/litre (Ward *et al.*, 1992b, Ward *et al.*, 1995). Dans ce cas, seulement 30% de la lactoferrine exogène est sécrétée dans le milieu. Pour les deux types de production, la lactoferrine recombinante est conforme à la lactoferrine du lait au niveau de sa taille, de son immunoréactivité et de sa capacité à fixer le fer. Liang et Richardson (1995) ont travaillé sur *Saccharomyces cerevisiae*. Une construction moléculaire fusionnant le peptide signal de l'invertase de levure à la séquence de la lactoferrine leur permet d'obtenir la sécrétion de 1 à 2 mg/litre de milieu de culture. En revanche, il est intéressant de noter que l'utilisation du peptide signal naturel de la lactoferrine ne permet quasiment pas la sécrétion de la protéine. De plus, il semblerait que la lactoferrine synthétisée soit toxique pour ce type de levure.

C) Expression par des animaux transgéniques

Récemment, Platenbourg *et al.* (1994) puis Nuijens *et al.* (1997) ont produit des souris transgéniques exprimant la lactoferrine humaine. Les séquences de régulation dérivées du gène de l' α S1 caséine bovine, suivie de son peptide signal ont été fusionnées à la séquence codant pour la lactoferrine mature. C'est ainsi que plusieurs lignées de souris transgéniques ont été établies. Les ARNm de lactoferrine humaine ont été détectées exclusivement dans la glande mammaire de femelles lactantes. Les taux de protéine humaine dans le lait de souris peuvent atteindre 36 μ g/ml. Cette lactoferrine recombinante ne diffère pas de celle du lait de Femme en ce qui concerne sa masse moléculaire et son immunoréactivité. Néanmoins, le degré de saturation en fer et la glycosylation diffèrent de ceux de la lactoferrine du lait humain. Il faut noter que cette même équipe a également produit un veau transgénique ayant intégré dans son génome l'ADNc de la lactoferrine humaine (Krimpenfort *et al.*, 1991).

D) Expression par les végétaux transgéniques

Il y a peu de temps, Mitra et Tang (1994) ont tenté d'exprimer la lactoferrine humaine dans une suspension de cellules NT1 de Tabac (*Nicotiana tabacum*). La séquence codant pour la lactoferrine, déletée de son peptide signal, a été clonée en aval du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (35S CaMV), et le codon Stop de la lactoferrine était immédiatement suivi des séquences de terminaison du gène de la nopaline synthase (Tnos). Avec cette construction, les auteurs n'ont pas obtenu la lactoferrine intégrale. Néanmoins, les cellules transformées synthétisent une protéine recombinante de 48 kDa qui est détectée par les anticorps anti-lactoferrine humaine. Ce fragment de lactoferrine n'a pas été analysé plus en détail. Celui-ci protégerait toutefois les cellules de tabac des bactéries phytopathogènes.

Conclusion

Ainsi, la structure de la lactoferrine humaine est maintenant bien connue. En effet, alors que la séquence de la lactoferrine est totalement identifiée, les données sur sa conformation tridimensionnelle s'avèrent également très précises, notamment grâce à des études cristallographiques sans cesse améliorées. Malgré ces connaissances structurales, les activités biologiques de la lactoferrine restent encore mal définies. Les nombreux rôles de la lactoferrine mettent en jeu des cellules cibles de la protéine et en particulier des récepteurs spécifiques de la lactoferrine. Dans la plupart des cas, les connaissances sur les interactions de la lactoferrine humaine et de ses ligands sont encore à préciser. La mutagenèse dirigée et l'expression de protéines recombinantes apparaissent comme une étape nécessaire à l'étude précises des interactions de la lactoferrine et de ses sites d'interaction, et par

conséquent à la compréhension des activités biologiques de la lactoferrine. Il faut noter par ailleurs que de nombreuses équipes se sont tournées vers l'expression de protéines recombinantes non seulement dans le but d'études des relations structure-fonction, mais aussi pour des applications directes des nombreux rôles de la lactoferrine humaine.

Travaux personnels

Objectifs

La découverte de récepteurs spécifiques de la lactoferrine humaine à la surface de nombreuses cellules et, en particulier, de cellules sanguines, a ouvert au laboratoire un large champ d'investigations concernant la nature des interactions moléculaires entre le ligand et son récepteur. Dans ce but, des travaux utilisant des fragments de lactoferrine obtenus par protéolyse ménagée, et des protéines modifiées chimiquement ont été réalisés.

En 1989, par des expériences de compétition entre la lactoferrine native marquée à l' ^{125}I et des fragments obtenus par hydrolyse protéolytique ménagée, Rochard *et al.* ont démontré que seule la moitié N-terminale est impliquée dans la reconnaissance de la lactoferrine par son récepteur. Puisque le glycopeptide N2 (domaine N II) n'inhibe pas la fixation de la lactoferrine sur son récepteur, les auteurs ont conclu, d'une part, que les glycanes de la protéine ne jouent pas de rôle dans l'interaction lactoferrine-récepteur, et, d'autre part, que le domaine N I est impliqué dans cette reconnaissance.

Par la suite, l'hydrolyse du lobe N-terminal de la lactoferrine par la protéase V8 a fourni un peptide du domaine N I (résidus 4 à 52) qui inhibe fortement la fixation de la molécule entière sur son récepteur lymphocytaire (Legrand *et al.*, 1992). Ce résultat a été confirmé par modification chimique de la protéine. En effet, il a été démontré que le SASD, un réactif bifonctionnel et l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), pouvaient inhiber la fixation de la lactoferrine sur son récepteur par simple masquage du site d'interaction. Un troisième réactif, le sulfo-SANPAH, pourtant analogue au SASD, n'a pas cet effet inhibiteur. Par isolement et séquençage des peptides porteurs des molécules de FITC, SASD et sulfo-SANPAH, les acides aminés modifiés par ces réactifs ont pu être localisés sur la protéine. Les trois réactifs se fixent sur le domaine NI de la lactoferrine mais, comme le montrent des études de modélisation moléculaire, seuls le FITC et le SASD sont capables de masquer partiellement les résidus 4 à 52 (Legrand *et al.*, 1991, 1992).

Ces travaux ont permis de conclure que le site d'interaction de la lactoferrine avec son récepteur est compris entre les 52 premiers résidus de la protéine. Sur la base de la modélisation moléculaire et de comparaisons de séquences, il apparaît que deux régions possèdent des caractéristiques structurales spécifiques de la lactoferrine : les acides aminés 1-5 et 28-34. Une troisième région (39-42) contient une séquence analogue à la séquence RGDS du fibrinogène, séquence qui intervient dans l'agrégation des plaquettes.

Il est également intéressant de noter que ce peptide est doté du pouvoir bactéricide de la protéine native (Bellamy *et al.*, 1992).

Cette région intéressante à plus d'un titre méritait donc d'être étudiée davantage. Seul le génie génétique nous permettait de poursuivre cette étude afin de vérifier les hypothèses suggérées par les techniques de biochimie classique. C'est ainsi que le Laboratoire s'est tourné vers la production de lactoferrines recombinantes.

Nos premiers objectifs concernaient la mise au point d'un système d'expression efficace et rapide de la lactoferrine, parallèlement à des travaux de mutagenèse dirigée de la lactoferrine humaine visant à modifier le site d'interaction avec ses cibles cellulaires.

Dans une première partie de nos travaux, nous avons choisi d'exprimer la lactoferrine dans des cellules de mammifères puis dans des cellules d'insectes infectées par un baculovirus recombinant. Ces systèmes nous ont permis d'obtenir non seulement de la lactoferrine humaine native mais aussi des protéines mutées.

Parallèlement à ces travaux de mutagenèse dirigée et dans le cadre de la production de protéines recombinantes par différents systèmes d'expression, nous avons engagé une collaboration avec le laboratoire BIOCEM, filiale du groupe Limagrain, en vue d'exprimer la lactoferrine humaine dans des plantes transgéniques. Dans ce but, le tabac, modèle classique d'expression de protéines hétérologues, a été choisi pour la transgénèse en système végétal. L'expression de protéines humaines dans les plantes étant une technologie encore récente et partiellement maîtrisée, l'expression de lactoferrine dans le tabac présente un intérêt fondamental et appliqué. En effet, de nombreux facteurs comme la nature des vecteurs utilisés, les séquences régulatrices reconnues par la cellule végétale, et la

protéine hétérologue exprimée, influencent cette expression. Ainsi, des signaux d'adressage permettent de cibler le lieu de stockage d'une protéine. Néanmoins, ces signaux sont encore mal connus et les peptides signaux de cellules animales sont ou ne sont pas reconnus par le système végétal selon des critères qui nous échappent encore. De plus, la glycosylation des protéines humaines recombinantes chez les plantes est un sujet d'intérêt encore peu étudié. L'étude de l'expression de la lactoferrine humaine dans le tabac ainsi que celle des propriétés biochimiques de la protéine recombinante pouvait servir de modèle applicable aux glycoprotéines humaines exprimées dans le système végétal. D'autre part, les nombreux rôles de la lactoferrine humaine pouvaient laisser supposer une application directe de cette protéine purifiée à partir du tabac, à des fins nutritionnelles ou thérapeutiques.

Enfin, nos objectifs se sont élargis à l'étude des lactoferrines recombinantes exprimées par ces différents systèmes, plus particulièrement en ce qui concerne leur maturation, leur conformation et leurs propriétés biochimiques. C'est ainsi que les propriétés physico-chimiques et biologiques des lactoferrines exprimées dans les cellules de mammifères BHK, dans les cellules d'insectes et dans le tabac ont été étudiées.

Nos résultats sont exposés en quatre parties:

La première partie décrit le système d'expression de la lactoferrine humaine dans les cellules de mammifère BHK, et, en particulier, une analyse approfondie de sa structure glycanique.

Le second chapitre concerne l'expression de la lactoferrine humaine dans les cellules d'insecte Sf9 et l'étude des propriétés biochimiques de la protéine recombinante.

Les résultats obtenus avec le tabac transgénique exprimant la lactoferrine humaine sont présentés dans une troisième partie.

Enfin, nous exposons nos résultats concernant les applications des systèmes d'expression BHK et baculovirus/cellules d'insectes, c'est-à-dire l'obtention de lactoferrine mutée ponctuellement et les conclusions quant à l'implication de certains acides aminés dans les interactions de la lactoferrine et ses cibles cellulaires et moléculaires.

Expression de la lactoferrine humaine dans les cellules BHK

I. Introduction

Au laboratoire, les premiers travaux d'expression de lactoferrine ont été réalisés avec un système hôte permettant des modifications post-traductionnelles les plus proches possibles de celles réalisées dans la protéine native. Des essais préliminaires ont été menés en exploitant le système d'expression transitoire dans les cellules fibroblastiques COS. Ce système ne permettant d'obtenir que de très faibles quantités de l'ordre de quelques μg de lactoferrine par boîte de cellules, nous nous sommes tournés vers des techniques d'expression permanente. Ces systèmes, contrairement au précédent, permettent dans certaines conditions, la multiplication et l'intégration des copies du gène hétérologue dans le génôme de la cellule hôte. L'utilisation d'antibiotiques permet la sélection des clones possédant le plus grand nombre de copies du vecteur d'expression, ce qui mène à l'obtention de clones exprimant la protéine d'intérêt de façon permanente et à des taux de l'ordre de quelques centaines de $\mu\text{g/l}$ de milieu. Il est ensuite possible d'amplifier l'expression grâce à une pression de sélection, jusqu'à des taux de quelques dizaines de mg/l de protéines recombinantes. Les cellules les plus couramment utilisées pour ce type d'expression sont les cellules fibroblastiques CHO ou BHK (Baby Hamster Kidney). Les cellules BHK ont été choisies pour la production de lactoferrine.

(*)

Les 4 des BPR (Bio-Processus) se sont réalisés pour la
première fois.

II Construction des vecteurs

A) Clonage de l'ADNc de la hLf

Une banque d'ADNc de cellules de glande mammaire humaine clonée dans λ gt11 a été criblée grâce à une sonde oligonucléotidique complémentaire de la séquence codant pour les 7 premiers acides aminés de la lactoferrine. L'ADNc complet de la lactoferrine de 2,3 kb, a été excisé de λ gt11 par hydrolyse ménagée par *EcoRI* et sous cloné dans le vecteur pBluescriptII SK au site de polyclonage *EcoRI*. Après séquençage de l'insert, le vecteur obtenu nommé pBS-hLf a permis l'amplification et le stockage de la séquence codant pour la hLf.

B) Construction du vecteur d'expression

Le plasmide pBS-hLf a été hydrolysé au niveau de son site de polyclonage par *XbaI* et *HindIII* et l'ADNc de la hLf a été isolé. Les extrémités cohésives de ce fragment de 2,3 kb ont subi l'action de la Polymérase I qui a permis l'obtention de bouts francs. La séquence codant pour la hLf a alors pu être sous-clonée dans le vecteur d'expression pNUT (généreusement donné par le Dr R. Palmiter [Stowell *et al.*, 1991]) préalablement hydrolysé par *SmaI*. Le nouveau construit fut nommé pNUT-hLf. Le vecteur pNUT est constitué d'un fragment du plasmide PUC 18 qui lui permet de se répliquer dans des bactéries. Il contient également une origine de répllication de SV40, l'ADNc de la dihydrofolate réductase (DHFR) sous contrôle des séquences en 3' du virus de l'hépatite B, qui permet la sélection des clones cellulaires après la transfection et l'amplification génique sous la pression de concentrations croissantes en méthotrexate (MTX). Enfin, l'insert cloné après digestion du vecteur par *SmaI* est sous le contrôle du promoteur de la métallothionéine (promoteur inductible par le zinc).

✓

III. Expression et purification de la lactoferrine

A) Transfection et sélection des clones cellulaires recombinants

Les cellules BHK ont été cultivées en routine en milieu DMEM, supplémenté de 10% de sérum de veau foetal et de gentamicine (50 µg/ml), à 37°C et 5 % de CO₂. Ces cellules ont été cotransfectées par le plasmide pcDNA1/neo et par pNUT-hLf dans des rapports de 1/20, selon la technique conventionnelle du phosphate de calcium. La sélection des cellules transfectées s'est faite par ajout de généticine (G-418) dans le milieu de culture, à raison de 700 µg/ml. La résistance à cet antibiotique est apportée par pcDNA1/neo.

Après la sélection des cellules transfectées, l'addition progressive de MTX dans le milieu a permis la sélection des cellules ayant amplifié le plasmide pNUT-hLf. Les cellules survivant dans 300 µM de MTX ont été utilisées pour la production de hLf recombinante.

B) Production et purification de la rhLf

En conditions de production, les cellules BHK ont été cultivées dans du DMEM/F12 en présence d'Ultroser G à 1 %. L'expression de hLf a été induite par le zinc. Le milieu a été collecté tous les 3 jours et stocké. Celui-ci, analysé par méthode ELISA, contenait 5 à 15 mg de rhLf par litre.

Lors des étapes de purification, la protéine recombinante a été purifiée sur colonne d'échange de cations SP Sepharose. Après élution par un gradient en NaCl, les fractions contenant la rhLf furent concentrées et dialysées. La pureté de la protéine purifiée a été vérifiée par SDS-PAGE, et la rhLf a été visualisée sous la forme d'une bande protéique de 80 kDa. Après purification, nous avons obtenu plus de 7 mg de rhLf par litre de milieu de culture.

X

C) Analyse de la structure glycanique de la rhLf

1 ~ Introduction

L'importance de la glycosylation dans les protéines recombinantes nous a incité à étudier la composition et la structure des chaînes glycaniques de la rhLf, ce qui donné lieu à la publication d'un article:

Legrand, D., **Salmon, V.**, Coddeville, B., Benaïssa, M., Plancke, Y. and Spik, G. (1995) Structural determination of two N-linked glycans isolated from recombinant human lactoferrin expressed in BHK cells. *FEBS Lett.* **365**, 57-60

Structural determination of two N-linked glycans isolated from recombinant human lactoferrin expressed in BHK cells

Dominique Legrand, Valérie Salmon, Bernadette Coddeville, Monique Benaissa, Yves Plancke, Geneviève Spik*

Laboratoire de Chimie Biologique, UMR CNRS n°111, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Received 22 March 1995; revised version received 6 April 1995

Abstract A full-length cDNA coding for human lactoferrin was isolated from a mammary gland library and the recombinant protein was expressed in BHK cells as described by Stowell K.M. et al. [1991, *Biochem. J.* 276, 349–355]. Two N-linked glycans from purified recombinant lactoferrin were released by hydrazinolysis and analyzed by 400-MHz ¹H-NMR spectroscopy. The identified structures corresponded to N-acetyllactosaminic biantennary glycans and were α -2,3-disialylated forms (80%) or α -2,3-monosialylated (20%) forms. Moreover, 70% of total glycans were α -1,6-fucosylated at the GlcNAc residue linked to asparagine. In regard to its glycan moiety, the recombinant glycoprotein is close to native lactoferrins from milk or leucocytes but shows specific structural features which should be taken into account prior to *in vivo* and *in vitro* biological studies.

Key words: Human lactoferrin; Lactotransferrin; N-glycan; Recombinant glycoprotein; BHK cell

1. Introduction

Human lactoferrin (or lactotransferrin) (hLf) is a 80 kDa bilobed glycoprotein of the transferrin class which is found in secretions, mainly in milk [1], and is also present in neutrophilic leucocytes [2]. No significant differences between milk and leucocyte hLfs have been reported with respect to the protein moiety [3] but the two N-acetyllactosaminic glycans of the molecules are different [4,5]. Milk hLf glycans differ from those of the leucocyte protein by the presence of α -1,6 and α -1,3 fucose residues and by the degree of sialylation [4,5]. Since the only specific structural features of hLfs from various tissues concern the nature of the carbohydrate chains, the question of the influence of the glycan moiety on the biological activities of hLf can be raised. In particular, it can be assumed that the clearance of hLf in the organism or its distribution on cells or tissues is mediated through carbohydrate recognition systems. The binding of milk hLf to monkey enterocytes [6], rat hepatocytes [7,8] and human macrophages [9], essentially through fucose-binding membrane lectins, has been reported. This binding probably does not occur for leucocyte hLf since the molecule is not fucosylated [5].

Expression of cloned hLf [10] and of its N-terminal half [11]

in BHK cells has been previously performed to undertake structural, functional and biological studies. Recombinant hLf was shown to be N-glycosylated but the structure of the glycans was not determined [10].

Since the definition of the glycosylation pattern of a recombinant protein is of importance for biological studies, we have cloned hLf and produced the recombinant protein in BHK cells. We have resolved the complete structure of two glycans of the recombinant protein using 400-MHz ¹H-NMR spectroscopy.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All restriction endonucleases and nucleotides were obtained from Eurogentec (Seraing, Belgium). T4 ligase and T4 polynucleotide kinase were from Stratagene (La Jolla, USA). pcDNA1/neo was obtained from Invitrogen (San Diego, USA). Dulbecco's modified essential medium (DMEM), DMEM-F12 nutrient mixture, foetal-calf serum (FCS), Ultraser-G, gentamicin and geneticin G-418 were from Gibco BRL (France). Methotrexate (MTX) was from ICN Biomedical (Aurora, USA). SP-Sepharose Fast Flow was from Pharmacia Biotech (St-Quentin-Yvelines, France) and BioGel P2 was from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA). D₂O (99.95 atom % D) was from the Commissariat à l'Energie Atomique (Saclay, France). Hydrazine, acetic anhydride, sodium acetate, copper acetate and N+O columns sets were from Oxford GlycoSystems (Abingdon, UK). All other reagents were analytical grade or purer.

2.2. Isolation of hLf cDNA and vector construction

A human mammary gland cDNA library constructed in the λ gt11 vector (Clontech, Palo Alto, USA) was screened with a synthetic oligonucleotide corresponding to nucleotides 293–317 of hLf cDNA (numbered according to [12]) as a hybridization probe and a positive clone was isolated and sequenced. Due to the presence of an *EcoRI* restriction site at position 2,413 in the coding sequence of the hLf cDNA [12], a full-length 2.3 kb cDNA was excised from λ gt11 using mild *EcoRI* hydrolysis conditions (3 U enzyme/ μ g DNA for 2 min at 37°C) and subcloned into the *EcoRI* site of pBluescript SK (Stratagene, La Jolla, USA). The resulting plasmid was then digested with *XbaI* and *HindIII* and the *XbaI/HindIII* 2.3 kb fragment, made blunt-ended, was subcloned into the *SmaI* site of the expression vector pNUT (generously provided by Dr. R. Palmiter [13]) to yield pNUT-hLf.

2.3. Cell culture, transfection and expression

Baby hamster kidney cells (BHK) kindly provided by Dr. L. Montagné (Institut Pasteur, Paris, France) were maintained on DMEM with 10% (v/v) foetal-calf serum and gentamicin (50 μ g/ml) (DME/FCS) at 37°C and 5% CO₂ air environment. BHK cells were cotransfected both with pcDNA1/neo and pNUT-hLf in a ratio of 1/20 by the conventional calcium phosphate technique [14]. For selection of stable transfectants, cells were first cultured in DME/FCS that contained 700 μ g/ml of active G-418 and the surviving colonies were grown sequentially with increasing concentrations of methotrexate (MTX), according to [15]. Expression of recombinant hLf from cells surviving in 300 μ M MTX was carried out in DME/F12 with 1% Ultraser G [15].

*Corresponding author. Fax: (33) 20 43 65 55.

Abbreviations: hLf, human lactoferrin; DMEM, Dulbecco's modified essential medium; BHK, baby hamster kidney; EPO, erythropoietin; MTX, methotrexate; NMR, nuclear magnetic resonance; TLC, thin-layer chromatography; GLC, gas liquid chromatography.

2.4. Purification and analysis of recombinant protein

Recombinant hLf was purified from DME/F12U by ion exchange chromatography. Medium was first centrifuged at $3,000 \times g$ for 15 min to eliminate cells in suspension and passed through a SP-Sepharose Fast Flow column equilibrated with 0.2 M sodium acetate. hLf was eluted with a salt gradient from 0 to 1 M NaCl in 0.2 M sodium acetate. The presence of recombinant hLf in eluted fractions was assessed by ELISA [16]. Positive fractions were pooled, concentrated, dialyzed and stored at -20°C . The purity of recombinant hLf was checked by SDS-PAGE.

2.5. Release and isolation of oligosaccharides

Oligosaccharides from recombinant hLf were released by hydrazinolysis using the GlycoPrep 1000 apparatus (Oxford GlycoSystems) [17]. Hydrazinolysis of 2 mg of recombinant glycoprotein was automatically processed with controlled conditions of temperature and time under an argon atmosphere. After removing excess hydrazine, N-acetylation was achieved by addition of acetic anhydride in a saturated solution of NaHCO_3 . Sodium ions and peptide material were removed from the sample by passage through a column of Dowex AG50 \times 12. The aceto-hydrazone glycan derivatives were converted to unreduced glycans by addition of 1 mM copper acetate for 30 min at 27°C [18]. After passage through a mixed bed column of Chelex 100/Dowex AG50 \times 12, the oligosaccharides were collected, concentrated and purified on a BioGel P2 column (12 \times 60 cm). Elution was carried out with distilled water. The oligosaccharide fraction was stained with the orcinol-sulfuric reagent spray on TLC plates and freeze-dried for further analysis.

2.6. Carbohydrate composition

Monosaccharide molar ratios and percentage composition of total neutral sugars, hexosamines and sialic acids were determined after methanolysis, re-N-acetylation [19] and GLC of the trimethylsilylated methyl glycosides [20] on a capillary CP SIL 5CB column (0.2 mm \times 25 m).

2.7. 400-MHz $^1\text{H-NMR}$ Spectroscopy

For the $^1\text{H-NMR}$ spectroscopic analysis, the oligosaccharides were repeatedly exchanged in D_2O at room temperature and at pH 7 with intermediate lyophilization [21] and the 400-MHz $^1\text{H-NMR}$ spectra were recorded on a Brüker AM 400-WB spectrometer.

3. Results

3.1. Cloning, expression and purification of recombinant hLf

A human mammary gland cDNA library was screened as previously described [12], using a 25-base oligonucleotide complementary to the 5' coding sequence of the hLf cDNA as a probe. The cDNA of a positive clone was sequenced and found to consist of the coding sequence of hLf cDNA (from nucleotide 287 to the 3' poly-A tail [12]). As detailed in section 2, after cloning the full-length 2.3 kb cDNA into pNUT, the resulting pNUT-hLf plasmid was used together with pcDNA1-neo to transfect BHK cells. The 300 μM MTX-resistant cells clones were induced with zinc and the amount of lactoferrin in the culture media ranged approximately from 5 to 15 mg. Purification of hLf by cation-exchange chromatography led to the

obtention of more than 7 mg protein/liter of culture medium. Recombinant hLf was visualized as a single protein band of 80 kDa by SDS-PAGE (data not shown).

3.2. Carbohydrate composition

The carbohydrate moiety representing 6.0% of the glycoprotein, consisted of 3.3% neutral sugars, 1.9% hexosamines and 0.8% sialic acids. These values were similar to those of milk hLf [4]. The sugars were identified as galactose, fucose, mannose, glucosamine and neuraminic acid by GLC of their trimethylsilyl derivatives. The molar ratios of these monosaccharides were similar to those estimated in the oligosaccharides released after hydrazinolysis (Table 1). Compared to milk hLf, carbohydrate compositions of recombinant hLf and of the oligosaccharides were characterized by a lower content of fucose and neuraminic acid, suggesting both incomplete fucosylation and sialylation of the glycans.

3.3. Determination of glycan primary structure

The oligosaccharides from recombinant lactoferrin were released by hydrazinolysis and submitted to 400-MHz $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. The procedure used allowed the release of the oligosaccharides from a small amount of lactoferrin (2 mg) with a good yield (75%). From the $^1\text{H-NMR}$ spectrum data (Table 2), the N-acetylglucosaminic type of the purified oligosaccharides can be asserted. The anomeric proton of the GlcNAc-1 ($\delta \text{H-1}\alpha = 5.181$) proved the completeness of the hydrazinolysis reaction [22]. The presence of the Man-4 and Man-4' anomeric protons ($\delta = 5.116$ and $\delta = 4.920$, respectively) and also the H-2 of the three mannose residues ($\delta \text{H-2 Man-3} = 4.250$, $\delta \text{H-2 Man-4} = 4.192$, $\delta \text{H-2 Man-4}' = 4.110$) are in favour of a biantennary structure with two fully α -2,3-sialylated branches (approximately 80% of total glycans, calculated on the basis of NMR peak integration and carbohydrate composition) and partially α -2,3-sialylated branches (20% of total glycans) [21]. Asialo Gal-6 and Gal-6' H-1 are observed at $\delta = 4.465$ and $\delta = 4.470$ ppm, respectively. The α -2,3-linkage of NeuAc is clearly verified by the chemical shift observed for the NeuAc H-3ax and H-3eq atom resonances [21] (Table 2). The spectrum also evidences the presence of α -1,6 Fuc linked to GlcNAc-1, but only for about 70% of the total glycan chains [21], in accordance with the carbohydrate composition. The identified oligosaccharides have the structures indicated in Fig. 1.

4. Discussion

Previous reports dealt with the obtention of functional recombinant hLf and of its N-terminal half in BHK cells with the

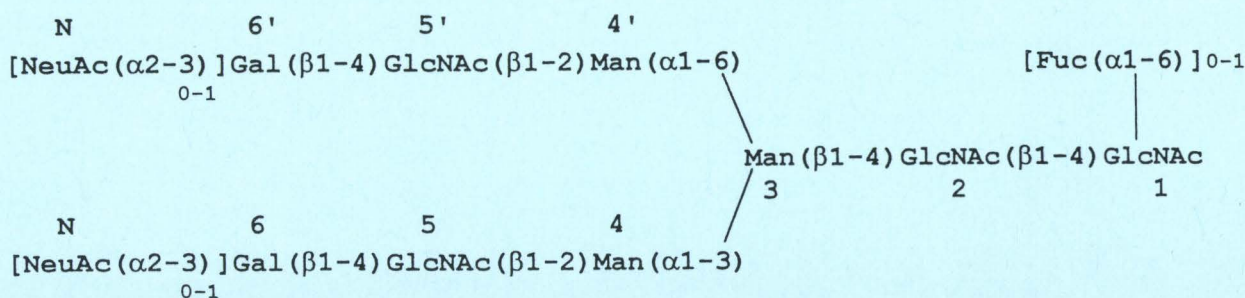


Fig. 1. Primary structures of the oligosaccharides isolated from recombinant hLf in BHK cells.

Table 1
Molar carbohydrate compositions of recombinant hLf compared to milk hLf and of the oligosaccharides released by hydrazinolysis

	Fuc	Gal	Man ^a	GlcNAc	NeuAc
Milk hLf	1.3	2.1	3.0	4.0	1.8
Recombinant hLf	0.8	1.9	3.0	3.6	1.6
Released oligo-saccharides	0.7	2.0	3.0	3.5	1.6

^a Molar ratios were calculated on the basis of three Man residues.

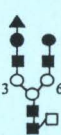


expression vector pNUT [10,11]. In the present study, we have cloned a full-length cDNA of human lactoferrin and expressed it in BHK cells with a protein yield in the culture medium of 5-15 mg/l, similar to that previously reported [10]. On the basis of a molecular weight of 82,400 Da for hLf [23] and of the percentage carbohydrate composition of the recombinant protein (6.0%), we can assume that the recombinant hLf possesses two glycans of about 2,400 daltons, as do milk and leucocyte hLfs [4,5]. By ¹H-NMR spectroscopy, the two glycans of recombinant hLf have been identified as biantennary structures of the sialylated *N*-acetylglucosaminic type with one or two α -2,3-linked NeuAc residues and the partial presence of an α -1,6 fucose residue linked to GlcNAc-1.

It is thus worthy of note that, despite of fucosylation and sialylation features which are specific to the cell line used [24], the glycosylation of recombinant hLf in BHK cells occurs at

the same degree of complexity as that of naturally-occurring hLfs [4,5]. A number of other glycoproteins, including serum transferrin [15,25], have been successfully produced at a high-expression level in BHK cells. The glycosylation of some recombinant proteins expressed in BHK cells, for instance human erythropoietin (EPO) [26], has been extensively studied. Human recombinant EPO contains a very complex mixture of tetra-, tri- and biantennary glycans of the *N*-acetylglucosaminic type, sometimes with *N*-acetylglucosamine repeats [26]. Interestingly, sugar chains of recombinant EPO were found to be very similar to those of human urinary EPO, except for the sialyl linkage [27]. In the particular case of recombinant human serum transferrin produced in BHK cells, electrospray mass analysis of the recombinant protein suggested the existence of a complex pattern of bi- and triantennary glycans [15]. Such a microheterogeneity was also evidenced for native human serum transferrin [28,29]. These observations indicate that, whether glycosylation of a recombinant protein depends on the host cell type, the culture environment and the method of cell culture [30], it also depends to some degree on the structure of the protein moiety.

Differences between the glycans of recombinant hLf and those of hLf from milk or from leucocytes concern the nature of the linkage between NeuAc and Gal (α -2,3 for the recombinant protein, instead of α -2,6 for the native lactoferrins), as well as the fucosylation patterns. These differences are relevant to the fact that BHK cells naturally lack the capability of α -2,6 sialylation and α -1,3 fucosylation of Gal β -1,4 GlcNAc-R motifs on *N*-glycans [24].

Table 2
¹H chemical shifts of structural reporter groups of constituent monosaccharides for oligosaccharides from recombinant hLf

Reporter group	Residue	Chemical shifts		
				
H-1	GlcNAc-1 α	5.181	5.181	5.181
	Fuc(1-6) α,β	4.89	4.89	4.89
	GlcNAc-2	-	-	-
	Man-3	-	-	-
	Man-4	5.116	5.116	5.116
	Man-4'	4.920	4.920	4.920
	GlcNAc-5	4.58	-	4.58
	GlcNAc-5'	-	4.58	4.58
	Gal-6	4.53	4.465	4.53
	Gal-6'	4.470	4.53	4.53
H-2	Man-3	4.250	4.250	4.250
	Man-4	4.192	4.192	4.192
	Man-4'	4.11	4.11	4.11
H-3	Gal-6,6'	-	-	4.11-4.12
H-3ax	NeuAc	1.801	1.801	1.801
H-3eq	NeuAc	2.758	2.758	2.758
H-6	Fuc(1-6) α	1.210	1.210	1.210
	β	1.22	1.22	1.22
NAc	GlcNAc-1	2.04	2.04	2.04
	GlcNAc-2	2.094	2.094	2.094
	GlcNAc-5	-	2.048	2.048
	GlcNAc-5'	-	2.044	2.044
	NeuAc	2.030	2.030	2.030

Compounds are represented by schematic structures according to [21]. ■, GlcNAc; ○, Man; ●, Gal; ▲, NeuAc; □, Fuc. Chemical shifts (δ) are given relative to sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-sulphonate but were actually measured by reference to internal acetone in D₂O: $\delta = 2.225$ ppm with an accuracy of more or less than 0.002 ppm.

It is now well admitted that glycans have effects on protein solubility and stability, immunogenicity, pharmacokinetics and biological activities [30]. In the case of lactoferrin, *in vitro* experiments, however, have failed to demonstrate the role of glycans in iron binding and release [31]. Nevertheless, the glycan moiety was shown to stabilize the iron-binding site of the 30 kDa N-tryptic fragment and the N-terminal domain II of milk hLf [32]. Concerning human serum transferrin, a study reported that the non-glycosylated protein bound to HeLa S3 cells with the same avidity and to the same extent as the glycosylated protein [15]. For many glycoproteins, full glycosylation equates with full biological activity [30], but there are several instances where the glycosylation status has no major impact on the biological efficacy of a protein *in vitro*. For example, although desialylated human EPO shows a thousand-fold reduction in specific activity *in vivo* compared to its native form, there is little effect *in vitro*. [33]. Since no drastic change in the number of sialic acid residues and in the global volume of the carbohydrate chains at the surface of the protein occurred, it is likely that the overall physicochemical properties of recombinant hLf are not altered compared to native hLfs. However, possible alterations of the *in vivo* biological activity, the clearance and distribution of recombinant hLf in the organism may be induced by the α -2,3 linkage of NeuAc and the lack of α -1,3 Fuc. It can be thus postulated that the masking ability and antigenicity of α -2,3 NeuAc is different from α -2,6 NeuAc and can affect the immunogenicity of the protein. Moreover, recognition systems such as the selectin ELAM-1 expressed on the vascular endothelium are able to trap α -2,3 NeuAc-containing glycoproteins [34]. Finally, the recognition of the α -1,3 Fuc residue present on milk hLf glycans by a specific lectinic receptor on rat hepatic cells has been reported [7,8]. The lack of α -1,3 fucosylation and the partial lack of α -1,6 Fuc in recombinant hLf may also influence the clearance and the distribution of the recombinant protein in the organism.

From this study, we can conclude that under our cell culture conditions, the glycosylation of recombinant hLf is close to that of homologous milk and leucocyte hLfs. Recombinant hLf glycans, however, possess specific features which have to be taken into account for the interpretation of *in vitro* and *in vivo* biological experiments.

Acknowledgements: This work was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité mixte de Recherche No. 111, Relations Structure-Fonction des Constituants Membranaires, Dir.: Prof. A. Verbert), by the Université des Sciences et Technologies de Lille, by the Ministère de l'Éducation Nationale and by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Contract No. 930507). We are indebted to Dr. R. Palmiter for providing us the expression vector pNUT and Dr. L. Montagné for providing us BHK cells and to Dr. G. Strecker for the interpretation of NMR results. We thank Pr. J. Montreuil, Drs. A. Pierce, R. Pierce and J. Mazurier for helpful advice.

References

- [1] Montreuil, J., Tonnelat, J. and Mullet, S. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 45, 413-421.
- [2] Masson, P.L., Heremans, J.F. and Schonke, F. (1969) *J. Exp. Med.* 130, 643-658.
- [3] Moguilevsky, N., Retegui, L.A. and Masson, P.L. (1985) *Biochem. J.* 229, 353-359.
- [4] Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dorland, L., van Halbeek, H. and Vliegthart, J.F.G. (1982) *Eur. J. Biochem.* 121, 413-419.
- [5] Derisbourg, P., Wieruszkeski, J.M., Montreuil, J. and Spik, G. (1990) *Biochem. J.* 269, 821-825.
- [6] Davidson, L.A. and Lönnerdal, B. (1988) *Am. J. Physiol.* 254, G580-G585.
- [7] Prieels, J.P., Pizzo, S.V., Glasgow, L.R., Paulson, J.C. and Hill, R.L. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2215-2219.
- [8] Pizzo, S.V., Lehrman, M.A., Imber, M.J. and Guthrow, C.E. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 704-708.
- [9] Goavec, M., Mazurier, J., Montreuil, J. and Spik, G. (1985) *C.R. Acad. Sci. Paris* 16, 689-694.
- [10] Stowell, K.M., Rado, T.A., Funk, W.D. and Tweedie, J.W. (1991) *Biochem. J.* 276, 349-355.
- [11] Day, C.L., Stowell, K.M., Baker, E.N. and Tweedie, J.W. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 13857-13862.
- [12] Rey, M.W., Woloshuk, S.L., deBoer, H.A. and Pieper, F.R. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18, 5288.
- [13] Palmiter, R.D., Behringer, R.R., Quaipe, C.J., Maxwell, F., Maxwell, I.H. and Brinster, R.L. (1987) *Cell* 50, 435-443.
- [14] Graham, F.L. and van der Eb, A.J. (1973) *Virology* 52, 456-460.
- [15] Mason, A.B., Miller, M.K., Funk, W.D., Banfield, D.K., Savage, K.J., Oliver, R.W.A., Green, B.N., MacGillivray, R.T.A. and Woodworth, R.C. (1993) *Biochemistry* 32, 5472-5479.
- [16] Mikogami, T., Heyman, M., Spik, G. and Desjeux, J.F. (1994) *Am. J. Physiol.* 267, G308-G315.
- [17] Parekh, R.B., Warren, C.E., Merry, A. and Bruce, J. (1990) *Glycoconjugate J.* 7, 382-383.
- [18] Patel, T., Bruce, J., Merry, A., Bigge, C., Wormald, M., Jacques, A. and Parekh, R.B. (1993) *Biochemistry* 32, 679-693.
- [19] Zanetta, J.P., Breckenridge, S.C. and Vincendon, G. (1972) *J. Chromatogr.* 69, 291-304.
- [20] Kamerling, J.P., Gerwig, G.J., Vliegthart, J.F.G. and Clamp, J.R. (1975) *Biochem. J.* 15, 491-495.
- [21] Vliegthart, J.F.G., Dorland, L. and van Halbeek, H. (1983) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 41, 309-374.
- [22] van Halbeek, H. (1993) in: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 17 (Jones, C., Mulloy, B. and Thomas, A.H. Eds.) pp. 115-148, Humana Press Inc., Totowa, USA.
- [23] Metz-Boutigue, M.H., Jollès, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J. and Jollès, P. (1984) *Eur. J. Biochem.* 145, 659-676.
- [24] Conrath, H.S., Hofer, B. and Hauser, H. (1990) *TIGG* 2, 168-181.
- [25] Funk, W.D., MacGillivray, R.T.A., Mason, A.B., Brown, S.A. and Woodworth, R.C. (1990) *Biochemistry* 29, 1654-1660.
- [26] Nimtz, M., Martin, W., Wray, V., Klöppel, K.D., Augustin, J. and Conrath, H.S. (1993) *Eur. J. Biochem.* 213, 39-56.
- [27] Takeuchi, M., Takasaki, S., Miyazaki, H., Kato, T., Hoshi, S., Kochibe, N. and Kobata, A. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 3657-3663.
- [28] Spik, G., Bayard, B., Fournet, B., Strecker, G., Bouquelet, S. and Montreuil, J. (1975) *FEBS Lett.* 50, 296-299.
- [29] Spik, G., Debruyne, V., Montreuil, J., van Halbeek, H. and Vliegthart, J.F.G. (1985) *FEBS Lett.* 183, 65-69.
- [30] Jenkins, N. and Curling, E.M.A. (1994) *Enz. Microb. Technol.* 16, 354-364.
- [31] Anderson, B.F., Baker, H.M., Norris, G.E., Rumball, S.V. and Baker, E.N. (1990) *Nature* 344, 784-787.
- [32] Legrand, D., Mazurier, J., Colavizza, D., Montreuil, J. and Spik, G. (1990) *Biochem. J.* 266, 575-581.
- [33] Yamaguchi, K., Akai, K., Kawanishi, G., Ueda, M., Masuda, S. and Sasaki, R. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 20434-20439.
- [34] Lowe, J.B., Stoolman, L.M., Nair, L.M., Larsen, R.D., Berhend, T.L. and Marks, R.M. (1990) *Cell* 63, 475-484.

2 ~ Résultats et conclusions

a- Résultats

Une première analyse de la composition en monosaccharides par la technique de méthanolyse a mis en évidence que la fraction glycanique représentait 6,0% de la masse de glycoprotéine et qu'elle était constituée de 3,3% d'oses neutres, de 1,9% d'hexosamines et de 0,8% d'acide sialique. Ce résultat est similaire à celui obtenu après la libération des glycannes par hydrazinolyse (Tableau I). Les monosaccharides ont été identifiés à du galactose, fucose, mannose, glucose, glucosamine, et acide neuraminique. La composition en monosaccharides de la rhLf se distingue de celle de la hLf du lait de Femme par un taux de fucose et d'acide sialique plus faible, ce qui suggère une fucosylation et une sialylation incomplète des glycannes.

Les oligosaccharides de la rhLf ont été isolés après hydrazinolyse et soumis à une étude par spectroscopie du proton $^1\text{H-RMN}$ à 400MHz. Cette technique a permis de mettre en évidence une structure de type N-acétyllactosaminique biantenné (Fig. 7).

b- Conclusion

Nous avons utilisé le système d'expression permanente de la lactoferrine par les cellules BHK qui nous a permis d'obtenir de la hLf en quantité suffisante pour des études structurales et, en particulier, pour une analyse détaillée de sa structure glycanique. Ainsi, sur la base de la masse moléculaire de la rhLf et de son taux de glycannes, nous avons pu conclure que la rhLf exprimée par les cellules BHK-21 est constituée, tout comme la hLf du lait de Femme (Spik *et al.*, 1984), de deux chaînes glycaniques de 2400 Da environ. Par RMN, les deux glycannes ont été identifiés comme étant de type N-acétyllactosaminique biantenné avec 1 ou 2 acides sialiques liés en α -2,3. De plus, on note la présence éventuelle d'un résidu de fucose lié en α -1,6 de la GlcNAc-1. Ainsi, en dépit d'une sialylation et d'une fucosylation spécifiques de la cellule, la glycosylation de la rhLf exprimée dans la lignée BHK-

Tableau I : Etude comparée de la composition molaire en monosaccharides de la hLf du lait de Femme et de la rhLf des cellules BHK avant et après hydrazinolyse

Constituants	Fuc	Gal	Man	GlcNAc	NeuAc
rhLf	0,8	1,9	3,0	3,6	1,6
Oligosaccharides issus de l'hydrazinolyse de la rhLf	0,7	2,0	3,0	3,5	1,6
hLf du lait	1,3	2,1	3,0	4,0	1,8

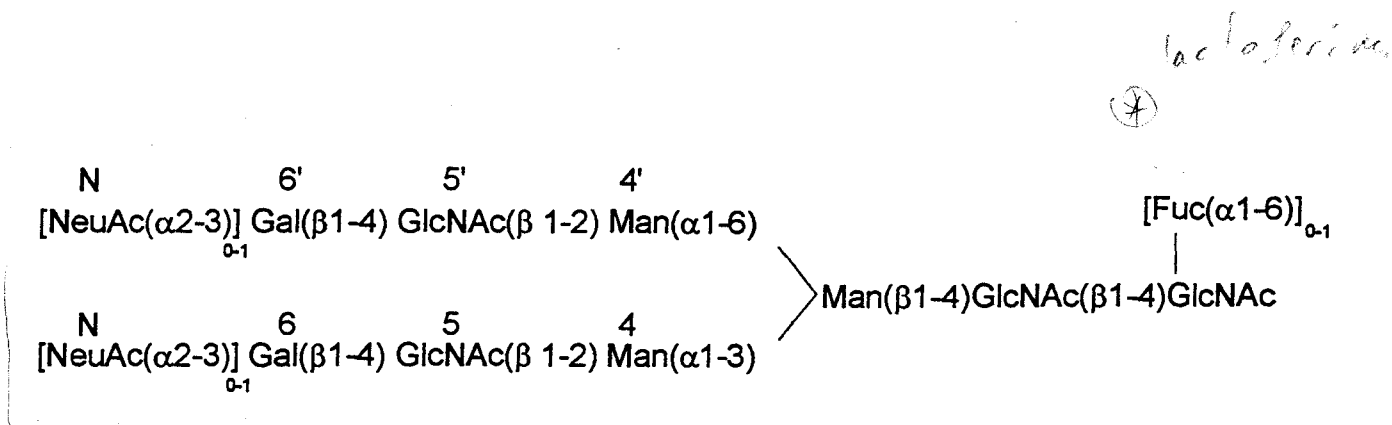


Fig.7 : Structure primaire des oligosaccharides isolés de la lactoferrine exprimée dans les cellules BHK

21 est réalisée avec la même complexité que dans la glycoprotéine humaine, bien que le troisième glycanne n'ait pas été identifié (Van Berkel *et al.*, 1995).

Ce système d'expression en cellules de mammifère a été exploité avec succès pour l'expression d'une lactoferrine mutée. Néanmoins, cette technique s'est avérée très lourde, longue à mettre en oeuvre et donc coûteuse. En effet, la nécessité d'une sélection clonale mettant en jeu une amplification des copies plasmidiques requiert plusieurs mois. C'est ainsi que nous nous sommes tournés vers le système d'expression baculovirus/cellules d'insectes.

Expression de la lactoferrine humaine par le système baculovirus/cellules d'insectes

I. Introduction

De nombreux travaux ont décrit récemment l'expression de protéines hétérologues par le système baculovirus/cellules d'insectes qui permet d'obtenir la plupart des modifications post-traductionnelles des eucaryotes avec un taux élevé de production. Ainsi, les protéines exprimées sont généralement correctement conformées, glycosylées et gardent les activités biologiques des protéines naturelles (voir revue générale de Devauchelle et Cérutti, 1993).

D'un point de vue pratique, l'expression d'une protéine par ce système nécessite la construction d'un plasmide chargé de l'ADNc exogène, nommé vecteur de transfert. Après cotransfection des cellules par ce vecteur et par un ADN de baculovirus, il peut y avoir recombinaison menant à un virus recombinant qui permet la synthèse de la protéine exogène sous contrôle d'un promoteur viral. Les premières techniques demandaient du temps et du savoir-faire pour sélectionner un virus recombinant noyé dans mille fois plus de virus sauvage. Ces dernières années, un ADN viral linéarisé a été commercialisé et a permis un gain de temps considérable puisque seuls les virus recombinants peuvent se répliquer. Avec un criblage ainsi facilité, le système baculovirus/cellule d'insecte est actuellement utilisé dans de nombreux laboratoires.

Nous avons choisi ce système d'expression pour produire les lactoferrines mutées. Dans un premier temps, une lactoferrine native a été produite afin de vérifier que ses propriétés ne sont pas modifiées et que ce type d'expression peut être appliqué aux protéines modifiées génétiquement.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication:

Salmon, V., Legrand, D., Georges, B., Slomianny, M.C., Coddeville, B., and Spik, G. (1997) Expression and characterization of human lactoferrin produced in the Baculovirus expression system. Protein Express. Purif. 9, 203-210

Characterization of Human Lactoferrin Produced in the Baculovirus Expression System

Valérie Salmon,* Dominique Legrand,* Bertrand Georges,† Marie-Christine Slomianny,* Bernadette Coddeville,* and Geneviève Spik*,¹

*Laboratoire de Chimie Biologique et Unité Mixte de Recherche du Centre National de la Recherche Scientifique n°. 111, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France; and †Laboratoire d'Immunologie Cellulaire, Unité de Recherche Associée du Centre National de la Recherche Scientifique n°. 1854, Institut Pasteur, 59019 Lille, France

Received August 12, 1996, and in revised form October 10, 1996

Lactoferrin, an iron-binding 80-kDa glycoprotein, is a major component of human milk whose structure is now well defined. The binding site of lactoferrin to the membrane receptor of lymphocyte has been located in the region 4-52, but the amino acids directly involved in the interaction have not been identified yet. To gain further insights into the structure-function relationships of the lactoferrin binding site, we first expressed the cDNA encoding human lactoferrin in the lepidoptera *Spodoptera frugiperda* cells (Sf9) using a recombinant baculovirus. The selected transformant secreted an N-glycosylated protein of 78 kDa which was immunoprecipitated by specific anti-lactoferrin antibodies. To confirm the structure and the function of the recombinant lactoferrin, the protein was purified by ion-exchange chromatography and its physical, biochemical, and biological properties were compared with those of the native protein. In particular, the N-terminal amino acid sequence and the iron-binding stability as a function of pH, of both proteins, were identical. The main difference concerns the glycosylation which leads to glycans of lower molecular masses as detected by the electrophoretic mobility of lactoferrin after N-glycosidase F treatment and matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry. Despite the different glycosylation features, the recombinant lactoferrin retained the binding property to the Jurkat human lymphoblastic T-cell line of the native lactoferrin. On the basis of these analyses, production of protein mutants generated by site-directed mutagenesis is now in process. © 1997 Academic Press

Human lactoferrin (hLf), also called lactotransferrin (1), is a member of the transferrin family composed of 80-kDa iron-binding monomeric glycoproteins. hLf, first discovered in milk (1), has since been detected in other external fluids (2) and in the secondary granules of neutrophils (3). Major progress has been made in the determination of glycans (4), polypeptide and nucleotide sequences (5-7), and three-dimensional structure and understanding of iron capture (8). Like all transferrins, hLf demonstrates a striking twofold internal amino acid sequence homology with about 40% identity between the N- and C-terminal halves (5), which leads to a bilobal structure. Each lobe contains one N-glycosylation site and is able to bind tightly but reversibly to one ferric ion. Many biological functions of hLf are undoubtedly related to its ability to sequester and solubilize iron and to bind to target cells through specific receptors (for reviews, see 9,10). The functions proposed for hLf include protection against microbial infections (11), regulation of myelopoiesis (12,13), modulation of inflammatory responses (14), promotion of cell growth (15,16), immunostimulatory activity (17,18), and inhibition of platelet aggregation (19). Lactoferrin-specific receptors were identified on several target cells such as enterocytes (20,21), hepatocytes (22,23), lymphocytes (16), epithelial mammary cell lines (24), and platelets (19). Preliminary studies have pointed out the importance of residues 4-52 of hLf in the interactions with the lymphocyte receptor (25). We intend now to define the nature of the amino acid residues involved in lactoferrin-receptor interactions by site-directed mutagenesis. The first attempts to produce native and mutated lactoferrins used a mammalian expression system in BHK cells (26,27), which yielded milligrams of biologically active proteins but was not suitable for a fast expression of the mutated proteins. Much atten-

¹ To whom correspondence should be addressed. Fax: 33 03 20 43 65 55.

tion has recently been paid to the easy-to-handle baculovirus expression system as it can achieve high productivity and most of the posttranslational modifications of heterologous proteins (28). As a result, the expressed proteins were usually correctly folded and glycosylated and they retained their biological activities (29,30). To advance investigations into structure-function relationships, this study describes expression, purification, structural analysis, and biological properties of recombinant hLf (rhLf) produced in baculovirus-infected insect cells.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Restriction endonucleases and oligonucleotides were obtained from Eurogentec (Seraing, Belgium). T4 ligase and calf alkaline phosphatase (CIP) were from Stratagene (La Jolla, CA) and PCR products from Promega (Charbonnières, France). The sequenase DNA sequencing kit was obtained from United States Biochemical Corp. (Cleveland, OH). The Baculogold kit containing linearized AcNPV DNA and agarose were purchased from PharMingen (San Diego, CA). Plasmid pVL1392 and cell line *Spodoptera frugiperda* (Sf9) were kindly provided by Dr. C. Auriault (Institut Pasteur, Lille, France). Fetal calf serum, gentamycin, Sf900II, and Grace's insect cell media were from Gibco BRL (Cergy-Pontoise, France). RPMI 1640 medium was purchased from Gentech (Les Ulis, France). Polyacrylamide gels were purchased from Bioprobe (Montreuil, France). Molecular weight size markers, protein A-Sepharose, SP Sepharose Fast Flow, and prepacked Sephadex G25 PD10 columns were from Pharmacia Biotech (St. Quentin-Yvelines, France). *N*-Glycosidase F was obtained from BioLabs (Hitchin, England) and Centriprep-30 ultrafiltration units from Amicon (Epernon, France). Iodo-beads for protein labeling were from Pierce (Rockford, IL). Carrier-free Na^{125}I was from ICN Pharmaceuticals. Human serum transferrin was from Sigma (St. Louis, MO). All chemicals used were of the highest grade.

Construction of Transfer Vector

A human mammary gland cDNA library was screened and hLf cDNA constructed in λ gt11 vector was cloned into the *Eco*RI site of pBluescript SK as previously described (26) to resultant pBS-hLf. A silent mutation was targeted by PCR against the *Eco*RI site at position 2163 using a 3' oligonucleotide allowing a *Bsu*36 I restriction site: 5'-TTTTACTTCCTGAGGAGTTCACAGG-3'. The 5' oligonucleotide was designed to be exactly the sequence of the hLf cDNA between position 2035 and 2064: 5'-ATGACAACACTGAGTGTC-IGGCCAGACTCC-3'. After PCR amplification, a frag-

ment of 150 pb was obtained, hydrolyzed by *Bsu*36 I and *Nde*I, and subcloned into pBS-hLf previously digested with both these enzymes at unique sites. The sequence of the construct was established by the dideoxynucleotide chain-termination method (31). The *Eco*RI fragment containing the full-length 2.3-kb hLf cDNA was ligated to pVL1392 which had previously been digested with *Eco*RI and dephosphorylated with CIP to yield the pVL1392-hLf construct.

Production of Recombinant Baculovirus

Both pVL1392-hLf and linearized AcNPV viral DNA were cotransfected using a conventional calcium phosphate technique according to the instructions given by the manufacturer. Briefly, 2×10^6 Sf9 cells laid onto a 60-mm tissue culture plate were cotransfected with both 3 μg of pVL1392-hLf and 1 μg of linear AcNPV. Five days after transfection, supernatant was harvested by a 15-min centrifugation at 5000 rpm at 4°C and several recombinant virus plaques were amplified and selected using a specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (32). To check the size and the immunogenic specificity of the recombinant protein, an immunoprecipitation technique described hereafter was used. A supernatant of wild-type AcNPV-infected Sf9 cells was included as a control. Finally, selected recombinant virus was purified by two rounds of plating. Recombinant viral stock was amplified and used to infect Sf9 cells for large-scale production.

Insect Cell Culture and Production of rhLf

Stock cultures of insect *S. frugiperda* Sf9 cells were grown at 27°C as monolayers in Grace's insect media supplemented with 10% fetal bovine serum containing 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycin. Confluent monolayers were subcultured by removing cells from flasks by gentle pipetting and dilution (1:4) in complete media.

Under production conditions, Sf9 cells were cultivated in 225 cm^2 flasks (about 20×10^6 cells per flask) using Sf900II insect medium supplemented with 5% fetal calf serum. Then, confluent monolayers cells were infected with recombinant baculovirus AcNPV at a multiplicity of infection of 10. Finally, 15 h later, the viral infection medium was discarded and replaced by a serum-free Sf900II medium. The culture medium was collected 4 days postinfection for further purification.

Purification of Recombinant Protein

rhLf was purified from the cell culture medium by ion-exchange chromatography on a SP Sepharose Fast Flow column equilibrated with 0.2 M sodium acetate. rhLf was eluted with a linear salt gradient from 0 to 1 M NaCl in 0.2 M sodium acetate. The presence of rhLf in eluted fractions was assessed by ELISA as described

below. Positive fractions were concentrated on Centriprep-30 ultrafiltration units, dialyzed against PBS, and stored at -20°C . The purity of rhLf was checked on 7.5% SDS-PAGE (33).

Analytical Methods

ELISA. ELISA was performed according to (32). Briefly, 100 μl of rabbit polyclonal antibodies specific to hLf (3.6 mg/ml) produced in our laboratory was coated overnight at 4°C on a plastic microtiter plate. Tween 20 (2%) in PBS was used to saturate the remaining well surface for 30 min at room temperature. Then, microplates were incubated for 2 h in PBS at 37°C , first with anti-hLf mouse monoclonal antibodies and then with peroxidase-labeled goat anti-mouse antibodies. Staining was initiated by adding orthophenyldiamine dichloride in 0.1 M acetate/citrate buffer, pH 5, and optical density was measured at 490 nm.

Immunoprecipitation. Five milligrams of rabbit polyclonal anti-hLf antibodies was incubated for 1 h at room temperature with 6 mg of protein A-Sepharose. Beads were recovered by centrifugation, washed three times with 1 ml PBS, incubated with infected medium (10 ml) for 2 h at room temperature, and washed again three times with PBS. Protein complexes were dissociated in Laemmli buffer (33), separated on 7.5% SDS-PAGE, and stained with Coomassie blue.

Spectral properties analysis. Ultraviolet and visible absorptions of proteins [1 mg/ml in 0.025 M Tris/HCl (pH 7.5)/0.2 M NaCl/0.01 M NaHCO_3] were measured from 260 to 700 nm on a Varian Cary Model 219 recording spectrophotometer.

MALDI/TOF mass spectrometry analysis. The experiments were carried out on a Vision 2000 MALDI mass spectrometer (Finnigan MAT, Bremen, Germany), a reflexion time-of-flight (TOF) instrument equipped with a nitrogen laser at 337 nm and operated with positive or negative detection with 6 kV acceleration potential. A solution (3 μl) containing 100 pmol of hLf was added to 17 μl of matrix solution consisting of 10 mg/ml of 2,5-dihydroxybenzoic acid in acetonitrile/water (30/70). One microliter of this mixture was applied to the target simultaneously with an internal mass calibrant (rabbit phosphorylase b, Sigma; MW 97,218.5 in sinapinic acid).

Amino acid sequence analysis. Ten micrograms of purified protein was subjected to amino acid sequence analysis by the Edman degradation procedure using an Applied BioSystem 477 protein sequencer.

pH Stability Experiments

Iron-saturated hLf was prepared as described in (34) prior to iron release experiments. Solutions of iron-saturated rhLf and milk hLf (3 mg/ml) were dialyzed for

24 h at room temperature against the following buffers containing 0.2 M NaCl/0.05 M Tris/HCl (pH 8–7); 0.05 M Mes (pH 6.5–6); 0.05 M sodium acetate (pH 5.5–3); 0.05 M glycine/HCl (pH 3–2). The iron content of lactoferrins at different pH values was evaluated by monitoring the protein solutions at 280 and 465 nm.

Deglycosylation of rhLf and Carbohydrate Analysis

N-Glycosidase F treatment of purified rhLf was performed under conditions recommended by the manufacturer: 5 μg of purified rhLf was boiled in 40 μl of a denaturing buffer (0.5% SDS, 1% β -mercaptoethanol, 25 mM Tris/HCl, pH 7.8) for 10 min and incubated overnight at 37°C with 5 μl of reaction buffer (0.5 M sodium citrate, pH 7.5), 5 μl of 10% NP-40, and 3 μl of *N*-glycosidase F (1000 U/ μl). Analysis of the protein solution was then performed on 7.5% SDS-PAGE.

Monosaccharide analysis of the glycoprotein was carried out using gas-liquid chromatography on a capillary CPSIL 5CB column and a Girdel 300 gas-liquid chromatograph. The flow rate of the carrier gas (helium) was 10 ml/min and the pressure 0.05 MPa. The temperature was programmed from 120 to 240°C at $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$. The trimethylsilylated *O*-methyl glycosides were prepared by methanolysis (35), *N*-acetylation, and trimethylsilylation (36).

Cell Binding Experiments

The Jurkat human lymphoblastic T-cell line was routinely cultured in RPMI 1640 medium, pH 7.4, containing 25 mM Hepes, 2 mM L-glutamine, and gentamicin (5 mg/ml) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37°C . Cells were kept in the logarithmic growth phase and diluted to a cell density of $4 \times 10^5/\text{ml}$ before the experiments. ^{125}I labeling of proteins (100 μg) was carried out with 0.2 mCi of ^{125}I , using Iodo-beads for 10 min at 4°C according to the manufacturer's instructions. The free iodine was removed by gel filtration through a Sephadex G-25 PD 10 column equilibrated in PBS, pH 7.3.

Equilibrium binding experiments were performed in a serum-free RPMI 1640 medium containing 0.4% (w/v) human serum transferrin to prevent nonspecific binding of hLf to the cells or the plastic. Aliquots (100 μl) containing 5×10^5 cells were distributed into 1.5-ml polypropylene centrifuge tubes with ^{125}I -labeled hLf concentrations ranging from 0 to 100 nM. Nonspecific binding was evaluated in the presence of a 100-fold molar excess of unlabeled hLf. Incubation of cells with proteins was performed at 4°C for 1 h in the presence of 0.01% (w/v) sodium azide. Cells were then washed three times with 1 ml RPMI and the final pellets were resuspended in 0.5 ml PBS for radioactivity counting

on a Compugamma LKB-Wallac (Turku, Finland) γ -radiation counter.

RESULTS

Expression and Purification of Wild-Type hLf cDNA in Baculovirus-Infected Sf9 Cells

Linearized baculovirus and pVL1392-hLf were allowed to transform Sf9 cells and virus-containing medium of the transformed Sf9 cells was collected and analyzed by ELISA for the presence of rhLf. A rhLf-expressing clone was selected by plaque-assay technique and immunoprecipitation of the culture medium. The immunoprecipitated material was analyzed on SDS-PAGE which revealed the presence of a 78-kDa protein band (not shown). The hLf-positive clone was amplified to 5×10^7 pfu/ml medium and the high-titer working stock was then used for the preparative expression of rhLf in Sf9 cells. Optimal yield of rhLf was reached when monolayers of confluent cells were infected with the stock of recombinant virus at a multiplicity of infection of 10. Medium was changed 15 h later and replaced by a serum-free medium to facilitate the purification step. Four days postinfection, the medium was collected, clarified by centrifugation, and purified.

Purification of rhLf was performed by ion-exchange chromatography on an SP Sepharose Fast Flow column and elution with a linear salt gradient. Two protein fractions were detected at 280 nm and analyzed by ELISA and SDS-PAGE. The first one eluted with 0.2 M NaCl contained uncharacterized proteins (not shown). The second protein fraction eluted with 0.8 M NaCl contained the rhLf which was visualized as a single 78-kDa Coomassie blue-stained band. This molecular mass was about 2–3 kDa lower than that for milk hLf (Fig. 1). The electrophoretic mobility of the rhLf was slightly faster than that for the milk hLf (80 kDa). Using this single-step chromatography, approximately 10 to 15 mg of purified rhLf was reproducibly obtained from each liter of pooled culture supernatant.

N-Terminal Amino Acid Sequence and Mass Spectrometry Analysis

rhLf was sequenced from N-terminus through 12 residues using the automated Edman degradation procedure. The sequence $^1\text{GRRRRSVQWCAV}^{12}$ was identical to that reported for the mature hLf isolated from milk (5). This result indicates that the preprotein was correctly processed during synthesis and secretion from Sf9 cells.

Based on the difference between the molecular mass of rhLf obtained by mass spectrometry ($78,820 \pm 10$ Da) and the calculated molecular mass of the polypeptide chain (76,319 Da), the molecular mass which was

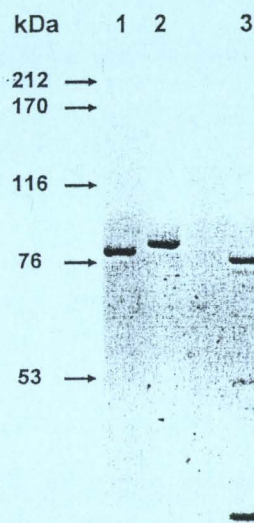


FIG. 1. SDS-PAGE analysis of rhLf after ion-exchange chromatography on SP Sepharose Fast Flow column and *N*-glycosidase F treatment. Lane 1, purified rhLf; lane 2, milk hLf; lane 3, rhLf treated with *N*-glycosidase F. The positions of protein standards are shown on the left.

supposed to correspond to glycans was evaluated at about 2500 Da.

Glycosylation Analysis

hLf isolated from milk contains two *N*-acetylglucosaminic-type glycans attached through *N*-glycosidic linkages (4). To determine the extent of glycosylation and the nature of the glycan protein linkage in rhLf, the molecule was treated with *N*-glycosidase F and resolved by SDS-PAGE. The *N*-glycosidase F treatment of rhLf induced a 2- to 3-kDa molecular mass decrease. This value is very close to that calculated from mass spectrometry experiments. Monosaccharide analysis showed that the carbohydrate content of rhLf represented 2.1% of the molecule (instead of 5% in milk hLf). These results taken as a whole suggested that the slightly increased electrophoretic mobility of rhLf compared to milk protein is related to the carbohydrate moiety. Finally, discrepancies between the carbohydrate compositions of rhLf and milk hLf were detected. In fact, the 2.1% glycan fraction was found to consist of 1.45% neutral sugars and 0.65% hexosamines and the monosaccharides were identified as fucose, galactose, mannose, and *N*-acetylglucosamine by GLC of their trimethylsilyl derivatives in the ratio 0.7:0.5:3.0:1.5, respectively. Compared to the native lactoferrin monosaccharide ratio (Table 1), rhLf contains a lower amount of fucose and galactose and does not contain *N*-acetylneuraminic acid residues. These results are in agreement with previous reports on other glycoproteins produced in insect cells (37). Based on

TABLE 1

Molar Carbohydrate Compositions of Recombinant Human Lactoferrin and Lactoferrin Isolated from Human Milk

	Fuc	Gal	Man	GlcNAc	NeuAc
rhLf	0.7	0.5	3.0	1.5	0
Milk hLf	1.3	2.1	3.0	4.0	1.8

Note. Molar ratios were calculated on the basis of three Man residues.

the glycan mass determined from mass spectrometry analysis and monosaccharide compositions, the presence of two truncated *N*-glycans can be assigned to the rhLf.

Visible and uv Spectroscopy

The absorption spectra of rhLf (Fig. 2) were virtually identical to those of milk hLf (not shown). In fact, both profiles exhibited a maximum absorption in the uv at 280 nm and in the visible range at 465 nm. The purified rhLf A_{280}/A_{465} ratio of 28 indicated a full iron saturation of the molecule. This feature was already reported for recombinant hLf produced in the BHK expression system (38).

Iron-Binding Properties

The iron-binding stability of rhLf toward pH was analyzed and compared to that of milk hLf (Fig. 3). The results demonstrated that in the buffer system used,

iron release was similar for both proteins. This release began around pH 4 and was complete around pH 2. Moreover, iron binding was reversible since iron-desaturated rhLf was resaturated by raising the pH to 7 with 0.05 M Tris/HCl (data not shown).

Cell Binding Assays

Binding of ^{125}I -labeled rhLf and milk hLf to the Jurkat T-lymphoblastic cell line was analyzed according to Scatchard's method (39). As shown in Fig. 4, very similar binding curves were obtained for both rhLf and hLf. In the range of the labeled protein concentrations used, only one class of binding sites for rhLf and hLf was detected at the surface of Jurkat cells with dissociation constants of 81.6 ± 9 and 64.4 ± 11 nM and a number of binding sites per cell of $125,000 \pm 12,000$ and $107,000 \pm 14,000$, respectively.

DISCUSSION

To undertake structural and functional studies of hLf, recombinant proteins have already been expressed in mammalian BHK cells (26,38) in *Aspergillus* (40,41) and in yeast (42). The BHK expression system has recently been used in our laboratory to produce native and mutated rhLfs (26). Binding and competitive experiments were performed with the rhLfs to define the amino acid sequence involved in the high-affinity binding to *Escherichia coli* lipopolysaccharides (27). Analysis of rhLf glycans demonstrated that, despite the fucosylation and sialylation features which were specific to

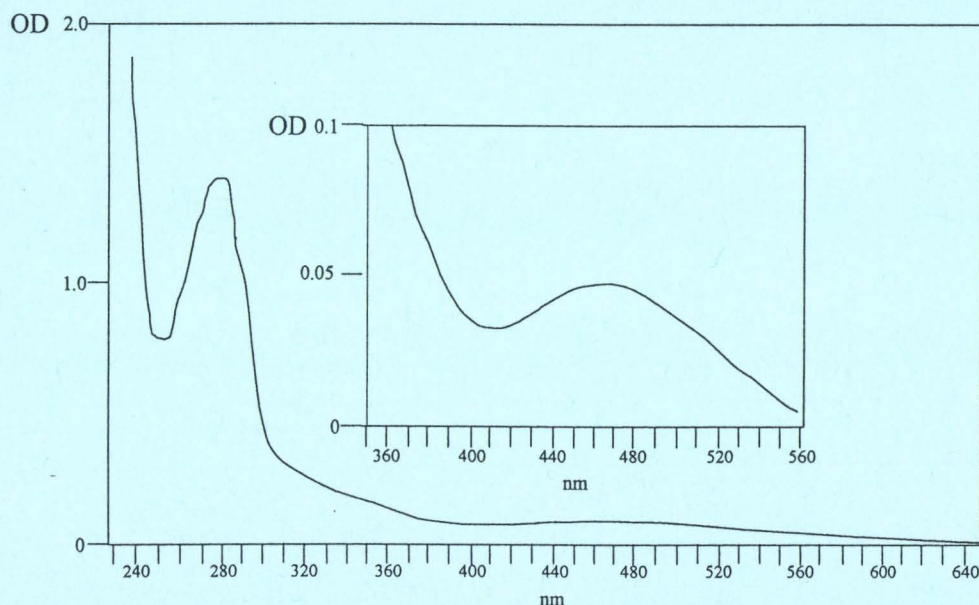


FIG. 2. Ultraviolet-visible absorption spectrum from 260 to 700 nm of rhLf. The inset shows the maximum absorption in the visible range at 465 nm.

the cell line used, glycosylation of hLf in BHK cells occurs at the same degree of complexity as in native hLf (26). Nevertheless, the BHK system is time consuming, requires clonal selection and sophisticated culture conditions, and thus is not suitable for fast and easy production of mutated proteins. Other expression systems, such as yeasts and bacteria, are usually employed. Nonetheless, yeasts do not allow correct processing of recombinant proteins, essentially in regard to the glycan moiety of molecules. Although bacterial expression systems have been widely used for low-molecular-mass recombinant proteins, they are not always successful: the proper disulfides are not formed in *E. coli* and the protein is often present in inclusion bodies. Moreover, glycosylation does not occur in prokaryotic cells (for review, see 43).

We have described here the production of rhLf in insect cells infected by a recombinant baculovirus. A high expression level of functional hLf in Sf9 cells (10 to 15 mg/liter of culture medium) is reported. Owing to its natural signal peptide, rhLf is secreted into the culture medium and our attempt to purify the protein from the culture supernatant using conventional ion-exchange chromatography was successful. Biochemical and physicochemical properties of rhLf were determined and compared to those of milk hLf. The visible absorption spectrum of rhLf was identical to that of milk protein and indicated a full iron saturation. Similar iron-binding stabilities toward pH were observed for both proteins, demonstrating that rhLf is able to adapt the appropriate tertiary structure for proper iron-binding and release. The N-terminal sequence of rhLf was similar to that of the native hLf, indicating identical posttranscriptional processing of the signal sequence. Estimation of the molecular mass of rhLf was achieved by SDS-PAGE and MALDI/TOF mass

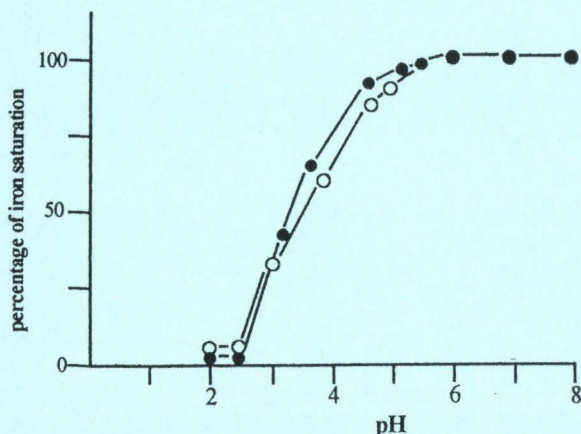


FIG. 3. pH-dependent release of iron from (●) rhLf and (○) milk hLf. The absorbances at 465 nm of the solutions of iron-saturated rhLf and milk hLf were measured after dialysis against the buffers described under Materials and Methods.

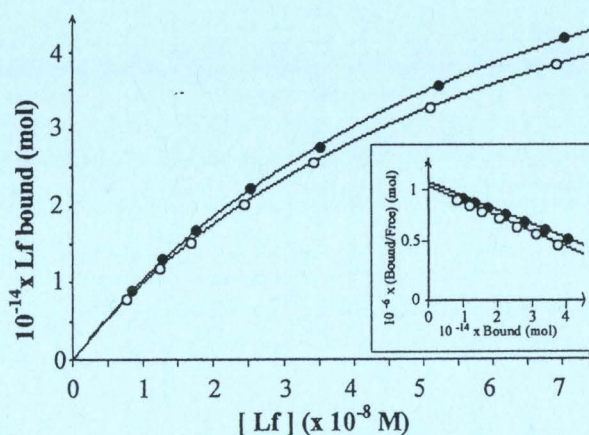


FIG. 4. Specific binding of iron-saturated ¹²⁵I-labeled (●) rhLf and (○) milk hLf to Jurkat lymphoblastic cells. The nonspecific binding measured in the presence of a 100-fold molar excess of unlabeled hLf was typically around 25% of the total binding and was subtracted from the total binding. Values are means of two separate experiments done in duplicate.

spectrometry analysis which evidenced a 2- to 3-kDa difference with the natural hLf molecular mass. Several lines of evidence indicate that this difference is related to the nature of the rhLf glycans. In fact, glycoproteins expressed in insect cells often have incomplete glycan structures compared to those expressed in mammalian cells (37). In the case of rhLf, the carbohydrate content was found to be about twice as less lower than in the native one. Until recently, it was believed that glycans synthesized by insect cells belonged only to the oligomannosidic type. In the present paper, the occurrence of fucose and galactose residues suggests the presence of glycans of the *N*-acetylglucosamine type as well. Further studies are underway to elucidate the complete structure of these glycans. Despite the modified carbohydrate composition of rhLf, our experiments show that these variations do not modify the binding parameters of rhLf to the T-cells. This result is in agreement with those previously obtained concerning the nonparticipation of human lactoferrin glycans in the interaction with the mouse intestinal brush border binding sites (44).

In conclusion, the baculovirus expression system allowed a high-level expression of biologically active hLf. In the field of further studies on lactoferrin-receptor interactions, such an easy to handle expression system may provide an efficient tool to produce mutated lactoferrins.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Université des Sciences et Technologies de Lille I, the Centre National de la Recherche Scientifique (U.M.R. du CNRS n°. 111, Director: Prof. A. Verbert), and the Ministère de l'Éducation Nationale. We are very grateful to Dr. C. Auri-

ault for welcoming V. Salmon into his laboratory. We thank Prof. A. Tartar and H. Drobecq for the determination of the N-terminal sequence, Y. Leroy for the mass spectrometry analysis, and M. Benaïssa for skillful technical assistance.

REFERENCES

- Montreuil, J., Tonnelat, J., and Mullet, S. (1960) Préparation et propriétés de la lactosidérophiline (lactotransferrine) du lait de Femme. *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 413–421.
- Masson, P. L., Heremans, J. F., and Dive, C. (1966) An iron-binding protein common to many external secretions. *Clin. Chim. Acta* **14**, 735–739.
- Masson, P. L., Heremans, J. F., and Schonke, E. (1969) Lactoferrin, an iron binding protein in neutrophilic leukocytes. *J. Exp. Med.* **130**, 643–657.
- Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquet, S., Montreuil, J., Dorland, L., van Halbeek, H., and Vliegthart, J. F. G. (1982) Primary structure of the glycans from human lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* **121**, 413–419.
- Metz-Boutigue, M. H., Jollès, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J., and Jollès, P. (1984) Human lactotransferrin: Amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur. J. Biochem.* **145**, 659–676.
- Rey, M. W., Woloshuk, S. L., deBoer, H. A., and Pieper, F. R. (1990) Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin. *Nucleic Acids Res.* **18**, 5288.
- Powell, M. J., and Ogden, J. E. (1990) Nucleotide sequence of human lactoferrin cDNA. *Nucleic Acids Res.* **18**, 4013.
- Haridas, M., Anderson, B. F., and Baker, E. N. (1995) Structure of human diferric lactoferrin refined at 2.2 resolution. *Acta Crystallogr.* **51**, 629–646.
- Sanchez, L., Calvo, M., and Brock, J. H. (1992) Biological role of lactoferrin. *Arch. Dis. Child.* **67**, 657–661.
- Montreuil, J., Spik, G., and Mazurier, J. (1997) Transferrin superfamily. An outstanding model for studying biochemical evolution, in "Glycoproteins" (Montreuil, J., Schachter, H., and Vliegthart, J. F. G., Eds.), Elsevier, Amsterdam, in press.
- Spik, G., Chéron, A., Montreuil, J., and Dolby, J. (1978) Bacteriostasis of a milk-sensitive strain of *Escherichia coli* by immunoglobulins and iron-binding proteins in association. *Immunology* **35**, 663–671.
- Broxmeyer, H. E., Smithyman, A., Eger, R. R., Meyers, P. A., and de Sousa, M. (1978) Identification of lactoferrin as the granulocyte-derived inhibitor of colony stimulating activity (CSA)-production. *J. Exp. Med.* **148**, 1052–1067.
- Zucali, J. R., Broxmeyer, H. E., Levy, D., and Morse, C. (1989) Lactoferrin decreases monocyte-induced fibroblast production of myeloid colony-stimulating activity by suppressing monocyte release of interleukin-1. *Blood* **74**, 1531–1536.
- Duncan, R. H., and McArthur, W. P. (1981) Lactoferrin-mediated modulation of mononuclear cell activities. *Cell Immunol.* **63**, 308–320.
- Hashizume, S., Kuroda, K., and Murakami, H. (1983) Identification of lactoferrin as an essential growth factor for human lymphocytic cell lines in serum-free medium. *Biochim. Biophys. Acta* **763**, 377–382.
- Mazurier, J., Legrand, D., Hu, W. L., Montreuil, J., and Spik, G. (1989) Expression of human lactotransferrin receptors in phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes. Isolation of the receptors by anti-ligand affinity chromatography. *Eur. J. Biochem.* **179**, 481–487.
- Zimecki, M., Mazurier, J., Machnicki, M., Wiczorek, Z., Montreuil, J., and Spik, G. (1991) Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4⁺CD8⁻ murine thymocytes. *Immunol. Lett.* **30**, 119–124.
- Zimecki, M., Mazurier, J., Spik, G., and Kapp, J. A. (1995) Human lactoferrin induces phenotypic and functional changes in murine splenic B cells. *Immunology* **86**, 122–127.
- Leveugle, B., Mazurier, J., Legrand, D., Mazurier, C., Montreuil, J., and Spik, G. (1993) Lactotransferrin binding to its platelet receptor inhibits platelet aggregation. *Eur. J. Biochem.* **213**, 1205–1211.
- Cox, T. M., Mazurier, J., Spik, G., Montreuil, J., and Peters, T. J. (1979) Iron-binding proteins and influx of iron across the duodenal brush border. Evidence for specific lactotransferrin receptors in the human intestine. *Biochim. Biophys. Acta* **588**, 120–128.
- Mikogami, T., Marianne, T., and Spik, G. (1995) Effect of intracellular iron depletion by picolinic acid on expression of the lactoferrin receptor in the human colon carcinoma cell subclone HT29-18-C-1. *Biochem. J.* **308**, 391–397.
- McAbee, D. D., Nowatzke, W., Oehler, C., Sitaram, M., Sbaschnig, E., Opferman, J. T., Carr, J., and Esbensen, K. (1993) Endocytosis and degradation of bovine apo- and holo-lactoferrin by isolated rat hepatocytes are mediated by calcium-dependent recycling binding sites. *Biochemistry* **32**, 13749–13760.
- Ziere, G. J., Kruij, J. K., Bijsterbosch, M. K., and van Berkel, T. J. C. (1993) Removal of 14 N-terminal amino acids of lactoferrin enhances its affinity for parenchymal liver cells and potentiates the inhibition of β -very low density lipoprotein binding. *J. Biol. Chem.* **268**, 27069–27075.
- Rochard, E., Legrand, D., Lecocq, M., Hamelin, R., Crépin, M., Montreuil, J., and Spik, G. (1992) Characterization of lactotransferrin receptor in epithelial cell lines from non-malignant human breast, benign mastopathies and breast carcinomas. *Anticancer Res.* **12**, 2047–2052.
- Legrand, D., Mazurier, J., Ellass, A., Rochard, E., Vergoten, G., Maes, P., Montreuil, J., and Spik, G. (1992) Molecular interactions between human lactotransferrin and the phytohemagglutinin-activated human lymphocyte lactotransferrin receptor lie in two loop-containing regions of the N-terminal domain-I of human lactotransferrin. *Biochemistry* **31**, 9243–9251.
- Legrand, D., Salmon, V., Coddeville, B., Benaïssa, M., Plancke, Y., and Spik, G. (1995) Structural determination of two N-linked glycans isolated from recombinant human lactoferrin expressed in BHK cells. *FEBS Lett.* **365**, 57–60.
- Elass-Rochard, E., Roseanu, A., Legrand, D., Trif, M., Salmon, V., Motas, C., Montreuil, J., and Spik, G. (1995) Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: Involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to *Escherichia coli* 055B5 lipopolysaccharide. *Biochem. J.* **312**, 839–845.
- Luckow, V. A., and Summers, M. D. (1988) Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Biotechnology* **6**, 47–55.
- Gillepsie, L. S., Hilesland, K. K., and Kanuer, D. J. (1991) Expression of biologically active human antithrombin III by recombinant baculovirus in *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 3995–4001.
- Davis, T. R., Trotter, K. M., Grandos, R. R., and Wood, H. A. (1992) Baculovirus expression of alkaline phosphatase as a reporter gene for evaluation of production, glycosylation and secretion. *Biotechnology* **10**, 1148–1150.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463–5467.
- Mikogami, T., Heyman, M., Spik, G., and Desjeux, J. F. (1994) Apical to basolateral transcytosis of human lactoferrin in human

II. Résultats

A) Construction des plasmides.

Afin de faciliter les étapes ultérieures de sous clonage, il était intéressant de muter le site *EcoRI* situé 12 pb en amont du codon stop. Cette modification a été effectuée par PCR en utilisant un couple d'oligonucléotides qui permettaient, d'une part de supprimer le site *EcoRI* sans changement de la séquence en acides aminés et, d'autre part, une réinsertion facile du produit de PCR dans le reste de l'ADNc de la hLf par hydrolyse et ligature au niveau de sites uniques de restriction. L'oligonucléotide 5'TTTTACTTCCTGAGGAGTTCACAGG3' portait le site de restriction *Bsu36I* ainsi que la mutation silencieuse, et l'oligonucléotide 5'ATGACAACACTGAGTGTCTGGCCAGACTCC3' s'appariait en amont du site *NdeI* (séquence 2,035 à 2,064 selon la numérotation de Rey *et al.*). La PCR a permis l'amplification d'un fragment d'environ 150pb qui a été hydrolysé par *Bsu36I* et *NdeI* et sous cloné dans pBS-hLf préalablement hydrolysé par ces deux enzymes. La séquence d'insertion a été séquencée et le vecteur obtenu a été dénommé pBS-hLf2.

Le vecteur de transfert pour l'expression en système baculovirus/cellules d'insectes est le plasmide pVL1392, qui offre un site de polyclonage en aval du promoteur de la polyédrine. Ainsi, après recombinaison entre l'ADN viral et ce vecteur de transfert, la synthèse de la hLf est sous contrôle du promoteur de la polyédrine. L'ADNc de la hLf a été inséré dans pVL1392 après hydrolyse de pBS-hLf2 par *EcoRI*. Le fragment obtenu comprenant la séquence entière de l'ADNc de la hLf a été sous-cloné au site de polyclonage *EcoRI* de pVL1392 pour donner pVL1392-hLf. Le sens de l'insertion et la séquence des 500 premiers nucléotides ont été vérifiés une dernière fois avant la transfection.

B) Transfection, sélection d'un clone viral recombinant et expression de la hLf.

Les cellules d'insectes qui ont été utilisées sont des cellules de la lignée Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). Les cellules Sf9 (généreusement données par le Dr Auriault, Institut Pasteur de Lille, France) ont été cultivées en routine en milieu de Grace contenant 10% de sérum de veau foetal et 10 µg/ml de gentamycine. Les cultures à confluence ont été divisées au quart par simple agitation mécanique.

Le vecteur de transfert chargé pVL1392-hLf et un ADN viral linéarisé d'AcNPV (Pharming) ont été cotransfectés par la méthode au phosphate de calcium selon les recommandations du fournisseur. Cinq jours après la transfection, le surnageant fut collecté et centrifugé. Des clones de baculovirus recombinants ont été sélectionnés par la technique de "plaque-assay". Ces clones furent amplifiés et l'expression de hLf recombinante fut détectée par dosage ELISA (Fig. 8).

Un clone viral a été sélectionné, et la masse moléculaire de la rhLf exprimée par ce clone a été vérifiée par immunoprécipitation du milieu de culture. Après analyse en SDS-PAGE de l'immunoprécipité, une bande protéique de 78 kDa a été révélée par coloration au Bleu de Coomassie. Ce clone positif a alors été amplifié et stocké pour les étapes ultérieures de production.

En conditions de production à grande échelle, les cellules Sf9 issues de la culture stock ont été cultivées en milieu Sf900II en présence de 5% de sérum de veau foetal pour les cultures provenant des conditions décrites précédemment. Le taux de sérum est diminué progressivement jusqu'à 1%. Les cellules confluentes cultivées dans ces dernières conditions ont été infectées par le baculovirus sélectionné à une MOI (Multiplicity of Infection) de 10. Finalement, 15 h plus tard, le milieu de culture a été remplacé par du milieu Sf900II sans sérum de veau foetal afin de faciliter les étapes de purification. Le milieu de culture a été collecté 4 jours plus tard et stocké à -20°C avant la purification de la rhLf.

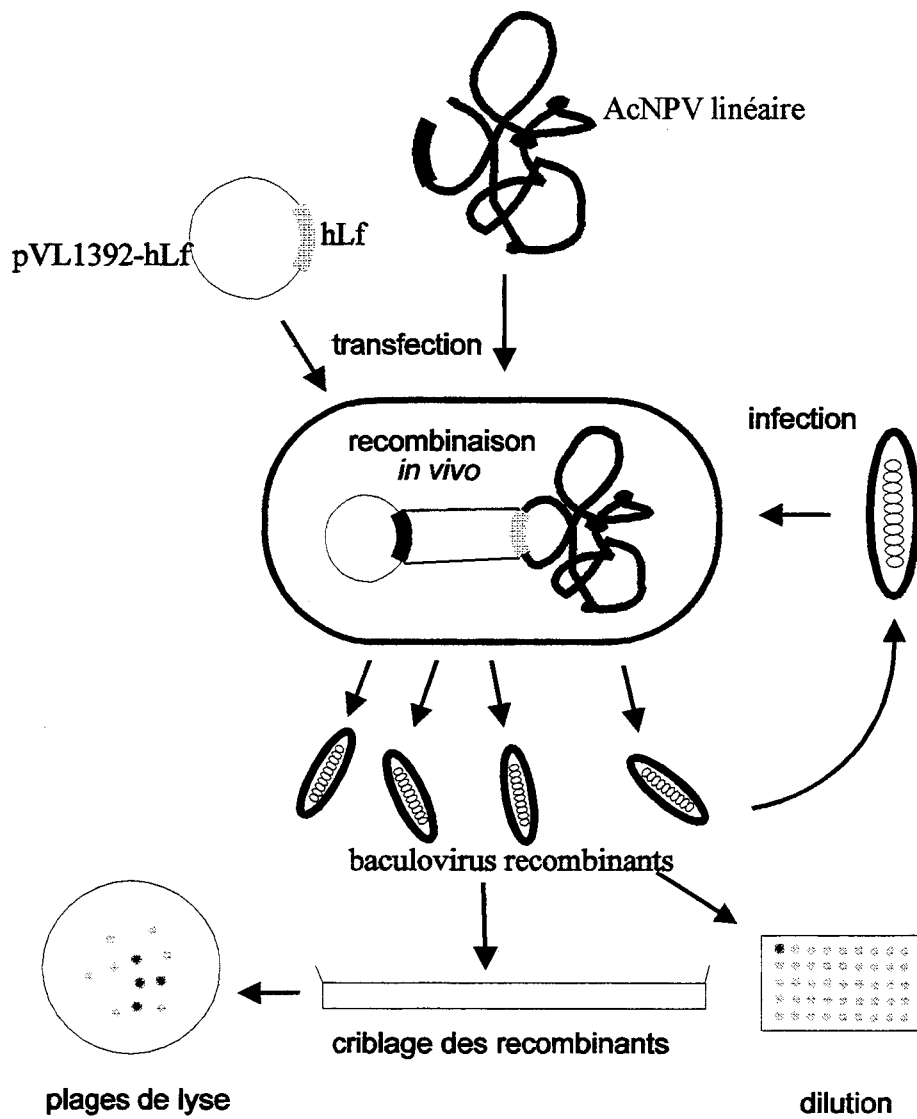


Fig. 8 : Expression de la lactoferrine humaine dans le système baculovirus/cellules d'insecte

C) Purification de la rhLf

La purification de la rhLf a été effectuée par chromatographie d'échange de cations sur colonne SP Sépharose. Après élution par un gradient en NaCl linéaire de 0 à 1 M, la fraction protéique éluée en NaCl 0,8 M contenait la rhLf qui a été visualisée par SDS-PAGE 7,5 % sous la forme d'une bande protéique unique de 78 kDa. Les paramètres d'élution de la protéine recombinante sont identiques à ceux de la lactoferrine du lait, ce qui suggère que la rhLf possède une charge identique à celle de la protéine native. La masse moléculaire visualisée par SDS-PAGE est environ 2 à 3 kDa plus faible que celle de la hLf isolée du lait qui est de 80 kDa (Fig. 9). La protéine purifiée a été concentrée, dialysée contre du PBS et stockée à -20°C. Par cette unique étape de chromatographie, nous avons pu obtenir de 10 à 15 mg de rhLf purifiée par litre de milieu de culture.

D) Analyse de la rhLf

Dans le but d'utiliser le système d'expression baculovirus/cellules d'insecte pour la production de protéines mutées, nous avons voulu vérifier que la protéine recombinante possédait les mêmes propriétés que la lactoferrine isolée du lait de Femme. Ainsi, nous avons comparé plusieurs paramètres biochimiques et biologiques des lactoferrines recombinante et native. Nous avons vérifié la séquence N-terminale de la rhLf et déterminé la masse moléculaire par spectrométrie de masse en mode MALDI/TOF, la capacité de fixation du fer en fonction du pH, le spectre d'absorbance, la composition en monosaccharide et la fixation aux cellules lymphoblastiques T Jurkat.

1 ~ Analyse de la séquence N-terminale

Les 12 premiers résidus de l'extrémité N-terminale de la rhLf furent séquencés selon le procédé de dégradation d'Edman. La séquence $^1\text{GRRRRSVQWCAV}^{12}$ s'est révélée identique à celle de la hLf mature isolée du

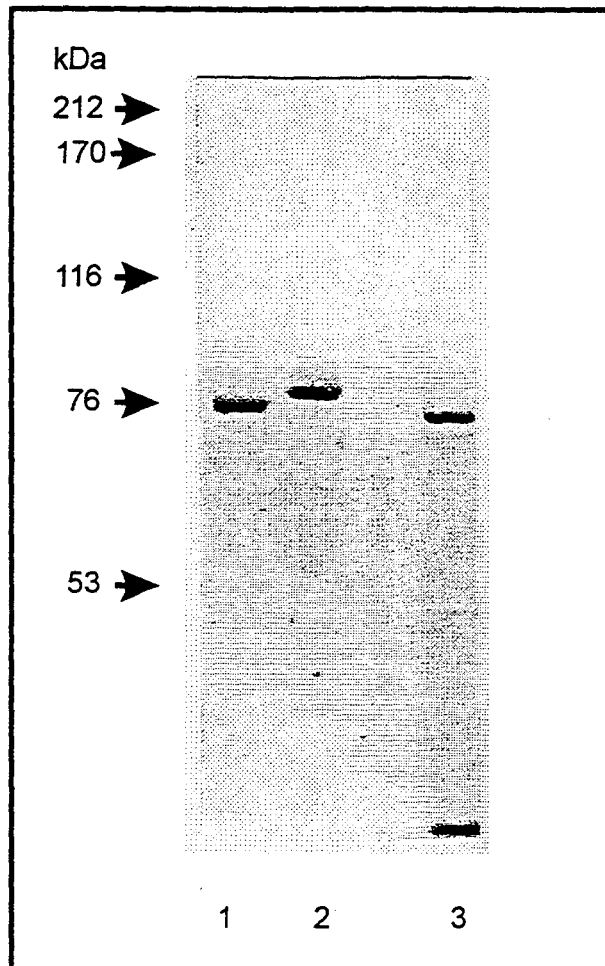


Fig. 9 : Analyse par SDS-PAGE de la rhLf des cellules Sf9 après purification et traitement par la N-Glycosidase F

1 : rhLf purifiée par chromatographie sur colonne SP-Sepharose

2 : hLf du lait

3 : rhLf après traitement par la N-Glycosidase F

lait. Ce résultat indique que la pré-protéine a été correctement maturée durant sa synthèse dans les cellules Sf9 et que le peptide signal a été correctement clivé au cours de la sécrétion de la protéine.

2 ~ Détermination de la masse moléculaire par spectrométrie de masse

La masse moléculaire précise de la rhLf a été déterminée par spectrométrie de masse en mode MALDI/TOF. Comparée à la masse moléculaire calculée de la chaîne polypeptidique (76319 Da), la masse totale mesurée de 78820 Da laisse supposer que la masse des glycanes est de 2500 Da (Fig. 10).

3 ~ Analyse de la fraction glycanique

La hLf isolée du lait contient deux glycanes de type N-acétyllactosaminique. Afin de déterminer la nature de la fraction glycanique de la rhLf, les glycanes ont été libérés par la N-glycosidase F et la rhLf déglycosylée a été analysée en SDS-PAGE. Ce traitement enzymatique a induit une diminution de 2 à 3 kDa de la masse moléculaire apparente. Cette valeur est très proche de celle calculée par spectrométrie de masse. L'analyse des monosaccharides a montré que la fraction glycanique de la rhLf représentait 2,1% de la molécule (au lieu de 5% dans la hLf du lait). L'ensemble de ces résultats suggère que la légère différence de mobilité électrophorétique entre les lactoferrines native et recombinante était due aux chaînes glycaniques. D'autre part, des différences dans la composition en monosaccharides entre la rhLf et la hLf du lait ont été mis en évidence. Ainsi, les 2,1% de la fraction glycanique de la rhLf sont constitués de 1,45% d'oses neutres et de 0,65% d'hexosamines. Les monosaccharides ont été identifiés au fucose, galactose, mannose et N-acétylglucosamine dont les rapports figurent dans le Tableau II. Comparativement aux rapports des monosaccharides de la hLf isolée du lait, la rhLf contient des taux de fucose et de galactose inférieurs et ne contient pas de résidus d'acides sialiques. Ces résultats sont en accord avec des données de la littérature obtenus sur d'autres glycoprotéines exprimées dans les cellules d'insectes

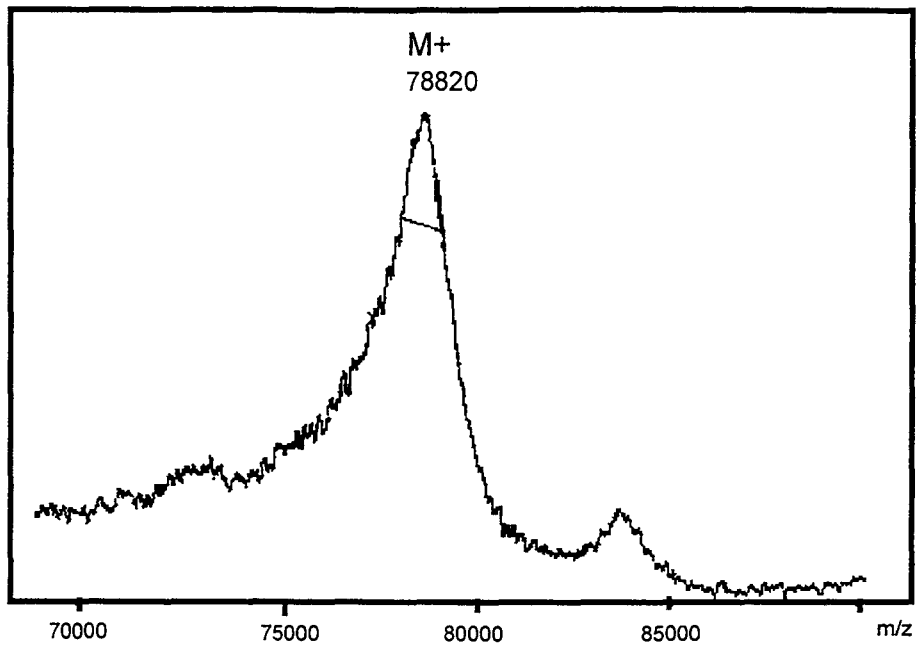


Fig. 10 : Spectre de masse en mode MALDI-TOF de la rhLf exprimée dans les cellules d'insecte Sf9

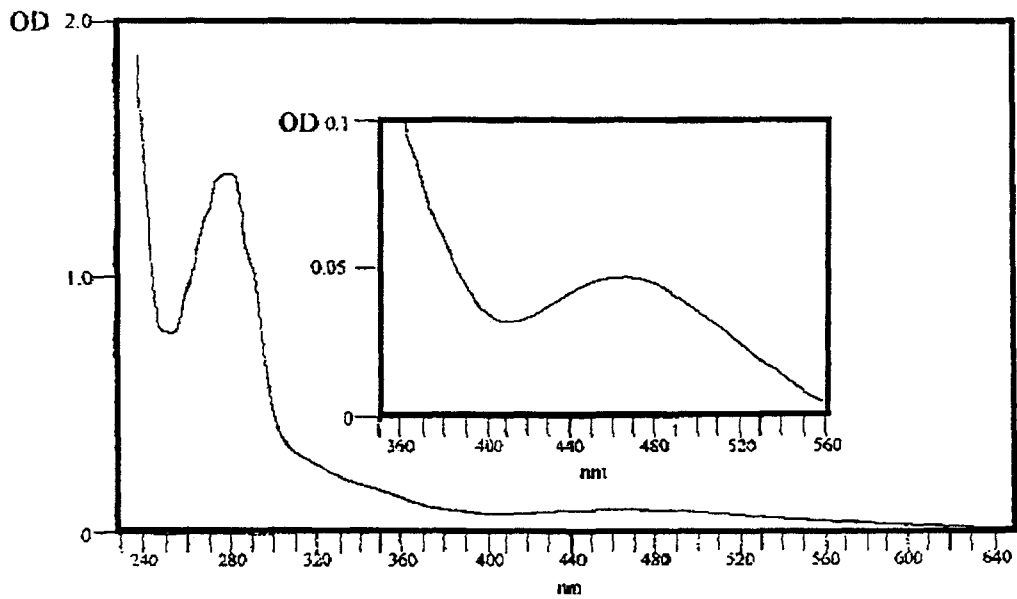


Fig. 11 : Spectre d'absorbance de 260 à 700 nm de la rhLf exprimée dans les cellules d'insecte Sf9

(Kuroda *et al.*, 1990). D'après nos résultats, nous pouvons conclure à l'existence de deux glycanes immatures dans la rhLf.

4 ~ Analyse spectroscopique en visible et en UV

Les spectres d'absorbance de la rhLf (Fig. 11) et de la lactoferrine du lait (non montré) sont tout à fait similaires. En fait, les deux spectres montrent un maximum d'absorbance dans l'UV à 280 nm et dans le visible à 465 nm. Le rapport A_{280}/A_{465} de 28 indique que la rhLf, comme la lactoferrine humaine témoin, est saturée en fer.

5 ~ Analyse de la fixation du fer en fonction du pH

La stabilité de la fixation du fer en fonction du pH a été analysée et comparée à celle de la hLf native (Fig. 12). Les résultats montrent que, dans les tampons employés, le relargage du fer s'opère de façon similaire pour les deux protéines. La libération du fer débute à environ pH 4 et il est total à pH 2. De plus, la fixation du fer est réversible ; ainsi, la rhLf saturée peut être resaturée en augmentant le pH à 7 par l'addition de tampon Tris HCl 0,05M.

6 ~ Fixation aux cellules lymphoblastiques T Jurkat

La fixation aux cellules Jurkat de la rhLf et de la hLf du lait marquées à ^{125}I a été étudiée par la méthode de Scatchard (Scatchard, 1949). Comme le montre la Fig. 13, les courbes de fixation obtenues sont très semblables pour les deux protéines. Dans la gamme de concentrations de lactoferrine utilisée, une seule classe de récepteurs a été détectée à la surface des cellules Jurkat pour la rhLf et la hLf du lait, avec un K_d de $81,6 \pm 9$ et $64,4 \pm 11$ nM et un nombre de sites de $125 \times 10^3 \pm 12 \times 10^3$ et $107 \times 10^3 \pm 14 \times 10^3$, respectivement.

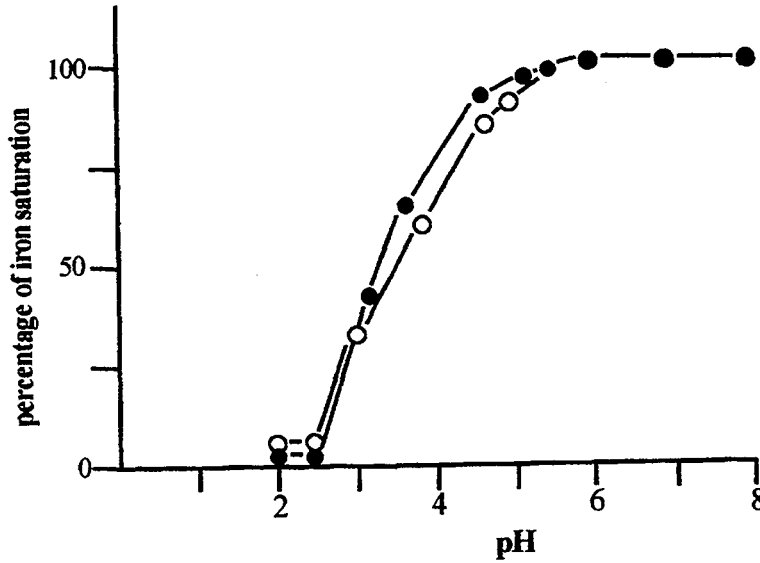


Fig.12 : Relargage du fer de la rhLf (●) et de la hLf du lait (○) en fonction du pH. Le pourcentage de saturation en fer est calculé sur la base du rapport des densités optiques à 280 et 465 nm

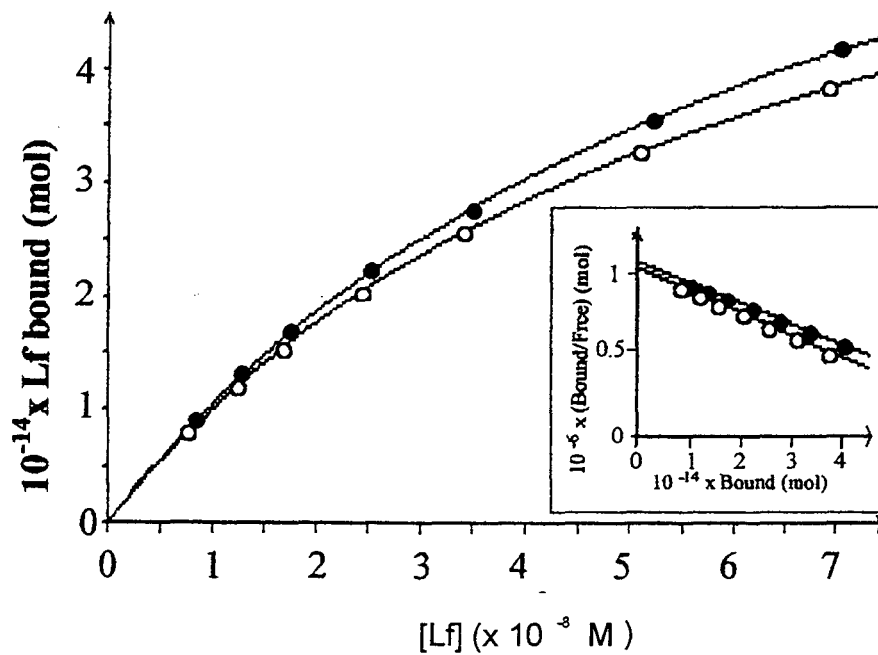


Fig.13 : Fixation spécifique de la rhLf (●) et de la hLf du lait (○) sur les cellules lymphoblastiques T Jurkat

III. Conclusion

Nous avons exprimé la rhLf dans des cellules d'insectes infectées par un baculovirus dans le but d'obtenir rapidement une protéine recombinante correctement conformée et qui soit facile à purifier.

Dans un premier temps, nous avons exprimé la rhLf non mutée qui devait servir de témoin à nos études ultérieures. Un taux d'expression élevé de protéine recombinante a été obtenu (de 10 à 15 mg/l) après purification en une seule étape. Grâce à son peptide signal naturel, la rhLf a été sécrétée dans le milieu de culture et nous avons pu la purifier selon les méthodes classiques de chromatographie d'échange de cations. Afin de vérifier si les propriétés de cette protéine correspondent à celle de la protéine isolée du lait, nous avons analysé plusieurs caractéristiques biochimiques de la rhLf et nous les avons comparées à celles de la protéine naturelle. Le spectre d'absorption s'est révélé identique à celui de la hLf du lait, ce qui démontre par ailleurs la saturation en fer de la protéine. D'autre part, la stabilité de fixation du fer de la rhLf et de la hLf en fonction du pH est comparable, ce qui suggère que la rhLf possède la structure tertiaire appropriée pour une fixation correcte du fer. Les séquences N-terminales des deux protéines sont également identiques, ce qui démontre un clivage correct du peptide signal de mammifère dans les cellules d'insecte. La masse moléculaire de la rhLf a pu être estimée par SDS-PAGE et déterminée avec précision par analyse en MALDI/TOF. Cette analyse a permis d'attribuer une masse de 2500 Da à la partie glycanique de la rhLf. En effet, les glycoprotéines d'insectes ont souvent des glycannes de structure incomplète et plus courte que les glycannes de glycoprotéines de mammifère (Lopez *et al*, 1997). Dans le cas de la rhLf, la fraction glycanique est deux fois moins importante dans la rhLf que dans la hLf isolée du lait et contient principalement des résidus de mannose, un peu de fucose et des traces de galactose. En dépit de cette différence au niveau de la glycosylation, les paramètres de fixation aux cellules lymphoblastiques Jurkat de la lactoferrine recombinante et de celle isolée du lait apparaissent identiques.

En conclusion, le système d'expression baculovirus/cellules d'insecte nous a permis d'obtenir de la rhLf biologiquement active. Ce système a, par la suite, été utilisé pour produire des protéines mutées dans le site d'interaction, protéines dont nous décrivons ultérieurement la production et les études de fixation sur les cellules Jurkat.

Expression de lactoferrine humaine dans du tabac transgénique

I. Introduction

Le système de plantes transgéniques a été développé pour sa potentialité à produire des protéines hétérologues complexes, biologiquement actives et à faible coût (Hiatt *et al.*, 1989 ; Sijmons *et al.*, 1990 ; Dieryck *et al.*, 1997). De plus, les risques de contamination par des agents exogènes est bien moindre chez les plantes que pour tout autre mode de production. Il était attrayant de tenter d'y exprimer la lactoferrine humaine pour diverses raisons. D'une part, les nombreux rôles biologiques de la lactoferrine laissent entrevoir de nombreuses applications nutritionnelles voire même thérapeutiques de la lactoferrine humaine recombinante obtenue à grande échelle. D'autre part, d'un point de vue fondamental, il était intéressant d'étudier la biosynthèse et l'adressage d'une glycoprotéine recombinante exprimée dans des plantes. En effet, à l'heure actuelle, peu de choses sont connues sur la reconnaissance des signaux d'adressage de cellules de mammifère dans les cellules végétales, ainsi que sur la glycosylation des protéines hétérologues. L'expression de la lactoferrine humaine dans le tabac est l'aboutissement d'une collaboration avec le laboratoire BIOCEM. Ainsi, nous avons réalisé les constructions moléculaires des vecteurs d'expression ainsi que la purification et l'analyse de la lactoferrine recombinante. Pour sa part, le laboratoire BIOCEM a réalisé les transformations du tabac ainsi que la culture des plantes transformées.

Nous avons choisi d'adresser la lactoferrine via le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi où se réalise la plupart des étapes de maturation post-traductionnelle comme la glycosylation et le repliement des chaînes peptidiques. Afin de potentialiser l'expression de lactoferrine recombinante, deux stratégies de constructions moléculaires ont été menées parallèlement. En utilisant le même vecteur d'expression, la séquence codant pour la lactoferrine humaine a été insérée, précédée, d'une part, de son propre peptide signal ou, d'autre part, d'un peptide de

sécrétion végétal. Ce dernier est le signal de sécrétion de la sporamine qui est une protéine de réserve de tubercules de patate douce. Grâce à ces peptides signaux et en l'absence d'autres signaux, la lactoferrine humaine recombinante devait être sécrétée dans le milieu extracellulaire appelé apoplasme, composé des parois pectocellulosiques, des espaces intercellulaires et de la sève.

Des constructions moléculaires ont permis l'intégration dans un vecteur binaire d'expression des séquences codant pour la lactoferrine humaine mature fusionnée soit à son peptide signal naturel, soit au peptide de sécrétion de la sporamine. Après transformation des plants de tabac par le biais d'*Agrobacterium tumefaciens* et sélection des transformants, la purification de la lactoferrine recombinante obtenue dans les deux types de transformants a été réalisée. Les propriétés physico-chimiques et biologiques de ces protéines recombinantes ont été comparées à celles de la lactoferrine isolée du lait humain. Les séquences N-terminales et le comportement électrophorétique des protéines recombinantes étant identiques, une seule de ces protéines, la rhLf obtenue par fusion au peptide signal végétal, a été purifiée à plus large échelle et soumise à des analyses complémentaires. Sa masse moléculaire précise a été déterminée par spectrométrie de masse en mode MALDI/TOF et la composition en glycannes a été analysée. Enfin, afin de vérifier l'activité biologique de la lactoferrine recombinante, nous avons étudié la fixation de la rhLf de tabac sur des cellules exprimant à leur surface le récepteur spécifique de la lactoferrine. Dans ce but, la lignée lymphoblastique Jurkat et la lignée entérocytaire HT-29-18C1 ont été utilisées comme modèle cellulaire.

Ces travaux ont fait l'objet d'une demande de dépôt de brevet national :

Lactoferrines recombinantes, leurs procédés de production par les plantes ainsi que leurs utilisations. N°dépôt : 05699, 02/05/1997.



II. Résultats

A) Construction des vecteurs binaires d'expression

1 ~ Construction du plasmide pBIOC21

Afin de s'assurer de la correcte maturation de la hLf dans les feuilles de tabac transgénique, l'ADNc de la hLf a été sous-cloné dans le plasmide pBIOC21 (An *et al.*, 1986) de deux façons différentes. D'une part, le vecteur binaire nommé pBIOC21-PSLf-Lf a été construit en insérant la séquence de la hLf précédée de son propre peptide signal (Fig. 14). D'autre part, le plasmide pBIOC-PSSp-Lf a été créé en fusionnant la séquence de sécrétion de la sporamine, une protéine végétale, à la séquence de l'ADNc de la hLf mature (Fig. 15). Pour ces deux vecteurs binaires d'expression, les inserts ont été placés sous le contrôle du promoteur constitutif double 35S (Pd35S) du CaMV (virus de la mosaïque du chou-fleur). Il correspond à une duplication des séquences activant la transcription, situées en amont de l'élément TATA du promoteur 35S naturel. De plus, nous avons utilisé l'ADNc de la hLf dont l'extrémité non codante en 3' a été délétée et remplacée par le terminateur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (T35S). Cette séquence terminatrice de transcription, le terminateur polyA 35S (T35S) correspond à la région 3' non codante de la séquence du virus à ADN bicaténaire circulaire de la mosaïque du chou-fleur produisant le transcrit 35S (Franck *et al.*, 1980).

Ces séquences sont incluses dans le vecteur binaire d'expression pBIOC21 (voir appendice technique). La transformation des plants de tabac a été réalisée par le biais d'*Agrobacterium tumefaciens*.

2 ~ Construction du plasmide pBIOC21-PsLf-Lf

L'ADNc entier de la hLf a été cloné dans le vecteur pBluescript, donnant ainsi naissance à pBS-hLf décrit précédemment.

Une modification en 3' de l'ADNc de la lactoferrine humaine a été opérée afin de pouvoir fusionner la séquence située en aval du codon stop avec le terminateur contenu dans pBIOC21. Par PCR, cette modification a permis de supprimer le site naturel de restriction *EcoRI* (GAATTC) en amont du codon stop et de recréer, 9 paires de bases en aval, un site *EcoRI* suivi d'un site *XbaI* (TCTAGA).

Cette PCR sur matrice pBS-hLf a été effectuée grâce au jeu d'oligonucléotide suivant :

- oligo 5' : 5' ATGACAACACTGAGTGTCTGGCC 3' (correspondant aux acides nucléiques 1991 à 2011, c'est-à-dire aux acides aminés 664 à 671 de la protéine immature);

- oligo3' : 5'CCGTCTAGAGAATTCGTTTTACTTCCTGAGGAGTTC AC 3' qui contient les sites de mutation (oligonucléotide chevauchant le codon stop, correspondant à l'acide aminé 711 de la hLf immature).

Le produit issu de cette PCR contient le site unique *NdeI* (acide aminé 678 de la pré-hLF) de l'ADNc de la lactoferrine. Ainsi, ce fragment a été hydrolysé par *XbaI* et *NdeI* et sous-cloné dans pBS-hLf délété de [*NdeI-XbaI*] ce qui a permis l'obtention du vecteur pBS-12. Le produit issu de la ligation a permis la transformation de bactéries DH5 α préalablement rendues compétentes par la technique au Rubidium décrite dans l'appendice technique.

Après analyse des clones de pBS-12, la séquence du fragment amplifié par PCR a été confirmée par séquençage (Sanger *et al.*, 1975) de ce vecteur.

pBS-12 a été ensuite hydrolysé par *EcoRI* et le fragment de 2160 paires de bases, délété de la région non codante en 3', a été sous-cloné dans le vecteur pBIOC-21 préalablement linéarisé en *EcoRI* et déphosphorylé.

Le vecteur pBIOC21-PSLf-Lf a été utilisé pour la transformation des feuilles de tabac (Fig. 14).

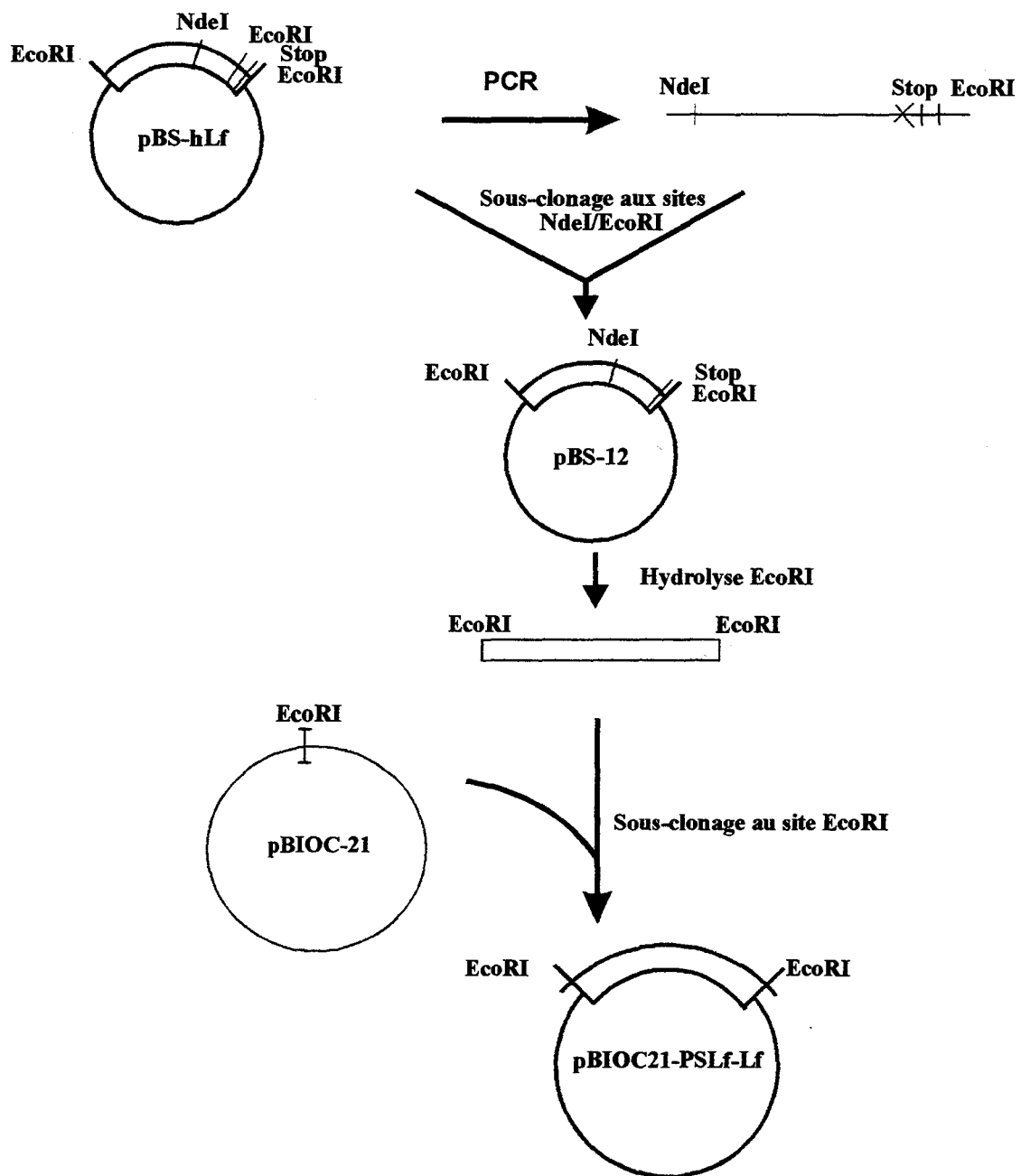


Fig.14 : Construction moléculaire de pBIOC21-PSLf-Lf

3 ~ Construction de pBIOC21-PSSp-Lf

Afin de pouvoir fusionner la séquence codant pour le peptide de sécrétion de la sporamine à la séquence de la hLf mature, un site *Sall* (GTCGAC) a été introduit par PCR en aval de *XhoI* (CTCGAG), au niveau du premier codon de la séquence de la hLf mature (Fig. 15).

Les oligonucléotides suivants ont été utilisés pour cette PCR sur matrice pBS-12 dont les conditions sont décrites ci-dessous.

- oligo 5' : 5' TAACTCGAGGCCGGGTCGACGGAGAAGGAGTGTT CAGTG 3' contenant *Sall* et *XhoI* (acides aminés 16 à 28 de la pré-hLf);
- oligo 3' : 5' ACCCGTCCAATTCAAGAATGGACGAAG 3' contenant *XcmI* (acide aminé 153 à 157 de la pré-hLf).

Le fragment issu de PCR a été hydrolysé par *XhoI* et *XcmI*. Après ligation dans pBS-12 délété du segment [*XhoI-XcmI*], nous avons obtenu pBS-13 dont la séquence du nouvel insert a été vérifiée.

Deuxièmement, afin de fusionner l'ADNc du peptide de sécrétion de la sporamine à celui de la hLf mature, un site *Sall* (GTCGAC) a été introduit par PCR au niveau du dernier codon de la séquence du peptide de la sporamine, ainsi qu'un site *XhoI* (CTCGAG) suivi d'un site *EcoRI* (GAATTC) immédiatement en amont du codon d'initiation ATG. Ces modifications ont été réalisées par PCR, sur matrice pMAT103. Les oligonucléotides choisis permettent l'insertion de ces différents sites de restriction :

- oligo 5' : 5' TCCCTCGAGGAATTCATGAAAGCCTTCACACTC 3';
- oligo 3' : 5' TCCGTCGACCGGAATGGGCTGGATTGGGCAGG 3'.

Après digestion du fragment amplifié par *XhoI* et *Sall*, celui-ci a été sous-cloné dans pBS-13 préalablement hydrolysé par *XhoI* et *Sall*. Le plasmide pBS-14 ainsi créé a permis le séquençage des 500 premiers nucléotides.

L'ADNc codant pour la protéine chimère a été excisé de pBS-14 par hydrolyse de ce dernier par *EcoRI*. Le fragment codant de 2150 paires de bases a été alors sous-cloné dans pBIOC-21 au site *EcoRI* de polyclonage. Ce nouveau construit, le vecteur pBIOC21-PSSp-Lf, fut utilisé lors des étapes de transformation décrites dans l'appendice technique.

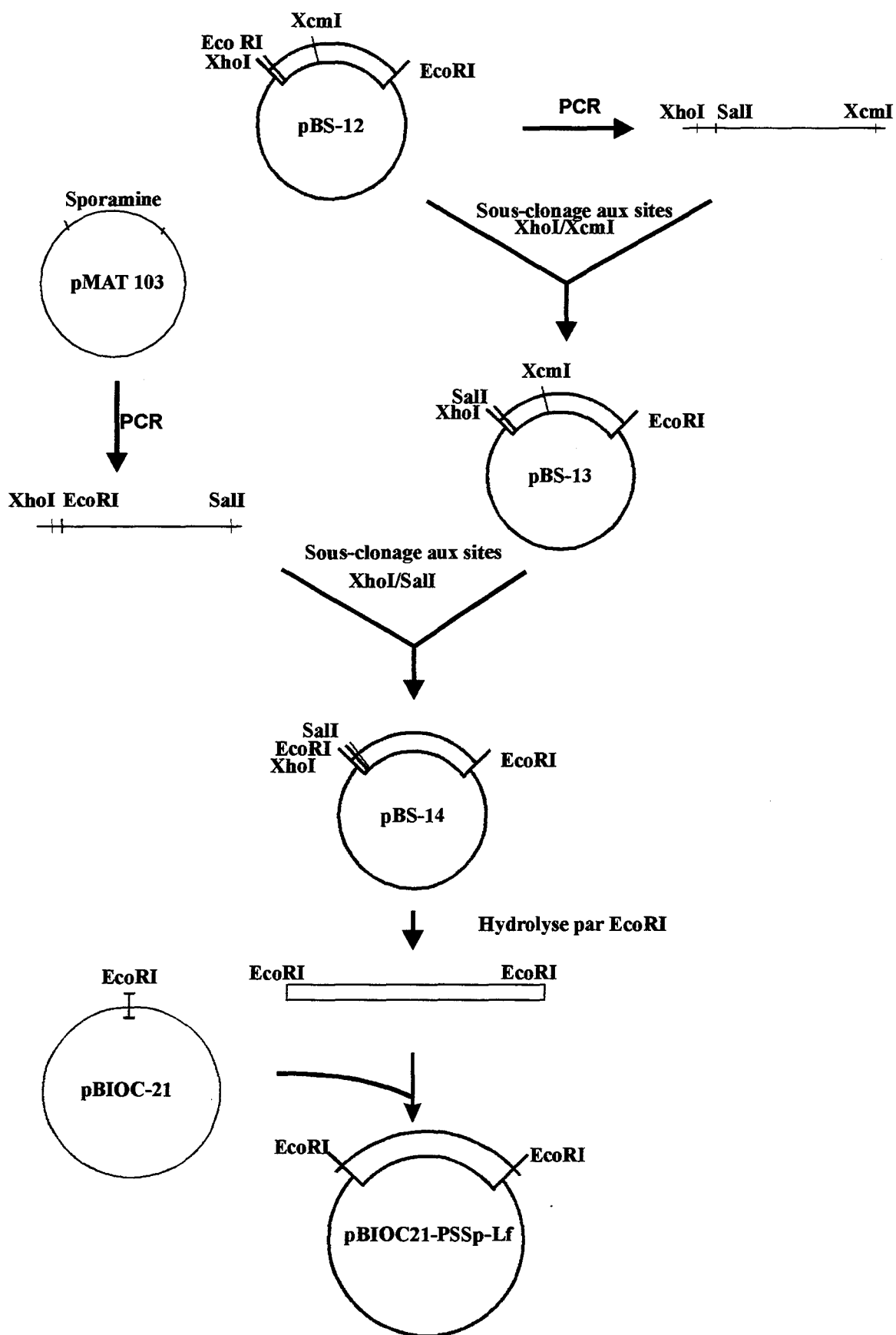


Fig. 15 : Construction moléculaire de pBIOC21-PSSp-Lf

B) Détection des hLf recombinantes et sélection des transformants

Après transformation et croissance d'une quarantaine de transformants, nous avons criblé les plantes transgéniques exprimant la protéine d'intérêt. Une extraction des protéines totales a été réalisée sur une vingtaine d'événements de transformation pour chacune des constructions pBIOC21-PSLf-Lf et pBIOC21-PSSp-Lf, suivie d'une mise en évidence qualitative et quantitative de l'éventuelle lactoferrine recombinante (rhLf).

Ainsi, les feuilles ont été broyées dans l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une fine poudre. Les protéines solubles ont été extraites de la matière végétale par un tampon d'extraction (Tris/HCl 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, Triton X100 0,1 %, pH 6,5), à raison de 4 ml de tampon par gramme de feuille. Après centrifugation de l'extrait pendant 30 min à 13 000 g, le surnageant a été décanté, filtré et utilisé pour les étapes ultérieures de mise en évidence de la rhLf.

1 ~ Sélection des transformants

Les dosages ELISA des extraits protéiques ont permis d'estimer les rapports rhLf/protéines solubles totales. Ces dosages ont conduit à la sélection du transformant T19 issu de la construction pBIOC21-PSLf-Lf (codant pour le peptide signal de la lactoferrine). Les rapports rhLf sur protéines solubles des transformants issus de cette transformation sont représentés dans le diagramme Fig. 16. Cette analyse des plantes issues de la première transformation montre une présence de lactoferrine recombinante en quantité variable (allant de 0 à 0,1 % des protéines totales) alors que le témoin non transformé ne présente aucune protéine détectée par ELISA. Le taux de rhLf du transformant T19 est de 0,1 %. Le transformant T30 a été sélectionné par la même technique, il correspond à la transformation du tabac par la construction pBIOC21-PSSp-Lf (fusionnant la hLf au peptide de sécrétion de la sporamine). La rhLf du transformant T30 représente 0,3 % des protéines solubles.

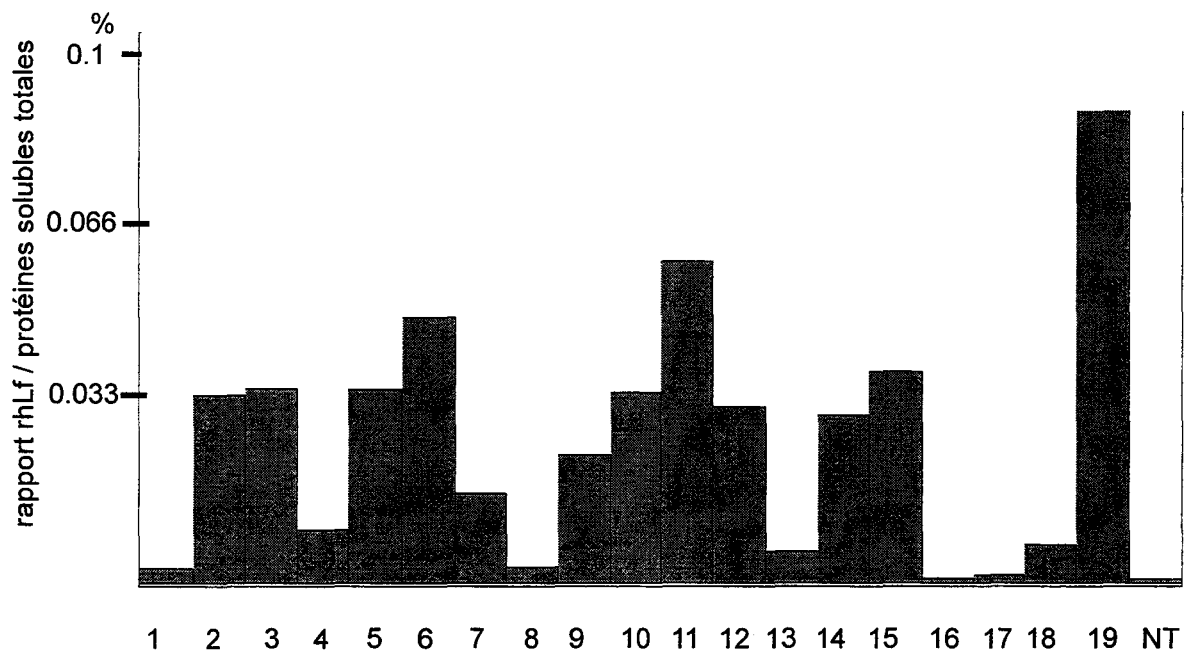


Fig. 16 : Criblage des transformants de tabac exprimant de la rhLf
(en pourcentage de protéines solubles)

2 ~ Analyse en SDS-PAGE des protéines recombinantes

Afin de vérifier la masse moléculaire des protéines recombinantes détectées par ELISA dans les transformants T19 et T30, diverses techniques d'analyse par SDS-PAGE ont été réalisées. Un Western blot de l'extrait des protéines solubles nous a permis de vérifier la présence d'une bande double de 80 kDa reconnue par les anticorps anti-lactoferrine humaine dans le transformant T19 (non montré), ce qui confirme les résultats suggérés par les tests ELISA.

La figure 17, qui représente un Western blot des protéines solubles totales issues du transformant T30 et montre également l'existence d'un doublet protéique de masse moléculaire proche de 80 kDa qui co-migre avec la Lf isolée du lait humain. La présence de ce doublet a également été visualisée après immunoprécipitation des protéines solubles issues du transformant T30. Par ailleurs, la figure 18 montre qu'après immunoprécipitation de l'extrait issu du transformant T19, la lactoferrine recombinante est visualisée sous forme d'un doublet de masse moléculaire d'environ 80 kDa. Les lactoferrines recombinantes issues des transformants T19 et T30 ont été baptisées respectivement Lf1 et Lf2.

C) Analyse des caractéristiques biochimiques des lactoferrines recombinantes Lf1 et Lf2

1 ~ Analyse de la séquence N-terminale

Afin de vérifier le processus de maturation *in vivo* et le site de clivage de la pré-lactoferrine, une analyse de la séquence N-terminale par le procédé de dégradation d'Edman a été réalisée sur Lf1 et Lf2 purifiées par chromatographie d'affinité sur gel de Sepharose 4B activé au BrCN sur lequel a été couplé un anticorps polyclonal anti-lactoferrine humaine (Fig. 19). Cette analyse a montré que, pour chacune des protéines Lf1 et Lf2, la séquence des 7 premiers résidus est «GRRRRSV», ce qui correspond à la séquence exacte de la hLf mature. Ces

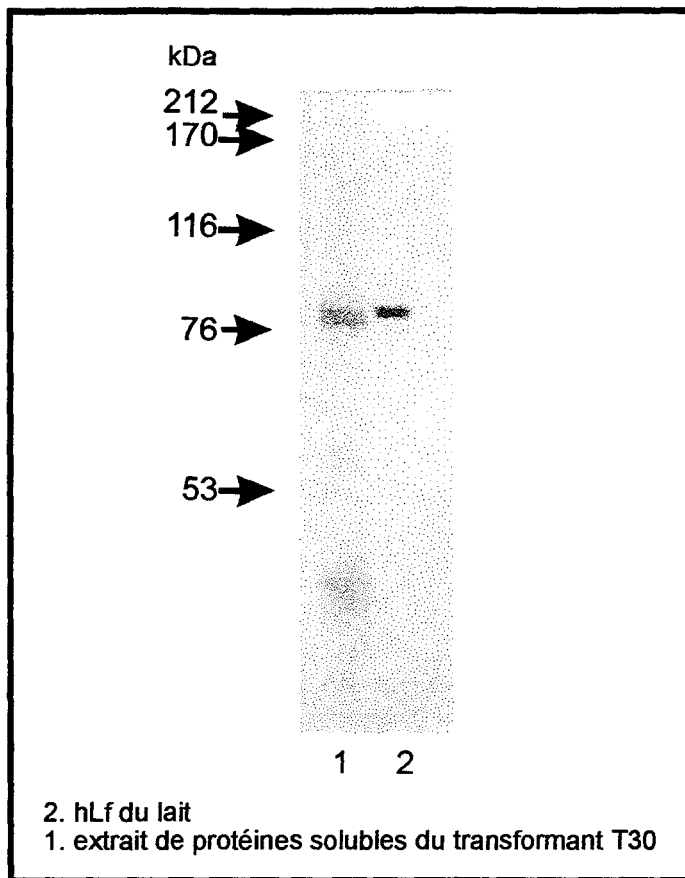


Fig.17 : Détection de la Lf2 par Western blot de l'extrait de protéines solubles du transformant T30

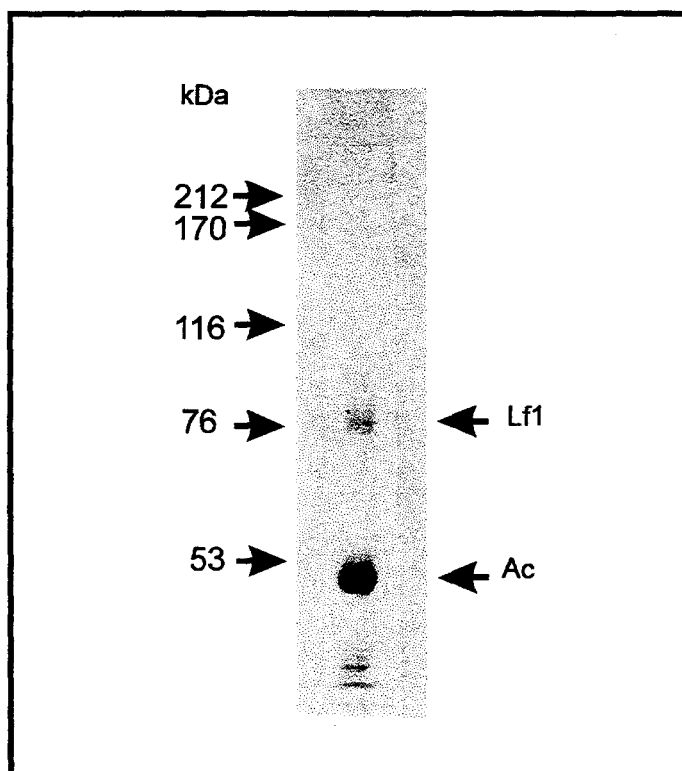


Fig. 18 : Immunoprécipitation de la Lf1 à partir d'un extrait de protéines solubles du transformant T19

résultats montrent que la fusion du peptide de sécrétion de la sporamine à la séquence de la protéine naturelle permet un clivage correct de ce peptide signal et permet l'obtention d'une protéine mature dont l'extrémité N-terminale est conforme à celle de la protéine naturelle. Par ailleurs, le peptide naturel de la hLf est également reconnu par la cellule végétale et la préprotéine est maturée et sécrétée avec clivage au bon endroit du peptide signal. Il faut noter que ces séquences N-terminales identiques n'expliquent pas la présence des deux bandes protéiques observées en SDS-PAGE à la fois pour Lf1 et Lf2.

2~ Comportement chromatographique et purification de Lf2

Compte-tenu des masses moléculaires apparentes et des séquences N-terminales similaires des protéines Lf1 and Lf2, les études ultérieures ont été poursuivies avec la protéine issue du transformant le plus productif, c'est-à-dire T30. Ainsi, une purification à grande échelle de Lf2 a été entreprise, en vue d'analyses approfondies de cette protéine. En effet, par chromatographie d'échange d'ions sur colonne SP-Sepharose Fast Flow, la Lf2 se retrouve majoritairement dans une fraction éluée à 0,8 M NaCl, tout comme la lactoferrine isolée du lait de Femme. Ces résultats suggèrent que la rhLf possède une charge identique à celle de la protéine native.

Les fractions contenant la Lf2 ont été concentrées, dialysées et congelées. La pureté de la Lf2 fut vérifiée en SDS-PAGE 7,5 %. La lactoferrine recombinante purifiée apparaît sous forme d'une double bande protéique d'une masse moléculaire d'environ 80 kDa.

3 ~ Analyse par spectrométrie de masse en mode MALDI/TOF

La masse moléculaire moyenne de Lf2 déterminée par spectrométrie de masse est de 81.250 Da (Fig. 20), ce qui correspond à la masse calculée de la chaîne polypeptidique de la hLf (76320 Da) sur laquelle seraient branchés des glycanes

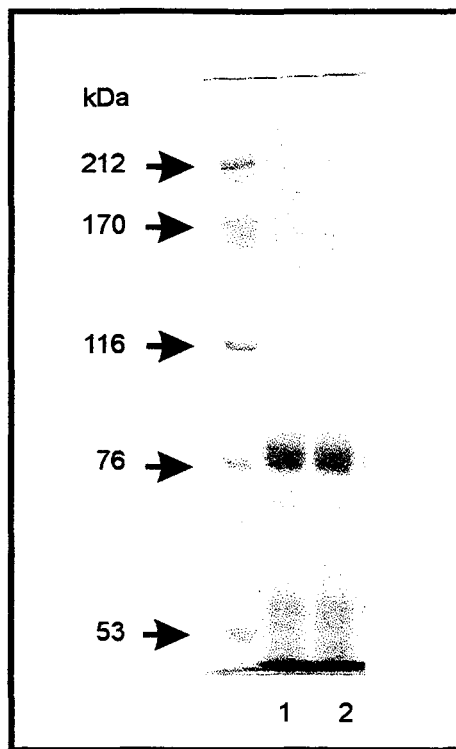


Fig. 19 : SDS-PAGE des protéines Lf1 (1) et Lf2 (2) purifiées par chromatographie d'affinité

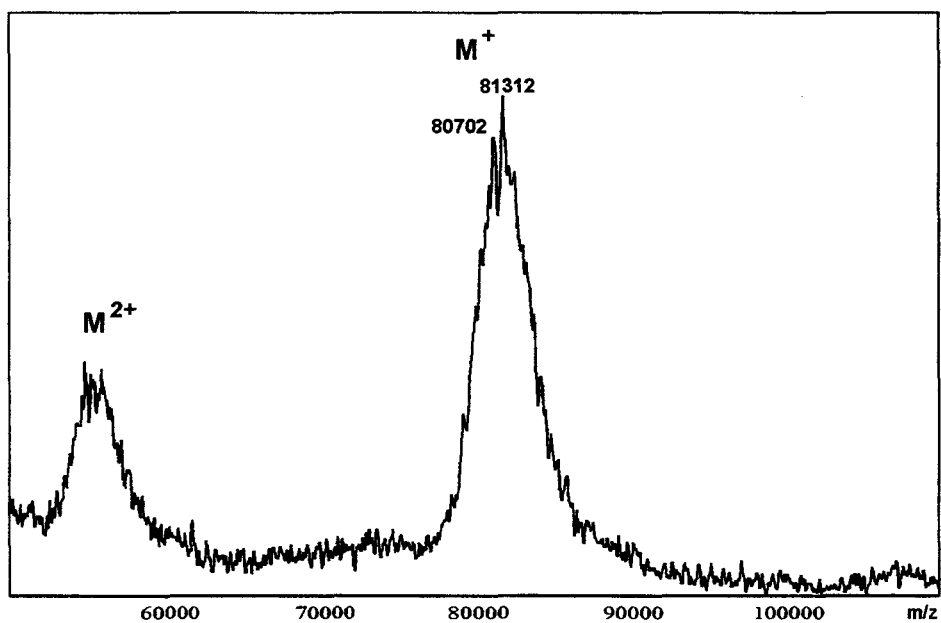


Fig. 20 : Spectre de masse en mode MALDI-TOF de la lactoferrine exprimée dans le tabac (Lf2)

d'une masse moléculaire globale de 5.180 Da. A partir de ces valeurs, nous pouvons en déduire que le taux de glycannes représente 6,35 % de la masse totale de la glycoprotéine. Néanmoins, cette analyse par spectrométrie de masse révèle un mélange complexe de protéines dont deux espèces moléculaires majeures de 80.700 Da et 81.310 Da. La présence de ces deux formes moléculaires permet d'expliquer la présence des deux bandes protéiques visualisées en SDS-PAGE.

4 ~ Composition de la fraction glycannique

Dans le but de déterminer la nature de la fraction glycannique de Lf2, une composition en monosaccharides a été déterminée. L'analyse montre un taux de 6,5 % d'oses totaux (au lieu de 5% dans la hLf isolée du lait). Cette valeur est très proche de celle calculée sur la base des résultats de spectrométrie de masse. La composition molaire est décrite dans le Tableau III.

Les résultats obtenus suggèrent une structure des glycannes de Lf2 de type N-acétyllactosaminique avec une certaine hétérogénéité de la composition molaire en monosaccharides qui expliquerait la présence du doublet observé sur gel de polyacrylamide. Il faut principalement noter la présence de xylose, la faible présence de galactose et l'absence d'acide N-acétyl neuraminique. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits dans les glycoprotéines de plantes (Faye *et al.*, 1989).

5 ~ Expériences de fixation aux cellules lymphoblastiques Jurkat et entérocytaires HT29-18C1

Afin de déterminer si la protéine recombinante est capable d'être reconnue par les récepteurs de la hLf, les paramètres de fixation de Lf2 marquée à l'¹²⁵I ont été déterminés par la méthode Scatchard sur deux lignées cellulaires qui ont servi de modèles : la lignée lymphoblastique T Jurkat et la lignée entérocytaires HT29-18C1.

Tableau III : Composition molaire des glycanes de la Lf2 de tabac comparée à celle de la hLf du lait

	Fuc	Gal	Man	GlcNAc	Xyl	NeuAc
Lf2	1,3	0,7	3,0	3,3	0,7	0,0
hLf du lait	1,3	2,1	3,0	4,0	0,0	1,8

a- Fixation aux cellules Jurkat

Comme le montre la figure 21, les courbes de fixation de Lf2 et de la hLf du lait sur les cellules Jurkat sont similaires. La fixation non-spécifique pour chacune des deux protéines est de 25 % environ. Dans la gamme de concentration de hLf utilisée, une seule classe de récepteurs a été détectée à la surface des cellules, avec une constante de dissociation de $80,27 \pm 33$ nM et un nombre de sites par cellules de $124 \times 10^3 \pm 36 \times 10^3$ pour la Lf2. Sur les mêmes cellules, la hLf se fixe avec une constante de dissociation de $89,7 \pm 22$ nM et un nombre de sites par cellule de $103 \times 10^3 \pm 14 \times 10^3$.

Les résultats montrent que la Lf2 se fixe sur le récepteur lymphocytaire avec des caractéristiques très proches de celles de la lactoferrine du lait humain.

b- Fixation aux cellules HT29-18C1

Sur les cellules entérocytaires HT29-18C1, la figure 22 montre que les courbes de fixation de Lf2 et de la Lf du lait sont similaires. La fixation non spécifique est de 25 % de la fixation totale pour chacune des protéines. Le Kd est de $0,8 \pm 0,19$ μ M et un nombre de sites par cellules de $1,82 \times 10^6 \pm 0,28 \times 10^6$ pour la Lf2. Sur ces cellules, la hLf native se fixe avec un Kd $1 \pm 0,2$ μ M et un nombre de sites par cellule de $4 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$.

Ces études démontrent que la fixation de la Lf2 sur les cellules entérocytaires est identique à celle de la protéine native.

Ainsi, les études de fixation aux cellules lymphoblastiques T Jurkat et aux cellules entérocytaires HT29-18C1 suggèrent que la Lf2 est, d'une façon générale, correctement conformée et biologiquement active.

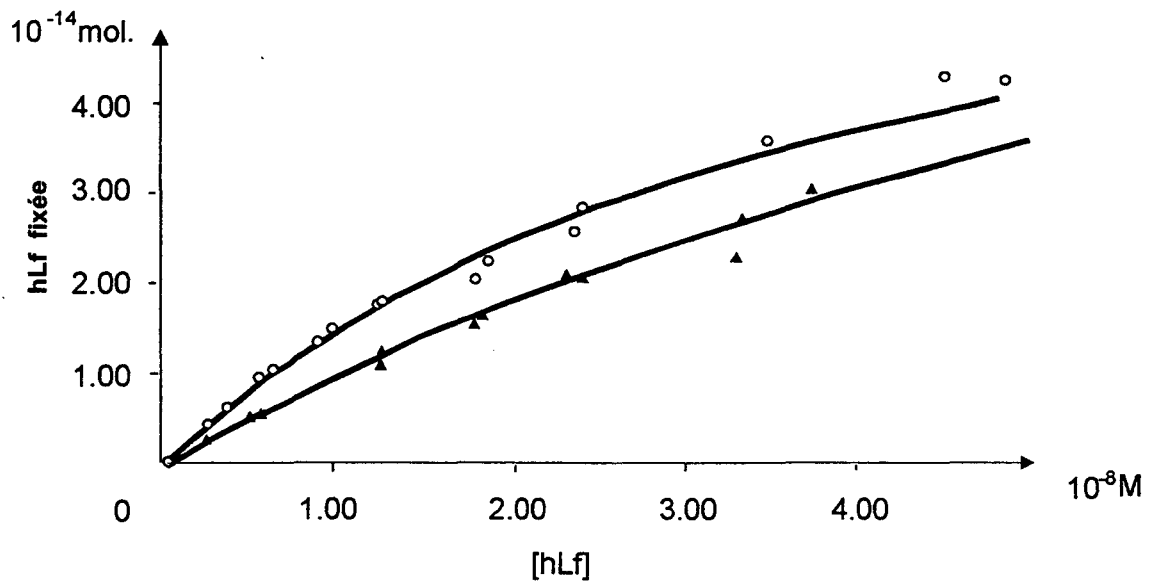


Fig. 21 : Fixation spécifique de Lf2 sur les cellules lymphoblastiques T Jurkat

- ▲ Fixation de Lf2
- Fixation de la lactoferrine du lait

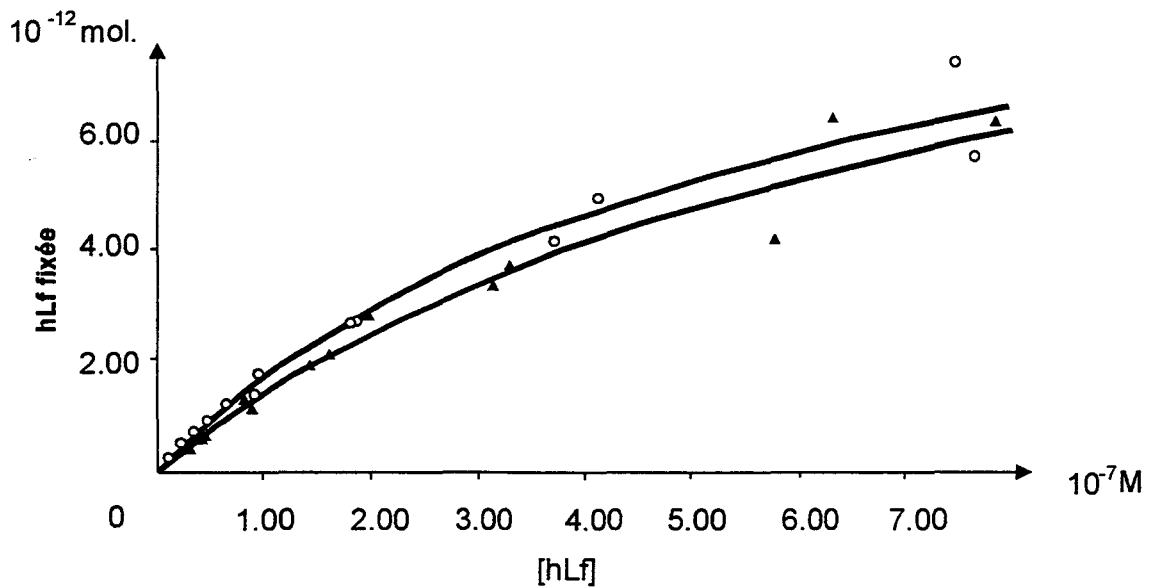


Fig. 22 : Fixation spécifique de Lf2 sur les cellules entérocytaires HT29-18-C1

- ▲ Fixation de Lf2
- Fixation de la lactoferrine du lait

III CONCLUSION

Dans ce travail, nous décrivons l'expression de la hLf dans des plantes entières de tabac et l'analyse de quelques propriétés physico-chimiques et biologiques.

L'intégration d'un ADN exogène dans le génome végétal peut être réalisé de différentes manières. Une des méthodes de transformation les plus communes pour le tabac est l'utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens*. C'est par ce biais que nous avons introduit avec succès l'ADNc de la hLf.

Dans le but d'augmenter la probabilité d'obtenir une hLf maturée et sécrétée, nous avons testé à la fois un signal de sécrétion végétal et un peptide signal humain. Dans la première construction, pBIOC21-PSLf-Lf code pour le peptide signal naturel de la hLf qui permet la sécrétion de la protéine dans les cellules humaines. Dans la seconde construction, pBIOC21-PSSp-Lf code pour la séquence du signal de sécrétion de la sporamine. Dans les deux cas, nous avons placé l'ADNc exogène sous le contrôle du double promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur. Les plantes transformées ont été criblées et deux transformants exprimant chacun la rhLf issue d'un des deux construits furent isolés. Les rhLfs obtenues furent purifiées et caractérisées biochimiquement.

D'après la détermination des séquences N-terminales de Lf1 et Lf2, nous pouvons conclure que les deux séquences signal utilisées, l'une végétale, l'autre de mammifères, sont reconnues par la machinerie cellulaire, qui permet le clivage de ce peptide et la sécrétion de la protéine mature. Ainsi, Lf1 et Lf2 sont apparemment identiques. Les taux d'expression de Lf1 et Lf2 des deux transformants les plus productifs sont de 0,1 et 0,3% des protéines solubles totales, respectivement. Ces taux sont sensiblement plus bas que ceux obtenus pour d'autres protéines de mammifères, les IgA, qui représentent jusqu'à 1,3% des protéines solubles (Hiatt *et al.*, 1989 ; Ma *et al.*, 1995). Cependant, un taux de 1,3% reste exceptionnel et la plupart des études montrent des taux de protéines recombinantes inférieurs à 0,1% (De Neve *et al.*, 1993, De Zoeten *et al.*, 1989). De plus, nous pourrions

probablement améliorer nos taux en augmentant le nombre d'événements de transformation, ce qui permettrait de sélectionner des transformants plus productifs.

Nous avons montré que la hLf recombinante et la hLf du lait sont similaires en ce qui concerne leur partie protéique. Néanmoins, des différences ont été observées dans la composition en monosaccharides des deux protéines. Ces différences n'affectent pas la fonctionnalité de la rhLf, comme le montrent les études de fixation sur deux lignées cellulaires. Cette observation est en accord avec les constatations d'auteurs qui ont déjà démontré que la partie glycanique n'intervenait pas dans la fixation de la hLf sur ses récepteurs cellulaires (Mazurier *et al.*, 1989; Hu *et al.*, 1990). Enfin, si les quantités de Lf2 obtenues lors de la première purification étaient insuffisante pour des études de fixation du fer, celles-ci sont néanmoins envisagées.

En conclusion, nos résultats démontrent pour la première fois que l'expression d'une rhLf fonctionnelle peut être obtenue dans du tabac transgénique. La production d'une rhLf biologiquement active dans les plantes pourrait faciliter les études concernant les applications thérapeutiques et nutritionnelles de la hLf.

Expression de hLfs mutées dans les cellules BHK et dans le système baculovirus/cellules d'insecte : Applications

I. Description des régions mutées

Après la découverte du récepteur lymphocytaire de la hLf, les recherches du laboratoire se sont tournées vers l'étude de l'interaction de la hLf avec son récepteur. Des études biochimiques ont permis de cibler un fragment particulier de la hLf (résidus 4-52) qui semble se fixer spécifiquement sur le récepteur des lymphocytes activés. Ce fragment comporte deux boucles (résidus 28 à 34 et 39 à 42) susceptibles d'être reconnues par le récepteur (Legrand *et al.*, 1991;1992). D'autre part, la boucle 39-42 semble également être responsable de l'activité inhibitrice de l'agrégation plaquettaire (Leveugle *et al.*, 1994). Enfin, plusieurs travaux ont démontré l'importance de la zone très basique des premiers acides aminés (Arg 2-5), dans la fixation de la hLf à la surface des cellules, en particulier sur les protéoglycannes (Wu *et al.*, 1995).

Ainsi, tous ces résultats suggèrent que plusieurs zones de la région composée des cinquante premiers résidus de la lactoferrine pouvaient être impliquées dans la reconnaissance des cellules cibles et en particulier, du récepteur des lymphocytes activés. La mutagenèse dirigée de cette séquence et l'expression de hLf mutées pouvaient confirmer cette hypothèse et nous permettre de conclure quant à l'implication exacte de chaque acide aminé dans la fixation de la protéine à son site.

Afin de s'assurer que les modifications engendrées n'entraînaient pas de bouleversements structuraux drastiques de la rhLf, nous avons choisi de substituer

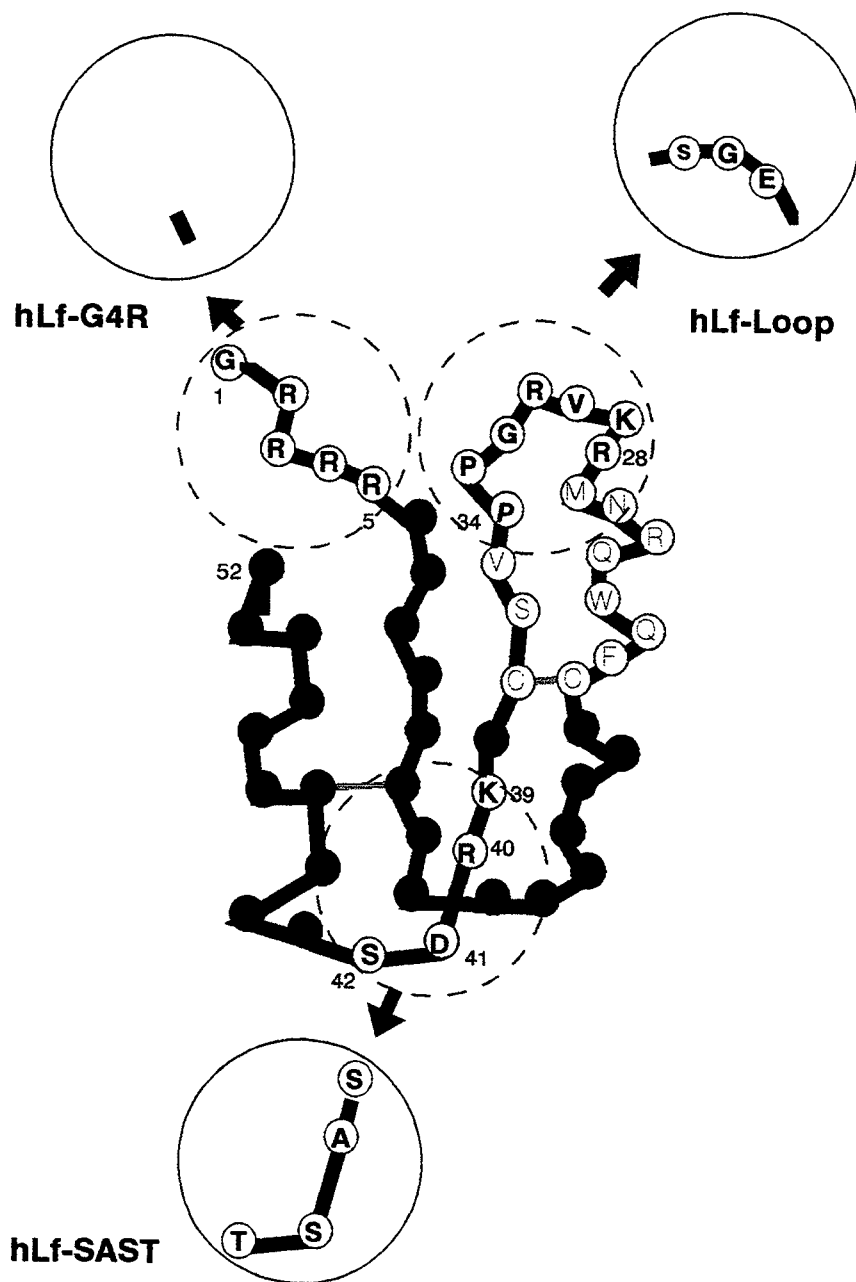


Fig. 23 : Modifications apportées à la lactoferrine humaine pour l'étude de son site d'interaction

l'intégralité de chacune de ces zones par des structures voisines et de conformation connue. C'est ainsi que nous les avons remplacées par les séquences homologues situées du côté C-terminal de la hLf, puisque le lobe C-terminal n'interagit pas avec le récepteur lymphocytaire.

Cinq hLfs mutées ont été obtenues. La hLf-G4R possède la séquence de la hLf dont les cinq premiers acides aminés, c'est-à-dire les résidus ¹GRRRR⁵, ont été ôtés. La hLf-Loop est une hLf dont la séquence ²⁸RKVRGPP³⁴, a été remplacée par la séquence EGS qui est son homologue au niveau du lobe C-terminal (acides aminés 365 à 367). La hLf-SAST est le résultat de la substitution de la séquence ³⁹KRDS⁴² par son homologue du C-terminal, la séquence ³⁷⁴SAST³⁷⁷. Deux protéines produites portent deux de ces mutations : la hLf-G4R/Loop porte à la fois la délétion des cinq premiers acides aminés et la modification de la boucle 28-34, alors que la hLf-G4R/SAST porte la délétion de la séquence N-terminale ainsi qu'une modification de la boucle 39-42 (Fig. 23)

II. Mutagenèse dirigée et expression des protéines

A) Mutagenèse dirigée

La méthode de mutagenèse dirigée que nous avons employée est celle décrite par Sayers (1988). Cette technique nécessite que le fragment d'ADN cible soit cloné dans le vecteur M13 afin de l'obtenir sous forme simple-brin.

Après hydrolyse de pBS-hLf (précédemment décrit) par *EcoRI* et *AccI*, un fragment de 346 paires de bases a été isolé. Celui-ci a été sous-cloné dans le phage M13mp11 préalablement hydrolysé par *EcoRI* et *AccI*. Après transformation des bactéries TG1, un clone de phages recombinants a été isolé et son insert séquencé. Ce phage nommé M13-346 a été utilisé comme matrice pour les étapes de mutagenèse dirigée (voir appendice technique).

Après transformation des bactéries TG1, nous avons criblé les clones de phages à l'aide d'une sonde oligonucléotidique portant la mutation et marquée au ³²P. Après séquençage, un clone a été sélectionné. Le fragment 346 a alors été isolé

après hydrolyse du phage par *EcoRI* et *AccI* puis ligaturé au reste de la séquence de la lactoferrine, c'est-à dire au fragment de 1800 pb obtenu par hydrolyse de pBS-hLf2 par *AccI* et *XbaI*. L'ADNc entier et muté de hlf a été réinséré dans pBluescript dénommé alors pBS-hLf*.

Plusieurs lactoferrines mutées ont été obtenues par cette technique de mutagenèse dirigée. La protéine nommée hLf-Loop est la lactoferrine dans laquelle la séquence R²⁸KVRGPP³⁴ a été remplacée par la séquence homologue du lobe C-terminal E³⁶⁵GS³⁶⁷. Cette mutation a été effectuée en utilisant l'oligonucléotide 5'TGGCAAAGGAATATGGAAGGTTCTGT3'. La lactoferrine dénommée hLf-SAST est le résultat d'un remplacement de la séquence K³⁹RDS⁴² par son homologue du lobe C-terminal S³⁷⁴AST³⁷⁷, grâce à l'oligonucléotide 5'GTCAGCTGCATATCAGCATCAACCCCAT CCAGTG 3'. Enfin, la protéine hLf-G4R est la séquence de la lactoferrine mature dans laquelle les cinq premiers résidus ont été délétés. Cette protéine a été mutée par l'oligonucléotide 5'CTGTGTCTGGCTAGTGTTTCAGTGGTG5'. Ces oligonucléotides ont été utilisés à la fois pour les mutations uniques et doubles c'est-à-dire les protéines hLf-G4R/Loop et hLf-G4R/SAST.

Après reconstruction de l'ADNc entier muté dans pBluescriptII SK, nous avons sous-cloné cet ADNc muté dans le vecteur pNUT pour l'expression dans les cellules de mammifères BHK (Fig.24), ou le vecteur pVL1392 pour l'expression en cellules Sf9, comme décrit précédemment (Fig. 25). Nous avons donc construit un vecteur d'expression pNUT-Loop et cinq vecteurs de transfert qui sont les plasmides pVL-Loop, pVL-SAST, pVL-G4R, pVL-G4R/Loop et pVL-G4R/SAST.

B) Expression des ADNc mutés de hLf et purification des protéines

La protéine hLf-Loop a été exprimée à la fois par les cellules BHK et Sf9, alors que les protéines hLf-G4R, hLf-G4R/Loop, hLf-SAST et hLf-G4R/SAST ont été exprimées dans les cellules Sf9 infectées par un baculovirus recombinant. Chaque

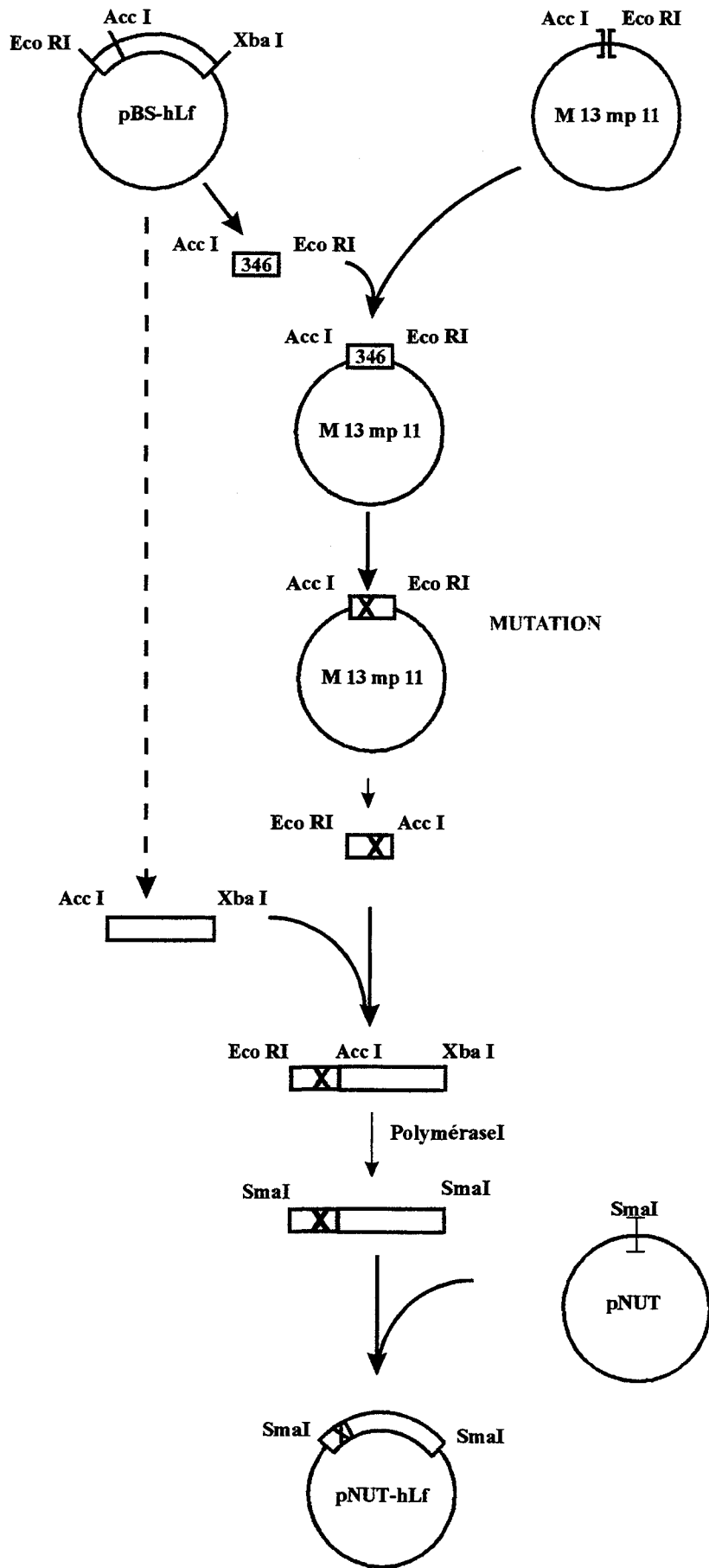


Fig. 24 : Mutation et clonage de l'ADNc de la lactoferrine dans le vecteur d'expression pNUT

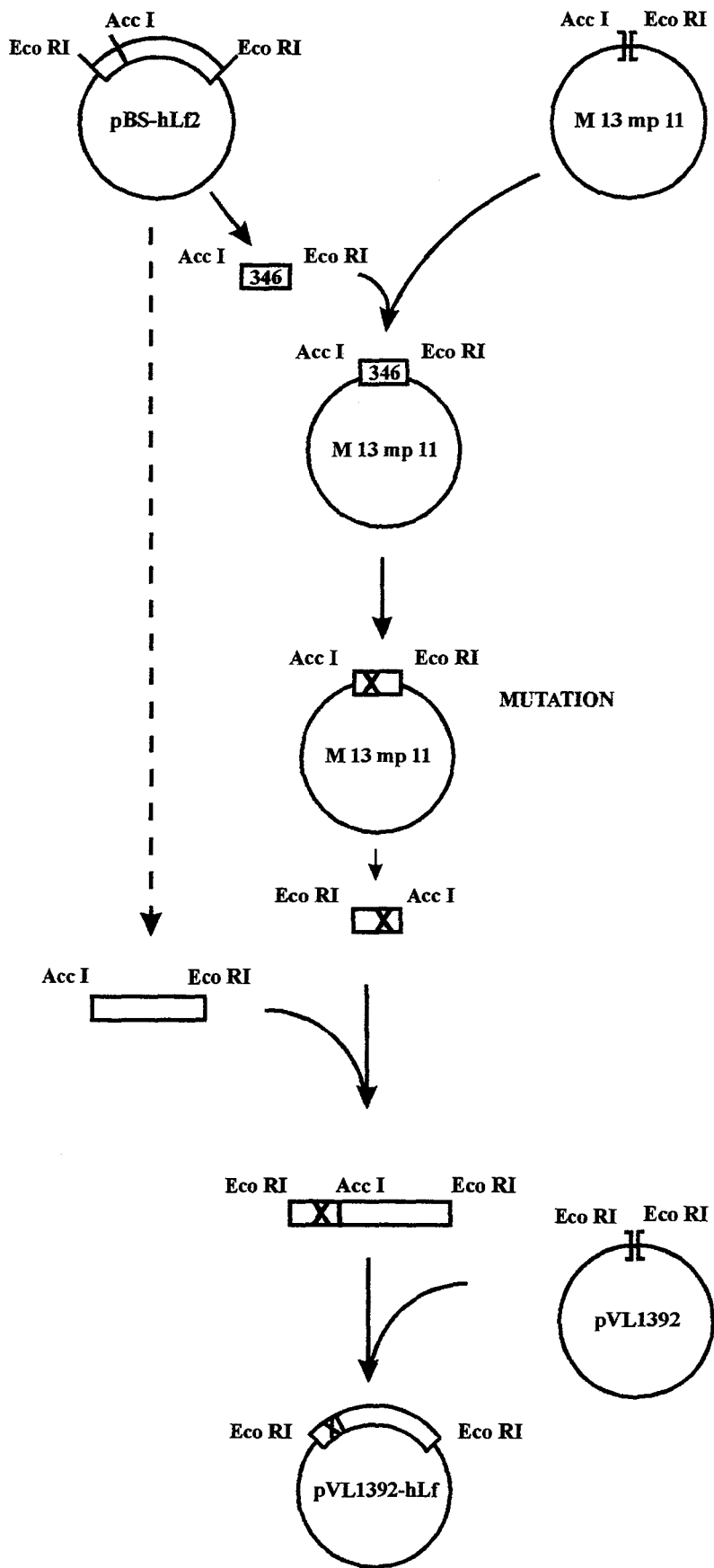


Fig. 25 :Mutation et clonage de l'ADNc de la lactoferrine dans le vecteur d'expression pVL1392

protéine mutée a été exprimée et purifiée par chromatographie d'échanges d'ions, dont la méthode est décrite précédemment.

III: Applications à l'étude des interactions de la lactoferrine avec ses cibles cellulaires et moléculaires

A) Interaction de la lactoferrine avec le récepteur des cellules lymphoblastiques T Jurkat

Afin de déterminer le rôle des séquences 1 à 5, 28 à 34 et 39 à 42 de la lactoferrine humaine dans l'interaction avec les lymphocytes T activés, les protéines mutées hLf-G4R, hLf-Loop, hLf-SAST, et hLf-G4R/Loop ont été soumises à des études de fixation sur les cellules. Nous avons utilisé la lignée lymphoblastique T Jurkat sur laquelle le récepteur de la lactoferrine a été mis en évidence (Bi *et al.*, 1996).

1 ~ Rôle de la région 1-5 de la hLf dans les interactions

a- Introduction

Plusieurs travaux ont émis l'hypothèse selon laquelle les premiers acides aminés de la hLf sont impliqués dans la fixation de la lactoferrine sur des récepteurs de basse affinité tels que les protéoglycannes. Les travaux de Mann *et al.* (1994) ont suggéré que les GAGs se fixent sur une région comprise dans les 33 premiers résidus de la hLf. Deux séquences de la lactoferrine agiraient en synergie dans cette fixation : $^1\text{GRRRRS}^6$ et $^{28}\text{RKVR}^{31}$. En effet, ces séquences sont très proches dans l'espace et forment une région très basique que l'on retrouve sur d'autres protéines. Ces travaux ont été confirmés par ceux de Wu *et al.* (1995) pour qui les Arg^{5, 25, 28, 31} et la Lys²⁹ forment le site de fixation aux protéoglycannes.

Au regard de ces hypothèses et afin de déterminer l'importance de la fixation de la lactoferrine sur les protéoglycannes des cellules T Jurkat, comparativement à

la fixation aux récepteurs spécifiques, il était intéressant de déterminer la contribution de chacun des résidus d'arginine qui constituent les premiers acides aminés de la hLf, dans la fixation aux cellules Jurkat. Ainsi, Legrand *et al.* (1997) ont étudié cette fixation par délétion récurrente de chacun des premiers résidus d'arginine de la hLf. Les hLf^{2N}, hLf^{3N} et hLf^{4N} (c'est-à-dire les lactoferrines auxquelles il manque les 2, 3 et 4 premiers acides aminés respectivement) ont été obtenus par protéolyse trypsique ménagée. Cette méthode ne permettant pas l'obtention de la hLf^{5N}, cette dernière a été obtenue par mutagenèse dirigée et expression par les cellules d'insecte, par la technique décrite précédemment, et qui avait préalablement été dénommée hLf-G4R. C'est par ce biais que j'ai contribué à ce travail qui a été publié :

The N-terminal Arg², Arg³, and Arg⁴ of human lactoferrin interact with sulfated molecules but not with the récepteur present on Jurkat human lymphoblastic T-cells.

Legrand, D., Van Berkel, P.H.C., **Salmon, V.**, van Veen, H.A., Slomianny, M.C., Nujens, J.H. and Spik, G. *Biochem. J.* Sous Presse.

The N-terminal Arg², Arg³ and Arg⁴ of human lactoferrin interact with sulphated molecules but not with the receptor present on Jurkat human lymphoblastic T-cells

Dominique LEGRAND*, Patrick H. C. VAN BERKEL†, Valérie SALMON*, Harry A. VAN VEEN‡, Marie-Christine SLOMIANNY*, Jan H. NUIJENS‡ and Geneviève SPIK*¹

*Laboratoire de Chimie Biologique et Unité Mixte de Recherche no. 111 du Centre National de la Recherche Scientifique, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France, †Leiden Institute of Chemistry, Medical Biotechnology Department, Gorlaeus Laboratories, Leiden University, 2333 CA, Leiden, The Netherlands, and ‡Pharming BV, Niels Bohrweg 11-13, 2333 CA, Leiden, The Netherlands

We previously characterized a 105 kDa receptor for human lactoferrin (hLf) on Jurkat human lymphoblastic T-cells. To delineate the role of the basic cluster Arg²-Arg³-Arg⁴-Arg⁵ of hLf in the interaction with Jurkat cells, we isolated N-terminally deleted hLf species of molecular mass 80 kDa lacking two, three or four N-terminal residues (hLf^{-2N}, hLf^{-3N} and hLf^{-4N}) from native hLf that had been treated with trypsin. Native hLf bound to 102 000 sites on Jurkat cells with a dissociation constant (K_d) of 70 nM. Consecutive removal of N-terminal arginine residues from hLf progressively increased the binding affinity but decreased the number of binding sites on the cells. A recombinant hLf mutant lacking the first five N-terminal residues (rhLf^{-5N}) bound to 17 000 sites with a K_d of 12 nM. The binding parameters of bovine lactoferrin (Lf) and native hLf did not significantly differ, whereas the binding parameters of murine Lf (8000 sites;

K_d 30 nM) resembled those of rhLf^{-5N}. Culture of Jurkat cells in the presence of chlorate, which inhibits sulphation, decreased the number of binding sites for both native hLf and hLf^{-3N} but not for rhLf^{-5N}, indicating that the hLf-binding sites include sulphated molecules. We propose that the interaction of hLf with a large number of binding sites (approx. 80 000 per cell) on Jurkat cells is dependent on Arg²-Arg³-Arg⁴, but not on Arg⁵. Interaction with approx. 20 000 binding sites per cell, presumably the hLf receptor, does not require the first N-terminal basic cluster of hLf. Moreover, the affinity of hLf for the latter binding site is enhanced approx. 6-fold after removal of the first basic cluster. Thus N-terminal proteolysis of hLf *in vivo* might serve to modulate the nature of its binding to cells and thereby its effects on cellular physiology.

INTRODUCTION

Lactoferrin (Lf), also called lactotransferrin, is a metal-binding glycoprotein found in most external secretions, such as milk [1], tears and saliva [2], as well as in the specific granules of polymorphonuclear leucocytes [3]. On the basis of the many reports on antimicrobial and anti-inflammatory activities *in vitro*, Lf is thought to be involved in the host defence against infection and severe inflammation. Some biological activities of human Lf (hLf) are linked to its ability to chelate iron strongly, whereas others relate to the interactions of hLf with host cells (intestinal cells [4], mammary gland epithelial cells [5], hepatocytes [6,7], monocytes [8], activated lymphocytes [9] and platelets [10]) or its binding to bacterial lipopolysaccharides [11,12], proteoglycans [13,14], DNA [15] and human lysozyme [16,17]. The highly positively charged N-terminus of hLf might be involved in most of these interactions [7,11–15,17].

The amino acid sequences of many lactoferrins, including hLf, bovine Lf (bLf) and murine Lf (mLf) have been determined by protein and DNA sequencing [18–21]. The N-terminal portion of hLf contains a unique cluster of four consecutive arginine residues as well as a second cluster of basic amino acid residues that is also present in other Lf species [18–21]. Mann et al. [13] suggested that the heparin-binding site in hLf represents a 'cationic cradle' formed by the juxtaposition of the first (Arg²-Arg³-Arg⁴-Arg⁵)

and second (Arg²⁸-Lys²⁹-Val³⁰-Arg³¹) basic clusters. Residues Arg⁴ and Arg⁵ of the cationic cradle were shown to be essential in the binding of hLf to heparin [13]. We have previously reported a specific hLf receptor of 105 kDa on activated lymphocytes [9] that binds hLf via the loops involving residues 28–34 and 39–42 [22]. The binding of hLf to lymphocytes promotes their differentiation [23]. Moreover, when presented as a sole iron source to cells, hLf was shown to promote growth of T-lymphocytes [9]. In other conditions, no effect or inhibitory effects on lymphocyte growth were reported [24,25]. Evidence for a similar 105 kDa receptor has also been found on the Jurkat T-cell line [26] and platelets [10].

The interaction of hLf with cells might involve multiple classes of binding sites [27]. It was postulated that the rapid hepatic clearance of hLf from the rat circulation involves at least two classes of hLf-binding sites, proteoglycans and the chylomicron remnant receptor and/or the LDL-receptor-related protein [7,27,28]. The Arg-Lys-rich sequence (Arg²⁵-Asn²⁶-Met²⁷-Arg²⁸-Lys²⁹-Val³⁰-Arg³¹) in hLf, which resembles the receptor recognition structure of apolipoprotein-E2, presumably mediates binding and internalization into the hepatocytes by the chylomicron remnant receptor and/or by LDL-receptor-related protein, whereas the Arg²-Arg³-Arg⁴-Arg⁵ stretch might have an important role in the massive low-affinity interaction of hLf with the large number of cell-associated chondroitin sulphate-type

Abbreviations used: bLf, bovine lactoferrin; GAG, glycosaminoglycan; hLf, human lactoferrin; hLf^{-2N}, hLf^{-3N}, hLf^{-4N}, hLf lacking the first two, three or four N-terminal residues respectively; Lf, lactoferrin; mLf, murine lactoferrin; rhLf, recombinant hLf; rhLf^{-5N}, recombinant hLf lacking the first five N-terminal residues.

¹ To whom correspondence should be addressed.

proteoglycans [7,27,28]. The contribution of each Arg residue of the first basic cluster to binding of hLf to hepatocytes or other cells has yet not been elucidated.

Here we describe the preparation of N-terminally deleted hLf species lacking two to five N-terminal residues by tryptic proteolysis or recombinant DNA technology. Cell binding experiments were performed with the distinct hLf species, in the presence or the absence of sodium chlorate, which inhibits sulphation [29], as well as with mLf and bLf. The results allow us to discern the role of the first basic cluster in binding to cell-associated proteoglycans and the hLf lymphocyte receptor.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

Soybean trypsin inhibitor (type I-S), bovine pancreatic trypsin (type III-S), human serum transferrin and sodium chlorate were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.). Restriction endonucleases and oligonucleotides were obtained from Eurogentec (Seraing, Belgium). T4 ligase, calf alkaline phosphatase and pBluescript SK were from Stratagene (La Jolla, CA, U.S.A.). Sequanase DNA sequencing kit was from United States Biochemical Corporation (Cleveland, OH, U.S.A.). Baculogold kit containing linearized AcNPV DNA and agarose were from Pharmingen (San Diego, CA, U.S.A.). Plasmid pVL1392 and cell line *Spodoptera frugiperda* (Sf9) were kindly provided by Dr. C. Auriault (Institut Pasteur, Lille, France). Carrier-free Na¹²⁵I was from ICN Pharmaceuticals (Orsay, France) and Iodo-Beads were from Pierce (Rockford, IL, U.S.A.). Sephadex G25 PD-10 columns were purchased from Pharmacia-LKB Biotechnology (Uppsala, Sweden). RPMI 1640 medium and fetal calf serum were from Techgen International (Les Ulis, France) and D. Dutscher (Brumath, France) respectively. SF900II insect cell medium and gentamycin were from Gibco BRL (Cergy-Pontoise, France). All other chemicals were of analytical grade.

Lactoferrins

Native hLf was purified from fresh human milk from a single donor by ion-exchange chromatography as previously described [30]. bLf was kindly provided by Biopole (Brussels, Belgium). mLf was isolated from mouse milk as follows: mouse milk was diluted 1:1 in 10 mM sodium phosphate/0.15 M NaCl (pH 7.5) (PBS) containing 0.8 M NaCl. Diluted milk was centrifuged at 40000 *g* for 1 h at 4 °C to obtain a whey fraction; this was diluted in 20 mM sodium phosphate, pH 7.5 (buffer A), and applied to an S-Sepharose column (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The column was washed with buffer A containing 0.1 M NaCl, then eluted with buffer A containing 0.5 M NaCl. The eluate was diluted and rerun on a Mono S HR 5/5 column (Pharmacia) in buffer A. Bound protein was eluted with a linear salt gradient of 0–0.5 M NaCl in 15 ml of buffer A at a flow rate of 0.5 ml/min. mLf eluting at 0.28 M NaCl was used for further experiments. Non-modified recombinant hLf (rhLf) was prepared as described in [31]. SDS/PAGE of the purified protein preparations showed no other protein bands than those characteristic of each of the lactoferrins.

Production of an N-terminally deleted hLf mutant lacking amino acids 1-5 (rhLf^{-5N})

A full-length 2.3 kbp cDNA encoding for hLf was obtained from a human mammary-gland cDNA library (Clontech, Palo Alto, CA, U.S.A.), as described [32]. The Sculptor *in vitro* mutagenesis

system kit (Amersham International, Little Chalfont, Bucks., U.K.) was used to delete the sequence 5'-GGCCGTAGGAG-AAGG-3' coding for Gly¹-Arg²-Arg³-Arg⁴-Arg⁵ of hLf [19]. For that purpose a mutagenic oligonucleotide, 5'-CTGTGTCGG-CTAGTGTTCAGTGGTG-3', was synthesized. The mutagenesis template was the phage M13mp11, which contains a 310 bp *EcoRI*-*AccI* fragment of the coding sequence (nt 295–606 [19]) cloned into pBluescript SK [32]. After mutagenesis, the deletion was confirmed by DNA sequence analysis and the mutated *EcoRI*-*AccI* fragment was ligated back into pBluescript SK with the 3' complementary part of the full-length cDNA of hLf [32]. Finally, the mutated cDNA was subcloned into pVL1392, yielding the pVL1392-rhLf^{-5N} construct. Production of rhLf^{-5N} in recombinant baculovirus-infected Sf9 insect cell culture was performed as described [31]. The recombinant protein was purified from the cell culture medium on an SP-Sepharose Fast Flow column equilibrated with 0.2 M sodium acetate, pH 7.8, and eluted with a linear salt gradient from 0 to 1 M NaCl. N-terminal amino acid sequencing of rhLf^{-5N} was performed by the automatic Edman degradation procedure (Applied Biosystems 477 Protein Sequencer). Purity of rhLf^{-5N} was confirmed by this analysis and assessed by SDS/PAGE.

SDS/PAGE analysis

SDS/PAGE of non-reduced and reduced hLf was performed as described [17]. Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue and hLf protein bands were quantified by densitometry with IPlabGel software of Signal Analytics (Vienna, VA, U.S.A.).

Radiolabelling of proteins

The different lactoferrin variants were labelled with ¹²⁵I by using Iodo-Beads as a catalyst. Two Iodo-Beads were washed twice with 1 ml of PBS in a 1.5 ml polypropylene tube and preincubated at 20 °C with 0.2 mCi of radioactive iodine in 100 µl of PBS. Protein (100 µg) in 100 µl of PBS was then added and incubated for 10 min at 4 °C. The volume was adjusted to 500 µl with PBS and free iodine was removed by gel filtration on a PD-10 column equilibrated in serum-free RPMI 1640. The specific radioactivity of the radioiodinated protein was estimated by measuring the absorbance at 280 nm and the radioactivity on a Compugamma LKB-Wallac (Turku, Finland) γ -radiation counter.

Cell culture

Jurkat cells were routinely grown at 37 °C in a humidified air/CO₂ (19:1) atmosphere in RPMI 1640 medium, pH 7.4, containing 5 µg/ml gentamycin, 2 mM L-glutamine, 20 mM Hepes and 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum. Cells were kept in the logarithmic growth phase and diluted to a cell density of 4 × 10⁵/ml. After 24 h, cell viability was checked with Trypan Blue stain. Cells were then washed twice in ice-cold serum-free RPMI 1640 and harvested by centrifugation at 200 *g* for 10 min at 4 °C.

Treatment of Jurkat cells with sodium chlorate

Jurkat cells were diluted to a cell density of 4 × 10⁵/ml in fresh RPMI 1640 medium containing 10% (v/v) fetal calf serum and 5 mg/ml gentamycin, with or without 30 mM sodium chlorate. After 24 h, cells incubated in the presence of sodium chlorate were counted and cell viability was assessed with Trypan Blue. Cells were then harvested and washed as described above.

Cell binding experiments

Equilibrium binding experiments were performed in serum-free RPMI 1640 containing 0.4% (w/v) human serum transferrin to prevent non-specific binding of radioiodinated protein to cells or to plastic. Aliquots (100 μ l) containing 5×10^5 cells were added to 1.5 ml polypropylene tubes and incubated with serial dilutions of 125 I-labelled protein (concentrations ranging from 0 to 80 nM). Incubation of cells with proteins was performed for 1 h at 4 $^{\circ}$ C in the presence of 0.01% (w/v) sodium azide to prevent ligand internalization. Cells were washed three times by centrifugation at 180 g for 7 min with 1 ml of RPMI, resuspended in 0.5 ml of PBS and bound radioactivity was measured. Non-specific binding measured in the presence of a 100-fold molar excess of unlabelled hLf was typically around 25% of the total binding and was subtracted from the total binding to obtain the specific binding. All binding experiments were performed in duplicate on two or three separate occasions. Binding parameters (K_d and number of binding sites per cell; means \pm S.E.M.) were calculated by Scatchard plot analysis [33] with the Enzfitter program software 1.05 (BioSoft).

RESULTS

Preparation of N-terminally deleted hLf variants

We have previously noted that several preparations of milk-derived hLf from various commercial suppliers contained hLf species lacking three (Gly¹-Arg²-Arg³) or two (Gly¹-Arg²) N-terminal residues that eluted from a Mono S cation-exchange column at 0.5 and 0.6 M NaCl respectively [17]. We speculated that these N-terminally deleted hLf species would be useful in determining the role of the consecutive N-terminal arginine residues in hLf function. To obtain large amounts of N-terminally deleted hLf, we studied limited proteolysis of hLf by trypsin. Tryptic proteolysis of native hLf was stopped after various incubation periods by the addition of excess soybean trypsin inhibitor, and N-terminal integrity was assessed by analytical Mono S chromatography [17] and N-terminal protein sequencing. Table 1 shows that after 1 min of incubation with trypsin, all hLf molecules had been N-terminally cleaved: 20% and 80% of the hLf molecules lacked residues Gly¹-Arg²-Arg³ or Gly¹-Arg² respectively. After 3 h, 2%, 49% and 42% of the hLf molecules lacked residues Gly¹-Arg²-Arg³-Arg⁴ (designated

Table 1 Relative amounts of N-terminally deleted hLf variants obtained after limited tryptic proteolysis of native hLf

Native hLf was incubated with trypsin as described. Digestion was stopped by the addition of a 12-fold molar excess of soybean trypsin inhibitor and N-terminal integrity was assessed by analytical Mono S chromatography [17]. Digested hLf was applied to Mono S in buffer A. Bound protein was eluted with a linear salt gradient of 0–1.0 M NaCl in 30 ml of buffer A at a flow rate of 1.0 ml/min. Eluted protein was detected by absorbance measurement at 280 nm. N-terminal protein sequence analysis of hLf eluted at 0.7, 0.6, 0.5 and 0.4 M NaCl indicated these to represent native hLf, hLf^{-2N}, hLf^{-3N} and hLf^{-4N} respectively. Relative amounts (percentages) were calculated by integrating peak areas.

Time (min)	Relative amount (%) of total hLf			
	hLf ^{-4N}	hLf ^{-3N}	hLf ^{-2N}	Intact hLf
0	0	0	0	100
1	0	20	80	0
5	0	22	78	0
25	1	28	70	0
180	2	49	42	0

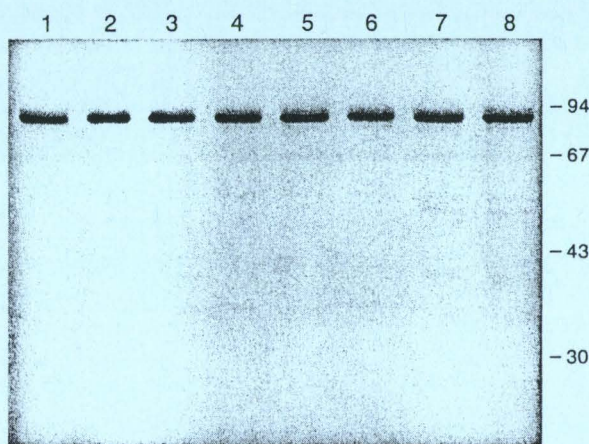


Figure 1 Reduced SDS/PAGE analysis of purified N-terminally deleted hLf variants

Native hLf was incubated with trypsin at an 8:1 molar ratio in PBS at 37 $^{\circ}$ C. At several time points, samples were taken in which further proteolysis was stopped by the addition of a 12-fold molar excess of soybean trypsin inhibitor. The samples were then applied to Mono S chromatography. SDS/PAGE analysis [12.5% (w/v) gel] of hLf treated with trypsin for 1, 5, 25 and 180 min that was eluted from Mono S at 0.6 M NaCl (hLf^{-2N}) is shown in lanes 1, 3, 5 and 7 respectively, whereas that of hLf eluted at 0.5 M NaCl (hLf^{-3N}) is shown in lanes 2, 4, 6 and 8 respectively. All lanes contained 5 μ g of protein. The positions of protein molecular mass standards are indicated at the right, in kDa. Similar results were obtained with non-reduced SDS/PAGE analysis of the samples (results not shown).

hLf^{-4N}), Gly¹-Arg²-Arg³ (designated hLf^{-3N}) and Gly¹-Arg² (designated hLf^{-2N}) respectively.

Tryptic cleavage of hLf at Lys²⁸³ results in the major N- and C-terminal fragments of molecular masses 39 and 51 kDa [34]. Non-reduced SDS/PAGE analysis of non-reduced samples of hLf^{-2N} and hLf^{-3N} isolated after digestion for 1 and 5 min revealed no 39 or 51 kDa fragments, whereas such cleavage had occurred in approx. 1% and 5% of the N-terminally deleted hLf variants after 25 and 180 min respectively (Figure 1). These results indicate that tryptic proteolysis at Arg² and Arg³ occurs before cleavage at Lys²⁸³.

Preparation of rhLf^{-5N}

We observed that cleavage at Arg⁵ did not occur on limited treatment of hLf with trypsin. Therefore we produced Sf9 cells secreting rhLf^{-5N}. Cell culture medium containing rhLf^{-5N} at levels up to 8 mg/ml was loaded on an SP-Sepharose Fast Flow column and rhLf^{-5N} was eluted as a single peak at 0.4 M NaCl. The protein migrated as a single 78 kDa band on SDS/PAGE. The N-terminus of rhLf^{-5N} (Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val) was confirmed by N-terminal protein sequencing.

Binding of native Lf and N-terminally deleted hLf species to Jurkat cells

To delineate the role of Arg²-Arg³-Arg⁴-Arg⁵ (first basic cluster) of hLf in the binding to Jurkat human lymphoblastic T-cells, we studied the binding of 125 I-labelled native hLf and N-terminally deleted hLf species at concentrations ranging from 0 to 80 nM. Figure 2 shows that the binding of all hLf species was concentration-dependent and saturable with a single class of binding sites. Moreover, binding of all proteins was inhibited by approx. 75% in the presence of a 100-fold molar excess of unlabelled hLf, suggesting that the binding was reversible and

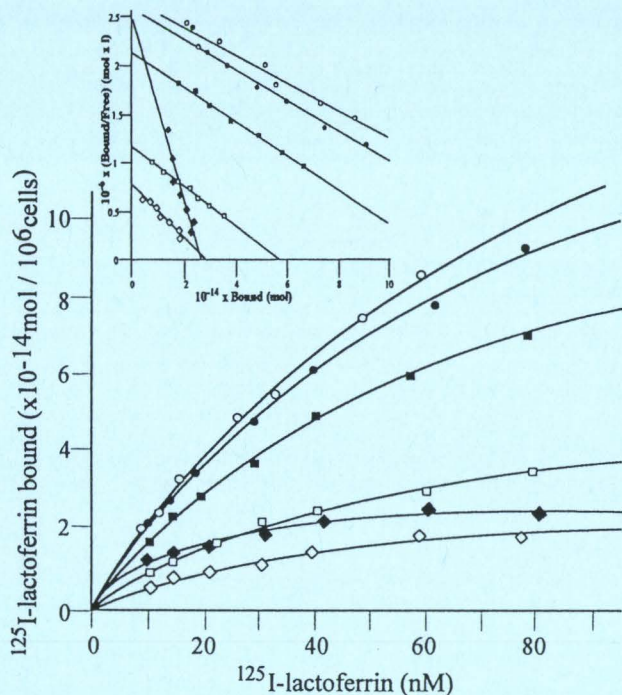


Figure 2 Binding of N-terminally deleted hLf variants to Jurkat cells

Curves show the specific binding of hLf (●); rhLf (○); hLf^{-2N} (■); hLf^{-3N} (□); hLf^{-4N} (◇) and rhLf^{-5N} (◆). Values are means of two or three separate experiments conducted in duplicate. Errors were less than 15% of the mean. The inset shows a Scatchard analysis [33] of the data.

Table 2 Dissociation constants (K_d) and numbers of binding sites per Jurkat cell for N-terminally deleted hLf variants

Values are means \pm S.E.M. for two or three separate experiments conducted in duplicate.

Protein	K_d (nM)	Number of sites per cell
hLf	69 \pm 8	102 000 \pm 19 500
rhLf	81 \pm 9	117 100 \pm 12 300
hLf ^{-2N}	65 \pm 18	75 000 \pm 11 000
hLf ^{-3N}	57 \pm 7	35 600 \pm 8 500
hLf ^{-4N}	41 \pm 9	17 500 \pm 8 000
hLf ^{-5N}	12 \pm 5	16 500 \pm 5 000

Table 3 Dissociation constants (K_d) and numbers of binding sites per Jurkat cell for hLf, bLf and mLf

Values are means \pm S.E.M. for two or three separate experiments conducted in duplicate.

Protein	K_d (nM)	Number of sites per cell
hLf	53 \pm 15	106 700 \pm 5 800
bLf	65 \pm 7	97 900 \pm 12 000
mLf	31 \pm 7	7 800 \pm 2 500

specific. Scatchard analysis revealed that, in the range of hLf concentrations used, the affinity of N-terminally deleted hLf was significantly increased when compared with N-terminally intact hLf (Table 2). K_d shifted from 69 or 81 nM for hLf or rhLf to 65,

Table 4 Dissociation constants (K_d) and numbers of binding sites per cell of native hLf and N-terminally deleted hLf variants with Jurkat cells cultured with sodium chlorate

Values are means \pm S.E.M. for two or three separate experiments conducted in duplicate.

Protein	Sodium chlorate	K_d (nM)	Number of sites per cell
hLf	—	71 \pm 5	102 000 \pm 8 600
hLf	+	62 \pm 11	62 450 \pm 9 600
hLf ^{-3N}	+	57 \pm 16	21 100 \pm 3 400
hLf ^{-5N}	+	28 \pm 6	20 700 \pm 1 800

57 and 41 nM for hLf^{-2N}, hLf^{-3N} and hLf^{-4N} respectively. The highest affinity (K_d 12.4 nM) was observed with rhLf^{-5N}. In addition we found that the number of binding sites per cell decreased from 102 000 for N-terminally intact hLf to 17 000 for both hLf^{-4N} and rhLf^{-5N} (Table 2). hLf^{-2N} and hLf^{-3N} bound to approx. 75 000 and 36 000 binding sites respectively. These results suggest that the binding of hLf to approx. 80 000 binding sites on Jurkat cells depends on the presence of Gly¹-Arg²-Arg³-Arg⁴.

To assess the species specificity of Lf-Jurkat cell interactions, we compared the binding of hLf with that of bLf and mLf. Table 3 shows that the binding parameters of bLf did not significantly differ from those of hLf; K_d and the number of binding sites were approx. 60 nM and 100 000 sites per cell for both Lf species. In contrast, mLf bound to about 8 000 binding sites per cell (Table 3) with a K_d of 30 nM, which is close to the values obtained with hLf^{-4N} and rhLf^{-5N} (Table 2).

Effect of sodium chlorate treatment on the binding of hLf species to Jurkat cells

To evaluate to what extent the binding of hLf to Jurkat cells is determined by sulphated glycosaminoglycans (GAGs) such as heparan sulphate, dermatan sulphate or chondroitin sulphate, we pretreated the cells with sodium chlorate. Chlorate inhibits ATP sulphurylase and hence the production of phospho-adenosine phosphosulphate, the active sulphate donor for sulpho-transferases. Chlorate has been shown to inhibit sulphation of carbohydrate residues on intact cells without interfering with cell growth or protein synthesis [29]. Culturing Jurkat cells in the presence of sodium chlorate altered neither their growth rate nor their morphology. Table 4 shows that chlorate treatment of Jurkat cells decreased the number of binding sites for native hLf from 102 000 to 62 000 per cell, whereas the K_d was decreased slightly from 71 to 62 nM. Depletion of cell-associated sulphate groups resulted in approx. 21 000 binding sites for hLf^{-3N} and rhLf^{-5N} with K_d values of 57 and 28 nM respectively (Table 4). This number of binding sites is very close to that found in untreated cells for both hLf^{-4N} and rhLf^{-5N} (approx. 17 000 sites per cell; Table 2). The chlorate treatment decreased the number of binding sites for hLf^{-3N} from 36 000 to 21 000 (Table 4), but did not affect the number of sites for rhLf^{-5N}. This suggests that hLf^{-3N}, but not rhLf^{-5N}, is still able to interact with sulphated groups exposed on the cell surface of untreated Jurkat cells.

DISCUSSION

In the present paper we show the role of Arg²-Arg³-Arg⁴-Arg⁵ of hLf in the binding of this protein to the lymphoblastic cell line Jurkat.

We have previously reported the purification and partial characterization of an hLf-specific receptor expressed in

phytohaemagglutinin-stimulated human lymphocytes [9]. Recently we identified a similar lactoferrin receptor on Jurkat cells [26]. First attempts to delineate the binding site of hLf for the lymphocyte receptor suggested that residues 28–34 and 39–42 were involved in hLf–receptor interactions [22]. Quantitative studies of structure–affinity relationships and comparative molecular field analysis of residues 4–52 confirmed the existence of two large regions involved in hLf–Jurkat cell interactions [35]. A striking structural feature of the first 50 residues of hLf, when compared with lactoferrin and transferrin of other species, is the basic cluster Arg²-Arg³-Arg⁴-Arg⁵. To our knowledge, no systematic study has as yet been made of the role of consecutive Arg residues in the first basic cluster in hLf–receptor interactions.

Here we describe limited tryptic proteolysis of native hLf yielding N-terminally deleted hLf variants lacking Gly¹-Arg², Gly¹-Arg²-Arg³ or Gly¹-Arg²-Arg³-Arg⁴. N-terminally deleted hLf variants were previously noted in purified hLf from milk from various suppliers [17]. Tryptic cleavage at Arg³ has been observed on preparing the 39 kDa N-terminal and 51 kDa C-terminal tryptic fragments of hLf (residues 4–283 and 284–692 respectively) [34]. The results in Table 1 suggest that cleavage at Arg² occurs before cleavage at Arg³. Subsequent cleavage of the peptide bond after Arg⁴, yielding hLf^{-4N}, occurs at a much slower rate. SDS/PAGE analysis showed that, under the mild hydrolysis conditions used, proteolysis had occurred almost solely at the N-terminus. Tryptic proteolysis at Lys²⁸³ was noted in less than 5% of total hLf molecules after 3 h of digestion, whereas all molecules lacked at least two N-terminal residues. These results clearly demonstrate that tryptic proteolysis of the N-terminus occurs before cleavage at the subsequent major cleavage site at Lys²⁸³. We were not able to remove the entire first basic cluster by limited tryptic proteolysis of hLf. Therefore an rhLf mutant lacking residues 1–5 has been produced in Baculovirus-infected insect Sf-9 cells.

The binding parameters of native hLf to Jurkat cells were close to those previously described [26], whereas subsequent removal of the N-terminal arginine residues progressively decreased the number of the binding sites per cell, while slightly increasing the binding affinity. These results indicate that Arg², Arg³ and, to a smaller extent, Arg⁴ of hLf contribute to the binding of hLf to approx. 80% of the total number of binding sites. Removal of the Gly¹-Arg²-Arg³-Arg⁴-Arg⁵ portion from hLf increased the affinity of hLf approx. 6-fold for a residual number of 20000 binding sites (Table 2), presumably representing the Lf-specific receptor. Comparison of the K_d of hLf^{-4N} with that of rhLf^{-5N} suggests that Arg⁵ sterically hinders interaction of the hLf lymphocytic receptor with the second basic cluster, Arg²⁸-Lys²⁹-Val³⁰-Arg³¹, a region that we previously identified as part of the hLf receptor-binding site [22]. The X-ray crystallographic data of hLf does indeed indicate that Arg⁵ is linked to the protein core through a hydrogen bond (results not shown). Arg⁵ is thus probably involved more in the structural integrity of hLf than in the interactions of hLf with other molecules. This might also explain why Arg⁵ is not readily released from hLf after treatment with trypsin.

A recent study on fibroblast growth factor activity with chlorate treatment of Jurkat cells, which inhibited sulphation by up to 90%, revealed cell-surface-associated molecules as low-affinity binding sites [36]. Treatment of Jurkat cells with chlorate resulted in a 40% decrease in the total number of binding sites for native hLf, suggesting that at least half of the sites that interact with the first N-terminal basic cluster of hLf include sulphate-containing molecules. Both hLf and bLf are able to interact with anionic cell-surface molecules such as proteoglycans or GAGs [13,14,27]. Moreover, hLf can be purified on heparin-

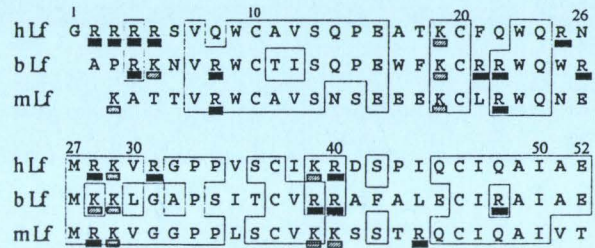


Figure 3 N-terminal protein sequence alignment of hLf, bLf and mLf

Identical amino acids between hLf [18,19], bLf [20] and mLf [21] are boxed. Arg and Lys residues are underlined with black and hatched blocks respectively. The numbering of the sequence is in accordance with [19].

Sepharose [37] and the binding of this protein to sulphated GAGs has been characterized [13,14]. A recent study on the binding of synthetic peptides comprising the first 33 residues of hLf to GAGs suggested that Gly¹-Arg²-Arg³-Arg⁴-Arg⁵-Ser⁶ acts synergistically with the second basic cluster, Arg²⁸-Lys²⁹-Val³⁰-Arg³¹ [13], through the formation of a 'cationic cradle'. Wu et al. [14] proposed that a structural motif formed by residue Arg⁵ only together with residues Arg²⁵, Arg²⁸, Arg²⁹ and Arg³¹ represents the GAG-binding domain. Our results suggest that Arg², Arg³ and Arg⁴ but not Arg⁵ contribute to the binding of hLf to proteoglycans on Jurkat cells.

The N-terminal cluster of four consecutive arginine residues is unique for hLf (Figure 3) [18]. Nevertheless the binding of bLf and hLf to Jurkat cells was comparable. mLf displayed relatively high-affinity binding to a much smaller number of binding sites (approx. 8000 per cell), which resembles the binding parameters of hLf^{-4N} and rhLf^{-5N}. This suggests that, in contrast with hLf and bLf, mLf does not interact with the sulphated molecules on the Jurkat cells but only with the lymphocyte receptor. The N-terminus of mLf contains a single basic residue (lysine) at position 1 (Figure 3) and lacks a pair of basic residues at the position homologous with Arg⁴ and Arg⁵ in hLf. The similar binding of both Lf species to Jurkat cells indicates that other basic residues in the N-terminus of bLf contribute to proteoglycan binding. In terms of basic residues, both hLf and bLf contain nine basic amino acids at different positions between residues 1–37, whereas mLf contains only six basic residues. Moreover, mLf possesses four negatively charged Glu residues in the 1–37 region instead of one in hLf and bLf.

In conclusion, our results indicate that Arg²-Arg³-Arg⁴ of hLf participates in the binding of the protein to lymphocytes. Arg²-Arg³-Arg⁴, but not Arg⁵, interacts with approx. 80000 binding sites, which include sulphated cell-surface molecules. Only approx. 20000 binding sites are likely to correspond to the hLf lymphocyte receptor that we have previously characterized [9]. Binding of hLf to these binding sites does not require the presence of the first basic cluster. In view of these results one could expect that native hLf has no preferential binding to its receptor but interacts mainly with sulphated molecules on T-lymphocytes. Cell surface proteoglycans often bind biologically active molecules such as growth factors, then sequester and present them to specific receptors or modulate their activity. It was previously shown that proteoglycans modulate Lf uptake by the liver by modifying the internalization of lactoferrin into rat hepatocytes via the lipoprotein remnant receptor [27]. One could hypothesize that native hLf is bound by sulphated molecules for further presentation to the hLf lymphocyte receptor. In that process, hLf bound by sulphated molecules might be N-terminally

degraded by membrane proteases or by extracellular proteases present in secretions or released during inflammation, thus leading to preferential binding of the protein to its receptor. As a matter of fact, our proteolysis experiments *in vitro* indicate that degradation of the N-terminus of hLf can readily be achieved *in vivo*. This hypothesis has to be investigated further. The quantitative preparation of N-terminally deleted hLf variants, described here, offers the opportunity to gain further insight into the biological role of different binding sites expressed at the cell surface.

We thank Professor A. Tartar and Dr. H. Drobecq (Pasteur Institute, Lille) for the determination of the N-terminal sequence, Miss I. Duthille for culturing Jurkat cells, Miss N. Branza for participating to site-directed mutagenesis of hLf cDNA, and Mrs. M. Benaïssa for technical assistance. This work was supported by the Université des Sciences et Technologies de Lille I, the Centre National de la Recherche Scientifique (U.M.R. du CNRS n° 111; Director Professor A. Verbert) and the Ministère de l'Éducation Nationale.

REFERENCES

- Montreuil, J., Tonnelat, J. and Mullet, S. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 413–421
- Masson, P. L., Heremans, J. F. and Dive, C. H. (1966) *Clin. Chim. Acta* **14**, 735–739
- Masson, P. L., Heremans, J. F. and Schöner, E. (1969) *J. Exp. Med.* **130**, 643–658
- Mikogami, T., Heyman, M., Spik, G. and Desjeux, J. F. (1994) *Am. J. Physiol.* **267**, G308–G315
- Rochard, E., Legrand, D., Lecocq, M., Hammelin, R., Crépin, M., Montreuil, J. and Spik, G. (1992) *Anticancer Res.* **1**, 2047–2052
- McAbee, D. D. and Esbensen, K. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 23624–23631
- Ziere, G. J., van Dijk, M. C. M., Bijsterbosch, M. K. and van Berkel, T. J. C. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 11229–11235
- Birgens, H. S., Karle, H., Hansen, N. E. and Kristensen, L. (1984) *Scand. J. Haematol.* **33**, 275–280
- Mazurier, J., Legrand, D., Hu, W. L., Montreuil, J. and Spik, G. (1989) *Eur. J. Biochem.* **179**, 481–487
- Leveugle, B., Mazurier, J., Legrand, D., Mazurier, C., Montreuil, J. and Spik, G. (1993) *Eur. J. Biochem.* **213**, 1205–1211
- Appelmek, B. J., An, Y. Q., Geerts, M., Thijs, B. G., de Boer, H. A., MacLaren, D. M., de Graaff, J. and Nuijens, J. H. (1994) *Infect. Immun.* **62**, 2628–2632
- Elass-Rochard, E., Roseanu, A., Legrand, D., Trif, M., Salmon, V., Motas, C., Montreuil, J. and Spik, G. (1995) *Biochem. J.* **312**, 839–845
- Mann, D. M., Romm, E. and Migliorini, M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 23661–23667
- Wu, H. F., Monroe, D. M. and Church, F. C. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* **317**, 85–92
- Hutchens, T. W., Henry, J. F. and Yip, T. T. (1991) *Pediatr. Res.* **29**, 243–250
- Jorieux, S., Mazurier, J., Montreuil, J. and Spik, G. (1985) *Prot. Biol. Fluids* **32**, 115–118
- van Berkel, P. H. C., Geerts, M. E., van Veen, H. A., Kooiman, P. M., Pieper, F. R., de Boer, H. A. and Nuijens, J. H. (1995) *Biochem. J.* **312**, 107–114
- Metz-Boutigue, M. H., Jollès, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J. and Jollès, P. (1984) *Eur. J. Biochem.* **145**, 659–676
- Rey, M. W., Woloshuk, S. L., de Boer, H. A. and Pieper, F. R. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 5288
- Pierce, A., Colavizza, D., Benaïssa, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J. and Spik, G. (1991) *Eur. J. Biochem.* **196**, 177–184
- Pentecost, B. T. and Teng, C. T. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 10134–10139
- Legrand, D., Mazurier, J., Elass, A., Rochard, E., Vergoten, G., Maes, P., Montreuil, J. and Spik, G. (1992) *Biochemistry* **31**, 9243–9251
- Zimecki, M., Mazurier, J., Machnicki, M., Wieczorek, Z., Montreuil, J. and Spik, G. (1991) *Immunol. Lett.* **30**, 377–382
- Slater, K. and Fletcher, J. (1987) *Blood* **69**, 1328–1333
- Djehe, A. and Brock, J. H. (1992) *Br. J. Haematol.* **80**, 235–241
- Bi, B. Y., Liu, J. L., Legrand, D., Roche, A. C., Capron, M., Spik, G. and Mazurier, J. (1996) *Eur. J. Cell Biol.* **69**, 288–296
- Ziere, G. J., Kruij, J. K., Bijsterbosch, M. K. and van Berkel, T. J. C. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 27069–27075
- Huettinger, M., Retzek, H., Hermann, M. and Goldenberg, H. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 18551–18557
- Keller, K. M., Brauer, P. R. and Keller, J. M. (1989) *Biochemistry* **28**, 8100–8107
- Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dorland, L., van Halbeek, H. and Vliegenthart, J. F. G. (1982) *Eur. J. Biochem.* **121**, 413–419
- Salmon, V., Legrand, D., Georges, B., Slomianny, M.-C., Coddeville, B. and Spik, G. (1997) *Protein Express. Purif.* **9**, 203–210
- Legrand, D., Salmon, V., Coddeville, B., Benaïssa, M., Plancke, Y. and Spik, G. (1995) *FEBS Lett.* **365**, 57–60
- Scatchard, G. (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**, 660–672
- Legrand, D., Mazurier, J., Metz-Boutigue, M. H., Jollès, J., Jollès, P., Montreuil, J. and Spik, G. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **787**, 90–96
- Elass, A., Vergoten, G., Legrand, D., Elass-Rochard, E., Mazurier, J. and Spik, G. (1996) *Quant. Struct.-Act. Relat.* **15**, 102–107
- Miao, H. Q., Ishai, R., Alzmon, R., Peretz, T. and Vlodaysky, I. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 4879–4886
- Blackberg, L. and Hernel, O. (1980) *FEBS Lett.* **109**, 180–183

b- Résultats

Les expériences de fixation ont été réalisées avec des concentrations en lactoferrine allant de 0 à 80 nM. Comme le montre la figure 26, la fixation de la lactoferrine non-mutée est réversible et spécifique. La fixation non-spécifique, mesurée en présence d'une concentration de 100 excès molaire de lactoferrine froide, est d'environ 25%.

Les résultats obtenus montrent que la première région basique (résidus d'acides aminés 1 à 5) contribue à la fixation d'environ 80 % du nombre total de sites de fixation de la lactoferrine sur les cellules Jurkat. La délétion de cette région entraîne, comme le montre la fixation de la protéine hLf-G4R, une augmentation de l'affinité d'environ 6 fois (Kd passant de 70 à 12 nM), alors que le nombre de sites chute de 110.000 à 20.000 sites (tableau IV, Fig. 26). Il faut noter que la protéine hLf^{4N} se fixe également sur ces 20.000 sites, mais avec une affinité moindre que la hLf-G4R (41 nM). Nous pouvons donc présumer que l'Arg⁵ n'intervient pas dans la fixation sur les 80% des sites qui reconnaissent principalement les Arg², Arg³, Arg⁴. D'autre part, nous pouvons conclure que les 20.000 sites fixant encore la hLf-G4R représentent les récepteurs spécifiques de la lactoferrine, sur lesquels les Arg², Arg³ et Arg⁴ n'interviennent pas. Etant donné l'augmentation de l'affinité lorsque l'on supprime le résidu d'Arg⁵, il semble que celui-ci soit impliqué dans des interactions avec des acides aminés du site de liaison au récepteur spécifique, en particulier en masquant partiellement le site d'interaction.

Les nombreux travaux suggérant une fixation de la lactoferrine sur des protéoglycannes nous laissaient supposer que les sites représentant 80 % des sites totaux pouvaient être de cette nature. Le traitement des cellules au chlorate de sodium, qui inhibe en grande partie, la sulfatation des molécules, entraîne une diminution de 40% du nombre total de sites de fixation, et montre qu'au moins la moitié des sites qui interagissent avec la première région basique renferme des molécules sulfatées (Tableau V).

En résumé, cet article démontre l'importance des Arg², Arg³, et Arg⁴ dans la fixation de la lactoferrine humaine aux protéoglycannes des cellules Jurkat, alors qu'il semble que l'Arg⁵ diminue l'affinité de la hLf pour son récepteur spécifique.

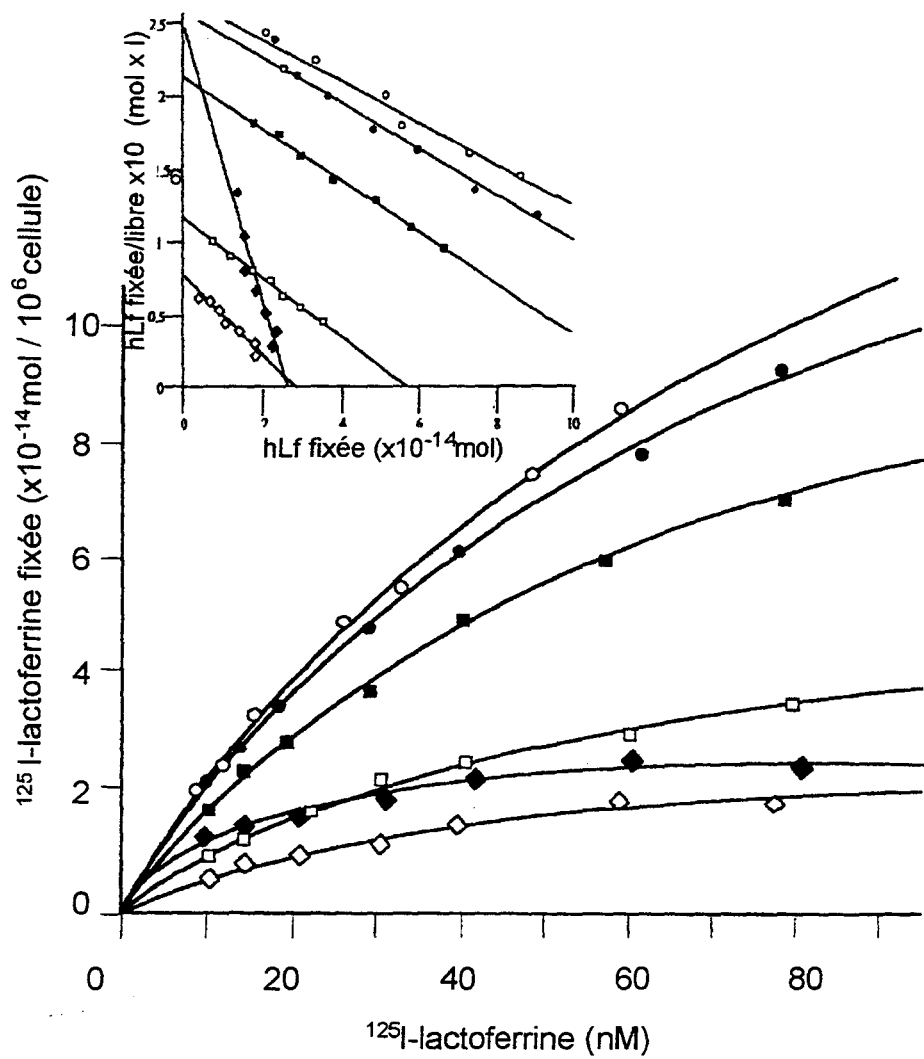


Fig. 26 : Fixations spécifiques des hLf du lait (●), rhLf (○), hLf^{-2N}(■), hLf^{-3N}(□), hLf^{-4N}(◆) et hLf-G4R (◇) aux cellules lymphoblastiques T Jurkat

Tableau IV : Constantes de dissociation (Kd)
et nombres de sites par cellule Jurkat
des hLfs délétées au niveau de leur séquence N-terminale

Protéines	Kd (nM)	Nombre de sites/cellule
hLf	69 ± 9	102 000 ± 19 500
rhLf	81 ± 9	117 000 ± 12 000
hLf ^{-2N}	65 ± 18	75 000 ± 11 000
hLf ^{-3N}	57 ± 7	35 600 ± 8 500
hLf ^{-4N}	41 ± 9	17 500 ± 8 000
hLf-G4R	12 ± 5	16 500 ± 5000

Tableau V : Constantes de dissociation (Kd) et nombres de sites
par cellule Jurkat traitée au chlorate de sodium
des différentes lactoferrines délétées au niveau de leur N-terminal

Protéines	NaClO ₃	Kd (nM)	Nombre de sites/cellule
hLf	-	71 ± 5	102 000 ± 8 600
hLf	+	62 ± 11	62 450 ± 9 600
hLf ^{-3N}	+	57 ± 16	21 450 ± 3 400
hLf-G4R	+	28 ± 6	20 700 ± 1 800

Les expériences ont été réalisées avec des lactoferrines issues d'une protéolyse trypsique ménagée de la lactoferrine humaine. Les hLf^{2N}, hLf^{3N}, hLf^{4N} ont été obtenues dès les premières minutes d'hydrolyse, alors que le reste de la molécule, et en particulier la liaison de l'Arg⁵ à la Ser⁶ sont très résistants à la protéolyse. Ceci suggère que cette dégradation protéolytique extrêmement rapide pourrait avoir une signification physiologique. En effet, une telle hydrolyse pourrait se produire au niveau des cellules et éventuellement au niveau des sites de fixation de basse affinité, ce qui aurait pour effet de permettre à la lactoferrine de se fixer préférentiellement sur ces récepteurs spécifiques.

2 ~ Rôle des régions 28-34 et 39-42 dans les interactions

Les conditions de fixation aux cellules Jurkat ont été identiques à celles employées pour l'étude du rôle de la région 1-5 de la lactoferrine.

Les fixations comparées de la hLf-Loop et de la rhLf non mutée montrent des différences importantes (Fig. 27 ; Tableau VI). En effet, à l'inverse de hLf-G4R, la protéine hLf-Loop se fixe sur les cellules avec une affinité significativement plus basse. Ainsi, les études de Scatchard permettent de calculer un Kd de 246 nM, avec un nombre de sites sensiblement plus bas (103.000 au lieu de 117.000 sites par cellule pour la protéine native). Ceci suggère que les résidus 28 à 34 sont, du moins en partie, responsables de la fixation sur des sites spécifiques de plus haute affinité. La fixation sur ces sites représenterait environ 15 % de la fixation totale, ce qui corrobore les résultats obtenus avec la protéine G4R, qui permettaient de conclure à environ 20.000 récepteurs spécifiques par cellule. Il semblerait néanmoins que la délétion de la boucle 28-34 n'inhibe pas totalement la reconnaissance de la hLf par son récepteur spécifique mais diminue son affinité. Les propriétés de la hLf-G4R/Loop semblent confirmer l'hypothèse précédente. En effet, la hLf-G4R/Loop n'inhibe pas totalement la fixation. Les molécules hLf-G4R/Loop ont une affinité intermédiaire à celles de hLf-G4R et de hLf-Loop (avec un Kd de 204 nM) tout comme le nombre de sites (20500 sites par cellule).

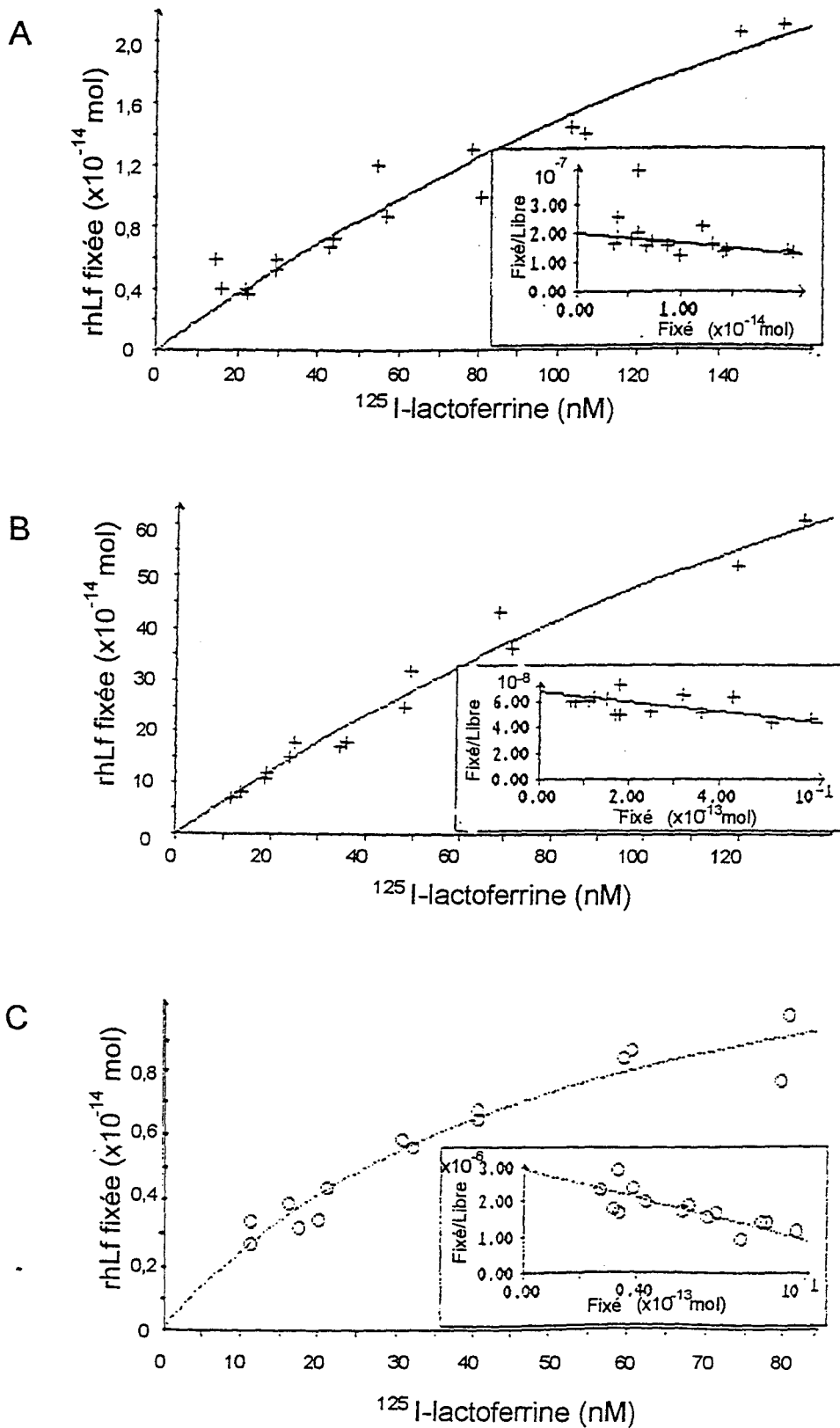


Fig. 27 : Courbes de fixation spécifique des protéines hLf-Loop (A) hLf-G4R/Loop (B) et hLf-SAST (C) sur les cellules lymphoblastiques T Jurkat

Tableau VI : Constantes de dissociation (Kd) et nombres de sites de fixation par cellule Jurkat des différentes lactoferrines mutées exprimées dans les cellules Sf9

Protéines	Kd (nM)	Nombre de sites/cellule
hLf	69 ± 9	102 000 ± 19 500
rhLf	81 ± 9	117 000 ± 12 000
hLf-SAST	50 ± 11	126 400 ± 12 000
hLf-G4R	12 ± 5	16 500 ± 500
hLfLoop	246 ± 59	103 500 ± 10 000
hLf-G4R/Loop	204 ± 56	20 500 ± 2 400

Ces résultats indiquent que la fixation de la hLf n'est pas uniquement due, d'une part aux 5 premiers résidus pour la fixation de basse affinité et d'autre part à la boucle 28-34 pour la fixation de haute affinité. La fixation de la rhLf est en réalité plus complexe et fait intervenir d'autres acides aminés dans la fixation. Nous avons émis l'hypothèse que ces résidus pouvaient être au niveau de la boucle 39-42. Cette hypothèse a été infirmée par les études de fixation de la protéine hLf-SAST qui possède les mêmes paramètres de fixation que la rhLf.

3 ~ Conclusion

Les paramètres de fixation pour la rhLf non mutée sont très proches de ceux décrits par Bi *et al.* (1996) pour la hLf du lait. Les protéines mutées possèdent des paramètres de fixation très différents de ceux de la rhLf, ce qui démontre l'importance des acides aminés modifiés. Ainsi, la délétion des cinq premiers résidus (hLf-G4R) augmente six fois l'affinité de la hLf, mais diminue le nombre de sites à 20.000 par cellule. Ces sites sont probablement, les récepteurs de haute affinité caractérisés par Bi *et al.* (1996), qui interagissent en grande partie avec la région 28-34, comme le démontrent les fixations de la hLf-Loop, alors que les sites de plus basse affinité reconnaissent la séquence ¹GRRRR⁵. Ces sites de basse affinité seraient de type protéoglycane comme le suggéraient les hypothèses de Wu *et al.* (1995).

B) Interaction de la lactoferrine avec les lipopolysaccharides

1 ~Introduction

L'activité anti-bactérienne de la hLf a été démontrée depuis longtemps (cf revue de Spik et Montreuil, 1983). En effet, cette glycoprotéine est non seulement capable d'exercer une ferriprivation du milieu infecté, mais aussi de destabiliser la membrane externe des bactéries par un mécanisme qui n'est pas encore clairement

élucidé. Il a été démontré en particulier, que la hLf se fixe au lipide A des lipopolysaccharides (LPS) bactériens libérés, les composants majeurs de la membrane externe des bactéries Gram-. La reconnaissance hLf-LPS pourrait également avoir une implication dans les phénomènes inflammatoires, puisque la fixation de la lactoferrine sur les monocytes est inhibée en présence de LPS. Néanmoins, jusqu'à ces dernières années, nous possédions très peu de renseignements concernant la région de la lactoferrine qui interagit avec les LPS. Ellass-Rochard *et al.* (1995) ont déterminé ce site à l'aide d'expériences d'inhibition de fixation de fragments protéolytiques de hLf et également grâce à la hLf mutée hLf-Loop, dont la préparation a été décrite précédemment. Ces travaux ont permis la publication suivante:

Elass-Rochard, E., Roseanu, A., Legrand, D., Trif, M., **Salmon, V.**, Motas, C., Montreuil, J. and Spik, G. (1995) Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction : involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to *Escherichia coli* 055B5 lipopolysaccharide. *Biochem. J.* **312** : 839-845

2 ~ Résultats et conclusion

Alors que la fixation de la hLf sur le lipide A des LPS avait précédemment été décrite (Appelmelk *et al.*, 1994), Ellass-Rochard *et al.* ont, pour la première fois, mis en évidence deux classes de sites de fixation aux LPS d'*E coli* 055B5: des sites de haute affinité, d'un Kd de 3,6 nM, et des sites de plus basse affinité, d'un Kd de 390 nM.

Par des fixations compétitives entre la lactoferrine humaine, la lactoferrine bovine (bLf), le fragment N-tryptique (résidus d'acides aminés 4 à 283), le fragment C-tryptique (résidus d'acides aminés 284 à 692), et le glycopeptide N2 (résidus 91 à 255) isolés après hydrolyse de la hLf, il a été démontré que le site de fixation de haute affinité reconnaît la région localisée dans le domaine NI de la hLf, alors que le site de basse affinité fait intervenir le lobe C-terminal. L'inhibition des interactions hLf/LPS par un octadécapeptide correspondant aux résidus 20 à 37 de la hLf, ainsi que par la lactoferrine bovine (acides aminés 17 à 41) ont révélé

Lactoferrin–lipopolysaccharide interaction: involvement of the 28–34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to *Escherichia coli* 055B5 lipopolysaccharide

Elisabeth ELASS-ROCHARD,* Anca ROSEANU,† Dominique LEGRAND,* Mihaela TRIF,† Valérie SALMON,* Cecilia MOTAS,† Jean MONTREUIL* and Geneviève SPIK*‡

*Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du CNRS no. 111, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France and †Institut de Biochimie de l'Académie Roumaine, Splaiul Independentei 296, 77.700 Bucarest 17, Rumania

The ability of lactoferrin (Lf), an iron-binding glycoprotein that is also called lactotransferrin, to bind lipopolysaccharide (LPS) may be relevant to some of its biological properties. A knowledge of the LPS-binding site on Lf may help to explain the mechanism of its involvement in host defence. Our report reveals the presence of two *Escherichia coli* 055B5 LPS-binding sites on human Lf (hLf): a high-affinity binding site (K_d 3.6 ± 1 nM) and a low-affinity binding site (K_d 390 ± 20 nM). Bovine Lf (bLf), which shares about 70% amino acid sequence identity with hLf, exhibits the same behaviour towards LPS. Like hLf, bLf also contains a low- and a high-affinity LPS-binding site. The K_d value (4.5 ± 2 nM) corresponding to the high-affinity binding site is similar to that obtained for hLf. Different LPS-binding sites for human serum transferrin have been suggested, as this protein, which is known to bind bacterial endotoxin, produced only 12%

inhibition of hLf–LPS interaction. Binding and competitive binding experiments performed with the N-tryptic fragment (residues 4–283), the C-tryptic fragment (residues 284–692) and the N2-glycopeptide (residues 91–255) isolated from hLf have demonstrated that the high-affinity binding site is located in the N-terminal domain I of hLf, and the low-affinity binding site is present in the C-terminal lobe. The inhibition of hLf–LPS interaction by a synthetic octadecapeptide corresponding to residues 20–37 of hLf and lactoferricin B (residues 17–41), a proteolytic fragment from bLf, revealed the importance of the 28–34 loop region of hLf and the homologous region of bLf for LPS binding. Direct evidence that this amino acid sequence is involved in the high-affinity binding to LPS was demonstrated by assays carried out with EGS-loop hLf, a recombinant hLf mutated at residues 28–34.

INTRODUCTION

Lactoferrin (Lf), also called lactotransferrin [1,2], is an iron-binding glycoprotein present in most biological fluids of mammals [2,3] and released from neutrophil granules during inflammatory responses [4]. Various biological functions of human Lf (hLf) and bovine Lf (bLf) have been demonstrated in host defence, especially in immunological response [5,6] and antibacterial activity (for reviews see refs. [7,8]). *In vitro* studies on a wide range of Gram-negative micro-organisms suggested two reasons for the antimicrobial property of Lf: (i) the capacity of the protein to induce an iron-deficient environment [9] and (ii) its ability to interact with several components present at the surface of the bacterial membrane [10,11]. With respect to the second reason, it has been shown that hLf can bind to lipopolysaccharide (LPS) [11], a major component of the outer membrane of Gram-negative bacteria. In agreement with these findings, Appelmek et al. [12] found high-affinity binding of hLf to the lipid A region of *Escherichia coli* LPS.

hLf–LPS interactions could also have relevance to the role of Lf in the inflammatory process. Indeed, hLf interacts with specific receptors present on mononuclear cells and regulates cytokine release [13–15]. This biological activity is inhibited in the presence of LPS suggesting that hLf loses the ability to bind to its receptor after hLf–LPS complex-formation [14].

A knowledge of the hLf structure has enabled its binding sites or the lymphocyte receptor to be identified [16–19]. Sequence analyses and crystallographic studies [20–22] have established that the hLf polypeptide chain is folded into two homologous

lobes, one N-terminal (residues 1–333), the other C-terminal (residues 345–692), each being organized into two domains NI, NII and CI, CII respectively. The primary structure of hLf shows about 70% sequence identity with that of bLf and 59% identity with that of human serum transferrin [23]. Three main regions located in the N-terminal domain I of hLf are involved in the hLf receptor-binding site: residues 4–6, 28–34 and 38–45 [19]. Comparison of the primary and tertiary structures of these regions with the homologous sequences of the C-terminal lobe of hLf and the N- and C-terminal lobes of serum transferrin revealed that residues 28–34 and residues 4–6 possess structural features specific to the N-terminal moiety of hLf. The loop region (residues 28–34) is also present in lactoferricin H (residues 1–47) and lactoferricin B (residues 17–41), two peptides derived from partial proteolytic hydrolysis of hLf and bLf respectively [24,25]. Both exhibit more potent antibacterial properties than the native proteins. It has been reported that the antibacterial sequences are precisely located in a loop region corresponding to residues 20–37 of hLf and 19–36 of bLf [24].

Therefore the region containing amino acid residues 28–34 could play an important role not only in hLf binding to its specific receptor but also in its antimicrobial activity. As hLf binds to LPS, the interaction of amino acid sequence 28–34 of the protein with bacterial endotoxin could be suggested.

To check this hypothesis, we have studied the binding of hLf and bLf to *E. coli* 055B5 LPS. As human serum transferrin binds to LPS [26], its ability to inhibit hLf–LPS interaction was also investigated. The domain of the hLf molecule implicated in the endotoxin recognition was specified by binding and competitive

Abbreviations used: LPS, lipopolysaccharide; hLf, human lactoferrin; bLf, bovine lactoferrin; Lf, lactoferrin; rLf, recombinant human lactoferrin.
‡ To whom correspondence should be addressed.

binding assays performed with different hLf fragments: N- (residues 4–283) and C- (residues 284–692) fragments, N2-glycopeptide (residues 91–255) [27,28], a chemically synthesized decapeptide corresponding to residues 20–37 of hLf and diferric B. Further, the hLf amino acid sequence responsible for LPS binding was more precisely defined by binding assays using EGS-loop recombinant hLf (EGS-loop rhLf), a mutated protein in which residues 28–34 of the N-terminal lobe were replaced by the homologous loop of the C-terminal lobe of hLf.

MATERIALS AND METHODS

Materials

hLf was purified from pooled human lactoserum by ion-exchange chromatography as previously described [29]. bLf was kindly provided by Biopole (Brussels, Belgium). Homogeneity of the protein was checked by SDS/PAGE [30]. Iron saturation of Lf was carried out as described elsewhere [31]. Diferric hLf was subjected to mild tryptic hydrolysis to isolate the 30 kDa monoferric N-tryptic fragment (residues 4–283) and the 50 kDa monoferric C-tryptic fragment (residues 284–692) [27,28]. The 30 kDa N2-glycopeptide (residues 91–255), which corresponds to the N-terminal domain II of hLf described by Anderson et al. [28], was prepared from the tryptic hydrolysate of the N-tryptic fragment [28]. These fragments were further purified by gel filtration chromatography on Bio-Gel P-60 for the N- and C-tryptic fragments and Bio-Gel P-30 for the N2-glycopeptide [28]. An octadecapeptide corresponding to the amino acid sequence 20–37 of hLf was chemically synthesized by Dr. Martine (Institut Pasteur, Lille, France). Lactoferricin B, a homologous peptide of hLf present in the N-terminal lobe of bLf (residues 17–41) was a gift from Morinaga Milk Industry Co. (Tokyo, Japan). Lf samples were passed through a Detoxi-Gel column (Pierce Chemicals Co., Rockford, IL, U.S.A.) before use. Contamination of Lfs, tryptic fragments and buffer solutions with less than 50 pg of endotoxin/mg of protein as estimated by *Alus* amoebocyte lysate assays (QCL1000; BioWhittaker, Walkersville, MD, U.S.A.), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29218) in 10 mM phosphate buffered saline (pH 7.3, without Ca^{2+} and Mg^{2+}), BSA recombinant for ELISA experiments and *E. coli* 055B5 LPS were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO, U.S.A.). Iron-saturated human serum transferrin was from Behring (Marburg, Germany). PD10 prepacked Sephadex G-25 M columns were purchased from Pharmacia-LKB Biotechnology (Uppsala, Sweden). Deionized water was used to prepare all buffer solutions.

Construction and purification of recombinant hLf and EGS-loop hLf

A full-length 2.3 kb cDNA coding for hLf was obtained from a human mammary-gland cDNA library (Clontech, Palo Alto, CA, U.S.A.) [32]. rhLf was expressed in BHK cells and purified as previously described [32]. The EGS-loop rhLf was obtained by directed mutagenesis of the cDNA coding sequence of hLf using the Sculptor *in vitro* mutagenesis system kit (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, Bucks., U.K.). This mutated protein corresponds to hLf in which the sequence $^{28}\text{RKVVRGPP}^{34}$ was replaced by the sequence $^{28}\text{EGS}^{367}$, located in the C-terminal lobe counterpart (Figure 1). A mutagenic oligonucleotide, 5'-CAA AGG AAT ATG GAAGGT ICT GTC AGC ATA AAG-3', was synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium) and used to replace nucleotides 433–451 (numbered as described by Rey et al. [21]) by the sequence GAAGGTT. The template for the mutagenesis was the phage M13-mp11 containing a 310 bp *EcoRI*-*AccI* fragment (nucleotides 295–606 coding sequence) obtained from the Lf cDNA cloned into

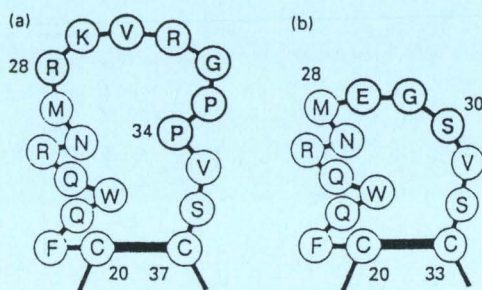


Figure 1 Schematic representation of the loop covering residues 28–34 of hLf

(a) The amino acid sequence of the 20–37 region of hLf N-terminal lobe; (b) residues 20–33 of the rhLf mutant (EGS-loop rhLf) where residues 28–34 of hLf are replaced by residues EGS. Bold letters indicate mutated amino acid residues.

pBluescript SK [32]. The presence of the mutated codons was confirmed by DNA sequence analysis [33] and the mutated *EcoRI*-*AccI* fragment was then ligated back into pBluescript with the 3' complementary part of the full-length cDNA of hLf. The resulting plasmid was then digested with *XbaI* and *HindIII* and the *XbaI*-*HindIII* fragment, made blunt-ended using the Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase I, was subcloned into the *SmaI* site of the expression vector pNUT, generously provided by Dr. R. Palmiter (University of Washington, Seattle, WA, U.S.A.) [34]. Transfection, expression in BHK cells and purification of the recombinant mutated protein were performed as previously described [32]. Both non-modified rhLf and EGS-loop rhLf exhibited only one 80 kDa single protein band similar to that of human milk Lf, as checked by SDS/PAGE (results not shown).

Molecular modelling

The crystallographic data of diferric hLf and bLf were kindly provided by Professor E. N. Baker (Massey University, Palmerston North, New Zealand). Molecular modelling was performed on an Evans and Sutherland PS 350 graphic station and a Vax 6320 host computer using the Sybyl 5.3 molecular modelling package (Sybyl, 1988) (Professor G. Vergoten, CRESIMM, Lille, France). The crystallographic data for rabbit serum transferrin used to compare the three-dimensional structures of hLf and serum transferrin were provided by Professor P. F. Lindley (CCL Daresbury Laboratory, Warrington, Lancs., U.K.).

Radiolabelling of proteins

Iron-saturated hLf and bLf, rhLf and mutated EGS-loop rhLf were labelled in 10 mM PBS, pH 7.4, with 0.2 mCi of Na^{125}I (ICN Biomedical, Orsay, France) in the presence of Iodo-Gen as a catalyst, as previously described [16]. Excess reagent was removed by gel filtration through a Sephadex G-25 PD10 column. Radiolabelling of N-tryptic fragment, C-tryptic fragment and N2-glycopeptide was performed under the same experimental conditions as used for native Lfs. Radioactivity of samples was measured with a compugamma LKB Wallac (Turku, Finland) γ radiocounter, and specific radioactivity was determined.

Binding assays to LPS

Binding experiments to endotoxin were carried out with radiolabelled hLf, bLf and tryptic fragments derived from hLf.

LPS was immobilized as previously described [35]. Briefly, LPS suspensions were sonicated, diluted to 5 µg/ml in PBS and transferred (200 µl) to radioimmunoassay Maxisorp tubes (Nunc, Kamstrup, Denmark). After overnight incubation at 4 °C, tubes were washed twice with PBS, and saturated with 200 µl of 0.1% BSA/0.01% Tween in PBS, for 3 h at 37 °C. The solution was discarded and tubes were washed three times. Radiolabelled Lfs or tryptic fragments (200 µl; concentration ranging from 10 to 500 nM) were added directly to LPS-coated tubes and further incubated overnight at 4 °C. After three washes with PBS, the radioactivity was measured. A control of binding of radiolabelled protein to LPS-free tubes was carried out. Non-specific binding was estimated for each protein concentration by adding a 100-fold molar excess of unlabelled protein in the presence of LPS. Specific binding was defined as the difference between total and non-specific binding of proteins to LPS. The non-specific binding of Lfs and tryptic fragments represented between 18 and 30% of total binding. Similar binding experiments were performed with rhLf and EGS-loop rhLf. The dissociation constants (K_d) were determined by Scatchard-plot analysis [36] using the Enzfitter program software 1.05 (BioSoft).

Competitive binding assays

Inhibition of ^{125}I -hLf binding to LPS by unlabelled hLf, bLf and human serum transferrin was assessed in the presence of a 10–100-fold molar excess of each unlabelled protein. Radioimmunoassay tubes were coated with 5 µg/ml LPS and incubated overnight at 4 °C. The wells were blocked with PBS/0.1% BSA, washed and incubated with 2 µg/ml ^{125}I -hLf overnight at 4 °C in the presence of increasing concentrations of unlabelled proteins. After three washes with PBS, the radioactivity was measured. A control of binding of radiolabelled protein to LPS-free tubes was carried out. Similar competitive experiments were performed between 2 µg/ml ^{125}I -hLf and a 10–100-fold molar excess of unlabelled N- and C-tryptic fragments, N2-glycopeptide, synthetic octadecapeptide, lactoferricin B, rhLf and EGS-loop rhLf.

RESULTS

Interactions of hLf and bLf with LPS

Specific binding of hLf to immobilized *E. coli* 055B5 LPS was found to be concentration-dependent and saturable at about 450 nM (Figure 2). Scatchard-plot analysis revealed the presence of two binding sites: (i) a high-affinity binding site with a K_d of 3.6 ± 1 nM; (ii) a low-affinity binding site with a K_d of 390 ± 20 nM (Table 1).

As reported for hLf, bLf also exhibits concentration-dependent and saturable binding to LPS (Figure 2). According to Scatchard analysis, two binding sites were found for bLf: (i) a high-affinity binding site with a K_d of 4.5 ± 2 nM, similar to the corresponding site of hLf; (ii) a low-affinity binding site with a lower K_d (576 ± 30 nM) (Table 1).

The specificity of the ^{125}I -hLf binding to LPS was checked in competitive studies with increasing concentrations of unlabelled hLf, bLf or human serum transferrin. As shown in Figure 3, the interaction of hLf with LPS was $76 \pm 4\%$ inhibited by a 100-fold molar excess of unlabelled hLf, suggesting specific binding. At the same concentration, bLf inhibited the binding of ^{125}I -hLf to LPS with an effectiveness similar to that of unlabelled human protein, $69 \pm 3\%$. We have also investigated whether human serum transferrin, a protein closely related in structure to hLf, could inhibit these interactions. Our results revealed that human serum transferrin did not prevent LPS binding to hLf, no more than $12 \pm 3\%$ inhibition being detected (Figure 3). These

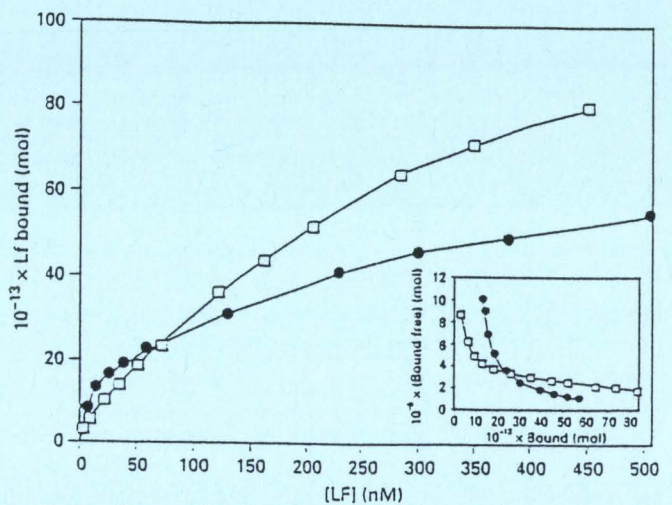


Figure 2 Specific binding of ^{125}I -hLf and ^{125}I -bLf to *E. coli* 055B5 LPS

Immobilized LPS was incubated with various concentrations of ^{125}I -hLf (●) and ^{125}I -bLf (□) at 4 °C as described in the Materials and methods section. Non-specific binding was measured in the presence of a 100-fold molar excess of unlabelled Lf and was subtracted from total binding to obtain specific binding. The inset displays data replotted by Scatchard-plot analysis. The results are typical of three separate experiments.

Table 1 Binding parameters of hLf, bLf, rhLf, EGS-loop rhLf and proteolytic fragments derived from hLf to *E. coli* 055B5 LPS

Results are means \pm S.E.M.

Proteins	K_d (nM)	
	High-affinity binding site	Low-affinity binding site
hLf	3.6 ± 1	390 ± 20
bLf	4.5 ± 2	576 ± 30
hLf N-tryptic fragment	13 ± 3	Not measurable
hLf C-tryptic fragment	Not present	580 ± 30
rhLf	7.6 ± 1	650 ± 20
EGS-loop rhLf	Not present	220 ± 14

findings suggest different LPS-binding sites for Lfs and human serum transferrin.

Interactions of tryptic fragments isolated from hLf with LPS

In order to define the region involved in the interaction with LPS, hLf was submitted to partial proteolytic hydrolysis and binding of the resulting fragments to LPS was investigated (Figure 4). At a low concentration, the N-tryptic fragment bound specifically to LPS with high affinity (K_d 13 ± 3 nM), close to that of hLf (Table 1). At a concentration above 150 nM, the binding of the N-tryptic fragment to endotoxin was not saturable and measurable. In contrast, binding of the C-tryptic fragment to LPS was about 2-fold lower than that of native hLf. Only a low-affinity binding site was detected with a K_d of 580 ± 30 nM. Moreover, the binding of N2-glycopeptide to LPS was not saturable and represented only $15 \pm 3\%$ of hLf binding.

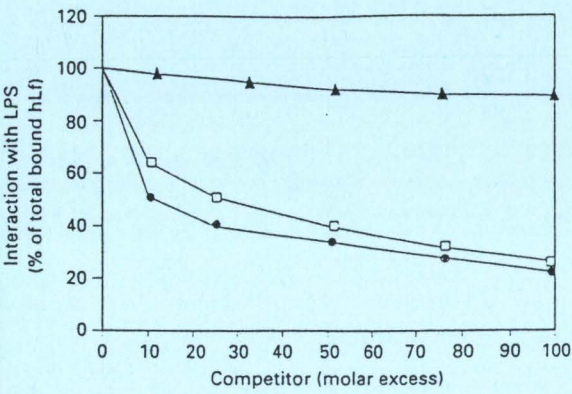


Figure 3 Inhibition of ^{125}I -hLf binding to LPS by unlabelled hLf, bLf and human serum transferrin

Competitive experiments for LPS binding were performed with $2\ \mu\text{g/ml}$ ^{125}I -hLf, in the presence of a 10–100-fold molar excess of unlabelled hLf (●), bLf (□) or human serum transferrin (▲). The results were calculated from three separate experiments and are expressed as a percentage of total ^{125}I -hLf bound to LPS.

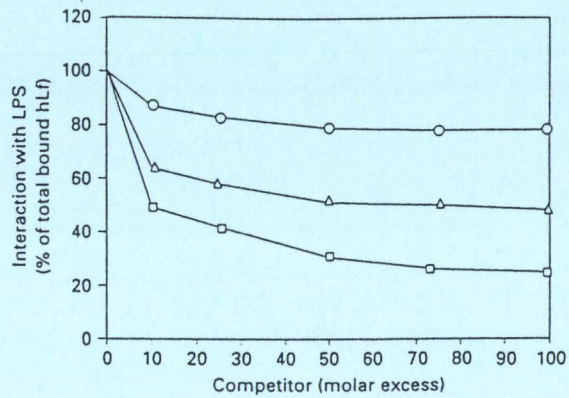


Figure 5 Inhibition of ^{125}I -hLf binding to LPS by unlabelled hLf tryptic fragments

Competitive experiments for LPS binding were carried out, with $2\ \mu\text{g/ml}$ ^{125}I -hLf in the presence of a 10–100-fold molar excess of unlabelled N-tryptic fragment (□), C-tryptic fragment (△) or N2-glycopeptide (○) of hLf at $4\ ^\circ\text{C}$. Results were calculated from three separate experiments. Percentage of total radioactivity bound to LPS was determined.

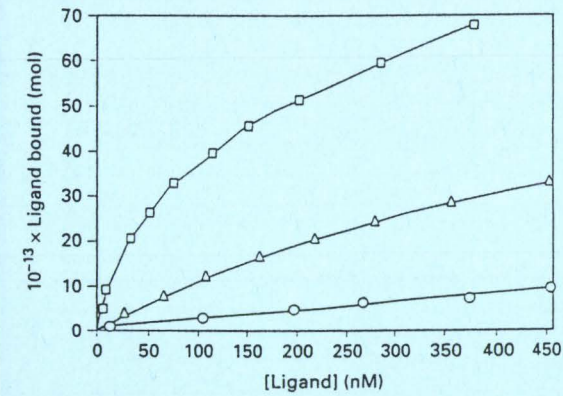


Figure 4 Specific binding of ^{125}I -labelled hLf tryptic fragments to LPS

Specific binding was determined in the presence of various concentrations of radiolabelled hLf tryptic fragments (□), C-tryptic fragment (△) or N2-glycopeptide (○) of hLf at $4\ ^\circ\text{C}$, as described in the Materials and methods section. Specific binding was estimated as described in the legend to Figure 1. The results were calculated from three separate experiments.

To investigate whether the two types of LPS-binding sites present in the N- and C-tryptic fragments are similar to that found in the native protein, competitive binding assays between hLf and its proteolytic fragments were also performed (Figure 5). Interaction of hLf with LPS was $75 \pm 3\%$ inhibited by a 100-fold molar excess of N-tryptic fragment whereas inhibition by C-tryptic fragment was only $50 \pm 3\%$. No significant effect was observed with the N2-glycopeptide, no more than $20 \pm 3\%$ inhibition being measured. These results are in a good agreement with the experiments described above and prove the presence of a high-affinity LPS-binding site in the N-terminal domain I of hLf.

Inhibition of ^{125}I -hLf binding to LPS by the synthetic octadecapeptide and lactoferricin B

Since the N-terminal domain I of hLf seems to be important in hLf-LPS interaction, we checked whether two well-known antimicrobial peptides located in this region could inhibit hLf-

LPS complex-formation. As illustrated in Figure 6, ^{125}I -hLf binding to LPS was $62 \pm 3\%$ inhibited by the synthetic octadecapeptide corresponding to residues 20–37 of hLf and $82 \pm 3\%$ by lactoferricin B, a homologous peptide of hLf present in the N-terminal lobe of bLf. The binding assays of the two peptides to LPS were not performed because, in the absence of tyrosine residues, their radiolabelling involves the linkage of a chemical reagent to basic amino acids. We have previously reported that for hLf, this type of labelling could modify the capacity of the protein to interact with other molecules [18].

Interaction of native and mutated rhLfs with LPS

To localize the amino acid sequence involved in the interaction with LPS, the $^{28}\text{RKVRGPP}^{34}$ sequence present in the N-terminal lobe of hLf was replaced by the sequence $^{365}\text{EGS}^{367}$ located in the C-terminal lobe of the protein. The EGS loop was obtained by

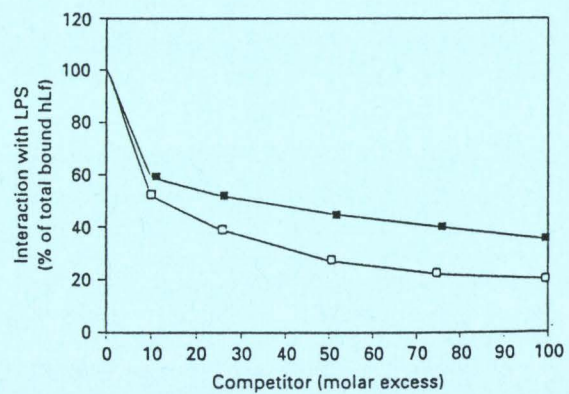


Figure 6 Inhibition of ^{125}I -hLf binding to LPS by unlabelled octadecapeptide and lactoferricin B

^{125}I -hLf ($2\ \mu\text{g/ml}$) was added to immobilized LPS, in the presence of a 10–100-fold molar excess of unlabelled synthetic octadecapeptide covering residues 20–37 of hLf (■) and lactoferricin B, a peptide involving residues 17–41 of bLf (□). Results were calculated from three separate experiments. Percentage of total radioactivity bound to LPS was determined.

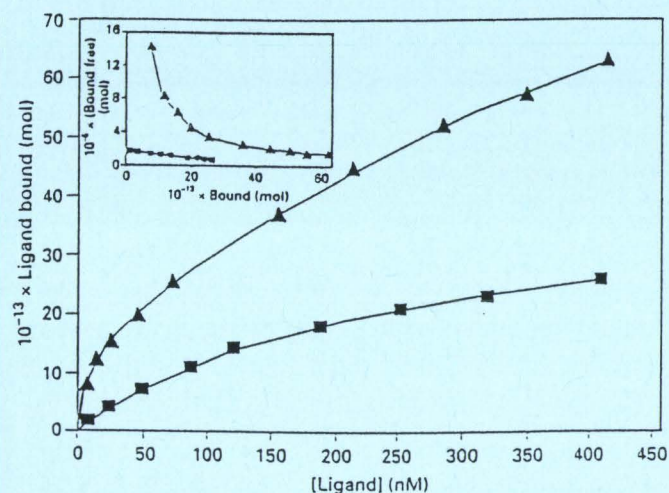


Figure 7 Specific binding of ^{125}I -rhLf and EGS-loop ^{125}I -rhLf to LPS

Equilibrium binding of ^{125}I -rhLf (▲) and EGS-loop ^{125}I -rhLf (■) was determined at 4 °C, as described in the Materials and methods section. The results are expressed as specific binding to LPS. The results are typical of three separate experiments.

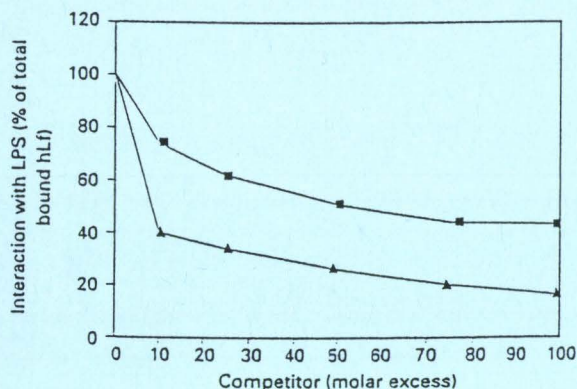


Figure 8 Inhibition of ^{125}I -hLf binding to LPS by unlabelled rhLf and EGS-loop rhLf

Competitive experiments were carried out with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^{125}I -hLf, in the presence of a 10–100-fold molar excess of unlabelled rhLf (▲) or EGS-loop rhLf (■) at 4 °C. The results were expressed as a percentage of total radioactivity bound to LPS.

in vitro mutagenesis experiments. Binding of native rhLf and EGS-loop rhLf to LPS was then investigated. Like hLf, native rhLf exhibits concentration-dependent and saturable binding to LPS (Figure 7). Scatchard analysis revealed the presence of two binding sites, one of high and one of low affinity, similar to those obtained for hLf; the K_d values were 7.6 ± 1 and 650 ± 20 nM respectively. However, the binding of the EGS-loop rhLf to LPS was about 2-fold less than the native rhLf or hLf and the high-affinity binding site had disappeared. Only one class of low-affinity binding sites (K_d 220 ± 14 nM) was detectable by Scatchard analysis.

In competitive binding experiments, $55 \pm 3\%$ inhibition of ^{125}I -hLf binding to LPS was obtained in the presence of EGS-loop rhLf (Figure 8). In contrast, native rhLf gave a similar inhibition curve to that of unlabelled hLf. These data confirm the results obtained in the binding experiments described above.

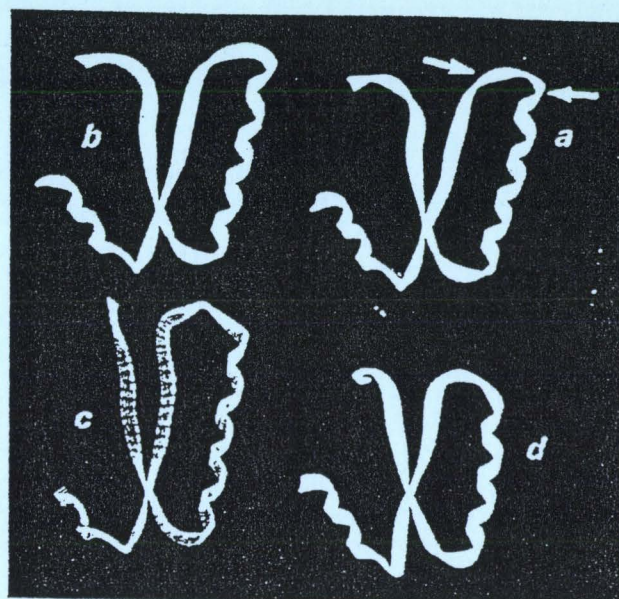


Figure 9 Molecular modelling of the 4–52 amino acid sequence of the N-terminal lobe of hLf (a) and the corresponding regions of the N-terminal lobe of bLf (b), the N-terminal lobe of rabbit serum transferrin (c) and the C-terminal lobe of hLf (d)

Arrowheads in (a) indicate the 28–34 loop region of hLf.

Molecular modelling

We have compared the folding of the N-terminal peptide (residues 4–52) of hLf with the folding of the corresponding regions found in the C-terminal lobe of hLf, N-terminal lobe of bLf and N-terminal lobe of rabbit serum transferrin. The N-terminal lobe of human serum transferrin possesses sequences homologous to that of rabbit protein [37]. However, crystallographic studies on human serum transferrin have not been reported.

As shown in Figure 9, all four peptides have β - α - β - α structures, which differ mainly in the loop equivalent to residues 28–34 of hLf. Very similar folding of this loop can be observed for hLf and bLf, whereas the corresponding loops of rabbit serum transferrin and the C-terminal part of hLf are longer or shorter respectively.

DISCUSSION

Antimicrobial properties of Lf [10,38] and its role in immune defence during inflammation [5,6] have been reported. Some of these activities are modulated, at least in part, by LPS-Lf complex-formation [14]. Recently, it has been demonstrated that inactivation of LPS by neutrophils is due to Lf secreted by neutrophil granules limiting inflammation and avoiding tissue damage by oxygen radicals [39]. However, up to now, no data on the region of Lf recognized by LPS are available. In the present study, two binding sites for *E. coli* O55B5 LPS have been found on hLf: a high-affinity (K_d 3.6 ± 1 nM) site, and a low-affinity (K_d 390 ± 20 nM) site which appears at high protein concentrations. The affinity constant corresponding to the high-affinity site is close to that obtained by Appelmek et al. [12] for hLf binding to lipid A isolated from *E. coli* LPS (0.5 nM). These authors have not described a low-affinity site, probably because they worked only at very low hLf concentrations. A number of other proteins have also been reported to bind the lipid A region

LPS. These include bactericidal permeability-increasing protein, a cationic protein present in the granules of polymorphonuclear leucocytes [35], and LPS-binding protein [40], a serum protein. The binding of both proteins is specific and of high affinity with a K_d of 2–5 nM for the former [35] and 1 nM for the latter [40]. In our experiments, as well as in those reported by others [12,35,40], the number of binding sites on different proteins per LPS molecule has not been determined. Indeed, it is well known that the molecular mass of LPS is heterogeneous since the endotoxin forms aggregates of different size. The capacity of ^{125}I -LPS to bind LPS was found to be specific, as 76% inhibition of LPS-Lf interaction was obtained in the presence of a 100-fold molar excess of unlabelled protein.

We have located the hLf binding sites for LPS using different fragments obtained by partial proteolysis of hLf. The high-affinity site was found to be present in the N-terminal fragment (residues 4–283) of hLf (K_d 13 ± 3 nM). It seems that the removal of the first three arginine residues from the N-tryptic fragment (obtained by tryptic hydrolysis of hLf [27]) does not affect the binding of the fragment to LPS, since similar K_d values for whole native hLf and the N-tryptic fragment were obtained. The C-tryptic fragment possesses only low-affinity binding features and partially inhibits the hLf-LPS interaction. As no significant binding of endotoxin was measured with the N2-glycopeptide (91–255) which corresponds to N-terminal domain II of the protein, it can be assumed that the high-affinity recognition site is located in N-terminal domain I of hLf (residues 4–91 and 256–322). The C-terminal moiety of the protein is not involved in the binding of hLf to LPS, since domain I is not glycosylated. It has been shown that the lymphocyte-receptor-binding site of hLf is located in the C-terminal part of the molecule, corresponding to residues 4–52 [19]. As reported by Legrand et al. [19], this domain contains three accessible areas, residues 4–6, 28–34 and 38–45, which are specific for the N-terminal moiety of hLf. The 28–34 amino acid sequence is present in the synthetic octadecapeptide, an anti-microbial cationic peptide corresponding to residues 20–37 of hLf which produced 62% inhibition of hLf-LPS interaction. The loop region, which was found to be involved in the receptor-binding site, is somewhat different in the corresponding part of the C-terminal lobe [19]. This fact could explain why the C-terminal fragment of hLf does not bind to LPS with high affinity. Direct evidence that residues 28–34 are responsible for LPS binding was obtained by experiments performed with the EGS-30 rhLf, a recombinant hLf in which residues 28–34 of the protein were replaced by the C-terminal loop counterpart. Our results revealed that this mutation on the whole protein leads to a suppression of the high-affinity interactions between rhLf and LPS.

As for the C-terminal lobe of hLf, the homologous loop of the C-terminal lobe of serum transferrin exhibits specific structural features which could explain why serum transferrin, despite its ability to bind LPS, did not inhibit hLf-LPS interaction. Our results suggest the existence of different LPS-binding sites on serum transferrin and hLf, a hypothesis supported by the different biological activities reported for these two proteins [24]. Unlike hLf which possesses bactericidal activity, only a bacteriostatic effect of transferrin has been detected [24]. Nevertheless, the high-affinity binding sites on serum transferrin have not been identified and further studies are necessary to elucidate the difference between hLf and serum transferrin in their molecular interactions with LPS.

Our analysis also showed the presence of two LPS-binding sites on bLf, with similar K_d values to those obtained for hLf. Moreover, bLf inhibited hLf-LPS interaction. These results suggest that the same binding sites are present on bLf and hLf.

In fact, considering the high-affinity binding of Lfs to LPS, it can be observed that the loop regions originating from hLf (residues 28–34) and bLf exhibit similar structural features [41]. Lactoferricin B, a proteolytic peptide covering residues 17–41 of bLf, also decreased hLf binding to the endotoxin, but the inhibition was greater than that obtained with the octadecapeptide (82% compared with 62%). This difference could be explained by a greater affinity of lactoferricin B for LPS, in agreement with its more potent activity against Gram-negative bacteria than the peptide derived from hLf [24].

In conclusion, the loop region (28–34) of hLf is essential for the high-affinity binding of LPS. Considering the similar behaviour of hLf and bLf towards LPS, it is reasonable to postulate that the above region is also important for bLf-LPS interaction. Moreover, as hLf has been reported to be a lipid A-binding protein [12], it can be assumed that the loop sequences of hLf and bLf interact directly with the lipid A region of LPS.

Finally, the data on the hLf amino acid sequence involved in interaction with LPS could help to explain the modulation of some biological activities of this glycoprotein in the presence of endotoxin [13,14]. In this context, our results are in agreement with the observation of Miyazawa et al. [14] that hLf loses the capacity to interact with its receptor present on differentiated HL60 cells after the formation of the hLf-LPS complex.

This work was supported by the Université des Sciences et Technologies de Lille I, the Centre National de la Recherche Scientifique (U.M.R. du CNRS no. 111, Director: Professor A. Verbert), by the INSERM contract (no. 930507) and by the Programme International de Coopération Scientifique of the CNRS with Rumania (contract no. 232). We are grateful to Mrs. M. Benaïssa and Mr. J. P. Decottignies for their skilful technical assistance and to Professor A. Tartar (URA no. 1309 du CNRS, Institut Pasteur, Lille) for synthesis of the octadecapeptide. We thank Professor E. N. Baker (Massey University, New Zealand) and Professor P. F. Lindley (CCL, Daresbury Laboratory, Warrington, Lancs., U.K.) for providing the X-ray crystallographic data on hLf, bLf and rabbit serum transferrin. We also thank Professor G. Vergoten (CRESIMM, Lille, France) for molecular modelling studies. We are especially grateful to Dr. J. Mazurier for helpful discussion.

REFERENCES

- Montreuil, J. and Mullet, S. (1960) *C. R. Acad. Sci. Paris* **250**, 1736–1739
- Montreuil, J., Tonnelat, J. and Mullet, S. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 413–421
- Masson, P. L. (1970) in *La Lactoferrine, Protéine des Sécrétions Externes et des Leucocytes Neutrophiles* (Masson, P. L., ed.), pp. 93–165, Edition Arsc, Bruxelles
- Masson, P. L., Heremans, J. F. and Schöner, E. (1969) *J. Exp. Med.* **130**, 643–658
- Brock, J. (1986) in *Iron in Immunity, Cancer and Inflammation* (De Souza, M. and Brock, J., eds.), pp. 81–98, John Wiley, Chichester
- Zimecki, M., Mazurier, J., Machnicki, M., Wiecezorek, Z., Montreuil, J. and Spik, G. (1991) *Immunol. Lett.* **30**, 377–382
- Spik, G. and Montreuil, J. (1983) *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* **19**, 123–130
- Sanchez, L., Calvo, M. and Brock, J. H. (1992) *Arch. Dis. Child.* **67**, 657–661
- Bullen, J. J. (1981) *Rev. Infect. Dis.* **3**, 1127–1137
- Arnold, R. R., Cole, M. F. and MacGhee, A. G. (1977) *Nature (London)* **197**, 263–265
- Ellisson, R. T. and Giehl, T. J. (1991) *J. Clin. Invest.* **88**, 1080–1091
- Appelmek, B. J., An, Y. Q., Geerts, M. et al. (1994) *Infect. Immun.* **62**, 2628–2632
- Crouch, S. P. M., Slater, K. J. and Fletcher, J. (1992) *Blood* **80**, 235–240
- Miyazawa, K., Mantel, C., Lu, L., Morrison, D. C. and Broxmeyer, H. E. (1991) *J. Immunol.* **146**, 723–729
- Birgens, H. S. (1991) *Dan. Med. Bull.* **38**: 244–252
- Mazurier, J., Legrand, D., Hu, W. L., Montreuil, J. and Spik, G. (1989) *Eur. J. Biochem.* **179**, 481–487
- Rochard, E., Legrand, D., Mazurier, J., Montreuil, J. and Spik, G. (1989) *FEBS Lett.* **255**, 201–204
- Legrand, D., Mazurier, J., Maes, P., Rochard, E., Montreuil, J. and Spik, G. (1991) *Biochem. J.* **276**, 733–738
- Legrand, D., Mazurier, J., Ellass, A. et al. (1992) *Biochemistry* **31**, 9243–9251
- Metz-Boutigue, M. H., Jollès, J., Mazurier, J. et al. (1984) *Eur. J. Biochem.* **145**, 659–676
- Rey, M. W., Woloshuk, S. L., De Boer, H. A. and Pieper, F. R. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 5288

- 22 Anderson, B. F., Baker, H. M., Dodson, E. J. et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 1769-1773
- 23 Pierce, A., Colavizza, D., Benaissa, M. et al. (1991) *Eur. J. Biochem.* **196**, 177-184
- 24 Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K. and Tomita, M. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1121**, 130-136
- 25 Jones, E. M., Smart, A., Bloomberg, G., Burgess, L. and Millar, M. R. (1994) *J. Appl. Bacteriol.* **77**, 208-214
- 26 Berger, D. and Berger, H. G. (1990) *Surg. Res. Comm.* **8**, 147-156
- 27 Legrand, D., Mazurier, J., Metz-Boutigue, M. H. et al. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **787**, 90-96
- 28 Legrand, D., Mazurier, J., Aubert, J. P., Loucheux-Lefebvre, M. H., Montreuil, J. and Spik, G. (1986) *Biochem. J.* **236**, 839-844
- 29 Spik, G., Strecker, G., Fournet, B. et al. (1982) *Eur. J. Biochem.* **121**, 413-419
- 30 Laemmli, U. K. (1970) *Nature (London)* **227**, 680-685
- 31 Mazurier, J. and Spik, G. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **629**, 399-408
- 32 Legrand, D., Salmon, V., Coddeville, B., Benaissa, M., Plancke, Y. and Spik, G. (1995) *FEBS Lett.* **365**, 57-60
- 33 Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463-5467
- 34 Palmiter, R. D., Behringer, R. R., Quaife, C. J., Maxwell, F., Maxwell, I. H. and Brinster, R. L. (1987) *Cell* **50**, 435-443
- 35 Gazzano-Santoro, H., Parent, J. B., Grinna, L. et al. (1992) *Infect. Immun.* **60**, 4754-4761
- 36 Scatchard, G. (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**, 660-672
- 37 Banfield, D. K., Chow, B. K., Funk, W. D. et al. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1089**, 262-265
- 38 Ellison III, R. T. (1994) *Adv. Exp. Med. Biol.* **357**, 71-90
- 39 Wang, D., Pabst, K. M., Aida, Y. and Pabst, M. J. (1995) *J. Leukoc. Biol.* **57**, 865-874
- 40 Mathison, J. C., Tobias, P. S., Wolfson, E. and Ulevitch, R. J. (1992) *J. Immunol.* **149**, 200-206
- 41 Spik, G., Legrand, D., Leveugle, B. et al. (1993) in *New Perspectives in Infant Nutrition* (Renner, B. and Sawatzki, G., eds.), pp. 77-83, Symposium Antwerp 1992, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

l'importance de la région constituée des acides 20 à 37. Une mise en évidence directe du rôle des acides aminés 28 à 34 a pu être réalisée par des tests de fixation de la protéine recombinante hLf-Loop. En effet, comme le montrent des études de Scatchard, la hLf-Loop se fixe uniquement sur des sites de basse affinité, ce qui nous a amené à conclure que la boucle 28-34 était impliquée dans l'interaction de haute affinité aux LPS.

Discussion

La lactoferrine se distingue de la sérotransferrine, non seulement par sa plus grande affinité pour le fer, mais aussi par sa localisation dans l'organisme et ses fonctions biologiques. En effet, la lactoferrine est présente essentiellement à la surface des muqueuses ainsi que dans les sécrétions. Si elle se retrouve globalement à l'état de traces dans le sang, son rôle n'y est pas négligeable puisqu'elle est libérée par les leucocytes neutrophiles lors du processus inflammatoire et se retrouve localement à des concentrations lui permettant d'agir sur ces cellules cibles. Ainsi, des travaux antérieurs ont permis de mettre en évidence un rôle de la lactoferrine dans la prolifération et la différenciation des lymphocytes (Mazurier *et al.*, 1989, Zimecki *et al.*, 1991). De même, la lactoferrine peut agir en inhibant l'agrégation plaquettaire (Leveugle *et al.*, 1993). La lactoferrine humaine n'agit pas uniquement sur ces deux types de cellules. Il existe en effet de nombreuses autres cibles cellulaires de la lactoferrine qui exerce sur elles de multiples rôles biologiques, essentiellement liés à la défense de l'organisme.

Les recherches entreprises au Laboratoire se sont tournées, il y a quelques années, vers l'étude des interactions de la lactoferrine humaine avec ses cellules cibles et, en particulier, avec le lymphocyte. Des études biochimiques préliminaires ont permis de cibler un fragment particulier de la lactoferrine humaine qui semble se fixer spécifiquement sur le récepteur des lymphocytes activés. Ce fragment comporte deux boucles, les résidus 28-34 et 39-42, qui sont susceptibles d'être reconnues par ce récepteur et également par le récepteur plaquettaire (Legrand *et al.*, 1991,92; Leveugle *et al.*, 1993). D'autres études ont suggéré, par ailleurs, un rôle important des cinq premiers résidus de l'extrémité N-terminale, extrêmement basiques car composés de 4 Arg (Wu *et al.*, 1995). Afin de confirmer et de préciser ces résultats, le but de nos travaux a été de produire de la lactoferrine recombinante native et mutée aux sites supposés de l'interaction avec ses cibles moléculaires. Nous avons exprimé la lactoferrine par différents systèmes d'expression : les cellules de mammifère, le tabac transgénique et les cellules d'insecte.

1- Expression de la lactoferrine humaine dans les cellules BHK.

Dans un premier temps, nous avons cherché à exprimer la lactoferrine dans les cellules BHK-21. Nous avons obtenu de la lactoferrine recombinante en quantité suffisante pour des études structurales et en particulier pour des analyses détaillées de sa structure glycanique, qui a révélé deux glycannes de type N-acétyllactosaminique biantenné, sialylé et fucosylé. Néanmoins, ce système d'expression n'était pas satisfaisant pour obtenir rapidement chaque protéine mutée et nous nous sommes tournés vers le système baculovirus/cellules d'insecte.

2- Expression de la lactoferrine humaine dans les cellules d'insectes infectées par un baculovirus recombinant.

Par le biais du système baculovirus/cellules Sf9, nous avons obtenu rapidement un taux d'expression élevé de lactoferrine recombinante sécrétée dans le milieu de culture. Après purification de la lactoferrine, nous avons vérifié les propriétés biochimiques de la lactoferrine recombinante, et en particulier, nous avons déterminé son spectre d'absorbance et étudié la stabilité de fixation du fer en fonction du pH. La séquence N-terminale de la lactoferrine recombinante a également été identifiée. Ces caractéristiques biochimiques se sont révélées identiques à la lactoferrine isolée du lait de Femme, ce qui démontre que les cellules d'insecte possède la machinerie enzymatique nécessaire à une maturation correcte de la protéine. La masse moléculaire de la lactoferrine recombinante a été déterminée par analyse en SDS-PAGE ainsi que par spectrométrie de masse MALDI/TOF. Une différence de masse de 2500 Da a été décelée, différence qui semble incomber à la fraction glycanique. En effet, une composition molaire des monosaccharides de la glycoprotéine a confirmé cette hypothèse, puisque la fraction glycanique s'est révélée être deux fois plus légère que celle de la protéine du lait de Femme. Enfin, afin de vérifier la fonctionnalité de la lactoferrine recombinante, nous avons étudié ses paramètres de fixation aux cellules lymphoblastiques T Jurkat. Ces expériences nous ont révélé que la lactoferrine exprimée par les cellules Sf9 était biologiquement active, en dépit d'une glycosylation différente de celle de la protéine native. Ainsi, les cellules Sf9 infectées par un baculovirus représentent un système particulièrement intéressant tant au niveau de la qualité de la protéine hétérologue, qu'au niveau de la rapidité d'obtention de la protéine. Les cellules

d'insecte étaient donc le système de choix pour l'expression de protéines génétiquement modifiées.

3- Expression de la lactoferrine humaine par du tabac transgénique.

L'exploitation du système des recombinants nous a amené à nous intéresser à l'expression de la lactoferrine dans le système végétal, en prenant pour modèle le tabac, ceci afin d'étudier l'expression d'une glycoprotéine hétérologue dans les plantes, mais également en vue d'utilisations de la lactoferrine recombinante dans des buts nutritionnels et thérapeutiques. L'expression de glycoprotéines dans les plantes n'étant pas une technique employée de façon systématique et routinière, nous avons expérimenté deux constructions moléculaires distinctes mettant en oeuvre des peptides signaux différents : un peptide de sécrétion végétal et le peptide signal propre à la lactoferrine humaine. Dans les deux cas, nous avons obtenu de la lactoferrine possédant une séquence N-terminale identique à celle de la lactoferrine du lait, ce qui démontre le clivage protéolytique co-translationnel du peptide signal. L'analyse de la masse moléculaire par SDS-PAGE et par spectrométrie de masse de la lactoferrine purifiée a suggéré une apparente intégrité de la fraction protéique. Ces techniques, ainsi qu'une analyse de la composition molaire en monosaccharides de la lactoferrine issue du tabac ont néanmoins permis de mettre en évidence une structure glycanique fort différente de celle de la lactoferrine du lait de Femme. On remarquera chez la glycoprotéine recombinante, l'absence d'acide neuraminique et la présence de xylose. Cette particularité glycanique n'a pas d'incidence sur la fixation de la lactoferrine recombinante sur les cellules lymphoblastiques T Jurkat, ni sur les cellules entérocytaires HT29-18C1, ce qui nous laisse supposer que la lactoferrine issue du tabac est fonctionnelle. Néanmoins, la glycosylation entraîne des conséquences primordiales sur les applications éventuelles de la lactoferrine produite par les plantes. En effet, l'importance de la nature des glycannes en terme d'antigénicité est maintenant bien établie. C'est ainsi que le xylose est antigénique, tout comme les résidus de fucose liés en α -1,3. La glycosylation apparaît comme un des problèmes majeurs de l'expression et de l'exploitation des glycoprotéines hétérologues par le système végétal. Une utilisation à visée thérapeutique ou même nutritionnelle de la lactoferrine humaine recombinante pourrait engendrer des conséquences graves sur le plan immunitaire. Absorbée de façon orale, la

lactoferrine humaine est capable de passer à travers la barrière intestinale, comme l'ont montré Mikogami *et al.* (1994) sur des cellules en culture ou encore Hutchens *et al.* (1991) chez le nouveau-né. Ainsi, l'ingestion de lactoferrine issue des plantes entraînerait, fort probablement, des réactions immunitaires. En revanche, malgré la probable immunogénicité de la lactoferrine de tabac, il serait éventuellement possible d'utiliser les propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, voire antitumorales de la molécule, sous la forme de traitements cutanés localisés. Toutefois, de rigoureuses études d'immunogénicité sont nécessaires pour de telles applications. Pour palier à ce problème majeur de l'antigénicité des glycoprotéines de plantes, il est maintenant possible d'envisager une alternative avec des plantes qui ont été mutées au niveau des enzymes de la glycosylation (von Schaeven *et al.*, 1993), afin que ces plantes ne synthétisent plus de glycannes complexes, et expriment des protéines nettement moins immunogènes. La seconde stratégie pour remédier à ce problème de glycosylation particulière aux cellules végétales est de fusionner de la protéine d'intérêt à une séquence KDEL de rétention au réticulum endoplasmique (Wandelt *et al.*, 1992). La protéine recombinante reste alors insérée dans la membrane du réticulum et ne subit pas la maturation due normalement aux enzymes golgiens. La glycosylation est stoppée au core oligomannosidique. Ce procédé présente néanmoins d'autres inconvénients, et en particulier, la purification de la glycoprotéine d'intérêt est beaucoup plus difficile que celle d'une protéine sécrétée dans l'apoplasme.

Ces stratégies seraient toutefois envisageables pour l'expression d'une lactoferrine recombinante non immunogène. Par ailleurs, la lactoferrine pourrait être exprimée non seulement dans du tabac, mais aussi dans d'autres plantes d'intérêt agronomique, tels que le colza ou le maïs, dont les graines constituent un lieu de stockage privilégié.

4- Applications à l'expression de lactoferrine génétiquement modifiée

a- Application à l'étude des interactions de la lactoferrine avec le lymphocyte

Après avoir mis au point le système d'expression de la lactoferrine dans les cellules d'insecte ainsi que de la méthode de mutagenèse dirigée, nous avons mis à profit ces techniques pour exprimer des lactoferrines mutées au niveau du site d'interaction. Grâce à ces protéines mutées, nous avons confirmé et précisé l'implication des

régions basiques 1 à 4, et 28 à 34 dans les interactions avec les cellules lymphoblastiques Jurkat. En effet, si les trois premiers résidus d'Arg interagissent essentiellement avec les protéoglycannes, la boucle 28-34 est impliquée dans l'interaction avec le récepteur spécifique de la lactoferrine, de plus haute affinité, qui représente 15 à 20% du nombre total des sites de fixation. Une application directe de la préparation de la hLf-G4R servira pour le criblage du ou des récepteurs de la lactoferrine en vue de son clonage. D'autre part, la séquence KRDS, pourtant décrite dans l'interaction avec le récepteur plaquettaire, n'a pas de rôle dans la fixation de la lactoferrine sur les lymphocytes.

La démonstration de l'existence des deux types de sites de fixation, l'un de basse affinité, peu spécifique, constitué de protéoglycannes et l'autre de plus haute affinité, spécifique, en nombre plus restreint, évoque la fixation du FGF (Fibroblast Growth Factor) sur ses récepteurs. En effet, les activités biologiques de FGF sont assurées par deux classes de sites : des récepteurs de haute affinité, membranaires, liant spécifiquement le FGF, alors que les sites de basse affinité sont des protohéparanes sulfatés. La plupart des travaux tendent à prouver que la coexistence de ces deux classes de récepteur est indispensable à la transduction du signal (Yayon *et al.*, 1991). En effet, après fixation du ligand, le récepteur spécifique transmet le signal à la cellule grâce à son activité tyrosine kinase, alors que le récepteur de basse affinité semble jouer un rôle préalable dans la fixation même du ligand (Kiefer *et al.*, 1991). Il se pourrait que les récepteurs de basse affinité de la lactoferrine aient un rôle similaire à celui des héparanes sulfates dans la fixation du FGF. Malgré ces similitudes, le mécanisme d'action de la lactoferrine ne peut être exactement identique puisqu'il semblerait que les récepteurs de basse affinité du FGF soit nécessaires à la fixation du ligand sur son récepteur spécifique, ce qui n'est pas le cas de la lactoferrine, comme nous l'avons montré. Néanmoins, les récepteurs de basse affinité, pourraient être un réservoir de lactoferrine et pourraient soit piéger soit céder le ligand à son récepteur spécifique de haute affinité. Ainsi, les récepteurs de faible affinité de la hLf pourraient réguler la fixation de la hLf sur ses sites de haute affinité en modifiant ainsi son activité. Ces hypothèses sont renforcées par la démonstration de la labilité de l'extrémité N-terminale de la lactoferrine. Comme nous l'avons montré, les trois premières Arg pourraient subir une hydrolyse rapide,

ce qui permettrait un déplacement de la lactoferrine fixée aux protéoglycannes vers ses récepteurs spécifiques.

b- Application à l'étude de l'interaction lactoferrine LPS

La lactoferrine génétiquement modifiée a également permis de mettre en évidence l'importance de la boucle 28-34 dans l'interaction avec le site de haute affinité des LPS bactériens. D'autres expériences utilisant les autres lactoferrines mutées sont actuellement en cours.

c- Perspectives

Les applications des lactoferrines mutées et exprimées par le système baculovirus / cellules d'insecte sont diverses. D'autres études d'interaction avec les récepteurs de la lactoferrine sont envisagées et en particulier, des études de fixation sur le récepteur des plaquettes sanguines, qui déboucheront sur des tests d'inhibition de l'agrégation plaquettaire. Il nous faudra établir le rôle de la séquence ³⁹KRDS⁴², mutée en SAST, qui est supposée interagir avec le récepteur plaquettaire. Néanmoins, si la séquence KRDS se fixait de façon spécifique, cela infirmerait l'hypothèse selon laquelle le récepteur lymphocytaire est identique au plaquettaire.

D'autre part, la méthode de mutagenèse dirigée et d'expression dans les cellules Sf9 étant mise au point, celle-ci permettra l'expression et l'étude d'autres protéines mutées. En effet, par des études de modélisation moléculaire, Ellass *et al.* (1996a, b) ont proposé d'autres acides aminés impliqués pour certains dans la spécificité de fixation (résidus 50-55), pour d'autres, dans l'affinité (résidus 43-47). Ces hypothèses étant basées sur des calculs théoriques, une confirmation par des tests d'activité biologique s'avère nécessaire.

Par ailleurs, il serait intéressant de se tourner vers d'autres cibles cellulaires de la lactoferrine, telles que les cellules entérocytaires HT29, et comparer le ou les récepteurs à ceux des lymphocytes.

Enfin, d'autres études sont actuellement engagées depuis peu pour étudier le signal de transduction de la lactoferrine. L'utilisation des protéines mutées permettrait de déterminer avec précision les acides aminés impliqués dans la transduction du message.

Appendice technique

I. Techniques de biologie moléculaire

Clonage de l'ADNc de la lactoferrine

Une banque d'ADNc de glande mammaire humaine (Clontech, La Jolla, USA) construite dans le vecteur λ gt11 a été criblée grâce à une sonde oligonucléotidique correspondant aux acides aminés du peptide signal (c'est-à-dire les acides aminés 1 à 19 de la hLf immature) par la technique d'hybridation sur réplique de nitrocellulose (Maniatis, *et al.*, 1982).

Par hydrolyse ménagée de λ gt11 par *EcoRI* (3 U/ μ g d'ADN pendant 2 min à 37°C), l'ADNc entier de la hLf a été cloné dans le plasmide pBluescript II SK (Stratagène, La Jolla, USA) au site de polyclonage *EcoRI*, conduisant ainsi au vecteur pBS-hLf (Legrand *et al.*, 1995).

Conditions de PCR

Les réactifs utilisés lors des différentes PCR ont été fournis par Promega (Charbonnière, France). Les oligonucléotides ont été synthétisés par Eurogentec (Seraing, Belgique).

Dans chaque cas, 5 ng de matrice ont été incubés en présence de 100 pmol de chacun des deux oligonucléotides, 3 μ l de dNTP 10 nM, 6 μ l de MgCl₂ 25 mM, 0.5 μ l (2,5 U) de Taq DNA polymerase, dans un volume final de 100 μ l comprenant le tampon du fournisseur.

Les PCR ont été réalisées par un bio-med THERMOCYCLER 60. La première dénaturation a lieu 5 min à 94 °C, elle était suivie de 30 cycles comprenant chacun 1 min à 94 °C, 1 min à (T_m-10 °C) et 1 min à 72 °C. Pour terminer, une dernière phase d'élongation était prolongée de 5 min à 72 °C.

Préparation des bactéries compétentes

Un ml de culture de nuit de DH5 α est remis en culture dans du milieu LB (10 g/l de bactotryptone, 5 g/l de NaCl) contenant du KCl (250 mM) et de MgSO₄ (16 mM), jusqu'à l'obtention d'une DO₆₅₀ de 0,3. La suspension bactérienne est

alors centrifugée à 2.500 rpm pendant 5 min à 4°C ; le culot est repris dans du tampon Tfb1 (RbCl 100mM, MnCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10mM, KAc 10mM, glycérol 15%, pH5,8), incubé sur la glace durant 15 min puis centrifugé de nouveau dans les mêmes conditions. Le culot est repris par 6,5 ml de tampon Tfb2 (MOPS 10 mM, RbCl10 mM, CaCl₂ 75 mM, glycerol 15% ajusté à pH 7 avec NaOH). Les cellules sont alors réparties à raison de 200 µl par tube et stockées à -80 C pour les étapes ultérieures de transformation.

Lors de l'étape de transformation, les cellules sont décongelées sur la glace, la solution d'ADN (25 µl de la réaction de ligation, soit 50 ng d'ADN) est ajoutée à 200 µl de DH5α compétentes. La suspension est incubée 20 min sur la glace puis plongée dans un bain-marie à 42°C pendant 90 sec et remplacée sur la glace durant 5 min. La suspension est remise en culture liquide dans du milieu LB pendant 1 h, puis étalée sur milieu LB gélosé contenant le marqueur de sélection. Après une culture d'une nuit à 37°C, les plasmides sont extraits par la méthode de lyse alcaline (Maniatis *et al*, 1982).

Les enzymes de restriction, la T4 ligase et la CIP proviennent d'Eurogentec (Seraing, Belgique). Ils sont utilisés selon les recommandations du fournisseur. Les techniques de ligation et de transformation des bactéries DH5α sont celles décrites par Maniatis *et al*. (1982).

Conditions de ligation

Les conditions de ligation sont les suivantes: 100 ng de vecteur et 100 ng d'insert sont incubés 1 nuit à 16°C, en présence de 4U de T4 ligase (Stratagene), dans le tampon et les conditions préconisés par le fournisseur, soit dans un volume final de 50 µl contenant 1 µl d'ATP 10 mM.

Le produit issu de la ligation permet la transformation de bactéries DH5α préalablement rendues compétentes par la technique au Rubidium décrite ci-dessus.

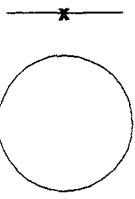
Mutagenèse dirigée d'après la méthode de Sayers.

Les enzymes de restriction et de modification ainsi que les oligonucléotides ont été fournis par Eurogentec (Seraing, Belgique). La T4 ligase et la phosphatase

alkaline de veau (CIP) proviennent de Stratagene (La Jolla, USA), et les réactifs de PCR de Promega (Charbonnières, France). Le kit de séquençage Sequenase DNA a été fourni par United States Biochemical Corporation (Cleveland, USA).

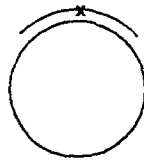
La méthode de mutagenèse dirigée que nous avons employée est celle décrite par Sayers (1988) et commercialisée par Amersham (*In vitro* Mutagenesis kit) (Fig. 28). Cette technique nécessite que le fragment d'ADN cible soit cloné dans le vecteur M13 afin de l'obtenir sous forme simple-brin. Tous les réactifs utilisés sont contenus dans le kit et ont été employés comme le préconise le fournisseur. Le principe de la mutagenèse est le suivant : après phosphorylation par la T4 polynucléotide kinase de l'oligonucléotide synthétique portant la mutation, cet oligonucléotide est apparié au phage portant le fragment sauvage de l'ADNc de la lactotransferrine. L'appariement est réalisé 3 min à 70°C puis la température est réduite d'un degré par minute jusque 37°C, température à laquelle le mélange est incubé 30 min avant d'être plongé dans la glace. L'oligonucléotide sert alors d'amorce pour la synthèse du brin complémentaire par le fragment de Klenow de la DNA polymérase de *E.coli*. La synthèse est réalisée en présence d'un thionucléotide qui est incorporé dans le brin mutant. Une filtration sur membrane de nitrocellulose ou une digestion par l'Exonucléase V permet la sélection du double brin. L'hydrolyse par l'enzyme Nci I produit une coupure unique dans le brin sauvage car cette enzyme possède la propriété de ne pas couper le brin dont les nucléotides sont thiolés. Cette coupure génère des extrémités libres sur le brin sauvage ce qui permet à l'Exonucléase III de digérer une partie du brin sauvage. Le brin portant la mutation sert alors de matrice pour reconstruire une molécule double-brin dont les deux brins portent maintenant la mutation. La transformation peut alors être réalisée dans des bactéries rendues compétentes.

Oligonucléotide portant la mutation



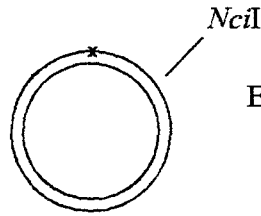
M 13 recombinant simple brin

Appariement



Klenow ligase

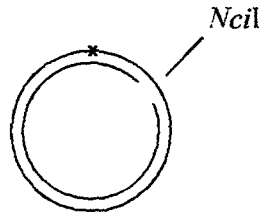
Extension avec du CTP α S et ligation



Elimination du simple brin restant par filtration

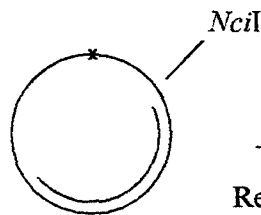
NciI

Coupure du brin non muté

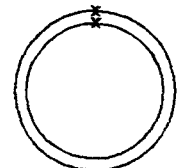


ExoIII

Digestion partielle par l'exonucléase III



Repolymérisation par la DNA polymérase I et ligation par la T4 DNA ligase



TRANSFORMATION

Fig. 28 : Principe de la mutagenèse dirigée
(Sayers et al., 1988)

Transformation des bactéries par les phages M13 et criblage des clones de phages portant la mutation

200 µl de bactéries compétentes sont transformées par 20 µl d'ADN phagique. Les phages et les bactéries sont mis en contact 40 minutes sur la glace. Après un choc thermique de 45 secondes à 42° C et réincubation sur la glace pendant 5 min, 200 µl de bactéries TG1 en phase exponentielle de croissance, 40 µl d'IPTG 100 mM et 40 µl d'X-Gal à 2 % (p :v) sont ajoutés. L'ensemble est alors mélangé à 3,5 ml d'agar mou et sur milieu gélosé. Les boîtes de Pétri sont laissées à 37 °C une nuit.

Les plages de retard de croissance sont répliquées sur membrane de nitrocellulose Hybond C (Amersham) selon le protocole du fournisseur. L'hybridation des filtres est réalisée à l'aide de l'oligonucléotide portant la mutation, marqué au ³²P après phosphorylation par la T4 Kinase (Manatis *et al.*, 1982). L'oligonucléotide marqué au ³²P est purifié par chromatographie sur colonne SepPack C18 (Maniatis *et al.*, 1982). La préhybridation et l'hybridation se font dans une solution 6X SSC, 2X Denhardt, 0,25 % SDS (p:v), 100 µg/ml d'ADN de sperme de Saumon. L'hybridation est réalisée dans la solution précédente renouvelée, en y ajoutant la sonde marquée (2×10^5 cpm/ml). Les filtres sont alors lavés par une solution 2X SSC, 0,05% SDS (p:v), deux fois 30 minutes à 42°C puis 8 minutes à 70°C. Les filtres sont autoradiographiés à -80°C pendant 16 heures. Après révélation, les clones positifs sont remis isolément en culture afin de produire des phages sous forme d'ADN simple-brin en vue du séquençage du fragment muté, réalisé par la méthode enzymatique de Sanger *et al.* (1977).

Obtention du vecteur pBIOC-21

Les constructions des différents plasmides via l'utilisation des techniques d'ADN recombinant dérivent de pBIOC4. Le plasmide binaire dérive de pGA492 (An *et al.*, 1986). Le plasmide dérivant de pBIOC4 et contenant la cassette d'expression « Pd35S-T35S » est le plasmide pBIOC21.

Les différents éléments permettant de reproduire ces constructions sont contenus dans la description de la demande de brevet WO9633277.

Transfection des cellules par la méthode au phosphate de calcium

Un ml de tampon A (hépes 125 mM, pH 7,1; CaCl₂ 125 mM; NaCl 140mM) sont ajoutés à un mélange constitué de 0,5 µg d'ADN linéarisé AcNPV et de 2 µg de vecteur de transfert chargé, préalablement mis en contact 10 min à température ambiante.

2x10⁶ cellules Sf9 adhérentes dans des boîtes de 60 mm contenant 1 ml de milieu de Grace complémenté avec 10 % de sérum de veau foetal sont mises en contact avec 1 ml de tampon A déposé sur les cellules goutte à goutte. Les cellules sont alors incubées à 27°C pendant 4 h. Le milieu de cotransfection est alors enlevé, et les cellules incubées à 27°C pendant 4-5 jours.

II. Techniques d'analyse de glycoprotéine

Mesure de l'absorbance des protéines

L'absorbance en UV et visible de la protéine (1 mg/ml en tampon Tris/HCl 0,025M pH7,5) a été mesurée de 260 à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Varian Carry 219.

Méthode ELISA de détection de la hLf (Mikogami et al, 1994).

Des anticorps polyclonaux de Lapin anti-lactoferrine humaine ont été produits dans notre laboratoire.

Les anticorps polyclonaux sont incubés dans les puits de la plaque de microtitration à raison de 100 µl par puits (soit 35 µg/ml) dans un tampon bicarbonate 10 mM (pH 9,6) une nuit à 4°C ou 2 h à 37 °C.

Une incubation de 20 min à température ambiante de 150 µl de PBS-tween 2 % permet de bloquer les sites non spécifiques. 100 µl de chaque échantillon issu des extraits de protéines totales sont incubés à 37 °C pendant 2 h avant que la hLf ne soit détectée par des Anticorps monoclonaux anti-Lf. Ceux-ci sont produits au laboratoire par fusion de splénocytes de souris et de cellules de myélome SP₂O/Ag.

Le surnageant du milieu de culture de ces hybridomes est utilisé directement lors du test ELISA. Le complexe Ac-rhLf est reconnu par des anticorps de Chèvre anti-souris marqués à la peroxydase (Diagnostic Pasteur) dilués au 1/3000^e dans du PBS et mis en contact, comme précédemment, 2h à 37 °C. La révélation est réalisée sous agitation par addition de la solution de substrat (4 mg d'ortho-phenylènediamine dihydrochloride dans 10 ml de tampon citrate pH 5,5 en présence de 10 µl d'H₂O₂). La coloration est obtenue en quelques minutes, et la réaction est stoppée par ajout de 50 µl par puits de H₂SO₄ à 20 %. La densité est lue à 490 mM.

Entre chaque étape, les puits sont lavés au PBS-tween 0,05 %.

Western Blot.

Après électrophorèse en gel de polyacrylamide à 7,5 % (20µg de protéines totales par puits), les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose. Celle-ci est alors incubée dans du PBS-tween 2 % puis lavée 3 fois dans du PBS-tween 0,05 %. Des anticorps polyclonaux de lapin sont dilués au 500^e dans du PBS (soit 7 µg/ml), mis en contact avec la membrane durant 3 h à 20 °C avant que celle-ci ne soit lavée dans du PBS-tween 0,05 %. Le conjugué, un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin (Diagnostic-Pasteur) marqué à la peroxydase et dilué au 2500^e dans du PBS est ensuite incubé 1h à 20 °C. La membrane est à nouveau lavée trois fois avec du PBS. Une dernière incubation de la membrane dans 100 ml de PBS en présence de 40 mg de DAB (3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) et de 200 µl d'H₂O₂ permet la révélation finale.

Immunoprécipitation

6 mg de Protéine-A Sepharose (Pharmacia) sont incubés 1 h à température ambiante en présence de 5 mg d'anticorps polyclonaux de lapin anti-Lf humaine. Ces anticorps sont produits comme décrit dans l'exemple 14. Les billes de Protéine-A Sepharose sont récupérées par centrifugation, lavées trois fois par du TBS pH 8,2 (Tris/HCl 20 mM, NaCl 150 mM) et mises en agitation dans 20 ml d'extrait de protéines totales, 2 h à température ambiante. Après trois lavages au TBS, le complexe protéique est dissocié dans du tampon de reprise (Tris 62,5 mM, 2 % SDS (p/v), 10 % sucrose (p/v), 5% β-mercaptoethanol (p:v), 5% bleu de

bromophenol (p/v)), séparé par SDS PAGE 7,5% et enfin coloré au bleu de Coomassie.

Purification de la lactoferrine par chromatographie d'échange d'ions

La lactoferrine est purifiée la technique de chromatographie d'échange d'ions SP Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech, St Quentin en Yvelines, France), équilibrée en acétate de sodium 0,2 M. Les protéines sont éluées par un gradient linéaire en NaCl de 0 à 1 M. La lactoferrine native est classiquement éluée dans la fraction à 0,7 ou 0,8 M de NaCl.

Purification des rhLfs de Tabac par chromatographie d'affinité

1 ml de gel Sepharose 4B activé au BrCN (Pharmacia Biotech, Seraing, Belgique) sur lequel ont été fixés environ 3 mg d'Ac. Ce gel a été incubé pendant une nuit à 4°C en batch dans 100 ml d'extrait de protéines dont le pH est amené à 8,2 par du Tris 1M. Le gel fut alors lavé abondamment par du TBS (Tris/HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,2) puis par du TBS, 1 M NaCl, pH 8,2. L'élué a été réalisé par un tampon glycine/HCl 0,2 M, pH 2,4, en trois élués successives qui furent analysées sur gel de polyacrylamide 7,5 %.

Etude de la fixation du fer en fonction du pH.

La hLf native saturée en fer a été préparée selon Mazurier *et al.*, (1980) avant les analyses de relargage du fer. Les solutions de rhLf et de hLf du lait (3 mg/ml) ont été dialysées pendant 24 h à température ambiante contre les tampons suivants : NaCl 0,2 M, Tris/HCl 0,05 M (pH 8-7) ; Mes 0,05 M (pH 6.5-5) ; acétate de sodium 0,05M (pH 5,5-3) ; glycine /HCl 0.05M (pH 3-2). La quantité de fer fixée à la lactoferrine a été déterminée par mesure de l'absorbance de la protéine à 280 et 465 nm.

Déglycosylation de la rhLf et analyse des glycanes.

La rhLf purifiée a subi un traitement par la N-Glycosidase F (Biolabs) selon les conditions du fournisseur : 5 µg de rhLf purifiée ont été portés à 100°C pendant 10 min dans 40 µl de tampon de dénaturation (SDS 0,5%, β mercaptoethanol 1%, Tris/HCl 25 mM, pH 7,8) puis incubés une nuit à 37°C en présence de 5 µl de tampon de réaction (citrate de sodium 0,5 M, pH 7,8), 5 µl de NP40 10% et 3 µl de N- Glycosidase F (1000 U/µl). L'analyse de la solution protéique a été réalisée en SDS-PAGE 7,5%.

L'analyse des monosaccharides de la glycoprotéine a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire CPSIL 5 CB 101 et par chromatographie sur Girdel 300. Le flux d'hélium était de 10 ml/min et la pression de 0.5 bars. La température était programmée de 120°C à 240°C à 2°C/min. Les dérivés triméthylsilylés ont été préparés par méthanolyse (Zanetta *et al.*, 1972), par N ré-acétylation et triméthylsilylation (Kamerling *et al.*, 1975).

Analyse en spectrométrie de masse MALDI / TOF.

Les analyses ont été réalisées sur un spectromètre de masse MALDI Vision 2000 à désorption laser (Finnigan MAT, Bremen, Allemagne). Trois µl de solution contenant 100 pmoles de lactoferrine ont été ajoutés à 17 µl de solution matrice contenant 10 mg/ml d'acide 2,5 dihydroxy-benzoïque dans un mélange eau/acétonitrile (30/70). Un µl de ce produit a été envoyé sur la cible, simultanément à de la sérotransferrine humaine (Sigma, masse moléculaire 79590 Da, dans de l'acide sinapinique) qui sert de témoin de masse.

Expériences de fixation aux cellules

1- Fixation de la lactoferrine aux cellules Jurkat

Les cellules lymphoblastiques T de la lignée Jurkat ont été cultivées en milieu RPMI 1640 (GIBCO, Cergy Pontoise, France) pH 7,4 contenant 25 mM d'Hepes, 2 mM de L glutamine, de gentamycine (5 mg / ml) en présence de 10 % de serum de veau foetal préalablement inactivé par la chaleur, dans une étuve à 5 % de CO₂, à 37°C.

Au stade de subconfluence, les cellules ont été diluées à une densité de 4.10^5 / ml pour les expériences de fixation.

Une quantité de 100 µg de Lf2 a été marquée par 0,2 mCi d' ^{125}I , en utilisant les iodo-beads (Pierce, Rockford, USA) selon les recommandations du fournisseur. L'iode libre a été éliminé par gel filtration sur colonne Sephadex G-25 équilibrée dans du PBS.

Les expériences de fixation ont été effectuées dans du RPMI contenant 0,4 % (p/v) de transferrine humaine afin d'éviter les fixations non-spécifiques de la Lf 2 sur les cellules ou sur le plastique. Des aliquotes de 100 µl contenant 5.10^5 cellules ont été réparties dans des tubes en propylène de 1,5 ml en présence de Lf2 marquée à des concentrations croissantes de 0 à 100 mM.

La fixation non spécifique a été évaluée en présence de 100 excès molaire de Lf non marquée. Les cellules ont été incubées avec les protéines pendant 1 h à 4 °C en présence de 0,01 % (p/v) d'azide de sodium. Enfin, les cellules ont été lavées 3 fois par 1 ml de RPMI et le culot a été finalement repris dans 0,5 ml de PBS. La radioactivité a alors été mesurée par un compteur de radiations γ Compugamma, LKB-Wallac (Turku, Finlande).

2- Fixation de la Lactoferrine à la surface des cellules HT29-18C1

Les cellules HT29 du clone 18C1 ont été cultivées en DMEM (Eurobio, Les Ulis, France) contenant 2 mM de L-glutamine et de la gentamicine (5 mg/l), et en présence de 10 % de serum de veau foetal préalablement inactivé par la chaleur, dans un étuve à 10 % de CO_2 , à 37°C. A ce stade de subconfluence, les cellules sont divisées et remises en culture en puits de 2 cm², à raison de 2×10^4 cellules/cm². Après 21 jours de culture qui permettent la différenciation en entérocytes, ces cellules ont été utilisées pour les études de fixation.

La Lf fut marquée à l' ^{125}I comme décrit précédemment.

Les cellules de chaque puits ont été incubées 1 h sur la glace en présence de 200 µl de Lf2 marquée, à des concentrations variables en présence de 0,01 % (p/v) d'azide de sodium et de transferrine humaine qui évite la fixation non spécifique de la Lf. La radioactivité d'un aliquot de 50 µl fut alors mesurée pour le calcul de la concentration de lactoferrine libre. Après 5 rinçages de 500 µl de DPBS+ (Sigma, St Moius, USA), les cellules ont été décollées par 200 µl de DPBS+/EDTA (5 g/l)

et la radioactivité de la Lf2 fixée fut mesurée à l'aide d'un compteur de radiations γ Compugamma, LKB-Wallac.

III. Transformation du tabac

Les plants de tabac utilisés pour les expériences de transformation (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi NC) furent cultivés *in vitro* sur le milieu de base de Murashige et Skoog (1962) additionné des vitamines de Gamborg (Sigma, St Louis, USA), de saccharose à 20 g/l et d'agar (Merck) à 8 g/l. Le pH du milieu est ajusté à 5,8 avec une solution de potasse avant autoclavage à 120°C pendant 20 min. Les plantules de tabac sont repiquées par bouture des entre-noeuds tous les 30 jours sur ce milieu de multiplication MS20 (M0404 à 4,4 g/l, saccharose à 20 g/l, agar agar à 8 g/l, pH 5,7).

Toutes les cultures *in vitro* ont été réalisées en enceinte climatisée, dans les conditions définies ci-dessous :

- intensité lumineuse de 30 uE.m-2S-1 ; photopériode de 16 h ;
- thermopériode de 26°C le jour, 24°C la nuit.

La technique de transformation utilisée est dérivée de celle de Horsch *et al.*(1985).

Une préculture d'*Agrobacterium tumefaciens* souche LBA4404 contenant les plasmides binaires fut réalisée durant 48 h à 28°C sous agitation, dans du milieu LB additionné des antibiotiques adéquats (rifampicine et tétracycline). La préculture a ensuite été diluée au 50^{ème} dans le même milieu et cultivée dans les mêmes conditions. Après une nuit, la culture fut centrifugée (10 min., 3000g), les bactéries ont été reprises dans un volume équivalent de milieu MS30 liquide -M0404 à 4,4 g/l, saccharose à 30 g/l, pH5,7) et cette suspension a été diluée au 10^{ème}.

Des explants d'environ 1 cm² ont été découpés à partir des feuilles des plantules décrites ci-dessus. Ils ont été ensuite mis au contact de la suspension bactérienne pendant 1 h, puis séchés rapidement sur papier filtre et placés sur un milieu de coculture (MS30 solide correspond à MS30 liquide additionné d'agar à 8 g/l, de BAP 1 m/l et d'ANA 0,1 mg/l).

Après 2 jours, les explants furent transférés en boîtes de Pétri sur le milieu de régénération MS30 (correspondant au milieu de coculture supplémenté en kanamycine à 200 mg/l et augmentin à 400 mg/l). Ce milieu contient un agent sélectif, la kanamycine (200 mg/l), un bactériostatique, l'augmentin (400 mg/l) et les hormones nécessaires à l'induction de bourgeons (BAP, 1 mg/l et ANA, 0,1 mg/l). Un repiquage des explants a été effectué sur le même milieu après 2 semaines de culture. Après 2 semaines supplémentaires, les bourgeons ont été repiqués en boîtes de Pétri sur le milieu de développement composé du milieu MS20 additionné de kanamycine et d'augmentin. Après 15 jours, les bourgeons furent repiqués de moitié. L'enracinement prend environ 20 jours, au terme desquels les plantules peuvent être clonées par bouture d'entre-noeuds ou sorties en serre.

Bibliographie

- Aisen, P. and Leibman, A. (1971) Lactoferrin and transferrin, a comparative study. *Biochim. Biophys. Acta.* **257**, 314-323
- Akin, D.T., Lu, M.Q., Lu, S.J., Kendall, S. and Arnold, R.R. (1994) Bactericidal activity of different forms of lactoferrin. Pp 61-70 *in* Adv. Exp. Med. Biol., Vol 357, Hutchens, T.W., Rumball, S.V. and Lönnerdal, B Eds. Plenum Publ. Corp.
- Altmann, F., and Marz, L. (1995) Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells : evidence to a-mannosidase II. *Glycoconjugate J.* **12**, 150-155
- Altmann, F., Kornfeld, G., Dalik, T., Staudacher, E., and Glossi, J. (1993b) Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells. N-Acetylglucosaminyltransferase I and II activities in culture lepidopteran cells. *Glycobiology.* **3**, 619-625
- Altmann, F., Tretter, V., Kubelka, V., Staudacher, E., Marz, L., and Becker, W.M. (1993a) Fucose in α 1-3 linkage to the N-glycan core forms an allergenic epitope that occurs in plant and in insect glycoproteins. *Glycoconjugate J.* **10**, 301
- Ambruso, D.R. and Johnston, R.B. (1981) Lactoferrin enhances OH radical production by human neutrophils, neutrophil particulate fractions and an enzymatic generating system. *J. Clin. Invest.* **67**, 352-360
- An, G. (1985) High efficient transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* **79**, 568-570
- Anderson, B.F., Baker, H.M., Dodson, E.J., Norris, G.E., Rumball, S.V., Waters, J.M. and Baker, E.N. (1987) Structure of human lactoferrin at 3.2 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 1769-1773
- Anderson, B.F., Baker, H.M., Norris, G.E., Rice, D.W. and Baker, E.N. (1989) Structure of human lactoferrin : crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **209**, 711-734
- Appelmelk, B.J., An, Y.Q., Geerts, M., Thijs, B.G., de Boer, H.A., Maclaren, D., Degraaff, J. and Nuijens, J.H. (1994) Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infect. Immun.* **62**, 2628-2632
- Ashwell, G. and Harford, J. (1982) Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 531-554
- Azuma, N., Mori, H., Kaminokawa, S. and Yamauchi, K. (1989) Stimulatory effect of human lactoferrin on DNA synthesis in BALB/c 3T3 cells. *Agri. Biol. Chem.* **53**, 31-35
- Baker, E.N., Anderson, B.F., Baker, H.M., Haridas, M., Jameson, G.B., Norris, G.E., Rumball, S.V. and Smith, C.A. (1991) Structure, function and flexibility of human lactoferrin. *Int. J. Biol. Macromol.* **13**, 122-129
- Baker, E.N., Rumball, S.V. and Anderson, B.F. (1987) Transferrins : insights into structure and function from studies on lactoferrin. *Trends Biochem. Sci.* **12**, 350-353
- Barton, K., Binns, A., Matze, A.J.M., Chilton, M.D (1983) Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny. *Cell* **32**, 1033-1043
- Bednarek, S.Y. and Raikhel, N.V. (1991) The barley lectin carboxy-terminal propeptide is a vacuolar sorting determinant in plants. *Plant Cell* **3**, 1195-1206
- Bellamy, W., Takase, M., Wakabayashi, H., Kawase, K and Tomita, M. (1992a) Antibacterial spectrum of lactoferricin-B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 472-479
- Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K. Wakabayashi, H., Kawase, K. and Tomita, M. (1992b) Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **1121**, 130-136

- Bellamy, W., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Takase, M., Takakura, N., Shimamura, S. and Tomita, M. (1994) Antifungal properties of lactoferricin B, a peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Lett. in Appl. Microb.* **18**, 230-233
- Bennett, R.M. and Davis, J. (1981) Lactoferrin binding to human peripheral blood cells : an interaction with a B-enriched population of lymphocytes and a sub-population of adherent mononuclear cells. *J. Immunol.* **127**, 1211-1216
- Bennett, R.M. and Kokocinski, T. (1979) Lactoferrin turnover in man. *Clinical Science* **57**, 456-460
- Bennett, R.M. and Mohla, C. (1976) A solid-phase radioimmunoassay for the measurement of lactoferrin in human plasma: variations with age, sex and disease. *J. Lab. Clin. Med.* **88**, 156-166
- Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* **12**, 8711-8721
- Bezault, J.A., Bhimani, R., Wiprovnick, J. and Furmanski, P. (1994) Human lactoferrin inhibits growth of solid tumor and development of experimental metastases in mice. *Cancer Res.* **54**, 2310-2312
- Bi, B.Y., Leveugle, B., Liu, J.L., Collard, A., Coppe, P., Roche, A.C., Nillesse, N., Capron, M., Spik, G. and Mazurier, J. (1994) Immunolocalization of the lactotransferrin receptor on the human T lymphoblastic cell line Jurkat. *Eur. J. Cell Biol.* **65**, 164-171
- Bi, B.Y., Liu, J.L., Legrand, D., Roche, A.C., Capron, M., Spik, G. and Mazurier, J. (1996) Internalization of human lactoferrin by the Jurkat human lymphoblastic T-cell line. *Eur. J. Cell Biol.* **69**, 288-296.
- Birgens, H.S., Kristensen, L.O., Borregard, N., Karle, H. and Hansen, H.E. (1988) Lactoferrin mediated transfer iron to intracellular ferritine in human monocytes. *Eur J. Haematol.* **41**, 52-57
- Bläckberg, L. and Hernell, O. (1980) Isolation of lactoferrin from human whey by a single chromatographic step. *FEBS Lett.* **109**, 180-184
- Bonnah, R.A., Yu, R.H. and Schryvers, A.B. (1995) Biochemical analysis of lactoferrin receptors in the Neisseriaceae : identification of a second bacterial lactoferrin receptor protein. *Microbial Pathogenesis*, **19**, 285-297
- Boxer, L.A., Haak, R.A., Yang, H.H., Wolach, J.B., Whitcomb, J.A., Butterick, C.J. and Behner, R.L. (1982) Membrane-bound lactoferrin alters the surface properties of polymorphonuclear leucocytes. *J. Clin. Invest.* **70**, 1049-1057
- Britigan, B.E., Hasset, D.J., Rosen, G.M., Hamill, D.R. and Cohen, M.S. (1989) Neutrophil degranulation inhibits potential hydroxyl radical formation: differential impact of myeloperoxidase and lactoferrin release on radical production by iron supplemented neutrophils assessed by spin trapping. *Biochem. J.* **264**, 447-455
- Britigan, B.E., Rosen, G.M., Thompson, B.Y., Chai, Y. and Cohen, M.S. (1986) Stimulated neutrophils limit iron-catalyzed hydroxyl radical formation as detected by spin trapping techniques. *J. Biol. Chem.* **261**, 17026-17032
- Britigan, B.E., Serody, J.S., Hayek, M.B., Charniga, L.M. and Cohen, M.S. (1991) Uptake of lactoferrin by mononuclear phagocytes inhibits their ability to form hydroxyl radicals and protects them from membrane autoperoxidation. *J. Immunol.* **147**, 4271-4277
- Brown, J.P., Hewick, R.D., Hellstrom, I., Hellstrom, K.E., Doolittle, R.F. and Dreyer W.J. (1982) Human melanoma-associated antigen P97 is structurally and functionally related to transferrin. *Nature* **296**, 171-173

- Broxmeyer, H.E., Smithyman, A., Eger, R.R., Meyers, P.A. and de Sousa, M. (1978) Identification of lactoferrin as the granulocyte-derived inhibitor of colony stimulating activity (CSA)-production. *J. Exp. Med.* **148**, 1052-1067
- Bullen, J.J. and Armstrong, J.A. (1979) The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* **36**, 781-791
- Busby, S., Kumar, A., Joseph, M., Halfpap, L., Insley, M., Berkner, K., Kurachi, K. and Woodbury, R. (1985) Expression of active human factor IX in transfected cells. *Nature*, **316**, 271-273
- Buttler, T.W., Grossi, C., Canessa, A., Pistola, V. and Barton, J.C. (1990) Immunoreactive lactoferrin in resting activated and neoplastic lymphocytes. *Leuk. Res.* **14**, 441-447
- Byatt, J.C., Schmuke, J.J., Comens, P.G., Johnson, D.A. and Collier, R.J. (1990) The effect of bovine lactoferrin on muscle growth in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 548-553
- Byrd, J.C., Tarentino, A.L., Maley, F., Atkinson, P.H. and Trimble, R.B. (1982) Glycoprotein synthesis in yeast identification of Man₈GlcNAc₂ as an essential intermediate in oligosaccharide processing. *J. Biol.Chem.* **257**,14657-14666
- Campbell, T., Skilton, R.A., Coombes, R.C., Shousha, S., Graham, M.D. and Luqmani, Y.A. (1992) Isolation of a lactoferrin cDNA clone and its expression in human breast cancer. *Br. J. Cancer* **65**, 19-26
- Caplan, A., Herrera-Estrella, L., Inze, D., Van Haute, E., Van Montagu, M., Schell, J. and Zambryski, P. (1983) Introduction of genetic material into plant cells. *Science* **222**, 815-821
- Caust, J., Dyall-Smith, M.L, Ladins, I. and Holmes, I.H. (1987) Glycosylation, an important modifier of rotavirus antigenicity. *Arch. Virol.* **96**, 123-134
- Chaabihi, H. (1992) Thèse : Etude de la régulation des gènes P10 et polyhédrine du baculovirus d'*Autographa californica* et développement de nouveaux vecteurs pour l'expression de gènes étrangers. Université d'Aix-Marseille II, Faculté des Sciences de Luminy, France.
- Chrispeels, M.J. (1991) Sorting of proteins in the secretory system. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 21-53
- Clare, J.J., Rayment, F.B., Ballantines, S.P., Sreekrishna, K. and Romanos, M. (1991) High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Bio/Technology* **9**, 455-460
- Compton, T., Nowlin, D.M. and Cooper, N.R. (1993) Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**, 834-841
- Cooper, N.R., Nowlin, D.M., Taylor, H.P. and Compton, T. (1991) Cellular receptor for human cytomegalovirus. *Transplant. Proc.* **23**, 56-59
- Courtoy, P.J., Moguilevsky, N, Retegui, L.A., Castracane, C.E. and Masson, P.L. (1984) Uptake of lactoferrin by the liver. II. Endocytosis by sinusoidal cells. *Lab. Invest.* **50**, 329-334
- Cox, T.M., Mazurier, J., Spik, G., Montreuil, J. and Peters, T.J. (1979) Iron-binding proteins and influx of iron across the duodenal brush border. Evidence for specific lactotransferrin receptors in the human intestine. *Biochim. Biophys. Acta* **588**, 120-128
- Cregg, M.J., Vedvick, T.S. and Raschke, W.C. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **11**, 905-910
- Crouch, S.P., Slater, M.K.J. and Fletcher, J. (1992) Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. *Blood* **80**, 235-240

- Cumming, D.A. (1991) Glycosylation of recombinant protein therapeutics: control and functional implications. *Glycobiology*, **1**, 115-130
- Davidson, L.A. and Lönnerdal, B. (1988) Specific binding of lactoferrin to brush-border membrane: ontogeny and effect of glycan chain. *Am. J. Physiol.* **254**, G580-G585
- De Neve, M., De Loose, M., Jacobs, A., Van Houdt, H., Kaluza, B., Weidle, U., Van Montagu, M. and Depicker, A. (1993) *Transgenic Res.* **2**, 227-237
- De Zoeten, G.A., Penswick, J.R., Horisberger, M.A., Ahl, P., Schultze, M. and Hohn, T. (1989) The expression, localization, and effect of a human interferon in plants. *Virology* **172**, 213-222
- Derisbourg, P., Wieruszkeski, J.M., Montreuil, J and Spik, G. (1990) Primary structure of glycans isolated from human leucocyte lactotransferrin: absence of fucose residues questions the proposed mechanism of hyposideraemia. *Biochem. J.* **269**, 821-825
- Devauchelle, G. and Cerutti, M. (1993) Les baculovirus d'insectes vecteurs d'expression de gènes étrangers. Dans *Les Cahiers IMABIO: Expression des protéines recombinantes* (éditeur: Centre National de la Recherche Scientifique) **9**, 19-30
- Dieryck W., Pagnier, J., Poyart, C., Marden, M.C., Gruger, V., Bournat, P., Baudino, S. and Mérot, B. (1997) Human haemoglobin from transgenic tobacco. *Nature* **386**, 29-30
- Drouet, L., Sollier, C., Cisse, M., Pignaud, G., Mazoyer, E., Fiat, A.M., Jollès, P. and Caen, J. (1990) The antithrombotic effect of KRDS, a lactotransferrin peptide, compared with RGDS. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* **32**, 59-62
- Duong, L.T., Caufield, M.P. and Rodenblatt, M. (1987) Synthetic signal peptide and analogs display different activities in mammalian and plant in vitro secretion systems. *J.Biol. Chem.* **262**, 6328-6333
- Durum, S.K., Higuchi, C. and Ron, Y. (1984) Accessory cells and T cell activation: the relationship between two components of macrophage accessory cell function. *Immunobiology* **168**, 217-219
- Eda, S., Kikugawa, K. and Beppu, M. (1996) Binding characteristics of human lactoferrin to the human monocytic leukemia cell line THP1 differentiated into macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 167-175.
- Edert, K.M., DiTullio, P. and Barry, C.A. (1994) Induction of human tissue plasminogen activator in the mammalian gland of transgenic goats. *Bio/Technology* **12**, 699-702
- Elass, A., Vergoten, G., Legrand, D., Mazurier, J., Elass-Rochard, E. and Spik, G. (1996a) Processes underlying interactions of human lactoferrin with the Jurkat human lymphoblastic T-cell line receptor - I Quantitative structure-affinity relationships studies. *Quant. Struct.-Act. Relat.* **15**, 94-101
- Elass, A., Vergoten, G., Legrand, D., Mazurier, J., Elass-Rochard, E. and Spik, G. (1996b) Processes underlying interactions of human lactoferrin with the Jurkat human lymphoblastic T-cell line receptor - II Comparative molecular field analysis. *Quant. Struct.-Act. Relat.* **15**, 102-107
- Elass-Rochard, E., Roseanu, A., Legrand, D., Trif, M., Salmon, V., Motas, C., Montreuil, J. and Spik, G. (1995) Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to *Escherichia coli* 055B5 lipopolysaccharide. *Biochem. J.* **312**, 839-845
- Ellison, R.T. and Giehl, T.J. (1991) Killing of Gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin. Invest.* **88**, 1080-1091
- Ellison, R.T., Giehl, T.J. and Laforge, F.M. (1988) Damage of the outer membrane of enteric Gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Inf. Immun.* **56**, 2774-2781

- Erdei, J., Forsgren, A. and Naidu, A.S. (1994) Lactoferrin binds to porins OmpF and OmpC in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **62**, 1236-1240
- Esaguy, N., Freire, O., Vanembden, J.D.A. and Aguas, A.P. (1993) Lactoferrin triggers *in vitro* proliferation of T-cells of Lewis rats submitted to mycobacteria-induced adjuvant arthritis. *Scand. J. Immunol.* **38**, 147-152
- Faucheux, B.A., Nillesse, N., Damier, P., Spik, G., Mouattprigent, A., Pierce, A., Leveugle, B., Kubis, N., Hauw, J.J., Agid, Y. and Hirsch, E.C. (1995) Expression of lactoferrin receptors is increased in the mesencephalon of patients with Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9603-9607
- Faye, L., Gomord, A.C., Fitchette-Laine, A.C. and Chrispeels, M.J. (1993) Affinity purification of antibodies specific for Asn-linked glycans containing α 1-3 fucose or β 1-2 xylose. *Anal. Biochem.* **209**, 104-108
- Faye, L., Jonhson, K.D., Sturm, A., and Chrispeels, M.J. (1989) Structure, biosynthesis and function of asparagine-linked glycans on plant glycoproteins. *Physiol. Plant* **75**, 309-314
- Fleer, R. (1992) Engineering yeast for high level expression. *Current Opinion in Biotechnology* **3**, 486-496
- Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. and Hirth, L. (1980) Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell* **21**, 285-294
- Fraser, M.J. (1989) Expression of eukaryotic genes in insect cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **25**, 225-235
- Friedman, A.D., Krieder, B.L., Venturelli, D. and Rovera, G. (1991) Transcriptional regulation of two myeloid-specific genes, myeloperoxidase and lactoferrin, during differentiation of the murine cell line 32D C13. *Blood* **78**, 2426-2432
- Fukuda, M.N., Sasaki, H., Lopez, L. and Fukuda, M. (1989) Survival of recombinant erythropoietin in the circulation : the role of carbohydrates. *Blood* **73**, 84-89
- Garre, C., Bianchiscarra, G., Siritto, M., Musso, M. and Ravazzolo, R. (1992) Lactoferrin binding sites and nuclear localization in K562(S) cells. *J. Cell. Physiol.* **153**, 477-482
- Giugliano, L.G., Ribeiro, S.T.G., Vainstein, M.H. and Ulhoa, C.J. (1995) Free secretory component and lactoferrin of human milk inhibit the adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* **42**, 3-9
- Gnezditskaya, E.V., Bukhova, V.P., Beletskaya, L.V., Zakharova, N.A. and Schakhanina, K.L. (1984) Lactoferrin receptors on human thymic lymphocytes. Stimulation of expression by adenosine, theophiline and supernatant of thymic lymphocytes. *Bull. Exp. Biol. Med.* **98**, 1547-1550
- Gnezditskaya, E.V., Bukhova, V.P., Zakharova, N.A. and Malkina, L.A. (1987) Lactoferrin induced stimulation of Fc- μ and Fc- γ receptor expression on the surface of human thymus lymphocytes *in vitro*. *Bull. Exp. Biol. Med.* **4**, 447-449
- Goavec, M., Mazurier, J., Montreuil J., and Spik, G. (1985) Rôle des glycanes dans la fixation de la sérotransferrine et de la lactotransferrine sur les macrophages alvéolaires humains. *C. R. Acad. Sci, Paris* **301**, 689-692
- Goldwasser, E., Kung, C.K.H. and Eliason, J. (1974) On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. XIII. The role of sialic acid in erythropoietin action. *J. Biol. Chem.* **249**, 4202-4026
- Gomord, V. Salier, J.F. and Faye Loïc (1996) Plante et médicament, un nouveau départ. *Biofutur* **154**, 26-30

- Grabenhorst, E., Hoffmann, A., Nimtz, M., Zettlmeissl, G., and Conradt, H.S. (1995) Construction of stable BHK-21-cells coexpressing human secretory glycoproteins and human Gal(β -1-4)GlcNAc- α -2,6-sialyltransferase α -2,6-linked NeuAc is preferentially attached to the Gal(β -1-4)GlcNAc(β -1-2)Man(α -1-3)-branch of biantennary oligosaccharides from secreted recombinant β -trace protein. *Eur. J. Biochem.* **232**, 718-725
- Granados, R.R. and Federeci, B.A. (1986a) The biology of baculoviruses. Vol. I Biological properties and molecular biology, CRC Press Inc., Boca Raton, F.L.
- Granados, R.R. and Federeci, B.A. (1986b) The biology of baculoviruses. Vol. II Practical applications for insect control, CRC Press Inc., Boca Raton, F.L.
- Gray-Owen, S.D. and Schryvers, A.B. (1996) Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends in Microbiol.* **4**, 185-191
- Green, M.R. and Pastewka, J.V. (1978) Lactoferrin is a marker for prolactin response in mouse mammary explants. *Endocrinology* **103**, 1510-1513
- Gribben, J.G., Devereux, S., Thomas, N.S.B., Keim, M., Jones, H.M., Goldstone, A.H. and Linch, D.C. (1990) Development of antibodies to unprotected glycosylation sites on recombinant human GM-CSF. *Lancet*, **335**, 434-437
- Grinna, L.S. and Tschopp, J.F. (1989) Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast* **5**, 107-115
- Groner, A. (1986) in « The biology of baculoviruses » Granados, R.R. and Federici, B.A., eds CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp. 177-202
- Gutteridge, J.M.C., Paterson, S.K., Segal, A.W. and Halliwell, B. (1981) Inhibition of lipid peroxidation by the iron binding protein lactoferrin. *Biochem. J.* **199**, 259-261
- Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E., Wall, R.J., Bolt, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R.D. and Brinster, R.L. (1985) Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* **315**, 680-683
- Hangoc, G., Falkenburg, J.H.F. and Broxmeyer, H.E. (1991) Influence of lymphocytes-T and lactoferrin on the survival-promoting effects of Il-1 and Il-6 on human bone marrow granulocyte-macrophage and erythroid progenitor cells. *Exp. Hematol.* **19**, 697-703
- Haridas, M., Anderson, B.F. and Baker, E.N. (1995) Structure of human diferric lactoferrin refined at 2.2 Å resolution. *Acta Crystallogr.* **51**, 629-646
- Harmsen, M.C., Swart, P.J., Debethune, M.P., Pauwels, R., Declercq, E., The, T.H. and Meijer, D.K.F. (1995) Antiviral effects of plasma and milk proteins : lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro. *J. Infect. Dis.* **172**, 380-388
- Hashizume, S., Kuroda, K. and Murakami, H. (1983) Identification of lactoferrin as an essential growth factor for human lymphocytic cell lines in serum-free medium. *Biochim. Biophys. Acta* **763**, 377-382
- Hattori, T., Ichihara, S. and Nakamura K (1987) Processing of plant vacuolar protein precursor in vitro. *Eur. J. Biochem.* **166**, 533-538
- Hattori, T., Nakagawa T., Maeshima, M., Nakamura, K. and Asashi, T. (1985) Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for sporamine, the major soluble protein of sweet potato tuberous roots. *Plant Mol. Biol.* **5**, 313-320
- Hattori, T., Yoshida, N., and Nakamura, K. (1989) Structural relationship among the members of a multigene family coding for the sweet potato tuberous root storageprotein. *Plant Mol. Biol.* **13**, 563-572

- Hayakawa, T., Kondo, T., Murase, T., Harad, H., Ochi, K. And Tanaka, J. (1993) Secretory component and lactoferrin in pure pancreatic juice in chronic pancreatitis. *Dig. Dis.Sci.* **38**, 7-11
- He, J.L. and Furmanski, P. (1995) Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature* **373**, 721-724
- Herman, L., Jacobs, A., Van Montagu, M. and Depicker, A. (1990) Plant chromosome/marker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integration events. *Mol. Gen. Genet.* **224**, 248-256
- Herscovics, A.O. and Orlean, P. (1993) Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J.* **7**, 540-550
- Herzen, P.A. (1985) Quantitative immunoenzyme determination of lactoferrin and alpha lactalbumin in the blood serum cancer patients. *Eksp. Onkol.* **7**, 56-60
- Heylar, L; and Sherman, A.R. (1987) Iron deficiency and Ill production by rat leucocytes. *Amer. J. Clin. Nutr.* **46**, 346-352
- Hiatt, A., Cafferkey, R. and Bowdish, K. (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* **342**, 76-78
- Hoekema, A., Hirsh, P.R., Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A. (1983) A binary vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Nature* **303**, 179-180
- Hooykaas, P.J.J. and Beijersbergen, A.G.M. (1994) The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**, 157-179
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffman, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G. and Fraley, R.T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**, 1229-1231
- Houdebine, L.M. (1995) The production of pharmaceutical proteins from the milk of transgenic animals. *Reprod. Nutr. Dev.* **35**, 609-617
- Howard, E.A., Zupan, J.R., Citovski, V. and Zambryski, P.C. (1992) The virD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* contains a C-terminal bipartite nuclear localisation signal : implications for nuclear uptake of DNA in plant cells. *Cell* **68**, 109-118
- Hu, W.L., Mazurier, J., Montreuil, J. and Spik, G. (1990) Isolation and partial characterization of a lactotransferrin receptor from mouse intestinal brush border. *Biochemistry* **29**, 535-541
- Hu, W.L., Mazurier, J., Sawatzki, G., Montreuil, J.M. and Spik, G. (1988) Lactotransferrin receptor of mouse small-intestinal brush border *Biochem. J.* **249**, 435-441
- Huettinger, M., Retzek, H., Hermann, M., and Goldenberg, H. (1992) Lactoferrin specifically inhibits endocytosis of chylomicron remnants but not alpha-macroglobulin. *J. Biol. Chem.* **267**, 18551-18557
- Hunt, R.C., Riegler, R. and Davis, A.A. (1989) Changes in glycosylation alter the affinity of the human transferrin receptor for its ligand. *J. Biol. Chem.* **264**, 9643-9648
- Hurley, W.L., Hegarty, H.M. and Metzler, J.T. (1994) In vitro inhibition of mammary cell growth by lactoferrin: a comparative study. *Life Sci.* **55**:1955-1963
- Hutchens, T.W., Henry, J.F., Yip, T.T., Hachey, D.L., Schanler, R.J., Motil, K.J. and Garza, C. (1991) Origin of intact lactoferrin and its DNA-binding fragments found in the urine of human milk-fed preterm infants - Evaluation by stable isotopic enrichment. *Pediatr. Res.* **29**, 243-250
- Imber, M.J. and Pizzo, S.V. (1983) Clearance and binding of native and defucosylated lactoferrin. *Biochem. J.* **212**, 249-257

- Inohara, N., Shimamura, S., Fukui, T. and Futai, M. (1989) Auxin-binding protein located in the endoplasmic reticulum of maize shoots : molecular cloning and complete primary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3564-3568
- Ismail, M. and Brock, J.H. (1993) Binding of lactoferrin and transferrin to the human promonocytic cell line U937 - Effect on iron uptake and release. *J. Biol. Chem.* **268**, 21618-21625
- Iyer, S. and Lönnnerdal, B. (1993) Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. *Eur J. Clin. Nutr.* **47**, 232-241
- Jarvis, D. and Garcia, A. (1994) Biosynthesis and processing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus gp64 protein. *Virology* **205**, 300-313
- Jarvis, D.L. and Finn, E.E. (1996) Modifying the insect cell N-glycosylation pathway with immediate early baculovirus expression vectors. *Nature biotechnology* **14**, 1288-1292
- Jarvis, D.L., Bohlmeyer, D.A., Liao, Y.F., Lomax, K., Merkle, R., Weinhauf, C., (1996) Isolation and characterization of a class II α -mannosidase cDNA from lepidopteran insect cells. *Glycobiology*.
- Jenkins, N. and Curling, E.M.A. (1994) Glycosylation of recombinant proteins : problems and prospects. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 354-366
- Jones, R.L and Robinson, D.G. (1989) Protein secretion in plants. *Transley Rev.* **17**, 567-588
- Kamerling, J.P., Gerwig, G.J., Vliegenthart, J.F.G. and Clamp, J.R. (1975) Characterization by gas liquid chromatography, mass spectrometry of per-trimethylsilyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycolipids. *Biochem. J.* **151**, 491-495
- Kaufman, R.J. and Sharp, P.A. (1982) Amplification and expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolate reductase complementary DNA gene. *J. Mol. Biol.* **159**, 601-609
- Kawakami, H. and Lonnerdal, B. (1991) Isolation and function of a receptor for human lactoferrin in human fetal intestinal brush-border membranes. *Am. J. Physiol.* **261**, G841-G846
- Kawamata, T., Tooyama, I., Yamada, T., Walker, D.G. and Mcgeer, P.L. (1993) Lactotransferrin immunocytochemistry in alzheimer and normal human brain. *Am. J. Pathol.* **142**, 1574-1585
- Kiefer, M.C., Ishihara, M., Swiedler, S.J., Crawford, K., Stephans, J.C. and Barr, P.J. (1991) The molecular biology of heparan sulfate fibroblast growth factor receptors. *Ann. NY Acad. Sci.* **638**, 167-176
- Kijlstra, A. and Broersma, L. (1984) Lactoferrin stimulates the production of leucocyte migration inhibitory factor by human peripheal mononuclear leucocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **55**, 459-464
- Kijlstra, A. and Jeurissen, S.H.M. (1982) Modulation of classical C3 convertase of complement by tear lactoferrin. *Immunology*. **47**, 263-270
- Kniskern, P.J., Hagopian, A., Burke, P., Schulz, L.D., Montgomery, D.L., Hurni, W.M., et al. (1994). Characterization and evaluation of a recombinant hepatitis-B vaccine expressed in yeast defective for N-linked hyperglycosylation. *Vaccine* **12**, 1021-1025
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 631-664
- Krimpenfort, P., Rademakers, A., Eyestone, W., van der Schans A., van den Broeck, S., Kooiman, P., Kootwijk, E., Platenbourg, G., Pieper, F., Strijker, R., and de Boer, H. (1991)

Generation of transgenic dairy cattle using in vitro embryo production. *Bio/Technology* **9**, 944-847

Kubelka, V., Altmann, F., Kornfeld, G., and Marzt, L. (1994) Structures of the N-linked oligosaccharides of the membrane glycoproteins from three lepidopteran cells (Sf-21, IZD-Mb-0503, Bm-N). *Arch. Biochem. Biophys.* **308**, 148-157

Kulics, J. and Kijlstra, A. (1987) The effect of lactoferrin on complement mediated modulation of immune complex size. *Immunol. Lett.* **14**, 349-353

Kuruzinska, M.A., Bergh, M.L.E. and Jackson, B.J. (1987) Protein glycosylation in yeast. *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 915-944

LaBranche, C.C., Clark, S.C., Johnson, G.D., Ornstein, D., Sabath, D.E., Tushinski, R., Paethau, V. and Prystowsky, M.B. (1990) Deletion of carboxyl-terminal residues of murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor results in a loss of biologic activity and altered glycosylation. *Arch. Biochem. Biophys.* **276**, 153-159

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* **227**, 680-685

Langer, B.G., Weisel, J.W., Dinauer, P.A., Nagaswami, C and Bell, W.R. (1988) Deglycosylation of fibrinogen accelerates polymerization and increases lateral aggregation of fibrin fibers. *J. Biol. Chem.* **263**, 15056-15063

Leatherbarrow, R.J., Rademacher, T.W. and Dwek, R.A. (1985) Effector functions of a monoclonal aglycosylated mouse IgG2a : binding and activation of complement component C1 and interaction with human monocyte Fc receptor. *Mol. Immunol.* **22**, 407-415

Lee, E.U., Roth, J., and Paulson, J.C. (1989) Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of β -galactoside α 2,6-sialyltransferase. *J. Biol. Chem.* **264**, 13848-13855

Leffel, M.S. and Spitznagel, J.K. (1972). Association of lactoferrin with lysozyme in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* **6**, 761-765

Légrand, D., Mazurier, J., Aubert, J.P., Loucheux-Lefebvre, M.H., Montreuil, J. and Spik, G. (1986) Evidence for interactions between the 30kDa N- and 50kDa C-terminal tryptic fragments of human lactotransferrin. *Biochem. J.* **236**, 839-844

Légrand, D., Mazurier, J., Ellass, A., Rochard, E., Vergoten G., Maes, P., Montreuil, J. and Spik, G. (1992) Molecular interactions between human lactotransferrin and the phytohemagglutinin-activated human lymphocyte lactotransferrin receptor lie in two loop-containing regions of the N-terminal domain-I of human lactotransferrin. *Biochemistry* **31**, 9243-9251

Légrand, D., Mazurier, J., Maes, P., Rochard, E., Montreuil, J. and Spik, G. (1991) Inhibition of the specific binding of human lactotransferrin to human peripheral-blood phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes by fluorescein labelling and location of the binding site. *Biochem. J.* **276**, 733-738

Légrand, D., Salmon, V., Coddeville, B., Benaïssa, M., Plancke, Y. and Spik, G. (1995) Structural determination of two N-linked glycans isolated from recombinant human lactoferrin expressed in BHK cells. *FEBS Lett.* **365**, 57-60

Lehle, L., Eiden, A., Lehnert, K., Haselbeck, A., and Kopetzki, E. (1995) Glycoprotein-biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*-ngd29, an N-glycosylation mutant allelic to och1 having a defect in the initiation of outer chain formation. *FEBS Lett.* **370**, 41-45

- Lerouge, P., Fichette-Laine, A.C., Chekkafi, A., Avidgor, V. and Faye, L. (1996) N-linked oligosaccharide processing is not necessary for glycoprotein secretion in plants. *The Plant Journal*. **10**,713-719.
- Leveugle, B., Faucheux, B.A., Bouras, C., Nillesse, N., Spik, G., Hirsch, E.C., Agid, Y. and Hof, P.R. (1996) Cellular distribution of the iron binding protein lactotransferrin in the mesencephalon of Parkinson's disease cases. *Acta Neuropathol.* **91**, 566-572
- Leveugle, B., Mazurier, J., Legrand, D., Mazurier, C., Montreuil, J. and Spik, G. (1993) Lactotransferrin binding to its platelet receptor inhibits platelet aggregation. *Eur. J. Biochem.* **213**,1205-1211
- Leveugle, B., Spik, G., Perl, D.P., Bouras, C., Fillit, H.M. and Hof, P.R. (1994) The iron-binding protein lactotransferrin is present in pathologic lesions in a variety of neurodegenerative disorders: A comparative immunohistochemical analysis. *Brain Res.* **650**, 20-31
- Liang, Q. W. and Richardson, T. (1993) Expression and characterization of human lactoferrin in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agr. Food Chem.* **41**, 1800-1807
- Liu, Y.H. and Teng, C.T. (1991) Characterization of estrogen-responsive mouse lactoferrin promoter. *J. Biol. Chem.* **266**, 21880-21885
- Liu, Y.H., Yang, N.Y. and Teng, C.T. (1993) COUP-TF acts as a competitive repressor for estrogen receptor-mediated activation of the mouse lactoferrin gene. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1836-1846
- Lomax, K.J., Gallin, J.I., Rotrosen, D., Raphael, G.D., Kaliner, M.A., Benz, E.J., Boxer, L.A. and Malech, H.L. (1989) Selective defect in myeloid cell lactoferrin gene expression in neutrophil specific granule deficiency. *Int. J. Clin. Invest.* **83**, 514-519
- Lönnerdal, B. and Forsum, E. (1985) Casein content of human milk. *Am. J. Clin. Nutr.* **41**, 113-120
- Lönnerdal, B. and Hernell, O. (1994) Iron, zinc, copper and selenium status of breast-fed infants and infants fed trace element fortified milk-based infant formula. *Acta Paediat.* **83**, 367-373
- Lopez, M., Coddeville, B., Langridge, J., Plancke, Y., Sautière, P., Chaabihi, H., Chirat, F., Harduin-Lepers, A., Cerutti, M., Verbert, A. and Delannoy, P. (1997) Microheterogeneity of the oligosaccharides carried by the recombinant bovine lactoferrin expressed in *Mamestra brassicae* cells. *Glycobiology.* **7** 635651
- Lu, L., Shen, R.N., Zhou, S.H., Srivastava, C., Harrington, M., Miyazawa, K., Wu., B., Lin, Z.H., Ruscetti, S. and Broxmeyer, H.E. (1991) Synergistic effect of human lactoferrin and recombinant murine interferon- γ on disease progression in mice infected with the polycythemia-inducing strain of the Friend virus complex. *Intern. J. Hematol.* **54**, 117-124
- Luckow, V.A. (1990) in « Recombinant DNA technology and applications » (Prokop, A., Bajpai, R.K. and Ho, C.S., eds) McGraw-Hill Inc., pp. 97-152
- Luckow, V.A. and Summers, M. D. (1988) Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technology*, **6**, 47-55
- Luqmani, Y.A., Campbell, T.A., Bennett, C., Coombes, R.C. and Paterson, I.M. (1991) Expression of lactoferrin in human stomach. *Int. J. Cancer* **49**, 684-687
- Lydon, J.P., O'Malley, B.R., Saucedo, O., Lee, T., Headon, D.R. and Conneely, O.M. (1992) Nucleotide and primary amino acid sequence of porcine lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **1132**, 97-99

- Ma, J.K.C. and Hein, M.B. (1995) Immunotherapeutic potential of antibodies produced in plants. *Trends Biotechnol.* **13**, 522-527
- Machnicki, M., Zimecki, M. and Zagulski, T. (1993) Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 *in vivo*. *Int. J. Exp. Pathol.* **74**, 433-439
- Maneva, A.I., Sirakove, L.M. and Manev, V.V. (1983) Lactoferrin binding to neutrophilic polymorphonuclear leucocytes. *Int. J. Biochem.* **15**, 981-984
- Maniatis, T., Fritish, E.F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Press,
- Mann, D.M., Romm, E. and Migliorini, M. (1994) Delineation of the glycosaminoglycan-binding site in the human inflammatory response protein lactoferrin. *J. Biol. Chem.* **269**, 23661-23667
- Marchetti, M., Longhi, C., Pia Conte, M., Pisani, S., Valenti, P. and Seganti, L (1996) Lactoferrin inhibits herpes simplex virus type 1 adsorption to Vero cells. *Antiviral Research* **29**, 221-231
- Mason, P.L., and Taylor, C.R. (1978) Distribution of transferrin, ferritin and lactotransferrin in human tissues. *J.Clin. Pathol.* **31**, 316-327
- Masson, P.L. (1970) La Lactoferrine, protéine des sécrétions externes et des neutrophiles (Masson P.L., ed), pp.93-165, Editions Arsca, Bruxelles
- Masson, P.L. and Heremans, J.F. (1971) Lactoferrin in milk from different species. *Comp. Biochem. Physiol.* **39B**, 119-129
- Masson, P.L., Heremans, J.F. and Schonke, E. (1969) Lactoferrin, an iron binding protein in neutrophilic leukocytes. *J. Exp. Med.* **130**, 643-657
- Matsumoto, S., Ikura, K., Ueda, M. and Sasaki, R. (1995) Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol. Biol.*, **27**, 1163-1172
- Matsuoka, K. and Nakamura, K. (1991) Propeptide of a precursor to a plant vacuolar protein required for vacuolar targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 834-838
- Mattsby-Baltzer, I., Roseanu, A., Motas, C., Elverfors, J., Engberg, I. and Hanson, L.A. (1996) Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells. *Pediatric Research* **40**, 457-262
- Mazoyer, E., Levy-Toledano, S., Rendu, F., Hermant, L., Lu, H., Fiat A., Jollès, P. and Caen, J. (1990) KRDS, a new peptide derived from human lactotransferrin, inhibits platelet aggregation and release reaction. *Eur. J. Bioch.* **194**, 43-49
- Mazurier, J. and Spik, G. (1980) Comparative study of the iron-binding properties of human transferrins. I. Complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactotransferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **629**, 399-408
- Mazurier, J., Léger, D., Tordera, V., Montreuil, J. and Spik, G. (1981) Comparative study of the iron binding of transferrins. Differences in the involvement of histidine residues as revealed by carbethoxylation. *Eur. J. Biochem.* **119**, 537-543
- Mazurier, J., Legrand, D., Hu, W.L., Montreuil, J. and Spik, G. (1989) Expression of human lactotransferrin receptors in phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes. Isolation of the receptors by anti-ligand affinity chromatography. *Eur. J. Biochem.* **179**, 481-487
- Mazurier, J., Montreuil, J. and Spik, G. (1985) Visualization of lactotransferrin brush-border receptors by ligand-blotting. *Biochim. Biophys. Acta* **821**, 453-460

- Mc Abee, D.D. (1995) Isolated rat hepatocytes acquire iron from lactoferrin by endocytosis. *Biochem. J.* **311**, 603-609
- Mc Abee, D.D. and Esbensen, K. (1991) Binding and endocytosis of apo-lactoferrin and holo-lactoferrin by isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **266**, 23624-23631
- Mc Abee, D.D. and Ling, Y.Y. (1997) Iron-loading of cultured adult rat hepatocytes reversibly enhances lactoferrin binding and endocytosis. *J. Cell. Physiol.* **171**, 75-86
- Mc Bride, K.E. and Summerfelt, K.R. (1990) Improved binary vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **14**, 269
- Mc Cormick, J.A., Markey, G.M. and Morris, T.C.M. (1991) Lactoferrin-inducible monocyte cytotoxicity for K562 cells and decay of natural killer lymphocyte cytotoxicity. *Clin. Exp. Immunol.* **83**, 154-156
- McFarlane, I.G. (1983) Hepatic clearance of serum glycoproteins. *Clin. Sci.*, **64**, 127-135
- Meilinger, M., Haumer, M., Szakmary, K.A., Steinbock, F., Scheiber, B., Goldenberg, H. and Huettinger, M. (1995) Removal of lactoferrin from plasma is mediated by binding to low density lipoprotein receptor-related protein alpha(2)-macroglobulin receptor and transport to endosomes. *FEBS Lett.* **360**, 70-74
- Metz-Boutigue, M.H., Jollès, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J. and Jollès, P. (1984) Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur. J. Biochem.* **145**, 659-676
- Mikogami, T., Heyman, M., Spik, G. and Desjeux, J.F. (1994) Apical to basolateral transepithelial transport of human lactoferrin in the intestinal cell line HT-29cl 19A. *J. Am. Physiol.* **267**, G308-G315
- Mikogami, T., Marianne, T. and Spik, G. (1995) Effect of intracellular iron depletion by picolinic acid on expression of the lactoferrin receptor in the human colon carcinoma cell subclone HT29-18-C-1. *Biochem. J.* **308**, 391-397
- Miller, L. K. (1988) Baculoviruses as gene expression vectors. *Annu. Rev. Microbiol.*, **42**, 177-199
- Mitra, A., Zhang, Z.Y. (1994) Expression of a human lactoferrin cDNA in tobacco cells produces antibacterial protein(s). *Plant Physiol.* **106**, 977-981
- Model, P., Russel, M. (1990) Procaryotic secretion. *Cell* **61**, 739-741
- Moguilevsky, N., Retegui, L.A. and Masson, P.L. (1985) Comparison of human lactoferrins from milk and neutrophilic leucocytes. Relative molecular mass, isoelectric point, iron-binding properties and uptake by the liver. *Biochem. J.* **229**, 353-359
- Molloy, A.L. and Winterbourn, C.C. (1990) Release of iron from phagocytosed *Escherichia coli* and uptake by neutrophilic latoferrin. *Blood* **75**, 984-989
- Montreuil, J., Tonnelat, J. and Mullet, S. (1960) Préparation et propriétés de la lactosidérophiline (lactotransferrine) du lait de Femme. *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 413-421
- Moonen, P., Mermod, J., Ernst, J.F., Hirschi, M. and DeLamarter, J.F. (1987) Increased biological activity of deglycosylated recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor produced by yeast or animal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 4428-4431
- Morgan, O.S., Bankey, J. and Quash, G.A. (1975) The effect of lactoferrin, an iron binding protein, on complement activity. *West Indian. Med.* **24**, 46-54

- Nakamura, K., Matsuoka, K., Mukumo, F., and Watanabe, N. (1993) Processing and transport to the vacuole of a precursor to sweet potato sporamin in transformed Tobacco cell line BY-2. *J. Exp. Bot.* **44**, 331-338
- Nelson, K.G., Takahashi, T., Bossert, N.L., Walmer, D.K. and McLachlan, J.A. (1991) Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 21-25
- Newbold, R.R., Teng, C.T., Beckman, W.C., Jefferson, W.N., Hanson, R.B., Miller, J.V. and McLachlan, J.A. (1992) Fluctuations of lactoferrin protein and messenger ribonucleic acid in the reproductive tract of the mouse during the estrous cycle. *Biol. Reprod.* **47**, 903-915
- Neyts, J., Snoeck, R. and Schols, D. (1992) Sulfated polymers inhibit the interaction of human cytomegalovirus with cell surface heparan sulfate. *Virology* **189**, 48-58
- Nichols, B.L., MacKee, K.S. and Huebers, H.A. (1990) Iron is not required in the lactoferrin stimulation of thymidine incorporation into the DNA of rat crypt cells. *Pediatr. Res.* **27**, 525-528
- Nichols, B.L., MacKee, K.S., Putman, M., Henry, J.F. and Nichols, V.N. (1989) Human lactoferrin supplementation of infants formulas increases thymidine incorporation into the DNA of rat crypt cells. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **8**, 102-109
- Nichols, B.L., MacKee, K.S., Henry, J.F. and Putman, M. (1987) Human lactoferrin stimulates thymidine incorporation into DNA of rat crypt cells. *Pediatr. Res.* **21**, 563-567
- Nikawa, H., Samaranayake, L.P. and Hamada, T. (1995) Modulation of the anti-Candida activity of apo-lactoferrin by dietary sucrose and tunicamycin *in vitro*. *Arch. Oral Biol.* **40**, 581-584
- Nikawa, H., Samaranayake, L.P., Tenovuo, J., Pang, K.M. and Hamada, T. (1993) The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Arch. Oral Biol.* **38**, 1057-1063
- Nikawa, H., Samaranayake, L.P., Tenovuo, J. and Hamada, T. (1994) The effect of antifungal agents on the *in vitro* susceptibility of *Candida albicans* to apo-lactoferrin. *Arch. Oral Biol.* **39**, 921-923
- Nillesse, N., Pierce, A., Lecocq, M., Benaissa, M. and Spik, G. (1994) Expression of the lactotransferrin receptor during the differentiation process of the megakaryocyte Dami cell line. *Biol. Cell* **82**, 149-159
- Nishiya, K. and Horwitz, D.A. (1982) Contrasting effects of lactoferrin on human lymphocytes and monocytes natural killer activity and antibody dependent cell mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* **129**, 2519-2523
- Nose, M. and Wigzell, H. (1983) Biological significance of carbohydrate chains on monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6632-6636
- Nuijens, J.H., van Berkel, P.H.C., Geerts, M.E.J., Hartevelt, P.H., de Boer, H.A., van Veen, H.A. and Pieper, F.R. (1997) Characterization of recombinant human lactoferrin secreted in milk of transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **272**, 8802-8807
- Odell, J.T., Knowlton, S., Lin, W. And Macauvais, C.J. (1988) Properties of an isolated transcription-stimulating sequence derived from the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Plant molecular Biology* **10**, 263-272
- Odell, J.T., Nagy, F., Chua, N.H. (1985) Identification of sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**, 810-812

- Oguchi, S., Walker, W.A. and Sanderson, I.R. (1995) Iron saturation alters the effect of lactoferrin on the proliferation and differentiation of human enterocytes (Caco-2 cells). *Biol. Neonate* **67**, 330-339
- Orfanoudakis, G. and Egly, J.M. (1993) Expression de protéines hétérologues- : les systèmes procaryotes. *Biofutur*, n°124, cahier n°59.
- Oria, R., Alvarez-Hernandez, X., Liceaga, J. and Brock, J.H. (1988) Uptake and handling of iron from transferrin, lactoferrin and immune complexes by macrophage cell line. *Biochem. J.* **252**, 221-225
- Oseas, R., Yang, H.H., Baehner, R.L. and Boxer, L.A. (1981) Lactoferrin : a promotor of polymorphonuclear leukocytes adhesiveness. *Blood* **57**, 939-945
- Osmand, A.P., Switzer, R.C. (1991) Differential distribution of lactoferrin and Alz-50 immunoreactivities in neuritic plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Alzheimer's disease : basic mechanisms, Diagnosis and therapeutic strategies*. Pp 219-228. Iqbal, K., McLachlan, D.R.C., Winblad, B. Wisniewski, H.M. Eds. Chichester Wiley.
- Owen, M.R.L., Gandecha, A., Cockburn, W. And Whitelam, G.C. (1992) The expression of antibodies in plants. *Chemistry and industry* **11**, 406-408
- Parker, R.I., Mckeown, L.P., Gallin, J.I. and Gralnick, H.R. (1992) Absence of the largest platelet-von willebrand multimers in a patient with lactoferrin deficiency and a bleeding tendency. *Thromb. Haemost.* **67**, 320-324
- Pejler, G. (1996) Lactoferrin regulates the activity of heparin proteoglycan-bound mast cell chymase : characterization of the binding of heparin to lactoferrin. *Biochem. J.* **320**, 897-903
- Penn, E., Almer, S., Bodemar, G., Ryden, B.O., Sjölin, C., Tejle, K. and Skogh, T.T. (1993) Anti-lactoferrin antibodies and other types of ANCA in ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis and Chron's disease. *Gut* **34**, 56-62
- Pentecost, B.T. and Teng, C.T. (1987) Lactotransferrin is the major estrogen inducible protein of mouse uterine secretions. *J. Biol. Chem.* **262**, 10134-10139
- Perraudin, J.P. and Prieels J.P. (1982) Lactoferrin binding to lysozyme treated *Micrococcus luteus*. *Biochim. Biophys. Acta* **718**, 42-48
- Pettersson, A., Kolarenbeek, V., Vandeurzen, J., Poolman, J.T. and Tommassen, J. (1994) Molecular characterization of the structural gene for the lactoferrin receptor of the meningococcal strain H44/76. *Microb. Pathog.* **17**, 395-408
- Pierce, A., Colavizza, D., Benaissa, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J. and Spik, G. (1991) Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* **196**, 177-184
- Platenburg, G.J., Kootwijk, E.P.A., Kooiman, P.M., Woloshuk, S.L., Nuijens, J.H., Krimpenfort, P.J.A., Pieper, F.R., Deboer, H.A., and Strijker, R. (1994) Expression of human lactoferrin in milk of transgenic mice. *Transgenic Res.* **3**, 99-108
- Plow, E.F., McEver, R.P., Collier, B.S., Woods, V.L., Marguerier, G.A. and Ginsberg, M.H. (1985) Related binding mechanisms for fibrinogen, fibronectin and thrombin-stimulated human platelets. *Blood*, **66**, 724-727
- Powell, M.J. and Ogden, J.E. (1990) Nucleotide sequence of human lactoferrin cDNA. *Nucl. Acids Res.* **18**, 4013
- Pratt, C.W., Church, F.C. (1993) General features of the heparin binding serpins antithrombin, heparin cofactor II and protein C inhibitor. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **4**, 479-

- Quinn, M.L., Weyer, S.J., Lewis, L.A., Dyer, D.W. and Wagner, P.M. (1994) Insertional inactivation of the gene for the meningococcal lactoferrin binding protein. *Microb. Pathog.* **17**, 227-237
- Rado, T.A., Bollenkens, J., St Laurent, G., Parker, L. and Benz, E. (1984) Lactoferrin biosynthesis during granulopoiesis. *Blood* **64**, 1103-1109
- Rado, T.A., Wei, X. and Benz, E.J. (1987) Isolation of lactoferrin cDNA from a human myeloid library and expression of mRNA during normal and leukemic myelopoiesis. *Blood*, **70**, 989-993
- Reese, J.H., Mcneal, J.E., Goldenberg, S.L., Redwine E.A. and Sellers, R.G. (1992) Distribution of lactoferrin in the normal and inflamed human prostate - An immunohistochemical study. *Prostate* **20**, 73-85
- Ren, J., Bretthauer, R.K. and Catellino, F.J. (1995) Purification and properties of golgi derived (α -1,2)-mannosidase I from baculovirus-infected lepidopteran insect cells (IPLB-Sf21AE) with preferential activity towards mannose, N-Acetylglucosamine. *Biochemistry* **34**;2489-2495
- Rey, M.W., Woloshuk, S.L., deBoer, H.A. and Pieper, F.R. (1990) Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin. *Nucl. Acids Res.* **18**, 5288
- Rochard, E., Legrand, D., Lecocq, M., Hamelin, R., Crépin, M., Montreuil, J. and Spik, G. (1992) Characterization of lactotransferrin receptor in epithelial cell lines from non-malignant human breast, benign mastopathies and breast carcinomas. *Anticancer Res.* **12**, 2047-2052.
- Rochard, E., Legrand, D., Mazurier, J. Montreuil, J. and Spik, G. (1989) The N-terminal domain I of human lactotransferrin binds specifically to phytohemagglutinin peripheral blood human lymphocyte receptor. *FEBS Lett.* **255**, 201-205
- Roiron, D., Amouric, M., Marvaldi, J. and Figarella, C. (1989) Lactoferrin-binding sites at the surface of HT29-D4 cells. *Eur. J. Biochem.* **186**, 367-373
- Roiron-Lagrour, D. and Figarella, C. (1994) Further evidence of different lactoferrin and transferrin binding sites on human HT29-D4 cells. Effects of lysozyme, fucose and cathepsin G. Comparison with transferrin. *BBA - Mol. Cell Res.* **1224**, 441-444.
- Roiron-Lagrour, D. and Figarella, R. (1990) Evidence for a different mechanism of lactoferrin and transferrin translocation on HT 29-D4 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**, 837-842
- Romanos, M.A., Scorer, C.A. and Clare, J.J. (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, **8**, 423-488
- Saarinen, U.M. and Siimes, M.A. (1977) Iron absorption from infant milk formula and the optimal level of iron supplementation. *Acta Paediatr. Scand.* **66**, 719-722
- Sanchez, L. Calvo, M. and Brock, J.H. (1992) Biological role of lactoferrin. *Arch. Dis. Child.* **67**, 657-661
- Sanchez, L., Ismail, M., Liew, F.Y. and Brock, J. (1996) Iron transport across Caco-2 cell monolayers. Effect of transferrin, lactoferrin and nitric oxide. *Biochim. Biophys. Acta.* **1289**, 291-297
- Sanders P.R., Winter, J.A., Zanarson, A.R., Rogers, S.G., Fraley, RT (1987) Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucl Acid Res.* **4**, 1543-1558
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Sci. USA* **74**, 5463-5467

- Sasaki, H., Ochi, N., Dell, A. and Fukuda, M. (1988) Site-specific glycosylation of human recombinant erythropoietin : analysis of glycopeptides or peptides at each glycosylation site by fast atom bombardment mass spectrometry. *Biochemistry* **27**, 8618-8626
- Sato, K., Shinmoto, H., Tanimoto, M., Dosako, S. and Nakajima, I. (1990). Uptake and re-secretion of human lactoferrin by B-lymphocytes. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 1275-1279
- Sayers, J.R., Schmidt, W. and Eckstein, F. (1988) Strand specific cleavage of phosphothionate containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide. *Nucl. Acids Res.* **16**, 791-802
- Scatchard, G. (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. NY Acad. Sci.* **51**, 660-672
- Schade, A.L. and Caroline L. (1946) An iron binding component of human blood plasma. *Science* **104**, 340-341
- Schein, C. (1989) Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Bio/Technology* **7**, 1141-1149
- Selden, R.F., Howie, K.B., Rowe, M.E., Goodman, H.M. and Moore, D.D. (1986) Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 3173-3179
- Sharon, N. and Lis, H. (1989) Lectins as cell recognition molecules. *Science* **246**, 227-234
- Shau, H., Kim, A and Golub, H. (1992) Modulation of natural killer and lymphokine activated killer cell cytotoxicity by lactoferrin. *J. Leukocyte Biol.* **51**, 343-349
- Shi, H.P. and Teng, C.T. (1994) Characterization of a mitogen-response unit in the mouse lactoferrin gene promoter. *J. Biol. Chem.* **269**, 12973-12980
- Shi, H.P. and Teng, C.T. (1996) Promoter-specific activation of mouse lactoferrin gene by epidermal growth factor involves two adjacent regulatory elements. *Mol Endo.* **10**, 732-741
- Shimizu, K., Matsuzawa, H., Okada, K., Tazume, S., Dozako, S., Kawazaki, Y., Hashimoto, K. and Koga, Y. (1996) Lactoferrin mediated protection of the host from murine cytomegalovirus infection by a T-cell-dependent augmentation of natural killer cell activity. *Arch. Virol.* **141**, 1875-1889
- Siebert, P.D., and Huang, B.C.B. (1997) Identification of an alternative form of human lactoferrin mRNA that is expressed differentially in normal tissues and tumor-derived cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2198-2203
- Siimes, M.A., Salpenperä, L. and Perheentupa, J. (1984) Exclusive breast feeding for 9 months : risk of iron deficiency. *J. Pediatr.* **104**, 196-199
- Sijmons, P.C., Dekker, B.M.M., Schrammeijer, B., Verwoerd, T.C., van den Elzen, P.J.M. and Hoekema, A. (1990) Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants *Bio/Technology* **8**, 217-221
- Skehel, J.J., Stevens, D.J., Daniels, R.S., Douglas, A.R., Knossow, M., Wilson, J.A. and Wiley, D.C. (1984) A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1779-1783
- Söderberg, C., Giugni, T.D., Zaia, J.A., Larsson, S., Wahlberg, J.M., and Möller, E. (1993) CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* **67**, 6576-6585
- Sonnevald, U., Brauer, M., von Schaeveen, A., Stitt, M. and Willmitzer, L. (1991) Transgenic tobacco plants expressing yeast derived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast : a powerful tool for studying sucrose metabolism and sink/source interactions. **1**, 95-106

- Soukka, T., Lumikari, M. and Tenovuo, J. (1991) Combined inhibitory effect of lactoferrin and lactoperoxidase system on the viability of streptococcus-mutans, serotype-C. *Scand. J. Dent. Res.* **99**, 390-396
- Soukka, T., Tenovuo, J. and Lenanderlumikari, M. (1992) Fungicidal effect of human lactoferrin against *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **90**, 223-228
- Spik, G. (1988) Rôle de la lactotransferrine dans la nutrition martiale du nourrisson. *Cah. Nutr. Diét.* **23**, 121-125
- Spik, G. and Montreuil, J. (1983) Rôle de la lactotransferrine dans les mécanismes moléculaires de la défense antibactérienne. *Bull. Europ. Physiopath. Resp.* **19**, 123-130
- Spik, G., Chéron, A., Montreuil, J. and Dolby, J. (1978) Bacteriostasis of a milk-sensitive strain of *Escherichia coli* by immunoglobulins and iron-binding proteins in association. *Immunology* **35**, 663-671
- Spik, G., Coddeville, B., Mazurier, J., Bourne, Y., Cambillaux, C. and Montreuil, J. (1994) Primary and tridimensional structure of lactotransferrin glycans. Pp. 21-32 in *Adv. Exp. Med. Biol.*, T. W. Hutchens, S. Rumball and B. Lönnerdal.
- Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dorland, L., van Halbeek, H. and Vliegenthart, J.F.G. (1982) Primary structure of the glycans from human lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* **121**, 413-419
- Stinnakre, MG., Devinoy, E., and Thepot, D. (1992) Quantitative collection of milk and active recombinant proteins from the mammary gland of transgenic mice. *Anim Biotechnol.* **3**, 245-255
- Stowell, K.M., Rado, T.A., Funk, W.D. and Tweedie, J.W. (1991) Expression of cloned human lactoferrin in Baby-Hamster Kidney cells. *Biochem. J.* **276**, 349-355
- Summer, M.D. and Smith, G.E. (1987) A manual of methods for baculovirus vectors insect cell culture procedures. *Bull. Texas Agric. Exp. Stat.*, n° 1555.
- Sun, I.L., Crane, F.L., Morre, D.J., Low, H. and Faulk, W.P. (1991) Lactoferrin activates plasma membrane oxidase and Na⁺/H⁺ antiport activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**, 498-504
- Suzuki, T., Takizawamizuno, M., Yazaki, M., Wada, Y., Asai, K. and Kato, T. (1991) Plasma lactoferrin levels after bone marrow transplantation monitored by a two-site enzyme immunoassay. *Clin. Chim. Acta* **202**, 111-117
- Takeuchi, M., Inoue, N., Stickland, T.W., Kubota, M., Wada, M., Shimizu, R., Hoshi, S., Kozutsumi, H., Takasaki, S. and Kobota, A. (1989) Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7819-7822
- Tchopp, J.P., Brust, P.F., Cregg, J.M., Stillman, C.A. and Gingeras, T.R. (1987) Expression of the *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.* **15**, 3859-3876
- Teng, C.T. (1995) Mouse lactoferrin gene : a marker for estrogen and epidermal growth factor. *Env. Health Pers.* **103**, 17-20
- Teng, C.T., Liu, Y.H., Yang, Y., Walmer, D. and Panella, T. (1992) Differential molecular mechanism of the estrogen action that regulates lactoferrin gene in human and mouse. *Mol. Endocrinol.* **6**, 1969-1981
- Teng, C.T., Pentecost, B.T., Marshall, A., Salomon, A., Bowman, B., Lalley, P. and Naylor, S. (1987) Assignment of the lactotransferrin gene to human chromosome 3 and to mouse chromosome 9. *Somat. Cell. Mol. Genet.* **13**, 689-693

- Teng, C.T., Walker, M.P., Bhattacharyya, S.N., Klapper, D.G., DiAugustini, R.P. and McLachlan J.A. (1986) Purification and properties of an oestrogen-stimulated mouse uterine glycoprotein (approx. 70 kDa). *Biochem. J.* **240**, 413-422
- Tourville, D.R., Ogra, S.S., Lippes, J. and Tomasi, T.B. (1970) The human female reproductive tract : immunohistological localization of gamma A, gamma G, gamma M secretory "piece" and lactoferrin. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **108** : 1102-1108.
- Tuccari, G., Rizzo, A., Crisafulli, C. and Barresi, G. (1992) Iron-binding proteins in human colorectal adenomas and carcinomas - an immunocytochemical investigation. *Histol. Histopathol.* **7**, 543-547
- Valtieri, M., Tweardy, D.J., Caracciolo, D., Johnson, K., Movilio, F., Altmann, S., Snatoli, D. And Rovera, G. (1987) Regulation of proliferative and differentiative responses in a murine progenitor cell line. *J. Immunol.* **138**, 3829-3835
- Van Berkel, P.H.C., Geerts, M.J.E., van Veen, H.A., Kooiman, P.M., Pieper, F.R., Deboer, H.A. and Nuijens, J.H. (1995) Glycosylated and unglycosylated human lactoferrins both bind iron and show identical affinities towards human lysozyme and bacterial lipopolysaccharide, but differ in their susceptibilities towards tryptic proteolysis. *Biochem. J.* **312**, 107-114.
- Van Berkel, P.H.C., van Veen, H.A., Geerts, M.E.J., de Boer, H.A. and Nuijens, J.H. (1996) Heterogeneity in utilization of N-glycosylation sites Asn⁶²⁴ and Asn¹³⁸ in human lactoferrin : a study with glycosylation-site mutants. *Biochem. J.* **319**, 117-122
- Van Snick, J.L., Masson, P.L. and Helemans, J.F. (1974) The involvement of lactoferrin in the hyposideremia of acute inflammation. *J. Exp. Med.* **140**, 1068-1084
- Velardo, M.A., Bretthauer, R.K., Boutaud, A., Reinhold; B., Reinhold, V.N. and Castellino F.J. (1993) The presence of UDP-N-Acetylglucosamine : α -3-D mannoside β -1,2-N-Acetylglucosaminyl transferase I activity in *Spodoptera frugiperda* cells (ILPB-Sf21AE) and its enhancement as a result of baculovirus infection. *J. Biol. Chem.* **268**, 17902-17907
- von Schaewen, A., Turm, A., O'Neill, J. and Chrispeels, M.J. (1993) Isolation of a mutant *Arabidopsis* plant that lacks N-acetylglucosaminyl transferase I and is unable to synthesize Golgi-modified complex N-linked glycans. *Plant Physiol* **102**, 1109-1118
- Walden, R. (1993) *Plant biochemistry and molecular biology*. Edited by P.J. Lea and R.C. Leegood. John Wiley and Sons Ltd. pp275-296
- Walmer, D.K., Wrona, M.A., Hughes, C.L. and Nelson, K.G. (1992) Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle - correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology* **131**, 1458-1466
- Wandelt, C.I., Khan, M.R.I., Craig, S., Schroeder, H.E., Spencer, D. and Higgins, T.J.V. (1992) Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. *Plant J.* **2**, 181-192
- Ward, P.P., Piddington, C.S., Cunningham, G.A., Zhou, X.D., Wyatt, R.D. and Conneely, O.M. (1995) A system for production of commercial quantities of human lactoferrin: A broad spectrum natural antibiotic. *Biotechnology* **13**, 498-503
- Ward, P.P., Lo, J.Y., Duke, M., May, G.S., Headon, D.R. and Conneely, O.M. (1992) Production of biologically active recombinant human lactoferrin in *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology* **10**, 784-789
- Ward, P.P., May, G.S., Headon, D.R. and Conneely, O.M. (1992) An inducible expression system for the production of human lactoferrin in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **122**, 219-223
- Willnow, T.E., Goldstein, J.L., Orth, K., Brown, M.S. and Herz, J. (1992) Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen

- activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance. *J. Biol. Chem.* **267**, 26172-26180
- Wittwer, A.J. and Howard, S.C. (1990) Glycosylation at Asn-184 inhibits the conversion of single-chain to two-chain tissue-type plasminogen activator by plasmin. *Biochemistry*, **29**, 4175-4180
- Wu, G., Ruan, C., Drouet, L. and Caen, J. (1992) Inhibition effects of KRDS, a peptide derived from lactotransferrin, on platelet function and arterial thrombus formation in dogs. *Haemostasis* **22**, 1-6
- Wu, H.F., Lundblad, R.L. and Church, F.C. (1995a) Neutralization of heparin activity by neutrophil lactoferrin. *Blood* **85**, 421-428
- Wu, H.F., Monroe, D.M. and Church, F.C. (1995b) Characterization of the glycosaminoglycan-binding region of lactoferrin. *Arch. Biochem. Biophys.* **317**, 85-92
- Yamauchi, K., Tomita, M., Giehl, T.J. and Ellison, R.T. (1993) Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infect. Immun.* **61**, 719-728
- Yang, N., Shigeta, H., Shi, H. and Teng, C.T. (1996) Estrogen-related receptor, hERR1, modulates estrogen receptor mediated response of human lactoferrin gene promoter. *J. Biol. Chem.* **271**, 5795-5804
- Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P. and Ornitz, D.M. (1991) Cell surface, heparin like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*, **64**, 841-848
- Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C, Leemans, J., Van Montague, M., and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *Embo J.* **2**, 2143-
- Zambryski, P., Tempe, J. and Schell J. (1989) Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell* **56**, 193-201
- Zanetta, J.P., Breckenridge, W.C. and Vincendon, G. (1972) Analysis of monosaccharides by gas-liquid chromatography of the *O*-methyl glycosides as trifluoroacetate derivatives. Applications to glycoproteins and glycolipids. *J. Chromatogr.* **69**, 291-304
- Ziere, G.J., Bijsterbosch, M.K. and Vanberkel, T.J.C. (1993) Removal of 14 N-terminal amino acids of lactoferrin enhances its affinity for parenchymal liver cells and potentiates the inhibition of beta-very low density lipoprotein binding. *J. Biol. Chem.* **268**, 27069-27075
- Ziere, G.J., Vandijk, M.C.M, Bijsterbosch, M.K. and Vanberkel T.J.C. (1992) Lactoferrin uptake by the rat liver - characterization of the recognition site and effect of selective modification of arginine residues. *J. Biol. Chem.* **267**, 11229-11235
- Zimecki, M., Mazurier, J., Machnicki, M., Wiczorek, Z., Montreuil, J. and Spik, G. (1991) Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4⁺ CD8⁻ murine thymocytes. *Immunol. Lett.* **30**, 119-124
- Zimecki, M., Mazurier, J., Spik, G. and Kapp, J.A. (1995) Human lactoferrin induces phenotypic and functional changes in murine splenic B cells. *Immunology* **86**, 122-127
- Zou, S., Magura, C.E. and Hurley, W.L. (1992) Heparin-binding properties of lactoferrin and lysozyme. *Comp. Biochem. Physiol. (B)* **103**, 889-895
- Zucali, J.R., Broxmeyer, H.E., Levy, D. and Morse, C. (1989) Lactoferrin decreases monocyte-induced fibroblast production of myeloid colony-stimulating activity by suppressing monocyte release of interleukin-1. *Blood* **74**, 1531-1536

RESUME

La lactoferrine humaine (hLf) est une protéine multifonctionnelle dont les activités anti-microbiennes, anti-fongiques, anti-virales et anti-tumorales sont liées à la défense immunitaire de l'hôte. Ces nombreuses propriétés biologiques nous ont amené, d'une part, à nous intéresser à l'expression de la hLf native en vue d'applications thérapeutiques. D'autre part, afin de poursuivre les travaux entrepris au laboratoire sur la caractérisation du site d'interaction de la hLf avec ses cibles moléculaires, nous avons exprimé et étudié des hLfs modifiées par mutagenèse dirigée.

Ces deux objectifs ont été abordés en exprimant la hLf dans les cellules BHK, les cellules d'insectes infectées par un Baculovirus recombinant et le Tabac transgénique. Dans les trois cas, l'ADNc de la lactoferrine a été cloné avec son propre peptide signal. Lors de l'expression dans du Tabac transgénique, une seconde construction moléculaire a été réalisée par fusion du peptide signal de la sporamine de patate douce à la séquence de la lactoferrine mature. Les différentes hLfs recombinantes ont été purifiées et leurs propriétés physico-chimiques et biologiques ont été comparées à celles de la lactoferrine isolée du lait de Femme. En particulier, la séquence N-terminale, la masse moléculaire analysée par spectrométrie de masse, la composition molaire en monosaccharides et la fixation aux cellules lymphoblastiques T Jurkat et entérocytaires HT29-18C1 ont été déterminées. Les propriétés des différentes hLfs recombinantes se sont révélées semblables à celles de la protéine native à l'exception de la composition glycanique qui est spécifique de chaque système d'expression. Enfin, dans le cadre des études du site d'interaction de la hLf, nous avons exprimé dans les cellules d'insecte des hLfs modifiées par mutagenèse dirigée, et nous avons pu conclure à l'importance des résidus 1 à 5 et 28 à 34 de la lactoferrine dans l'interaction avec le récepteur lymphocytaire et les lipopolysaccharides.

