

Etude de la masse moléculaire de la lactotransferrine et de la serotransferrine humaines

par D. LÉGER, A. VERBERT, Marie-Henriette LOUCHEUX *, Geneviève SPIK (1)

avec la collaboration technique de Myriam CONIEZ, C. DUPIRE et J. P. DECOTTIGNIES

*Laboratoire de Chimie Biologique
et Laboratoire de Chimie Moléculaire,
Université des Sciences et Techniques de Lille I,
B. P. n° 36, 59650 Villeneuve d'Ascq*

** Institut de Recherches sur le cancer,
B.P. 3567, 59020 Lille Cedex.*

Summary. *The molecular weight of human lactotransferrin and serotransferrin.*

Molecular weight of human lactotransferrin (LTF) has been studied applying several procedures. Human serotransferrin (STF) was used as reference material. Equilibrium-sedimentation in non-denaturing (Tris-HCl) and in denaturing (6 M guanidinium chloride) media of 3 forms of LTF and STF (native, reduced, reduced and carboxamidomethylated proteins) led to values of $77\ 000 \pm 1\ 000$ and $75\ 000 \pm 1\ 000$ for LTF and STF, respectively. These values were confirmed on the basis of iron determinations, gel filtration behaviour, electrophoretic mobilities in polyacrylamide gel, sedimentation coefficient (S_{20}^0) and intrinsic viscosity.

The number of amino acid residues was 641 ± 20 for LTF and 632 ± 20 for STF, when estimated from the $\{\eta\}$ values. This number was 646 ± 20 for LTF and 639 ± 20 for STF when calculated on the basis of S_{20}^0 values obtained with the carboxamidomethylated transferrins in denaturing medium. The 7 to 9 additional amino acid residues and the 5 to 6 supplementary fucose residues in LTF could explain the slightly higher molecular weight of this protein as compared to STF.

Moreover, our results confirm the single chain structure of LTF and STF proposed by others and do not agree with the multiple chain structure we suggested previously, in particular on the basis of C-terminal amino acid determination by hydrazinolysis.

As is the case of bovine and murine LTF, human LTF led to the formation of oligomeric structures in concentrated aqueous solutions.

Introduction.

Les valeurs de masse moléculaire de la sérotransferrine (STF) ont longtemps été dispersées entre 68 000 et 114 000 daltons, mais les études les plus récentes (Roberts *et al.*, 1966 ; Spik, 1968 ; Mann *et al.*, 1970 ; Spik, 1971 ; Palmour et Sutton, 1971) ont

(1) A qui toute correspondance doit être adressée.

conduit à la conclusion que la sérotransferrine possédait une masse moléculaire de 76 000. Au contraire, la masse moléculaire et la conformation de la lactotransferrine (LTF) (Montreuil et Mullet, 1960 ; Montreuil, Tonnelat et Mullet, 1960) ont fait l'objet d'un nombre plus restreint de travaux. Les résultats obtenus par Spik (1968) et par Querinjean *et al.* (1971) étaient en faveur d'une valeur de masse moléculaire proche de celle de la sérotransferrine.

D'autre part, l'accord n'était pas réalisé sur la structure des deux protéines. En effet, certains auteurs étaient parvenus à la conclusion que toutes deux possédaient une structure monocaténaire sur la base des méthodologies suivantes : ultracentrifugation, en milieu dénaturant ou non dénaturant, de la protéine native ou réduite et alkylée, dans le cas de la STF (Greene et Feeney, 1968 ; Mann *et al.*, 1970 ; Palmour et Sutton, 1971), électrophorèse en gel de polyacrylamide de la protéine native ou réduite et alkylée, (Querinjean *et al.*, 1971) et chromatographie de tamisage moléculaire de la protéine native en milieu dénaturant (Aisen et Leibman, 1972) dans le cas de la LTF. Les résultats acquis par d'autres auteurs étaient, au contraire, en faveur de structures oligocaténares. En effet, par hydrazinolyse, Spik *et al.* (1968) et Charet *et al.* (1969) mettaient en évidence la présence de sérine et de glycolle en position C-terminale dans la LTF, et de sérine, de glycolle, de proline et de demi-cystine dans la STF. En outre, dans le cas de cette dernière, Jeppson (1967) l'avait dissociée en 2 sous-unités (MM 39 000 et 42 000) après réduction et alkylation.

En vue de corriger d'éventuelles erreurs que nous aurions commises, nous nous sommes proposé de déterminer avec certitude et d'une manière définitive la masse moléculaire et la nature mono ou pluricaténaire de la LTF et de la STF — celle-ci étant prise comme base de comparaison —, non plus en appliquant un ou deux procédés analytiques, mais en associant les méthodologies suivantes aux protéines natives et (ou) réduites puis alkylées : mesures de viscosité en milieu dénaturant, ultracentrifugation associée à la viscosité ou au volume spécifique partiel en milieu dénaturant et non-dénaturant, équilibre de sédimentation en milieu dénaturant et non-dénaturant, dosage du fer, chromatographie et électrophorèse de tamisage moléculaire.

Matériel et méthodes.

Matériel. Nous avons utilisé, pour toutes nos expériences, les transferrines débarassées du fer (apotransferrines). L'aposérotransferrine humaine native (STF) était une préparation commerciale (Behringwerke, Marburg/Lahn). L'apolactotransferrine humaine (LTF) a été préparée selon les procédés décrits par Montreuil *et al.* (1960) et par Spik (1971). La STF réduite (STF-SH), puis carboxamidométhylée (STF-CM) par l'iodo-acétamide et la LTF réduite (LTF-SH), puis carboxamidométhylée (LTF-CM) ont été préparées selon un mode opératoire adapté du procédé de Crestfield, Moore et Stein (1963).

Méthodes.

1) *Viscosité intrinsèque.* Les mesures de viscosité intrinsèque ont été effectuées à l'aide d'un viscosimètre de type Ubbelohde (section du capillaire : 0,4 mm), à

25 + 0,02 °C, sur des solutions préparées par dilution de solutions mères renfermant 2 g de protéine native pour 100 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M, de pH 7,5 ou 1 g de protéine modifiée (STF-SH ; LTF-SH ; STF-CM et LTF-CM) pour 100 ml de solution de Tris-HCl 0,1 M/chlorhydrate de guanidine 6 M, de pH 7,5. Les masses moléculaires ont été déterminées en appliquant les équations I et II de Tanford, Kawahara et Lapanje (1967) : Equation I : $M = nM_0$, dans laquelle M représente la masse moléculaire des protéines, M_0 la masse moléculaire moyenne apparente d'un résidu d'acide aminé (118 pour la STF ; 121 pour la LTF) que nous avons calculée d'après le nombre de résidus d'acides aminés et de monosaccharides de la protéine (Spik, 1971) pour une masse moléculaire de 10 000 daltons et n le nombre de résidus d'acides aminés dans la protéine tel qu'il est tiré de l'équation II : $\{ \eta \} = 0,716 n^{0,66}$ où $\{ \eta \}$ est la viscosité intrinsèque que la chaîne polypeptidique en conformation étirée.

2) *Ultracentrifugation*. Les ultracentrifugations ont été effectuées à 20 °C dans une ultracentrifugeuse analytique Beckman modèle E équipée du système Schlieren et du système optique interférentiel de Rayleigh, sur des solutions renfermant de 1 à 10 mg/ml de protéine native ou modifiée.

Les transferrines natives ont été étudiées sur des solutions récupérées à la sortie des colonnes de Sephadex G-150 équilibrées avec le tampon Tris-HCl 0,1 M de pH 7,5 afin de les soustraire à la dialyse et à la lyophilisation, facteurs d'aggrégation des molécules. On obtient, de cette manière, un alignement parfait des valeurs de constante de sédimentation en fonction de la concentration en protéine.

La concentration des solutions en apo-protéines a été déterminée par spectrométrie dans l'ultraviolet ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 11$ pour la STF et 11,2 pour la LTF) (Spik, 1968, 1971).

Dans le cas des transferrines modifiées, les solutions ont été dialysées contre le tampon de pH 7,5 Tris-HCl 0,1 M/chlorhydrate de guanidine 6 M. Les valeurs de $S_{20,w}^0$ des transferrines natives ont été obtenues en appliquant aux valeurs de S_{20}^0 la formule de Gehatia et Katschalski (1959). Dans le cas des transferrines alkylées (STF-CM et LTF-CM), les valeurs ont été exprimées uniquement en S_{20}^0 . Les valeurs, mesurées par pycnométrie, des volumes spécifiques partiels qui ont été utilisées dans les calculs étaient de 0,732 pour la LTF et de 0,725 pour la STF (Spik, 1968, 1971).

La masse moléculaire des protéines natives a été déterminée d'après les valeurs de viscosité intrinsèque (mesurées en tampon Tris-HCl 0,1 M de pH 7,5) et les valeurs de constantes de sédimentation $S_{20,w}^0$ (mesurées dans le même tampon), en appliquant l'équation de Scheraga et Mandelkern (1953).

$$M^{2/3} = \frac{N \times S_{20,w}^0 \times \{ \eta \}^{1/3} \times \eta_0}{\beta(1 - v\rho)}$$

où M : masse moléculaire, N : nombre d'Avogadro, $S_{20,w}^0$: constante de sédimentation, $\{ \eta \}$: viscosité intrinsèque, η_0 : viscosité du solvant, β : coefficient dépendant de la forme et du rapport des axes de l'ellipsoïde ($2,12 \times 10^6$ pour les protéines globulaires), v : volume spécifique partiel, ρ : densité du solvant.

La masse moléculaire des protéines alkylées en milieu chlorhydrate de guanidine a été déterminée en appliquant l'équation III de Tanford, Kawahara et Lapanje (1967)

$$\frac{S_{20,GuHCl}^0}{1 - v\rho} = 0,286 n^{0,473}$$

où $S_{20,GuHCl}^0$: constante de sédimentation en milieu guanidine, v : volume spécifique partiel effectif de la protéine dans le solvant, ρ : densité du solvant mesurée pour chaque expérience, n : nombre d'acides aminés dans la protéine.

Les déterminations de masse moléculaire à l'équilibre de sédimentation ont été réalisées selon le procédé d'Yphantis (1964), modifié par Chervenka (1970).

3. *Chromatographie sur gels de Sephadex*. La détermination de la masse moléculaire des transferrines natives par chromatographie sur colonne de Sephadex G-100 et G-200 a été effectuée en appliquant le procédé d'Andrews (1964), avec un tampon Tris 0,005 M/KCl 0,1 M de pH 7,5.

4. *Electrophorèse en gel de polyacrylamide*. La masse moléculaire des transferrines natives a été mesurée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium suivant le protocole de Neville (1971). La courbe étalon a été obtenue en utilisant les protéines de masse moléculaire connue suivants : IgG bovines (162 000), sérumalbumine bovine (67 000), catalase (57 000), carboxypeptidase (35 000), lactalbumine (15 300).

Résultats et discussion.

I. Viscosité intrinsèque.

1) *Transferrines natives*. Les valeurs de viscosité intrinsèque de la STF et de la LTF natives sont rassemblées dans le tableau 1. Les valeurs de 4,0 et de 4,1 ml/g obtenues pour la LTF et la STF sont des valeurs caractéristiques des protéines globulaires. La présence du fer ne modifie pas les valeurs de ces viscosités, bien que la valeur de 4,65 ml/g obtenue à partir de l'apo-LTF soit plus élevée. En effet, cette augmentation serait due aux conditions de désaturation en milieu très acide (pH 1,5) de la LTF puisque la désaturation en présence de chlorhydrate de guanidine 7 M et d'EDTA permet d'obtenir une apo-LTF moins dénaturée qui possède une viscosité intrinsèque de 4,30 ml/g. Nos résultats confirment ceux de Bezkorovainy et Grohlich (1967) et de Mann *et al.* (1970) pour la STF (4,0 ml/g). Dans le cas de la LTF, aucune valeur n'avait été donné antérieurement.

2) *Transferrines modifiées*. En milieu chlorhydrate de guanidine 6 M, les transferrines réduites et les transferrines alkylées possèdent une viscosité intrinsèque de $50,5 \pm 1,5$ ml/g dans le cas de la STF et de $51 \pm 1,5$ ml/g dans le cas de la LTF. L'augmentation de ces valeurs par rapport aux valeurs de viscosité intrinsèque de 16 ml/g et de 26 ml/g pour la STF et la LTF natives en solution dans la guanidine s'expliquent par l'existence de nombreux ponts disulfure dans les deux glycoprotéines : 18 dans la STF et 13 dans la LTF (Mann *et al.*, 1970 ; Montreuil et Spik, 1975). Les valeurs obtenues dans le cas de la STF sont très voisines de celles de Mann *et al.* (1970) (17 ml/g et 50,8 ml/g).

Les mesures de viscosité intrinsèque permettent de déterminer la masse moléculaire des transferrines réduites et alkylées par l'application des formules I et II de Tanford *et al.*. Le nombre des acides aminés de la STF et de la LTF déterminé par l'application de l'équation II de Tanford *et al.* est de 632 ± 28 dans le cas de la STF et de 641 ± 28 dans le cas de la LTF. Sur la base de ces résultats, l'application de l'équation I de Tanford *et al.* donne des valeurs de masse moléculaire de $74\ 600 \pm 3\ 300$ pour la STF et de $77\ 600 \pm 3\ 500$ pour la LTF.

TABLEAU 1

Viscosité intrinsèque de la sérotransferrine et de la lactotransferrine

Tampons	Protéines	$[\eta]$ ml/g
Tris-HCl 0,1 M pH 7,5	Apo-STF	$4,10 \pm 0,15$
	STF	$4,05 \pm 0,15$
	Apo-LTF ^(a)	$4,65 \pm 0,20$
	Apo-LTF ^(b) LTF	$4,30 \pm 0,20$ $4,00 \pm 0,15$
Tris-HCl 0,1 M pH 7,5	STF	$16,00 \pm 0,50$
Guanidine 6 M pH 7,5	LTF	$26,00 \pm 0,70$
Tris-HCl 0,1 M pH 7,5	STF-CM	$50,5 \pm 1,5$
Guanidine 6 M pH 7,5	LTF-CM	$51,0 \pm 1,5$

^(a) Apo-LTF préparée par désaturation de la LTF à pH 1,5.

^(b) Apo-LTF préparée par désaturation de la LTF en présence de chlorhydrate de guanidine 6 M et d'EDTA à 1 p. 100.

3) *Conclusions.* Cette valeur de masse moléculaire obtenue pour la STF peut être comparée à la valeur de 78 300 obtenue par Mann *et al.* suivant un protocole identique. La légère différence s'explique par la valeur de 674 donnée par ces auteurs pour le nombre d'acides aminés présents dans la STF.

Les mesures de viscosité intrinsèque effectuées d'une manière comparée sur la LTF et la STF montrent que la LTF possède un nombre d'acides aminés et une masse moléculaire légèrement supérieurs à ceux de la STF. D'autre part, les valeurs de viscosité intrinsèque de la STF et de la LTF réduites et carboxyméthylées en milieu chlorhydrate de guanidine confirment l'existence d'une seule chaîne polypeptidique dans la STF et dans la LTF.

II. Ultracentrifugation.

1) Détermination des masses moléculaires par les constantes de sédimentation.

a) *Etude des transferrines natives.* L'extrapolation à concentration nulle des constantes de sédimentation de la STF et de la LTF natives déterminées dans le tampon

Tris-HCl 0,1 M de pH 7,5 permet d'attribuer une valeur de $S_{20}^0; w$ de $5,30 \pm 0,15$ à la STF et de $5,35 \pm 0,15$ à la LTF.

Le résultat que nous avons obtenu à propos de la STF est en accord avec ceux d'autres auteurs : $4,92 \pm 0,12$ (Roberts *et al.*, 1966) ; 5,1 (Charlwood, 1963) ; $5,2 \pm 0,2$ (Mann *et al.*, 1970) ; 5,3-5,4 (Bezkorovainy, 1966 et Bezkorovainy et Grohlich, 1967) ; $5,32 \pm 0,19$ (Palmour et Sutton, 1971). Dans le cas de la LTF, nous ne connaissons que la valeur de 4,93 donnée par Querinjean *et al.* (1971) et de 4,8 donnée par nous-mêmes (Spik, 1968).

Les valeurs de constantes de sédimentation des transferrines natives associées aux valeurs de viscosité intrinsèque déterminées dans le même tampon permettent, en appliquant l'équation de Scheraga et Mandelkern (1953), d'obtenir les valeurs de $74\ 000 \pm 3\ 000$ pour la STF et de $77\ 500 \pm 3\ 000$ pour la LTF. Mann *et al.* (1970) avaient obtenu une valeur de 79 300 pour la STF en effectuant les mesures dans une solution de NaCl 0,1 M à pH 6,5.

b) *Etude des transferrines modifiées.* En milieu chlorhydrate de guanidine, la STF et la LTF réduites et carboxyméthylées possèdent respectivement un $S_{20}^0; GuHCl$ de 1,01 et de 0,98. La valeur de 1,01 que nous avons obtenue pour la STF est supérieure aux valeurs de 0,87 donnée par Greene et Feeney (1968) et 0,75 donnée par Palmour et Sutton (1971). D'autre part, les valeurs de constante de sédimentation obtenues sont, elles aussi, en faveur de l'existence d'une seule chaîne polypeptidique dans les deux transferrines.

La détermination des valeurs des constantes de sédimentation en milieu chlorhydrate de guanidine des transferrines réduites et alkylées permet d'obtenir, en appliquant l'équation III de Tanford, Kawahara et Lapanje (1967), la valeur de 646 ± 20 pour le nombre de résidus d'acides aminés présents dans la LTF et la valeur de 639 ± 20 pour ceux présents dans la STF. Ces données permettent d'attribuer les valeurs de $78\ 100 \pm 2\ 500$ et de $75\ 400 \pm 2\ 500$ pour les masses moléculaires de la LTF et de la STF.

2) Détermination des masses moléculaires à l'équilibre de sédimentation.

a) *Etude des transferrines natives.* Les valeurs de masse moléculaire qui représentent les moyennes des déterminations effectuées sur une dizaine d'échantillons de STF et de LTF natives, à des concentrations de 0,1 à 1 mg/ml dans le tampon Tris-HCl 0,1 M de pH 7,5, sont reportées dans le tableau 2. Dans le tableau 3 sont rassemblées les valeurs de masse moléculaire des transferrines natives en solution dans le tampon Tris-HCl 0,1 M de pH 7,5 renfermant du chlorhydrate de guanidine 6 M.

Nous pouvons noter (tabl. 2) que, si les valeurs de masse moléculaire de la STF native dans le tampon Tris-HCl restent stables lorsque la concentration en protéine varie, les valeurs de masse moléculaire de la LTF augmentent avec la concentration. Au contraire, les valeurs de masse moléculaire de la LTF native dans le tampon Tris-HCl en présence de chlorhydrate de guanidine 6 M restent invariables et égales à 76 700. Ces résultats sont en faveur de l'existence d'un équilibre monomère-oligomère déplacé vers la forme monomère aux faibles concentrations, comme l'ont suggéré Castellino, Fish et Mann (1970) à propos de certaines préparations de LTF de Vache et Kinkade, Kindall-Miller et Segars (1976) à propos de la LTF de

TABLEAU 2

Valeurs de la masse moléculaire de la sérotransferrine et de la lactotransferrine, en fonction de la concentration, déterminées par équilibre de sédimentation en Tris-HCl 0,1 M de pH 7,5

Concentration en mg/ml	Masses moléculaires	
	LTF	STF
0,1	78 000	75 500
0,2	78 000	—
0,3	79 500	76 000
0,4	79 000	—
0,5	82 000	76 000
0,6	81 000	—
0,85	83 000	76 000

TABLEAU 3

Valeurs de la masse moléculaire de la sérotransferrine et de la lactotransferrine natives déterminées, à différentes concentrations, par équilibre de sédimentation en Tris-HCl 0,1 M de pH 7,5 renfermant du chlorhydrate de guanidine 6 M

Concentration en mg/ml	Masses moléculaires	
	LTF	STF
0,3	76 700	74 500
0,5	76 700	75 000
0,7	76 000	75 000

Souris. Si, selon Teller (1973) nous traçons la courbe des variations du rapport M_w/M_1 en fonction de la concentration initiale de l'échantillon (fig. 1) (M_w étant la masse moléculaire en poids déterminée à chaque concentration et M_1 celle du monomère, soit la valeur de 76.700 obtenue en présence de chlorhydrate de guanidine) nous obtenons une droite. L'extrapolation à concentration nulle conduit à un rapport de M_w/M_1 égal à 1. Le monomère de la LTF possède donc une masse moléculaire de

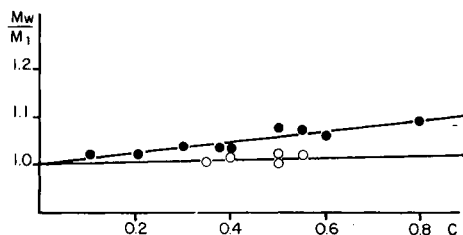


FIG. 1. — Variation, en fonction de la concentration C (exprimée en mg/ml), du rapport M_w/M_1 . M_w : masses moléculaires déterminées à l'équilibre de sédimentation en tampon Tris-HCl 0,1 M de pH 7,5. M_1 : masses moléculaires des monomères déterminées à l'équilibre de sédimentation en tampon Tris-HCl 0,1 M de pH 7,5 et en milieu chlorhydrate de guanidine 6M. o : STF ; ● : LTF.

76 700. Dans le cas de la STF, le phénomène est presque inexistant. En effet, si nous prenons pour M_1 la valeur de 75 000 obtenue en milieu chlorhydrate de guanidine, nous constatons que la pente de la droite M_w/M_1 est très faible. Dans ce cas, nous pouvons faire la moyenne des masses moléculaires M_w obtenues à chaque concentration : cette valeur est égale à 75 500. La propriété que présente la LTF à former des oligomères en solution concentrée apporte vraisemblablement une explication aux valeurs élevées de masse moléculaire donnée par les premiers auteurs, Montreuil, Tonnelat et Mullet (1960), et par Haupt et Baudner (1973) : 93 000 et 82 600, respectivement.

b) *Etude des transferrines réduites et alkylées.* La masse moléculaire des transferrines, réduites et carboxamidométhylées a été déterminée, en milieu chlorhydrate de guanidine, à l'équilibre de sédimentation pour les concentrations de 0,3, 0,5 et 0,7 mg/ml. Nous avons utilisé les valeurs de V_{sp} des protéines natives (cf : Méthodes ; § 2) puisque celui-ci ne varie pas en milieu guanidine 6 M (Castellino, Fish et Mann, 1970). Nous n'avons observé, dans ces conditions, aucune variation de la valeur des masses moléculaires en fonction de la concentration : ces valeurs, égales à $74\,600 \pm 2\,000$ pour la STF et à $76\,000 \pm 2\,000$ pour la LTF, sont très voisines des valeurs précédentes. Ces résultats confirment, en outre, l'existence d'une seule chaîne polypeptidique dans la STF et la LTF.

III. Chromatographie sur gels de Sephadex.

La chromatographie sur colonne de Sephadex G-100 et G-200 de la STF et de la LTF natives, conduit à des valeurs de masse moléculaire de 76 000 aussi bien pour la STF que pour la LTF.

IV. Dosage du fer.

Le tracé des courbes de saturation en fer de l'apo-transferrine et de la LTF partiellement saturée en fer montre que la quantité de fer fixée à saturation correspond à une valeur de 1,47 g p. 1 000 de la STF et de la LTF qui conduit, par le calcul sur la base de 2 atomes de métal p. mole de protéine, à une valeur de masse moléculaire de 75 980 pour les deux transferrines. La valeur de 6 atomes de fer trouvée par Montreuil *et al.* (1960) s'explique par le fait que la saturation en fer avait été réalisée en milieu non tamponné et qu'elle a provoqué une fixation non spécifique du fer sur la protéine (Spik, 1971).

V. Electrophorèse en gel de polyacrylamide.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide, réalisée en présence de protéines témoins de masses moléculaires connues, permet d'attribuer une masse moléculaire de 75 000 à la STF et de 77 000 à la LTF.

Conclusions.

D'après les résultats que nous avons obtenus et qui sont rassemblés dans le tableau 4, on voit que les masses moléculaires varient entre les valeurs limites de 74 000 et 76 000 pour la STF et de 75 980 à 78 100 pour la LTF. Il n'est donc pas dérai-

TABLEAU 4

Valeurs des masses moléculaires de la sérotransferrine et de la lactotransferrine humaines déterminées par différentes méthodes

Méthodes	STF	LTF
Viscosité intrinsèque en milieu Gu HCl 6 M des protéides réduits et alkylés . .	74 700	77 500
Combinaison de la viscosité intrinsèque et de la constante de sédimentation ($S_{20,w}^0$)	74 000	77 500
Constante de sédimentation ($S_{20,GuHCl}^0$) et volume spécifique partiel des protéides réduits et alkylés	75 400	78 100
Equilibre de sédimentation		
1) Protéides natifs		
— en tampon Tris-HCl 0,1 M	75 500	76 700
— en Gu HCl 6 M	75 000	76 700
2) Protéides réduits et alkylés		
— en Gu HCl 6 M	74 600	76 000
Dosage du fer	75 980	75 980
Tamisage moléculaire		
1) Chromatographie		
— Sephadex G-100	76 000	76 000
— Sephadex G-200	76 000	76 000
2) « Disc-electrophoresis »	75 000	77 000

sonnable d'adopter les valeurs de $75\,000 \pm 1\,000$ et de $77\,000 \pm 1\,000$, respectivement, pour la STF et pour la LTF. En tout état de cause, la masse moléculaire de la LTF est manifestement un peu plus élevée que celle de la STF, comme le confirme l'électrophorèse en gel de polyacrylamide qui parvient à discriminer les deux protéines (fig. 2). Cette différence s'explique en partie par la présence, dans la LTF, d'un

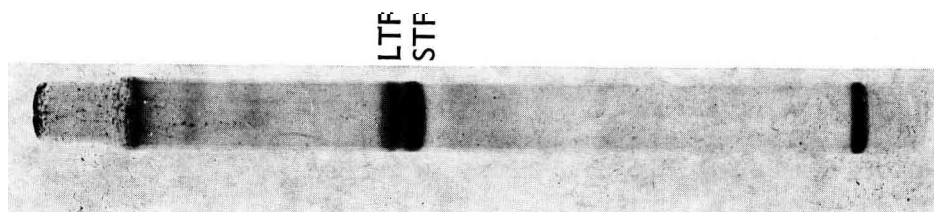


FIG. 2. — Electrophorèse en gel de polyacrylamide, selon Neville (1971), de la sérotransferrine et de la lactotransferrine humaines.

nombre de résidus d'amino-acides légèrement supérieur à celui de la STF et de 5 à 6 résidus de fucose supplémentaires (Spik *et al.*, 1974, 1975).

D'autre part, nos résultats sont en faveur de l'existence d'une seule chaîne peptidique aussi bien dans la STF que dans la LTF. Ils confirment donc les conclusions de Greene et Feeney (1968), de Mann *et al.* (1970) et de Palmour et Sutton (1971) pour la STF et de Querinjean *et al.* (1971) et de Aisen et Leibman (1972) pour la LTF. Ils infirment les conclusions auxquelles nous avions conduits les résultats de la détermination des acides aminés C-terminaux par hydrazinolyse (Spik, Monsigny et Montreuil, 1968) dont on sait, à présent, qu'elle présente des artefacts — comme la libération de glycolcolle et de sérine —, ainsi que l'ont signalé plusieurs auteurs (voir, à cet égard, Kasai, Yokoyama et Oshii, 1970).

Enfin, comme les lactotransferrines de Vache et de Souris, la lactotransferrine humaine, contrairement aux sérotransferrines, a tendance à former des oligomères en solution concentrée.

Reçu en janvier 1977.

Accepté en avril 1977.

Remerciements. — Ce travail a bénéficié d'une aide du C.N.R.S. (Laboratoire Associé n° 217 : Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués ; Directeur : Prof. J. Montreuil) et de la D.G.R.S.T. (ACC Technologie Agricole et Alimentaire, Contrat 75-7-0414 et ACC Membranes Biologiques : structure et fonctions, Contrat 75-7-1334) auxquels nous adressons nos remerciements.

Références

- AISEN D., LEIBMAN A., 1972. Lactoferrin and transferrin : a comparative study. *Biochim. biophys. Acta*, **257**, 314-323.
- ANDREWS P., 1964. Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. *Biochem. J.*, **91**, 222-233.
- BEZKOROVAINY A., 1966. Comparative study of metal-free, iron-saturated and sialic acid-free transferrins. *Biochim. biophys. Acta*, **127**, 535-537.
- BEZKOROVAINY A., GROHLICH D., 1967. The behavior of native and reduced-alkylated human transferrin in urea and guanidine-HCl solutions. *Biochim. biophys. Acta*, **147**, 497-510.
- CASTELLINO F. J., FISH W. W., MANN K. G., 1970. Structural studies on bovine lactoferrin. *J. biol. Chem.*, **245**, 4269-4275.
- CHARET P., MONSIGNY M., SPIK G., MONTREUIL J., 1969. Etudes sur les glycoprotéines. XL. Etude des séquences peptidiques de 2 glycopeptides isolés d'hydrolysats tryptiques de la transferrine humaine. *C. R. Acad. Sci., Paris, D*, **269**, 1019-1022.
- CHARLWOOD P. A., 1963. Ultracentrifugal characteristics of human, monkey and rat transferrins. *Biochem. J.*, **88**, 394-398.
- CHERVENKA C. H., 1970. Long-column meniscus depletion sedimentation equilibrium technique for the analytical ultracentrifuge. *Anal. Biochem.*, **34**, 24-29.
- CRESTFIELD A. M., MOORE S., STEIN W. H., 1963. The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteins. *J. biol. Chem.*, **238**, 622-627.
- GEHATIA M., KATCHALSKI E., 1959. Brownian motion in the centrifugal field. *J. Chem. Phys.*, **30**, 1334-1339.
- GREENE F. C., FEENEY R. E., 1968. Physical evidence for transferrins as single polypeptide chains. *Biochemistry*, **7**, 1366-1371.
- HAUPT H., BAUDNER S., 1973. Isolierung und Kristallisation von Lactoferrin aus Human-Kolos-trum. *Z. Physiol. Chem.*, **354**, 944-948.

- JEPSON J. O., 1967. Subunits of human transferrin. *Acta chem. scand.*, **21**, 1686-1694.
- KASAI K., YOKOYAMA S., OSHII S., 1970. Determination of C-terminal amino acid residues of bovine fibrinogen by hydrazinolysis. *FEBS-Letters*, **11**, 298-300.
- KINKADE J. M., KINDALL-MILLER W. W., SEGARS F. M., 1976. Isolation and characterization of murine lactoferrin. *Biochem. biophys. Acta*, **446**, 407-418.
- MANN K. G., FISH W. W., COX A. C., TANFORD C., 1970. Single-chain nature of human serum transferrin. *Biochemistry*, **9**, 1348-1354.
- MONTREUIL J., MULLET S., 1960. Isolement d'une lactosidérophiline du lait de femme. *C. R. Acad. Sci. Paris D*, **250**, 176-178.
- MONTREUIL J., SPIK G., 1975. Comparative studies of carbohydrate and protein moieties of human serotransferrin and lactotransferrin, 27-38. In CRICHTON R. R. *Proteins of iron storage and transport in biochemistry and medicine*, North-Holland Publ. Co, Amsterdam.
- MONTREUIL J., TONNELAT J., MULLET S., 1960. Préparation et propriétés d'une lactosidérophiline (lactotransferrine) isolée du lait de femme. *Biochem. biophys. Acta*, **45**, 413-421.
- NEVILLE D. M., 1971. Molecular weight determination of protein dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J. biol. Chem.*, **246**, 6328-6334.
- PALMOUR R. M., SUTTON H. E., 1971. Vertebrate transferrins. Molecular weights. Chemical compositions and iron-binding studies. *Biochemistry*, **10**, 4026-4032.
- QUERINJEAN P., MASSON P. L., HEREMANS J. F., 1971. Molecular weight, single-chain structure and amino acid composition of human lactoferrin. *Eur. J. Biochem.*, **20**, 420-425.
- ROBERTS R. C., MALEY D. G., SEAL U. S., 1966. Human transferrin : Molecular weight and sedimentation properties. *J. biol. Chem.*, **241**, 4907-4913.
- SCHERAGA H. A., MANDELKERN L., 1953. Consideration of the hydrodynamic properties of proteins. *J. am. chem. Soc.*, **75**, 179-184.
- SPIK G., 1968. Etude comparative des propriétés physico-chimiques et de la structure de la transferrine et de la lactotransferrine humaines. *Thèse Doct. Sci., Lille*.
- SPIK G., 1971. Formes communes et assimilation du lactofer. Etude particulière des lactotransferrines. *Ann. Nut. Alim.*, **25**, A81-A134.
- SPIK G., BAYARD B., FOURNET B., STRECKER G., BOUQUELET S., MONTREUIL J., 1975. Studies on glycoconjugates. LXIV. Complete structure of two carbohydrate units of human serotransferrin. *FEBS-Letters*, **50**, 296-299.
- SPIK G., MONSIGNY M., MONTREUIL J., 1968. Etudes sur les glycoprotéines. XXV. Les acides aminés C-terminaux de la transferrine et de la lactotransferrine humaines. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **50**, 2186-2187.
- SPIK G., VANDERSYPPE R., FOURNET B., BAYARD B., CHARET P., BOUQUELET S., STRECKER G., MONTREUIL J., 1974. Structure of glycopeptides isolated from human serotransferrin and lactotransferrin, 483-500. In *Les Glycoconjugués*, C.N.R.S. éd. Paris, Colli. nt. n° 221 du C.N.R.S Villeneuve-d'Ascq, 20-27 juin 1973.
- TANFORD C., KAWAHARA K., LAPANJE S., 1967. Proteins as random coils. I. Intrinsic viscosities and sedimentation coefficients in concentrated guanidine hydrochloride. *J. amer. chem. Soc.*, **89**, 729-749.
- TELLER D. C., 1973. Characterization of proteins by sedimentation in the analytical ultracentrifuge. In COLOWICK, KAPLAN, *Methods in Enzymology*, vol. **27D**, 346-441, Acad. Press Inc. Pub., New York.
- YPHANTIS D. A., 1964. Equilibrium ultracentrifugation of dilute solutions. *Biochemistry*, **3**, 297-317.