

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MEMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DE LILLE 1

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

en Biochimie

par

Vicente TORDERA

ETUDES SUR LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN :

I : ISOLEMENT ET DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES.

II : ROLE DE LA FRACTION GLUCIDIQUE DANS L'INTERACTION

SEROTRANSFERRINE-RECEPTEUR RETICULOCYTAIRE.



Soutenu le 2 Octobre 1978, devant la commission d'examen

Président : M. J. MONTREUIL

Rapporteur : Melle G. SPIK

Examineurs : MM. B. FOURNET

J. KREMBEL

G. STRECKER

Ces travaux ont été réalisés dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE I (Laboratoire associé au C.N.R.S. n° 217 " Biologie physico-chimique et moléculaire des glucides libres et conjugués ") (Professeur Jean MONTREUIL), sous la direction de Mademoiselle Geneviève SPIK, Maître de Conférence, et de Monsieur Didier LEGER, Assistant . Ils ont bénéficié de l'aide de la D.G.R.S.T. (Contrat N° 75-7-1334 : Membranes biologiques : Structure et fonction. Etude du mécanisme de la fixation réversible de la sérotransferrine sur les membranes des réticulocytes).

Je remercie Monsieur le Professeur J. MONTREUIL pour l'honneur qu'il m'a fait en m'acceptant dans le Laboratoire qu'il dirige, pour ses discussions enrichissantes et pour l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Mademoiselle le Professeur G. SPIK, qui m'a guidé dans ce travail avec efficacité et sympathie.

Monsieur D. LEGER, qui m'a aidé à faire les premiers pas dans la Biochimie. Qu'il trouve ici le témoignage de mon attachement.

Messieurs les Professeurs B. FOURNET et J. KREMBEL et Monsieur G. STRECKER, Maître de Recherche au C.N.R.S., qui ont bien voulu examiner ce travail ; qu'ils me permettent de leur exprimer mes très vifs remerciements.

Monsieur le Professeur J.F.G. Vliegenthart et Messieurs L. DORLAND et J. HAVERKAMP, qui ont réalisé l'étude de résonance magnétique nucléaire des glycopeptides de la STF de lapin.

Monsieur A. VERBERT et Madame M. CONIEZ, pour les études effectuées à l'aide de l'ultracentrifugeuse analytique.

Monsieur Y. LEROY et Madame A.F. BOUQUELET, pour les analyses en chromatographie en phase gazeuse.

Monsieur le Professeur CAPRON et Monsieur J.L. NEYRINCK, et Madame S. LOISEAUX, qui nous ont permis d'effectuer les comptages de radioactivité.

Monsieur le Professeur GOUDMAND et Monsieur G. LAMBERT, qui nous ont permis de déterminer le taux de réticulocytes et la numération globulaire.

Monsieur le Professeur SCHAUER, qui nous a fourni
la neuraminidase.

Monsieur le Professeur G. BISERTE et Madame BENAISA,
pour les analyses des acides aminés.

Monsieur A. CHERON, qui nous a fourni le glycopeptide
de la Lactotransferrine de Vache.

Monsieur J.P. DECOTTIGNIES, pour sa précieuse collaboration
dans de nombreux domaines.

Madame R. DEBRAY, qui a préparé les glycopeptides de la
STF humaine.

Madame J. CELEN, pour l'aide apportée à la présentation
de cette thèse.

Mesdemoiselles M. PAMBLANCO, qui a réalisé la frappe
de cette thèse et A. CRETEL, pour ses encouragements
dans les moments difficiles. A Monsieur J. MAZURIER,
pour ses bons conseils donnés avec la simplicité
souriante que le caractérise.

aux Abattoirs FAILLIE à Quesnoy sur Deule, qui nous ont
permis d'aller recueillir du sang de lapin en grande quantité.

Enfin, je témoigne ici ma profonde gratitude à tout le
personnel du Batiment C₉ pour son merveilleux accueil.

TABLE DE MATIERES

INTRODUCTION	p. 1
GENERALITES	p. 4
<u>I - ISOLEMENT DES SEROTRANSFERRINES</u>	p. 5
<u>II - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES SEROTRANSFERRINES</u>	p. 6
A. <u>MASSE MOLECULAIRE</u>	p. 6
B. <u>PARTIE PEPTIDIQUE</u>	p. 8
C. <u>PARTIE GLYCANNIQUE</u>	p. 12
D. <u>FIXATION DU FER PAR LA SEROTRANSFERRINE</u>	p. 15
<u>III - ROLE BIOLOGIQUE DE LA SEROTRANSFERRINE</u>	p. 17
A. <u>REPARTITION ET METABOLISME DE LA SEROTRANSFERRINE</u>	p. 17
B. <u>FONCTION DE LA SEROTRANSFERRINE DANS LE METABOLISME</u>	p. 17
<u>DU FER</u>	
1. <u>Intéraction entre la sérotransferrine et les</u> <u>réticulocytes</u>	p. 18
a) Adsorption de la STF sur la membrane réti- culocytaire.	p. 20
b) Formation d'un complexe entre la STF et le réticulocyte.	p. 20
a) Influence de la partie protéique de la STF	p. 21
b) Influence de la partie glycanique de la STF.	p. 21

γ) Influence de la partie glycanique du récepteur membranaire	p. 21
δ) Influence de la partie protéique du récepteur	p. 22
ε) Isolement du complexe	p. 22
c) <u>Transfert du fer vers la biosynthèse de l'hémoglobine</u>	p. 23
d) <u>Détachement de la STF de la membrane</u>	p. 24
2 . <u>Intéraction entre la sérotransferrine et d'autres tissus</u>	p. 25
a) <u>Intestin</u>	p. 25
b) <u>Foie</u>	p. 25
c) <u>Placenta</u>	p. 26
3 . <u>Hypothèse de Fletcher et Huehns</u>	p. 27
 IV - CONCLUSIONS	 p. 29
 MATERIEL ET METHODES	 p. 32
 I - <u>PREPARATION ET ANALYSE DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN</u>	 p. 33
A. <u>PRELEVEMENT DU SANG DE LAPIN ET OBTENTION DU PLASMA</u>	p. 33
B. <u>PRECIPITATION AU RIVANOL PUIS AU SULFATE D'AMMONIUM</u>	p. 33
1 . <u>Réactifs</u>	p. 33
2 . <u>Mode opératoire</u>	p. 35

C. <u>PURIFICATION SUR DEAE-SEPHADEX</u>	p. 35
D. <u>PURIFICATION SUR SP-SEPHADEX</u>	p. 36
E. <u>CHROMATOGRAPHIE SUR ULTROGEL AcA44</u>	p. 36
F. <u>CONTROLE DE L'HOMOGENEITE DES PREPARATIONS DE SEROTRANSFERRINE DE LAPIN</u>	p. 37
1 . <u>Electrophorèse sur acétate de cellulose</u>	p. 37
a) <u>Electrophorèse</u>	p. 37
b) <u>Révélation</u>	p. 37
2 . <u>Immunoélectrophorèse sur gélose</u>	p. 38
3 . <u>Electrophorèse en plaque de gel de polyacrylamide</u>	p. 38
II - <u>ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN</u>	p. 38
A. <u>MASSE MOLECULAIRE</u>	p. 38
B. <u>FIXATION DU FER</u>	p. 38
1 . <u>Saturation de la sérotransferrine de lapin</u>	p. 38
2 . <u>Calculs</u>	p. 39
C. <u>DETERMINATION DE LA COMPOSITION MOLAIRE EN ACIDES AMINES</u>	p. 39
D. <u>COMPOSITION EN GLUCIDES</u>	p. 39
1 . <u>Composition centésimale.</u>	p. 39
2 . <u>Composition molaire</u>	p. 40

III - <u>PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES DE LA</u>	p. 40
<u>SEROTRANSFERRINE DE LAPIN</u>	
A. <u>HYDROLYSE PROTEINASIQUE</u>	p. 40
1. <u>Hydrolyse pronasique</u>	p. 40
2. <u>Hydrolyse trypsique</u>	p. 41
B. <u>FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS</u>	p. 42
1. <u>Fractionnement des hydrolysats pronasiques</u>	p. 42
2. <u>Fractionnement des hydrolysats trypsiques</u>	p. 42
C. <u>PURIFICATION DES GLYCOPEPTIDES</u>	p. 42
IV - <u>ETUDE DES GLYCOPEPTIDES DE LA SEROTRANSFERRINE</u>	p. 43
<u>DE LAPIN</u>	
A. <u>DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES CHAINES PEPTIDIQUES</u>	p. 43
1. <u>Identification des acides aminés N-terminale</u> <u>et C-terminale</u>	p. 43
2. <u>Etude de la séquence peptidique des glycopeptides</u>	p. 43
B. <u>ACTION DE LA NEURAMINIDASE</u>	p. 44
C. <u>ETUDE DE LA STRUCTURE DES GROUPEMENTS GLYCANNIQUES</u>	p. 44
1. <u>Détermination de la composition centésimale</u> <u>et molaire en glucides</u>	p. 44

- 2 . Méthylation des glycopeptides p. 45
- a) Préparation de l'hydrure de sodium exempt d'huile et du méthyl-sulfinyle-carbanion p. 45
- b) Perméthylation p. 45
- c) Analyse des produits méthylés p. 46
- 3 . Analyse en Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN) p. 47

V - INCORPORATION DE LA SEROTRANSFERRINE SUR LES p. 47
RETICULOCYTES EN PRESENCE DES GLYCOPEPTIDES

- A. PREPARATION DU SANG ENRICHI EN RETICULOCYTES p. 47
- B. PREPARATION DES TRANSFERRINES MARQUEES p. 48
1. Marquage à l'iode 125 (¹²⁵I) p. 48
- a) Matériel p. 48
- b) Méthode p. 48
2. Marquage au ⁵⁹Fe p. 49
- a) Matériel p. 49
- b) Méthode p. 49
- C. PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES p. 50
- D. PROCEDES D'INCUBATION p. 50
1. Matériel p. 50
2. Méthode p. 51

RESULTATS

p. 53

I - ISOLEMENT DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN

p. 54

A. PRECIPITATION AU RIVANOL PUIS AU SULFATE D'AMMONIUM

p. 54

B. CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-SEPHADEX

p. 54

C. CHROMATOGRAPHIE SUR SP-SEPHADEX

p. 59

D. CONCLUSIONS

p. 59

II - ETUDE DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN

p. 62

A. PROPRIETES PHYSIQUES

p. 63

1 . Masse moléculaire

p. 63

2 . Fixation du fer

p. 63

B. PROPRIETES CHIMIQUES

p. 65

1 . Composition en acides aminés

p. 65

2 . Séquence N-terminale de la sérotransferrine de lapin

p. 65

3 . Composition en glucides

p. 67

C. CONCLUSIONS

p. 67

III - ETUDE DES GLYCOPEPTIDES ISOLES DE LA SEROTRANSFERRINE

p. 69

DE LAPIN

A. GLYCOPEPTIDES PRONASIQUES

p. 70

1 . Hydrolyse pronasique

p. 70

2 . Fractionnement de l'hydrolysate pronasique

p. 70

3 . Etude de la fraction peptidique des glycopeptides

p. 71

GP-I et GP-II

a) <u>Composition en acides aminés</u>	p. 71
b) <u>Acide aminé N-terminal</u>	p. 71
c) <u>Conclusions</u>	p. 74
4 . <u>Etude de la fraction glucidique des glycopeptides</u> <u>GP-I et GP-II</u>	p. 74
a) <u>Composition en glucides</u>	p. 74
b) <u>Action de la neuraminidase</u>	p. 75
c) <u>Perméthylation des glycopeptides GP-I et GP-II</u>	p. 75
d) <u>Etude des spectres de RMN du proton à 360 MHz</u>	p. 77
5 . <u>Conclusions</u>	p. 79
B. <u>GLYCOPEPTIDES TRYPSIQUES</u>	p. 80
1 . <u>Isolement des glycopeptides</u>	p. 80
2 . <u>Composition des glycopeptides tryptiques</u>	p. 83
3 . <u>Etude de la chaîne peptidique</u>	p. 85
a) <u>Acide aminé N-terminal</u>	p. 85
b) <u>Acide aminé C-terminal du glycopeptide GPT-II</u>	p. 85
c) <u>Dégradation récurrente d'Edman sur le glycopeptide</u> <u>GPT-II</u>	p. 86
4 . <u>Conclusions</u>	p. 86
C. <u>CONCLUSIONS</u>	p. 86

<u>IV - LE GLYCANNE DANS L'INTERACTION STF-RETICULOCYTE</u>	p. 88
<u>A. EXPERIENCES PRELIMINAIRES</u>	p. 88
1 . <u>Préparation des réticulocytes</u>	p. 88
2 . <u>Détermination de la concentration optimale en STF</u>	p. 89
3 . <u>Incorporation du fer par le réticulocyte de lapin ; différence entre la STF humaine et la STF de lapin</u>	p. 91
4 . <u>Incubation des réticulocytes de lapin avec la STF de lapin désialylée</u>	p. 93
<u>B. REACTION D'INHIBITION DE L'INTERACTION STF-RETICULOCYTE PAR LES GLYCOPEPTIDES PRONASIQUES</u>	p. 93
1 . <u>Incubation de la STF de lapin et des réticulocytes de lapin, en présence de glycopeptides de la STF humaine</u>	p. 93
2 . <u>Fixation de la STF de lapin doublement marquée sur des réticulocytes de lapin, en présence de glycopeptides pronasiques de la STF humaine à pH 7,4</u>	p. 95
3 . <u>Incubation de deux STF de lapin, l'une marquée au ⁵⁹Fe et l'autre au ¹²⁵I, en présence des glycopeptides de la STF humaine à pH 7,4</u>	p. 97
4 . <u>Incubation de la STF de lapin, en présence du glycopeptide de la STF humaine désialylée</u>	p. 99

5 . <u>Incubation de la STF de lapin, en présence du mélange des monosaccharides dans les mêmes rapports molaires que ceux présents dans le glycopeptide</u>	p. 101
6 . <u>Cinétique d'incorporation du fer de la STF de lapin par le réticulocyte de lapin, en présence des glycopeptides pronasiques de la STF de lapin</u>	p. 103
7 . <u>Discussion</u>	p. 105
C. <u>REACTION D'INHIBITION DE L'INTERACTION STF-RETICULOCYTE PAR LE GLYCOPEPTIDE TRYPSIQUE DE LA STF DE LAPIN</u>	p. 105
1 . <u>Cinétique d'incorporation du fer de la STF de lapin par les réticulocytes de lapin, en présence du glycopeptide trypsique de la STF de lapin</u>	p. 106
2 . <u>Discussion</u>	p. 106
D. <u>REACTION D'INHIBITION DE L'INTERACTION STF-RETICULOCYTE PAR D'AUTRES GLYCOPEPTIDES QUE CEUX DE LA STF</u>	p. 108
1 . <u>Incorporation du fer, en présence des glycopeptides oligomannosidiques</u>	p. 108
2 . <u>Discussion</u>	p. 108
E. <u>CONCLUSIONS</u>	p. 110

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

p. 112

BIBLIOGRAPHIE

p. 117

INTRODUCTION

Le travail dont nous rapportons les résultats dans ce mémoire s'inscrit dans le cadre des travaux entrepris au Laboratoire sur le rôle des transferrines dans le métabolisme du fer, et en particulier sur l'étude de la fixation réversible des sérotransferrines sur les membranes réticulocytaires lors du mécanisme du transfert du fer.

A cause de la difficulté de se procurer des réticulocytes humains, les réticulocytes utilisés dans les travaux sur l'interaction sérotransferrine-réticulocyte, proviennent le plus souvent, de sang de lapin. Par contre, la sérotransferrine utilisée dans la plupart des expériences est la sérotransferrine humaine.

Des études préliminaires ont montré, cependant, que l'incorporation du fer par le réticulocyte dans un système homologue (réticulocyte de lapin-sérotransferrine de lapin), était deux fois supérieure à celle trouvée au niveau d'un système hétérologue (réticulocyte de lapin-sérotransferrine humaine), JANDL *et al.* (1). Nous avons été donc amenés à travailler de préférence sur un système homologue (réticulocyte de lapin-sérotransferrine de lapin). Seulement, si la méthode de préparation et les propriétés physico-chimiques de la sérotransferrine humaine sont bien connues, nos connaissances concernant la sérotransferrine de lapin sont à l'heure actuelle très limitées.

Le but de nos travaux a donc consisté à mettre au point une méthode de préparation de sérotransferrine de lapin pure, et de

définir ses principales propriétés physico-chimiques. Pour définir le rôle des glycanes dans l'interaction sérotransferrine-récepteur membranaire, nous avons été amené à isoler la fraction glycopeptidique de la sérotransferrine de lapin, à déterminer sa structure, et à réaliser en présence de cette fraction glycopeptidique, native ou désialylée, des expériences d'inhibition du transfert du fer.

Nous présenterons d'abord, dans le chapitre des généralités, l'état actuel des connaissances sur les propriétés physico-chimiques des sérotransferrines de différents espèces de vertébrés. Nous préciserons, d'autre part, le rôle de la sérotransferrine dans le métabolisme du fer.

Dans une deuxième partie, réservée à nos travaux personnels, nous présenterons les résultats obtenus concernant la préparation de la sérotransferrine de lapin, ses caractéristiques physiques et chimiques, et en particulier, la structure de la fraction glucidique. Nous discuterons ensuite, les résultats obtenus concernant le rôle des glycanes dans l'interaction entre la sérotransferrine et les réticulocytes.

Jusqu'à présent, nos travaux ont fait l'objet de la communication et de la publication suivantes :

Communication :

D.LEGER, V.TORDERA, G.SPIK et J.MONTREUIL.

Structure et rôle du glycanne de la sérotransferrine de lapin.-
Forum des Jeunes de la Société de Chimie Biologique, Villeneuve
d'Ascq, 27-29 Juin 1978.

Publication :

D.LEGER, V.TORDERA et G.SPIK, L.DORLAND, J.HAVERKAMP et

J.F.G.VLIEGENTHART.

Structure détermination of the single glycan of rabbit sero-
transferrin by methylation analysis and 360 MHz ^1H NMR spectroscopy.

FEBS Lett. Sous presse.

GENERALITES

Les transferrines représentent un groupe de glycoprotéines homologues de nature non hémunique capables de fixer réversiblement 2 atomes de fer. Elles ont été trouvées dans le sérum des vertébrés, dans le lait des mammifères, et dans le blanc d'oeuf d'oiseaux.

Nous nous intéresserons uniquement à la description des propriétés des transferrines sériques, car elles ont un rôle primordial dans la fourniture du fer aux réticulocytes.

I - ISOLEMENT DES SEROTRANSFERRINES

Les méthodes de préparation des sérotransferrines (STF) de différentes espèces de vertébrés sont des modifications des procédés mis au point pour l'isolement de la STF humaine et principalement de celui de SUTTON et KARP (2), de HEIDE *et al.* (3) et de ROOP et PUTNAM (4).

La majeure partie des protéines sériques sont précipitées par le rivanol (lactate de 6,9-diamino-2-éthoxy-acridine). Après élimination du rivanol par addition de NaCl, et dialyse, une précipitation au sulfate d'ammonium à 55 p.100 de saturation permet d'éliminer les immunoglobulines IgG.

La STF est ensuite isolée à partir du surnageant dialysé et lyophilisé, par chromatographie d'échange d'ions, soit sur colonne de DEAE-Séphadex, BAKER *et al.* (6); soit sur colonne de SP-Séphadex, MARTINEZ-MEDELLIN et SCHULMAN (7); soit sur une colonne de CM-Séphadex, HATTON *et al.* (8).

Néanmoins, une importante contamination en hémopexine a été remarquée dans les préparations de STF bovine, HATTON *et al.* (9), et celles de STF humaine, WOODWORTH et BALIN (10).

En effet, WOODWORTH et BALIN (11), ont retrouvé par électrofocalisation, des quantités équivalentes de STF et d'hémopexine dans des prépara-

tions de STF humaine soit disant " dépourvues d'hémopexine ". Le même problème se retrouve dans la préparation de la STF bovine. La séparation de la STF et de l'hémopexine est virtuellement impossible lorsqu'on utilise la méthode d'isolement classique de précipitation et de chromatographie d'échange d'anions, EFREMOV *et al.* (12). Cependant, selon HATTON *et al.* (13), il est possible de séparer la STF de l'hémopexine par passage sur colonne de CM50-Séphadex, et élution par un gradient continu de force ionique.

La présence d'hémopexine dans les préparations de STF peut représenter une source d'erreur considérable lorsqu'on étudie la partie glucidique des STF. En effet, l'hémopexine, avec une masse moléculaire de 56000, contient 20 p.100 de sucres, soit: oses neutres: 4 p.100; N-acétylglucosamine: 8,2 p.100 et acide N-acétyl neuraminique: 7,8 p.100 (HRKAL et MULLER-EBERHARD (14)).

II - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES SEROTRANSFERRINES

Les STF de plusieurs espèces ont été intensément étudiées en ce qui concerne leur masse moléculaire, leur composition en acides aminés et en sucres et leur capacité de fixation du fer. La comparaison de certaines caractéristiques des STF de différentes espèces (Tableau I; p.7) semble confirmer la notion d'une famille de protéines homologues.

A - MASSE MOLECULAIRE

Les résultats obtenus pour les STF de différentes espèces de vertébrés (Tableau I; p. 7), indiquent qu'elles possèdent une masse moléculaire très voisine de celle de la STF humaine, fixée à présent à 76000 daltons, SPIK (15); SPIK *et al.* (16); MANN *et al.* (17); PALMOUR et SUTTON (18) et LEGER *et al.* (19).

Ainsi, GREENE et FEENEY (20), trouvent par équilibre de sédimentation

TABLEAU I

Comparaison des caractéristiques des transferrines de différentes espèces animales.

STF	Masse moléculaire	S° _{20,w}	A ₁ ¹ cm p.100 280 nm.	at. de fer fixés par molécule	Références
Tortue	93.700	5,63	13,33	2,04	PALMOUR et SUTTON (21)
Grenouille	79.400	5,16	11,91	1,85	"
Porc	76.400	5,20	-	1,95	HUDSON <i>et al.</i> (22)
Cheval	77.100	5,25	-	1,80	"
Boeuf	77.300	5,21	-	1,90	"
Lapin	74.600	5,29	13,74	1,95	PALMOUR et SUTTON (23)
	70.000	-	13,86	1,91	BAKER <i>et al.</i> (24)
	76.700	5,28	-	1,92	HUDSON <i>et al.</i> (25)
Mouton	77.500	5,15	12,50	-	GUERIN <i>et al.</i> (26)
"Hagfish"	44.000	3,45	10,78	0,94	PALMOUR et SUTTON (27).
	75.000- 80.000	5,8	-	2	AISEN <i>et al.</i> (28)
Humaine	74.000	4,92	-	-	ROBERTS <i>et al.</i> (29)
	76.000	4,8	14	1,96	SPIK (30) et SPIK (31).
	76.600	5,25	-	-	MANN <i>et al.</i> (32)
	76.200	5,32	14,06	1,91	PALMOUR et SUTTON (33).
	75.000	5,30	-	-	LEGER <i>et al.</i> (34)



en urée 8 M une masse moléculaire de 77500 et 76000 daltons, respectivement pour la STF de lapin et l'ovotransferrine. Par la même technique, mais en absence d'urée, PALMOUR et SUTTON (35), obtiennent respectivement une masse moléculaire de 74590, 79370 et 93.700 daltons pour la STF de lapin, de grenouille et de tortue.

Dans l'étude faite par HUDSON *et al.* (36), sur différentes STF, les auteurs fixent la masse moléculaire de la STF de lapin, cheval, porc et de boeuf à 77.000 daltons.

La STF de "*Eptatretus stoutii*" (Hagfish, poisson très proche de la Lamproie) a fait l'objet d'une intéressante discussion. En effet, PALMOUR et SUTTON (37), avaient déterminé pour cette espèce une masse moléculaire de 44.000 daltons, et la fixation d'un seul atome de fer. Ce résultat étayerait l'hypothèse selon laquelle les STF des vertébrés proviendraient de la duplication du gene responsable de la formation d'une STF ancestrale qui aurait une faible masse moléculaire et qui ne fixerait qu'un seul atome de fer.

Cependant, par la suite, après une étude plus approfondie de la masse moléculaire de la STF de cette espèce, AISEN *et al.* (38), trouvent une valeur de 75.000-80.000 daltons et la fixation de deux atomes de fer.

B - PARTIE PEPTIDIQUE

Le Tableau II;p. 9, rassemble les compositions en acides aminés des STF de différentes espèces de vertébrés. Ces valeurs ne diffèrent pas de manière significative avec l'espèce. De même, les séquences N-terminales données dans la Fig. 1, p. 10, montrent une grande similitude.

Par contre, les séquences des acides aminés au voisinage du point d'attache des glycanes des différentes STF sont beaucoup plus différentes, comme le montre la Fig. 2, p. 11.

Selon GRAHAM et WILLIAMS (39); on peut classer ces séquences en deux types, suivant la nature du résidu en position X dans la séquence: Asn(CHO)-X-

TABLEAU II

Composition molaire en acides aminés des STF de différentes espèces de vertébrés.

Acides aminés	Sérot transferrine						
	Boeuf(a)	Cheval(a)	Porc(a)	Grenouille(b)	Tortue(b)	Lapin(c)	Homme(d)
Asp	74	73	78	68	79	70	74
Thr	44	32	25	37	53	20	28
Ser	49	39	35	39	65	34	37
Glu	63	60	59	65	80	61	54
Pro	35	42	36	37	33	32-33	36
Gly	45	42	35	48	64	45	46
Ala	49	50	48	55	60	51	56
1/2 Cys	34	33	33	25	17	32	35
Val	44	44	41	37	56	42	39
Met	7	4	5	8	8	5- 6	8
Ileu	17	16	17	23	30	15	13
Leu	45	54	53	50	60	58	55
Tyr	20	21	16	20	24	23	27
Phe	25	20	23	27	31	25	30
Trp	10	9	9	5	10	10	7
Lys	52	44	41	72	59	52	52
His	15	14	12	16	15	16	17
Arg	24	23	23	20	28	24	23
Total	652	620	589	652	772	616	637

(a) HUDSON *et al.* (40).

(b) PALMOUR *et* SUTTON (41).

(c) BAKER *et al.* (42).

(d) SPIK (43), MONTREUIL *et coll.* (44), CHARET (45).



STF humaine (a)	Val-Pro-Asp-Lys-Thr
STF de porc (a)	Val-Pro-Glu-Lys-Thr
STF bovine (a)	Ala(Pro,Asp,Lys,Ser)
STF de mouton (b)	Ser-Pro-Glu-Lys-Thr-Val-Arg-Trp

(a) GRAHAM et WILLIAMS (46)

(b) GUERIN *et al.* (47).

Figure 1: Schéma de structure du peptide N-terminal des STF de différentes espèces de vertébrés.



Séquence de type A

STF humaine (a) Tyr-Asn(CHO)-Lys-Ser-Asp-Asp-Asn-Gln-Glu-Cys-Thr-Pro-Ala-Gly-Tyr
STF bovine (b) Arg-Val-Tyr-Asn(CHO)-Ser-Ser-Leu-Gln-Thr-Asn-(Pro,Gly,Ala)
STF porcine (b) Asp-Asp-Ser-Ser-Arg-Lys-Asn(CHO)-Arg-Ser-Leu-Thr-Val-Gly-Glu-Glu
STF de poule (c) Gly-Leu-IleuHis-Asn(CHO)-Arg-Thr

Séquence de type B

STF humaine (a) Phe-Gly-Ser-Asn(CHO)-Val-Thr-Asp-Cys-Ser-Gly-Asp-Phe-Leu-Phe-Cys
STF bovine (b) Phe-Ala-Gly-Asn(CHO)-Ser-Thr-Gln-His-Val-Leu-Pro-Lys
STF porcine (b) Thr-Ser-Asp-Asn(CHO)-Leu-Ser-Ser-Ala-Phe
STF de poule (c) Ala-Asn(CHO)-Leu-Thr-Gly

(a) CHARET *et al.* (48) et CHARET et MONTREUIL (49).

(b) GRAHAM et WILLIAMS (50).

(c) WILLIAMS (51).

Figure 2: Séquence peptidique des STF de différentes espèces de vertébrés au niveau du point d'attache des glycannes.



Ser(ou Thr). Le type A possédant un acide aminé basique en position X, et le type B un acide aminé aliphatique. La seule exception connue est la séquence des glycopeptides de la STF bovine, qui possède un résidu de sérine en position X dans les deux cas.

JEPPSON (52), BEZKOROVAINY et GROHLICH (53), SUTTON et BREW (54), et CHARET (55), ont entrepris la détermination de la structure primaire de la STF humaine par coupure au BrCN au niveau des résidus de méthionine. CHARET (56), obtient 9 peptides (CN-1 à CN-9), dont deux sont des glycopeptides (CN-1 et CN-2); le glycopeptide CN-1, de masse moléculaire 26.500 daltons, étant en position C-terminale est le glycopeptide de type B. La structure primaire des peptides CN-7, CN-8 et CN-9 est donnée par JOLLES *et al.* (57). Cependant, récemment, MACGILLIVRAY *et al.* (58), ont déterminé presque totalement la séquence primaire de la STF humaine; et par comparaison des résidus 1 à 339 aux résidus 340 à 676 , montrent de grandes homologues de séquence, qui les amènent à conclure à la duplication du gène responsable de la synthèse de la STF qu'ils avaient déjà suggéré en 1975, MACGILLIVRAY et BREW (59).

C - PARTIE GLYCANNIQUE

Si la structure de la fraction glycanique de la STF humaine est bien connue à présent; deux glycannes biantennés, dont la structure a été résolue par SPIK *et al.* (60), (Fig. 3, p.13) et confirmée définitivement à l'aide de l'étude des spectres obtenus par résonance magnétique nucléaire du proton, DORLAND *et al.* (61), on ne sait pratiquement rien de la structure de la fraction glucidique des STF d'autres espèces de vertébrés.

Les seules informations acquises concernent la composition molaire en sucres de la STF de plusieurs espèces.

Les résultats rassemblés dans le Tableau III; p. 14 ; montrent que l'accord n'est pas complet.

TABLEAU III

Composition molaire en glucides des STF de différentes espèces de vertébrés.

Nature du monosaccharide	Sérotransferrine									
	Boeuf			Porc		Cheval	Poulet	Lapin	Homme	
	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(a)	(d)	(a)	(e)	
Galactose	2	6,2	2	8	3,1	6	3,5	5	4	
Mannose	3	7,2	3	9	4,3	4	1,8	4	6	
N-Acétyle-glucosamine	3-4	8,8	3,3	14	5,6	9	5,7	5-6	8	
Acide N-Acétyle-neuraminique	2	2	2 et 3	7-8	2	4	1,7	4	3 ou 4	
Fucose			0,3	3-4	1					
Nombre de groupements glycanniques mis en hypothèse par les auteurs.	1	2	1	4	1	2	1	2	2	

(a) HUDSON *et al.* (64).

(b) GRAHAM *et WILLIAMS* (65).

(c) HATTON *et al.* (66).

(d) WILLIAMS (67).

(e) SPIK (68).



En effet, si GRAHAM et WILLIAMS (69), isolent deux glycopeptides de la STF bovine, HATTON *et al.* (70), ne retrouvent qu'un seul glycopeptide. Ces derniers auteurs observent cependant une hétérogénéité au niveau du nombre de résidus d'acide sialique du glycanne; 60 p.100 des molécules en posséderait deux résidus et 40 p.100, trois.

En ce qui concerne la STF porcine les résultats sont bien différents. En effet, HUDSON *et al.* (71), d'après ses résultats sur la composition molaire en glucides, suggèrent l'existence de quatre groupements glycaniques. Par contre, GRAHAM et WILLIAMS (72), n'isolent qu'un seul glycopeptide; ce glycanne serait branché sur le " site " A ou B indistinctement (voir la Fig. 2, p.11).

Ces mêmes auteurs isolent un seul glycopeptide de la STF de poulet; 85 p.100 de ce glycanne serait branché sur le " site " A, et seulement 15 p.100 sur le "site" B.

Les premières observations faites sur la fraction glucidique de la STF de lapin sont celles de BAKER *et al.* (73), et PALMOUR et SUTTON (74). Ces auteurs trouvent deux molécules d'acide sialique par molécule de STF de lapin.

Plus tard, HUDSON *et al.* (75), suggèrent l'existence de deux groupements glycaniques par molécule de STF de lapin.

D - FIXATION DU FER PAR LA SEROTRANSFERRINE

La STF humaine, ainsi que les STF d'autres espèces de vertébrés, sont capables de fixer deux atomes de fer sous forme ferrique, SURGENOR *et al.* (76); PALMOUR et SUTTON (77), et HUDSON *et al.* (78).

La STF saturée en fer présente une coloration rose saumon qui possède un maximum d'absorbance à 460-465 nm., SURGENOR *et al.* (79). Ce complexe fer-STF est dissociable réversiblement en milieu acide, LAURELL (80) et SURGENOR *et al.* (81)

Dans les expériences de saturation de la STF en fer, ce dernier doit être ajouté sous forme chélatée car les ions ferriques libres se fixent sur des sites non spécifiques, AASA *et al.* (82), et donnent des transferrines saturées.

La fixation et la stabilité du métal sont largement favorisées par la présence d'ions bicarbonate, SCHADE *et al.* (83). Cependant, d'autres anions, telles que le NTA (Nitrilo-tri-acétate) ou l'oxalate, sont aussi capables de manifester le même effet.

La présence d'anions semble être indispensable pour la fixation du fer, PRICE et GIBSON (84). Cependant, d'après BATES et SCHLABACH (85) et AISEN *et al.* (86), " *in vivo* " l'anion lié à la STF serait le carbonate.

On connaît également la participation de plusieurs acides aminés à la fixation du fer. Actuellement on admet la participation de deux ou trois résidus de tyrosine par site de fixation, SCHADE *et al.* (87) et AASA et AISEN (88). La participation des atomes d'azote dans les sites de fixation du fer a été suggérée par WINDLE *et al.* (89) et AASA et AISEN (90).

Dans la STF humaine, les deux sites de fixation du fer sont cependant légèrement différents, AASA *et al.* (91). En effet, PRINCIOTTO et ZAPOLSKI (92) ont démontré par des expériences de dissociation du complexe fer-STF en fonction du pH, qu'un des sites fixe le fer à un pH plus acide que l'autre. Au même moment, KRYSTEVA *et al.* (93) ont mis en évidence une différence structurale entre les deux sites, en ce qui concerne le nombre de résidus d'histidines impliqués dans chaque site.

La différence entre les deux sites de fixation du fer de la STF humaine est maintenant bien démontrée par CANNON et CHASTEEN (94), MAZURIER *et al.* (95), CHASTEEN *et al.* (96) et HARRIS (97).

Par contre, PRINCIOTTO et ZAPOLSKI (98), suggèrent que les deux sites de fixation du fer de la STF de lapin, contrairement à ceux de la STF humaine, ne diffèrent pas au niveau de leurs propriétés de dissociation en milieu acide.

D'autre part, la fixation du fer sur la STF entraîne une stabilité

plus grande de la protéine vis à vis de l'action des protéases, SPIK (99) et SPIK et MONTREUIL (100). La différence de conformation entre la forme " apo " et la forme saturée de la STF est bien démontrée à présent, JARRIT (101), MAKEY et SEAL (102) et KRYSTEVA *et al.* (103).

III - ROLE BIOLOGIQUE DE LA SEROTRANSFERRINE

La fonction essentielle de la STF est le transport du fer dans l'organisme. La STF jouerait en effet un rôle fondamental dans le métabolisme du fer. Néanmoins, d'autres activités ont été signalées par les auteurs, telle qu'une activité bactériostatique et le transport de l'acide folique.

A - REPARTITION ET METABOLISME DE LA SEROTRANSFERRINE

La STF est essentiellement synthétisée dans le foie (voir la revue générale de SCHULTZE et HEREMANS (104)) et sa demi-vie a été fixée entre 7 et 12 jours suivant les auteurs, KATZ (105), AWAI et BROWN (106) et GITLIN et coll. (107).

Un individu normal possède de 10 à 11 g. de STF, dont 52 à 53 p.100 sont extravasculaires, AWAI et BROWN (108).

La STF se trouve dans le sang humain à la concentration d'environ 2 g. par litre, JAGER (109), BAMBACH (110) et WOODWORTH et SCHADE (111); mais elle existe aussi dans les urines, BERGGARD (112), dans le liquide céphalo-rachidien, EWERBECQ (113), dans le lait, HANSON (114) et dans la bile et d'autres tissus et liquides biologiques.

La quantité de STF catabolisée dans l'organisme humain est par jour de 1 g. environ, FREEMAN (115).

B - FONCTION DE LA SEROTRANSFERRINE DANS LE METABOLISME DU FER

Nous situerons le rôle central de la STF dans le métabolisme

du fer à l'aide du schéma de la Fig. 4, p. 19 .

Le fer lié à la STF est échangé plusieurs fois par jour. En effet, la demande de fer par les érythroblastes de la moelle osseuse par jour est quatre fois plus grande que la quantité de fer vasculaire liée à la STF.

L'apport de fer à la STF provient d'une part de l'absorption du fer au niveau intestinal, et d'autre part, de la destruction des globules rouges qui a lieu principalement dans les cellules réticulo-endothéliales.

La STF peut aussi utiliser le fer qui est accumulé par la ferritine et l'hémossiderine dans le foie et les tissus cellulaires.

Le taux de saturation en fer de la STF dans le sang pourrait jouer un rôle important dans le transport du fer de certains tissus à d'autres (voir les revues générales de MORGAN (116) et de LANE (117)). En effet, en cas de ferriprivation, la STF est faiblement saturée et le fer est mobilisé de la ferritine et transporté par la STF aux érythroblastes de la moelle osseuse. Par contre, en cas d'excès de fer, la STF est fortement saturée, et la majeure partie du fer absorbé au niveau intestinal est transporté par la STF, puis stocké dans la ferritine et l'hémossiderine, et accumilé sous forme de fer de réserve.

1 . Interaction entre la sérotransferrine et les réticulocytes

Depuis les premiers travaux de JANDL *et al.* (118), des nombreuses expériences ont été effectuées pour comprendre le processus de transfert du fer de la STF aux réticulocytes.

Les études de JANDL *et al.* (119), ont montré que la STF n'était pas capable de transférer son fer qu'aux érythrocytes immatures: les réticulocytes. Le traitement des réticulocytes par la trypsine ou la chymotrypsine , inhibe le transfert du fer, et la présence d'EDTA

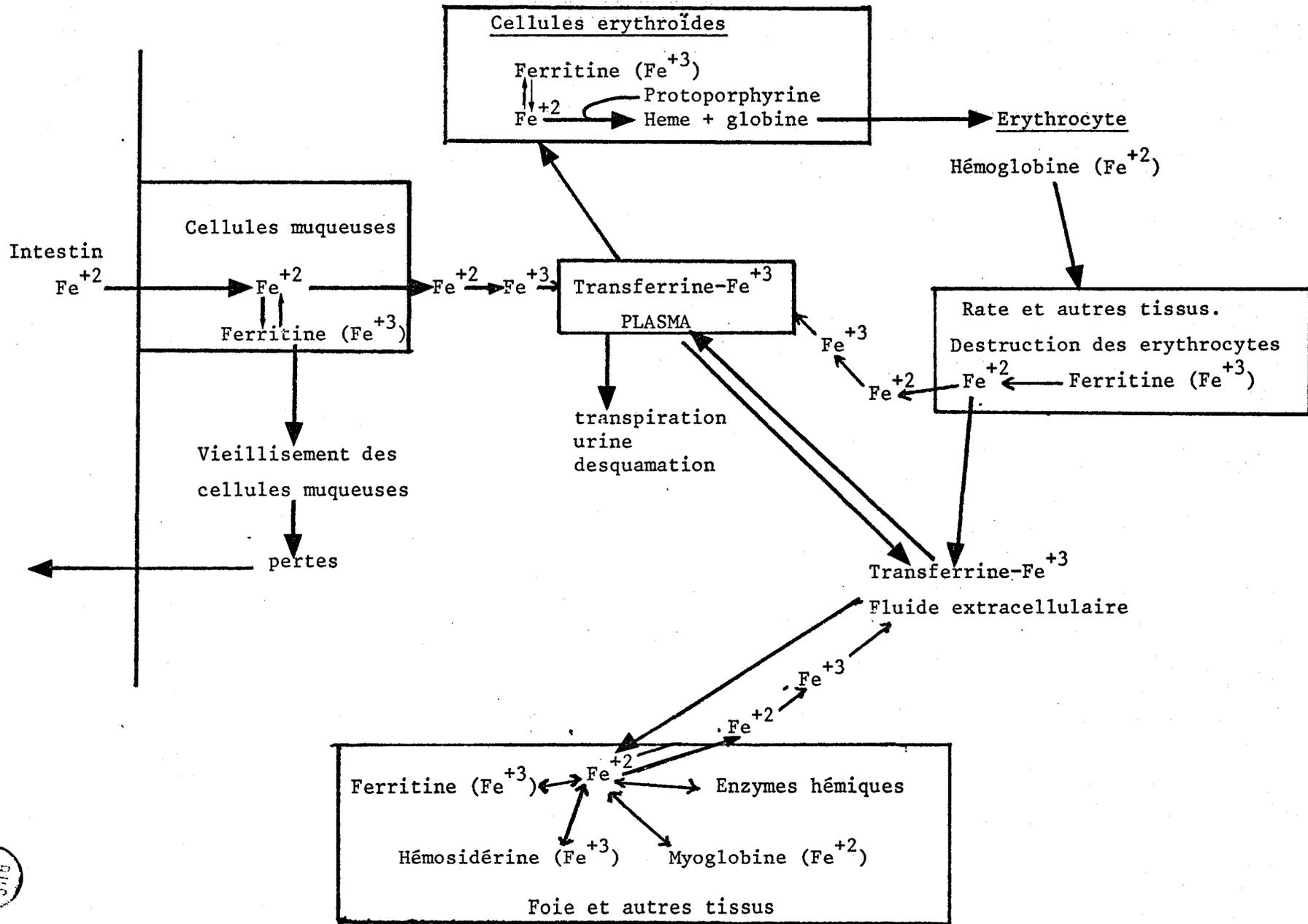


Figure 4: Rôle de la sérotransferrine dans le métabolisme du fer

(acide éthylène-diamino-tétracétique) n'altère pas ce transfert.

Ces mêmes auteurs, ont montré, d'autre part, la différence d'affinité des STF pour les réticulocytes dans un système homologue et dans un système hétérologue. Ainsi, le transfert du fer de la STF humaine sur les réticulocytes de lapin est deux fois plus faible que celui de la STF de lapin pour les réticulocytes de lapin, JANDL *et al.* (120).

Tous ces résultats ont poussé JANDL *et al.* (121) à considérer que le processus de transfert du fer de la STF aux réticulocytes, se fait par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire.

Actuellement, on peut différencier quatre étapes principales dans le mécanisme de transfert du fer de la STF aux réticulocytes,

- a) Adsorption de la STF sur la membrane réticulocytaire.
- b) Formation d'un complexe stable entre la STF et le réticulocyte.
- c) Transfert du fer vers la biosynthèse de l'hémoglobine.
- d) Détachement de la STF de la membrane.

a) Adsorption de la STF sur la membrane réticulocytaire

L'adsorption de la STF sur la membrane est considérée comme un processus physique, car elle n'est pas affectée ni par la température, ni par les inhibiteurs métaboliques; mais elle dépend de la charge nette électrique de la surface de la membrane ou de la STF, du pH et de la force ionique du milieu d'incubation, MORGAN (122), KORNFELD (123), BAKER et MORGAN (124)

b) Formation d'un complexe entre la STF et le réticulocyte

Cette deuxième étape, par contre, représente un véritable processus de reconnaissance spécifique de la STF par le réticulocyte; processus qui nécessite un apport d'énergie et qui est sensible à la

température, JANDL *et al.* (125). Le mécanisme intime de la reconnaissance de la STF par le réticulocyte reste encore mal connu. Cependant, des expériences ont été effectuées afin d'élucider le rôle de la partie protéique de la STF ou du récepteur, et de la partie glucidique de la STF ou de la membrane, dans cette reconnaissance.

α) Influence de la partie protéique de la STF

La modification chimique des groupements aminés libres de la STF provoque une fixation plus grande de celle ci sur les réticulocytes, et une incorporation du fer plus faible à l'intérieur de la cellule; cette fixation supplémentaire se ferait sur des sites non spécifiques, l'affinité pour les sites spécifiques étant nettement diminuée, KORNFELD (126).

β) Influence de la partie glycanique de la STF

L'élimination de l'acide N-acétyl-neuraminique de la STF humaine n'affecte pas profondément leur affinité pour les membranes du réticulocyte de lapin, MORGAN *et al.*(127), et KORNFELD (128). L'élimination de la moitié des monosaccharides des groupements glycaniques de la STF humaine par l'action d'un mélange de glycosidases provenant d'un précipité sulfate d'ammonium de la fève Jack, ne semble pas altérer le transfert du fer sur les réticulocytes de lapin, KORNFELD (129). De plus, ce même auteur, n'observe pas une diminution de l'incorporation du fer par le réticulocyte en présence des concentrations croissantes en glycopeptide pronasique de la STF humaine (jusqu'à 140 molaire excès par rapport à la STF.

γ) Influence de la partie glycanique du récepteur membranaire

La fixation de la sérotransferrine et le transfert du fer sur les réticulocytes ne sont pas altérés lorsque les réticulocytes sont traités

par la neuraminidase, HEMMAPLARDH et MORGAN (130). Par contre, LEIBMAN et AISEN (131), suggèrent que la partie glycanique de la sous-unité majeure du récepteur qu'ils ont isolé, a un rôle décisif dans la fixation de la STF sur le réticulocyte. En effet, la seule différence trouvée entre le récepteur du réticulocyte et le récepteur de l'érythrocyte mature consiste en l'absence de la partie glycanique de cette sous-unité, LEIBMAN et AISEN (132).

L'action de la Concanavoline A sur l'interaction STF-réticulocytes, effectuée par LOH et MORGAN (133), n'inhibe pas la fixation de la STF sur les réticulocytes, mais inhibe fortement l'incorporation du fer dans la cellule, cette réaction n'étant pas une simple conséquence de l'agglutination des réticulocytes. Ces auteurs expliquent ce résultat en supposant que la Concanavoline A se fixe sur les glycoprotéines membranaires de la cellule, soit par interaction directe avec les récepteurs de la STF, soit par production d'un changement non spécifique de la structure de la membrane.

δ) Influence de la partie protéique du récepteur

Le traitement des réticulocytes par la trypsine et la pronase, montre que la fixation de la STF par les cellules nécessite une interaction avec un récepteur de nature protéique, HEMMAPLARDH et MORGAN (134).

ε) Isolement du complexe

De nombreux travaux ont été effectués afin d'isoler le récepteur membranaire de la STF.

En 1974, SPEYER et FIELDING (135), après incorporation de la STF humaine doublement marquée au ^{125}I et ^{59}Fe et solubilisation des membranes réticulocytaires humaines par le Triton X-100, isolent par passage sur colonnes de Sépharose 2B et 6B un composé de masse moléculaire 230.000 qu'ils identifient comme le complexe STF-récepteur membranaire. Le récepteur aurait donc lui même, une masse moléculaire de 150.000 daltons.

Dans le système STF de lapin-réticulocyte de lapin, VAN-BOCKXMEER et MORGAN (136), en utilisant un détergent non ionique, le Teric 12A9, isolent par chromatographie de tamissage moléculaire, un complexe STF-récepteur, d'une masse moléculaire de 275.000 daltons.

Par contre, LIGHT (137), par passage sur colonne de Sépharose 4B-STF des membranes solubilisées par le Triton X-100, obtient une protéine de masse moléculaire 65.000 à 70.000 daltons constituée par deux monomères.

Récemment, LEIBMAN et AISEN (138), après incorporation de la STF de lapin sur les réticulocytes et solubilisation des membranes par le Triton X-100, isolent, par passage sur colonne d'Ultrogel Aca22, un complexe STF-récepteur de masse moléculaire 350.000-400.000 daltons. Le récepteur, de nature glycoprotéique, est constitué de deux sous-unités; une de 95.000 daltons et l'autre de 176.000 daltons.

c) Transfert du fer vers la biosynthèse de l'hémoglobine

Le mécanisme de transfert du fer de la STF à la globine reste aussi très mal connu.

Certaines expériences suggèrent que le départ du fer de la STF est précédé par le déplacement de l'anion carbonate impliqué dans le site de fixation, EGYED (139), AISEN et LEIBMAN (140), MARTINEZ-MEDELLIN et SCHULMAN (141) et WILLIAMS et WOODWORTH (142). Ainsi, SCHULMAN *et al.* (143), pensent à l'existence d'une enzyme (anhydrase carbonique), qui enlèverait l'ion carbonate de la STF; celle-ci, relâcherait ainsi son fer qui serait pris en charge par un intermédiaire.

En effet, le fait que le blocage des groupements thiols n'affecte pas la fixation de la STF sur les membranes, mais le transfert du fer à l'intérieur du réticulocyte, EDWARDS et FIELDING (144) et FIELDING et SPEYER (145), pourrait étayer cette hypothèse.

D'après certains auteurs, la STF rentrerait à l'intérieur de la cellule par un processus de pinocytose, et elle céderait son fer à des intermédiaires cellulaires, MORGAN et APPLETON (146), SULLIVAN *et al.* (147), MARTINEZ-MEDELLIN et SCHULMAN (148) et HEMMAPLARDH et MORGAN (149).

Cependant, des études récentes montrent que lorsqu'on couple la STF à du Sépharose, elle reste capable de transférer son fer à l'intérieur du réticulocyte et celui-ci se retrouve sur l'hémoglobine, GLASS *et al.* (150), et LOH *et al.* (151), ce qui infirmerait l'hypothèse précédente.

L'intervention de l'ATP dans le mécanisme de transfert du fer a été proposé depuis plusieurs années, MAZUR *et al.* (152) et MAZUR et CARLETON (153).

Récemment, KAILIS et MORGAN (154), suggèrent que l'ATP est une source d'énergie nécessaire pour le processus d'endocytose de la STF qu'ils mettent en hypothèse.

Par contre, EGYED (155), montre que l'ATP est directement impliqué dans le transfert du fer. Cet auteur suggère que le détachement du fer de la STF est un processus membranaire qui nécessite l'interaction entre l'ATP et la membrane.

D'après FIELDING et SPEYER (156), la STF fixée sur le récepteur membranaire, donnerait son fer à un composant membranaire B₁ ; puis, le fer serait transféré de ce composé à un autre composé membranaire A, lequel le céderait à un transporteur cytoplasmique identifié à la ferritine, FIELDING et SPEYER (157) et NUNEZ *et al.* (158).

d) Détachement de la STF de la membrane

Le départ du fer de la STF provoquant un changement de confor-

mation de la protéine entraînerait son détachement de la membrane. Cependant, jusqu'à présent aucune preuve n'a été amenée pour infirmer ou confirmer cette hypothèse. On sait seulement que c'est un phénomène sensible à la température, et similaire à beaucoup d'égard à la deuxième étape de la fixation de la STF sur les réticulocytes.

2 . Intéraction entre la sérotransferrine et d'autres tissus

a) Intestin

Le fer, absorbé au niveau de l'intestin , traverse les entérocytes par un mécanisme encore très mal connu. Cependant, deux protéines capables de fixer le fer ont été isolées dans les cellules de la muqueuse intestinale. La protéine 1 est une forme de ferritine différente de la ferritine d'autres tissus cellulaires, HUEBERS *et al.* (159). La protéine 2, capable de fixer deux atomes de fer, possède une masse moléculaire de 78.000 daltons et est constituée par deux sous-unités, POLLACK et LASKY (160).

Le mécanisme du passage du fer à travers la membrane basale des entérocytes reste inconnu. D'après FORTH et RUMMEL (161), le fer serait préalablement réduit à l'état d'ions ferreux et traverserait la membrane sous forme de complexe. Une fois à l'extérieur de l'entérocyte, le fer serait oxydé à l'état ferrique et fixé par la STF.

La STF dirigerait le fer, soit vers les organes érythropoïétiques où le fer est utilisé comme nous l'avons décrit à la page , soit vers des tissus comme le foie et la rate, où il est mis en réserve sous forme de ferritine ou d'hémosidérine.

b) Foie

Le mécanisme du passage du fer de la STF à l'intérieur des cellules hépatiques reste encore très mal connu.

MAZUR *et al.* (162), ont montré , en 1960, que le transfert

du fer n'était pas inhibé par une large variété d'inhibiteurs métaboliques. Le fer passerait donc à l'intérieur des cellules par un processus non enzymatique, MAZUR *et al.* (163).

Par contre, pour GARDINER et MORGAN (164), la STF serait reconnue par un site récepteur spécifique, récepteur détecté par VAN-BOCKXMEER *et al.* (165). Le mécanisme de transfert du fer ne serait donc pas très différent de celui des réticulocytes, GROHLICH *et al.* (166).

L'échange de fer entre la STF et le foie est réversible car lorsque l'organisme a besoin d'un apport supplémentaire en fer, celui-ci peut être mobilisé à partir du foie et d'autres organes de réserve. Des évidences montrent que le fer est préalablement réduit avant de quitter la cellule, et dans le liquide extracellulaire oxydé avant d'être fixé par la STF.

Deux mécanismes ont été proposés pour la réduction intracellulaire du fer. Le premier propose comme responsable la xanthine oxydase, MAZUR et CARLETON (167). L'autre, par contre, propose l'acide ascorbique comme agent réducteur, LYNCH *et al.* (168). Les ions ferreux, une fois la membrane traversée, seraient oxydés sous forme d'ions ferriques par la céruléoplasmine, et fixés ensuite par la STF plasmatique.

c) Placenta

La STF présente aussi la capacité de se fixer le placenta et transférer son fer au foetus , VOSBURGH et FLEXNER (169). AWAI, CHIPMAN et BROWN (170) et ELMER et BROWN (171), ont montré chez le rat qu'un seul des deux sites de la STF donne son fer au placenta et que c'est le même site qui est responsable du transfert du fer au réticulocyte. D'ailleurs , d'après LAURELL et MORGAN (172), le mécanisme de fixation

de la STF sur le placenta ne serait pas très différent de la fixation sur les réticulocytes. De plus, VAN-BOCKXMEER, HEMMAPLARDH et MORGAN (173), ont démontré la présence d'un récepteur de la STF dans le placenta; la fixation spécifique de la STF étant d'ailleurs deux fois plus élevée sur ce récepteur dans le placenta que dans la moelle osseuse.

3 . Hypothèse de Fletcher et Huehns

Afin d'expliquer le mécanisme par lequel la STF peut transférer le fer à des tissus différents, FLETCHER et HUEHNS (174), en 1968, émettent une hypothèse (Fig.5 , p.28) fondée sur la base de leurs résultats expérimentaux. D'après ces auteurs, un des sites de fixation du fer donnerait préférentiellement son fer aux érythroblastes de la moelle osseuse et au placenta. L'autre site serait reconnu préférentiellement par les cellules de réserve du foie.

De nombreux travaux ont été effectués afin de vérifier cette hypothèse.

Les résultats obtenus ont montré que dans un système hétérologue (STF humaine-réticulocyte de lapin), les cellules utilisent préférentiellement le fer fixé sur l'un des deux sites, FLETCHER (175), CHERNELCH et BROWN, (176), ZAPOLSKI *et al.* (177), et HARRIS et AISEN (178).

Par contre, la STF humaine donne son fer aux réticulocytes humains (donc, dans un système homologue) indifféremment à partir de ses deux sites, HARRIS et AISEN (179).

Egalement, la STF de lapin donne son fer indifféremment à partir de ses deux sites aux réticulocytes de lapin, HARRIS et AISEN (180) et PRINCIOTTO et ZAPOLSKI (181).

L'hypothèse de FLETCHER et HUEHNS semble se confirmer,

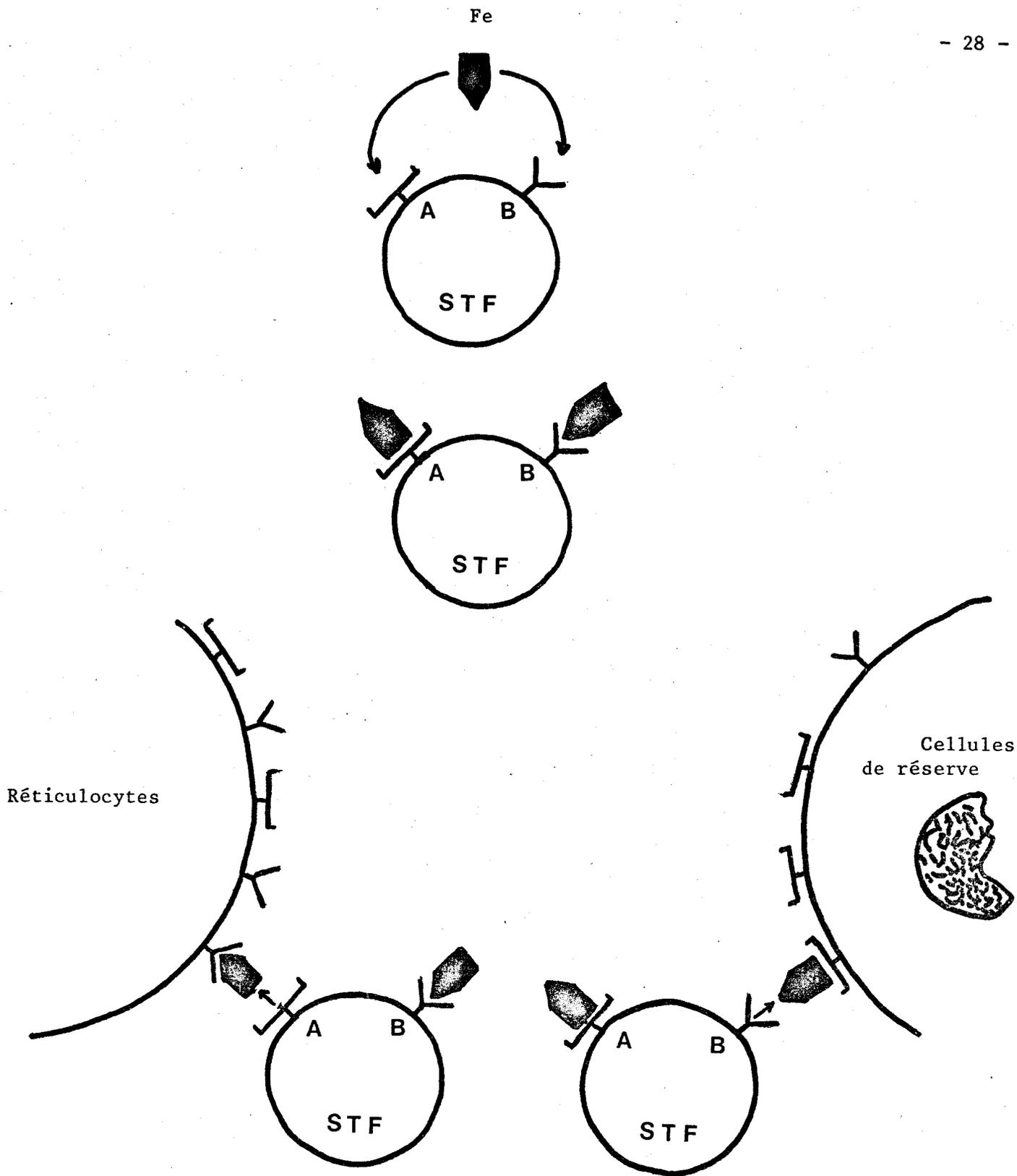


Figure 5 : Schéma de l'hypothèse de FLETCHER-HUEHNS, d'après BROWN (182)

La STF peut fixer le fer sur les sites A et B. Le fer du site A est libéré préférentiellement aux réticulocytes (et placenta). Le fer du site B est libéré préférentiellement aux cellules de réserve.

BHS
LILLE

cependant, dans un système homologue, d'après les travaux effectués sur le rat " in vivo " et " in vitro " de AWAI *et al.* (183).

IV - CONCLUSIONS

Les résultats que nous venons d'exposer dans ce chapitre de généralités nous montrent, que si les sérotransferrines de vertébrés appartiennent bien à un même groupe de protéines, aux propriétés physico-chimiques très voisines, les informations concernant leur partie glycanique sont fragmentaires et disparates, et la seule structure complète connue est celle des glycanes de la STF humaine. D'autre part il apparaît d'après ces résultats que le mécanisme moléculaire de l'interaction entre la STF et le réticulocyte reste très mal connu.

Notre but, dans ce travail, est donc d'élucider le rôle éventuel de la partie glucidique de la STF dans cette interaction. En effet, l'hypothèse de travail est fondée sur l'observation que la fixation du fer sur la STF entraînait une modification de la conformation de la protéine. Cette modification entraînerait elle-même une modification de la conformation spatiale des groupements glycaniques de manière à ce que ces groupements puissent reconnaître le récepteur membranaire (Fig.6 p. 30).

La différence d'affinité entre la STF humaine et la STF de lapin pour les réticulocytes de lapin, pourrait provenir d'une différence éventuelle de structure de la fraction glycanique entre

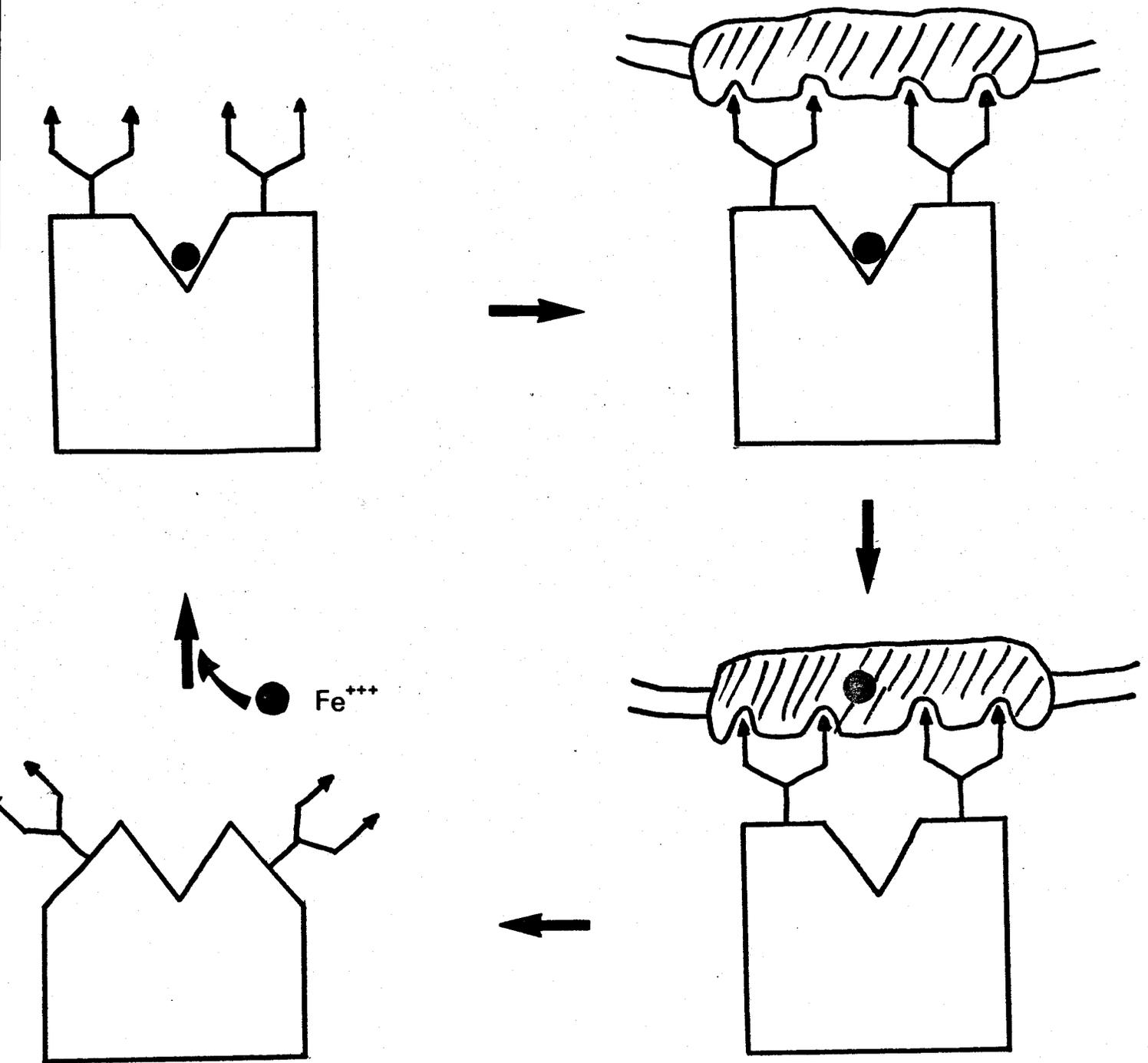


Fig 6: Schéma hypothétique de la fixation réversible de la STF sur la membrane des réticulocytes.

les deux glycoprotéines.

Nous avons donc été amené à isoler la fraction glucidique de la STF de lapin, et à déterminer leur structure. Ultérieurement cette fraction a été utilisée afin de vérifier si les groupements glycaniques de la sérotransferrine jouent un rôle dans l'interaction STF-réticulocytes.

MATERIEL ET METHODES

I - PREPARATION ET ANALYSE DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN

Le procédé de préparation utilisé est une modification des méthodes de ROOP et PUTNAM (184) et de MARTINEZ-MEDELLIN et SCHULMAN (185), appliquées au sérum de lapin.(Fig.7 p.34).

A - PRELEVEMENT DU SANG DE LAPIN ET OBTENTION DU PLASMA

Le sang de lapin est recueilli directement dans des seaux en plastique sur une solution d'héparine (à raison de 5.000 unités par litre de sang) dans NaCl 9 p.100; ceci pour éviter une importante hémolyse due aux conditions de récupération du sang. En effet, le prélèvement se fait dans un abattoir privé, et les lapins pendus par les pieds sont d'abord assomés, puis égorgés, et le sang recueilli dans les seaux en grandes quantités, contient de l'urine et des poils. Le sang est ensuite centrifugé pour éliminer les éléments figurés, et le plasma récupéré est dialysé, puis lyophilisé.

B - PRECIPITATION AU RIVANOL PUIS AU SULFATE D'AMMONIUM

1 . Réactifs

- Solution de chlorure de sodium à 9 g. p.litre.
- Tampon 0,005 M en 2-amino-2hydroxy-méthyl-1,3 dipropanéidol ou " Tris ", ajusté à pH 8,8, avec l'acide chlorhydrique.
- Solution de rivanol (lactate de 6,9 diamino-2-éthoxy-acridine) à 0,6 p.100, obtenue en dissolvant 6 g. de rivanol dans 1 litre du tampon " Tris " précédent.
- Solution de chlorure ferrique à 2,32 g. de $FeCl_3$ à 6 H_2O par litre de tampon 0,1 M en citrate de sodium de pH 8,6.

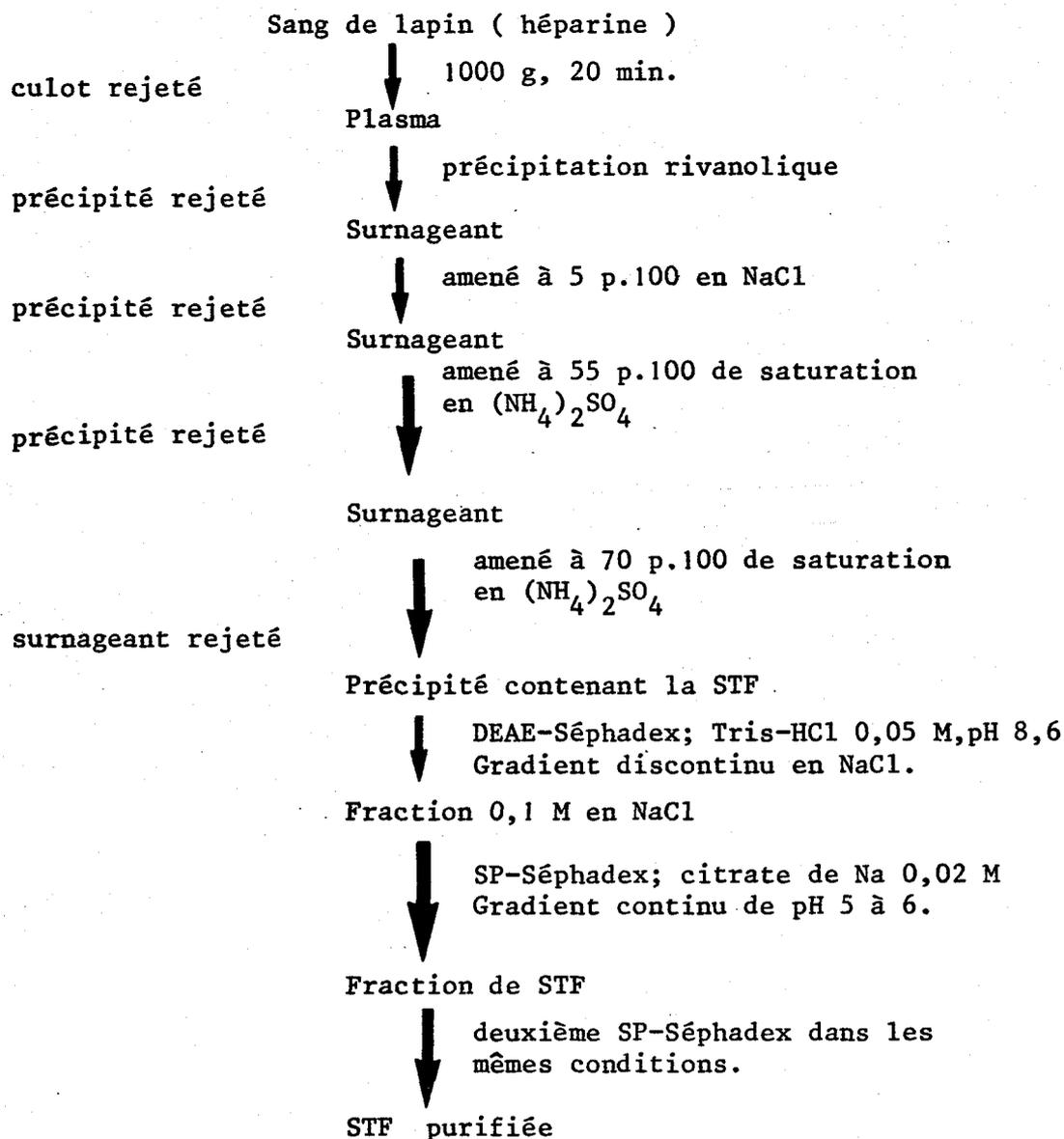


Figure 7 : Schéma d'isolement de la STF de lapin par précipitation sélective et chromatographie d'échange d'ions.

2 . Mode opératoire

A 50 g. de plasma de lapin dissous dans 750 ml de sérum physiologique, on ajoute 2.250 ml de tampon " Tris " de pH 8,8 et 5 ml de la solution ferrique. Puis, on ajoute goutte à goutte 3 l. de la solution de rivanol, pendant une nuit à 4°C, sous agitation.

Le mélange est centrifugé à 8.000 g pendant 20 minutes, et le surnageant, qui contient la STF, est additionné de chlorure de sodium cristallisé, de façon à obtenir une solution à 5 g. de NaCl pour 100 ml. Après un repos d'une nuit à 4°C, le rivanol précipité est éliminé par centrifugation et filtration sur papier. Le surnageant est dialysé contre de l'eau permutée et lyophilisé.

10 g. de cette fraction rivanolique sont dissous dans 500 ml d'eau distillée. On ajoute alors, sous agitation, du sulfate d'ammonium pour obtenir une concentration finale à 55 p.100 de saturation. Les immunoglobulines G (IgG) précipitent, et après une nuit à 4°C, le précipité est éliminé par centrifugation. Au surnageant, on ajoute du sulfate d'ammonium pour obtenir une concentration finale à 70 p.100 de saturation, entraînant ainsi la précipitation de la STF. Après une nuit de repos à 4°C, le précipité est récupéré par centrifugation, dissout dans de l'eau distillée, dialysé contre de l'eau permutée pendant quatre jours et lyophilisé.

C - PURIFICATION SUR DEAE-SEPHADEX

La STF obtenue par précipitation sélective est purifiée sur DEAE-Séphadex A-50. 8 g. du précipité 70 p.100 de saturation au sulfate d'ammonium sont dissous dans un petit volume de tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8,6 et déposés sur une colonne de DEAE-Séphadex A-50 (6,5 x 40 cm)

stabilisée dans le même tampon.

L'élution s'effectue par passage du tampon Tris-HCl 0,05 M en NaCl; 0,1 M en NaCl; 0,15 M en NaCl et enfin 0,2 M en NaCl. Chaque fraction est dialysée et lyophilisée.

D - PURIFICATION SUR SP-SEPHADEX

La fraction 0,1 M en NaCl recueillie après passage sur DEAE-Séphadex est purifiée par passage sur colonne de SP-Séphadex C-50, selon une modification de la méthode de MARTINEZ- MEDELLIN et SCHULMAN (186).

1 g. de la fraction NaCl est dissous dans un petit volume de tampon citrate de sodium 0,02 M, pH 5, et déposée sur une colonne de SP-Séphadex C-50 (3,8 x 17 cm), équilibrée dans le même tampon.

Après lavage par 400 ml du même tampon, on élue par un gradient linéaire de pH 5 à pH 6 (500 ml de tampon citrate de sodium 0,02 M pH 5 et 500 ml de tampon citrate de sodium 0,02 M pH 6). Le pic de la STF est dialysé, puis lyophilisé. Un deuxième passage sur colonne de SP-Séphadex C-50 est effectué suivant le même protocole, pour éliminer les dernières traces d'hémopexine.

E - CHROMATOGRAPHIE SUR ULTROGEL Aca 44

La STF peut subir une ultime purification par tamassage moléculaire sur Ultrogel Aca 44 qui a une zone de fractionnement pour les protéines globulaires entre 12.000 et 130.000 daltons. La colonne type " Pharmacia " (5 cm x 90 cm) est équilibrée dans un tampon Tris 0,1 M, NaCl 1 M, pH 8. L'élution s'effectue par le même tampon.

F - CONTROLE DE L'HOMOGENEITE DES PREPARATIONS DE SEROTRANSFERRINE
DE LAPIN

Chaque fraction est analysée par électrophorèse sur acétate de cellulose et par électrophorèse en plaque de gel de polyacrylamide. Les préparations les plus purifiées sont analysées par immunoelectrophorèse en gélose afin de vérifier l'homogénéité des préparations de STF et déceler la présence d'hémopexine.

1 . Electrophorèse sur acétate de cellulose

a) Electrophorèse

Les électrophorèses sont réalisées sur des bandes de 2,5 cm x 16 cm fournies par POLIPHOR, dans le tampon LAURELL (187), pH 8,6 et sous une tension de 120 V pendant 90 minutes.

b) Révélation

La révélation des protéides est réalisée soit à l'Amidoschwartz, soit à l'ortho-dianisidine, révélation spécifique des hémoprotéines utilisant les propriétés peroxydasiques de l'hème. Cette dernière révélation permet déceler la présence d'hémopexine dans les préparation de STF, toutes deux étant des β -1 globulines, migrent au même endroit en électrophorèse. La composition du réactif est la suivante:

- 100 mg. O-dianisidine (3,3'-diméthoxy-benzidine) dans 70 ml d'éthanol.
- 10 ml Tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4,7.
- 18 ml d'eau distillée
- 3 ml d'eau oxygénée à 130 V

L'hémopexine développe une coloration rouge, en présence de ce réactif.

2 . Immunoélectrophorèse sur gélose

Les immunoélectrophorèses sont réalisées selon la méthode de GRABAR et WILLIAMS (188), modifiée par SCHEIDEGGER (189). L'électrophorèse sur gélose, effectuée dans un tampon véronal de pH 8,2 et sous une tension de 30 V pendant 90 minutes, est suivie d'une diffusion de 48 heures contre un sérum de Chèvre anti-protéides sériques de Lapin.

3 . Electrophorèse en plaque de gel de polyacrylamide

Les électrophorèses en plaque de gel de polyacrylamide sont réalisées suivant le protocole de KERCKAERT (190).

II - ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN

A - MASSE MOLECULAIRE

La masse moléculaire de la STF de lapin a été déterminée par équilibre de sédimentation dans une ultracentrifugeuse Beckman modèle E, selon la méthode de YPHANTIS (191), modifiée par CHERVENKA (192).

B - FIXATION DU FER

La capacité de fixation du fer par la STF de lapin est déterminée selon le procédé de SURGENOR et coll. (193), modifié par SPIK (194).

1 . Saturation de la sérotransferrine de lapin

250 g. d'aposérotransferrine sont dissous dans 25 ml de tampon citrate de sodium 0,1 M, pH 8,6, et répartis par fractions de 3 ml dans des tubes à hémolyse. Des quantités croissantes de la solution ferrique d'AZARI et BAUGH (195), sont ajoutées aux différents tubes. Les tubes sont agités, et la mesure des absorbances est effectuée à 460 nm. après un repos d'une nuit à l'obscurité.

2 . Calculs

On trace la courbe de saturation en portant en abscisse les volumes de solution de sel ferrique ajoutés , et en ordonnée, les absorbances des solutions.

Le point d'intersection entre la courbe ascendante et le palier de saturation, donne le volume de solution ferrique nécessaire pour obtenir la saturation.

Connaissant le taux de fer de la solution d'AZARI et BAUGH (196), on peut déterminer la quantité de fer fixée à saturation par la STF (la concentration exacte en protéine étant déterminée par extrait sec).

C - DETERMINATION DE LA COMPOSITION MOLAIRE EN ACIDES AMINES

Les compositions en acides aminés sont déterminées à l'Auto-analyseur Beckman Multichrom, après hydrolyse acide de la STF. L'hydrolyse est effectuée en tubes scellés sous vide, par l'acide chlorhydrique 5,6 N bidistillé, pendant 24, 48 et 72 heures dans une étuve à 105°C.

Le dosage du tryptophane a été effectué selon le procédé de BENCZE et SCHMID (197).

Le dosage de la cystéine sur la STF native étant peu fiable, le nombre de demi-cystine a été déterminé à l'Auto-analyseur sous forme de S-carboxyméthylcystéine. La réduction de la STF est effectuée en milieu chlorhydrate de guanidine 6 M selon le procédé de CRESTFIELD *et al.* (198); l'alkylation est ensuite réalisée par l'iodoacetamide.

D - COMPOSITION EN GLUCIDES

1 . Composition centésimale

Les oses " neutres " ont été dosés par les méthodes colori-

métriques à l'orcinol-sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (199), modifiée par RIMINGTON (200), et à l'anthrone-sulfurique de DREYWOOD (201), modifiée par SHIELDS et BURNETT (202). Les "témoins internes" sont des solutions titrées de galactose et mannose (1 : 1).

Les osamines sont dosées par la méthode colorimétrique d'ELSON et MORGAN (203), modifiée par BELCHER et coll. (204), après avoir été libérées par une hydrolyse effectuée à 100°C avec de l'acide chlorhydrique 4 N, pendant 4 heures.

Les acides sialiques sont dosés par la méthode à la diphenylamine de NIAZI et STATE (205), modifiée par WERNER et ODIN (206).

Les protocoles expérimentaux sont ceux préconisés par MONTREUIL et SPIK (207).

2 . Composition molaire

Les rapports molaires sont déterminés par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse, selon le procédé décrit par ZANETTA *et al.* (208), modifié par FORNET (209).

III - PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN

A - HYDROLYSE PROTEINASIQUE

1 ; Hydrolyse pronasique

Nous avons appliqué, dans ses grandes lignes le procédé de YAMASHINA et MAKINO (210), modifié par MONSIGNY, ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (211).

A une solution de 5 g. d'apo-sérotransferrine, dans 500 ml d'acétate de calcium 0,01 M, on ajoute 100 mg de pronase (Calbiochem). L'hydrolyse est effectuée à pH 7,8 et à 37°C, sous agitation, pendant 48 heures. Le pH est maintenu constant par l'addition de soude 0,15 N, contrôlée par un titrateur automatique (pH-stat TTT IC Radiometer).

L'hydrolysate est ensuite ajusté à pH 4,5 avec l'acide acétique, puis concentré à 10 ml environ et traité par 10 volumes d'éthanol absolu froid. Le mélange est maintenu pendant 18 heures à 2°C. le précipité qui s'est formé est recueilli par centrifugation, dissous dans 250 ml d'acétate de calcium 0,01 M et soumis à une nouvelle hydrolyse pronasique dans les conditions décrites ci-dessus. Ce protocole expérimental est répété encore une fois; le troisième précipité éthanolique représente la " Fraction glycopeptidique totale " (FGT).

2 . Hydrolyse trypsique

Nous avons appliqué le procédé de HIRS *et al.* (212).

1,5 g. d'aposérotransferrine de lapin réduite, selon le procédé de CRESTFIELD *et al.* (213), et alkylée, sont remis en suspension dans 75 ml de tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M, pH 8,2. L'hydrolyse est effectuée à 37°C pendant 8 heures au pH-stat TTT IC Radiometer. Le mélange est maintenu à pH 8,2 par la soude 0,1 N. On ajoute 2 fois à 4 heures d'intervalle, 30 mg de trypsine (EC 3.4.4.4) (rapport enzyme-substrat : 1/50).

La réaction enzymatique est arrêtée par addition de quelques gouttes d'acide acétique glacial jusqu'à pH 5.

B - FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS

1 . Fractionnement des hydrolysats pronasiques

La " Fraction glycopeptidique totale " est dissoute dans 50 ml d'eau distillée et la solution obtenue est additionnée d'un volume égal d'une solution aqueuse d'acide trichloroacétique à 10 g. par 100 ml. Le mélange est maintenu pendant 18 heures à 2°C. Le précipité formé est éliminé par centrifugation, et la solution surnageante est purifiée par un passage successif sur des colonnes (2 cm x 35 cm) d'échangeurs de cations (Dowex 50 x 8; " mesh " 50-100; forme acide), puis d'anions (Duolite A-102-D ; " mesh " 50-100; forme formiate). Le liquide effluent est concentré dans un évaporateur rotatif, puis injecté sur une colonne (2cm x 100 cm) de gel de Séphadex G-25, afin d'éliminer les peptides qui n'ont pas été retenus par les échangeurs d'ions.

Le repérage des constituents glycopeptidiques dans l'effluent est effectué par la méthode au phénol-sulfurique de DUBOIS *et al.* (214).

2 . Fractionnement des hydrolysats tryptiques

L'hydrolysat tryptique est concentré dans un évaporateur rotatif, puis injecté sur une colonne (2,7 cm x 80 cm) de gel de Séphadex G-50. Le repérage des glycopeptides est réalisé par la méthode colorimétrique au phénol-sulfurique de DUBOIS *et al.* (215).

C - PURIFICATION DES GLYCOPEPTIDES

La fraction glycopeptidique, soit pronasique, soit tryptique, est soumise à l'électrophorèse préparative en toit, sur papier Whatman 3. Le dépôt est de l'ordre de 1 mg de glycopeptide par cm. Les systèmes tampons utilisés sont les suivants:

- pH 2,4 acide acétique 1 N, de la cathode vers l'anode.
- pH 2,4 acide acétique 1 N, de l'anode vers la cathode,
- pH 6,5 pyridine/eau/acide acétique (25;225;1),

Les électrophorèses sont réalisées pendant 18 heures sous une tension de 10 V/cm.

Après séchage du papier et repérage des glycopeptides par révélation des bandes latérales par le réactif à la ninhydrine-cadmium et par celui à l'acide periodique-benzidine, de MONTGOMERY et WU (216), spécifique des glucides, les bandes de papier renfermant des glycopeptides sont éluées par de l'eau distillée.

IV - ETUDE DES GLYCOPEPTIDES DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN

A - DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES CHAINES PEPTIDIQUES

1. Identification des acides aminés N-terminale et C-terminale

La nature des acides aminés en position N-terminale des glycopeptides est déterminée par dansylation. Celle-ci est effectuée suivant la technique de HARTLEY (217), et l'identification des acides aminés dansylés, selon le protocole de WOODS et WANG (218) et de HARTLEY (219). La nature de l'acide aminé en position C-terminale a été déterminée par dansylation après l'action de la Carboxypeptidase A (E.C.3.4.2.1).

2. Etude de la séquence peptidique des glycopeptides

Nous avons utilisé la dégradation récurrente d'Edman couplée à l'identification des PTH-amino-acides, suivant le protocole mis au point par HAN *et al.* (220). Nous avons recherché la présence du Tryptophane, après la méthode de TABONE *et al.* (221) et REDDI et KODICEK (222).

B - ACTION DE LA NEURAMINIDASE

L'hydrolyse est effectuée à pH 5,9 dans du tampon acétate de sodium 0,1 M pendant 4 heures à 37°C par la neuraminidase (EC 3.2.1.18) de *Clostridium perfringens* (0,25 U/15 mg de glycopeptide),

Lorsque la réaction est terminée, la solution est directement soumise à une électrophorèse préparative sur papier Whatman 3 MM, sous une tension de 7V/cm, pendant 16 heures, dans le tampon acide acétique 1N de pH 2,4 , de l'anode vers la cathode.

Après séchage de l'électrophorégramme et repérage des glycopeptides par révélation des bandes latérales par le réactif à la ninhydrine-cadmium, les bandes de papier renfermant des glycopeptides, sont éluées par de l'eau distillée.

Le taux d'acide sialique résiduel des glycopeptides est déterminé colorimétriquement par dosage à la diphénylamine suivant la méthode de NIAZI et STATE (223), modifiée par WERNER et ODIN (224), et par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse, selon le procédé décrit par ZANETTA *et al.* (225), modifié par FOURNET (226).

C - ETUDE DE LA STRUCTURE DES GROUPEMENTS GLYCANNIQUES

1 . Détermination de la composition centésimale et molaire en glucides

Les compositions centésimales et molaires en glucides des glycopeptides ont été effectués par les méthodes décrites à la p.40..

2 . Méthylation des glycopeptides

Les glycopeptides pronasiques ont été perméthylés par la méthode de HAKOMORI (227), modifiée par SANFORD et CONRAD (228).

a) Préparation de l'hydrure de sodium exempt d'huile et du méthyl-sulfinyle-carbanion

Dans un flacon à pénicilline de 100 ml est introduit 3 g. d'hydrure de sodium (mélangé à 55 % avec de l'huile minérale). L'hydrure de sodium est lavé par trois fois sous agitation avec 30 ml de pentane ou d'hexane. Après le troisième lavage, le flacon est scellé. Le solvant est éliminé à l'aide d'une aiguille hypodermique et l'hydrure de sodium est séché par un lent courant d'azote. 30 ml de diméthylsulfoxyde sont introduits dans le flacon. La solution est alors portée dans un bain ultrasonique. Lorsque la production d'hydrogène est arrêtée, le flacon est retiré du bain ultrasonique et placé sous azote. Le méthylsulfinyle carbanion est conservé à l'obscurité à 4°C. La solution ainsi préparée est à la concentration de $2,09 \times 10^{-3}$ moles de méthyl-sulfinyle carbanion par ml.

b) Perméthylation

Le glycopeptide lyophilisé dans un flacon à pénicilline est repris par 1 ml de diméthylsulfoxyde. Le flacon est scellé et placé sous courant d'azote; ensuite, il est placé dans un bain ultrasonique. 0,5 ml de méthyl-sulfinyle carbanion est additionné à l'aide d'une aiguille hypodermique; le flacon est placé dans le bain ultrasonique pendant 30 min. Une fois retiré du bain ultrasonique, il est laissé 4 heures à température ambiante, puis congelé. 1 ml d'iodure de méthyle

est ajouté sur le produit congelé et le flacon est placé 30 minutes au bain ultrasonique.

La solution contenant le glycopeptide perméthylé est versée dans 10 ml d'eau distillée. Le sucre méthylé est extrait par 3 fois 5 ml de chloroforme. Les phases organiques rassemblées sont lavées par 5 fois 5 ml d'eau distillée. La phase organique est séchée par du sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée à l'évaporateur rotatif.

Le produit ainsi méthylé est purifié sur une colonne (2 x 50 cm) de Séphadex LH 20 dans le système solvant chloroforme-éthanol (1:1). Le repérage du produit méthylé se fait par la méthode au phénol-sulfurique, de DUBOIS *et al.* (229). Les fractions sont rassemblées, évaporées à sec à l'évaporateur rotatif, reprises par du chloroforme dans un tube à méthanolyse. Après séchage sous courant d'azote, le tube est placé pendant 24 heures sous P_2O_5 .

c) Analyse des produits méthylés

Le glycanne perméthylé est méthanolysé (1 ml de méthanol-chlorhydrique 0,5 N pendant 24 heures à 80°C). Les dérivés méthylés sont identifiés, après peracétylation (pyridine/anhydride acétique: 1 : 1, 45 minutes à 105°C), par chromatographie en phase gazeuse sur colonne Carbowax 6000 à 3% sur Chromosorb W (AW)DMCS "mesh" 100-120, à température programmée de 130°C à 200°C à raison de 2°C/min., sous un débit de gaz vecteur (azote) de 20 ml/min. La température de l'injecteur et du détecteur, étant de 200°C.

3 . Analyse en Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton ^1H à 360 MHz sont effectués sur des solutions renfermant 5 à 10 mM de glycopeptides stabilisés plusieurs fois dans D_2O , à l'aide d'un spectromètre BRUCKER HX-360, en opérant à l'aide des transformations de FOURIER à 25°C et 60°C.

Les déplacements chimiques des protons sont donnés par rapport au 2,2-diméthyl-2-silipentane-5-sulphonate de sodium (indirectement par rapport à l'acétone dans D_2O : $\delta = 2.225$ ppm.).

L'interprétation des spectres a été rendue possible grâce à l'étalonnage préalable des déplacements chimiques des protons à l'aide de glycopeptides et d'oligosaccharides de structure connue, En particulier, les déplacements chimiques des protons obtenus avec les glycopeptides de la sérotransferrine de lapin avec et sans acides sialiques ont été comparés avec les valeurs obtenues lors de l'étude des glycopeptides de la sérotransferrine humaine (DORLAND *et al.* (230)), de différents sialyloligosaccharides (DORLAND *et al.* (231)), et qui ont été résumés dans la revue générale de MONTREUIL et Vliegenthart (232).

V - INCORPORATION DE LA SEROTRANSFERRINE SUR LES RETICULOCYTES EN PRESENCE DES GLYCOPEPTIDES

A - PREPARATION DU SANG ENRICHI EN RETICULOCYTES

La réticulocytose est induite chez les lapins " Fauves de Bourgogne " par 4 saignées répétées, tous les deux jours, de 40 ml de sang à la veine interne de l'oreille.

Le dernier prélèvement est effectué juste avant l'expériences d'incubation, sur héparine (5.000 U/ml) à raison de 10 Unités par ml de sang.

Le plasma est éliminé par centrifugation à 4°C dans une centrifugeuse Beckman, modèle J 21, à 800 g pendant 7 minutes; puis, le culot de cellules est lavé 3 fois par le tampon de HANKS et WALLACE(233). Le taux de réticulocytes est déterminé après coloration des cellules par le bleu de Unna.

B - PREPARATION DES TRANSFERRINES MARQUEES

1. Marquage à l'iode 125 (¹²⁵I)

La STF est marquée à l'iode 125 (Na ¹²⁵I sans entraîneur), selon une méthode dérivée de HUNTER et GREENWOOD (234), de manière à fixer au maximum 1 atome d'iode par molécule de STF.

a) Matériel

- Bicarbonate de sodium 0,02 M sans entraîneur.
- Na ¹²⁵I (213 mCi/ml); 10 µl q.s.p. 1 ml par NaHCO₃ 0,02 M.
- NaI froid : 7 mM dans NaHCO₃ 0,02 M.
- Chloramine T : 1 mg/ml dans NaHCO₃ 0,02 M.
- Métabisulfite de sodium : 1 mg/ml dans NaHCO₃ 0,02 M.
- KI : 10 mg/ml dans NaHCO₃ 0,02 M.

b) Méthode

Dans un bain de glace, on ajoute à 1 mg d'aposérot transferrine dans 0,5 ml de NaHCO₃ 0,02 M, 50 µl de la solution de Na ¹²⁵I, 20 µl de NaI froid et 100 µl de chloramine T comme agent oxydant. On laisse en contact pendant 2 minutes en agitant, et on ajoute alors 100 µl de la

solution de métabisulfite de Na pour réduire l'iode en iodure;
puis, on dilue l'iodure en excès par 800 µl de KI comme entraîneur.

Le mélange est ensuite déposé sur colonne de Séphadex G-25
(PD-10 ; " Pharmacia " ; 1,5 cm x 9,5 cm), équilibrée dans un tampon
citrate de sodium 0,1 M, bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 8,6 et éluée
par ce même tampon.

La STF ainsi marquée à l' ^{125}I est prête pour la saturation
en fer froid, selon le procédé décrit à la page 38 , ou en ^{59}Fe .

2 . Marquage au ^{59}Fe

L'aposérotansferrine est marquée au ^{59}Fe en utilisant une
légère modification de la méthode décrite à la page 38 .

a) Matériel

- $^{59}\text{FeCl}_3$ (14,6 mCi/mg) en solution dans HCl 0,4 N (0,38 mCi/ml).

- Citrate de sodium 0,1 M, bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 8,6.

- Citrate de sodium 0,1 M, bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 10.

- $^{57}\text{FeCl}_3$ dans le tampon citrate pH 8,6 précédent, à raison
de 52 µg de fer par 100 µl.

b) Méthode

On prépare la solution de sel ferrique radioactive en mélan-
geant 20 µl de solution de $^{59}\text{FeCl}_3$, 20 µl du tampon citrate pH 10, et
55 µl du tampon citrate pH 8,6, contenant le fer froid, de manière à
obtenir un pH neutre. Cette solution contient 3,23 µg de fer par 10 µl.

A 1 mg d'aposérotansferrine, marquée au ^{125}I ou non, en
solution dans le tampon citrate pH 8,6, on rajoute 5 µl de la solution

ferrique radioactive décrite ci-dessus, correspondant à 10 p.100 de fer en excès par rapport à la quantité stoechiométrique nécessaire pour fixer deux atomes de fer par molécule. Après deux heures de contact à l'obscurité, le mélange est déposé sur une colonne de Séphadex G-25 (PD-10 " Pharmacia ", 1,5 cm x 9,5 cm), équilibrée dans le tampon de HANKS et WALLACE (235) et éluée par le même tampon.

Les STF ainsi marquées sont prêtes à l'emploi pour les incorporations sur les réticulocytes. Leur concentration est déterminée spectrophotométriquement en prenant comme coefficient d'absorption $E_{1\text{ cm}}^{1\text{ p.100}} = 11$ pour l'aposérot transferrine de lapin et 13,8 pour la saturée en fer. (Ces coefficients ont été déterminés en prenant l'absorbance de solutions de concentrations croissantes en STF, concentrations mesurées par la méthode de LOWRY (236)).

C - PREPARATIONS DES GLYCOPEPTIDES

Les glycopeptides pronasiques et tryptiques de la STF de lapin, avec ou sans acides sialiques, sont préparés selon les protocoles décrits à la page 42.

Des solutions mères de 10 à 30 mM dans le tampon de HANKS et WALLACE (237), sont préparées, et ajustées à pH 7,4 par la soude 0,2 M pour les glycopeptides contenant de l'acide sialique. Puis, on effectue une série de dilutions au demi afin d'obtenir une gamme de concentrations.

D - PROCEDES D'INCUBATION

1. Matériel

- Culot de cellules enrichi en réticulocytes.

- Gamme de concentrations en glycopeptides.
- Tampon de HANKS et WALLACE (238), dont la composition est la suivante : NaCl, 8 g/l ; KCl, 0,4 g/l ; CaCl₂ 0,14 g/l ; MgSO₄(7 H₂O), 0,2 g/l ; Na₂HPO₄(12 H₂O), 0,12 g/l ; KH₂PO₄, 0,06 g/l ; NaHCO₃, 0,35 g/l et glucose à 1 g/l.
- Solutions de STF marquées selon le protocole décrit précédemment.
- Tampon phosphate isotonique 310 miliosmolaire (mOsm) de pH 7,4. Soit NaH₂PO₄(2H₂O), 20,962 mM (3,27 g/l) et Na₂HPO₄(12H₂O) , 89,364 mM (32,006 g/l).

2 . Méthode

On répartit 0,2 ml de culot de cellules dans une série de tubes à hémolyse en polystyrène. Dans chaque tube on ajoute 0,2 ml de tampon de Hanks et Wallace. Les tubes sont mis à incuber dans un bain marie couvert et thermostaté à 37°C, ainsi que les solutions de glycopeptides et les transferrines marquées, 20 minutes avant de procéder à la préincubation.

On préincube 10 minutes les tubes contenant les réticulocytes avec 100 µl de solution de concentration croissante en glycopeptides, puis on ajoute dans chaque tube la même quantité de STF de lapin (de 80 à 150 µg) marquée, soit à 1' ¹²⁵I et saturée en ⁵⁷Fe (non radioactif), soit uniquement au ⁵⁹Fe, soit doublement marquée au ¹²⁵I et au ⁵⁹Fe, et on laisse en contact 10 minutes en agitant doucement les tubes à l'obscurité, où pendant des temps variables lorsqu'on fait une étude cynétique d'incorporation.

La milliosmolarité se calcule en totalisant la concentration de toutes les espèces ionisables en solution, sans tenir compte de la déviation du comportement idéal des sels.

Dans chaque série, on introduit 3 témoins internes dans lesquels, les solutions de glycopeptides sont remplacées par 100 µl de tampon de Hanks et Wallace.

Pour les expériences d'incorporation du fer sans essais d'inhibition par les glycopeptides, le protocole est identique, excepté la préincubation avec les solutions de glycopeptides.

L'incubation est ensuite arrêtée en plongeant les tubes dans la glace et en diluant immédiatement par 4 ml de tampon phosphate isotonique à 0°C. Puis, les tubes sont bouchés et centrifugés à 1.000 g pendant 4 minutes. Le surnageant est éliminé par aspiration, et le culot de cellules est lavé 2 fois dans les mêmes conditions par 4,5 ml du même tampon froid.

Le dernier surnageant est éliminé par aspiration, et les tubes bouchés sont analysés dans un compteur des radiations gamma INTERTECHNIQUE (cristal 3 pouces, 3 canaux).

Le 100 p.100 de radioactivité totale est déterminé en comptant 3 tubes témoins contenant la même quantité de STF marquée qu'on a mis par tube. Le bruit de fond est déterminé par comptage de tubes contenant toutes les solutions exceptée la STF marquée.

RESULTATS

I - ISOLEMENT DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN

Le sang de lapin recueilli en grande quantité (environ 30 litres) est partiellement hémolysé, malgré le traitement par l'héparine. Pour un litre de sang nous obtenons environ 50 g de plasma lyophilisé.

A - PRECIPITATION AU RIVANOL PUIS AU SULFATE D'AMMONIUM

500 g de plasma lyophilisé fournissent après la précipitation rivanolique 76 g de précipité.

Un premier traitement de ce précipité au sulfate d'ammonium (à 55 p.100 de saturation) fournit une fraction surnageante de 36 g ; et une deuxième précipitation (à 70 p.100 de saturation) fournit 14,25 g de précipité sulfate d'ammonium. Lors de ces précipitations succesives au sulfate d'ammonium, nous obtenons une préparation enrichie en STF mais contenant encore des traces d'immunoglobulines IgG, d'hémoglobine, d'hémopexine, et d'autres β -globulines (Fig.8 p.55).

B - CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-SEPHADEX

La chromatographie sur colonne de DEAE-Séphadex du précipité 70 p.100 de saturation au sulfate d'ammonium, suivant le protocole décrit p.35 , nous fournit 4 fractions (Fig.9 ,p.56), dénommées A, B, C et D, représentant respectivement 8,7 p.100, 74,7 p.100, 8,8 p.100 et 5,6 p.100. La composition de ces fractions a été analysée en électrophorèse sur bande d'acétate de cellulose (Fig.10 p.57) et en électrophorèse en plaque de gel de polyacrylamide (Fig.8 p.55).

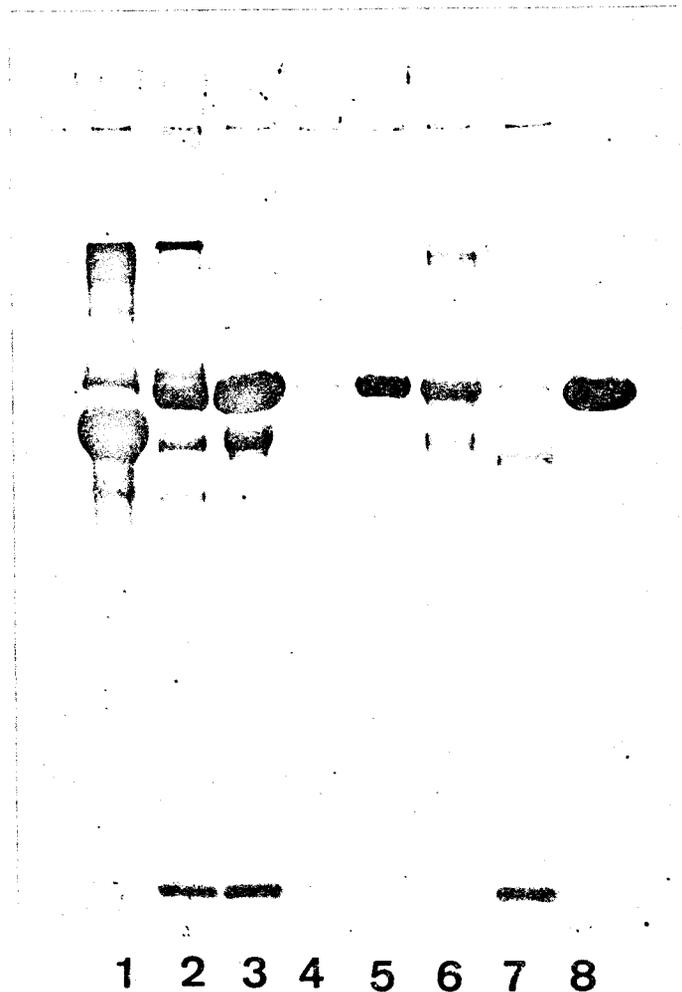


Figure 8 : Electrophorèse sur plaque de gel de polyacrylamide des différentes fractions de préparation de la STF de lapin; pH 8,6 ; en présence de SDS et de mercaptoéthanol.

- 1 : Sérum de lapin
- 2 : Précipité rivanolique
- 3 : Précipité à 70 p.100 de saturation en sulfate d'ammonium
- 4 : Fraction A du fractionnement sur DEAE-Séphadex
- 5 : Fraction B du fractionnement sur DEAE-Séphadex
- 6 : Fraction C du fractionnement sur DEAE-Séphadex
- 7 : Pic D du fractionnement sur DEAE-Séphadex
- 8 : STF après double passage sur SP-Séphadex.



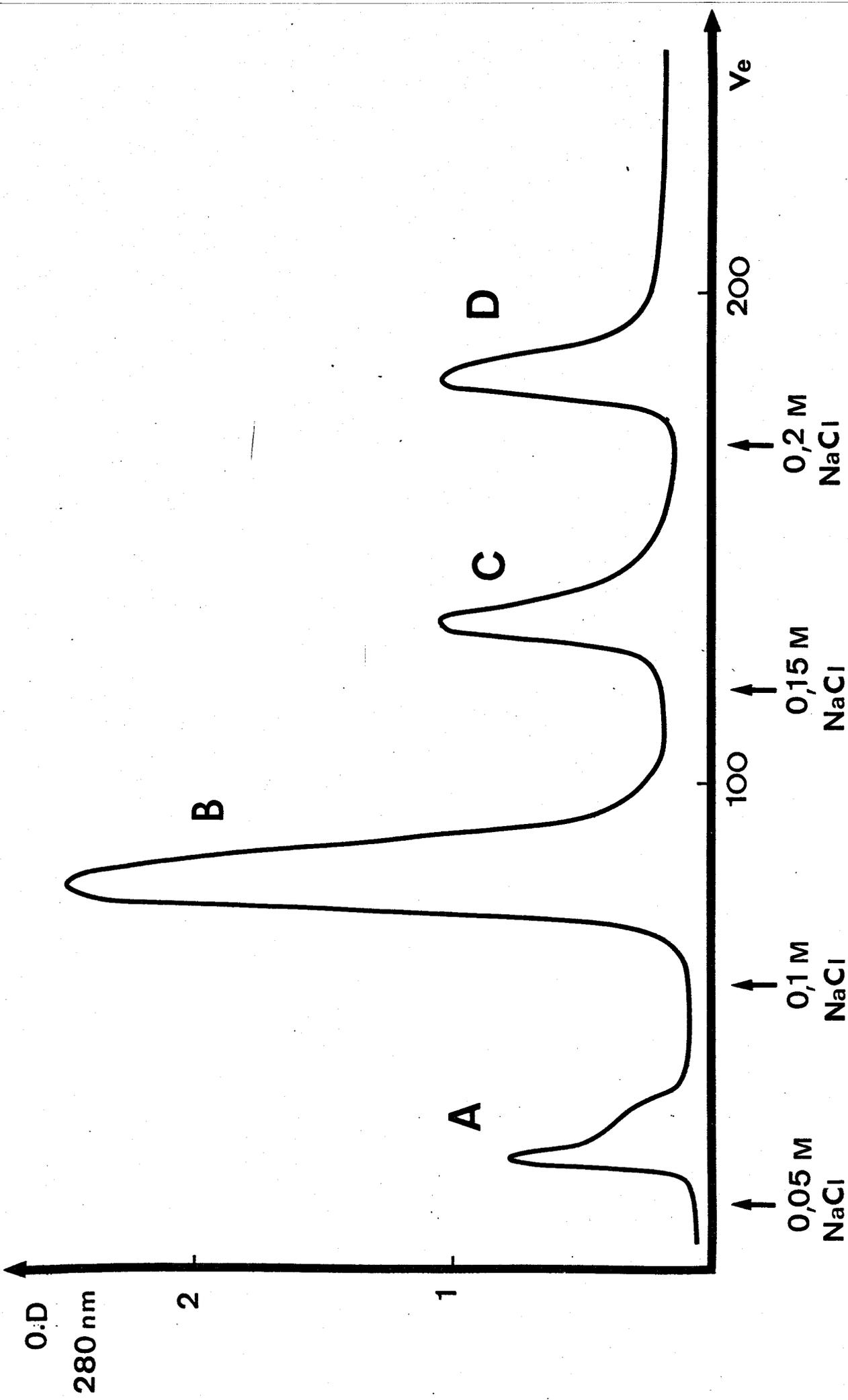
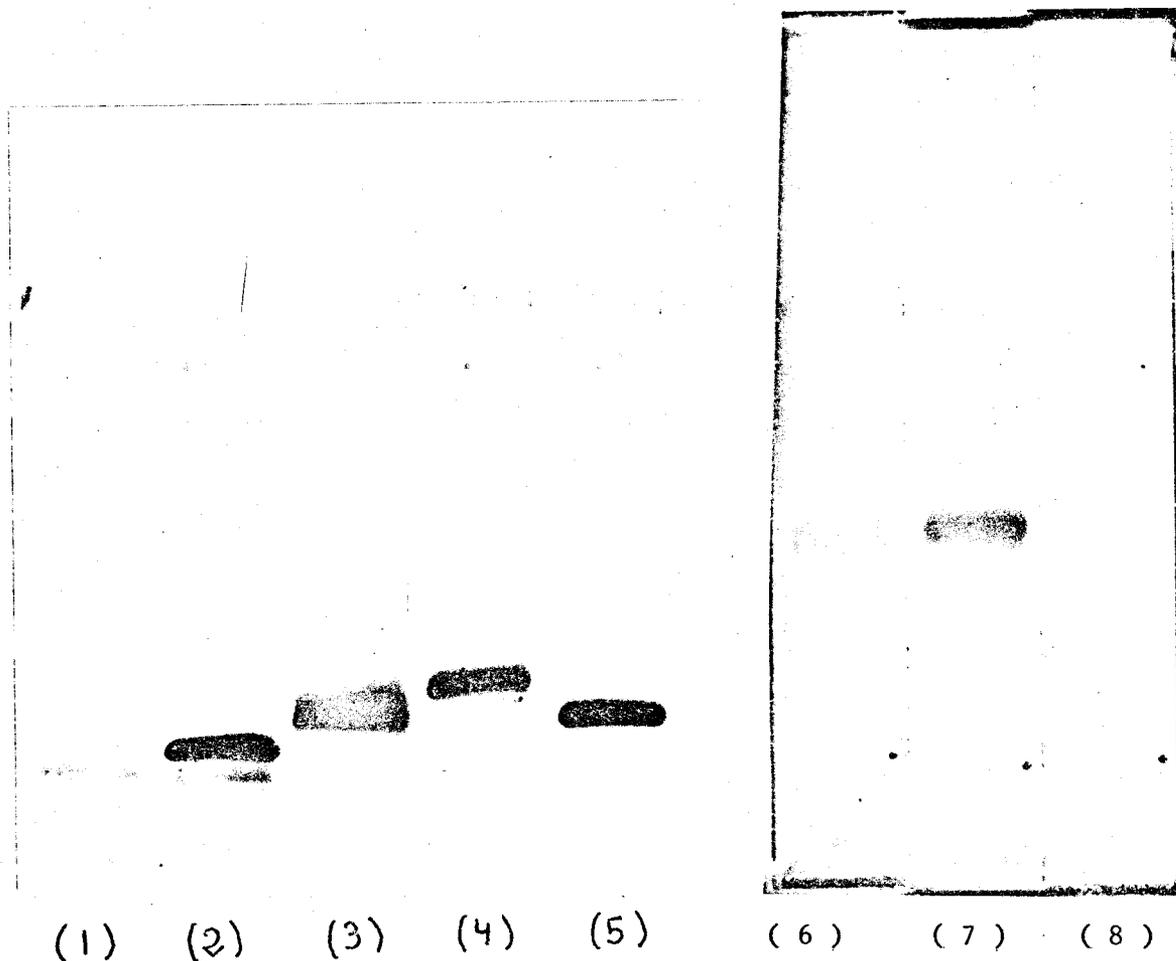


Figure 9 : Chromatographie sur colonne de DEAE-Séphadex (2,5 cm x 35 cm) de 1 g de précipité 70 p.100 de saturation en sulfate d'ammonium (25 ml/h ; 8 ml/fraction).





Révélation Amidoschwartz

Révélation O-dianisidine

Figure 10 : Electrophorèse en acétate de cellulose de :

- (1) : Fraction A après DEAE-Séphadex
- (2) : Fraction B après DEAE-Séphadex
- (3) : Fraction C après DEAE-Séphadex
- (4) : Fraction D après DEAE-Séphadex
- (5) : STF après double passage sur SP-Séphadex
- (6) : Précipité 70 p.100 de saturation en sulfate d'ammonium
- (7) : Fraction B après DEAE-Séphadex
- (8) : STF après double passage sur SP-Séphadex.

L'examen de l'électrophorégramme en plaque de gel de polyacrylamide montre que la fraction B contient la majeure partie de la STF, soit 10,7 g en partant de 14,25 g de précipité 70 p.100 de saturation en sulfate d'ammonium. On retrouve néanmoins des quantités plus faibles de STF dans les autres fractions. Nous sommes donc en présence d'une microhétérogénéité qui provient, soit de l'existence de variants, soit d'une perte partielle d'acide sialique.

Nous constatons cependant que la fraction B renferme une quantité non négligeable de protéine contaminante d'une masse moléculaire voisine de la sérumalbumine, bien qu'on ne détecte pas de sérumalbumine dans l'électrophorèse en acétate de cellulose (Fig. 10 p. 57). Cette fraction B est totalement dépourvue d'hémoglobine, celle-ci étant éluée avec la fraction D, et se retrouve au front de l'électrophorégramme en gel de polyacrylamide (Fig. 8 p. 55) ; l'électrophorèse étant réalisée en présence de SDS et de mercaptoéthanol.

De plus, la révélation spécifique à l'ortho-dianisidine, de l'électrophorégramme réalisé sur acétate de cellulose (Fig. p.) montre l'existence d'un composé de nature hémique, l'hémopexine, migrant au niveau des β_1 -globulines, dans la fraction B, comme dans le précipité 70 p.100 de saturation en sulfate d'ammonium. En effet, HATTON *et al.* (239), ont déjà décrit l'impossibilité d'isoler la STF bovine pure par chromatographie sur DEAE-cellulose, à partir d'un sérum partiellement hémolysé ; impossibilité due à la présence de l'hémopexine saturée en hème, qui est éluée au même temps que la STF.

C - CHROMATOGRAPHIE SUR SP-SEPHADEX

La fraction B éluée de la colonne de DEAE-Séphadex est chromatographiée sur colonne de SP-Séphadex selon le protocole décrit p. 36 . Le schéma de fractionnement est donné dans la Fig. 11 p. 60 .

La fraction correspondante au sommet du pic, éluée entre pH 5,52 et pH 5,58, avec un rendement de 60 p.100 (soit 6,4 g) est rechromatographiée sur colonne de SP-Séphadex, dans les mêmes conditions. Cette dernière purification nous fournit un pic symétrique (Fig.11 p. 60) avec un rendement de 90 p.100, qui correspond à 5,78 g de STF pour 500 g de plasma lyophilisé, soit un rendement final de 1,15 p.100. Nous constatons d'autre part que le passage sur colonne de SP-Séphadex dans les conditions particulières que nous utilisons, nous fournit une STF désaturée en fer (contenant moins de 72 ng de fer par mg de protéine), qui sera utilisée dans des expériences ultérieures, comme apo STF.

La STF ainsi préparée est analysée en électrophorèse sur bande d'acétate de cellulose, révélée à l'Amidoschwartz (Fig. 10 p. 57), au réactif à l'orto-dianisidine (Fig.10 p.57), en électrophorèse sur plaque de gel de polyacrylamide (Fig. 8 p.55) et en immunoélectrophorèse (Fig.12 p.61). Dans les différents cas analysés nous pouvons constater l'absence de protéines contaminantes dans la préparation de STF.

D - CONCLUSIONS

L'examen des critères de pureté montre l'absence

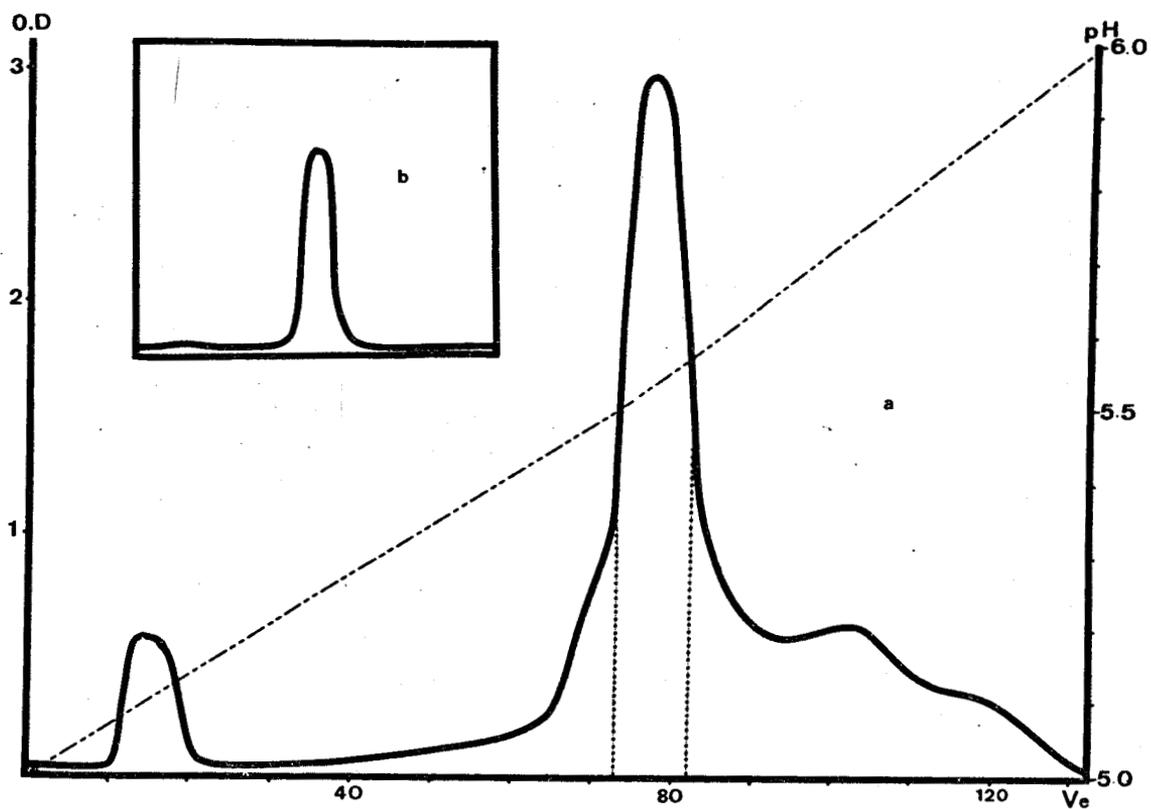


Figure 11 : Chromatographie sur colonne de SP-Séphadex de la fraction B éluée de la colonne de DEAE-Séphadex, selon le protocole p. 36.

- (a) premier passage
- (b) deuxième passage



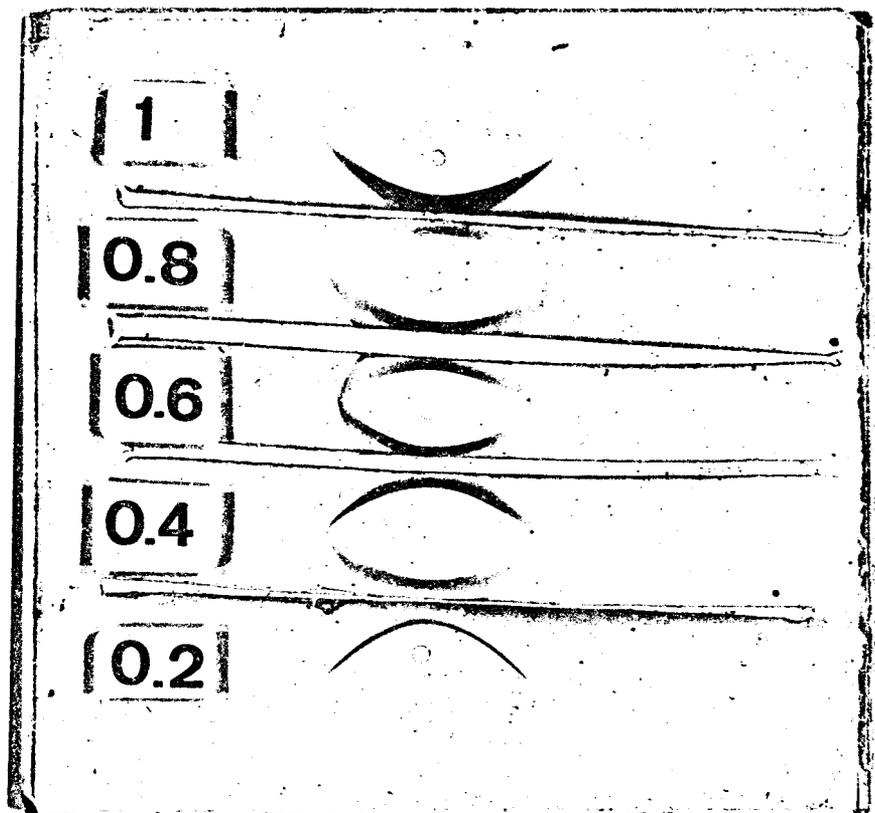


Figure 12 : Immunoélectrophorèse sur gélose de la STF de lapin après double passage sur colonne de SP-Séphadex. Le dépôt a été effectué à des concentrations décroissantes : 1 p.100, 0,8 p.100 , 0,6 p.100, 0,4 p.100 et 0,2 p.100.



d'hémoprotéines et d'autres contaminants, et nous pouvons considérer que notre préparation de STF est pure, dans la limite de sensibilité des méthodes utilisées.

Nous avons vérifié en particulier, l'absence d'hémopexine, condition indispensable pour nos études sur la fraction glycanique de la STF de lapin, par révélation spécifique à l'ortho-dianisidine. En effet, comme nous l'avons déjà écrit (voir p. 6), le pourcentage élevé en glucides de cette protéine et la grande difficulté méthodologique pour l'éliminer, fait de l'hémopexine le contaminant le plus important des préparations de STF.

Nous avons éliminé la contamination en hémopexine, même dans des préparations provenant de sang partiellement hémolysé, par un double passage sur colonne de SP-Séphadex, dans les conditions décrites à la page 36.

C'est cette préparation qui est utilisée pour les études physico-chimiques et biologiques ultérieures.

II - ETUDE DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN

La préparation de STF de lapin pure, obtenue comme nous l'avons décrit précédemment, est utilisée pour les études physico-chimiques concernant la masse moléculaire, la fixation du fer, la composition en acides aminés, la structure du peptide N-terminal et la composition en glucides.

A - PROPRIETES PHYSIQUES

1 . Masse moléculaire

La masse moléculaire de notre préparation de STF de lapin a été déterminée selon le procédé décrit p.38. Elle est égale à 75.000 ± 2.000 . Cette valeur est en accord avec celles déjà citées dans la littérature pour la STF de lapin (Tableau I p. 7).

2 . Fixation du fer

A une solution à 1 p.100 d'aposérottransferrine de lapin préparée selon le protocole décrit p.36 , nous avons ajouté des quantités croissantes de la solution de sel ferrique d'AZARI et BAUGH (240). La saturation en fer est suivie par la mesure de l'absorbance à 460 nm. (Fig.13 p.64).

Les valeurs obtenues d'après la courbe, en suivant la méthode décrite p.39 , nous montrent que l'absorbance $A_{460 \text{ nm.}}^{1\text{p.100}}$ est égale à 0,58 pour 1,90 atomes de fer par molécule, soit 1,44 μg de fer par mg de protéine. Ces valeurs sont en accord avec celles de HUDSON *et al.* (241), PALMOUR et SUTTON (242) et BAKER *et al.* (243), qui donnent respectivement : 1,92 ; 1,95 et 1,91 atomes de fer par molécule. Nous pouvons donc conclure que la STF de lapin fixe, comme les autres sérotransferrines, deux atomes de fer.

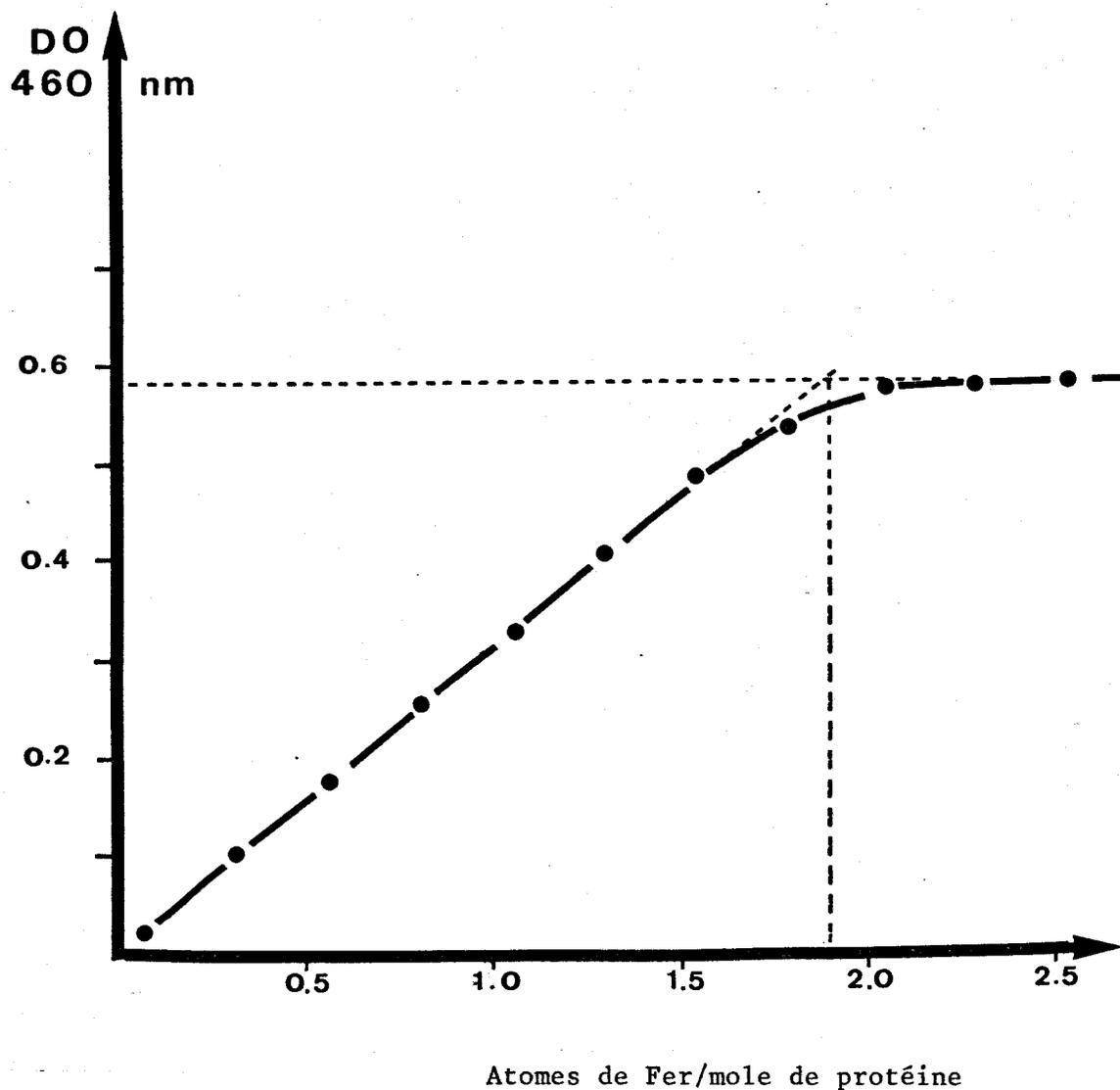


Figure 13 : Saturation en fer d'une solution à 10 mg/ml d'aposéro-transferrine de Lapin.



B - PROPRIETES CHIMIQUES

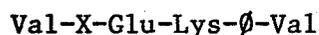
1 . Composition en acides aminés

La composition en acides aminés , par molécule de STF de lapin, est donnée dans le Tableau IV , p.66 Ce sont des valeurs moyennes déterminées d'après la composition de 3 échantillons différents de STF après des temps d'hydrolyse de 24, 48 et 72 heures.

Notre résultat est en accord avec ceux déjà cités par différents auteurs (Tableau II , p. 9) pour la STF de lapin.

2 . Séquence N-terminale de la sérotransferrine de lapin

Nous avons déterminé la séquence peptidique N-terminale de la STF de lapin afin de la comparer à celles des autres STF (Fig. 1 , p. 10). Cette séquence est exposée ci-dessous :



Nous pouvons constater qu'il existe de grandes homologies entre les séquences N-terminales des STF de différents espèces de mammifères.

Le 2^{ième} acide aminé n'a pu être identifié, ni par chromatographie surcouche mince, ni après régénération des PTH-acides aminés . Il ne semble pas être la proline comme dans les STF des autres espèces animales. Par analogie avec les autres STF, il existerait une délétion (\emptyset) au niveau du résidu d'acide aminé hydroxylé en position 5.

TABLEAU IV

Composition molaire en acides aminés de la sérotransferrine de lapin, (a).

Asp	72
Thr	26
Ser	43
Glu	66
Pro	36
Gly	47
Ala	53
1/2 Cys (b)	34
Val	45
Met	7
Ileu	16
Leu	59
Tyr	26
Phe	25
Lys	54
His	18
Arg	26
Trp (c)	10
TOTAL	663

(a) Chaque détermination est déduite de l'analyse des résultats obtenus après 24, 48 et 72 heures d'hydrolyse.

(b) Déterminé sous forme de S-carboxyméthyl-cystéine.

(c) Déterminé selon le procédé de BENCZE et SCHMID (244).



3 . Composition en glucides

Les compositions centésimales et molaires en glucides obtenues pour la fraction B après passage sur colonne de DEAE-Séphadex, et pour la STF obtenue après 2^{ième} passage sur colonne de SP-Séphadex, sont rassemblés dans le Tableau V, p.68 .

Nous pouvons constater que le pourcentage des sucres diminue brusquement avec le degré de purification de la STF.

Si les valeurs obtenues pour la fraction B se rapprochent de celles obtenues par HUDSON *et al.* (Tableau III, p. 14) et semblent indiquer la présence de deux groupements glycaniques, les valeurs de la préparation purifiée après double passage sur colonne de SP-Séphadex sont plus en accord avec la présence d'un seul glycanne.

En effet, la présence d'hémopexine dans notre fraction B, vérifiée par révélation spécifique à l'orto-dianisidine (Fig. 10, p.57), peut représenter une source d'erreur très importante dans l'étude de la composition en glucides de la STF. Etant donné l'identité des monosaccharides entrant dans la composition de l'hémopexine et de la STF, nous ne pouvons pas différencier les glucides provenant de la STF de ceux provenant de l'hémopexine. De plus, la teneur très élevée en sucres (20 p.100) de l'hémopexine provoque une forte contamination en glucides, même si le taux de contamination en hémopexine n'est pas très élevé.

C - CONCLUSIONS

Les études physico-chimiques effectuées sur notre préparation de

TABLEAU V

Composition en glucides de la sérotransferrine de lapin.

	Fraction B après DEAE-Séphadex	STF après 2 ^{ième} passage sur SP-Séphadex
<u>Composition centésimale</u>		
Oses neutres	2,02	1,2
N-acétyl-glucosamine	1,67	1,2
Acide N-acétyl-neuraminique	1,57	0,8
<u>Composition molaire</u>		
Galactose	3,7	2,11
Mannose	4,7	2,88
N-acétyl-glucosamine	5,5	4,03
Acide N-acétyl-neuraminique	3,8	1,92



STF de lapin confirment ceux des auteurs ayant déjà travaillé sur cette protéine, en ce qui concerne la masse moléculaire (75.000 daltons), la fixation de deux atomes de fer et la composition en acides aminés.

Nous constatons que ces propriétés sont communes à toutes les STF de différentes espèces de vertébrés étudiées jusqu'à présent.

La séquence N-terminale de la STF de lapin, que nous avons déterminée est très proche de celle des autres STF de différents mammifères.

La composition molaire en glucides de la STF de lapin que nous avons déterminée, soit 2 Gal, 3 Man, 4 GlcNAc et 2 NANA, nous permet de mettre en hypothèse l'existence d'un seul glycanne dans la STF de lapin de structure semblable à ceux de la STF humaine.

En effet, si nous arrivons à démontrer que la structure de la fraction glycanne de la STF de lapin est du même type que celle des glycannes de la STF humaine, nous prouverons de plus la présence d'un seul groupement glycanne dans la STF de lapin, et d'infirmier ainsi les résultats de HUDSON *et al.* (245).

III - ETUDE DES GLYCOPEPTIDES ISOLES DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN.

Nous avons effectué des hydrolyses pronasiques sur la STF de lapin afin d'obtenir des glycopeptides avec une chaîne peptidique très courte. Ces glycopeptides ont été étudiés en profondeur pour

déterminer ainsi la structure de la partie glycanique de la STF de lapin.

De plus, nous avons fait une hydrolyse trypsique pour connaître la structure de la chaîne peptidique au voisinage du point d'attache.

A - GLYCOPEPTIDES PRONASIQUES

1 . Hydrolyse pronasique

A chaque étape de l'hydrolyse pronasique, dont le protocole a été décrit p.40 , des contrôles ont été effectués en dosant les oses " neutres ", pour détecter d'éventuelles pertes de glycannes. Après la première hydrolyse pronasique 82 p.100 des sucres initiaux sont récupérés ; 80 p.100, après la deuxième; et après précipitation à l'ATCA on ne retrouve plus que 76 p.100 de sucres. Enfin, après passage sur les résines échangeuses d'ions, il ne reste plus que 62,5 p.100 de sucres.

2 . Fractionnement de l'hydrolysate pronasique

La fraction glycopeptidique totale récupérée après chromatographie sur colonne de Séphadex G-25, est soumise à une électrophorèse préparative, en toit, sur papier dans l'acide acétique 1 N à pH 2,4. La migration est réalisée de la cathode vers l'anode, ce qui permet d'éliminer les peptides qui souillent encore la fraction glycopeptidique. Une électrophorèse dans le même tampon mais en sens contraire a été effectuée afin de vérifier l'absence d'autres glycopeptides moins acides.

Dans nos conditions d'électrophorèse 2 taches majeures apparaissent ; la séparation entre ces taches est importante, comme le montre la Fig.¹⁴ p. 72.

A partir de 5 g de STF de lapin hydrolysée, nous obtenons 90 mg de fraction glycopeptidique totale. L'électrophorèse préparative nous fournit 11 mg du glycopeptide GP-I et 43,5 mg du GP-II, soit un total de 54,5 mg. (soit un rendement de 60 p.100 pour l'électrophorèse).

L'hydrolyse pronasique de la STF de lapin nous fournit donc deux glycopeptides ; le glycopeptide pronasique I (GP-I) moins acide , et le glycopeptide pronasique II (GP-II) plus acide, dans un rapport de 1 : 4 en poids.

3 . Etude de la fraction peptidique des glycopeptides GP-I et GP-II.

a) Composition en acides aminés

Les compositions molaires en acides aminés des glycopeptides pronasiques GP-I et GP-II sont rassemblées dans le Tableau VI p.73 .

Nous constatons que cette composition est identique pour les deux glycopeptides pronasiques, soit deux acides aminés, l'acide aspartique et la sérine, dans le rapport 1 : 1,

b) Acide aminé N-terminal

Nous avons déterminé la nature de l'acide aminé en position N-terminale par dansylation. L'acide aspartique a été identifié dans

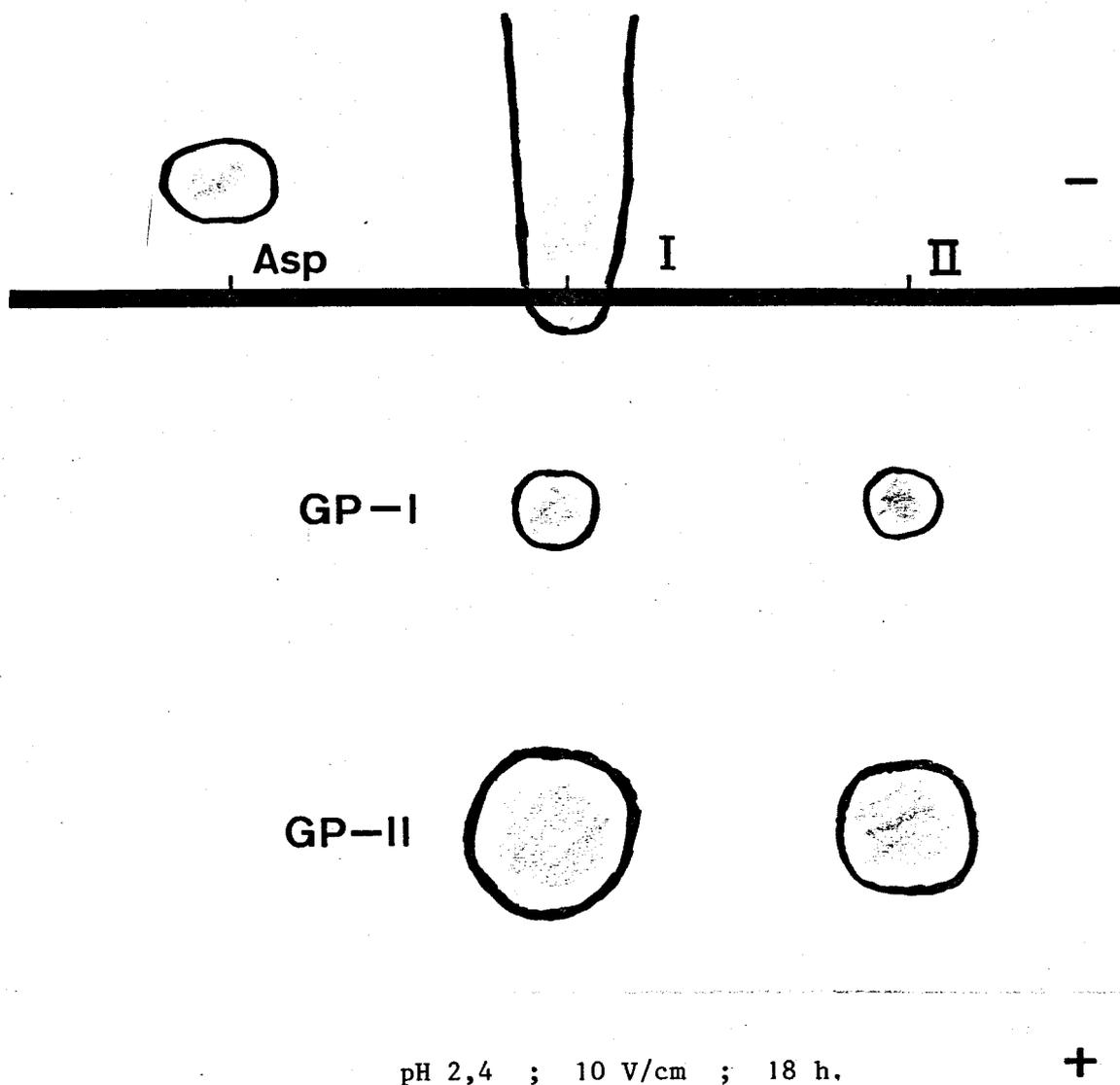


Figure 14 : Electrophorèse en toit à pH 2,4 de la fraction glycopeptidique pronasique filtrée sur SG-25.

I : Révélation à la ninhydrine-cadmium

II : Révélation à l'ac. périodique-benzidine



TABLEAU VI

Composition en glucides et en acides aminés des glycopeptides pronasiques GP-I et GP-II.

	GP-I	GP-II
<u>Rendements</u>	20 p.100	80 p.100
<u>Composition centésimale en glucides</u>		
Hexoses	38,4	32,2
N-acétyl glucosamine	40,2	35,7
Acide N-acétyl neuraminique	15,9	26,5
<u>Composition molaire en glucides (a).</u>		
Galactose	2	1,8
Mannose	3	3
N-acétyl glucosamine	4,2	4,2
Acide N-acétyl neuraminique	1,1	2,2
<u>Composition molaire en acides aminés (b)</u>		
Asp	1	1
Ser	0,96	1,11
N-acétyl glucosamine	3,3	3,3

(a) Les calculs ont été effectués en prenant comme base de référence 3 résidus de mannose.

(b) Les calculs ont été effectués en prenant comme base de référence 1 résidu d'acide aspartique.



les glycopeptides GP-I et GP-II. Le fait d'identifier un seul acide aminé par glycopeptide nous conduit à penser que nos glycopeptides sont dans un état de pureté satisfaisant.

c) Conclusions

Nous pouvons donc conclure que la structure de la chaîne peptidique des deux glycopeptides pronasiques isolés de la STF de lapin est identique, soit : Asn (CHO)-Ser.

4 . Etude de la fraction glucidique des glycopeptides GP-I et GP-II.

a) Composition en glucides

Les compositions centésimales et molaires en glucides des glycopeptides GP-I et GP-II sont rassemblées dans le Tableau VI p.73 .

Les rapports molaires en glucides du glycopeptide GP-I sont dans des rapports simples, et montrent la présence d'un seul résidu d'acide sialique pour deux résidus de galactose, trois de mannose et quatre de glucosamine.

La composition en glucides du glycopeptide majeur, GP-II, ne diffère de celle du GP-I que par la présence d'un résidu supplémentaire d'acide sialique.

Le faible nombre de résidus de glucosamine (3,3) obtenus à l'autoanalyseur d'acides aminés est explicable par le taux de récupération de celle-ci ; soit 84 p.100, ce qui fait après correction un nombre de résidus très proche de 4 (3,93).

D'après les résultats obtenus au Laboratoire, la méthanolyse ne libère pas la glucosamine au point d'attache dans la liaison GlcNAc-Asn. Les résultats ont été donc corrigés en ajoutant 1 résidu de glucosamine par glycopeptide.

b) Action de la neuraminidase

Après traitement du GP-II par la neuraminidase, selon le protocole décrit p.44 , l'hydrolysat est fractionné par électrophorèse préparative sur papier à pH 2,4. Les deux taches qui apparaissent sont dénommées GP-II (a) et GP-II (b).

Les résultats des analyses effectués par colorimétrie et par méthanolyse, montrent que le glycopeptide GP-II (a) ne contient plus d'acide sialique et que le glycopeptide GP-II (b) n'en renferme plus qu'un résidu.

c) Perméthylation des glycopeptides GP-I et GP-II

Les résultats des analyses chromatographiques des éthers méthyliques obtenus après perméthylation et acétylation des glycopeptides GP-I et GP-II sont rassemblés dans le Tableau^{VII}, p.76 .

Ces résultats montrent l'identité des glycopeptides GP-I et GP-II, la seule différence étant l'existence d'un perméthylgalactose dans le glycopeptide GP-I. Ce résidu de galactose se trouve donc en position externe.

La présence de deux résidus de 2,3,4-O-méthyl-galactoside dans le GP-II montre qu'il ne possède plus de galactose en position externe, ceux-ci étant substitués par de l'acide sialique en position 6.

TABLEAU VII

Composition molaire des éthers méthyliques obtenus après perméthylation des glycopeptides pronasiques GP-I et GP-II.

Monosaccharides méthylés (a)	Glycopeptides	
	GP-I	GP-II
2,3,4,6 tétra-O-méthylgalactoside	1	0,12
2,3,4 tri-O-méthylgalactoside	1,13	1,76
3,4,6 tri-O-méthylmannoside	1,70	1,85
2,4 di-O-méthylmannoside	1	1
2 acétamido-3,6 di-O-méthyl- glucoside	3,69	3,72

(a) Les calculs ont été effectués en prenant comme base de référence
1 résidu de 2,4-di-O-méthylmannoside.



D'autre part, la présence dans les deux glycopeptides de 1 résidu de 2,4 di-O-méthylmannose et 2 de 3,4,6 tri-O-méthylmannose, montre l'existence d'un noyau trimannosidique.

Tous les résidus de glucosamine sont substitués dans les deux glycopeptides, en 1,4

L'ensemble de ces résultats nous permet de prévoir déjà une structure glycanique du même type que celle des glycanes de la STF humaine.

d) Etude des spectres de RMN du proton à 360 MHz.

Les valeurs des déplacements chimiques des protons du glycopeptide GP-I et du glycopeptide GP-II disialylé et asialylé, comparées avec les valeurs obtenues pour les glycopeptides de la STF humaine (DORLAND *et al.* (246) et (247)), sont données dans le Tableau VII \bar{b} , p.78.

L'étude des déplacements chimiques des pics caractéristiques du glycopeptide GP-II disialylé et asialylé, montre la présence d'un glycanne biantenné possédant un noyau du type mannotrioside-di-N-acétylneuraminyl- α (2 6)-N-acétyllactosaminique. Cette structure est identique à celles des glycanes isolés de la STF humaine, SPIK *et al.* (248) et DORLAND *et al.* (249)).

D'autre part, nous pouvons constater que le glycopeptide GP-I est un mélange de deux monosialoglycopeptides isomères (GP-Ia et GP-Ib) ; le premier possédant un résidu d'acide sialique sur la branche supérieure et le deuxième sur la branche inférieure.

TABLEAU VIII

Résultats de la R.M.N. (lire le texte p. 77).

H-1 de	<u>Glycopeptides STF de lapin</u>				<u>Glycopeptides STF humaine</u>	
	<u>GP-Ia</u>	<u>GP-Ib</u>	<u>GP-II bisialoglycanne</u>	<u>GP-II asialoglycanne</u>	<u>asialoglycanne</u>	<u>bisialoglycanne</u>
GlcNAc 1	5,073	5,073	5,072	5,070	5,072	5,073
GlcNAc 2	4,620	4,620	4,622	4,617	4,616	4,598
Man 3	4,769	4,769	4,775	4,765	4,77	4,77
Man 4	5,138	5,120	5,134	5,121	5,119	5,133
Man 4'	4,928	4,944	4,946	4,929	4,926	4,946
GlcNAc 5	4,599	4,577	4,600	4,581	4,581	4,598
GlcNAc 5'	4,577	4,599	4,600	4,581	4,581	4,598
Gal 6	4,445	4,471	4,445	4,471	4,470	4,447
Gal 6'	4,471	4,445	4,445	4,471	4,470	4,447
<u>H-2 de</u>						
Man 3	4,251	4,251	4,254	4,248	4,244	4,254
Man 4	4,192	4,192	4,195	4,191	4,188	4,196
Man 4'	4,112	4,112	4,114	4,110	4,107	4,115
<u>H-3 de</u>						
NeuNAc (H ₃ eq)	1,716	1,716	1,715	-	-	1,721
NeuNAc (H ₃ ax)	2,670	2,670	2,671	-	-	2,671
<u>N-acétyl protons de</u>						
GlcNAc 1	2,005	2,005	2,007	2,009	2,013	2,013
GlcNAc 2	2,078	2,078	2,080	2,078	2,076	2,079
GlcNAc 5	2,030	2,048	2,030	2,050	2,047	2,030
GlcNAc 5'	2,048	2,030	2,030	2,047	2,047	2,030
NeuNAc	2,068	2,068	2,067	-	-	2,068

La présence d'un acide sialique branché en position $\alpha(2 \rightarrow 6)$ sur le galactose, produit une augmentation significative pour les valeurs des déplacements des protons mannose 4 et 4' ; N-acétylglucosamine 5 et 5' et galactose 6 et 6', comme on peut constater dans le Tableau VII p. 78.

Les glycopeptides GP-Ia et GP-Ib, à un seul acide sialique, peuvent provenir, soit d'une hétérogénéité du glycanne de la STF de lapin au niveau du nombre d'acide sialique, soit de la perte d'un acide sialique lors de la longue préparation des glycopeptides pronasiques.

5 . Conclusions

L'hydrolyse pronasique de la STF de lapin, nous a permis d'isoler deux glycopeptides semblables, le GP-I et le GP-II, dans un rapport 1 : 4 . Le GP-I possède un seul résidu d'acide sialique, tandis que le GP-II en possède deux. Leur séquence peptidique est identique, soit un résidu d'acide aspartique se trouvant en position N-terminale.

Le glycopeptide GP-I est constitué d'un mélange de deux glycopeptides, le GP-Ia et le GP-Ib ; le premier possédant son acide sialique sur la branche supérieure et le deuxième sur la branche inférieure. L'origine de ce glycopeptide peut être expliquée, soit par une hétérogénéité au niveau de l'acide sialique de la STF de lapin, soit par une perte d'acide sialique lors de la préparation des glycopeptides

pronasiques.

Nous avons rassemblé dans la Fig. 15 p. 81, les structures primaires complètes des glycopeptides GP-Ia, GP-Ib et GP-II, obtenues d'après les résultats de composition molaire en sucres, de perméthylation et des études de la RMN. Nous pouvons constater une identité complète entre les glycannes de la STF humaine (voir Fig. 3 p. 13) et le glycanne " majeur " (GP-II) isolé de la STF de lapin.

B - GLYCOPEPTIDES TRYPSIQUES

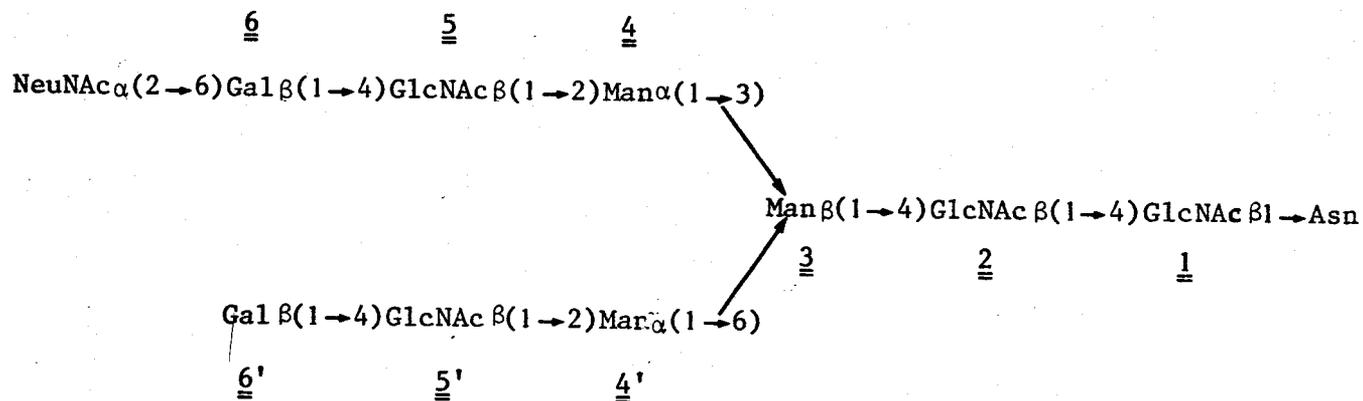
1. Isolement des glycopeptides

Pour purifier les glycopeptides des hydrolysats tryptiques de la STF de lapin, réduite et alkylée, nous avons effectué d'abord une chromatographie de tamisage moléculaire qui permet d'éliminer une grande partie des peptides. Ainsi, l'hydrolysat de STF de lapin, une fois concentré à l'évaporateur rotatif, est déposé sur une colonne de Séphadex SG-50. La fraction glycopeptidique est éluée en tête, tandis qu'une importante quantité de peptides est retardée dans le gel. Nous obtenons ainsi 39 mg de fraction glycopeptidique, pour un hydrolysat de 1,25 g de STF de lapin.

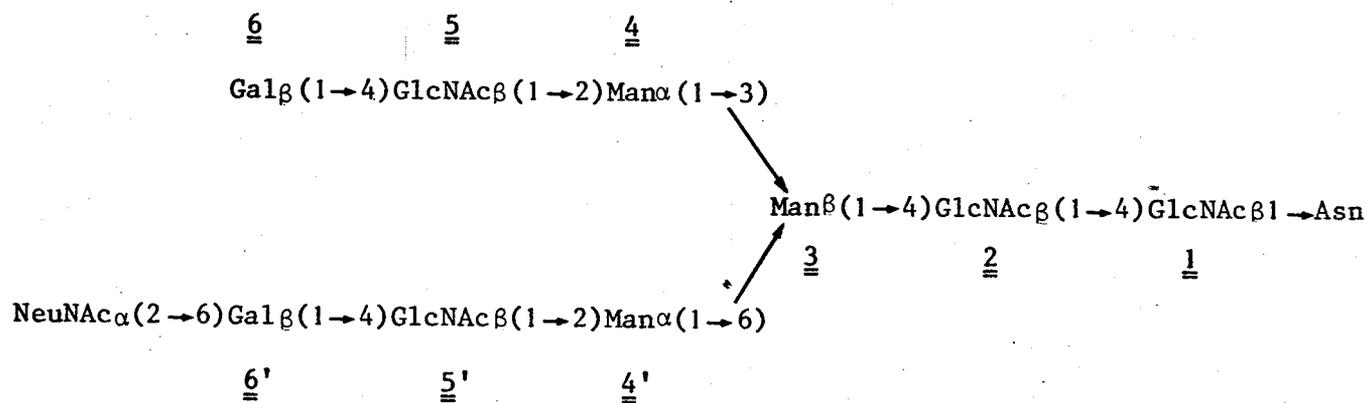
La fraction glycopeptidique est alors soumise à une électrophorèse préparative en toit à pH 2,4 de l'anode vers la cathode.

La révélation des électrophorégrammes (voir la Fig. 16 p. 82) montre qu'apparaissent deux taches bien séparées, et exemptes de peptides ; le glycopeptide GPT-I, qui migre le moins vite, et le glycopeptide GPT-II qui migre davantage. Les rendements sont de 4,3 mg pour le GPT-I, et de 17,4 mg pour le GPT-II, soit

GP-Ia



GP-Ib



GP-II

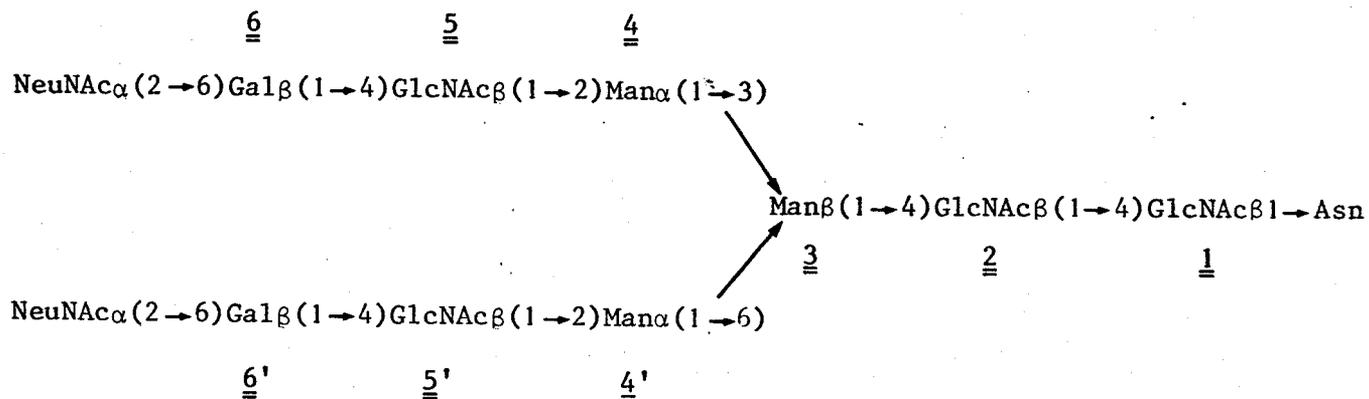
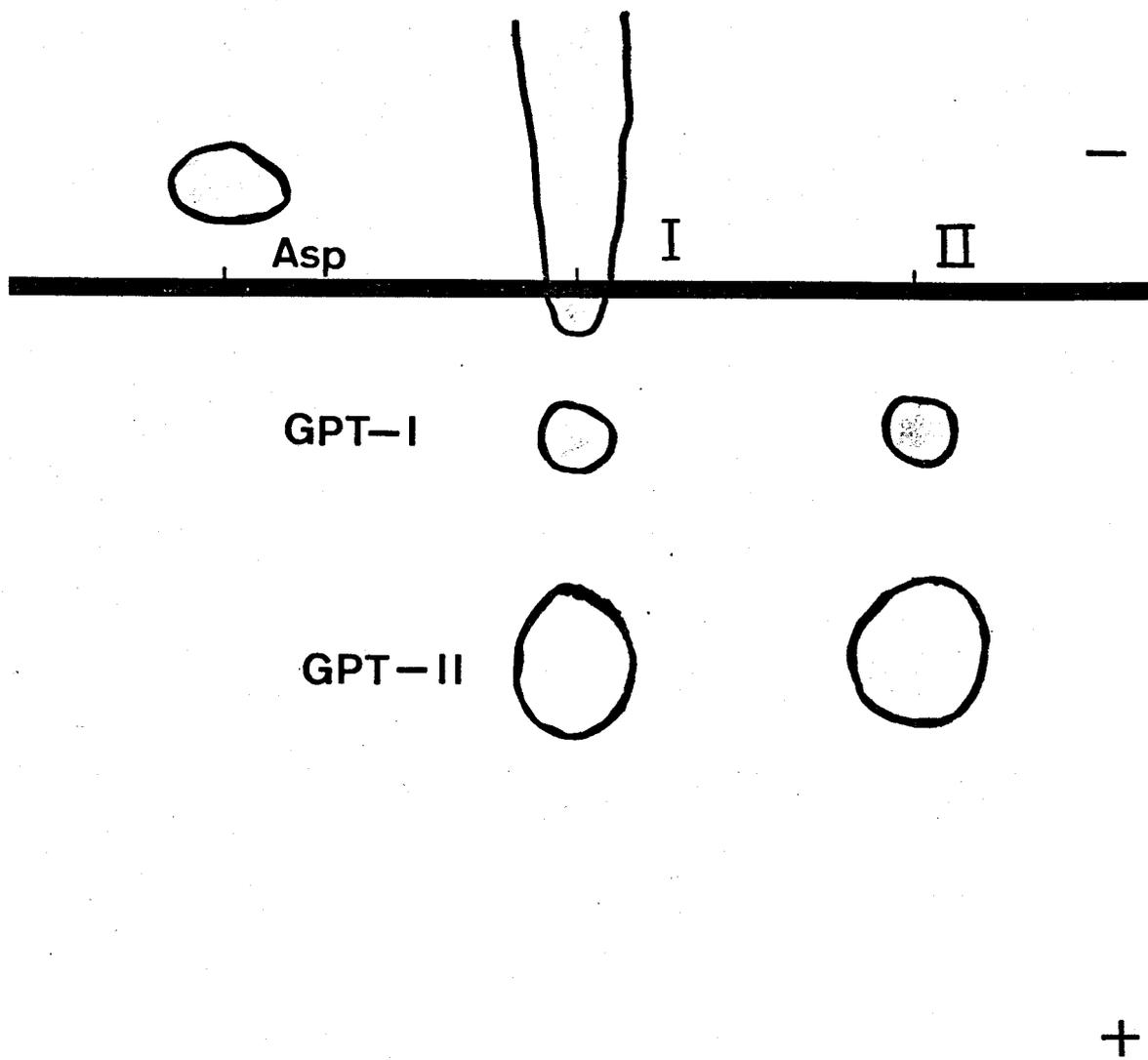


Figure 15 : Structure primaire des glycopeptides isolés de la STF de lapin.



pH 2,4 ; 10 V/cm ; 18 h.

Figure 16 : Electrophorèse en toit à pH 2,4 de la fraction glycopeptidique trypsique filtrée sur SG-50.
I : Révélation à la ninhydrine-cadmium
II: Révélation à l'acide périodique-benzidine.



dans un rapport 1 : 4 et avec un bilan pour l'électrophorèse de 56 p.100.

2 . Composition des glycopeptides tryptiques

Les compositions molaires en acides aminés et en glucides des glycopeptides tryptiques, GPT-I et GPT-II, sont rassemblées dans le Tableau IX, p. 84 .

Les résultats obtenus pour la N-acétyl glucosamine, soit par méthanolyse, soit après passage à l'autoanalyseur, ont été corrigés comme nous l'avons déjà décrit pour les glycopeptides pronasiques (p. 74).

Ces résultats montrent que les deux glycopeptides possèdent une composition identique en glucides ; composition qui correspond à celle du glycopeptide pronasique GP-II. On remarque aussi l'absence de glycopeptide à un seul résidu d'acide sialique, ce qui tendrait à démontrer la perte d'acide sialique lors de la préparation des glycopeptides pronasiques, qui est beaucoup plus longue, expliquant ainsi l'existence du glycopeptide pronasique GP-I.

Le glycopeptide GPT-I possède une séquence peptidique plus longue que le glycopeptide GPT-II, cependant, nous pouvons constater que tous les acides aminés présents dans le GPT-II, le sont aussi dans le GPT-I, mais à des taux plus élevés. L'étude comparée de la composition en acides aminés des glycopeptides

TABLEAU IX

Compositions molaires en acide aminés et en glucides des glycopeptides tryptiques de la STF de lapin.

	<u>GPT-I</u>	<u>GPT-II</u>
<u>Rendement</u>	20 p.100	80 p.100
<u>Acides aminés</u>		
Asp	1,8	0,97
Ser	2,6	1,81
Glu	0,87	-
Pro	0,67	-
Gly	0,71	-
Ala	0,50	-
Val	0,54	-
Leu	1,75	1,17
Lys	0,66	-
Trp (a)	-	-
GlcNAc	3,92	3,43
<u>Glucides (b)</u>		
Galactose	2,26	2,1
Mannose	3	3
N-Acétyle glucosamine	3,94	3,9
Acide N-acétyle neuraminique	2,03	2,06

(a) Déterminé selon le protocole de TABONE *et al.* (250) et REDDI et KODICEK (251)

(b) Les résultats ont été effectués en prenant comme base de référence 3 résidus de mannose.



GPT-I et GPT-II, nous conduit à penser que ces deux glycopeptides proviennent de coupures à différents niveaux, au voisinage du même glycanne.

Du fait de la spécificité de la trypsine, on peut s'étonner de ne pas trouver de résidus basiques dans le glycopeptide majeur GPT-II ; et penser ainsi qu'il s'agit du fragment C-terminal de la protéine, ou bien considérer qu'il s'agit d'une coupure de type chymotrypsine au niveau de la leucine. Nous préférons cette dernière hypothèse due au fait de l'existence du glycopeptide GPT-I, de chaîne plus longue, et vraisemblablement provenant d'une coupure différente, comme nous l'avons dit plus haut. Quant au glycopeptide GPT-I, il aurait été bien coupé au niveau de la lysine.

D'autre part, nous avons recherché la possible présence de Tryptophane dans les glycopeptides GPT-I et GPT-II, suivant la méthode décrite p. 43. Les résultats ont été négatifs.

3 . Etude de la chaîne peptidique

a) Acide aminé N-terminal

L'acide aminé N-terminal identifié après dansylation pour les glycopeptides tryptiques GPT-I et GPT-II, est l'acide aspartique.

b) Acide aminé C-terminal du glycopeptide GPT-II

L'acide aminé en position C-terminale, identifié

par dansylation après hydrolyse du glycopeptide GPT-II par la carboxypeptidase A à des temps différents, a été la leucine.

c) Dégradation récurrente d'Edman sur le glycopeptide GPT-II

La dégradation récurrente d'Edman effectuée sur le glycopeptide " majeur " GPT-II n'a pas donné des résultats suffisamment interprétables, vraisemblablement du fait que le glycanne est, d'après les résultats de dansylation, en position N-terminale, et qu'il est très court.

4 . Conclusions

L'ensemble de ces résultats, associés aux résultats obtenus sur la chaîne peptidique des glycopeptides pronasiques; permettent de proposer le schéma de structure suivant pour la séquence peptidique du glycopeptide trypsique majeur, GPT-II :



←→
glycopeptide
pronasique

←→
dansylation

←→

Action de la
carboxypeptidase A

C - CONCLUSIONS

Nous avons isolé deux glycopeptides pronasiques de la STF de lapin: Le glycopeptide majeur GP-II, de structure identique à celle des deux glycopeptides de la STF humaine , et le glycopeptide mineur GP-I de structure semblable à celle du glycopeptide GP-II, avec la seule différence d'avoir un seul résidu d'acide

sialique lié indifféremment soit sur la branche supérieure, soit sur la branche inférieure du glycanne.

L'hydrolyse trypsique de la STF de lapin, nous a permis d'isoler deux glycopeptides semblables, la seule différence portant sur la longueur de la chaîne peptidique ; le glycopeptide majeur, GPT-II qui possède la séquence peptidique suivante : Asn (CHO)-Ser-Ser-Leu, et le glycopeptide mineur GPT-I, de chaîne peptidique plus longue. Nous avons vérifié l'absence de tryptophane dans les deux glycopeptides tryptiques.

La séquence peptidique Asn-Ser-Ser-Leu , est identique à celle du glycopeptide type A de la STF bovine (voir la Fig.2 p.11). Cependant, nous ne pouvons pas formuler de conclusion quant à la position du glycanne sur la chaîne peptidique de la STF de lapin.

Nous constatons l'absence de glycopeptide trypsique à un seul acide sialique ; cela nous permet de penser que le glycopeptide pronasique à un seul acide sialique , GP-I , provient de la perte d'acide sialique lors de la préparation des glycopeptides.

En effet, la préparation des glycopeptides tryptiques est beaucoup plus courte que celle des glycopeptides pronasiques, et le fait de ne pas retrouver de glycopeptide à un seul acide sialique, infirmerait l'hypothèse d'une hétérogénéité au niveau de l'acide sialique dans la STF de lapin.

Il semblerait plus probable que la perte d'acide sialique

soit due à une coupure lors de l'isolement des glycopeptides, ou bien à la présence d'une activité neuraminidase dans la pronase.

D'après les résultats concernant la composition molaire en glucides de la STF de lapin, et connaissant la structure du groupement glycanique de cette protéine, nous pouvons conclure qu'elle ne possède qu'un seul glycanne par molécule.

IV - LE GLYCANNE DANS L'INTERACTION STF-RETICULOCYTE

Comme nous l'avons décrit au début de ce mémoire, notre but principal a été de définir le rôle de la partie glucidique de la STF dans l'interaction STF-réticulocyte.

Nous avons été donc amenés, après un certain nombre d'expériences préliminaires, à essayer d'inhiber le transfert du fer de la STF aux réticulocytes par préincubation de ceux-ci avec les glycopeptides de la STF.

A - EXPERIENCES PRELIMINAIRES

1 . Préparation des réticulocytes

Le sang enrichi en réticulocytes est préparé selon la méthode décrite p.47 .

Le taux de réticulocytes, déterminé après chaque prélèvement sur un échantillon est le suivant : 1 à 2 p.100 à la première saignée;

5 à 9 p.100 à la deuxième ; 10 à 15 p.100 à la troisième et de 20 à 30 p.100 lors du dernier prélèvement.

L'aspect des réticulocytes ainsi préparés est normal au microscope, cependant les cellules sont fragilisées après lavage et l'hémolyse intervient plus rapidement que dans le cas du sang non traité. Le culot de cellules enrichi en réticulocytes est donc utilisé immédiatement après le lavage, pour les incorporations en présence de STF.

2 . Détermination de la concentration optimale en STF

La vitesse d'incorporation du fer dans les réticulocytes est fonction du rapport STF/taux de réticulocytes.

Nous avons donc réalisé une cinétique d'incorporation du fer par les réticulocytes de lapin (en moyenne 22 p.100 de réticulocytes) en présence de différentes concentrations en STF de lapin, de manière à déterminer les conditions pour lesquelles l'incorporation du fer est assez rapide pour permettre des études d'inhibition.

La Fig.17 p. 90 nous montre qu'une concentration en STF de 460 μg par tube (équivalent à la concentration de la STF dans le sang normal), provoque une incorporation lente et régulière du fer par les réticulocytes. Par contre, avec des concentrations beaucoup plus faibles (60 μg par tube), l'incorporation est plus rapide, mais présente un maximum aux environs de 30 nm. , pour descendre lentement après. Ce résultat met en évidence un défaut de STF.

Enfin, une concentration de 120 μg par tube, montre une incorporation rapide et linéaire jusqu'à 15 nm., atteignant un plateau aux environs de 30 minutes.

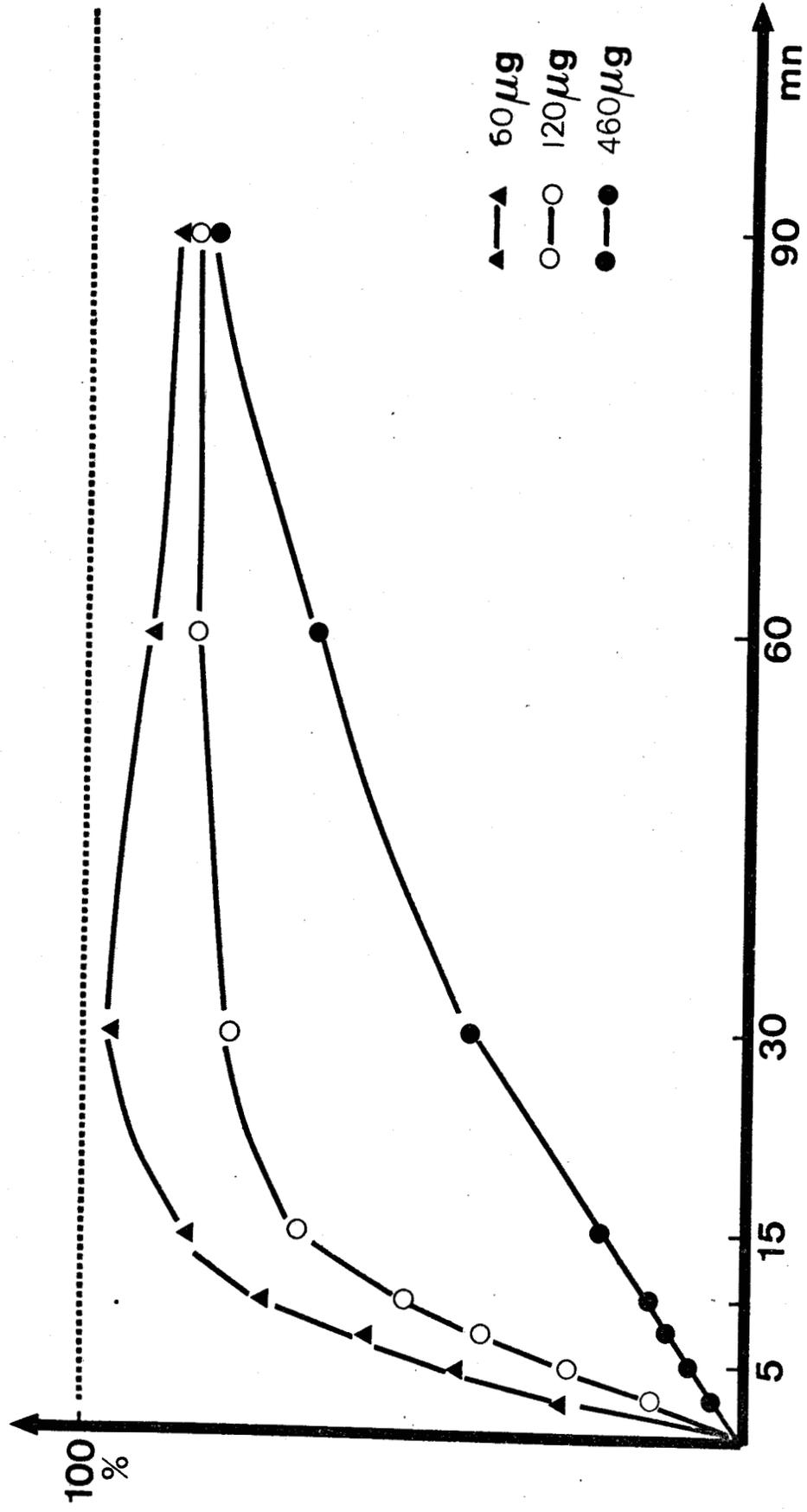


Figure 17 ; Incubation de la STF de lapin à différentes concentrations avec les réticulocytes de lapin.



C'est donc au voisinage de cette dernière concentration (de 100 à 150 μg par tube) que nous avons réalisé les expériences d'inhibition par les glycopeptides. En effet, les temps d'incubation avec la STF utilisés étant de 10 minutes, nous nous situons dans la partie linéaire de la courbe et avec un pourcentage d'incorporation suffisamment élevé pour être significatif.

3 . Incorporation du fer par le réticulocyte de lapin ;
différence entre la STF humaine et la STF de lapin

Des expériences préliminaires avaient montré que l'incorporation du fer par les réticulocytes de lapin en présence de STF de lapin était deux fois supérieure à celle incorporé en présence de la STF humaine, JANDL *et al.* (252). Par contre, d'après les résultats récents de PRINCIOTTO et ZAPOLSKI (253), l'incorporation par les réticulocytes de lapin du fer de la STF humaine, qui représente 75 p.100 de celle de la STF de lapin après 30 minutes, atteint 90 p.100 de cette dernière à 90 minutes d'incubation.

Nous avons répris cette expérience, et les résultats, illustrés dans la Fig.18 p. 9 , montrent que la différence entre l'incorporation du fer par la STF de lapin et la STF humaine est de 25 p.100, pour 60 minutes d'incubation.

Notre hypothèse de travail, n'est cependant pas modifiée par ce résultat car, comme nous l'avons démontré, le glycanne de la STF de lapin est identique à ceux de la STF humaine, et la petite différence d'incorporation trouvée pourrait s'expliquer, soit par

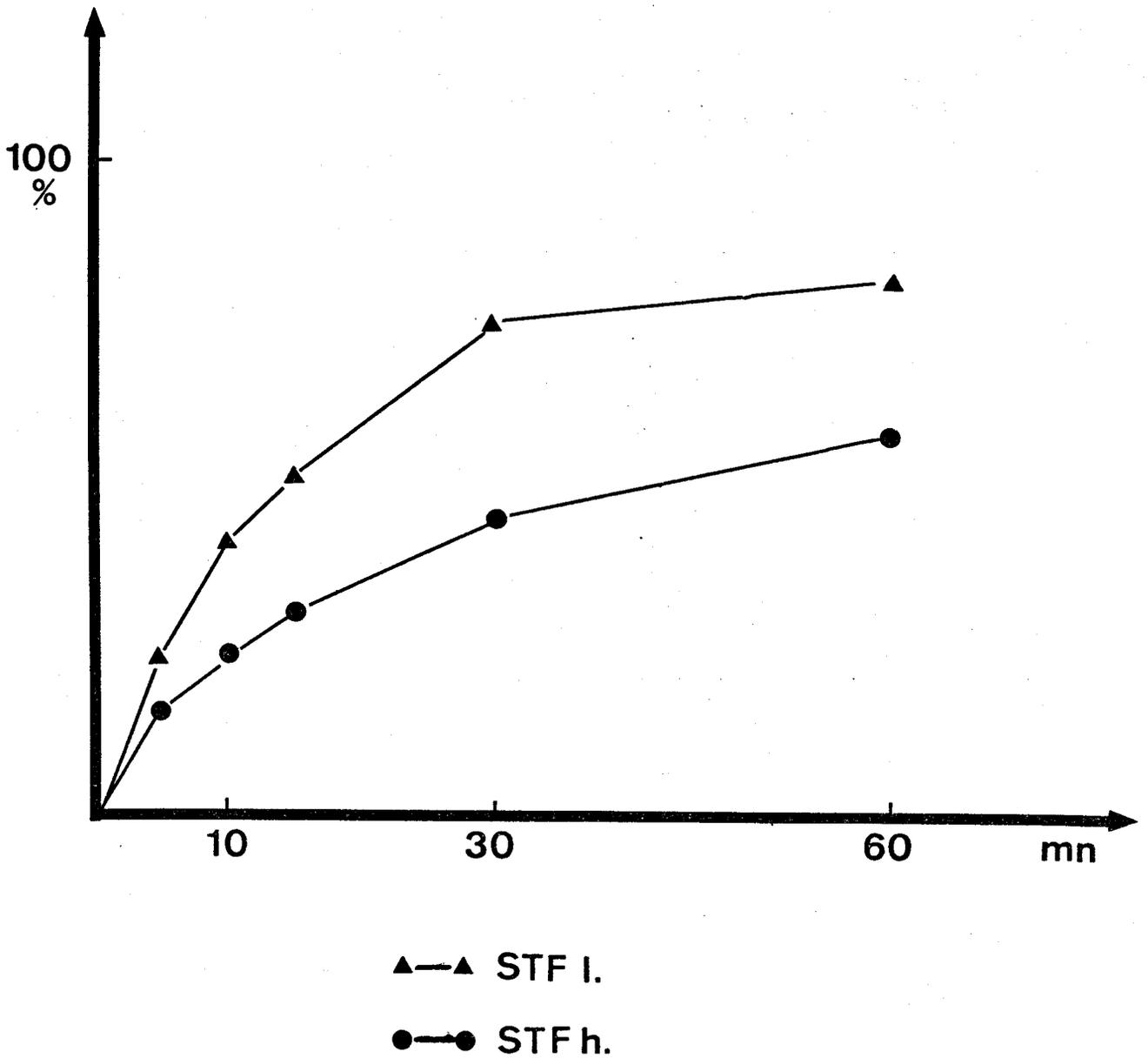


Figure 18 : Incorporation du fer par les réticulocytes de lapin en présence de STF humaine et STF de lapin.



le nombre différent de groupements glycaniques, soit par de légères différences conformationelles entre les deux protéines.

4 . Incubation des réticulocytes de lapin avec la STF de lapin désialylée

Comme dans l'expérience précédente, des travaux préliminaires avaient déjà montré que l'élimination de l'acide sialique de la STF humaine n'affecte pas profondément le transfert du fer aux réticulocytes de lapin, MORGAN *et al.* (254) et KORNFELD (255).

Nous avons repris la même expérience mais avec la STF de lapin. Les résultats (Fig.19 p.94), montrent que dans le système homologue, le transfert du fer n'est pas non plus affecté par l'absence de l'acide sialique dans la protéine.

Nous pouvons donc conclure que l'acide sialique n'intervient pas de manière déterminante dans l'interaction STF-réticulocytes.

B - REACTION D'INHIBITION DE L'INTERACTION STF-RETICULOCYTE PAR LES GLYCOPEPTIDES PRONASIQUES

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent, le glycanne de la STF de lapin possède une structure identique à celle du glycanne de la STF humaine. Nous avons donc utilisé pour les réactions d'inhibition, soit les glycopeptides pronasiques de la STF de lapin, soit les glycopeptides pronasiques de la STF humaine.

1 . Incubation de la STF de lapin et des réticulocytes de lapin, en présence de glycopeptides de la STF humaine

Le protocole expérimental utilisé est décrit p.50 . Les

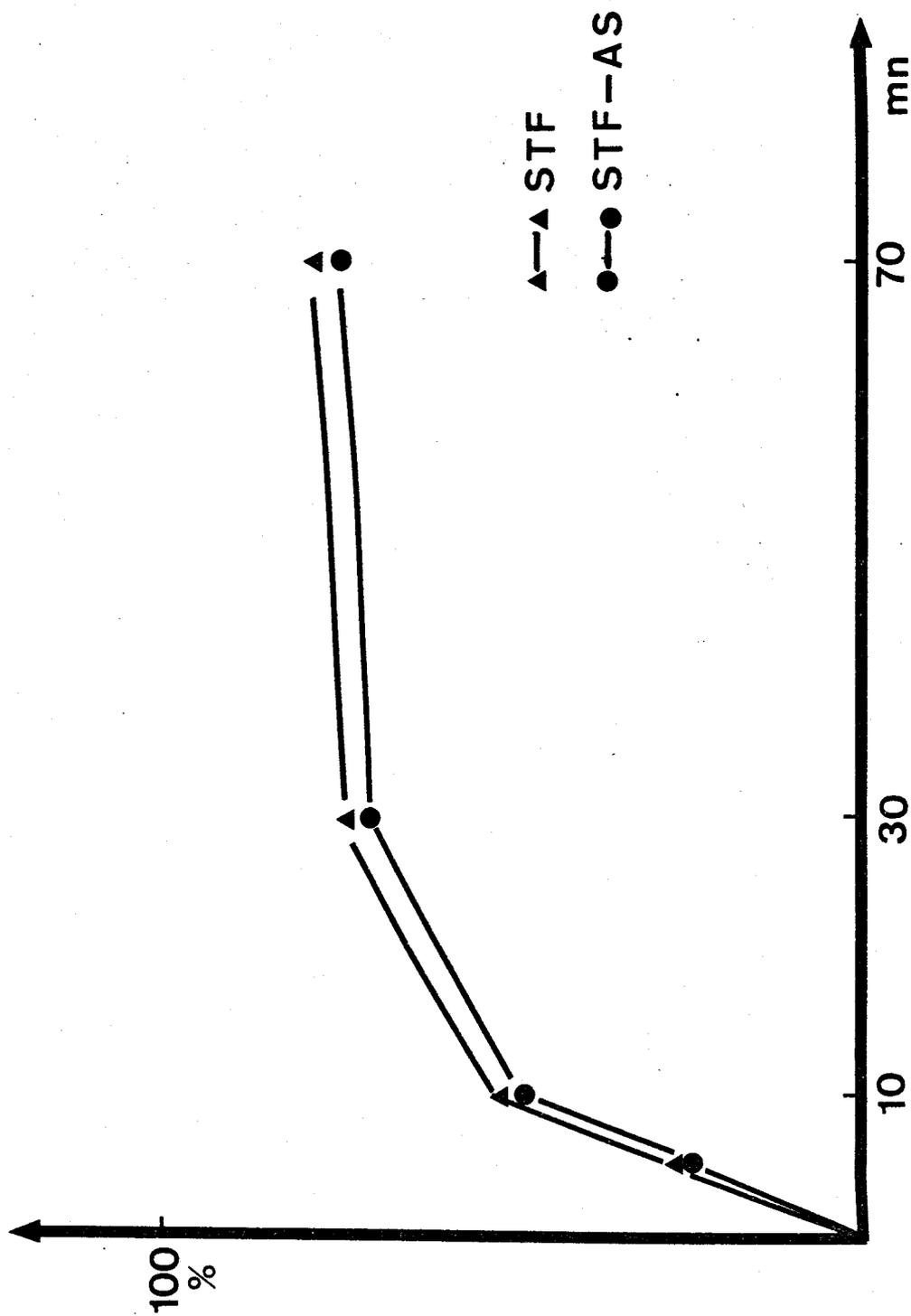


Figure 19 : Incorporation du fer par les réticulocytes de lapin, à partir de STF de lapin désialylé.



glycopeptides utilisés sont un mélange de glycopeptides pronasiques (GP-1 à GP-4) de la STF humaine, obtenus après électrophorèse en veine liquide.

Dans une expérience préliminaire nous avons effectué une gamme de concentrations finales en glycopeptides allant de 0,01 à 10 mM, soit de 5 à 5.000 M excès par rapport à la STF. Ces glycopeptides ne sont pas désialylés, et le pH de la solution mère n'est pas ajusté à 7,4.

Les résultats sont donnés dans la Fig.20 p.96 et sont exprimés en taux d'incorporation du fer sur les cellules par rapport à un témoin sans glycopeptide. (Les témoins sont toujours effectués en triple).

Nous constatons que pour des concentrations en glycopeptides inférieures à 150 M excès, soit 0,3 mM, il n'y a pas des variations dans le taux d'incorporation du fer sur les cellules ; par contre, celui-ci décroît régulièrement pour des concentrations supérieures à 150 M excès, et est nul pour des concentrations de l'ordre de 5000 M excès (soit 10 mM en glycopeptides).

2 . Fixation de la STF de lapin doublement marquée sur des réticulocytes de lapin, en présence de glycopeptides pronasiques de la STF humaine à pH 7,4.

Il est cependant possible que la présence d'une quantité non négligeable d'acide sialique abaisse le pH du milieu suffisamment

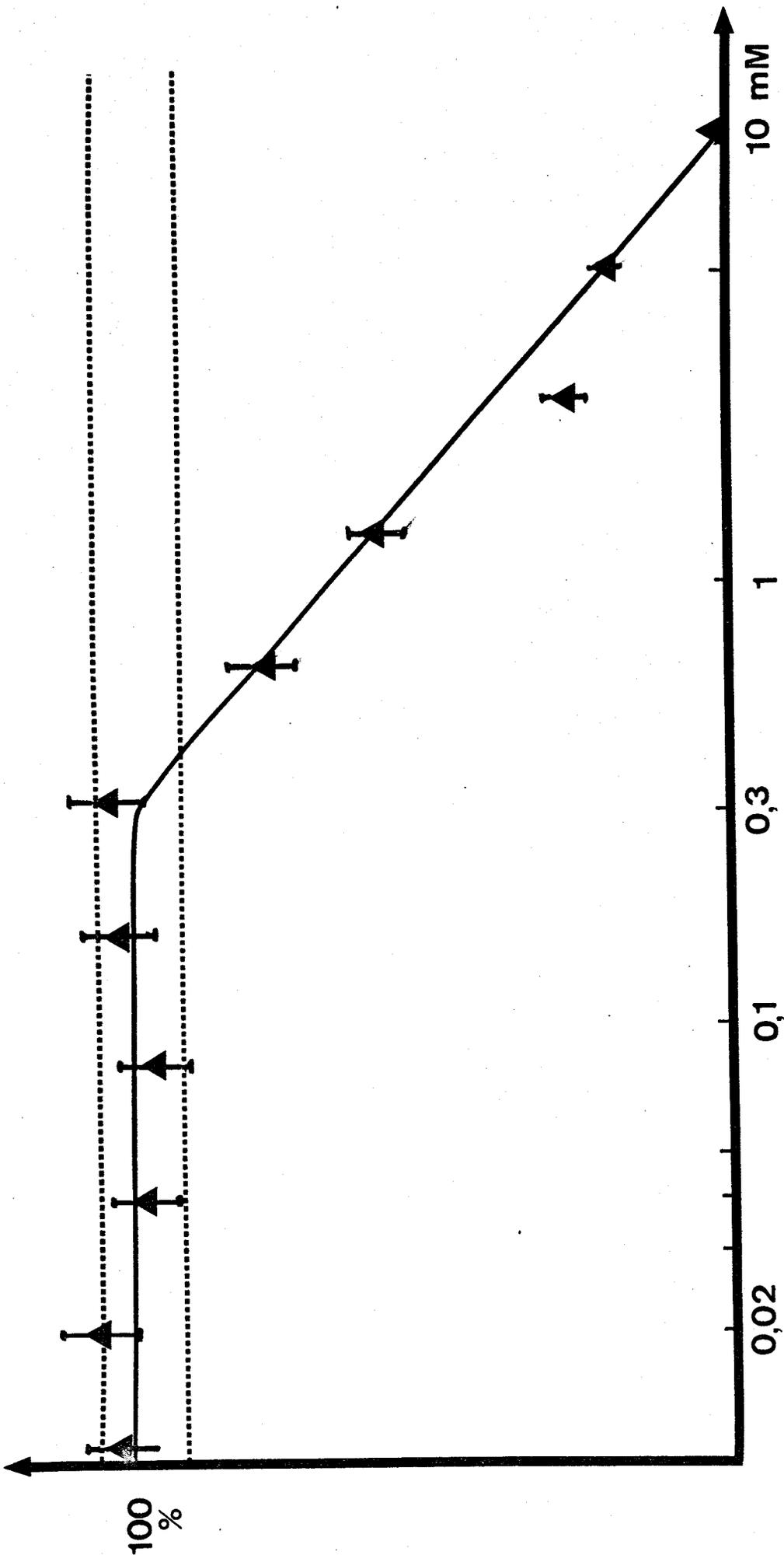


Figure 20 : Expériences d'inhibition du transfert du fer par les glycopeptides pronasiques de la STF humaine (dont le pH n'a pas été neutralisé).



soit pour empêcher les réticulocytes de fonctionner normalement, soit pour désaturer la STF. En effet, une concentration finale de 10 mM représente 25 mg de glycopeptide par ml de milieu d'incubation. Ainsi, nous avons effectué la même expérience que précédemment mais en ajustant avec la soude, la solution mère de glycopeptide à pH 7,4.

D'autre part, nous avons utilisé une STF de lapin doublement marquée à l' ^{125}I et au ^{59}Fe , de manière à voir si l'inhibition constatée provenait d'une non fixation de la STF sur les cellules. Cette inhibition étant suffisamment importante pour des concentrations en glycopeptides inférieures à 10 mM, nous n'avons pas utilisé des concentrations supérieures à 2,7 mM.

La courbe illustrant cette expérience, représentée dans la Fig.21 p. 98, nous montre une cassure identique à la précédente, pour des concentrations en glycopeptide de 150 à 200 M excès, soit 0,3 à 0,4 mM, avec cependant une diminution de l'incorporation du fer plus lente que dans l'expérience précédente.

Nous constatons aussi que, contrairement au fer, la radioactivité de l'Iode 125 sur les cellules reste constante quelque soit la concentration en glycopeptide, et est identique à celle du témoin incubé sans glycopeptide.

- 3 . Incubation de deux STF de lapin, l'une marquée au ^{59}Fe et l'autre au ^{125}I , en présence des glycopeptides de la STF humaine à pH 7,4.

Dans l'expérience précédente la STF de lapin étant

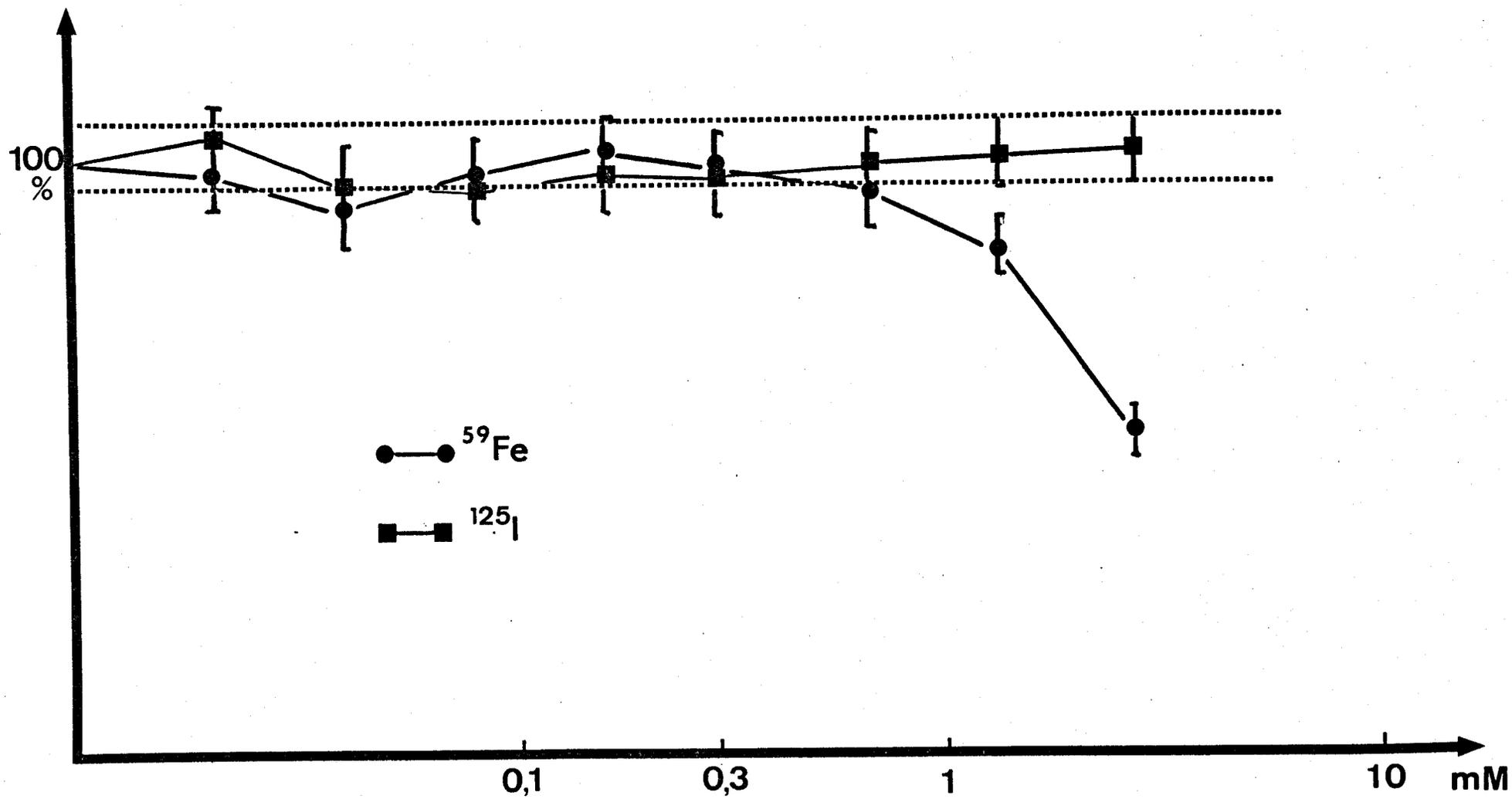


Figure 21 : Expériences d'inhibition du transfert du fer par les glycopeptides pronasiques de la STF humaine (dont le pH a été neutralisé).



doublement marquée, au ^{59}Fe et au ^{125}I , la fixation de l'iode sur les tyrosines de la STF pourrait perturber le départ du fer de la STF.

Nous avons donc utilisé deux lots identiques de cellules en présence des mêmes concentrations en glycopeptide, l'un étant mis à incuber avec une STF marquée au ^{59}Fe , et l'autre avec une STF saturée en fer froid et marquée au ^{125}I ,

Comme nous le constatons dans la Fig. 22 p. 100, le résultat est identique au précédent. En effet, nous retrouvons un début d'inhibition de l'incorporation du fer par la cellule pour la même concentration en glycopeptide (0,3 mM), la fixation de la STF sur la cellule déterminée par la radioactivité de l'Iode 125, restant constante.



4 . Incubation de la STF de lapin en présence du glycopeptide de la STF humaine désialylée

De manière à vérifier si l'inhibition observée à partir de certaines concentrations en glycopeptides ne provenait pas d'une modification locale du pH au voisinage de la cellule due à une grande concentration de molécules contenant de l'acide sialique, nous avons répété l'expérience précédente en utilisant le glycopeptide de la STF humaine, dépourvu d'acide sialique. Une courbe témoin a été effectuée simultanément, avec le glycopeptide non désialylé à pH 7,4.

Les résultats exposés dans la Fig. 22 p. 100, montrent que les deux courbes sont exactement superposables, ce qui semble indiquer que la diminution de l'incorporation du fer dans la cellule

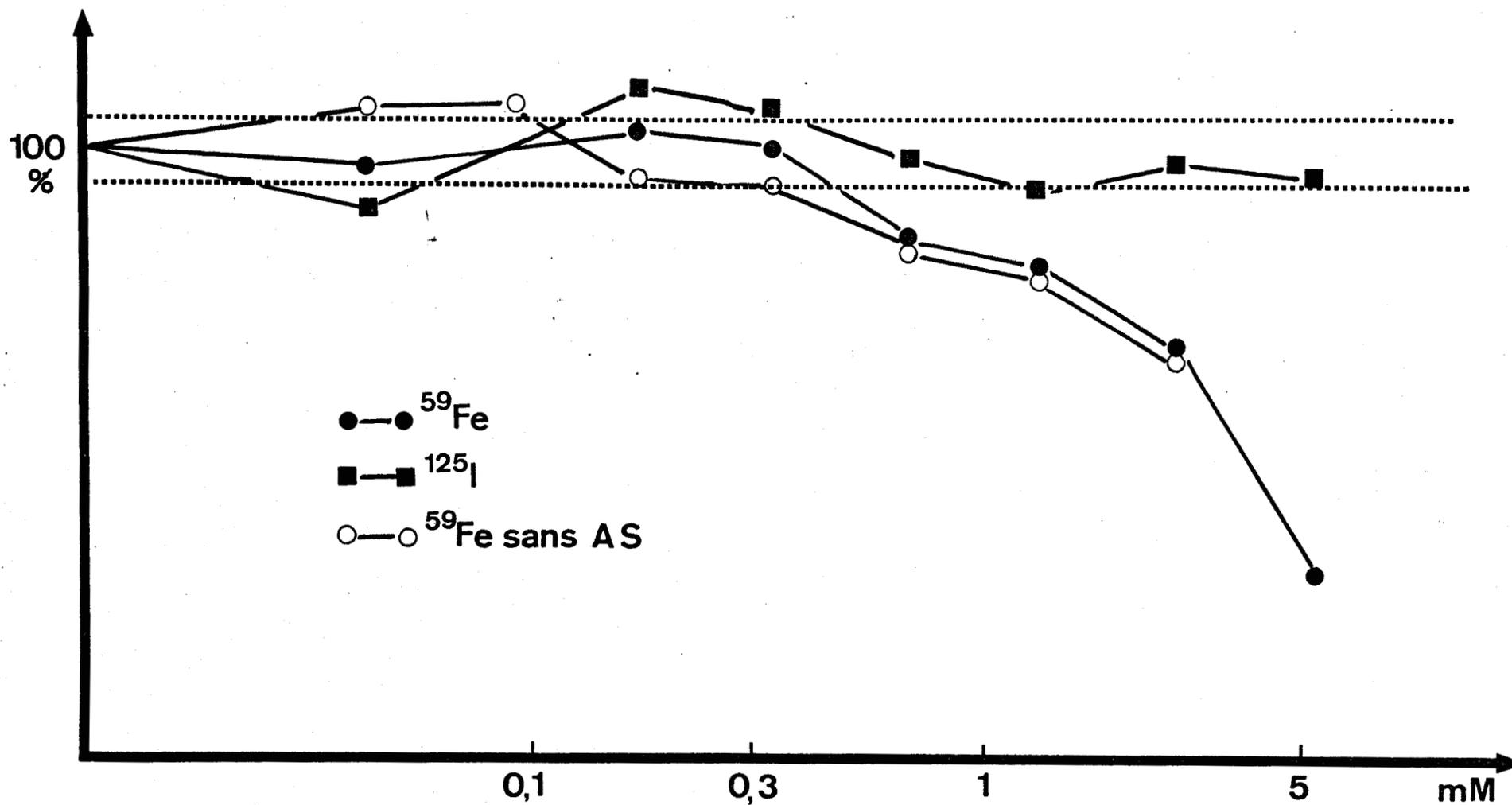


Figure 22 : Expériences d'inhibition du transfert du fer ou de la fixation sur le réticulocyte à partir d'un échantillon de STF marqué au Fer 59 , et d'autre échantillon saturé en fer froid et marqué au Iode 125, en présence des glycopeptides pronésiques de la STF humaine (dont le pH a été neutralisé), sialylés et asialylés).

n'est pas due à la présence d'acide sialique.

5 . Incubation de la STF de lapin en présence du mélange des monosaccharides dans les mêmes rapports molaires que ceux présents dans le glycopeptide

Enfin, les concentrations en glycopeptide provoquant une inhibition de l'incorporation du fer sur la cellule étant relativement élevées, il pouvait s'agir d'un phénomène non physiologique. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons donc repris l'expérience précédente en remplaçant le glycopeptide de la STF par un mélange de monosaccharides (NANA, Gal, Man, GlcNAc) dans les mêmes rapports molaires que ceux de la STF de manière à obtenir une gamme de concentrations identique à celle effectuée parallèlement avec le glycopeptide de la STF humaine. Les pH des deux solutions mère sont ajustés à pH 7,4.

Cette expérience est réalisée, comme les deux précédentes avec deux STF, l'une marquée au ^{59}Fe et l'autre au ^{125}I .

Les résultats exposés dans la Fig.23 p.102, montrent clairement que, même pour des concentrations équivalentes à 5 mM (exprimées en équivalentes glycopeptide), il n'y a pas d'inhibition de l'incorporation du fer dans le réticulocyte, ni de modification dans la fixation de la STF sur la cellule.

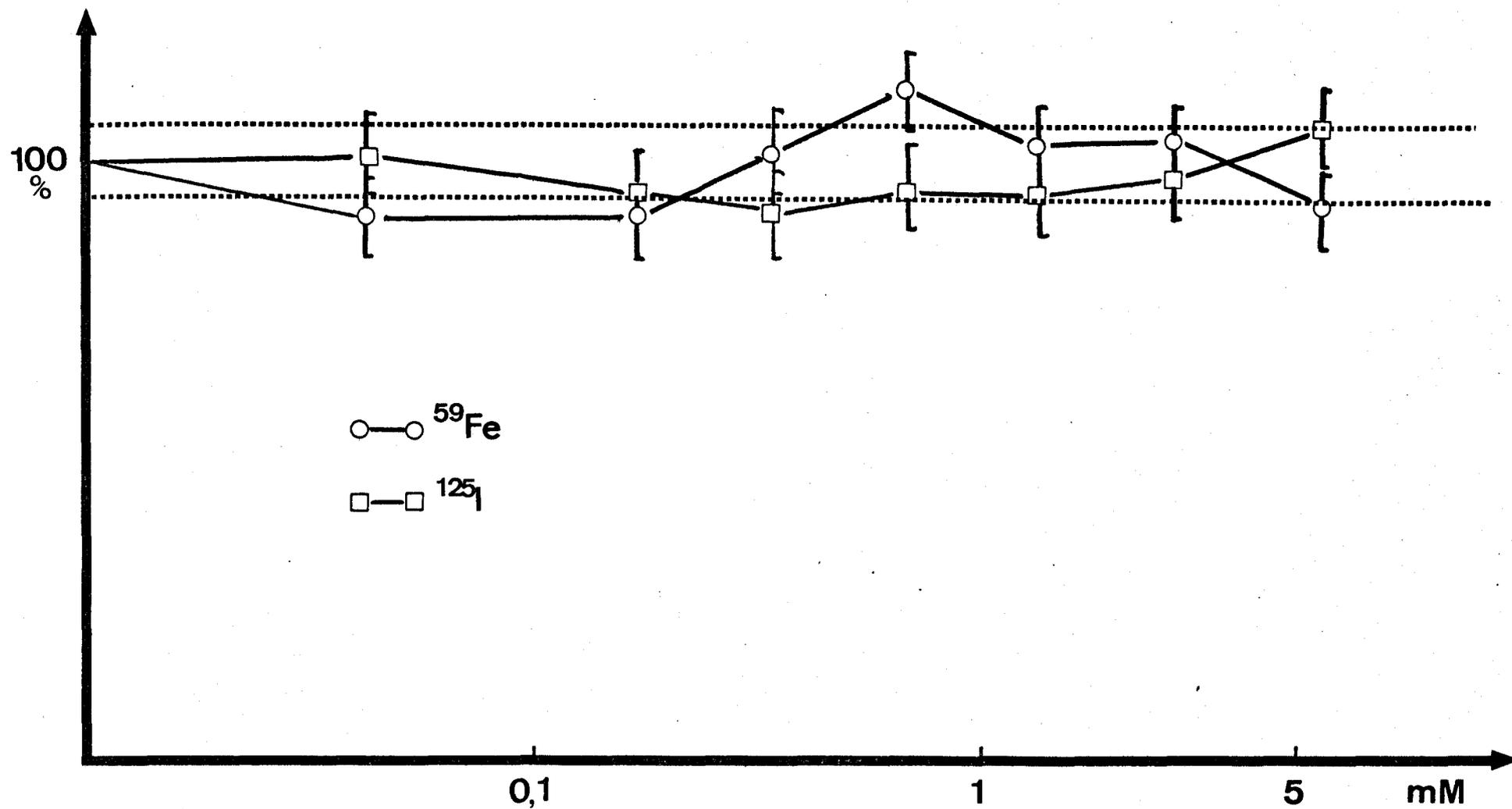


Figure 23 : Expériences d'inhibition du transfert du fer, par un mélange de monosaccharides dans un rapport molaire équivalente à celui des glycanes de la STF humaine.

6 . Cinétique d'incorporation du fer de la STF de lapin
par les réticulocytes de lapin en présence des glyco-
peptides pronasiques de la STF de lapin

Nous avons utilisé dans les expériences précédentes un mélange des deux glycopeptides pronasiques de la STF humaine, de séquence : Ser-Asn (CHO) et Asn (CHO)-Lys. Cependant, la STF de lapin ne renferme qu'un seul glycanne, et la séquence du glycopeptide pronasique est légèrement différente : Asn (CHO)-Ser. Afin de vérifier si cette légère différence ne provoquerait pas une inhibition plus importante, nous nous sommes placés à une concentration fixe en glycopeptide de la STF de lapin, 200 M excès, (soit 0,4 mM) au niveau du tout début de l'inhibition déjà observé pour les glycopeptides de la STF humaine.

De plus, nous avons réalisé une cinétique d'incorporation en fonction du temps, afin de détecter d'éventuelles différences dans les vitesses de passage du fer.

Cette expérience a été effectuée parallèlement en présence des deux glycopeptides pronasiques isolés de la STF de lapin, le GP-I à un seul acide sialique, et le GP-II à deux acides sialiques; la cinétique témoin étant réalisée sans glycopeptide.

Les résultats sont rassemblés dans la Fig.24 p.104. La faible diminution de l'incorporation du fer est identique à celles qui a été observée avec les glycopeptides de la STF humaine pour les mêmes concentrations, et les vitesses sont les mêmes.

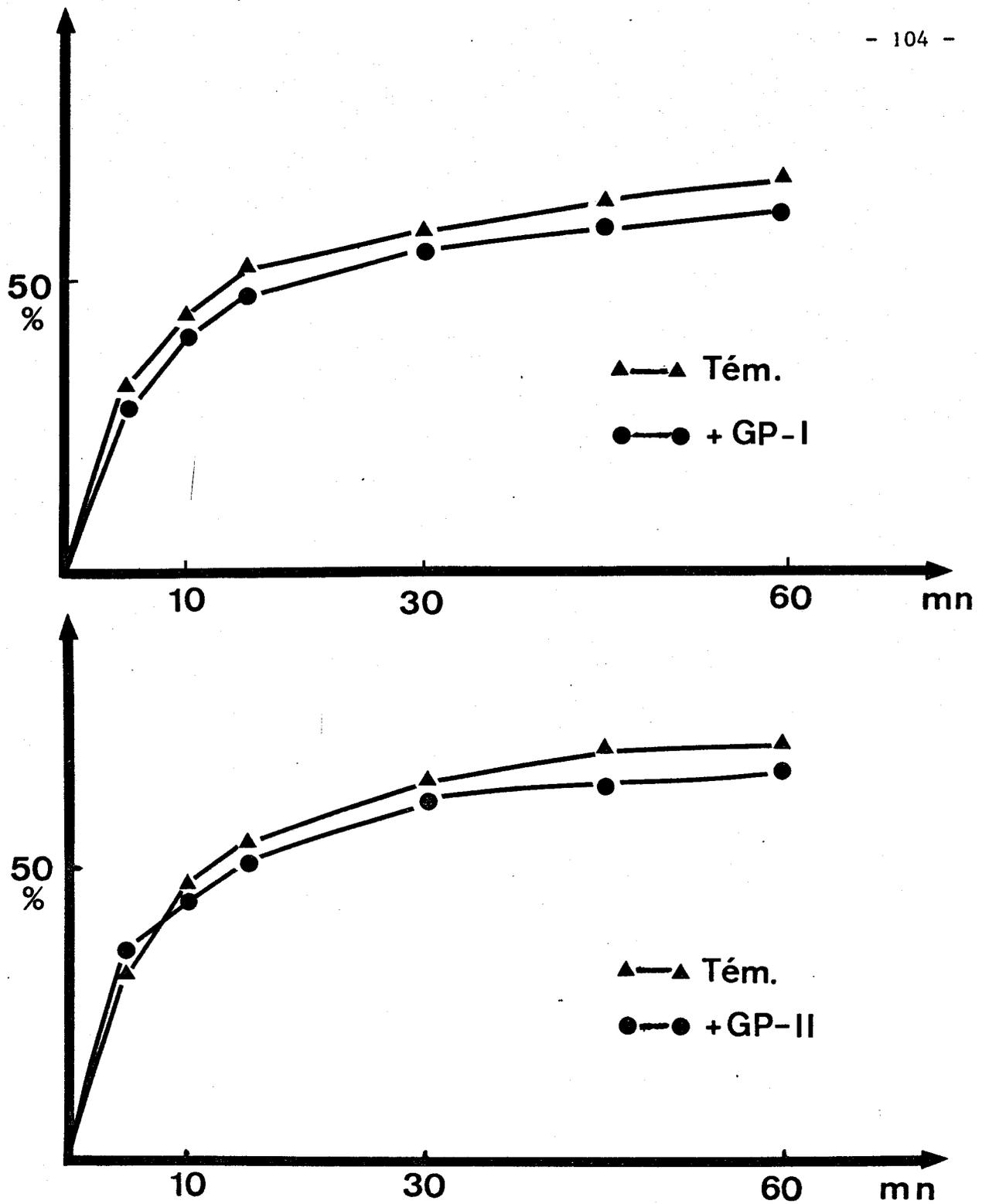


Figure 24 : Incorporation du fer par les réticulocytes de lapin en présence des glycopeptides pronasiques de la STF de lapin (concentration en glycopeptide=0,4mM)



7 . Discussion

D'après les résultats que nous avons observé, il semble donc que l'inhibition que nous avons constaté soit bien due au glycanne de la STF

Ce n'est pas non plus la présence de l'acide sialique qui influe sur le transfert du fer, soit par abaissement du pH, soit par un rôle de chélation du fer.

Contrairement à l'hypothèse de départ (voir Fig.6 p.30), il semble que la présence de glycanne dans le milieu d'incubation n'empêche pas la fixation de la STF sur son récepteur membranaire, mais plutôt le passage du fer de la STF vers l'intérieur du réticulocyte. L'inhibition ne serait donc pas due à un phénomène de saturation des sites récepteurs de la STF par le glycanne.

Nos résultats infirment les conclusions de KORNFELD (256). En effet, cet auteur ne décelait aucune inhibition du transfert du fer de la STF humaine aux réticulocytes de lapin en présence des glycopeptides de la STF humaine. Ce résultat s'explique vraisemblablement par le fait que les concentrations de glycopeptides utilisées par les auteurs n'excédaient pas 70 M excès.

C - REACTION D'INHIBITION DE L'INTERACTION STF-RETICULOCYTE PAR LE GLYCOPEPTIDE TRYPSIQUE DE LA STF DE LAPIN

Nous avons déjà vu dans le paragraphe précédent que la nature de l'acide aminé des glycopeptides pronasiques n'influe pas sur l'inhibition du transfert du fer. Cependant, l'allongement

de la chaîne peptidique de la STF de lapin pouvait apporter des renseignements supplémentaires sur l'influence respective de la partie glucidique et peptidique sur cette inhibition.

1 . Cinétique d'incorporation du fer de la STF de lapin par les réticulocytes de lapin, en présence du glycopeptide tryptique de la STF de lapin

Nous avons utilisé le glycopeptide tryptique majeur, GPT-II, dont la séquence peptidique est donnée p. 86, à une concentration fixe de 200 M excès (soit 0,4 mM). Les résultats sont exposés dans la Fig. 25 p. 107. Nous pouvons constater que, comme dans le cas du glycopeptide pronasique de la STF de lapin, la diminution de l'incorporation du fer, n'excède pas 5 à 10 p.100 par rapport au témoin sans glycopeptide, et les vitesses sont identiques.

2 . Discussion

L'allongement de deux acides aminés de la chaîne peptidique du glycopeptide tryptique par rapport au glycopeptide pronasique, n'augmente donc pas l'inhibition de l'incorporation du fer. Ceci n'est cependant pas suffisant pour conclure que la partie peptidique ne joue aucun rôle dans le transfert du fer. En effet, nous ne pouvons pas écarter la possibilité que la présence d'une partie peptidique plus importante aurait comme conséquence une inhibition plus marquée.

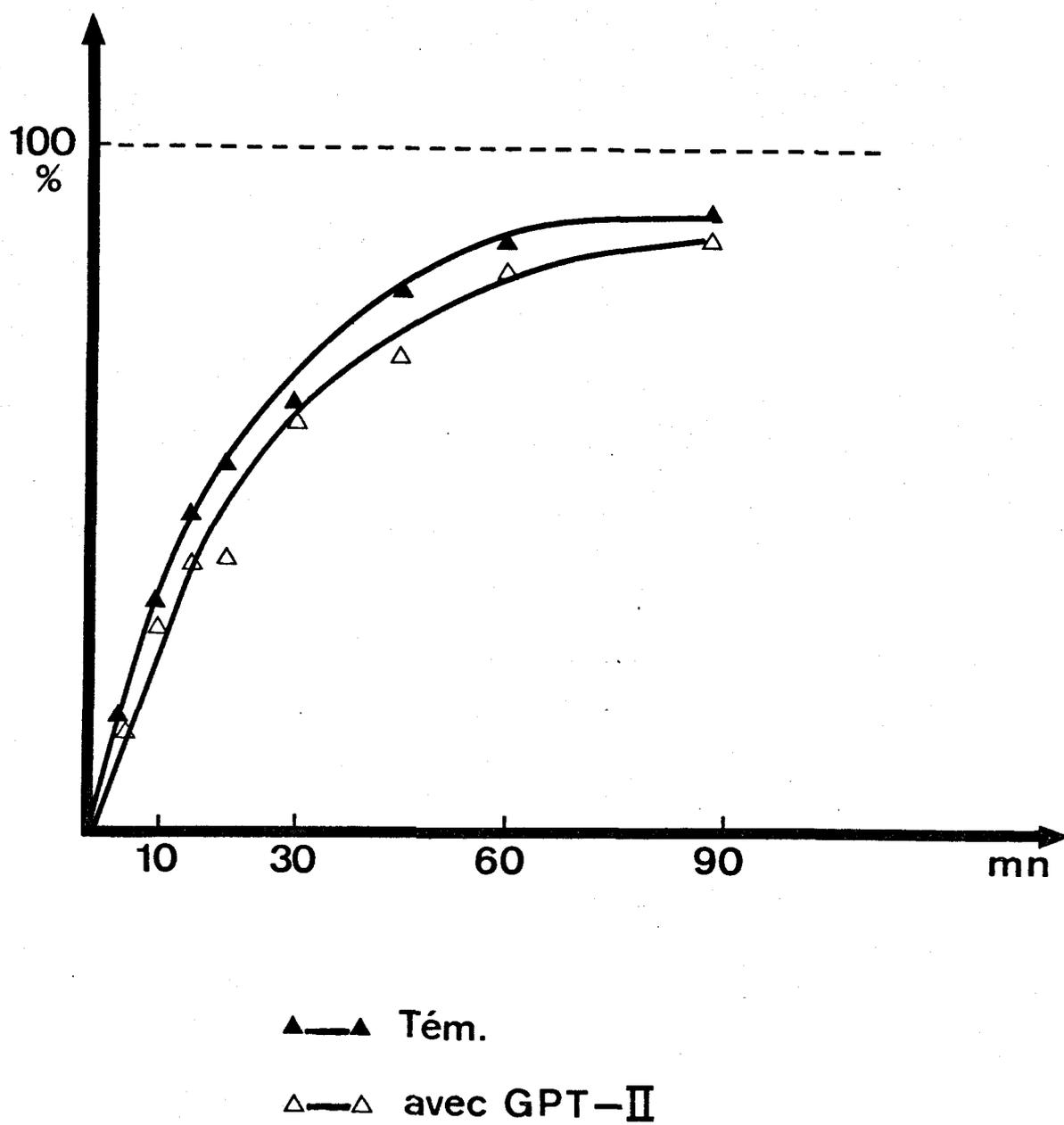


Figure 25 : Incorporation du fer par les réticulocytes de lapin en présence du glycopeptide trypsique GPT-II, de la STF de lapin (concentration en glycopeptide 0,4 mM).

D - REACTION D'INHIBITION DE L'INTERACTION STF-RETICULOCYTE PAR
D'AUTRES GLYCOPEPTIDES QUE CEUX DE LA STF.

Nous avons essayé d'inhiber l'incorporation du fer de la STF de lapin par les réticulocytes, par préincubation avec des glycopeptides de structures différentes de celle de la STF, de manière à vérifier si l'inhibition observée précédemment est spécifique ou non.

1 . Incorporation du fer en présence de glycopeptides
oligomannosidiques

Nous avons utilisé un glycopeptide tryptique de la lactotransferrine bovine, de nature oligomannosidique, renfermant 8 résidus de mannose, 2 de N-acétyl glucosamine et 4 acides aminés.

Les résultats exposés dans la Fig.²⁶ p.109, ne montrent pas d'inhibition de l'incorporation du fer en présence de ce type de glycanne, la fixation de la STF sur les cellules n'étant pas non plus affectée.

2 . Discussion

Il semble donc bien d'après ces résultats que la structure glucidique du glycopeptide soit déterminante lors de l'inhibition de l'incorporation du fer par le réticulocyte. En effet, les glycopeptides de la STF et les glycopeptides tryptiques de la lactotransferrine bovine, possèdent une masse moléculaire voisine, de 2,200 environ, mais le glycanne inhibiteur, celui de la STF, possède une structure de type

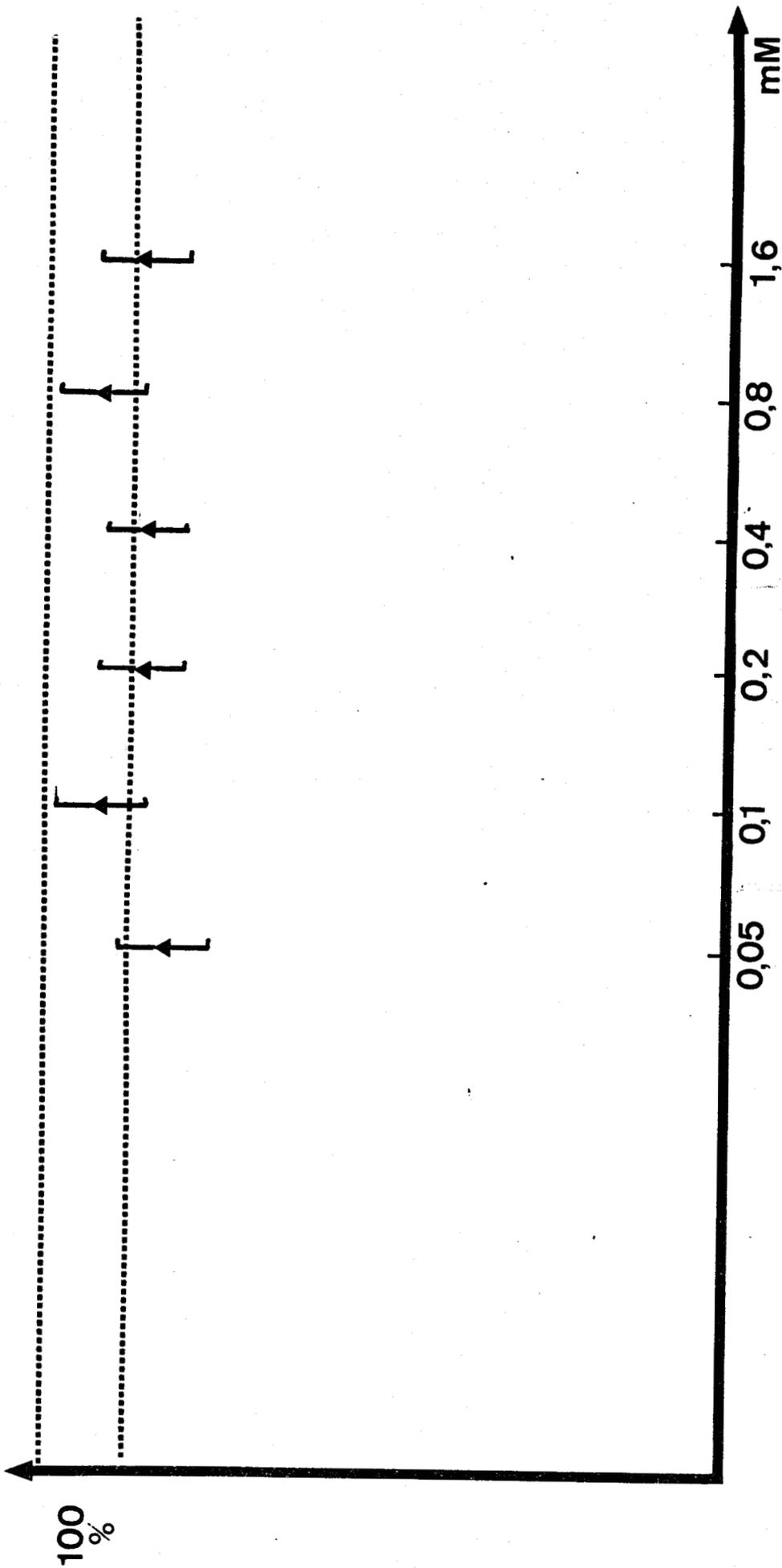


Figure 26 : Expériences d'inhibition du transfert du fer par un glycopeptide de nature oligomannosidique, isolé de la LTF bovine.



N-acétyllactosaminique, tandis que le glycanne de la LTF bovine, qui n'a pas d'action inhibitrice, est de nature oligomannosidique.

E - CONCLUSIONS

Nous avons mis en évidence une inhibition de l'incorporation du fer de la STF de lapin par le réticulocyte de lapin, en présence de concentrations de glycopeptides de la STF (à partir de 0,5 mM).

La présence d'acide sialique dans le glycopeptide n'est pas indispensable pour cette inhibition. En effet, les résultats sont identiques lorsqu'on utilise des glycopeptides bisialylés, momosialylés ou asialylés.

Ce phénomène semble être spécifique du glycopeptide de la STF en tant qu'entité moléculaire. En effet, ni les glycopeptides de type oligomannosidique, ni un mélange des monosaccharides libres présents dans les mêmes rapports que dans le glycanne de la STF ne sont pas capables de produire une inhibition du transfert du fer.

La partie peptidique, se trouvant immédiatement au voisinage du point d'attache du glycanne ne joue pas un rôle prépondérant dans cette inhibition.

Nous pouvons donc conclure que la partie glycanne de la STF joue un rôle important dans l'interaction STF-réticulocyte, contrairement aux conclusions de KORNFIELD (257).

Cependant, le rôle de la partie glycanne ne serait pas celui que nous avons proposé p.30 . En effet, il ne semble pas

que la fixation de la STF sur son récepteur membranaire soit effectuée par l'intermédiaire du glycanne, car l'inhibition constatée s'effectue uniquement au niveau de la fixation de la STF sur la cellule.

Ainsi, le mécanisme du transfert du fer serait donc constitué de deux processus liés l'un à l'autre ; d'une part la reconnaissance par le récepteur membranaire de la STF, et d'autre part le transfert du fer à la cellule. Le glycanne aurait un rôle fondamental dans ce transfert, soit pour bien positionner la protéine dans l'ensemble de " l'unité " responsable du transfert du fer, soit pour reconnaître directement un composé membranaire auquel la STF céderait son fer.

CONCLUSIONS GENERALES

Les conclusions que nous pouvons tirer de notre étude sur la sérotransferrine de lapin et sur le rôle de la fraction glycanique de cette protéine dans l'interaction sérotransferrine-réticulocyte, sont les suivantes :

1 - La méthode de préparation que nous avons utilisé nous a permis d'isoler la sérotransferrine de lapin dans un état de pureté satisfaisant. Nous avons vérifié en particulier, l'absence d'hémopexine, qui représente le contaminant le plus important des préparations de sérotransferrine. L'hémopexine, renfermant 22 % de glucides constitue, en effet, une source d'erreur considérable lors de l'étude de la fraction glycanique de la sérotransferrine de lapin.

2 - Les études physico-chimiques effectuées sur cette préparation de sérotransferrine de lapin, ont montré qu'elle possède des propriétés très voisines de celles des sérotransferrines des autres espèces de vertébrés. Elle possède, en effet, une masse moléculaire de 75,000 , fixe deux atomes de fer à saturation et renferme une composition en acides aminés et une séquence N-terminale très voisine de celles des autres sérotransferrines.

3 - Les compositions molaires et centésimales en glucides montrent la présence de 2 résidus de Galactose, 3 de Mannose, 4 de

N-acétyl glucosamine et 2 d'acide N-acétyl neuraminique par molécule de sérotransferrine de lapin.

4 - L'étude des glycopeptides pronasiques et tryptiques isolés de la sérotransferrine de lapin, nous a permis d'établir la structure du groupement glycanique de cette glycoprotéine. En effet, les résultats de la perméthylation et de la R.M.N. à 360 MHz démontrent l'identité structurale entre le glycanne de la sérotransferrine de lapin et ceux de la sérotransferrine humaine. En outre, ce résultat nous permet de conclure que la sérotransferrine de lapin ne possède qu'un seul groupement glycanique.

La séquence peptidique au voisinage du point d'attache est la suivante : Asn (CHO)-Ser-Ser-Leu, ce qui l'apparente à la STF bovine qui ne possède qu'un seul glycanne, avec une séquence peptidique identique. Cependant, nous ne pouvons pas formuler des conclusions quant à la position du glycanne sur la chaîne peptidique de la sérotransferrine de lapin.

5 - En ce qui concerne le rôle biologique des groupements glycaniques, nous avons mis en évidence une inhibition de l'incorporation du fer de la sérotransferrine de lapin par le réticulocyte de lapin, en présence des glycopeptides pronasiques de la sérotransferrine à concentrations supérieures de 0,3 mM.

6 - L'acide sialique et la partie peptidique des glycopeptides de la sérotransferrine utilisés ne semblent pas jouer aucun rôle dans cette inhibition.

7 - La présence d'un groupement glycanique de type oligomannosidique jusqu'à des concentrations de 1,6 mM, n'inhibe pas le transfert du fer de la sérotransferrine aux réticulocytes.

8 - L'ensemble des résultats que nous venons d'exposer, nous permettent de modifier notre hypothèse de travail. En effet, le rôle de la partie glycanique de la sérotransferrine, ne serait plus celui de reconnaître le récepteur membranaire, rôle qui serait plutôt réservé à la partie protéique, mais serait de bien positionner la sérotransferrine dans le complexe membranaire responsable du transfert du fer.

Les perspectives qui s'ouvrent maintenant pour éclaircir ce mécanisme de fixation de la sérotransferrine et transfert du fer sont très larges. En effet, nous avons fait

que parcourir les premières étapes dans la connaissance intime du rôle du glycanne dans l'interaction sérotransferrine-réticulocyte. La preuve directe de l'intervention du glycanne dans le mécanisme du transfert du fer ne sera apportée qu'avec une sérotransferrine totalement débarrassée de sa partie glucidique, Ceci ne pourra se faire que par l'action d'endoglycosidases, capables de libérer le glycanne tout en ne modifiant pas la conformation de la molécule,

BIBLIOGRAPHIE

- AASA R., AISEN P., J. Biol. Chem., 1968, 243, 2399-2404,
(88, 90)
- AASA R., MALMSTROM B.G., SALTMAN P., VANGAARD T., Biochem.
Biophys. Acta., 1963, 75, 203, (82, 91)
- AISEN P., AASA R., MALMSTROM B.G., VANNGARD T., J. Biol. Chem.,
1967, 242, 2484-2490, (86)
- AISEN P., LEIBMAN A., Biochim. Biophys. Acta., 1973, 304, 794 (140)
- AISEN P., LEIBMAN A., SIA C.L., Biochemistry., 1972, 11, 3461 (28,38)
- AWAI M., BROWN E.R., J. Lab. Clin. Med., 1963, 61, 363, (106, 108)
- AWAI M., CHIPMAN B., BROWN E.B., J. Lab. Clin. Med., 1975, 85,
769, (170,183)
- AZARI P., BAUGH R.F., Arch. Biochem. Biophys., 1967, 118, 138
(195, 196, 240)
- BAKER E., MORGAN E.H., J. Cell. Physiol., 1971, 77, 377-384, (124)
- BAKER E., SHAW D.C., MORGAN E.H., Biochemistry., 1968, 7, 1371-1378,
(6, 24, 42, 73, 243)
- BAMBACH M.N., Klin. Wochschr., 1966, 44, 1276, (110)
- BATES G.W., SCHLABACH M.R., FEBS Letters., 1973, 33, 289, (85)
- BELCHER R., NUTTEN A.J., SAMBROOK C.M., Analyst., 1954, 79, 201 (204)
- BENCZE W.L., CHMID K., Anal. Chem., 1957, 29, 1193, (197, 244)
- BERGGÅRD I., Nature., 1960, 187, 776;(112)
- BEZKOROVAINY A., GROHLICH D., Biochem. J., 1971, 123, 125-126, (53)
- BROWN E. B. , Proteins of iron storage and transport in biochemistry
and medicine., Ed. R.R. CRICHTON., 1975, 97-106.,(182, 171)
- CANNON J.C., CHASTEEN N.D., Biochemistry., 1975., 14, 4573, (94)

- CHARET P., C. R. Acad. Sci., 1975, 280 D, 2049-2052 (45,55, 56)
- CHARET P., MONTREUIL J., C. R. Acad. Sci., 1971, 273, 533, (49)
- CHARET P., SPIK G., MONTREUIL J., C. R. Acad. Sci., 1971, 273 D
422, (48)
- CHASTEEN N.D., WHITE L.K., CAMPBELL R.F., Biochemistry., 1977,
16, 363-368, (96)
- CHERNELCH M., BROWN E.B., Nature., 1970, 226, 356, (176)
- CHERVENKA C.H. Anal. Biochem., 1970, 34 24-29, (192)
- CRESTFIELD A.M., MOORE S., STEIN W.H., J. Biol. Chem., 1963,
238, 522, (198, 213)
- DORLAND L., HAVERKAMP J., SCHUT B.L., Vliegenthart J.F.G.,
SPIK G., STRECKER G., FOURNET B., MONTREUIL J., FEBS Letters.?
1977, 77, 15-20, (61, 63, 230, 246, 249)
- DORLAND L., HAVERKAMP J., Vliegenthart J.F.G., STRECKER G.,
MICHALSKI J.C., FOURNET B., SPIK G., MONTREUIL.,
Eur. J. Biochem., 1978, 87, 323-329, (231,247)
- DREYWOOD R., Ind. Eng. Chem. Anal. (Ed)., 1946, 18, 499, (201)
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F.,
Anal. Chem., 1956, 28, 350, (214, 215, 229)
- EDWARDS S.A., FIELDING J., Brit. J. Haematol., 1971, 20, 405, (144)
- EFREMOV G.D., SMITH L.L., BARTON B.P., HUISMAN T.H.J., Anim.
Blood. Grps. Biochem. Genet., 1971, 2, 159, (12)
- EGYED A., Biochem. Biophys. Acta., 1973, 304, 805, (139)
- EGYED A., in "Proteins of iron metabolism", Ed. E.D. Brown,
P.Aisen, J.Fielding et R.R.Crichton., 1977, 237-244, (155)
- ELSON L.A., MORGAN W.T.J., Biochem. J., 1933, 27, 1824, (203)
- EWERBECQ H., Klin. Wochschr., 1950, 28, 692, (113)

- FIELDING J., SPEYER B.E., *Biochem. Biophys. Acta.*, 1974, 363, 387-396, (145, 156)
- FIELDING J., SPEYER B.E., in "Proteins of iron metabolism". Ed. E.B. Brown, P.Aisen, J. Fielding, R.R. Crichton., 1977, 311-318, (157)
- FLETCHER J., *Clin. Sci.*, 1969, 37, 273-297, (175)
- FLETCHER J., HUEHNS E.R., *Nature.*, 1968, 218, 1211-1214, (174)
- FORTH W., RUMMEL W., *Physiol. Rev.*, 1973, 53, 724-792, (161)
- FOURNET B., *Thèse Doct. ès Sci.*, Lille., 1973 (209, 226)
- FREEMAN T., in " Proteins of the biological fluids "., 8^e Colloque de Bruges., 1960., Elsevier ed., 1961, 213 (115)
- GARDINER M., MORGAN E., *Aust. J. Exp. Biol. & Med. Sci.*, 1974, 52, 723, (164)
- GITLIN D., JANEWAY C.A., FARR., L.E., *J. Clin. Investig.*, 1956, 35, 44, (107)
- GLASS J., NUNEZ M.T., ROBINSON S.H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, 75, 226-232, (150)
- GRABAR P., WILLIAMS C.A., *Biochem. Biophys. Acta.*, 1955, 17, 65, (188)
- GRAHAM I., WILLIAMS J., *Biochem. J.*, 1975, 145, 263-279, (39, 46, 50, 65, 69, 72)
- GREENE F.C., FEENEY R.F., *Biochemistry.*, 1968, 7, 1366 (20)
- GROHLICH D., MORLEY C.G.D., MILLER R.J., BEZKOROVAINY A., in " Proteins of iron metabolism " Ed. E.B. Brown, P.Aisen, J. Fielding, R.R. Crichton., 1977, 335-340, (166)
- GUERIN , VREEMAN H.J., NGUYEN T.C., *Eur. J. Biochem.*, 1976. 433-445, (26, 47)

- HAKOMORI S.I., J, Biochem., 1964, 55, 205-208, (227)
- HAN K.K., PLANCHON B., DAUTREVAUX M., BISERTE G., Ann. Pharmacéu-
tiques Fr., 1973, 31, 539-550, (220)
- HANKS J.H., WALLACE R.E., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1949,
71, 196, (233, 235, 237, 238)
- HANSON L.A., Experientia., 1959., 15, 473, (114)
- HARRIS D.C., Biochemistry., 1977, 16, 560-564, (97)
- HARRIS D.C., AISEN P., Nature., 1975, 257, 821-823, (179)
- HARRIS D.C., AISEN P., Biochemistry., 1975., 14, 262-268, (178,180)
- HARTLEY R.S., Biochem. J., 1970., 119, 805-822, (217,219)
- HATTON M.W.C., REGOECZI E., KAUR H., Can.J. Biochem., 1978, 56,
339-344 (66, 70)
- HATTON M.W.C., REGOECZI E., WONG K.-L., KRAAY G.J., Biochem. Genet.,
1977, 15, 621-640 (8,9,10,239)
- HEIDE K., HAUPT H., STÖRIKO K., SCHULTZE H.E., Clin. Chim. Acta,
1964, 10, 460 (3)
- HEMPLARDH D., MORGAN E.H., Biochim. Biophys. Acta, 1976, 426,
385-398 (130, 134, 149)
- HIRS C.H.W., MOORE S., STEIN W.A., J. Biol. Chem., 1956, 221, 151 (212)
- HRKAL Z., MULLER-EBERHARD U., Biochemistry, 1971, 10, 1746 (14)
- HUEBERS H., HUEBERS E., CRICHTON R.R., FEBS-Lett., 1974, 44, 302 (159)
- HUDSON B.G., OHNO M., BROCKWAY W.J., CASTELLINO F.J., Biochemistry,
1973, 12, 1047-1053 (16,24,34,36,39,48,49,50,53,54,55,58,59,64,
131,134,137)
- HUNTER W.M., GREENWOOD F.C., Nature, 1962, 194, 1495 (234)
- JAGER B.V., J. Clin. Invest., 1949, 4, 792 (109)
- JANDL J.H., INMAN J.K., SIMMONS R.L., ALLEN D.W., J. Clin. Invest.,
1959, 38, 161-185 (1,118,119,120,121,125,252)

- JARRIT P.H., *Biochem. Biophys. Acta.*, 1976, 453, 332-343, (101)
- JEPPSON J.O., *Biochem. Biophys. Acta.*, 1967, 140, 477, (52)
- JOLLES J., CHARET P., JOLLES P., MONTREUIL J., *FEBS Letters.*,
1974, 46, 276-280, (57)
- KAILIS S.G., MORGAN E.H., *Biochem. Biophys. Acta.*, 1977, 464, 389-398, (154)
- KATZ J.H., *J. Clin. Investtig.*, 1961, 40, 2143, (105)
- KERCKAERT J.P., *Anal. Biochem.*, 1978, 84, 354-360, (190)
- KORNFELD S., *Biochemistry.*, 1968, 7, 945-954, (123, 126, 128, 129, 255,
256, 257)
- KRYSTEVA M.A., MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J., *FEBS Letters.*,
1975, 56, 337-340, (93)
- KRYSTEVA M.A., MAZURIER J., SPIK G., *Biochem. Biophys. Acta.*, 1976,
453, 484-493, (103)
- LANE R.S., in " Structure and function of plasma proteins ". Vol. 2.,
(Ed. A.C. Allison)., 1976, 53-78, (117)
- LAURELL C.B., *Acta Physiol. Scand.*, 1947, 14, suppl.46, (80)
- LAURELL A.B., *Vox Sanguinis.*, 1957, 2, 312, (187)
- LAURELL C.B., MORGAN E.H., *Acta Physiol. Scand.*, 1964, 62, 271-279, (172)
- LEGER D., VERBERT A., LOUCHEUX M.H., SPIK G., *Ann. Biol. Anim. Bioch.
Biophys.*, 1977, 17, (5-A), 737-747, (19)
- LEIBMAN A., AISEN P., *Biochemistry.*, 1977, 16, 1268-1272, (131, 132, 138)
- LIGHT N.D., *Biochem. Biophys. Acta.*, 1977, 495, 46-57, (137)
- LOH T.T., YEUNG Y.G., YEUNG D., *Biochem. Biophys. Acta.*, 1977, 471,
118-124, (151)
- LOWRY O.H., ROSSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J., *J. Biol. Chem.*,
1951, 193, 265, (236)
- LYNCH S.R., LIPSCHITZ D.A., BOTHWELL T.H., CHARLTON R.W., in " Iron
in Biochemistry and Medicine " (Ed. Jacobs A. et M. Worwood).,
1974, 564-589, (168)

- MACGILLIVRAY R.T.A., BREW K., *Science.*, 1975, 190, 1306-1307, (59)
- MACGILLIVRAY R.T.A., MENDEZ E., BREW K., in " Proteins of iron metabolism " (Ed. E.B. Brown ; P. Aisen ; J. Fielding et R.R. Crichton ; Grune et Stratton publishers., New York., 1977, 133-141, (58)
- MAKEY D.G., SEAL U.S., *Biochem. Biophys. Acta.*, 1976, 453, 250-256, (102)
- MANN K.G., FISH W.W., COX A.CH., TANFORD CH., *Biochemistry.*, 1970, 9, n° 6, 1348-1354, (17, 32)
- MARTINEZ-MEDELLIN J., SCHULMAN H.M., *B. B. A.*, 1972, 264, 272-284, (7, 148, 185, 186)
- MARTINEZ-MEDELLIN J., SCHULMAN H.M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, 53, 32, (141)
- MAZUR A., CARLETON A., *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 1817, (153)
- MAZUR A., CARLETON A., *Blood.*, 1965, 26, 317, (167)
- MAZUR A., GREEN S., CARLETON A., *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 595, (152, 162, 163)
- MAZURIER J., LHOSTE J., SPIK G., MONTREUIL J., *FEBS Lett.*, 1977, 81, 371-375, (95)
- MONSIGNY ., ADAM-CHOSSON., MONTREUIL J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1968, 50, 857, (211)
- MONTGOMERY R., WU Y.C., *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 3547, (216)
- MONTREUIL J., SPIK G., " Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux ". *Laboratoire de Chimie Biologique, Fac. Sci., éd., Lille.*, 1963, (207)
- MONTREUIL J., SPIK G., MONSIGNY M., DESCAMPS J., BISERTE G., DAUTREVAUX M., *Experientia.*, 1965, 21, 254, (44)
- MONTREUIL J., VLIEGENTHART J.F.G., *Proc. 4 th. Int. Symp. Glycoconjugates, 19èè, Woods Hole., Acad. Press éd. Nex York, 1978, sous presse.* (232)

- MORGAN E.H., Br. J. Haemat., 1964, 10, 442-452, (122)
- MORGAN E.H., in " Iron in Biochemistry and Medicine " Ed. A. Jacobs et M. Worwood. Academic Press. New York., 1974, 29-71, (116)
- MORGAN E.H., APPLETON T.C., Nature (London)., 1969, 233 1371, (146)
- MORGAN E.H., MARSAGLIA G., GIBLETT E.R., FINCH C.A., J. Lab. Clin. Med., 1967, 69, 370, (127, 254)
- NIAZI S., STATE D., Cancer Research., 1948, 8, 653, (205, 223)
- NUNEZ M.J., GLASS J., ROBINSON S.H., Biochem. Biophys. Acta., 1978, 509, 170-180, (158)
- PALMOUR R.M., SUTTON H.E., Biochemistry., 1971, 10, 4026-4032, (18, 21, 23, 27, 33, 35, 37, 41, 74, 77, 242)
- POLLACK S., LASKY F.D., in " Proteins of iron storage and transport in biochemistry and medicine " . Ed. R.R. Crichton., 1975, 389-394, (160)
- PRICE E.M., GIBSON J.F., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, 46, 646-651, (84)
- PRINCIOTTO J.V., ZAPOLSKI E.J., Nature., 1975, 255, 87-88, (92)
- PRINCIOTTO J.V., ZAPOLSKI E.J., Biochem. Biophys. Acta., 1978, 539, 81-87, (98, 181, 253)
- REDDI K.K., KODICEK E., Biochem. J., 1953, 53, 286, (222, 251)
- RIMIINGTON C., Biochem. J., 1940, 34, 931, (200)
- ROBERTS R.C., MAKEY D.G., SEAL U.S., J. Biol. Chem., 1966, 241, 4907, (29)
- ROOP W.E., PUTNAM F.W., J. Biol. Chem., 1967, 242, 2507-2513, (4, 184)
- SANFORD P.A., CONRAD H.E., Biochemistry., 1966, 5, 1508, (228)
- SCHADE A.L., REINHART R.W., LEVY H., Arch. Biochem., 1949, 20, 170-172, (83, 87)
- SCHEIDEGGER J.J., Inter. Arch. Allergy Appl. Immunol., 1955, 7, 103, (189)

- SCHULMAN H.M., MARTINEZ-MEDELLIN J., SIDLOI R., *Biochem. Biophys. Acta.*, 1974, 343, 529, (143)
- SCHULTZE H.E., HEREMANS J.F., " *Molecular Biology of Human Proteins* " Elsevier., 1966, 1, (104)
- SHIELDS R., BURNETT W., *Anal. Chem.*, 1960, 32, 885, (202)
- SPEYER B.E., FIELDING J., *Biochem. Biophys. Acta.*, 1974, 332, 192-200, (135)
- SPIK G., Thèse Doct. ès Sciences., Lille., 1968, (15, 30, 43, 68, 99, 194)
- SPIK G., *Ann. Nutr. Alim.*, 1971, 25, A-81, (16, 31)
- SPIK G., BAYARD B., FOURNET B., STRECKER G., BOUQUELET S., MONTREUIL J., *FEBS Letters.*, 1975, 50, n° 3, 296-299, (60, 62, 248)
- SPIK G., MONTREUIL J., *C. R. Soc. Biol.*, 1966, 160, 94, (100)
- SULLIVAN A.L., GRASSO J.A., WEINTRAUB L.R., *Blood.*, 1976, 47, 133-143, (147)
- SURGENOR D.M., KOECHLIN B.A., STRONG L.E., *J. Clin. Investig.*, 1949, 28, 73, (76, 79, 81, 193)
- SUTTON M.R., BREW K., *Biochem. J.*, 1974, 139, 163, (54)
- SUTTON H.E., KARP G.W., *Biochem. Biophys. Acta.*, 1965, 107, 153, (2)
- TABONE J., ROBERT D., THOMASEY S., MAMOUNAS N., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1950, 32, 529, (221, 250)
- TILLMANS J., PHILIPPI K., *Biochem. Z.*, 1929, 215, 36, (199)
- VAN BOCKXMEER F., HEMMAPLARDH D., MORGAN E.H., " *Proteins of iron storage and transport in Biochemistry and Medicine* ", Ed. R.R. Crichton . North-Holland publishing Company. Amsterdam., 1975, 111-119, (165, 173)
- VAN BOCKXMEER F.M., MORGAN E.H., *Biochem. Biophys. Acta.*, 1977, 468, 437-450, (136)
- VOSBURGH G., FLEXNEN L., *Am. J. Physiol.*, 1950, 161, 202-211, (169)
- WERNER I., ODIN L., *Acta Soc. Med. Upsaliensis.*, 1952, 57, 230, (206, 224)
- WILLIAMS J., *Biochem. J.*, 1968, 108, 57-67, (51, 67)

- WILLIAMS S.C., WOODWORTH R.C., J. Biol. Chem., 1973, 248, 5848, (142)
- WINDLE J.J., WIERSEMA A.K., CLARK J.R., FEENEY R.E., Biochemistry.,
1963, 2, 1341-1345, (89)
- WOODS K.S., WANGS K.T., Biochem. Biophys. Acta., 1967, 133, 369-370,
(218)
- WOODWORTH R.C., BALIN N.A., " Proteins of iron storage and transport
in Biochemistry and Medecine ". Crichton R.R. Ed. Amsterdam,
North Holland Publishing Co., 1975, 73, (10, 11)
- WOODWORTH R.C., SCHADE A.L., Biochem. Biophys. Acta., 1961, 47, 403, (111)
- YAMASHINA I., MAKINO M., J. Biochem., 1962., 1962, 51, 359, (210)
- YPHANTIS D.A., Biochemistry., 1964, 3, 297-314, (191)
- ZANETTA J.P., BRECKENRIDGE W.C., VINCENDON G., J. Chromatog., 1972,
69, 291-304, (208, 225)
- ZAPOLSKI E.J., GANZ R., PRINCIOTTO J.V., Am. J. Physiol., 1974, 226,
334-339, (177)