

ordre : 876

76
81
41

50378

1981

41

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MEMOIRE

présenté à l'UNIVERSITÉ DE LILLE I

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE 3^{ème} CYCLE

SPÉCIALITÉ BIOCHIMIE

par

Véronique MICHEL

*Exclu du
prêt*



RECHERCHE SUR LA FRACTION GLYCANNIQUE DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN :

- ETUDE CONFORMATIONNELLE.
- ROLE DANS L'INTERACTION SEROTRANSFERRINE-RECEPTEUR RETICULOCYTAIRE.

SCD LILLE 1



D 030 288332 8

Soutenu le 7 janvier 1981, devant la Commission d'Examen

Président	J. MONTREUIL
Rapporteur	G. SPIK
Examineurs	P. DEVAUX
	B. GALLOT

50376
1981
41

50376
1981
41

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MEMOIRE

présenté à l'UNIVERSITÉ DE LILLE I

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE 3^{ème} CYCLE

SPÉCIALITÉ BIOCHIMIE

par

Véronique MICHEL



RECHERCHE SUR LA FRACTION GLYCANNIQUE DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN :

- ETUDE CONFORMATIONNELLE.
- ROLE DANS L'INTERACTION SEROTRANSFERRINE-RECEPTEUR RETICULOCYTAIRE.

Soutenu le 7 janvier 1981, devant la Commission d'Examen

Président	J. MONTREUIL
Rapporteur	G. SPIK
Examineurs	P. DEVAUX
	B. GALLOT

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, Directeur: Professeur
Jean Montreuil), sous la direction du Professeur Geneviève Spik.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	p. 1
GENERALITES	p. 5
METABOLISME GENERAL DU FER	p. 6
STRUCTURE GENERALE DES TRANSFERRINES	p. 11
<u>A - CONFORMATION GÉNÉRALE DES SÉROTRANSFERRINES HUMAINE ET DE LAPIN</u>	
1 - <u>MASSE MOLECULAIRE</u>	p. 12
2 - <u>DIMENSIONS</u>	p. 12
3 - <u>DONNEES CRISTALLOGRAPHIQUES</u>	p. 15
<u>B - ÉTUDE DE LA PARTIE PROTÉIQUE DES SÉROTRANSFERRINES HUMAINE ET DE LAPIN</u>	p. 15
1 - <u>LA SEQUENCE PEPTIDIQUE</u>	p. 15
a) <u>Sérotransferrine humaine</u>	p. 15
b) <u>Sérotransferrine de Lapin</u>	p. 18
2 - <u>DEMONSTRATION DE L'EXISTENCE DE DEUX DOMAINES</u>	p. 18
a) <u>Sérotransferrine humaine</u>	p. 18
b) <u>Sérotransferrine de Lapin</u>	p. 21
<u>C - PARTIE GLYCANNIQUE DES SÉROTRANSFERRINES HUMAINE ET DE LAPIN</u>	p. 22
1 - <u>SEROTRANSFERRINE HUMAINE</u>	p. 22
2 - <u>SEROTRANSFERRINE DE LAPIN</u>	p. 25
<u>D - LES SITES DE FIXATION DU FER</u>	p. 26
1 - <u>SEROTRANSFERRINE HUMAINE</u>	p. 26
a) <u>Généralités</u>	p. 26

b) <u>Différences entre les deux sites</u>	p. 29
2 - <u>SEROTRANSFERRINE DE LAPIN</u>	p. 31
E - <u>CONCLUSIONS</u>	p. 32
LES SITES RECEPTEURS DES TRANSFERRINES	p. 33
<hr/>	
A - <u>LES SITES RÉCEPTEURS DE LA SÉROTRANSFERRINE SUR LES RÉTICULOCYTES</u>	
1 - <u>MISE EN EVIDENCE DU RECEPTEUR</u>	p. 33
2 - <u>ISOLEMENT DU RECEPTEUR</u>	p. 35
a) <u>Historique de la découverte du récepteur</u>	p. 35
b) <u>Analyse des sites récepteurs</u>	p. 36
c) <u>Discussion</u>	p. 40
3 - <u>LES DIFFERENTES HYPOTHESES CONCERNANT LE TRANSPORT DU FER</u>	
a) <u>Hypothèse de Fielding et Speyer</u>	p. 43
b) <u>Hypothèse de l'équipe de Morgan</u>	p. 47
c) <u>Conclusion</u>	p. 48
4 - <u>INTERACTION SEROTRANSFERRINE-RÉTICULOCYTE</u>	p. 49
a) <u>Participation de la sérotransferrine</u>	p. 50
b) <u>Participation du récepteur</u>	p. 52
c) <u>Participation d'autres facteurs</u>	p. 54
d) <u>Conclusion</u>	p. 56
B - <u>LES SITES RÉCEPTEURS DE LA SÉROTRANSFERRINE AU NIVEAU DES</u> <u>AUTRES TISSUS</u>	p. 57
1 - <u>RECEPTEUR INTESTINAL</u>	p. 57
2 - <u>RECEPTEUR HEPATIQUE</u>	p. 59
3 - <u>RECEPTEUR PLACENTAIRE</u>	p. 60

- 4 - RECEPTEURS DE LA SEROTRANSFERRINE SUR LES AUTRES TISSUS p. 62.
5 - HYPOTHESE DE FLETCHER-HUEHNS p. 65

C - LES SITES RECEPTEURS DES AUTRES TRANSFERRINES p. 68

- 1 - LACTOTRANSFERRINE p. 68
2 - OVOTRANSFERRINE p. 69

CONCLUSIONS

p. 70

TRAVAUX PERSONNELS

p. 75

ESSAIS D'INHIBITION DU TRANSFERT DU FER SUR LES RETICULOCYTES
PAR L'UTILISATION DE GLYCOPEPTIDES ET D'OLIGOSACCHARIDES

p. 76

A - INTRODUCTION

p. 76

B - MATÉRIEL ET MÉTHODES

p. 77

- 1 - PREPARATION DES RETICULOCYTES p. 77
2 - PREPARATION DE LA SEROTRANSFERRINE p. 78
a) Isolement p. 78
b) Marquage de la sérotransferrine au ⁵⁹Fe p. 78
3 - PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES ET OLIGOSACCHARIDES p. 80
4 - INCUBATION DES RETICULOCYTES AVEC LES TRANSFERRINES,
EN PRESENCE D'INHIBITEURS p. 81
a) Matériel p. 81
b) Méthode p. 82

C - RÉSULTATS ET DISCUSSION

p. 83

- 1 - PREPARATION DES RETICULOCYTES

p. 83

2 - <u>INCORPORATION DU FER PAR LES CELLULES EN PRESENCE</u> <u>D'OLIGOSACCHARIDES ET DE GLYCOPEPTIDES</u>	p. 83
<u>D - CONCLUSIONS</u>	p. 88
DEGLYCOSYLATION CHIMIQUE ET ENZYMATIQUE DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN	p. 91
<u>A - INTRODUCTION</u>	p. 91
<u>B - MATÉRIEL ET MÉTHODES</u>	p. 94
1 - <u>HYDROLYSE PAR HF</u>	p. 94
a) <u>Conditions d'hydrolyse</u>	p. 94
b) <u>Isolement du produit d'hydrolyse</u>	p. 96
2 - <u>HYDROLYSE PAR L'ENDOGLYCOSIDASE B</u>	p. 97
a) <u>Désialylation</u>	p. 97
b) <u>Déglycosylation</u>	p. 97
c) <u>Isolement des produits d'hydrolyse</u>	p. 98
3 - <u>ETUDE DES PRODUITS D'HYDROLYSE</u>	p. 99
a) <u>Electrophorèse en gel de polyacrylamide en plaque</u> <u>en présence de SDS</u>	p. 99
b) <u>Electrophorèse en gel de polyacrylamide en tubes</u> <u>en présence de SDS</u>	p. 100
c) <u>Electrophorèse en gel de polyacrylamide en plaque</u> <u>sans SDS</u>	p. 101
d) <u>Electrophorèse sur acétate de cellulose</u>	p. 101
e) <u>Immunoélectrophorèse sur gélose</u>	p. 101
f) <u>Séparation des oligosaccharides par chromatographie sur</u> <u>couche mince</u>	p. 102
g) <u>Analyse de la composition molaire en monosaccharides</u>	102

<u>C - RÉSULTATS ET DISCUSSION</u>	p. 103
1 - <u>HYDROLYSE PAR HF DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN</u>	p. 103
a) <u>Traitement de la sérotransferrine par HF à basse température</u>	p. 103
b) <u>Traitement de la sérotransferrine par HF à la température de la pièce</u>	p. 109
c) <u>Discussion</u>	p. 109
2 - <u>HYDROLYSE DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN PAR L'ENDO-N-ACETYL-β-D-GLUCOSAMINIDASE B</u>	p. 113
a) <u>Désialylation</u>	p. 113
b) <u>Analyse du produit d'hydrolyse</u>	p. 113
c) <u>Déglycosylation par l'endo-N-acétyl-β-D-glucosaminidase B et isolement des divers produits d'hydrolyse</u>	p. 114
d) <u>Analyse des divers produits d'hydrolyse</u>	p. 120
e) <u>Conclusion</u>	p. 127
3 - <u>INCORPORATION DU FER DANS LES RETICULOCYTES PAR LA SEROTRANSFERRINE DEGLYCOSYLEE</u>	p. 128
 <u>D - CONCLUSION</u>	 p. 130

ETUDE DE LA MOBILITE DES GLYCANNES BI- ET TRI-ANTENNES DE TYPE N-ACETYLLACTOSAMINIQUE, PAR RESONNANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE

<u>A - INTRODUCTION</u>	p. 132
 <u>B - MATÉRIEL ET MÉTHODES</u>	 p. 137
1 - <u>PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES</u>	p. 137
2 - <u>MARQUAGE DES GLYCOPEPTIDES SIALYLES</u>	p. 137
3 - <u>DETERMINATION DU TAUX DE MARQUAGE</u>	p. 139
4 - <u>INTERACTION AVEC LA CONCANAVALINE A</u>	p. 140
5 - <u>EXPERIENCES DE R.P.E.</u>	p. 140

C - <u>RÉSULTATS</u>	p. 141
1 - <u>MARQUAGE ET ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES MARQUES</u>	p. 141
2 - <u>MOBILITE ROTATIONNELLE DES GLYCOPEPTIDES MARQUES</u>	p. 144
3 - <u>INTERACTIONS SPIN-SPIN DANS LES GLYCANNES BI- ET TRI- ANTENNES</u>	p. 144
4 - <u>EFFET DES BASSES TEMPERATURES</u>	p. 148
5 - <u>MODIFICATION DU MOUVEMENT DUE A L'INTERACTION AVEC LA CONCANAVALINE A</u>	p. 148
D - <u>DISCUSSION</u>	p. 150
E - <u>CONCLUSION</u>	p. 152
CONCLUSIONS GENERALES	p. 155
BIBLIOGRAPHIE	p. 160

I N T R O D U C T I O N

INTRODUCTION

Nos travaux s'incrivent dans le cadre de ceux entrepris depuis longtemps, au Laboratoire, sur l'étude des transferrines.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle du glycanne de la sérotransferrine de lapin.

En 1974, Spik et al., ont déterminé la structure des glycanes de la sérotransferrine humaine. Puis des travaux ont été entrepris, au Laboratoire, afin d'étudier l'interaction spécifique entre la sérotransferrine et le réticulocyte. Mais, comme il est plus facile de se procurer des cellules de lapin, que des cellules humaines, Léger et al., en 1978, afin de travailler sur un système homologue, ont isolé la sérotransferrine de lapin et ont déterminé la structure de son glycanne. Tordera en 1978, a ensuite commencé une série d'étude sur le rôle du glycanne de la sérotransferrine de lapin dans l'interaction entre la glycoprotéine et le réticulocyte.

C'est alors que nous sommes entrés au Laboratoire et avons, tout d'abord, poursuivi les travaux entrepris par Tordera, concernant l'étude de glycopeptides et d'oligosaccharides en tant qu'inhibiteurs du transfert du fer dans la cellule. Puis, nous avons déglycosylé la sérotransferrine de lapin par voie chimique et enzymatique afin d'en étudier les nouvelles propriétés. Enfin, nous avons entrepris une étude de la flexibilité des glycanes par R.P.E. après fixation d'un marqueur de spin sur les résidus d'acide sialique terminaux de glycopeptides bi- et tri-antennés de type N-acétyllactosaminique.

Ce mémoire comporte principalement deux parties :

- le chapitre des généralités fournit quelques données récentes, sur la structure des sérotransferrines, mais aussi sur leur interaction avec les récepteurs membranaires.

- le chapitre des travaux personnels décrit les quelques résultats que nous avons obtenus au cours des études dont nous venons de tracer les grandes lignes.

Ce travail a fait l'objet des communications et publications suivantes :

COMMUNICATIONS

- Michel, V., Léger, D. et Spik G.

Importance du glycanne de la sérotransferrine de lapin dans son interaction avec les réticulocytes de lapin

Forum des Jeunes de la Société de Chimie Biologique. Orléans, 12-14 septembre 1979

- Léger, D., Michel, V., Bouquelet, S., Montreuil, J. et Spik G.

Etude de l'interaction de la sérotransferrine de lapin avec les réticulocytes de lapin

Congrès d'Automne de la Société de Chimie Biologique. Villeneuve d'Ascq, 22-24 septembre 1980

- Davoust, J., Michel, V., Spik, G., Montreuil, J. et Devaux, P.

Etude comparative par résonnance paramagnétique électronique (R.P.E.) de la flexibilité du glycanne de type N-acétyllactosaminique bi- et tri-antennés.

Congrès d'Automne de la Société de Chimie Biologique. Villeneuve d'Ascq, 22-24 septembre 1980

PUBLICATION

- Davoust, J., Michel, V., Spik, G., Montreuil, J. et Devaux, P.

Flexibility of bi- and tri-antennary glycopeptides of N-acetyllactosaminic type. A comparative spin label study.

Manuscript à soumettre à FEBS-Letters.

GENERALITES

METABOLISME GENERAL DU FER

Le fer est un élément essentiel puisqu'il permet le transport de l'oxygène et des électrons : il intervient notamment dans le processus de la respiration.

Le corps humain renferme 35 à 50 mg de fer par kg, réparti en trois compartiments :

1 - Les formes actives, qui contiennent 75 % du fer total de l'organisme. Il s'agit principalement du métal complexé à l'hème dans toutes les protéines héminiques telles que l'hémoglobine, la myoglobine, les cytochromes, etc.... D'autre part, certains enzymes de nature non héminique, utilisent également le fer en tant que cofacteur.

2 - Les formes de réserve qui renferment 25 % du fer, sont constituées du métal complexé à deux protéines : la ferritine et l'hémosidérine, et stocké essentiellement dans le réticulum endothélial (c'est-à-dire dans des cellules du foie, de la rate et de la moëlle osseuse) et dans le parenchyme hépatique.

3 - Les formes de transport, qui représentent seulement 0,1 % du fer total mais qui jouent un rôle clé puisqu'elles permettent la répartition du métal entre les formes actives et les formes de réserve. Il s'agit du fer complexé aux transferrines.

En effet, le métabolisme du fer est caractérisé par un échange très faible avec l'extérieur, ce qui implique une réutilisation du métal interne et, par conséquent, l'existence d'un système de transport et de régulation. Or, dans les conditions physiologiques de pH et de pression

en oxygène, le fer libre précipite sous forme d'hydroxyde ferrique. Mais les transferrines sont capables de fixer le métal sous sa forme ferrique et de le maintenir ainsi en solution. Elles peuvent alors transporter le fer dans tout l'organisme et le livrer spécifiquement à diverses cellules.

Le terme de transferrines s'applique à toute une classe de protéines que l'on rencontre chez les Vertébrés, et qui comprend :

- L'ovotransferrine, provenant du blanc d'oeuf des oiseaux et dont l'existence a été soupçonnée dès 1899 par Osborne ; mais ses propriétés de fixation du fer n'ont été reconnues qu'en 1944 par Schade et Caroline.

- La sérotransferrine, dont la présence dans le plasma a été découverte dès 1927 par Barkan ; mais c'est véritablement grâce aux purifications entreprises par Holmberg et Laurell en 1945 et par Schade et Caroline en 1946, qu'a été démontrée l'existence de protéines fixant spécifiquement le fer et dont le rôle physiologique a pu ensuite être déterminé.

- La lactotransferrine, que l'on trouve dans le lait des mammifères et dans d'autres liquides de sécrétion. Elle fut découverte et isolée du lait de femme par Montreuil et Mullet et Montreuil et al., en 1960 ainsi que par Johansson, la même année.

Ces trois types de transferrines possèdent beaucoup de propriétés communes mais elles présentent aussi bon nombre de différences. Toutes ces caractéristiques ont été souvent décrites dans la littérature (voir la revue générale de Mazurier en 1980) et nous en détaillerons certaines par la suite. Les transferrines jouent, dans le métabolisme du fer, un rôle extrêmement important que Lane en 1976, Hershko en 1977 et Aisen et Brown en 1977 ont étudié en détail dans leurs revues générales. La Fig. 1 p. 8 retrace les grandes lignes de ce métabolisme chez l'Homme et met en évidence le

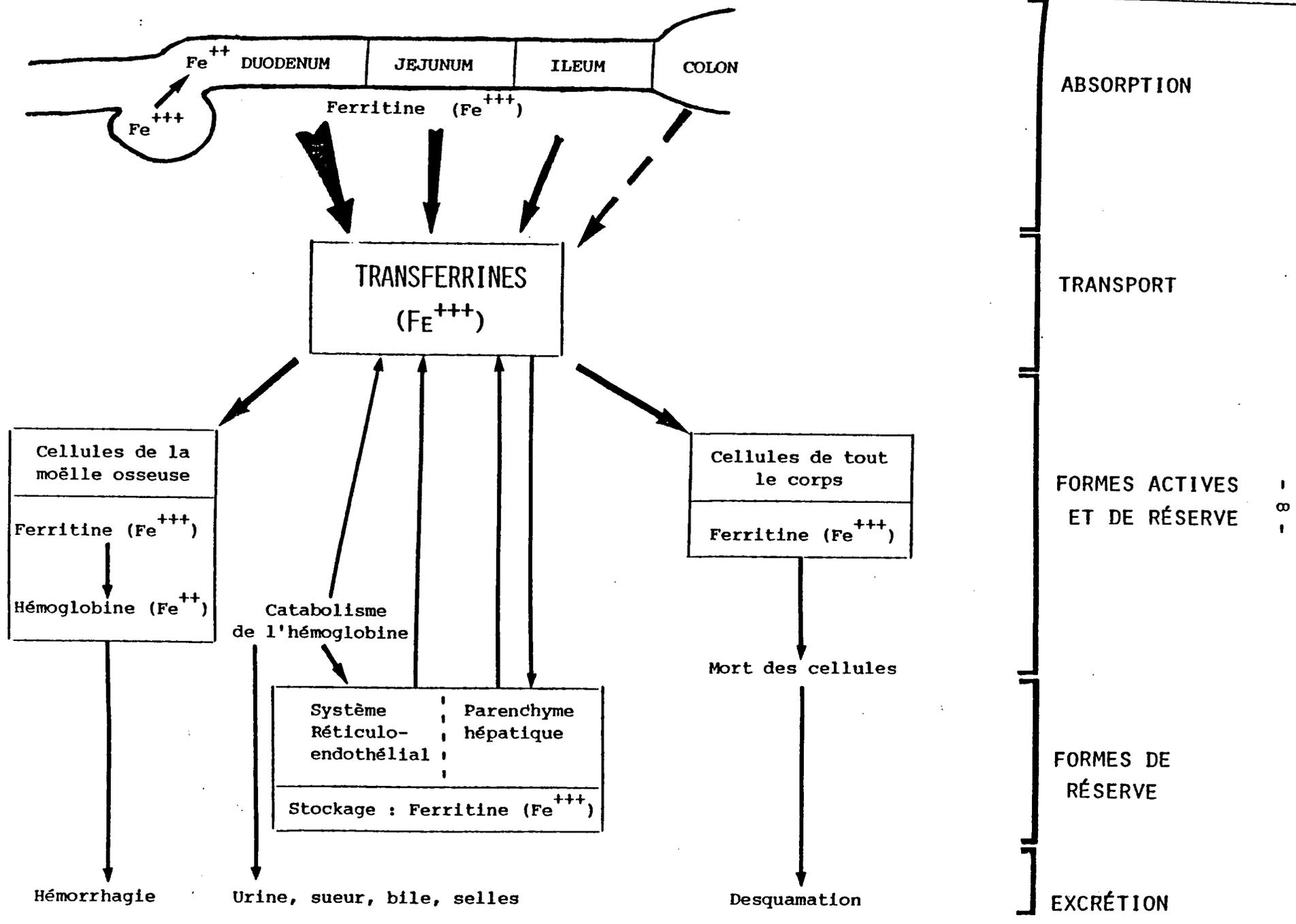


FIGURE 1 : Schéma général du métabolisme du fer chez l'homme selon Von Moore, 1973

rôle central des transferrines : dans l'absorption du fer au niveau du tube digestif, dans les échanges entre les compartiments et dans l'excrétion du métal. Mais, outre ce rôle de régulation et de transport, les transferrines ont également une fonction très importante : en complexant le fer, elles empêchent la multiplication dans l'organisme des agents infectieux pour qui le métal est aussi un facteur indispensable. Cette activité bactériostatique ferriprive est connue depuis les études de Schade et Caroline en 1944 et elle a été décrite dans de nombreuses revues générales, notamment dans celles de Weinberg en 1978 et de Sussman en 1974. Elle s'avère, en fait, être le fruit de plusieurs mécanismes reliés à l'existence des transferrines qui concourent tous à la destruction des agents infectieux.

Ainsi, les transferrines transportent le fer à travers tout l'organisme pour le répartir entre les différents tissus. Elles sont donc capables de prélever et de céder le métal à plusieurs types de cellules. Cela implique l'existence de récepteurs spécifiques de ces protéines, situés à la surface des cellules où s'effectue le transfert. Suivant leur origine et le rôle qu'elles assument dans le métabolisme, les transferrines doivent pouvoir reconnaître différents tissus, donc divers types de récepteurs. Et c'est particulièrement dans de telles propriétés biologiques que se distinguent les trois types de transferrines puisque, par exemple, les réticulocytes ne sont reconnus que par la sérotransferrine, alors que les macrophages ne le sont que par la lactotransferrine et que l'ovotransferrine se fixe spécifiquement aux cellules sanguines d'embryon de poulet.

Etant donné l'universalité d'un tel processus d'interaction protéine-récepteur membranaire et l'attrait que peut présenter l'étude de l'un d'entre eux comme modèle, cela explique l'intérêt actuellement porté, au sein des investigations globales concernant les transferrines,

à tout ce qui concerne plus particulièrement ses sites récepteurs. Aussi, nous consacrerons ultérieurement un chapitre à ce sujet. Mais il nous paraît préférable, de décrire tout d'abord la structure des transferrines, ce qui permet ensuite de comprendre mieux leurs interactions avec les sites récepteurs.

STRUCTURE GENERALE DES TRANSFERRINES

Il est maintenant bien établi que toutes les transferrines possèdent des propriétés communes :

1 - Ce sont des glycoprotéines monocaténaires de masse moléculaire voisine de 80.000.

2 - Elles fixent réversiblement, en deux sites spécifiques : deux ions Fe^{3+} ; deux ions carbonate ou bicarbonate et développent alors une coloration rose saumon dont le maximum d'absorption se situe à 465 nm.

3 - Elles sont composées de deux domaines structuraux possédant chacun un site métallique.

4 - Elles présentent de nombreuses homologues dans la structure covalente de leur partie polypeptidique.

5 - Elles assurent le transport du fer jusqu'à une cellule cible qu'elles reconnaissent spécifiquement.

6 - Enfin, elles sont douées d'une activité bactériostatique.

Malgré ces nombreuses analogies, les transferrines présentent des propriétés biologiques différentes puisqu'elles sont susceptibles d'apporter leur fer à des cellules spécifiques. Il en est de même en ce qui concerne leurs propriétés structurales et, pour ne prendre qu'un exemple, si toutes les transferrines portent des groupements glycaniques, chaque type de glycoprotéines se différencie par le nombre ou par la structure de leurs chaînes polysaccharidiques.

Nous nous bornerons à décrire la structure générale des sérotransferrines dans la mesure où notre étude concerne seulement cette glycoprotéine.

Et nous nous limiterons à :

- la sérotransferrine humaine, sur laquelle ont porté la majorité des études concernant les sérotransferrines, et qui sert en quelque sorte de modèle.

- la sérotransferrine de lapin, beaucoup moins bien connue, mais qui fait l'objet de notre étude.

A - CONFORMATION GÉNÉRALE DES SÉROTRANSFERRINES HUMAINE ET DE LAPIN

1 - MASSE MOLECULAIRE

L'échelle des masses moléculaires trouvées pour les sérotransferrines de différentes espèces de Vertébrés s'étend de 68.000 à 114.000. Mais les résultats les plus récents s'accordent à donner des masses voisines pour toutes les sérotransferrines. Ces valeurs sont comprises entre 74.000 et 81.000 comme le montre le Tableau I p. 13 .

2 - DIMENSIONS

La sérotransferrine humaine se présente comme un ellipsoïde de révolution dont la conformation semble liée à la fixation du métal. L'étude de la sédimentation, de la diffusion et de la viscosité de la glycoprotéine ont permis de connaître ses paramètres hydrodynamiques. Les valeurs sont reportées dans le Tableau II p. 14 . Elles varient en fonction du degré de saturation des deux sites métalliques de la transferrine, ce qui suggère un changement de conformation lors de la fixation du fer. De telles différences dans les propriétés hydrodynamiques de l'aposérotransferrine et de la transferrine saturée en fer ont pu aussi être mises en évidence grâce à des études par échange de protons (Ulmer, 1969), par modification chimique (Bezkorovainy et al., 1969) et par chromatographie sur échangeur d'ions (Lane , 1971).

TABLEAU I

Masses moléculaires de la sérotransferrine de lapin et de la sérotransferrine humaine

	Masse Moléculaire	Auteurs
Sérotransferrine de Lapin	75.000	Baker <i>et al.</i> , 1968
	76.000	Greene et Feeney, 1968
	74.600	Palmour et Sutton, 1971
	77.000	Hudson <i>et al.</i> , 1973
	75.500	Léger <i>et al.</i> , 1978
Sérotransferrine humaine	73.400 - 75.800	Roberts <i>et al.</i> , 1966
	76.600 - 77.700	Aisen <i>et al.</i> , 1970
	76.600	Mann <i>et al.</i> , 1970
	76.200	Palmour et Sutton, 1971
	76.000	Spik, 1968 et Spik, 1971
	81.000	Mac Gillivray <i>et al.</i> , 1977



TABLEAU II

Dimensions de la sérotransferrine humaine

Nature de la transferrine	Dimension de l'axe a (Å)	Dimension de l'axe b (Å)	Rapport des deux axes a/b	Auteurs
Apo-sérotransferrine	62	24,6	2	Bezkorovainy, (a) 1966
			3	Rosseneu <i>et al.</i> , 1971
Sérotransferrine saturée	55,2	27,6	2	Rosseneu <i>et al.</i> , 1971



3 - DONNEES CRISTALLOGRAPHIQUES

La sérotransferrine de lapin a été cristallisée et les paramètres cristallographiques de la glycoprotéine saturée en fer ont été déterminés par Al Hilal et al., en 1976 puis par Gorinski et al., en 1979. Ces derniers ont, en outre, construit un modèle moléculaire de la sérotransferrine (Figure 2 p. 16) selon lequel la glycoprotéine, qui présente des dimensions de 95 x 60 x 50 Å, apparaît nettement constituée de deux parties de volume égal. Chacun de ces lobes, dont les axes forment entre eux, un angle de 30°, est creusé d'une cavité tournée vers l'axe de symétrie de la molécule. Ce modèle rend parfaitement compte des propriétés des transferrines qui possèdent deux domaines structuraux comportant chacun un site métallique.

B - PARTIE PROTÉIQUE DES SÉROTRANSFERRINES HUMAINE ET DE LAPIN

1 - LA SEQUENCE PEPTIDIQUE

a) Sérotransferrine humaine

La composition en acides aminés de la sérotransferrine humaine a été étudiée depuis longtemps et par de nombreux auteurs. Mais en 1977, Mac Gillivray et al., ont déterminé la séquence de 80 % de la chaîne peptidique. Les résultats sont donnés dans le Tableau III p. 17. La sérotransferrine humaine apparaît donc comme une protéine monocaténaire comportant 673 acides aminés ; si l'on tient compte de la présence des deux groupements glycaniques sur cette chaîne, cela amène la transferrine à une masse moléculaire de 81.000. Les auteurs ont pu remarquer une grande homologie interne de séquence entre les deux parties de la chaîne peptidique, formées de l'enchaînement des résidus 1 à 336 et 337 à 673. Cette observation confirme l'hypothèse, que



MS
L111

Figure 2

Modèle moléculaire de la sérotransferrine de Lapin obtenu
par diffraction des rayons X, avec une résolution de 6 Å
d'après GORINSKI et al., 1979

TABLEAU III



Séquence de la chaîne peptidique de la sérotransferrine humaine d'après MacGillivray et al., 1977

		10		20		30
Line A	Val-Pro-Asp	Lys-Thr-Val-Arg	Trp-Cys-Ala	Val-Ser-Glu	His-Glu-Ala-Thr-Lys	Cys-Gln-Ser-Phe-Arg-Asp-His-Met-Lys-Ser
Line B	Asp-Glu-Cys	Lys-Val-Pro-Lys	Trp-Cys-Ala	Leu-Ser-His	His-Glu-Arg-Leu-Lys	Asn-Glu-Cys-Ser-Asp-Val-Gly-Lys-Ile-Glu
		40		50		60
A	Val-Ile-Pro-Ser-Asp-Gly-Pro-Ser-Val-Ala	Cys-Val	Lys-Lys-Ala-Ser-Tyr-Leu	Asp-Cys-Ile	Arg-Ala-Ile	Ala-Ala-Asn-Glu-Ala-Asp
B		Cys-Val	Ser-Ala-Glu-Thr-Thr-Glu	Asp-Cys-Ile	Ala-Lys-Ile	Met-Asn-Gly-Glu-Ala-Asp
		70		80		90
A	Ala-Val-Thr	Leu-Asp-Ala-Gly	Leu-Val-Tyr	Asp-Ala-Tyr-Leu-Ala-Pro-Asn-Asn	Leu-Lys	Pro-Val-Val-Ala-Glu-Phe-Tyr-Gly-Ser-Lys
B	Ala-Met-Ser	Leu-Asp-Gly-Gly	Phe-Val-Tyr	Ile-Ala-Gly-Lys-Cys-Gly	Leu-Val	Pro-Val-Leu-Ala-Glu-Asn-Tyr-Asn-Lys-Ser
		100		110		120
A	Glu-Asx	Pro-Glx-Thr-Phe-Tyr	Ala-Val-Ala-Val-Val-Lys-Lys	Asx	Ser-Gly-Phe-Glx-Met	Asp-Gln-Leu-Arg-Gly
B	Asp-Asp	Cys-Glu-Gln-Thr-Pro	Ala-Gly-Tyr-Phe	Ala-Val-Ala-Val-Val-Lys-Lys	Ser-Ala	Ser-Asp-Leu-Thr-Trp-Asp-Asn-Leu-Lys-Gly
		130		140		150
A	Lys-Lys-Ser-Cys-His-Thr	Gly-Leu-Gly	Arg-Ser	Ala-Gly-Trp-Asx-Ile-Pro	Leu-Gly-Ile	Leu
B	Lys-Lys-Ser-Cys-His-Thr	Ala-Val-Thr	Arg-Thr	Ala-Gly-Trp-Asn-Ile-Pro	Met-Gly-Leu	Leu-Tyr-Asn-Lys-Ile-Asn-His-Cys-Lys-Phe
		160		170		180
A		CN-2				
B	Glx-Glx-Phe-Phe	CN-10				Leu-Cys-Met-Gly-Ser-Gly-Leu-Asn-Leu-Cys-Glu-Pro
		190		200		210
A		Tyr-Phe-Gly-Tyr	Ser-Gly-Ala-Phe	Lys-Cys-Leu	Lys-Asx-Gly-Ala	Gly-Asp-Val-Ala-Phe-Val-Lys-His-Ser-Thr
B	Asn-Asn-Lys-Glu-Gly	Tyr-Tyr-Gly-Tyr	Thr-Gly-Ala-Phe	Arg-Cys-Leu	Val-Glu-Lys	Gly-Asp-Val-Ala-Phe-Val-Lys-His-Asx-Thr
		220		230		240
A	Ile-Phe-Glx	Leu-Ala-Asx-Asx	Lys	CN-2		Leu-Asx-Glx-Thr-Arg
B	Val-Glx-Glx	Thr, Pro, Gly, Gly	Lys	Asx-Pro-Asx-Pro-Trp	Ala-Lys-Asp-Leu-Asx-Glx-Lys-Tyr-Asx-Glu-Leu-Cys	Leu-Asp-Gly-Thr-Arg
		250		260		270
A	Lys-Pro-Val-Glx	Asx-Tyr-Lys-Asp	Cys-His-Leu-Ala	Glx-Val-Pro-Ser-His	Thr-Val-Val-Ala-Arg	Ser-Met-Gly-Gly-Lys-Glu-Asp-Leu
B	Lys-Pro-Val-Glx	Glu-Tyr-Ala-Asn	Cys-His-Leu-Ala	Arg-Ala-Pro-Asn-His	Ala-Val-Val-Thr-Arg	Lys-Asp-Lys-Glu-Ala-Cys
		280		290		300
A	Ile-Trp-Glu-Leu	Leu-Asn-Gln	Ala-Gln-Glu-His	Phe-Gly	Lys-Asp-Lys-Ser-Lys-Glu-Phe-Gln-Leu	Phe-Ser-Ser-Pro-His-Gly
B	Val-His-Lys-Ile	Leu-Arg-Gln	Gln-Gln-His-Leu	Phe-Gly	Ser-Asn-Val-Thr-Asx-Cys-Ser-Gly-Asx	Phe-Cys-Leu-Phe-Arg-Ser-Glu-Thr
		310		320		330
A	Lys-Asn	Leu-Leu-Phe	Lys-Asp	Ser-Ala-His-Gly-Phe-Leu	Lys-Val-Pro-Pro	Arg-Met-Asn-Ala-Lys-Met-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Glu-Tyr-Val
B	Lys-Asp	Leu-Leu-Phe	Arg-Asp	Asp-Thr-Val-Cys-Leu-Ala	Lys-Leu-His-Asp	Arg-Asn-Thr-Tyr-Glu-Lys-Tyr-Leu-Gly-Gln-Glu-Tyr-Val
		340		350		
A	Thr-Ala	Ile-Arg	Asn-Leu-Arg	Glu	Gly-Thr-Cys-Pro	Glu-Ala-Pro-Thr
B	Lys-Ala	Val-Gly	Asx-Leu-Arg	Lys-Cys-Ser-Thr-Ser-Ser-Leu-Leu	Glu-Ala-Cys	Thr-Phe-Arg-Arg-Pro

Mac Gillivray et al., avaient déjà émise en 1975, de la duplication d'un gène ancestral responsable de la synthèse de la protéine. Une telle hypothèse est d'ailleurs étayée par l'existence, dans les transferrines, de deux sites indépendants de fixation du fer, qui appartiennent à deux domaines protéiques distincts et dont nous reparlerons par la suite.

D'autre part, les taux d'hélicité α et de structure β ont été déterminés pour la sérotransferrine humaine. Ils sont rassemblés dans le Tableau IV p. 19 . Le taux d'hélicité α de la protéine semble très faible et inchangé lors de la fixation du fer. Pourtant, d'après le modèle de Gorinski et al., en 1979, l'une des cavités serait délimitée par une hélice α . Ainsi la présence du métal sur la sérotransferrine ne semble pas induire un profond changement de conformation, même si les dimensions de la glycoprotéine varient en fonction de la saturation en fer des sites.

b) Sérotransferrine de Lapin

Peu d'études ont été réalisées sur cette sérotransferrine si l'on excepte la détermination de la structure tertiaire par Gorinski et al., en 1979.

La composition en acides aminés et la séquence de l'extrémité N-terminale ont été néanmoins étudiées par plusieurs auteurs. Ces données permettent de constater une certaine homologie entre les sérotransferrines humaine et de lapin. Elles sont reportées dans le Tableau V p. 20 .

2 - DEMONSTRATION DE L'EXISTENCE DE DEUX DOMAINES

a) Sérotransferrine humaine

Outre celles que nous avons déjà mentionnées, il y a deux méthodes qui ont permis de mettre en évidence l'existence de deux domaines structuraux bien distincts. Ce sont les coupures enzymatiques et la dénaturation thermique. Par action ménagée de la trypsine, Evans et Williams en 1978, ont réussi à couper

TABLEAU IV

Etude de quelques paramètres concernant la structure secondaire de la sérotransferrine humaine

Nature de la protéine	Taux d'hélicité α en %	Taux de structure β en %	Auteurs
Aposérotransferrine	17-18	-	Nagy <i>et al.</i> , 1972 (1)
	21	-	Tomimatsu <i>et al.</i> , 1972 (2)
	20	40-45	Ventura <i>et al.</i> , 1973 (3)
	17	68	Mazurier <i>et al.</i> , 1976 (4)
Sérotransferrine saturée en fer	17-18	-	(1), (2), (3), (4)



TABLEAU V

A : Composition molaire en acides aminés des sérotransferrines
humaine et de lapin

Acides aminés	Homme (1)	Lapin (2)
Asp	74	72
Thr	28	26
Ser	37	43
Glu	54	66
Pro	36	36
Gly	46	47
Ala	56	53
1/2 Cys	35	34
Val	39	45
Met	8	7
Ileu	13	16
Leu	55	59
Tyr	27	26
Phe	30	25
Trp	7	10
Lys	52	54
His	17	18
Arg	23	26
Total	637	663

B : Séquence de l'extrémité N-terminale des sérotransferrines
humaine et de lapin

Val - Pro - Asp - Lys - Thr Humaine (3) (4)

Val - X - Glu - Lys - Ø - Val Lapin (5)

(1) Spik 1968, Montreuil et al., 1961, Charet 1975

(2) Tordera 1978

(3) Graham et Williams 1975

(4) Mac Gillivray et al., 1977

(5) Tordera 1978



la sérotransferrine humaine en deux ensembles. Les fragments obtenus possèdent des propriétés antigéniques, des compositions en acides aminés, et des cartes peptidiques différentes. Ils sont tous deux porteurs d'un ion Fe^{3+} et l'un d'eux a été identifié à l'extrémité C-terminale, l'autre à l'extrémité N-terminale de la protéine.

Donovan et Ross ont montré, dès 1975, que chaque forme de transferrines apo, monoferrrique sur le site N-terminal et sur le site C-terminal, et diferrrique, possède une température de dénaturation propre. Les domaines semblent structuralement indépendants, puisque la fixation du métal sur l'un des sites, N- ou C-terminaux, ne change pas la température de dénaturation de l'autre site (Donovan et al., 1976).

Ainsi, les deux domaines, qui ne sont pas reliés par des ponts disulfures, semblent être indépendants et structuralement distincts. Nous verrons dans un autre chapitre quel est le rôle fonctionnel de ces deux domaines.

b) Sérotransferrine de Lapin

Esparza et Brock avouent, en 1980 (a), n'avoir jamais pu hydrolyser la sérotransferrine de lapin par action des protéases, alors qu'ils arrivent à couper, dans les mêmes conditions, la sérotransferrine bovine. Pourtant, Léger, en 1979 a pu caractériser, après coupure par la chymotrypsine de la glycoprotéine traitée à l'urée, un fragment renfermant encore un ion Fe^{3+} . Il semble néanmoins plus difficile d'obtenir, à partir de la sérotransferrine de lapin, deux domaines contenant chacun un site de fixation du métal. Cela indique que, suivant la transferrine étudiée, le degré d'indépendance structurale des deux moitiés peut varier. D'ailleurs, Donovan et al., en 1976 ont montré qu'il existe des interactions entre les deux domaines de l'ovotransferrine.

C - PARTIE GLYCANNIQUE DES SÉROTRANSFERRINES HUMAINE ET DE LAPIN

1 - SÉROTRANSFERRINE HUMAINE

Cette glycoprotéine contient essentiellement deux glycanes identiques. Leur structure a été établie par Spik et al., en 1974, Spik et al., en 1975 et définitivement confirmée par Dorland et al., en 1977. Elle est donnée dans la Figure 3 p.23 . Outre ce glycanne biantenné de type N-acétyllactosaminique (Montreuil, 1975), la sérotransferrine humaine peut aussi porter un glycanne de structure triantennée (Spik et al., 1965), mais toujours de type N-acétyllactosaminique.

La conformation des glycanes est encore inconnue. Seules, les études de modèles moléculaires du glycanne biantenné, effectuées par Montreuil en 1975, Montreuil et al., en 1978 et enfin Montreuil et Vliegthart en 1979, ont permis de préciser quelques points :

- le noyau pentasaccharidique du mannotriosidodi-N-acétylchitobiose invariable, est compact. Le trisaccharide β -Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-1 \rightarrow Asn relié au résidu d'asparagine, se trouve dans un plan stabilisé par deux liaisons hydrogène.

- les antennes de sialyl N-acétyllactosamine sont enroulées en hélice.

- le mannose 4 peut adopter deux positions par rapport au plan du trisaccharide. Ainsi deux conformations sont possibles pour le glycanne : en Y ou en T. Warin et al., après une étude par cristallographie en 1979, proposent le modèle en T comme étant le plus probable. Il est représenté dans la Figure 4 p. 23 comparé à celui en Y.

Depuis les études de Spik et al., en 1965, on sait que les glycanes de la sérotransferrine humaine sont liés à la protéine par une liaison

805
LIFE

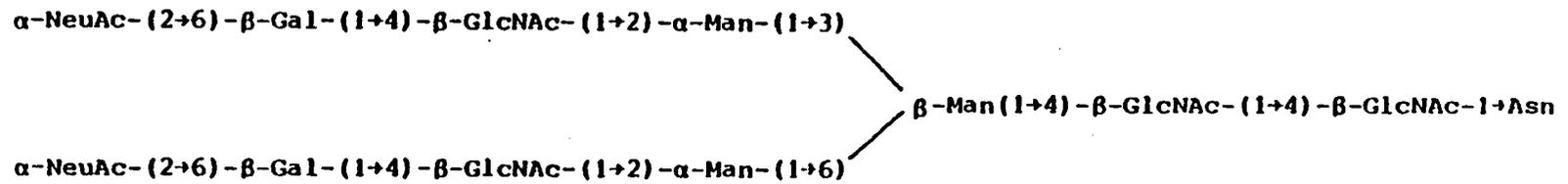
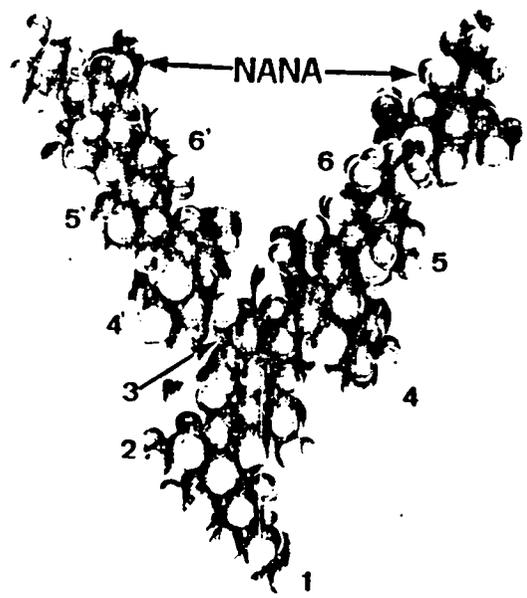
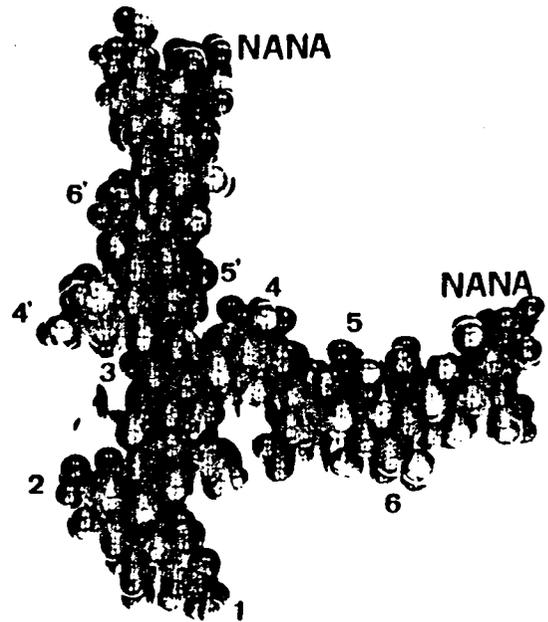


Figure 3

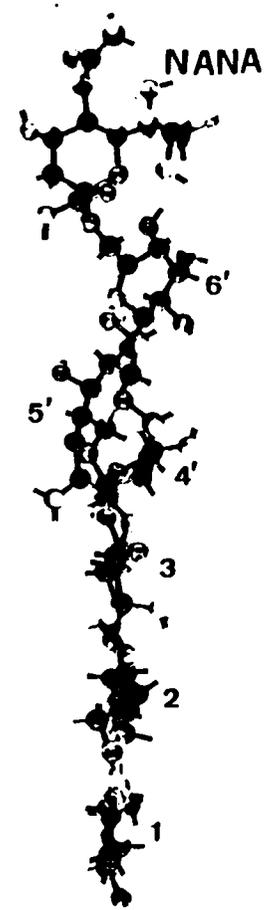
Structure du glycanne de la sérotransferrine humaine d'après SPIK et al., 1974



A



B



C

Figure 4

Modèles moléculaires compacts (A et B) et éclaté (C) du glycanne biantenné de la sérotransferrine humaine selon Montreuil et al., 1978

A : conformation en Y ; B : conformation en T



N-(β -aspartyl)-N-acétyl glucosaminyllaminique. La structure de la chaîne peptidique au niveau du point d'attache des glycanes est donnée dans le Tableau III p. 17 représentant la séquence de la sérotransferrine humaine déterminée par Mac Gillivray et al., en 1977. Ces derniers ont vu que les deux glycanes sont attachés à la protéine sur les résidus d'asparagine 415 et 608, c'est-à-dire sur le même domaine C-terminal.

2 - SEROTRANSFERRINE DE LAPIN

Cette glycoprotéine contient un seul groupement glycanique dont la structure a été déterminée par Léger et al., en 1978. Le glycanne, biantenné, est de type N-acétyllactosaminique et en tous points identique à celui trouvé pour la sérotransferrine humaine. Strickland et al., ont confirmé cette structure en 1979.

La séquence du point d'attache des glycanes a été déterminée par Tordera en 1978 : Asn-Ser-Ser-Leu. Elle est confirmée par Strickland et al., en 1979. Elle est identique à celle trouvée pour l'un des glycanes de la sérotransferrine humaine.

Hudson et al., en 1973 ont proposé l'existence de deux glycanes par molécule de sérotransferrine de lapin. Leur hypothèse repose sur un pourcentage de sucres totaux contenu dans la glycoprotéine, calculé d'après un dosage colorimétrique. Tenant ce résultat pour acquis, Strickland et Hudson en 1978 trouvent que les deux glycanes sont situés sur une même région protéique, représentant environ un tiers de la molécule. Puis en 1979, toujours sur les mêmes bases, Strickland et al., constatent que les deux groupements oligosaccharidiques sont fixés sur une séquence peptidique identique. Il est donc fort probable que ce groupe d'auteurs n'étudient en fait que le même glycanne. Les calculs de Léger et al., en 1978 qui

trouvent un seul glycanne par molécule de sérotransferrine, reposent eux, sur des analyses simultanées de la composition molaire en glucides de la sérotransferrine de Lapin et de la structure du glycanne, cela par des méthodes de dosage colorimétrique et par chromatographie en phase gazeuse.

En conclusion, les sérotransferrines humaine et de lapin semblent surtout se différencier par le nombre des glycanes qu'elles portent. Une telle variabilité se retrouve d'ailleurs au sein de toutes les sérotransferrines étudiées jusqu'alors, qui peuvent présenter de 1 à 4 groupements glycaniques par molécule.

D - LES SITES DE FIXATION DU FER

1 - SEROTRANSFERRINE HUMAINE

Pour des renseignements plus précis concernant les sites de fixation du fer, nous renvoyons aux revues détaillées de Chasteen et d'Aisen et Brown, toutes deux parues en 1977.

Jusqu'ici, nous avons vu que la sérotransferrine humaine possédait deux domaines structuraux relativement indépendants et deux sites de fixation du fer : un sur chaque domaine. Une question qui vient alors à l'esprit est la suivante : existe-t-il une identité entre les sites ? Pour y répondre, il faut d'abord rappeler les propriétés générales de fixation du fer de la sérotransferrine, qui sont, bien souvent, aussi celles de toutes les transferrines.

a) Généralités

La sérotransferrine humaine peut fixer deux ions ferriques de manière réversible (Laurell, 1947) et développer alors une couleur rose saumon dont le maximum d'absorption se situe à 465 nm (Surgenor et al., 1949).

La protéine peut aussi fixer d'autres ions métalliques et plusieurs lanthanides (voir la revue générale de Chasteen en 1977). Nous verrons ultérieurement que cela semble correspondre à un rôle biologique puisque les sérotransferrines transporteraient certains de ces ions dans l'organisme.

Mais le fer reste le métal qui a le plus d'affinité pour les sérotransferrines. Les constantes calculées par Aasa et al., en 1963, Aisen et Leibman en 1971 et Jarrit et Charlwood en 1976 permettent de supposer l'indépendance et l'équivalence des deux sites. La constante apparente de fixation du Fe^{+++} à la transferrine est, pour une pression partielle en CO_2 et un pH voisin de ceux du sang, de l'ordre de $10^{24} M^{-1}$.

Tous les métaux et lanthanides qui se fixent à la sérotransferrine, nécessitent simultanément, la fixation d'anions et la libération de trois protons (Schade et al., 1949 ; Warner et Weber, 1952). Si l'on prend pour exemple le bicarbonate, l'équation générale est la suivante :



Il y a une coopérativité entre métal et anion : le premier ne peut se fixer sur le site qu'en présence du second, mais l'anion ne se fixe pas à la protéine sans le métal (Aisen et al., 1969 ; Schlabach et Bates, 1975 ; Tsang et al., 1975). On ne sait pas encore si l'anion naturel est le carbonate ou le bicarbonate.

Le site de fixation du fer et de l'anion a été maintes fois étudié. Schlabach et Bates ont proposé en 1975, un modèle de coordination de l'anion à la protéine par l'intermédiaire d'un groupement permettant la formation d'un carbone tétravalent. Ce modèle est reporté dans la Figure 5 p. 28. Des études faisant appel à des méthodes optiques ou à des modifications chimiques, ont permis de déterminer la nature des ligands impliqués dans la fixation du métal et de l'anion. Pour plus de détails nous renvoyons encore à la revue de Chasteen en 1977 ainsi qu'à celle, plus récente, de Mazurier en 1980. Nous nous bornerons ici à citer les acides aminés qui paraissent actuellement impliqués dans la fixation d'un ion métallique :

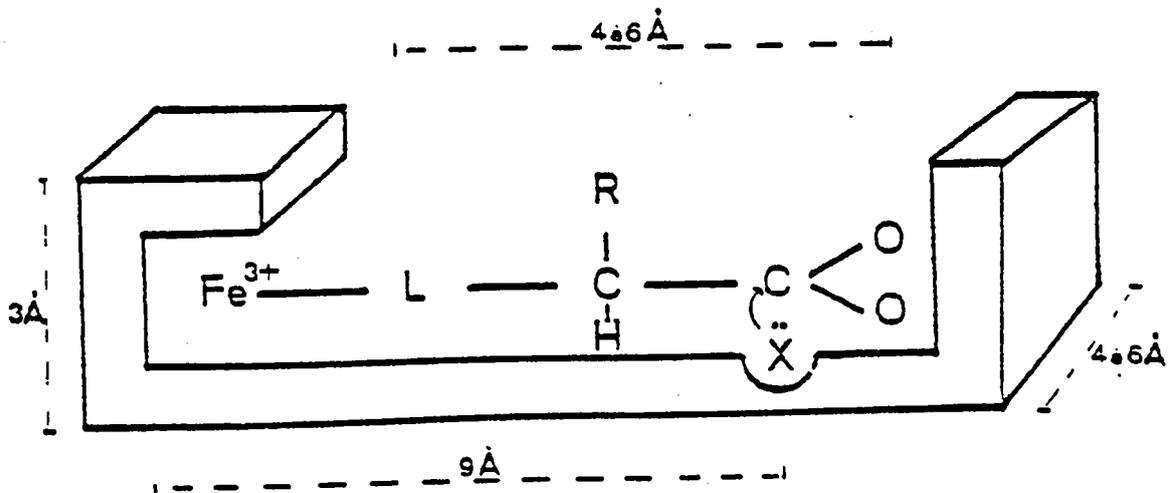


Figure 5

Modèle des sites de fixation du fer et de l'anion
d'après SCHLABACH et al., 1975

1 - La distance entre le carbonate et le métal a été mesurée par
HARRIS et al., 1974.



- deux, quatre ou six résidus de tyrosine ont été mis en cause ;
- deux, trois ou quatre noyaux imidazole sont également impliqués ;
- le tryptophane semble aussi intervenir mais non par liaison directe avec le métal ;
- l'arginine enfin, participe à la fixation de l'anion.

L'hétérogénéité des résultats s'explique du fait que tous les auteurs n'emploient pas les mêmes méthodes d'investigations et n'étudient pas tous la fixation du même métal.

b) Différences entre les deux sites

Les études concernant la différence entre les deux sites de fixation du fer reposent sur une hypothèse émise en 1967 par Fletcher et Huehns concernant la non équivalence biologique de ces deux sites et dont nous reparlerons plus tard, après avoir mieux défini les propriétés biologiques des sérotransferrines. Aucune différence n'a, jusqu'à présent, été mise en évidence dans la nature ni dans le nombre des ligands impliqués dans chaque site. Par contre, Princiotto et Zapolski en 1975, montrent que la dissociation du métal de la sérotransferrine humaine est un processus biphasique : le premier fer part à pH 5,8, le second à pH 4,8. Il existe donc un site acido-labile et un site acido-stable et la glycoprotéine est capable de fixer indépendamment le métal sur l'un ou l'autre site ou sur les deux. Ces différentes formes de saturation en fer de la sérotransferrine sont représentées dans la Figure 6 p. 30 .

Au même moment, Krysteva et al., en 1975 et 1976, révèlent grâce à des études par modification chimique et à des méthodes optiques, que l'un des sites se trouve à la surface de la protéine, alors que l'autre est enfoui. Les auteurs arrivent notamment à différencier deux populations d'histidines impliquées dans la fixation du métal, en fonction de leur réactivité vis-à-vis d'un agent chimique spécifique de la modification des histidines.

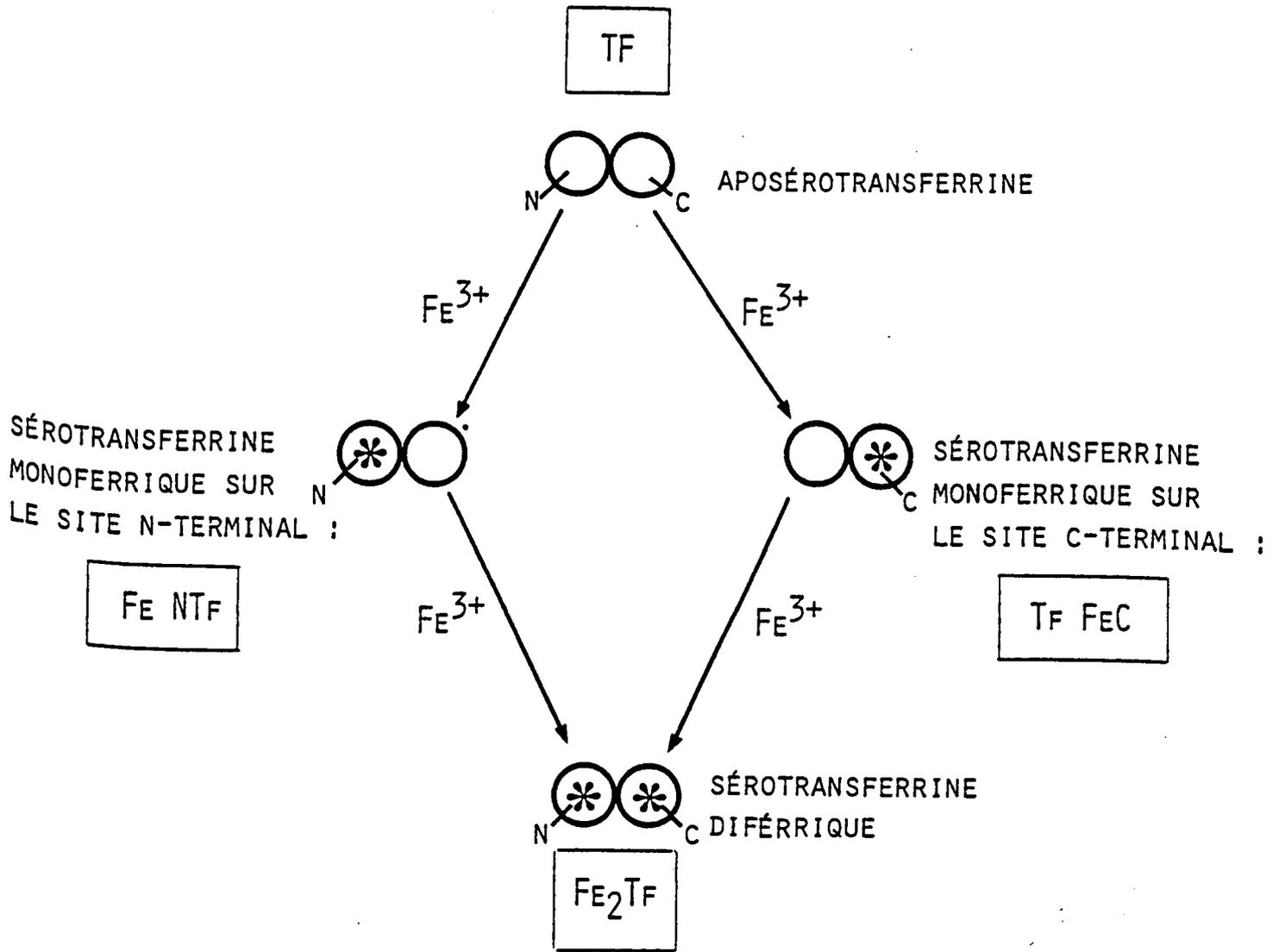


FIGURE 6

Les diverses formes de saturation en fer de la sérotransferrine d'après Frieden et Aisen (1980).



Puis Chasteen en 1977, Mazurier et al., en 1977 et Zweir en 1978, étudient les spectres R.P.E. de la sérotransferrine après fixation de divers métaux. Cela leur permet de montrer une différence de comportement du métal, donc l'existence d'un environnement différent, suivant le site occupé.

Aisen et al., en 1978 recalculant les constantes d'équilibre stoechiométrique ou thermodynamique de la sérotransferrine humaine, ont démontré que, quelque soit le pH, il y a toujours deux constantes de fixation pour le métal sur la protéine, une pour chaque site.

Makey et al., en 1976 et Van Eijk et al., en 1978 arrivent à séparer les quatre formes de la sérotransferrine humaine : Tf, FeN Tf, TfFe_c et Fe₂Tf, par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Si cela confirme la différence entre les sites de fixation du métal, cela rejoint aussi la démonstration de l'existence de deux domaines structuraux distincts dans la sérotransferrine humaine, par Evans et Williams en 1978. D'ailleurs, ces derniers ont pu identifier chacun de ces domaines sur la glycoprotéine entière, lorsqu'elle est partiellement saturée en fer. Enfin, récemment, Leibman et Aisen en 1979 et Williams et Moreton en 1980, démontrent que, "in vitro", dans le sérum, la sérotransferrine fixe le fer surtout sur le site acido-labile.

La non-identité des sites de fixation du métal de la sérotransferrine humaine n'est plus à démontrer et si cela semble effectivement relié à un rôle biologique de la protéine, il reste encore à en préciser les mécanismes.

2 - SEROTRANSFERRINE DE LAPIN

Peu d'études ont été faites jusqu'à présent dans ce domaine, sur cette protéine. Toutefois Princiotta et Zapolski en 1978 montrent que les deux sites de fixation du fer de la sérotransferrine de lapin, ne relarguent pas le métal de manière différente en milieu acide. Par contre, Mazurier et al., en 1980 montrent qu'il est possible de différencier les deux sites

en fonction du pH, en présence d'E.D.T.A. et d'ions phosphate. Les auteurs arrivent également à distinguer deux groupes d'histidines fixant le fer. Ces histidines réagissent diversement lorsqu'elles sont soumises à une modification chimique.

La sérotransferrine de lapin présenterait donc aussi des sites de fixation du métal différents.

E - CONCLUSIONS

Les sérotransferrines humaine et de lapin présentent beaucoup de propriétés structurales communes, même si elles sont différentes par certains côtés. Cela se traduit d'ailleurs au niveau de leurs propriétés biologiques, car il est tout à fait possible de faire fonctionner ces protéines dans des systèmes hétérologues tels que : sérotransferrine humaine et réticulocytes de lapin ou sérotransferrine de lapin et réticulocytes humains.

Nous avons déjà maintes fois, en abordant les questions liées à leur structure, mentionné les rôles biologiques des transferrines. Nous allons maintenant les décrire plus en détail en consacrant le chapitre suivant aux connaissances actuelles accumulées sur les récepteurs de ces protéines.

LES SITES RECEPTEURS DES TRANSFERRINES

A - LES SITES RÉCEPTEURS DE LA SÉROTRANSFERRINE SUR LES RÉTICULOCYTES

1 - MISE EN EVIDENCE DU RECEPTEUR

A cause de leur importance, les récepteurs des réticulocytes sont très étudiés. En effet, plus de la moitié du fer total de l'organisme est complexé à l'hémoglobine. Or, la synthèse de l'hème a lieu dans les mitochondries appartenant aux cellules de la lignée érythropoïétique. Ce sont des cellules de la moëlle osseuse qui, par différenciations successives, aboutissent à la formation des globules rouges. La sérotransferrine parvenant dans les vaisseaux sinusoides de la moëlle osseuse, est l'unique source de fer de ce tissu. Mais, parmi les cellules rouges circulant dans le sang, il y a des précurseurs des érythrocytes encore capables de capter le fer de la sérotransferrine : ce sont les réticulocytes. Voilà pourquoi la plupart des études de l'interaction érythroblastes-sérotransferrine a été faite en prenant pour modèle ce type de cellules, que l'on peut se procurer simplement par saignée.

L'incorporation du fer dans les réticulocytes a tout d'abord été étudiée par Walsh et al., en 1949, qui ont trouvé que ces cellules, aussi bien que celles dont elles proviennent dans la moëlle osseuse, étaient capables d'absorber le fer du milieu et de l'incorporer dans l'hémoglobine. Mais la participation de la sérotransferrine dans ce processus a été révélée par Jandl et al., en 1959 et Jandl et Katz en 1963. Ces auteurs ont vu que la transferrine pouvait donner son fer aux réticulocytes et non aux érythrocytes, que ce n'était pas un mécanisme de diffusion simple et que la protéine s'attachait à la surface du réticulocyte avant de relarguer le métal.

Ils ont vu, en outre, que la sérotransferrine saturée en fer se fixe plus vite à la cellule que l'aposérotransferrine. Ni les immunoglobulines ni l'albumine ne sont capables de se fixer à la membrane du réticulocyte. Le relarguage du fer de la transferrine est supprimé quand la cellule est traitée par la trypsine. Tous ces résultats ont amené les auteurs à postuler l'existence de sites récepteurs spécifiques de la sérotransferrine saturée en fer, à la surface des réticulocytes.

L'interaction de la glycoprotéine avec le récepteur peut être décrite par les équations de Michaelis-Menten. De telles analyses ont permis d'estimer à 50.000 le nombre de sites de fixation présents sur un réticulocyte humain et à 26.000 à 560.000 sites sur les réticulocytes de lapin (Jandl et Katz, 1963 ; Baker et Morgan, 1969 ; Kornfeld, 1969). La spécificité des récepteurs pour la sérotransferrine saturée en fer dépendrait de la différence de conformation entre la forme saturée et la forme non saturée de la protéine (Kornfeld, 1969 ; Lane, 1972). Jandl et Katz en 1963 et Morgan en 1964, ont proposé un schéma d'interaction entre le réticulocyte et la sérotransferrine :

- formation d'un complexe non spécifique entre la membrane cellulaire et la glycoprotéine saturée en fer ;
- formation d'un complexe spécifique entre le récepteur du réticulocyte et la sérotransferrine ;
- transfert du fer dans la cellule pour la synthèse de l'hémoglobine ;
- relarguage de la sérotransferrine désaturée, du récepteur membranaire.

Le trajet du fer dans le réticulocyte est encore très mal connu. Morgan et Appleton ont postulé dès 1969, sur la base d'expériences d'autoradiographie, que la transferrine devait pénétrer dans la cellule pour y relarguer

son fer. Par contre, pour Speyer et Fielding, 1974, une telle incorporation n'est pas nécessaire et les auteurs ont isolé, à partir des réticulocytes, des macromolécules susceptibles de fixer le métal de la transferrine et de permettre le transport du fer dans la cellule. Quoiqu'il en soit, le fer amené dans les érythrocytes par la sérotransferrine se retrouve dans l'hémoglobine. Puis parvenu dans les globules rouges matures, il y reste jusqu'à leur mort. Ensuite, les cellules du système réticuloendothélial phagocytent les hématies mortes et dégradent l'hémoglobine. Par une suite d'étapes encore mal définies au cours desquelles intervient l'hémopexine, le fer libéré peut être de nouveau réutilisé et refixé sur la sérotransferrine (Lynch et al., 1974). Un tel mécanisme représente 80 % du renouvellement du fer plasmatique.

2 - ISOLEMENT DU RECEPTEUR

Il a fallu attendre le développement des méthodes de solubilisation des protéines membranaires pour voir enfin isolé et caractérisé un récepteur de la sérotransferrine. Mais si, depuis les premiers travaux de Garret et al., en 1973, les groupes ont été nombreux à travailler sur ce sujet, on ne peut pas encore aujourd'hui construire un modèle unique tant les résultats obtenus sont différents et peu compatibles.

a) Historique de la découverte du récepteur

De 1973 à 1975 commencent à apparaître les études des récepteurs des réticulocytes. On retrouve partout le même processus d'isolement ; mais suivant les groupes, on utilise divers agents de solubilisation, pour isoler le complexe glycoprotéine-récepteur, et plusieurs sortes de tamisage moléculaire pour le purifier et le caractériser. Comme de surcroît, les auteurs

travaillent sur des réticulocytes provenant de différentes espèces, il n'est pas étonnant de voir apparaître et décrite, toute une cascade de complexes d'une masse moléculaire s'échelonnant entre 135.000 et 700.000.

Puis, au cours des années 1976 - 1978, les techniques s'affinent, se précisent, et suivant ces améliorations, les divers groupes reprennent leurs anciennes études et caractérisent à nouveau les sites spécifiques des sérotransferrines sur les réticulocytes. Il apparaît alors deux types de tendances :

- les récepteurs sont de nature macromoléculaire
- les récepteurs sont de masse moléculaire plus faible, ou tout du

moins formés de plusieurs sous-unités.

Nous ne présenterons ici que les derniers résultats des divers groupes ayant travaillé sur le sujet, ne citant leurs anciens travaux que pour étayer une discussion ou une hypothèse. Le tableau VI p. 37 rassemble quelques unes de ces données.

D'autre part, la revue générale de Hu et Aisen en 1978 récapitule les résultats acquis jusqu'alors.

b) Analyse des sites récepteurs

Fielding et Speyer ont isolé des réticulocytes humains, en 1974, un complexe récepteur-sérotransferrine possédant une masse moléculaire de 230.000.

Van der Heul et al., en 1977, travaillant sur les réticulocytes de rat, montrent l'existence d'un complexe récepteur-sérotransferrine qu'ils assimilent à celui découvert par Fielding et Speyer chez l'homme, et dont la masse moléculaire est de 150.000.

Ecarot-Charrier et al., en 1977 arrivent à isoler une fraction de la membrane des réticulocytes de lapin, qui migre comme un composé unique en gel de polyacrylamide. Cette fraction possède une masse moléculaire voisine



TABLEAU VI

Masses moléculaires déterminées pour les récepteurs de la sérotransferrine sur les réticulocytes

Auteurs	Cellules	Détergent employé	Masse moléculaire du complexe transferrine-composé(s) membranaire(s) déterminé par gel filtration.	Masse moléculaire des sous-unités proposées après électrophorèse en SDS.
Garret <u>et al.</u> , 1973	Réticulocytes de lapin	1 % Deoxycholate	350.000 - 700.000	-
Fielding et Speyer, 1974	Réticulocytes humains	1 % Triton X100	230.000	-
Ecarot-Charrier <u>et al.</u> , 1977	Réticulocytes de lapin	0,7 % Triton X100	> 200.000	200.000
Light, 1977	Réticulocytes de lapin	0,5 % Triton X100	30 - 35.000	30 - 35.000
Nunez <u>et al.</u> , 1977	Réticulocytes de lapin		125.000 - 210.000 *	-
Van Bockxmeer et Morgan, 1977	Réticulocytes de lapin	10 % Téric 12 A9	350.000	-
Van der Heul <u>et al.</u> , 1977	Réticulocytes de rat	1 % Triton X100	150.000	-
Hu et Aisen, 1978	Réticulocytes de lapin	1 % Triton X100	250.000	95.000
Sly <u>et al.</u> , 1978	Réticulocytes de lapin	1 % Triton X 100	180.000	{17.000 48.000
Witt et Woodworth, 1978	Réticulocytes de lapin			190.000
Glass <u>et al.</u> , 1980	Réticulocytes de lapin	0,4 % SDS	{435.000 200.000	78.000
Steiner, 1980	Réticulocytes humains		123.000 *	43.000

* Déterminé par électrophorèse en présence de S.D.S.

de 200.000 et fixe la sérotransferrine d'une manière réversible.

Sly et al., en 1978, trouvent dans les réticulocytes de lapin, un complexe récepteur membranaire-sérotransferrine qu'ils identifient également à celui de Speyer et Fielding et dont la masse moléculaire est de 188.000. L'analyse du récepteur par électrophorèse en présence de SDS fait apparaître des sous-unités de 17.000 et de 48.000.

Van Bockxmeer et Morgan en 1977 isolent des réticulocytes de lapin, un complexe d'une masse moléculaire de 350.000 qu'ils ne retrouvent pas dans les globules rouges matures ; ils vérifient en outre, que ce récepteur est bien capable de fixer la sérotransferrine de manière saturable et réversible. Ces mêmes auteurs en 1978, étudient l'interaction de la glycoprotéine avec le récepteur solubilisé et montrent que les caractéristiques du dit récepteur sont en bon accord avec celles déterminées sur la cellule entière.

Hu et Aisen, en 1978, définissent l'existence d'un complexe dans la membrane des réticulocytes de lapin, d'une masse moléculaire de 250.000 ; le récepteur présente une forme ellipsoïdale et semble constitué de deux sous-unités de 95.000 assemblées en un polymère de 175.000 ; il serait encore présent dans les globules rouges matures, mais ne serait plus capable, alors, de fixer la transferrine.

Witt et Woodworth en 1978, emploient un procédé d'étude original : ils séparent différents stades de maturation des réticulocytes de lapin par centrifugation isopycnique. Un marquage des cellules, au préalable, à l'iode radioactif, leur permet d'isoler une protéine membranaire de masse moléculaire 190.000, qui disparaît quand l'âge des cellules augmente. Et si la transferrine est tout d'abord incubée avec les réticulocytes, le marquage de la protéine de 190.000 n'a plus lieu.

Enfin, en 1980, Glass et al., isolent, des réticulocytes de lapin, un complexe de masse moléculaire 435.000, probablement composé de sous-unités de 78.000.

Il faut noter que tous ces auteurs, à part Witt et Woodworth, utilisent sensiblement le même processus d'isolement : action d'un détergent sur les membranes et purification du complexe par tamisage moléculaire. Mais tous n'emploient pas le même détergent : Glass et al., utilisent le SDS, Van Bockxmeer et Morgan : le Téric 12A9, tous les autres : le Triton X 100. De même, les étapes de tamisage moléculaire sont différentes suivant les groupes. Ainsi Fielding et Speyer, Van der Heul et al., passent obligatoirement au cours de leur isolement par une étape de gel filtration sur Sépharose 2B, totalement ignorée par les autres groupes qui emploient soit le DEAE-Biogel A (Sly et al.,) soit le Séphadex G200 (Ecarot-Charrier et al., Van Bockxmeer et al.,) soit le Biogel A1.5 (Glass et al.,) soit enfin l'Ultrogel ACA₂₂ (Hu et Aisen) ou ACA₃₄ (Van Bockxmeer et Morgan). De plus, Ecarot-Charrier et al., et Glass et al., utilisent la chromatographie d'affinité au cours de la purification : ils fixent des anticorps spécifiques de la sérotransferrine sur une matrice de Sépharose 4B afin de retenir sélectivement le complexe transferrine-récepteur.

D'autres auteurs employant d'autres techniques, arrivent à isoler des récepteurs de plus petite taille. Ainsi Nunez et al., en 1977, utilisent des agents de "cross-linking" pour fixer la sérotransferrine à son site spécifique sur le réticulocyte de lapin. Le complexe isolé présente une masse moléculaire variant de 125.000 à 210.000, suivant l'agent employé. Si l'on admet une fixation stoechiométrique entre une molécule de transferrine et un récepteur, cela suppose pour ce dernier une masse allant de 60.000 à 145.000.

Puis Light en 1977 isole, des membranes de réticulocytes de lapin, par chromatographie d'affinité, un complexe dont il tente de séparer ensuite le récepteur, en employant un agent dissociant. Car il pense que l'utilisation des agents de solubilisation des protéines

membranaires entraîne la formation d'aggrégats et que les complexes isolés jusqu'ici peuvent être le résultat de l'association de plusieurs transferrines et de plusieurs récepteurs. Et, en effet, il isole un composé membranaire de masse moléculaire 30.000 à 35.000, qui, lorsqu'il n'est pas soumis à l'action de l'agent dissociant, s'associe en dimères.

Enfin Steiner en 1980, utilise aussi une méthode astucieuse : il fixe sur la sérotransferrine un marqueur fluorescent et un dérivé photosensible afin d'étudier le récepteur des réticulocytes humains. Après photolyse, il isole un complexe covalent : transferrine marquée, site spécifique, d'une masse moléculaire 123.000, ce qui suppose donc un récepteur de masse moléculaire 43.000.

c) Discussion

L'hypothèse que Light émet en 1977, semble pouvoir expliquer, en partie, l'hétérogénéité des résultats obtenus jusqu'alors par les différents groupes. Les travaux de Steiner en 1980, qui emploie une méthode d'isolement très précise, sont tout à fait en faveur de cette hypothèse. Ceux de Nunez et al., en 1977 le sont aussi puisque ces auteurs ont prouvé qu'on pouvait isoler des complexes de masses moléculaires différentes, en employant divers agents de "cross-linking". Il faut noter que Hu et Aisen en 1978, Sly et al., en 1978 et Glass et al., 1980, arrivent aussi à dissocier leurs récepteurs en sous-unités, en présence de SDS.

Hu et Aisen en 1978, attirent d'ailleurs l'attention sur le fait que les études des protéines extraites des membranes par tamisage moléculaire donnent seulement une estimation du rayon de Stokes et non véritablement une masse moléculaire. De plus, le paramètre varie avec le pH et la force ionique du tampon d'élution. Voilà donc encore un moyen d'expliquer le désaccord qui subsiste entre les différents résultats.

Il ne faut pas oublier non plus, que les auteurs n'emploient pas tous le même détergent. Or Garret et al., en 1973, avaient démontré que, suivant l'agent de solubilisation employé, les complexes isolés des membranes avaient des masses moléculaires qui pouvaient s'échelonner entre 350.000 et 700.000.

Tout cela semble donc concorder avec les prédictions de Light en 1977, à qui nous laisserons le mot de la fin.

Light étudie en 1978 les cellules érythroïdes de la moëlle osseuse et y trouve un composé membranaire majeur qui lie la transferrine. Ce composé présente une masse moléculaire de 18.000 à 20.000. Pour Light, une telle masse est seule vraisemblable pour le récepteur de la sérotransferrine. Si l'on tient compte en effet du nombre des sites spécifiques par cellules -estimé pour le réticulocyte de lapin entre 26.000 et 560.000 par Jandl et Katz en 1963, Kornfeld en 1969 et Baker et Morgan en 1969- tout récepteur d'une taille supérieure à 100.000 représenterait une protéine majeure de la membrane du réticulocyte. Or, cette dernière a été isolée par Light et Tanner en 1977 qui l'identifient comme étant la protéine responsable du transport des anions à travers la cellule. Elle présente une masse moléculaire de 93.000. L'auteur montre d'autre part, que, dans certaines conditions, cette protéine peut être copurifiée avec le récepteur de la sérotransferrine.

Pour Light, 1978, il ne fait donc aucun doute que les récepteurs de masse moléculaire importante, isolés jusqu'à présent ne sont que des agrégats de diverses protéines. Il donne en exemple le complexe isolé par Hu et Aisen en 1978, dont la présence retrouvée sur les globules rouges matures, suggère en effet que les auteurs ont du isoler autre chose que le seul site spécifique de la sérotransferrine. Car Light rappelle enfin, et ses récentes études en 1977, le confirment, qu'au cours du processus de maturation des

cellules érythroïdes, il y a un complet changement des propriétés des membranes, et entre autres, perte du récepteur de la sérotransferrine parallèlement à la perte de la capacité de synthèse de l'hème (Myrthe en 1964). De telles conclusions ont d'ailleurs été récemment tirées par Nunez et al., en 1977 et par Van Bockxmeer et Morgan en 1979 (a). Les éclaircissements fournis par Light peuvent expliquer aussi les résultats de Witt et Woodworth en 1978, dont la méthode d'étude n'est pas très spécifique : les auteurs n'ont peut être pas caractérisé un récepteur de la sérotransferrine, mais tout au moins un "complexe" suffisamment proche de lui, pour que la fixation de la glycoprotéine sur son site spécifique empêche le marquage de l'ensemble.

Comment expliquer alors la variation des masses moléculaires obtenues même quand les auteurs s'attachent à éviter l'isolement d'aggrégats ?.

Probablement par les raisons que donnent Hu et Aisen en 1978 sur l'estimation des masses moléculaires ; peut être aussi parce que toutes les études ne concernent pas le même type de cellules. On peut à ce propos rappeler les travaux de Workman et al., en 1975, démontrant que les membranes des réticulocytes provenant d'animaux traités à la phénylhydrazine (agent qui provoque une augmentation du taux des précurseurs des hématies) présentent des modifications dans leurs propriétés. Or beaucoup d'auteurs emploient cette méthode pour se procurer des réticulocytes en grand nombre.

Light fournit, enfin, une dernière explication possible en 1978, pour rendre compte de la variation observée dans la taille des récepteurs isolés jusqu'ici : puisque le nombre des sites spécifiques de la sérotransferrine diminue au cours de la maturation des cellules, on peut supposer que la perte des récepteurs survient par aggrégation et "capping" (Bretsher, 1976).

Il paraît donc pour l'instant délicat de proposer un modèle unique du récepteur de la sérotransferrine sur les réticulocytes : taille, nombre de sous-unités sont autant de questions encore non résolues. Mais,

l'étude des récepteurs est très liée à celle du transport du fer à l'intérieur des cellules et la plupart des auteurs précédemment cités se sont aussi intéressés à ce problème. Aussi allons-nous maintenant aborder cet aspect de l'internalisation du fer dans les réticulocytes : divers modèles en sont actuellement proposés, en relation avec les récepteurs membranaires.

3 - LES DIFFERENTES HYPOTHESES CONCERNANT LE TRANSPORT DU FER

Dès 1974, deux écoles s'opposent :

a) Hypothèse de Fielding et Speyer en 1974, qui montrent, outre l'existence, dans les réticulocytes humains, d'un récepteur de la sérotransferrine, celle de deux autres composés d'origine membranaire, fixant le fer avant de le livrer à un intermédiaire cytosolique. En 1977, ces mêmes auteurs identifient le composé cytosolique à la ferritine. Un schéma de ce modèle est donné dans la Figure 7 p. 44. En 1979, Speyer et Fielding démontrent que la ferritine est un intermédiaire obligatoire dans le transport du fer à travers le réticulocyte humain. Donc, pour ces auteurs, la pénétration de la sérotransferrine dans la cellule n'est pas nécessaire au transfert du métal.

D'autres groupes ont confirmé cette hypothèse : Van der Heul et al., en 1977, montrent aussi l'existence, dans les réticulocytes de rat, de plusieurs composés membranaires, en plus du récepteur de la sérotransferrine, intervenant dans le mécanisme d'incorporation du fer.

Sly et al., en 1978, isolent, à partir des membranes des réticulocytes de lapin, incubées avec de la sérotransferrine radioactive, plusieurs complexes marqués, dont ils ne caractérisent qu'un seul : celui qu'ils identifient au récepteur de la sérotransferrine.

Puis en 1980, Glass et al., prenant pour modèle celui de Fielding et Speyer, cherchent à mettre en évidence dans les réticulocytes de lapin, des composés membranaires ayant reçu du fer de la sérotransferrine. Ils

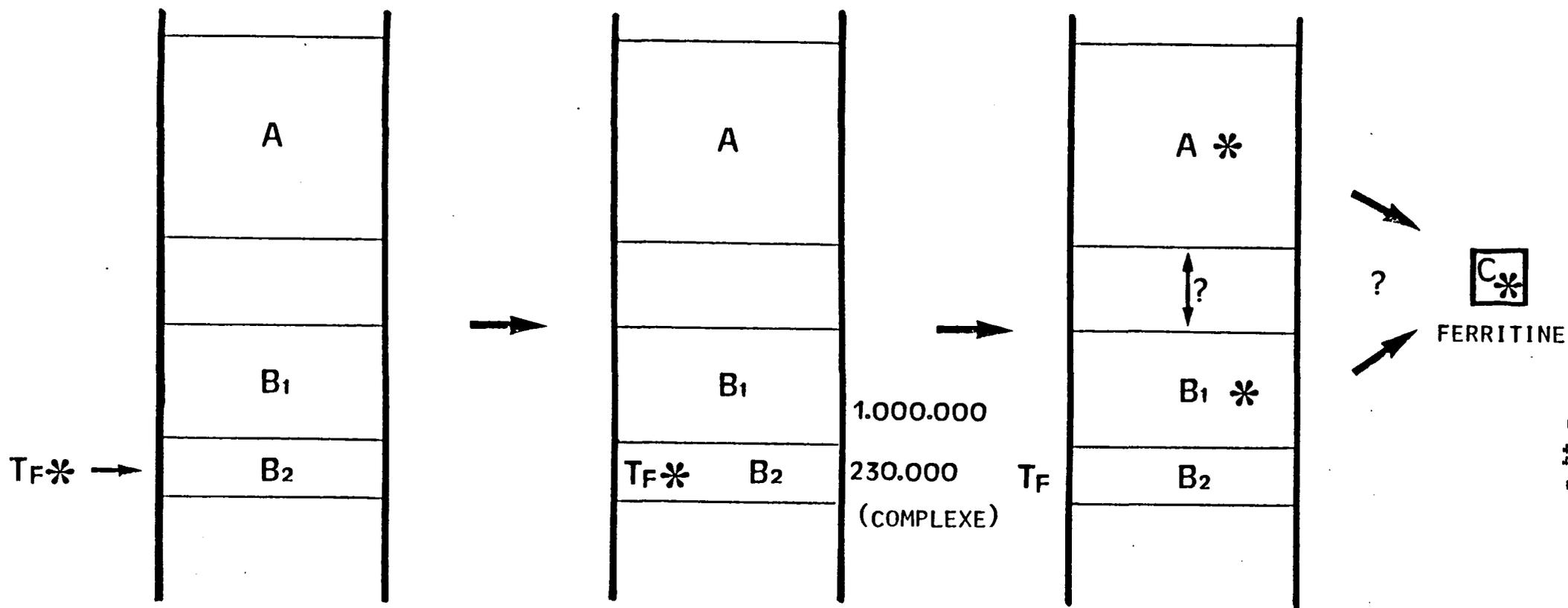


Figure 7

Modèle d'internalisation du fer (*) dans les réticulocytes humains, d'après Fielding et Speyer, 1974.

Les nombres représentent les masses moléculaires estimées pour les intermédiaires B₁ et B₂ + Tf.

BUS
LILLE

utilisent pour cela une transferrine marquée au fer et à l'iode et recherchent le pourcentage de radioactivité de chaque isotope, retrouvé dans les complexes membranaires qu'ils isolent par chromatographie d'affinité et dont ils déterminent les masses moléculaires. De ces données, ils déduisent un nouveau modèle, selon lequel la transferrine se lierait d'abord à un récepteur membranaire constitué de deux ou trois sous-unités de taille identique à celle de la glycoprotéine. Puis, ou bien ce complexe serait scindé en un nouvel intermédiaire membranaire comportant une transferrine pour une sous-unité, capable alors de prélever le fer ; ou bien la transferrine se fixerait sur un autre composé membranaire, de taille identique à la sienne, et auquel elle céderait le métal. Un schéma de ce modèle est donné dans la Figure 8 p. 46 : il présente beaucoup d'analogies avec celui de Fielding et Speyer ; notons toutefois que, comme les deux groupes d'auteurs n'emploient pas le même détergent, il n'est pas surprenant de voir mis en évidence des intermédiaires membranaires différents. Il faut aussi remarquer que les auteurs ne s'intéressent pas aux mêmes cellules.

D'autre part, Loh et al., en 1977 et Glass et al., en 1977, emploient une transferrine liée à des billes d'agarose pour montrer que la pénétration de la protéine dans la cellule n'est pas nécessaire au transfert du métal. Nunez et al., en 1978, constatent que le fer provenant de la sérotransferrine est associé à la ferritine dans les réticulocytes de souris, mais aussi à un composé de masse moléculaire 17.000. Workman et Bates, dès 1974, avaient mis en évidence l'existence d'un tel composé cytosolique. Pour les auteurs, la transferrine ne pénétrerait pas non plus dans les cellules.

Enfin, Romslo et al., en 1979 confirment les travaux de Speyer et Fielding en 1979, en montrant que les mitochondries de foie de rat tiennent leur fer de la ferritine.

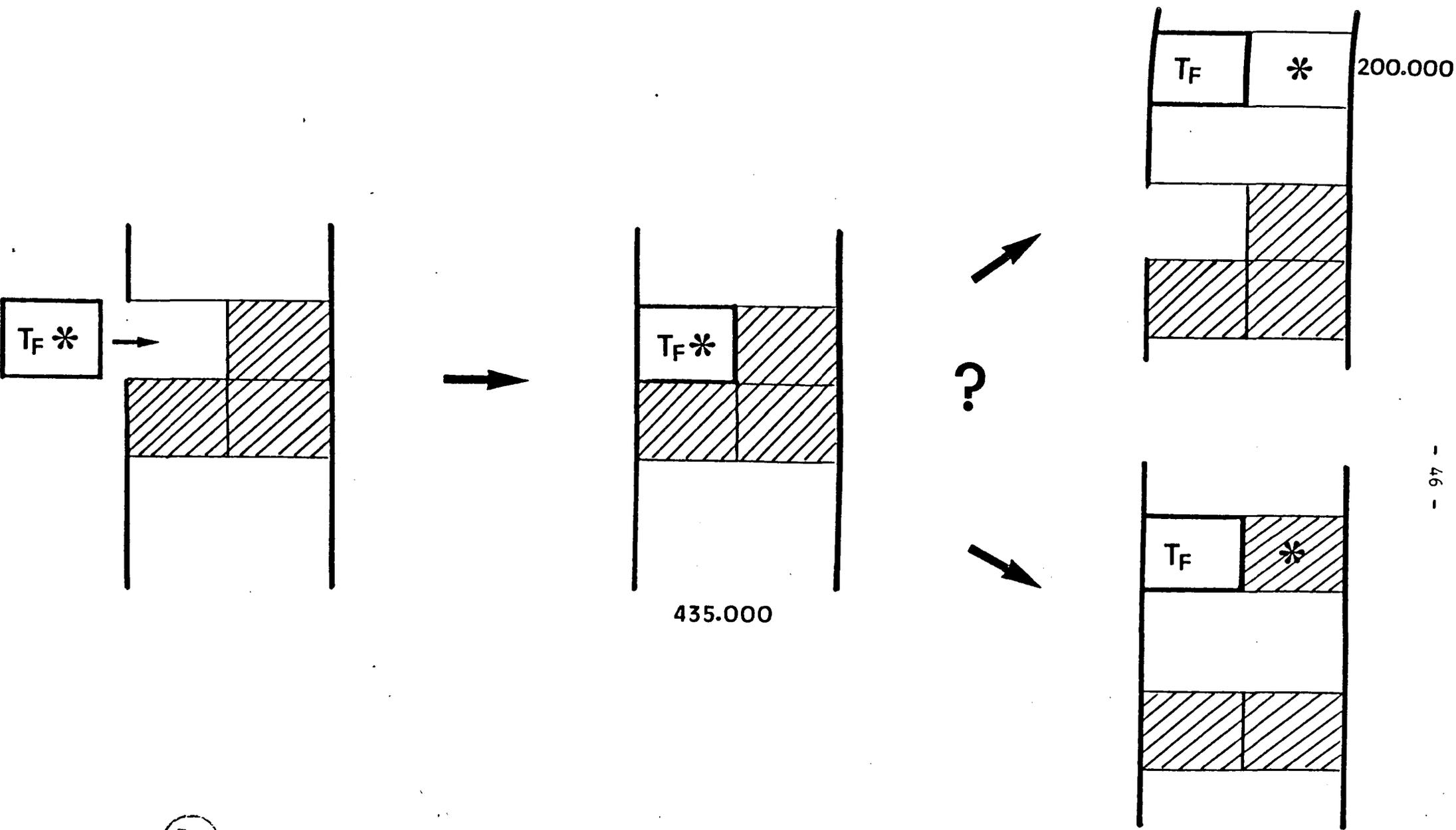


Figure 8

Modèle d'internalisation du fer ($*$) dans les réticulocytes de lapin d'après Glass et al., 1980. Les nombres représentent les masses moléculaires des complexes Tf-composé membranaire.

b) Hypothèse de l'équipe de Morgan. Dès 1969, Morgan et Appleton, sur la base d'expériences d'autoradiographie, proposent que la sérotransferrine saturée en fer pénètre dans la cellule pour donner son métal au réticulocyte et qu'elle est ensuite rejetée dans le milieu extracellulaire. En 1974, Hemmaplardh et al., montrent en employant des inhibiteurs du fonctionnement des microtubules et de microfilaments, que la transferrine doit être internalisée par la cellule pour y apporter son fer. Ces études sont précisées par Hemmaplardh et Morgan en 1976, qui montrent en outre, que le récepteur est de nature protéique et qu'après sa fixation à la membrane du réticulocyte, la sérotransferrine est très vite intégrée dans la cellule. Puis en 1977, Hemmaplardh et Morgan (a) confirment ce fait, en utilisant une technique d'insolubilisation de la sérotransferrine identique à celle de Loh et al., en 1977 et de Glass et al., en 1977. De plus, Hemmaplardh et al., en 1977 démontrent l'intervention des phospholipides membranaires dans le processus d'internalisation de la sérotransferrine. En outre, Blackburn et Morgan en 1977, montrent l'existence d'un facteur intracytosolique, de petite taille, susceptible de fixer le fer de la sérotransferrine et que l'on peut rapprocher de celui mis en évidence par Workman et Bates en 1974 puis par Nunez et al., en 1978. Le rôle de cet intermédiaire cytosolique reste cependant à préciser. Puis en 1978, Van Bockxmeer et al., étudiant l'interaction de la sérotransferrine avec le récepteur solubilisé, confirment encore une fois, l'endocytose de la protéine.

Ce mécanisme d'internalisation de la sérotransferrine a d'autre part été déjà proposé par Martinez et al., en 1972 et par Sullivan et al., en 1976.

Récemment Konopka et al., en 1979 et en 1980, ont montré l'existence de récepteurs spécifiques de la sérotransferrine à la surface des mitochondries de foie, récepteurs qui permettraient le transfert du métal nécessaire à la biosynthèse de l'hémoglobine. Ces études viennent en renfort de la théorie de l'équipe de Morgan, puisqu'elles supposent que l'endocytose de la sérotransferrine est une étape obligatoire dans la fixation du métal par la cellule. Mais peut-on comparer le métabolisme du fer au niveau du foie et au niveau du réticulocyte ? Hamilton et al., en 1979, ont en effet soupçonné l'existence de deux types différents de récepteurs de la sérotransferrine, à la surface de ces deux sortes de cellules.

c) En conclusion, si l'hypothèse de Fielding et Speyer vient encore récemment de trouver des confirmations, celle de l'équipe de Morgan suscite tout autant d'intérêt. Et ne peut-on finalement concevoir que les deux types de mécanismes coexistent ? Les résultats d'Octave et al., en 1979 sur des fibroblastes en culture, ont en effet, amené les auteurs à supposer que la transferrine endocytée gagnerait les lysosomes où elle perdrait son métal ; puis elle serait excrétée dans le fluide extracellulaire. Milsom et Batey, d'autre part, montrent en 1979, que dans les cellules de foie, seule la transferrine dénaturée est pinocytée mais non la transferrine intacte dont le fer passerait dans la cellule probablement par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire. Puis le métal apparaît lié à la ferritine dans les deux cas, soit qu'il provienne des lysosomes soit qu'il provienne directement du cytosol.

Ces deux dernières études offrent donc des possibilités de conciliation entre les deux hypothèses. Il est toutefois probable qu'une connaissance plus approfondie des petits intermédiaires cytosoliques autres que la ferritine, ainsi que celle des mécanismes du relargage du fer de

la sérotransferrine, apporteront bientôt des éclaircissements.

Quoiqu'il en soit, un point fait l'unanimité de tous les groupes qui s'attachent à cette étude : la sérotransferrine se fixe tout d'abord aux récepteurs des réticulocytes. Nous allons maintenant aborder plus en détail cette interaction, en tentant de définir les facteurs susceptibles d'intervenir dans le mécanisme de reconnaissance entre la glycoprotéine et la cellule.

4 - INTERACTION SEROTRANSFERRINE-RETICULOCYTE

Lors de l'interaction entre la sérotransferrine et son site spécifique sur les réticulocytes, on peut distinguer plusieurs stades :

- la reconnaissance de la sérotransferrine par le récepteur et la fixation spécifique entre ces deux entités.
- le relargage du métal de la sérotransferrine dans la cellule.
- le détachement, de la surface de la cellule, de la sérotransferrine désaturée.

Considérant ces étapes, il est possible alors de subdiviser l'étude concernant le mécanisme de l'interaction, en trois parties qui comprennent :

- la participation de la sérotransferrine dans sa reconnaissance et sa fixation pour le récepteur et dans le transfert du métal
- la participation du récepteur dans la reconnaissance de la sérotransferrine, dans sa fixation et dans le transfert du métal.
- la participation d'autres facteurs tels que la présence d'ions calcium, ou d'ATP ou de tout autre composé intervenant dans la fixation entre sérotransferrine et récepteur ou dans le transfert du métal.

a) Participation de la sérotransferrine

Dès 1963, Jandl et Katz montraient que la sérotransferrine humaine saturée en fer présentait plus d'affinité pour les réticulocytes que l'aposérotransferrine. Puis, en 1969, Kornfeld précisait ces résultats et postulait que les différences observées étaient dues à un changement de conformation entre les formes apo- et saturées. Mais Baker et Morgan en 1969, n'observaient pas les mêmes différences d'affinité, entre les deux formes de la sérotransferrine de lapin, vis-à-vis des réticulocytes de lapin. Finalement Lane en 1972, fournissait une explication : comparant le comportement des sérotransferrines humaine et de lapin en chromatographie sur DEAE-cellulose, il montrait que la protéine d'origine humaine se fixait différemment sur l'échangeur d'ions suivant qu'elle était sous forme apo- ou saturée en fer ; mais les deux formes de la sérotransferrine de lapin présentaient très peu de différence. Cela indique une modification de la conformation entre les deux formes de la sérotransferrine humaine alors que la protéine de lapin ne semble pas présenter les mêmes propriétés. D'autre part, Lane voyait que les protéines humaine et de lapin saturées en fer s'associaient rapidement aux réticulocytes de lapin, alors que l'aposérotransferrine humaine ne s'y liait que très peu, bien que l'aposérotransferrine de lapin se fixe aux réticulocytes comme les transferrines saturées.

Tous ces résultats amènent à considérer que la conformation de la sérotransferrine est effectivement importante dans son interaction avec les réticulocytes et qu'un changement provoqué par la fixation du fer pourrait être responsable de la reconnaissance spécifique de la glycoprotéine par le récepteur cellulaire. Il faut rappeler, d'autre part, que de tels changements conformationnels dus à la fixation du métal

ont déjà été décelés sur la sérotransferrine humaine, pour certaines de ses propriétés physicochimiques, comme nous l'avons décrit au chapitre précédent. De plus, Spik et Montreuil en 1966, montraient que la fixation du fer sur la sérotransferrine humaine augmente la résistance de la protéine vis à vis des protéases.

Il reste donc à définir à quel niveau dans la glycoprotéine, la conformation détermine l'interaction. Deux parties, dans la molécule, sont susceptibles d'être impliquées : la partie glycanique et la partie protéique.

a) Rôle de la partie glycanique dans l'interaction avec les récepteurs

Dès 1966, Bezkorovainy (b) montrait que la conformation de la sérotransferrine humaine est inchangée après élimination de l'acide sialique. Puis Morgan et al., en 1967, voyaient qu'après un tel traitement, la glycoprotéine est toujours capable de fixer le fer et de le transférer. En 1968, Kornfeld confirmait les résultats précédents. Il arrivait en outre, à éliminer 40 à 50 % des monosaccharides provenant des glycanes de la sérotransferrine humaine, après action d'un mélange de glycosidases. Ce traitement ne semble pas non plus altérer les propriétés de transfert du fer de la glycoprotéine sur les réticulocytes de lapin. De plus, la présence -jusqu'à 140 molaires excès par rapport à la transferrine- de glycopeptides pronasiques, isolés de la sérotransferrine humaine, au cours de l'incubation de la glycoprotéine avec les réticulocytes de lapin, ne provoque pas de diminution notable de l'incorporation du fer dans les cellules. Pour Kornfeld, les glycanes de la sérotransferrine ne jouent pas un rôle primordial dans l'interaction. Mais l'auteur n'a déglycosylé que partiellement la glycoprotéine et a étudié un système hétérologue : sérotransferrine humaine - réticulocytes de lapin.

β) Rôle de la partie protéique dans l'interaction avec les réticulocytes

Kornfeld en 1968, modifiant les groupes aminés libres de la glycoprotéine humaine par l'emploi de réactifs spécifiques, de charge et de taille diverses, montre que ces traitements altèrent dans tous les cas la propriété de fixation aux réticulocytes de la sérotransferrine. Par contre, la glycoprotéine conserve pratiquement inchangées ses propriétés de fixation du fer.

b) Participation du récepteur

Dès 1959, Jandl et al., montraient que le récepteur est de nature protéique. Puis Leibman et Aisen en 1977, caractérisaient un récepteur comportant des sucres et enfin Sly et al., en 1978 ont confirmé que le récepteur est une glycoprotéine et ont identifié des résidus d'hexose, de N-acétylhexosamine, de fucose et d'acide sialique, portés par ce récepteur. On peut donc là aussi supposer que deux parties peuvent être impliquées dans l'interaction : la partie glycanique et la partie protéique.

α) Influence de la partie glycanique du récepteur

Loh et Morgan en 1975 étudient l'effet de la concanavaline A sur la fixation de la transferrine de lapin et sur l'incorporation du fer par les réticulocytes de lapin. Ils voient alors une forte inhibition de l'incorporation du métal dans les cellules, mais pas de la fixation de la sérotransferrine sur les réticulocytes. Ils en concluent que la lectine se fixe sur les glycannes membranaires et probablement même sur ceux du récepteur de la sérotransferrine, empêchant ainsi tout transfert du métal. Par contre, la fixation de la sérotransferrine aux membranes des réticulocytes serait toujours possible grâce à l'intervention de la lectine qui peut aussi fixer la transferrine.

En 1976, Hemmaplardh et Morgan montrent que l'enlèvement des acides sialiques de la membrane des réticulocytes au moyen d'une neuraminidase, n'empêche ni la fixation de la sérotransferrine, ni le transfert du métal. L'étude préalable réalisée par Jandl et al., en 1959, et concernant la modification des acides sialiques de la membrane des réticulocytes par action du periodate de potassium avait fourni des résultats du même type. Ce traitement provoque seulement une diminution de 27 % de l'incorporation du fer dans les cellules.

β) Influence de la partie protéique du récepteur

Jandl et al., en 1959, ont prouvé qu'après digestion trypsique effectuée sur la membrane des réticulocytes, il n'y avait plus de transfert du métal dans la cellule par la sérotransferrine ; les auteurs avaient vérifié que les réticulocytes avaient néanmoins conservé une certaine intégrité.

Hemmaplardh et Morgan en 1976 reprennent ces études et voient que le traitement des réticulocytes par la trypsine et la pronase altère les propriétés du récepteur qui ne peut plus reconnaître la sérotransferrine. Les auteurs ont vérifié aussi qu'aucune modification morphologique des cellules n'intervient à la suite de l'hydrolyse enzymatique et que le métabolisme interne du fer semble inchangé. Les mêmes auteurs étudient également le relargage de la protéine de ses sites spécifiques et concluent que la fixation et le relâchement de la sérotransferrine par la cellule se font pas endocytose et exocytose, et que l'étape première est obligatoirement une fixation au récepteur. Mais on ne peut conclure si l'action des enzymes protéolytiques a concerné directement le récepteur ou si ce dernier a été détaché de la membrane ou bien dégradé.

D'autre part, l'exposition des réticulocytes aux agents bloquant les groupements thiols, abolit la fixation de la sérotransferrine et l'incorporation du fer dans les cellules (Edwards et Fielding, 1971). Ce traitement inhibe aussi le relargage de la transferrine déjà liée aux récepteurs (Baker et Morgan, 1969). Un tel effet peut provenir d'une altération de la structure de la membrane plutôt que d'une modification de la structure des récepteurs, ainsi que l'ont montré Speyer et Fielding en 1974.

c) Participation d'autres facteurs

Nous en arrivons donc à considérer les autres facteurs pouvant intervenir dans l'interaction.

a) Intégrité de la membrane

Nous avons déjà vu qu'aucune des expériences réalisées sur les réticulocytes ne permet de conclure que c'est directement le récepteur qui a été touché. A chaque fois, il faut envisager l'hypothèse que les composés adjacents aux récepteurs ont pu être atteints et que cela suffit à altérer les propriétés du récepteur. Ce fait a d'ailleurs été confirmé par des expériences réalisées sur les "ghosts" en 1974 par Morgan et Baker. Les auteurs ont vu que ces morceaux de membrane ne présentaient plus de spécificité vis-à-vis de la sérotransferrine. L'intégrité de la membrane semble essentielle pour le maintien des propriétés du récepteur.

Puis en 1977, Hemmaplardh et al., ont montré que la composition en phospholipides de la membrane des réticulocytes, influençait l'interaction de la transferrine avec son récepteur, les processus d'endocytose et d'exocytose et le mécanisme d'incorporation du fer dans la cellule. De plus, à cause de l'inhibition de l'incorporation de la transferrine dans la cellule, observée par Hemmaplardh et al., en 1974 lorsqu'ils emploient

des agents inhibant le fonctionnement des microtubules, et du fait que le Ca^{++} semble impliqué dans les processus d'endocytose et d'exocytose et dans le fonctionnement des microtubules (Douglas, 1974), Hemmaplardh et Morgan en 1977 (b), ont voulu vérifier le rôle du Ca^{++} dans l'interaction sérotransferrine-réticulocyte. Ils ont, pour cela, employé des agents chélateurs du Ca^{++} (EDTA, EGTA) et ont vu que les membranes des cellules avaient besoin de Ca^{++} pour la fixation de la transferrine aux récepteurs des réticulocytes. Par contre, la concentration intracellulaire en Ca^{++} ne semble pas jouer sur la fixation de la sérotransferrine ni sur l'incorporation du fer. En effet, ces deux mécanismes dépendent aussi de la présence de certains métabolites dans la cellule.

β) Métabolites cellulaires

Les agents interférant avec les métabolites inergétiques provoquent plus un abaissement de l'incorporation du fer qu'une diminution de la fixation de la sérotransferrine (Baker et Morgan, 1969). Cela semble dû à une interférence avec la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie, plutôt qu'à une simple décroissance du taux cellulaire d'ATP, puisque l'incorporation du fer diminue avant que les stocks d'ATP de la cellule ne soient épuisés. Puis Egyed en 1977 montre que le départ du fer de la sérotransferrine est un processus qui nécessite l'interaction entre la membrane et l'ATP. Ce dernier serait donc directement impliqué dans le transfert du métal. Ces résultats ont été confirmés par Kailis et Morgan en 1977, qui voient, en outre, la fixation de la sérotransferrine aux réticulocytes inhibée seulement pour des taux très faibles d'ATP. Les auteurs n'excluent donc pas que la fixation de la glycoprotéine aux récepteurs soit aussi un processus APT-dépendant, mais à un taux moindre que ne l'est la fixation du fer à la sérotransferrine.

Egyed en 1974 avait postulé que le NADH était indispensable à l'incorporation du fer par les cellules, car il servirait à l'étape obligatoire de réduction du fer ferrique en fer ferreux, lors du transfert du métal à l'accepteur intracellulaire. Mais Kailis et Morgan en 1977 se sont aussi intéressés à l'intervention du NADH dans l'interaction sérotransferrine-réticulocyte. Les auteurs voient que ce métabolite ne semble pas intervenir comme un facteur limitant dans le mécanisme de fixation du fer par les réticulocytes.

Enfin, les chélateurs du fer s'avèrent incapables d'interférer au cours de l'échange du métal entre la transferrine et le réticulocyte (Jandl et al., 1959 ; Baker et Morgan, 1969) ni de transférer eux-mêmes le métal à la cellule (Hemmaplardh et Morgan (a), 1974).

d) Conclusions

Les mécanismes participant à l'interaction entre la sérotransferrine et les réticulocytes sont donc encore bien mal connus. Leur étude permet de dégager néanmoins certains points :

- il semble que la conformation de la sérotransferrine soit un facteur primordial de la reconnaissance entre la protéine et la cellule, et qu'un changement de conformation s'opère entre la fixation et le relargage de la sérotransferrine, en relation avec le départ du fer. La participation dans cette modification de la partie glycanique de la sérotransferrine reste encore un des points à préciser.

- l'intégrité de la membrane du réticulocyte, et probablement aussi la conformation du récepteur, ont une importance certaine dans l'interaction. Mais rien n'est encore clairement défini.

- les effecteurs métaboliques jouent également un rôle non négligeable, qu'on ne peut dissocier de ceux joués par la sérotransferrine et le réticulocyte au cours de l'interaction, et qui mériterait d'être amplement précisé.

B - LES SITES RÉCEPTEURS DE LA SÉROTRANSFERRINE AU NIVEAU DES AUTRES TISSUS

Si les récepteurs des réticulocytes ont toujours été les plus étudiés parmi les sites spécifiques des sérotransferrines, plusieurs types de récepteurs situés sur d'autres cellules, provenant de différents organes, ont été néanmoins mis en évidence et s'ils n'ont pas tous été isolés et caractérisés, les preuves de leur existence n'en ont pas moins pour autant été apportées.

Or, dans la mesure où l'on ne peut, d'après les travaux réalisés sur les réticulocytes, produire un modèle unique d'interaction transferrine-récepteur membranaire, il paraît d'autant plus intéressant d'étudier les récepteurs présents sur d'autres tissus. N'y pourrait-on trouver, en effet, des éléments de réponses aux questions qui se posent encore actuellement ?.

1 - RECEPTEUR INTESTINAL

Le fer contenu dans les aliments est, tout d'abord, absorbé par l'intestin. Le mécanisme de l'absorption est étudié en détail dans les revues générales de Forth et Rummel en 1973 et de Turnbull en 1974.

C'est dans l'entérocyte, cellule intestinale dont la bordure en brosse est en contact direct avec les aliments, que le fer pénètre avant d'être livré à la sérotransferrine du plasma. Un tel mécanisme, par lequel le métal traverse la cellule, suggère l'existence de deux types de récepteurs : l'un aurait trait à l'absorption du fer dans l'entérocyte, alors que l'autre permettrait le passage du métal de la cellule dans le plasma.

Huebers et al., en 1974, ont montré l'existence, mais uniquement chez le rat déficient en fer, de récepteurs spécifiques de la sérotransferrine, au niveau de la bordure en brosse. Par contre, Cox et al., en 1979, ont mis en évidence l'existence de récepteurs spécifiques de la lactotransferrine sur la bordure en brosse des cellules intestinales humaines et ont montré que ces récepteurs ne reconnaissaient pas la sérotransferrine.

D'autre part, Lévine et al., ont vu, en 1972, que l'apo-sérotransferrine peut se fixer "in vitro" de manière sélective, à l'entérocyte, suggérant, là aussi, l'existence de récepteurs spécifiques qui permettraient le relargage du fer de la cellule dans le plasma.

En fait, le mécanisme de l'absorption du fer est encore très mal connu et son étude n'apporte pas beaucoup de lumières aux problèmes posés par les récepteurs. Par contre, du fait que le fer absorbé traverse la cellule, véhiculé à l'intérieur des entérocytes par des protéines chélatrices, cela en fait un système d'étude intéressant. Les recherches, concernant ces chélateurs, sont nombreuses mais l'accord est encore loin d'être fait, notamment sur le rôle de ces protéines dans la régulation de l'absorption du fer et sur leur relation avec les transferrines. En effet, Pollack et Lasky en 1975, Huebers et al., en 1976, Halliday et al., en 1976 et Kaufman et al., en 1977, ont tous isolé à partir de la muqueuse intestinale de rat ou de cobaye deux protéines fixant le fer. L'une d'elles a été identifiée à l'unanimité à la ferritine. Par contre, l'autre est considérée suivant les auteurs soit comme une contamination par la sérotransferrine (Halliday et al.) soit comme une transferrine, mais différente de la sérotransferrine (Huebers et al.) soit enfin, comme une protéine composée de deux sous-unités de masse moléculaire 40.000 donc n'étant ni la sérotransferrine, ni la lactotransferrine (Pollack et Lasky).

Il reste néanmoins acquis, que la majorité du métal absorbé pénètre dans le plasma et que la sérotransferrine peut alors le diriger soit vers les formes actives soit vers les formes de réserve.

2 - RECEPTEUR HEPATIQUE

C'est principalement dans le foie qu'est synthétisée la sérotransferrine et c'est aussi dans cet organe que se situe la réserve de fer la plus importante de l'organisme, soit 30 % du métal stocké sous forme de ferritine. La sérotransferrine livre son fer uniquement aux cellules parenchymateuses du foie (Finch et al., 1975). Dans l'hépatocyte, comme dans l'entérocyte, le fer doit pouvoir pénétrer et être relargué en fonction des besoins du métabolisme. Mais, là aussi, les mécanismes par lesquels la sérotransferrine donne le métal à la cellule, puis par lesquels le fer est stocké dans l'hépatocyte et enfin relâché et repris par la sérotransferrine, sont tous très mal connus. Leur étude se trouve compliquée du fait que d'autres mécanismes d'incorporation du fer dans les cellules du foie peuvent avoir lieu, principalement à partir des systèmes hémoglobine-haptoglobine et hémopexine (Hershko et al., 1972) et que des facteurs intracellulaires interviennent tels que des réducteurs, dont l'action sur les formes ferriques semble indispensable avant tout relargage du métal, qui serait réoxydé à l'extérieur de la cellule avant d'être capté par la sérotransferrine (Mazur et Carleton, 1965 ; Lynch et al., 1974).

Néanmoins, Gardiner et Morgan en 1974 ont mis en évidence une fixation spécifique de la sérotransferrine aux hépatocytes. L'existence d'un tel récepteur a été ensuite montrée par Van Bockmeer et al., en 1975 et plus récemment, en 1979, par Gröhlich et al., Ces derniers confirment, en outre, que les sites spécifiques de la

sérotransferrine, situés à la surface des cellules ne représentent qu'un des moyens par lesquels l'hépatocyte peut incorporer le fer : des phénomènes de diffusion peuvent, par ailleurs, intervenir même dans le cas du fer lié à la transferrine.

Les études de Beamish et al., en 1975 et de Baker et al., en 1975, concernant plus particulièrement le relargage du fer des hépatocytes ne permettent pas de conclure quand aux mécanismes mis en jeu. Les auteurs ne rejettent cependant pas l'hypothèse de l'intervention d'un récepteur de la sérotransferrine.

Enfin, pour Munro et Linder, en 1978, l'absorption du fer dans les hépatocytes implique la pénétration de la sérotransferrine dans les cellules, ce qui est confirmé par Gröhlich et al., en 1979. Mais les études récentes de Milson et Batey en 1979, montrent que seule la sérotransferrine dénaturée est pinocytée.

Le problème de l'internalisation de la transferrine dans les cellules ne semble pas mieux résolu pour les hépatocytes que pour les réticulocytes. Dans les deux cas, le soin apporté dans le choix et dans l'emploi des méthodes d'investigation est particulièrement important et de ce point de vue, les cellules du foie ne sont peut-être pas un système d'étude idéal pour cette question délicate que pose la pénétration de la transferrine : les hépatocytes semblent en effet faire appel à plusieurs mécanismes divers et simultanés d'incorporation du fer.

3 - RECEPTEUR PLACENTAIRE

Depuis les premières études réalisées in vitro par Bothwell et al., en 1958 sur le lapin, il a été démontré chez beaucoup d'autres mammifères que, pendant la gestation et, plus spécialement, au cours des derniers stades, la majeure partie du fer liée à la sérotransferrine est dirigée vers le placenta afin de pourvoir aux besoins du fœtus.

Les mécanismes mis en jeu dans ce processus sont évoqués dans la revue de Morgan en 1974 : le fer amené par la sérotransferrine maternelle est relargué dans le placenta, puis, une fois parvenu dans la circulation foetale, il se réassocie à la sérotransferrine foetale qui le distribue aux tissus foetaux. Donc là encore, on peut s'attendre à trouver deux types de récepteurs placentaires de la glycoprotéine : au niveau de la circulation maternelle et au niveau de la circulation foetale. Mais jusqu'alors seule la première étape de transfert du métal au placenta a été étudiée et la participation, dans de tels mécanismes, de sites spécifiques de la sérotransferrine a été soupçonnée dès 1969 par Baker et Morgan. Mais il faut attendre 1975 et les études de Van Bockxmeer et al., pour voir détectée la présence d'un tel récepteur dans le placenta de rat. Puis King en 1976 a localisé, par des méthodes immunochimiques, des sites spécifiques de la sérotransferrine au niveau du trophoblaste syncytial du placenta, c'est-à-dire au niveau d'un tissu directement en contact avec le sang maternel et représentant la première barrière placentaire. Ces résultats viennent d'être confirmés par Galbraith et al. (a), en 1980, qui utilisent des méthodes de marquage par immunofluorescence.

Ce n'est que récemment que plusieurs groupes de chercheurs ont pu isoler et caractériser des récepteurs du placenta humain, spécifiques de la sérotransferrine. En 1979, Seligman et al., trouvent à partir d'un homogénat placentaire total, un récepteur de masse moléculaire 150.000, qui serait constitué de deux sous-unités de masse moléculaire 90.000 et qui serait immunologiquement identique au récepteur de la sérotransferrine situé sur les réticulocytes. Wada et al., en 1979, étudient des vésicules qu'ils préparent à partir des microvillosités de la membrane des trophoblastes baignant dans le sang maternel. Ils en isolent un récepteur de masse moléculaire 90.000, de nature protéique, et qui serait différent de celui

- également spécifique de la sérotransferrine- que l'on trouve dans le foie et le rein. Loh et al., en 1980, partant du même système que les auteurs précédents, détectent, eux, un récepteur d'une masse moléculaire de 230.000, mais qui semble pouvoir se dissocier en un composé majeur de masse moléculaire 90.000.

Les résultats obtenus pour les isollements des récepteurs du placenta font preuve de plus d'homogénéité que ceux concernant les réticulocytes. En effet, il faut remarquer que les auteurs ne travaillent pas tous sur un système totalement comparable et que même quand tel est le cas, ils n'emploient pas des méthodes d'isolement identiques. Néanmoins, dans les trois cas cités, il apparaît une constante : l'existence d'un composé membranaire de masse moléculaire 90.000, ayant trait à la fixation spécifique de la sérotransferrine sur le placenta. Ces résultats accréditent la théorie de Light (1977), selon laquelle l'hétérogénéité des récepteurs observée sur les réticulocytes, proviendrait d'une hétérogénéité des stades cellulaires observés : dans le placenta, les cellules du trophoblaste syncytial sont toutes au même stade de différenciation ; la diversité des résultats obtenus sur ce tissu proviendrait seulement de la différence des méthodes d'investigation. Aussi est-elle moins importante.

4 - RECEPTEURS DE LA SEROTRANSFERRINE SUR LES AUTRES TISSUS

La fonction de la sérotransferrine est d'amener du fer à tous les tissus à travers tout l'organisme. Mais, en dehors des cellules que nous venons d'étudier, le turn-over est si petit que les mesures cinétiques sont difficiles, voire impossibles. Aussi peu d'études ont été faites dans ce domaine. C'est seulement par l'emploi de marqueurs radioactifs et immunochimiques que l'on peut détecter à la surface des

cellules, la présence de récepteurs spécifiques de la sérotransferrine. Aussi Van Bockxmeer et al., en 1975, ont pu localiser de tels récepteurs sur le foie, la rate, le rein et la moelle osseuse de lapin.

Parallèlement, depuis la découverte que la sérotransferrine peut donner son fer à des cellules humaines en culture (Hemmaplardh et Morgan, 1974) puis que cette glycoprotéine est un facteur de croissance nécessaire à différentes lignées cellulaires (Hayashi et Sato, 1976), beaucoup d'études ont été poursuivies dans le sens, suggérant un rôle important de la transferrine dans le métabolisme d'un grand nombre de cellules. Mais ce rôle reste encore obscur.

Ainsi, Hamilton et al., en 1979 et en 1980, et Wada et al., en 1979, tirant parti du fait que les cellules trophoblastiques présentent des propriétés communes avec les cellules néoplastiques (en particulier toutes deux échappent au système immunitaire et présentent une croissance rapide) utilisent des anticorps formés contre la membrane des cellules trophoblastiques placentaires, pour déterminer les antigènes communs à diverses lignées cellulaires et à différents tissus. Ils en concluent que les récepteurs placentaires de la sérotransferrine se retrouvent sur beaucoup de cellules en culture, ce qui prouve l'universalité du transporteur qu'est la transferrine dans tous les tissus présentant une croissance rapide. En effet, les récepteurs du foie et du rein ne présentent pas les mêmes propriétés antigéniques que ceux du récepteur placentaire. Pour les auteurs, cette observation trouve son explication dans le fait que foie et rein sont des tissus dans un état de repos et qu'ils ne nécessitent pas autant de transfert du fer que les tissus placentaires ou les cellules de la lignée érythropoïétique ou encore les cellules transformées dont le turn-over est plus rapide. Et cela

expliquerait que l'on puisse trouver divers types de récepteurs de la sérotransferrine suivant les tissus.

Galbraith et al. (b), en 1980, étudient aussi des cellules transformées et montrent l'existence de sites spécifiques de la sérotransferrine sur les membranes de cellules humaines en culture, provenant de différents tissus. Ils s'intéressent en particulier, à des cellules lymphoblastoïdes sur lesquelles des récepteurs de la sérotransferrine avaient été déjà mis en évidence et étudiés par Larrick et Cresswell en 1979 (a). Ces derniers ont également vu que de tels récepteurs existent déjà sur les lymphocytes B et T normaux mais que leur nombre augmente considérablement à la surface des cellules au cours de la transformation (Larrick et Cresswell, 1979, (b)). Hu et al., en 1977 voient aussi une augmentation du nombre des récepteurs de la sérotransferrine, sur des cellules transformées de la lignée erythropoïétique, au cours d'une différenciation provoquée par un agent chimique. Mais ces résultats ne sont pas retrouvés par Glass et al., en 1978, qui travaillent pourtant sur le même système. Cette contradiction pose précisément le problème de la fiabilité des cellules en culture. Pour Glass et al., il y aurait au cours de la différenciation, induction d'un nouveau mécanisme de transfert du fer à travers la cellule, ne faisant pas intervenir les récepteurs de la sérotransferrine. Il faut noter toutefois que les auteurs trouvent davantage de sites spécifiques de la glycoprotéine sur les cellules transformées que sur les cellules normales jeunes.

Philips (1976) avait déjà constaté une fixation spécifique de la sérotransferrine aux lymphocytes humains, mais il montre que la glycoprotéine leur transfère du zinc, métal nécessaire au métabolisme des acides nucléiques. Plus récemment Larson et al., en 1980 et Wong et al., en 1980, constatent que des cellules tumorales peuvent

capter Fe et Ba à partir de la sérotransferrine et cela, par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

Il semble donc se dégager un processus général : les cellules à turn-over rapide ont besoin, pour leur croissance, de cofacteurs (Fe, Zn, Ba) . La transferrine serait susceptible de leur fournir ces métaux et des récepteurs spécifiques de la glycoprotéine apparaîtraient à la surface des cellules pour permettre le transfert.

Pour Galbraith et al.(b), en 1980, les récepteurs de la sérotransferrine joueraient aussi un rôle dans les propriétés immunologiques des cellules transformées, en permettant par fixation de la glycoprotéine sur ces sites, un masquage des antigènes portés par les cellules et étrangers à l'organisme, d'où la non reconnaissance par le système immunitaire.

Bien des points sont donc encore à élucider dans ces mécanismes, mais les cultures de cellules fournissent des modèles d'étude intéressants, sur lesquels on peut, par exemple, plus facilement que sur l'animal entier, faire agir sélectivement des drogues, des agents chimiques. Donc pour l'instant, il y a encore peu de relations établies entre les divers sites spécifiques de la sérotransferrine sur les différents tissus de l'organisme. Cependant, il faut rappeler à ce sujet, l'hypothèse qu'émirent Fletcher et Huehns en 1967 et 1968.

5 - HYPOTHESE DE FLETCHER-HUEHNS

Cette hypothèse apporte une réponse au problème posé par l'hétérogénéité des récepteurs reconnus par la sérotransferrine, en proposant une hétérogénéité des sites de fixation du fer sur la glycoprotéine. En effet, pour Fletcher et Huehns, la sérotransferrine serait capable de céder sélectivement le fer de l'un de ses sites (site A) aux cellules érythropoïétiques et du placenta, alors que l'autre site (site B)

ne donnerait le métal qu'aux cellules capables de le stocker (surtout, donc, au foie) et aux cellules intestinales. L'hypothèse schématisée dans la figure 9 p. 67, repose sur les expériences de Fletcher et Huehns en 1968, Hahn en 1973, Zapolski et al., en 1974, et Chernelch et Brown en 1970, qui ont montré une capacité différente des deux sites à donner leur fer. Mais d'autres expériences contredisent cette théorie. En effet, Harris et Aisen en 1975, montrent que la sérotransferrine humaine donne indifféremment le fer fixé sur ses deux sites aux réticulocytes humains. Les mêmes auteurs tirent la même conclusion de leurs études réalisées sur le système réticulocyte - sérotransferrine de lapin. Par contre, dans un système hétérologue (sérotransferrine humaine-réticulocyte de lapin), il y a hétérogénéité des sites.

Cependant, le développement des techniques de marquage sélectif des deux sites de fixation du fer et l'obtention de fragments de la sérotransferrine ne comportant plus qu'un seul ion métallique, doivent permettre d'apporter des éléments de réponse.

En effet, Awai et al., en 1975, utilisant un marquage des deux sites par deux isotopes différents du fer, montrent, "in vivo" et "in vitro" sur un système homologue sérotransferrine-réticulocyte de rat, que l'un des sites permet l'incorporation du métal sur l'érythrocyte, la moëlle osseuse, la rate et le placenta, alors que l'autre fournit son fer à l'hépatocyte et à l'intestin. Il faudrait pouvoir vérifier ainsi l'hypothèse sur d'autres espèces, mais il n'est pas toujours possible de marquer sélectivement les deux sites de fixation du fer.

D'autre part, récemment, Esparza et Brock en 1980, parvenant à couper la sérotransferrine bovine en deux fragments monoferriques, ont pu étudier leur interaction avec des réticulocytes de lapin et ont vu que, si les deux domaines étaient encore capables de céder leur fer

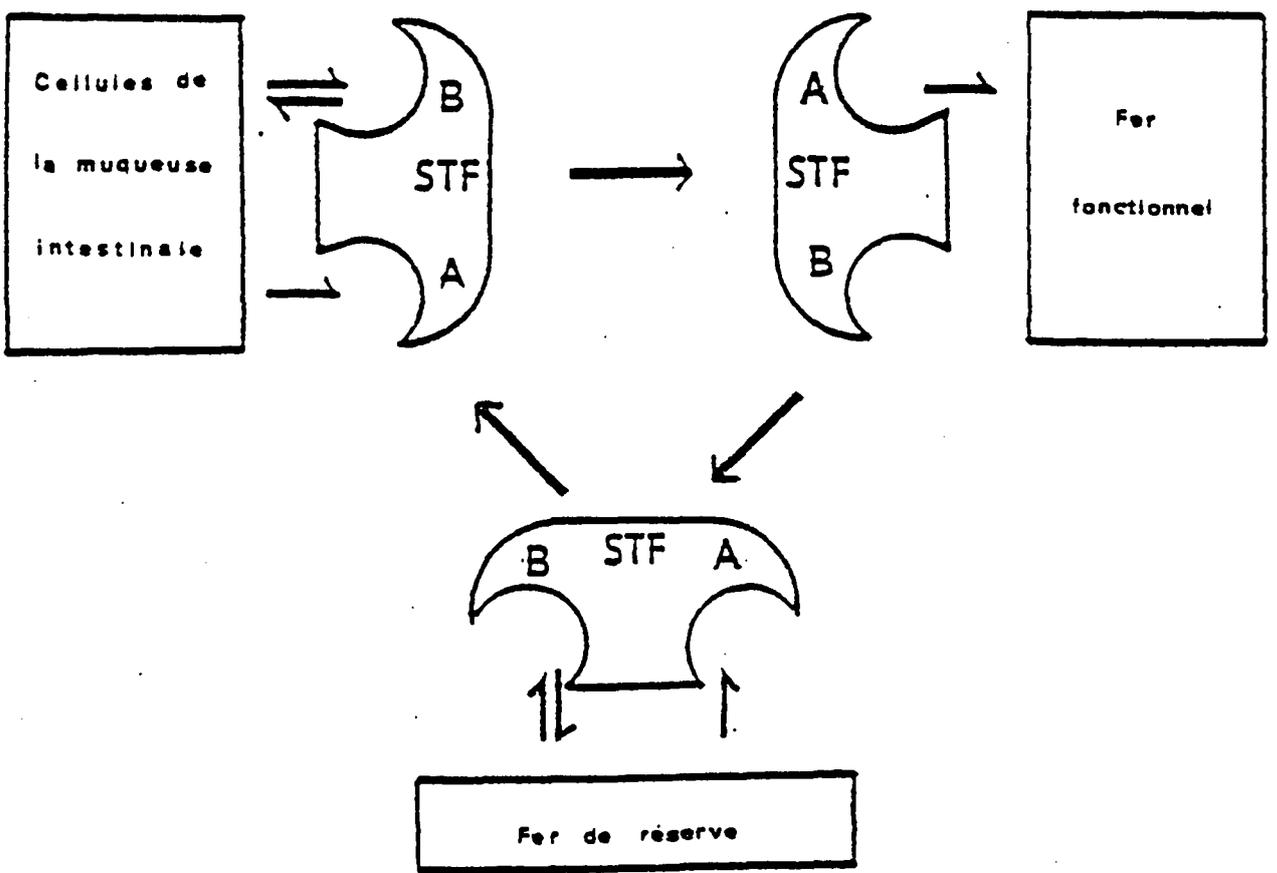


Figure 9

Hypothèse de FLETCHER et HUEENS, 1968 concernant la différence fonctionnelle des deux sites de fixation du fer de la sérotransferrine



à ces cellules, c'était néanmoins avec un rendement très faible. Mais qu'en serait-il sur un système homologue ?.

L'hypothèse de Fletcher et Huehns reste donc toujours séduisante et d'actualité.

C - LES SITES RÉCEPTEURS DES AUTRES TRANSFERRINES

1 - LACTOTRANSFERRINE

Récemment, Cox et al., en 1979, partant de l'observation que la lactotransferrine est le principal chélateur du fer dans le lait humain, cherchaient à mettre en évidence des sites de fixation de cette glycoprotéine à la surface des cellules intestinales. Ils ont pu ainsi prouver l'existence, au niveau de la bordure en brosse de l'intestin humain, de récepteurs spécifiques de la lactotransferrine, et ont vu que la sérotransferrine n'était pas reconnue par ces récepteurs.

D'autre part, Van Snick et al., en 1976 montraient la présence d'un récepteur spécifique de la lactotransferrine sur les macrophages. En effet, lors d'une inflammation, il semble que l'apolactotransferrine soit libérée des leucocytes neutrophiles (Van Snick et al., 1977) et capte alors le fer de la sérotransferrine présente dans le plasma, provoquant ainsi une anémie ferriprive néfaste à la survie des agents infectieux. Puis la lactotransferrine saturée en fer irait reconnaître les macrophages et leur livrer le métal qui serait alors stocké dans la ferritine.

La lactotransferrine intervient donc dans l'organisme, outre par son activité bactériostatique, dans une fonction liée à la nutrition du nourrisson.

2 - OVOTRANSFERRINE

Cette transferrine ne semble pas présenter non plus, uniquement une activité bactériostatique (Alderton et al., 1946). Elle peut aussi donner son fer aux cellules sanguines de l'embryon susceptibles de synthétiser l'hémoglobine. Witt et Woodworth en 1975, utilisant une approche originale pour étudier les sites spécifiques de ces cellules, ont fixé covalamment un photoanalogue sur l'ovotransferrine pour isoler le complexe. Le récepteur ainsi obtenu présente une masse moléculaire de 35.000. Ces travaux confirment encore une fois l'hypothèse de Light (1977) selon laquelle, si l'on s'attache à éviter la formation d'aggrégats au cours de l'isolement des protéines de membranes, on peut mettre en évidence des récepteurs de la sérotransferrine de petite masse moléculaire. Mais Van Bockxmeer et Morgan en 1979, ont entrepris une étude comparative des interactions transferrines-récepteurs provenant de différentes espèces. Ils en concluent que, bien que l'ovotransferrine soit reconnue et liée par les récepteurs des cellules sanguines de l'embryon de poulet, elle ne présente pas d'affinité pour les récepteurs des réticulocytes de mammifères. Il est peut-être, compte-tenu de ces observations, audacieux de comparer les résultats obtenus par Witt et Woodworth en 1975 à ceux de Light en 1977 sur différentes cellules, bien que tous s'attachent à utiliser des méthodes d'isolement très précises.

Il paraît donc, pour l'instant, délicat de faire des rapprochements entre les différents sites spécifiques des différentes transferrines sur différents tissus, bien que les glycoprotéines présentent beaucoup de propriétés structurales en commun et soient toutes capables de reconnaître spécifiquement des cellules cibles.

CONCLUSIONS

Au cours du chapitre des généralités, nous avons pu voir combien le champ des investigations est large en ce qui concerne l'étude des transferrines : leur rôle dans le métabolisme du fer, leurs propriétés structurales, leur interaction avec les récepteurs cellulaires sont autant de vastes domaines encore actuellement exploités et dont l'étude suscite toujours de l'intérêt. Car nous avons pu constater aussi que les résultats sont fragmentaires et bien souvent préliminaires, en particulier sur tout ce qui concerne l'interaction entre les transferrines et leurs récepteurs cellulaires. Même si l'on considère le système le mieux étudié jusqu'alors, à savoir : sérotransferrine-récepteur des réticulocytes, les connaissances acquises dans ce domaine ne permettent toujours pas d'établir un modèle unique et précis d'interaction. Le mécanisme intime de cette interaction est lui-même, encore très mal connu. Ainsi, la participation des glycanes de la sérotransferrine dans la reconnaissance de la glycoprotéine par son site spécifique sur la cellule n'a jamais été clairement définie. En effet, l'intervention des oligosaccharides en tant que signaux de reconnaissance portés par les glycoprotéines vis-à-vis de récepteurs cellulaires, n'est plus à démontrer. Pour ne citer qu'un exemple, Ashwell et Morell en 1974, identifiaient, sur la membrane des hépatocytes, des récepteurs qui permettent aux cellules de pinocyter les glycoprotéines désialylées du sérum et qui reconnaissent spécifiquement les résidus de galactose terminaux portés par ces asialoglycoprotéines.

En ce qui concerne la sérotransferrine, les études de Jandl et al., dès 1959, indiquaient une différence de comportement entre la glycoprotéine humaine et celle de lapin, vis-à-vis des réticulocytes de lapin : le transfert du métal est, en effet, deux fois moins important

dans le système hétérologue que dans le système homologue. Or, les propriétés structurales comparées des deux types de sérotransferrine, montrent que leur différence essentielle réside en le nombre de groupements glycaniques qu'elles portent :

- deux, pour la glycoprotéine d'origine humaine ;
- un, pour la sérotransferrine de lapin.

Comme, il a d'autre part été vu qu'un changement de conformation intervenait dans la sérotransferrine au cours du départ du fer, Montreuil et al. en 1976, ont proposé une hypothèse selon laquelle les glycannes des sérotransferrines se comporteraient comme des antennes, responsable de la reconnaissance des glycoprotéines par la cellule cible. Un schéma en est donné dans la figure 10 p. 72.

Sur la base de cette hypothèse, des travaux ont été entrepris au laboratoire afin de déterminer le rôle éventuel du glycanne de la sérotransferrine de lapin dans son interaction avec le récepteur situé sur les réticulocytes de lapin. En effet, les études entreprises jusqu'alors dans ce domaine, n'avaient été faites que sur un système hétérologue, ce qui rend délicat l'interprétation des résultats, si l'on en juge d'après les différences d'incorporation du fer observées entre un système homologue et un système hétérologue.

Ainsi, Léger et al., en 1978, ont-ils isolé la sérotransferrine de lapin, déterminé la structure de son glycanne et entrepris des études de l'interaction entre la glycoprotéine et les réticulocytes, dans le but de rechercher la participation des groupements glycaniques dans ce mécanisme.

L'un des moyens employés afin de mettre en évidence la participation des oligosaccharides lors d'une interaction glycoprotéine-

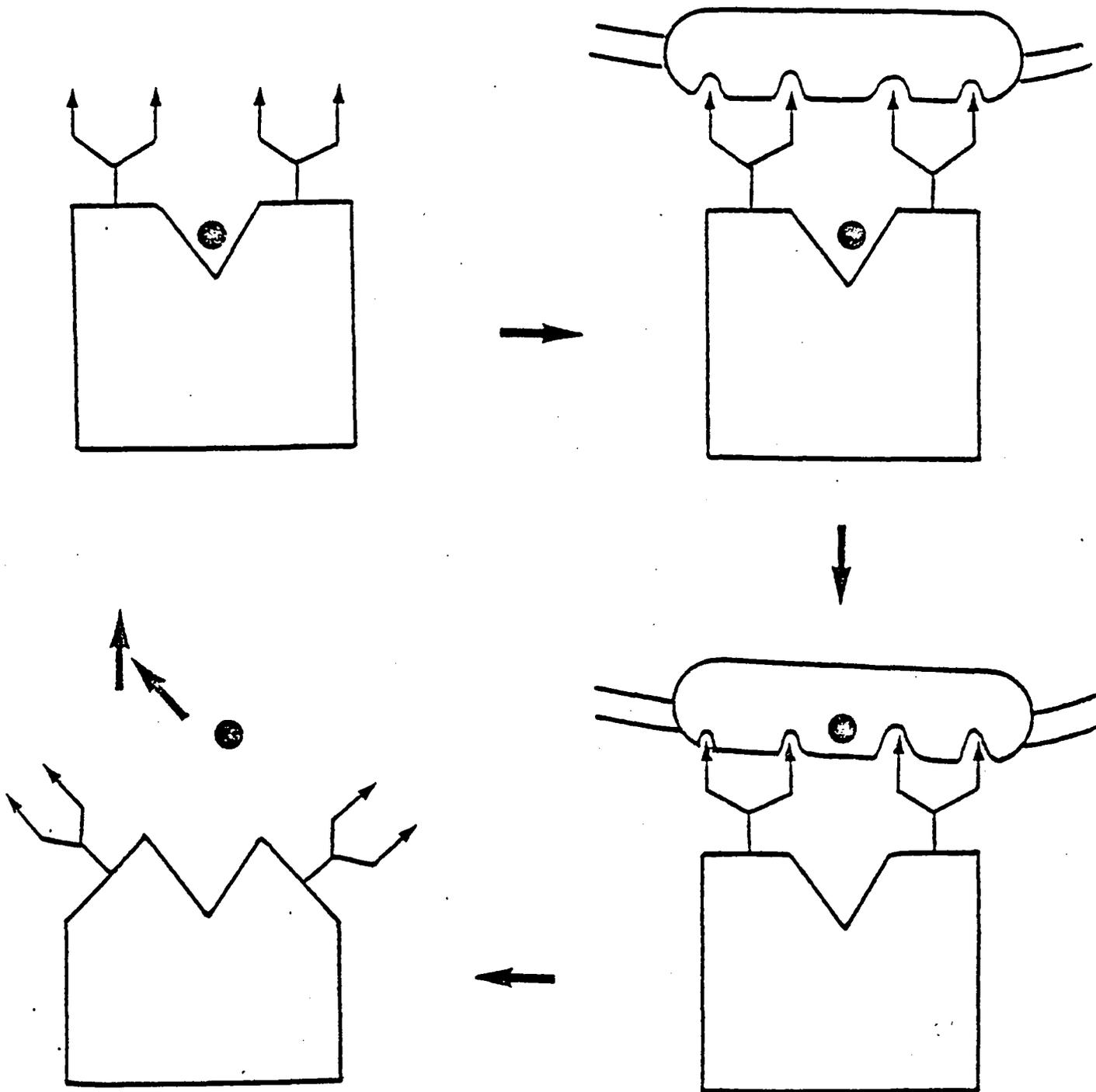


Figure 10

Rôle des glycanes dans la reconnaissance du réticulocyte,
d'après MONTREUIL et al., 1976.

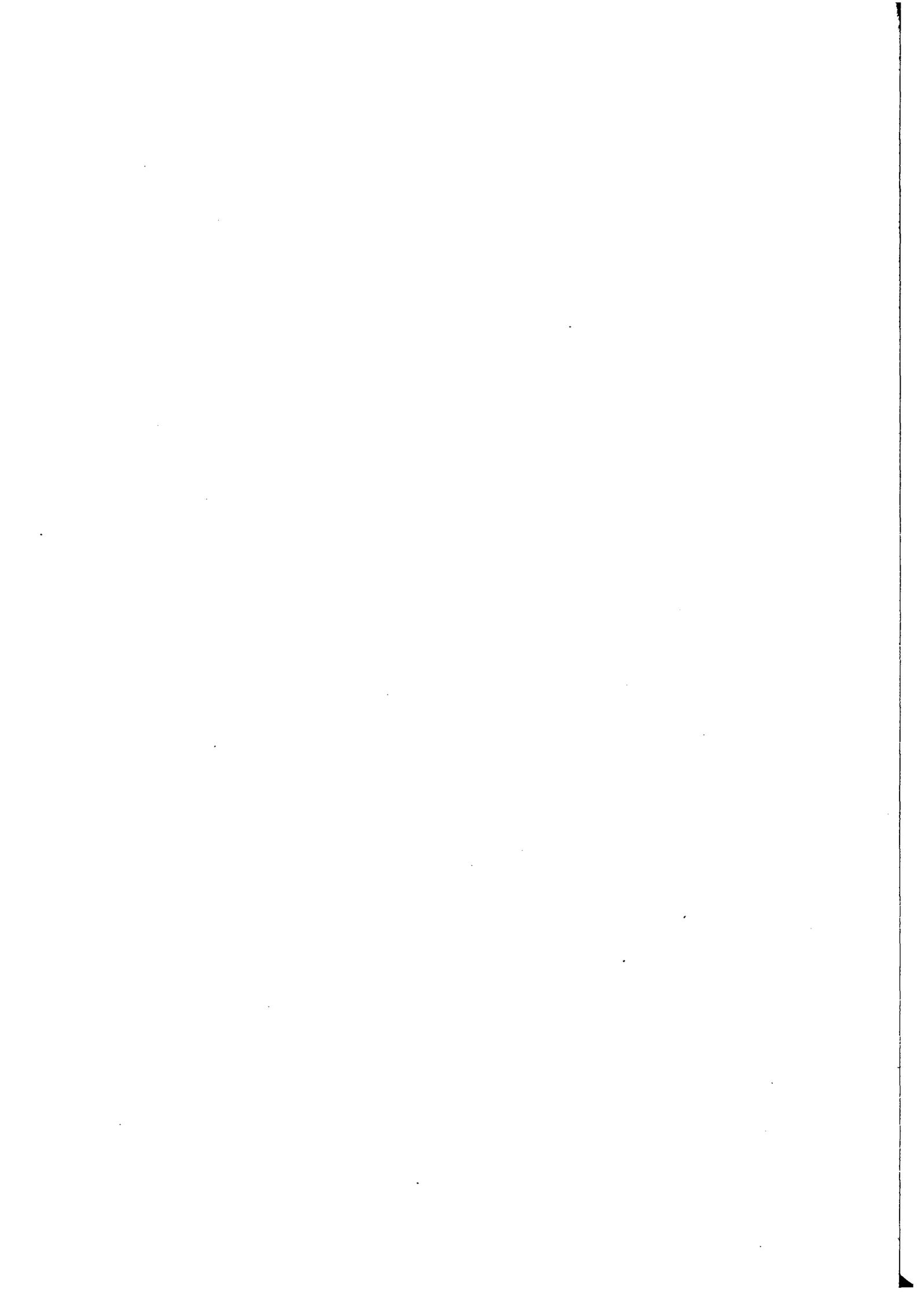


récepteur cellulaire, est l'étude du comportement de composés glycaniques en tant qu'inhibiteurs. De telles expériences ont été déjà mises au point au laboratoire sur le système qui nous intéresse par Tordera, en 1978. En effet, il a déterminé les conditions d'incubation de la sérotransferrine et des réticulocytes de lapin, pour lesquelles il est possible d'observer une inhibition de l'incorporation du fer par les cellules, après addition d'un glycopeptide dans l'incubat. L'auteur a employé, en tant qu'inhibiteurs, des glycopeptides pronasiques ou trypsiques isolés de la sérotransferrine humaine ou de lapin, portant donc le même glycanne que celui de la sérotransferrine de lapin. Les résultats montrent qu'il faut employer des concentrations d'au moins 150 M excès par rapport à la sérotransferrine, pour commencer à observer une inhibition de l'incorporation du fer ; cela peut expliquer pourquoi Kornfeld en 1968, ayant fait le même type d'études, bien que sur un système hétérologue sérotransferrine humaine-réticulocytes de lapin, n'a observé aucun effet inhibiteur : il n'a pas utilisé des concentrations en glycopeptides supérieures à 130 M excès par rapport à la sérotransferrine. De plus, Tordera n'a pu, même pour des concentrations en inhibiteur de 5000 M excès par rapport à la glycoprotéine, empêcher la fixation de cette dernière aux réticulocytes. D'autre part, un mélange de monosaccharides, ajouté au milieu d'incubation, dans des proportions identiques à celles trouvées dans le glycopeptide, n'a pas provoqué d'inhibition de la fixation de la sérotransferrine ni du transfert du métal, pour les concentrations où le glycopeptide intervient. Cela tendrait à prouver, malgré les grandes concentrations en glycopeptides employées pour observer une inhibition, qu'il s'agit néanmoins d'un processus spécifique et non d'un artéfact dû à l'utilisation de quantités importantes d'inhibiteurs. D'ailleurs aucun effet n'a pu être observé par l'emploi d'un glycopeptide portant un glycanne différent

de celui de la sérotransferrine, puisque de type oligomannosidique. De tous ces résultats, l'auteur en a conclu que, l'inhibition de l'incorporation du fer, rencontrée lors de l'interaction entre la sérotransferrine et les réticulocytes de lapin en présence de glycopeptides de type N-acétyllactosaminique, provenait d'une intervention du glycanne au cours de l'interaction. Tordera a suggéré, en outre, que le glycanne interviendrait non dans la reconnaissance de la glycoprotéine par le récepteur, mais uniquement dans le transfert du métal à la cellule, puisque seule cette dernière étape peut être inhibée par l'emploi de glycopeptides. Enfin, la présence de résidus d'acide sialique terminaux portés par le glycanne de la sérotransferrine ne semble pas nécessaire ni à la fixation de la glycoprotéine à la cellule, ni à l'absorption du fer.

Compte-tenu de ces résultats, il nous a paru intéressant de poursuivre ce type d'études et de préciser si le glycanne de la sérotransferrine jouait effectivement un rôle dans l'interaction de la glycoprotéine avec le récepteur et si oui, à quel niveau. Pour cela, nous disposons de plusieurs méthodes d'investigations :

- Etude du comportement d'oligosaccharides de structure connue, en tant qu'inhibiteurs du transfert par la sérotransferrine ;
- Déglycosylation chimique et enzymatique de la sérotransferrine ;
- Fixation d'un marqueur de spin sur le glycanne de la sérotransferrine, afin d'en étudier la mobilité par R.P.E..



TRAVAUX PERSONNELS

ESSAIS D'INHIBITION DU TRANSFERT DU FER SUR LES RETICULOCYTES
PAR L'UTILISATION DE GLYCOPEPTIDES ET D'OLIGOSACCHARIDES

A - INTRODUCTION

Nous avons voulu, dans un premier temps, poursuivre les travaux entrepris par Tordera en 1978. En effet, ses expériences d'inhibition du transfert du fer, par l'emploi de glycopeptides, lui ont permis de conclure que le glycanne de la sérotransferrine intervenait dans l'interaction entre la glycoprotéine et le réticulocyte. En particulier, les résultats obtenus par Tordera 1978 montraient que l'inhibition par les glycopeptides gênait plus précisément le transfert du métal et non la fixation de la sérotransferrine aux réticulocytes. Ces résultats encourageants ont orienté nos études vers la recherche de la fraction du glycanne pouvant jouer un rôle au cours de l'interaction. Nous pensions, en effet, qu'il devait être possible, en employant des oligosaccharides en tant qu'inhibiteurs de l'interaction et du transfert du métal, de cerner la zone, dans le glycanne, intervenant plus précisément dans l'interaction. On peut, en effet, supposer que, comme dans le cas des lectines qui sont capables de reconnaître un type de monosaccharide précis, au sein de la structure globale des glycoprotéines (Sharon et Lis, 1972), ainsi, le transfert du métal de la sérotransferrine dans le réticulocyte aurait lieu grâce à un mécanisme d'interaction spécifique : la cellule pourrait reconnaître une séquence particulière ou un monosaccharide précis, dans le glycanne de la sérotransferrine.

Comme nous disposions, au laboratoire, de glycopeptides de structures diverses et d'oligosaccharides qui représentent des fractions

plus ou moins importantes du groupement glycanique entier de la sérotransferrine, nous avons utilisé ces composés pour tenter d'inhiber le transfert.

B - MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 - PREPARATION DES RETICULOCYTES

L'enrichissement du sang de Lapin en réticulocytes est obtenu par 3 ou 4 saignées consécutives, tous les deux jours, d'environ 40 ml de sang prélevés à la veine interne de l'oreille.

Le dernier prélèvement du sang utilisé pour l'expérience, est effectué sur héparine, à raison de 10 U par ml de sang. Le plasma est éliminé par centrifugation à 800 g pendant 5 minutes. Puis le culot de cellules est remis doucement en suspension et lavé 3 fois par du tampon phosphate isotonique 310 mOsm pH 7,4 (dont la composition est donnée p. 81), afin d'éliminer la sérotransferrine du plasma, adsorbée sur les réticulocytes. Au cours des deux premiers lavages, la mince couche blanchâtre, constituée des leucocytes et des lymphocytes, qui se forme à la surface du culot de globules rouges, est ôtée avec précaution au moyen d'une pipette Pasteur.

Le taux de réticulocytes est déterminé au microscope après coloration des cellules du bleu de Unna. Ce taux peut être augmenté, pour les cellules servant à l'expérience, en utilisant la méthode de Murphy, 1973. Pour cela, il faut centrifuger la suspension de cellules obtenue après le dernier lavage, pendant 1 h à 4°C et à 15.000 r.p.m., dans un rotor à angle fixe (rotor de type JA₂₀ de la centrifugeuse Beckman, modèle JA₂₁). Puis, seule la partie supérieure du culot de cellules, enrichie en réticulocytes et représentant 5 p. 100 à 10 p. 100 du volume total du culot, est prélevée.

2 - PREPARATION DE LA SEROTRANSFERRINE

a) Isolement

La sérotransferrine de lapin est isolée selon le protocole décrit par Léger et al., 1978. Ce procédé est une modification des méthodes de Roop et Putman, 1967, et de Martinez-Medellin et Schulman, 1973, appliquées au sérum de Lapin. Un schéma de l'isolement, figure 11 p. 79, en rappelle les principales étapes.

b) Marquage de la sérotransferrine au ^{59}Fe

La sérotransferrine est marquée au ^{59}Fe selon la méthode de fixation du fer d'Azari et Baugh, datant de 1967.

La protéine est dissoute à raison de 10 mg/ml dans un tampon citrate-bicarbonate de sodium 0,1 M pH 8,6. Le fer est ajouté sous forme de citrate ferrique.

La solution de sel ferrique radioactive est préparée en introduisant extemporanément 2 p. 100 de $^{59}\text{FeCl}_3$ (HCl 0,1 N, 51 mCi/mg, 1 mCi/ml) dans la solution de fer froid d'Azari et Baugh, composée de 260 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ dissous dans 100 ml de tampon citrate-bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 8,6. Avant d'être ajoutée, la solution mère de fer ^{59}Fe qui contient de l'HCl, est mélangée à volume égal avec du tampon citrate-bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 10.

La protéine est saturée en fer après addition d'un volume de la solution décrite ci-dessus, correspondant à 10 p. 100 de fer en excès par rapport à la quantité nécessaire pour fixer 2 atomes de fer par molécule. Pour 10 mg d'aposérotransferrine, il faut donc ajouter 30 μl de la solution de fer radioactive, puisqu'elle contient 57 μg Fe/100 μl . La fixation du métal se produit à température ambiante au moins pendant 2 heures. Puis le mélange est déposé sur colonne de Séphadex G-25

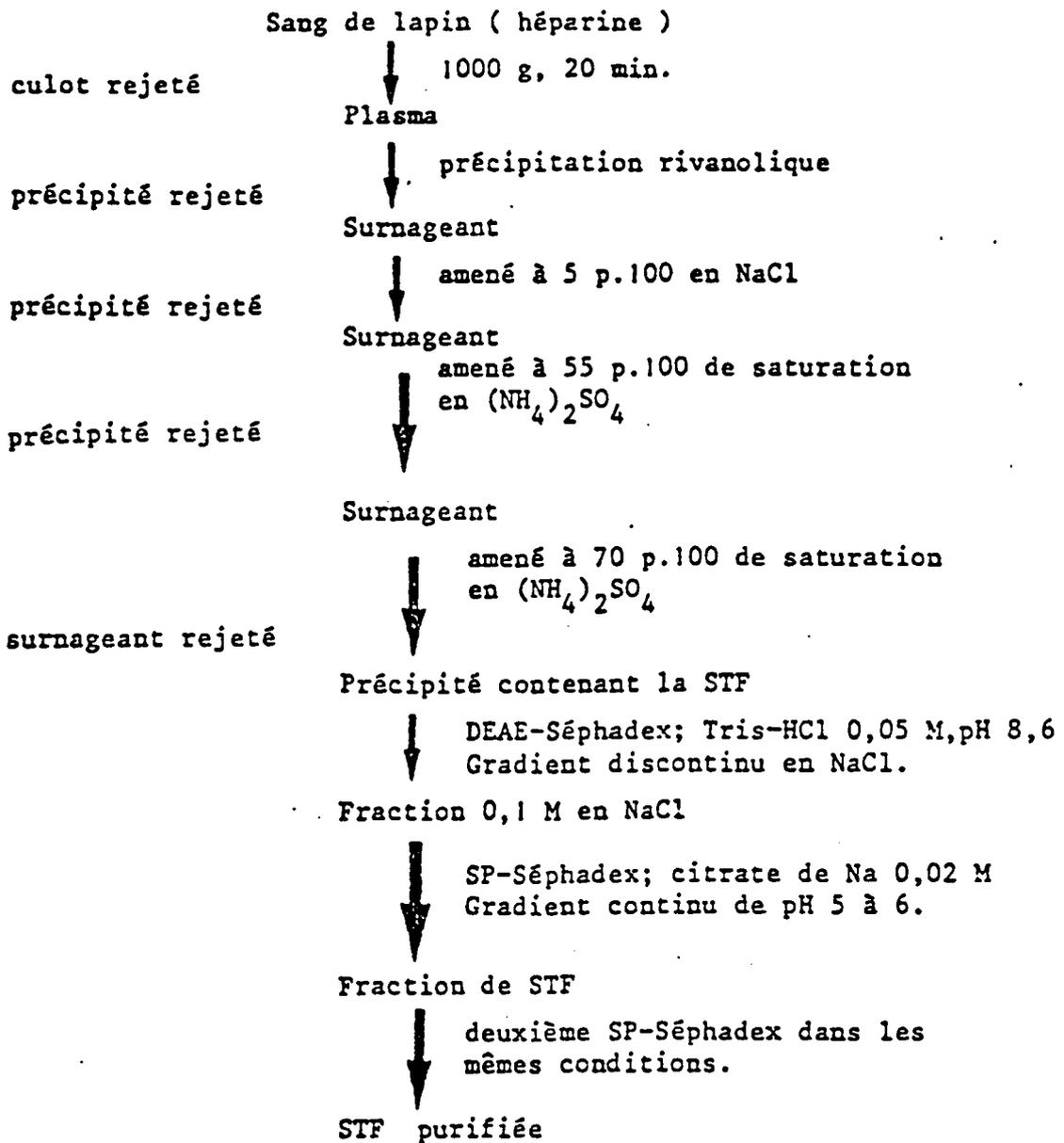


Figure 11 : Schéma d'isolement de la STF de lapin par précipitation sélective et chromatographie d'échange d'ions, selon Léger et al., 1978.



(PD-10 Pharmacia 1,5 cm x 9,5 cm) équilibré dans le tampon de Hanks et Wallace, 1949 (dont la composition est donnée p. 81) et éluée par le même tampon.

La solution de sérotransferrine marquée est ainsi débarrassée du fer en excès et dissoute dans le tampon d'incubation. Sa concentration est déterminée spectrophotométriquement, en prenant un coefficient d'absorption à 280 nm : $E \frac{1\mu.100}{1 \text{ cm}} = 11$ pour l'aposérotransferrine et $E \frac{1\mu.100}{1 \text{ cm}} = 13,8$ pour la sérotransferrine saturée en fer.

Le pourcentage de saturation en fer de la protéine peut être vérifié en calculant le rapport des absorbances à 280 nm et à 460 nm, en prenant : $E \frac{1\mu.100}{1 \text{ cm}} = 0,58$ à 460 nm pour la sérotransferrine saturée.

3 - PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES ET OLIGOSACCHARIDES

Les glycopeptides pronasiques de la sérotransferrine et de la lactotransferrine humaine, que nous avons utilisés, ont été préparés au laboratoire selon les procédés de Spik et Montreuil, 1969 et de Spik et al., 1974.

Les glycopeptides β isolés de l'ovomucoïde ont été préparés selon la méthode de Yamashina et Makino, 1962 modifiée par Monsigny et al., en 1968.

Les oligosaccharides nous ont été fournis par Gérard Strecker* . Les trisaccharides et les oligosaccharides II et III proviennent de l'urine de patients qui présentent des défauts d'enzyme intervenant dans le métabolisme des glycanes. L'oligosaccharide I a été obtenu après acétolyse de la fraction IV de Cohn.

* Nous adressons nos plus vifs remerciements à Monsieur Gérard STRECKER pour la fourniture de ces différents oligosaccharides.

Des solutions mères (120 mM ou 1,2 M suivant l'inhibiteur) sont préparées dans le tampon de Hanks et Wallace, 1949, et ajustées à pH 7,4 par de la soude 3 N, pour les glycopeptides ou oligosaccharides contenant de l'acide sialique. Elles sont ensuite soumises à une série de dilution au demi afin d'obtenir une gamme de concentration allant de 120 mM à 0,94 mM ou de 1,2 M à 0,94 mM.

4 - INCUBATION DES RETICULOCYTES AVEC LA TRANSFERRINE,
EN PRESENCE D'INHIBITEURS

a) Matériel

- Tampon phosphate isotonique 310 milliosmolaire, pH 7,4 :

$\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2 \text{H}_2\text{O}$ 3,27 g/l (20,962 mM)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12 \text{H}_2\text{O}$ 32,006 g/l (89,364 mM)

- Tampon de Hanks et Wallace, 1949, pH 7,35 :

NaCl 8 g/l

KCl 0,4 g/l

CaCl_2 sec 0,14 g/l

$\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l

$\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12 \text{H}_2\text{O}$ 0,12 g/l

$\text{KH}_2\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O}$ 0,06 g/l

NaHCO_3 0,35 g/l

Glucose 1 g/l

- Culot de cellules enrichi en réticulocytes

- Gamme de concentration en glycopeptides et en oligosaccharides

(1,2 M ou 120 mM suivant les types d'inhibiteur, à 0,94 mM)

- Solution de sérotransferrine marquée au ^{59}Fe .

b) Méthode

50 μ l de culot de cellules sont répartis dans une série de tubes à hémolyse en polystyrène. 50 μ l de tampon de Hanks et Wallace sont ajoutés aux cellules et les tubes sont plongés dans un bain-marie à 37°C et doucement agités. La température des solutions de glycopeptides, d'oligosaccharides et de sérotransferrine est aussi stabilisée à 37°C avant de commencer l'expérience.

La préincubation des réticulocytes à 37°C en présence de glycopeptides ou d'oligosaccharides dure 10 minutes, après introduction dans chaque tube contenant les cellules de 10 μ l de solution de glucides. Puis la sérotransferrine de lapin est ajoutée à raison de 40 μ g dans 10 μ l par tube. Une telle concentration de 4 μ M correspond aux conditions optimales d'incubation déterminées par Tordera en 1978 pour les expériences d'inhibition. Cette incubation à 37°C dure 10 mn. Elle est arrêtée en plongeant les tubes dans la glace et en diluant immédiatement leur contenu par 5 ml de tampon phosphate isotonique à 4°C.

Les tubes sont alors bouchés, centrifugés, les surnageants prélevés, et les culots cellulaires lavés deux fois par le même tampon phosphate toujours à 4°C. Le dernier surnageant éliminé, les tubes contiennent des cellules ayant incorporé du fer radioactif, mais débarrassées du fer radioactif exogène. Elles sont alors analysées dans un compteur de radioactivité Gamma. Pour chaque expérience le 100 p. 100 de radioactivité est déterminé en comptant la radioactivité de 3 tubes contenant 40 μ g de la sérotransferrine marquée, utilisée pour l'incubation.

Pour chaque série d'inhibiteur, 3 tubes témoins sont préparés contenant 10 μ l de tampon de Hanks et Wallace, 1949, au lieu de la solution de glycopeptides ou d'oligosaccharides.

C - RÉSULTATS ET DISCUSSION

1 - PREPARATION DES RETICULOCYTES

Leur taux varie, dans le sang de lapin, de 20 % à 30 % au bout de 4 saignées. Il peut être amené à 40 % ou 50 % pour les cellules servant à l'expérience en utilisant la méthode de Murphy, 1973.

L'emploi d'agents, tels que la phénylhydrazine, provoquant une forte augmentation du taux de réticulocytes est cependant à bannir, pour les expériences d'incubation. En effet, les cellules semblent alors énormément fragilisées. La plupart d'entre-elles sont hémolysées quand elles sont observées au microscope.

Par contre, dans le cas de réticulocytose induite par saignée, l'aspect des cellules est normal au microscope. Il faut noter cependant que, lorsque les globules rouges ont subi une centrifugation d'1 h à 15.000 r.p.m., le pourcentage de cellules hémolysées, bien que faible, est un peu plus important que dans la cas des cellules utilisées directement après le dernier lavage.

2 - INCORPORATION DU FER PAR LES CELLULES EN PRESENCE D'OLIGOSACCHARIDES ET DE GLYCOPEPTIDES

Nous avons repris les conditions d'incubation décrites précédemment, qui étaient celles employées par Tordera en 1978.

Les courbes d'inhibition de l'incorporation du fer en présence de glycopeptides et d'oligosaccharides sont données dans la figure 12 p. 84 . Les résultats sont exprimés en taux d'incorporation du fer dans les cellules par rapport à un témoin sans oligosaccharide ni glycopeptide. Les courbes sont tracées en fonction de la molarité en inhibiteur. Le tableau VII p.85 présente les structures des oligosaccharides et des glycopeptides employés et donne les concentrations nécessaires

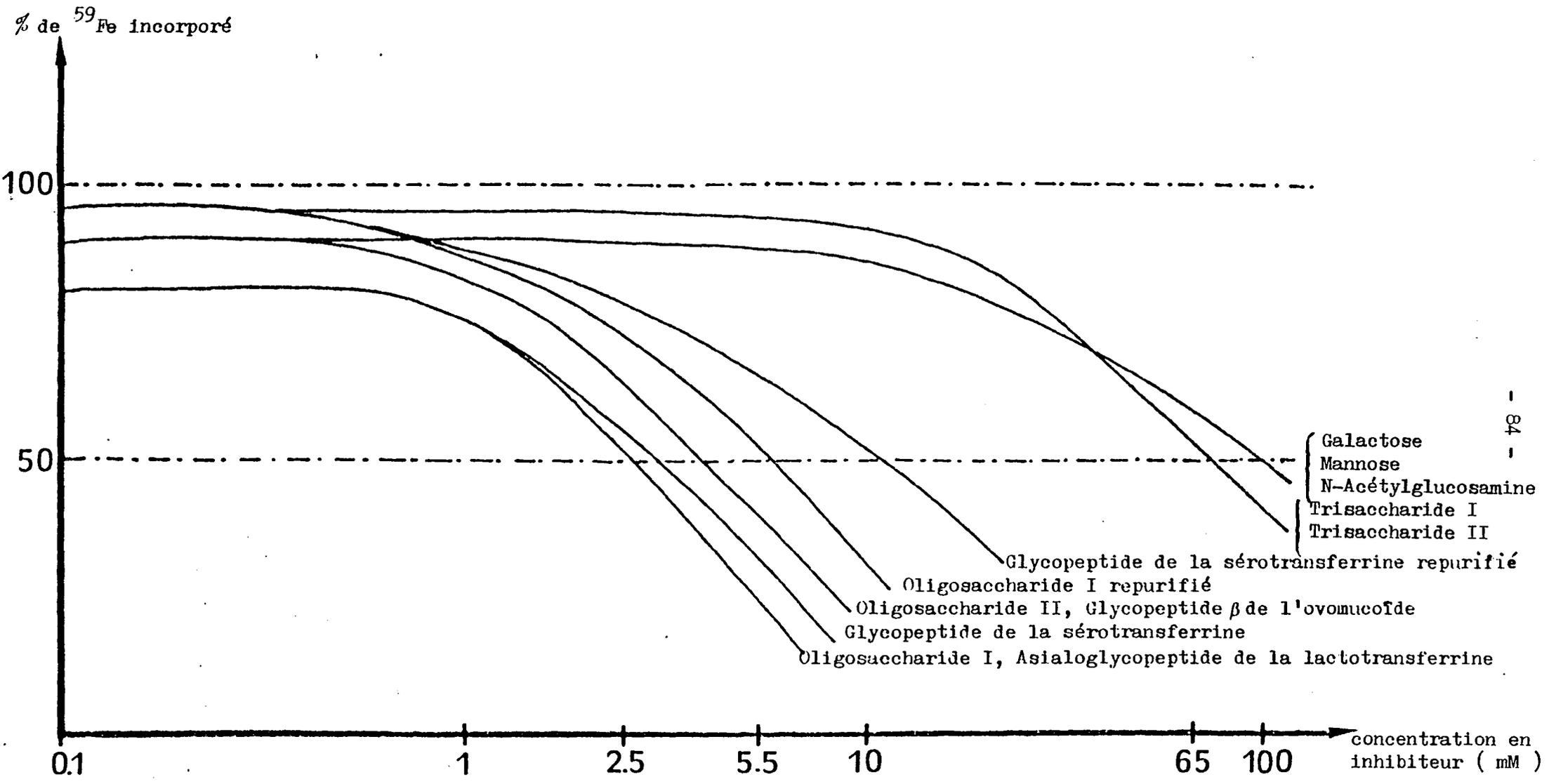


Figure 12

Inhibition de l'incorporation du fer en présence de concentrations croissantes en glycopeptides et oligosaccharides.



TABLEAU VI

Structure des oligosaccharides et glycopeptides employés comme inhibiteurs. Concentrations en ces composés pour obtenir 50 p. 100 d'inhibition du transfert du fer



Structure	Inhibiteur	Concentration pour obtenir 50 % d'inhibition
	Galactose	100 mM
	Mannose	100 mM
	N-Acétyleglucosamine	100 mM
α -Man-(1 \rightarrow 3) β -Man-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc	Trisaccharide I	65 mM
 β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)-Man	Trisaccharide II	65 mM
α -NeuAc-(2 \rightarrow 6)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)-Man	Oligosaccharide I	Avant } repurification 2,5 mM
α -NeuAc-(2 \rightarrow 6)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3)		Après } 5,5 mM
 β -Man-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc	Oligosaccharide II	3,5 mM
α -NeuAc-(2 \rightarrow 5)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3)	Glycopeptide de la sérotransferrine	Avant } repurification 2,8 mM
 β -Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow)-Asn		Après } 10 mM
α -NeuAc-(2 \rightarrow 6)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 6)	Asialoglycopeptide de la lactotransferrine	2,5 mM
 β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3)		
 β -Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow)-Asn	Glycopeptides de l'ovomucoïde	3,5 mM
 β -GlcNAc α -Fuc		
β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 6)	Glycopeptides de l'ovomucoïde	3,5 mM
 β -GlcNAc α -Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- α -Man-(1 \rightarrow 3)		
 β -GlcNAc α -Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- α -Man-(1 \rightarrow 6)	Glycopeptides de l'ovomucoïde	3,5 mM
 β -GlcNAc β -GlcNAc		

pour obtenir 50 p. 100 d'inhibition de l'incorporation du fer.

Comme Tordera en 1978, nous pouvons constater qu'aucune inhibition d'incorporation de fer ne peut être observée pour des concentrations inférieures à 0,3 mM. Cependant, pour les glycopeptides isolés de la sérotransferrine humaine, de la lactotransferrine humaine et de l'ovomucoïde, ainsi que pour les oligosaccharides I, II et III, une inhibition de 50 p. 100 d'incorporation du fer est obtenue pour des concentrations allant de 2,5 mM à 10 mM. De plus, les trisaccharides n'inhibent, au même taux, le transfert du métal que pour une concentration de 65 mM. Enfin, nous avons cherché à obtenir une inhibition par l'emploi d'un seul monosaccharide : le galactose, la N-acétylglucosamine ou le mannose, seuls, n'inhibent à 50 p. 100 le transfert du fer qu'à des concentrations de 100 mM.

Que les glycopeptides testés proviennent de la sérotransferrine, de la lactotransferrine ou de l'ovomucoïde, ils présentent tous des taux d'inhibition voisins et comparables à ceux des oligosaccharides I, II et III. Donc la cellule ne reconnaît pas préférentiellement un glycopeptide de structure bien définie. Or Tordera en 1978, avait trouvé qu'un glycopeptide de type oligomannosidique (isolé de la lactotransferrine bovine) n'inhibait pas le transfert ; mais les concentrations employées ne dépassaient pas 1,6 mM.

Nous avons dû, en effet, utiliser pour toutes ces expériences, des concentrations importantes en inhibiteurs : une concentration de 5 mM correspond à un excès de 1250 molaire par rapport à la quantité de sérotransferrine présente dans le milieu. Cela représente, pour le glycopeptide isolé de la sérotransferrine, une concentration de 12,5 mg par ml d'incubat.

L'ensemble de ces résultats, et plus particulièrement les taux d'inhibition voisins observés pour tous les glycopeptides testés, quelle que soit leur structure, nous ont alors amenés à revoir notre hypothèse de départ. N'aurions nous pas, en effet, pu observer, au lieu de l'effet attendu d'inhibition spécifique, un artéfact dû, soit aux trop grandes quantités d'inhibiteurs, soit à un contaminant présent dans la solution de glycopeptides. Les moindres traces de sels ou d'autres contaminants subsistant après les diverses étapes d'isolement du composé employé en tant qu'inhibiteur peuvent, aux concentrations utilisées, interférer dans la reconnaissance entre sérotransferrine et réticulocyte et/ou dans le transfert du métal. Ces mécanismes sont, comme nous l'avons déjà mentionné, très mal connus. Beaucoup de questions se posent encore sur tout ce qui concerne la nature des petits effecteurs, leur rôle dans la fixation entre la sérotransferrine et la cellule, dans le relargage du fer et dans la pénétration dans le réticulocyte.

Aussi, nous avons, pour tenter de vérifier cette hypothèse, repurifié un glycopeptide et un oligosaccharide par passage sur colonne de Biogel P₂. Les résultats des expériences d'inhibition effectuées après cette étape sont données dans le tableau VIIp. 85. Tant l'oligosaccharide que le glycopeptide repurifiés nécessitent des concentrations plus importantes pour inhiber le transfert du métal. Il devient alors clair que certains contaminants présents dans les solutions de glycopeptide ou d'oligosaccharide, ont pu inhiber l'incorporation du fer dans la cellule ou favoriser une telle inhibition par les composés glycaniques.

Donc, la gamme de concentrations en inhibiteurs nécessaire pour obtenir 50 p. 100 d'inhibition se resserre autour de valeurs très voisines pour presque tous les oligosaccharides et glycopeptides testés (2,5 à 10 mM) et nous ne pouvons dire que l'un d'entre eux inhibe

d'avantage le transfert du fer. Par contre, les monosaccharides et les trisaccharides testés nécessitent des concentrations beaucoup plus importantes pour atteindre le même pourcentage d'inhibition. Mais l'oligosaccharide I, dont la seule différence avec le trisaccharide II est la présence d'un résidu supplémentaire d'acide N-acétylneuraminique branché en α -(2 \rightarrow 6) requiert par rapport à ce trisaccharide, une quantité 12 fois moindre pour empêcher le transfert du métal au même taux. Or Tordera en 1978, avait vu que les glycopeptides isolés de la sérotransferrine, di-, mono- ou dé-sialylés, inhibaient 50 p. 100 du transfert pour une concentration identique pour tous, de 4 mM. De plus, Morgan et al., en 1967 et Kornfeld en 1968, avaient déjà vu, comme Tordera en 1978, que la sérotransferrine désialylée donnait son fer aux réticulocytes comme une sérotransferrine normale. Alors, si l'on exclut la participation de l'acide sialique dans le mécanisme de l'interaction, il ne reste plus, pour expliquer la différence de comportement entre les divers inhibiteurs que l'hypothèse de la taille : il semble qu'il y ait, à partir d'une taille donnée (4 résidus) une inhibition plus importante. Encore faudrait-il pour vérifier cela, employer d'autres oligosaccharides de structure différente, mais de taille identique et, par exemple, divers disaccharides et tétrasaccharides.

D - CONCLUSIONS

Il est maintenant difficile de conclure définitivement sur la participation du glycanne de la sérotransferrine de lapin lors de l'interaction entre cette glycoprotéine et les réticulocytes.

D'une part, les quantités importantes de glycopeptides ou d'oligosaccharides nécessaires pour obtenir une inhibition, ne sont pas

très en faveur d'une telle participation. Nous avons pu constater qu'il était tout à fait possible d'observer, dans de telles conditions, un effet inhibiteur provenant d'impureté, même minimes, présentes dans les solutions. En effet, les glycopeptides et oligosaccharides que nous avons employés dans un premier temps, avaient déjà été soigneusement purifiés et satisfaisaient pleinement aux critères classiques de pureté. Cela nous prouve donc, combien il est difficile de maîtriser toutes les données du système sur lequel nous travaillons. Il faut rappeler encore une fois qu'il s'agit de cellules vivantes, plongées dans un milieu d'incubation et que l'addition des inhibiteurs en un tel excès peut intervenir, non pas seulement dans le mécanisme que nous vous proposons d'étudier mais aussi sur d'autres parties de la cellule et gêner alors plus ou moins directement l'incorporation du fer par la sérotransferrine.

D'autre part, il reste néanmoins, même après plusieurs passages sur colonne de Biogel P₂, un effet inhibiteur certain des oligosaccharides et des glycopeptides testés. Dans ce cas 50 % d'inhibition est obtenue pour des concentrations voisines de 10 mM. Cela représente 2500 molaire excès par rapport à la sérotransferrine présente dans le milieu. Ce chiffre est certes important, mais il est du même ordre que celui observé dans diverses études concernant des récepteurs cellulaires capables de reconnaître des glucides. Par exemple, Kawasaki et al., en 1978, ont pu caractériser la spécificité de reconnaissance d'un récepteur cellulaire du mannane, en employant des inhibiteurs de taille différente, à des concentrations similaires aux nôtres. Beaucoup d'autres auteurs, par contre, utilisent des inhibiteurs à des concentrations beaucoup plus importantes (jusqu'à 1 million molaire excès) et en déduisent des spécificités de reconnaissance.

Nos expériences d'inhibition de transfert du fer ne permettent pas de conclure à la participation directe et exclusive du glycanne de la sérotransferrine de lapin, lors de son interaction avec les réticulocytes. Comme l'ont déjà montré les études de Tordera en 1978, la partie glycanne ne semble pas intervenir dans un mécanisme de reconnaissance mais serait plutôt impliquée dans un processus de transfert du métal. Si tel est le cas, nos études ne permettent pas de préciser la partie dans le glycanne, concernée par ce transfert. En effet, presque tous les glycopeptides et oligosaccharides testés inhibent de la même manière. Il semble, simplement que la taille des inhibiteurs ait une influence. Ce qui paraît plus vraisemblable est que, les techniques que nous avons employées, et les expériences que nous avons faites, ne nous permettent pas d'observer uniquement l'intervention des oligosaccharides et des glycopeptides en tant qu'inhibiteurs de l'interaction de la sérotransferrine avec les réticulocytes. Il est plus probable que nous ayons constaté l'intervention des inhibiteurs dans d'autres mécanismes qui touchent de plus ou moins près au transfert du métal et au cours desquels les glycopeptides et oligosaccharides interviennent de manière plus ou moins spécifique. Il serait d'ailleurs sûrement très intéressant de tenter de les définir et de les étudier. Mais cela exige une méthodologie nouvelle tenant compte d'un élargissement des données et des hypothèses.

Nous avons alors pensé qu'un moyen permettrait de répondre à la question que nous nous posons toujours au terme de ces expériences : ôter le glycanne de la sérotransferrine pour voir s'il intervient réellement dans l'interaction avec les réticulocytes.

DEGLYCOSYLATION CHIMIQUE ET ENZYMATIQUE DE LA SÉROTRANSFERRINE DE LAPIN

A - INTRODUCTION

Un des procédés employés pour vérifier le rôle des groupements glycaniques des glycoprotéines consiste en la déglycosylation de ces protéines. Actuellement, plusieurs méthodes sont employées, visant à débarrasser les glycoprotéines de leurs glycannes. Il s'agit :

1 - de l'usage de la tunicamycine, antibiotique qui bloque la première étape de glycosylation des protéines (Tkacz et Lampen, 1975). Mais l'emploi de cet agent, afin d'obtenir de la sérotransferrine susceptible d'être ensuite isolée et étudiée, nécessite l'utilisation soit de cellules hépatiques de lapin en culture, soit du foie de l'animal perfusé. Ces deux techniques délicates ne permettent pas l'obtention de grandes quantités de protéine néosynthétisée sous forme déglycosylée. De plus, l'action de la tunicamycine ne s'arrête évidemment pas à la biosynthèse de la seule sérotransferrine et ce sont toutes les glycoprotéines de la cellule, donc tout le métabolisme qui est atteint. On peut se demander alors, dans quelle mesure la partie protéique de la sérotransferrine sera synthétisée normalement. Aussi pour toutes ces raisons, avons-nous pensé que l'emploi de la tunicamycine n'était pas le meilleur moyen pour obtenir de la sérotransferrine déglycosylée.

2 - de l'emploi de réactifs chimiques. Il en existe deux : l'acide fluorhydrique (HF) et le méthanol-chlorhydrique. Une étude comparée de la méthode d'hydrolyse par HF et de la méthanolyse ménagée, effectuée par Glassman et al., en 1978, a montré que l'emploi d'HF était moins drastique pour la partie peptidique de la glycoprotéine. En effet,

le problème soulevé par l'emploi des réactifs chimiques est celui de leur action non spécifique. Mais Mort et Lamport, dès 1977, avaient démontré que cet acide est capable d'hydrolyser spécifiquement la partie glycanne des glycoprotéines, sans toucher aux acides aminés. Aussi avons nous tenté la déglycosylation de la sérotransferrine par ce réactif, qui, selon les conditions utilisées par Mort et Lamport en 1977, laisse intacte la liaison entre la dernière glucosamine du glycanne et l'asparagine. Cette technique devait nous permettre d'obtenir une sérotransferrine ayant conservé seulement le résidu de N-acétylglucosamine du point d'attache.

3 - de l'utilisation enfin, de glycosidases spécifiques : des exoglycosidases ou des endoglycosidases.

L'utilisation d'exoglycosidases présente quelques inconvénients elle nécessite l'emploi de toute une gamme de glycosidases spécifiques dépourvues d'activité protéolytique ; elle nécessite des temps d'hydrolyse très longs à des températures relativement élevées (autour de 37°C) ; au cours de ces traitements, la sérotransferrine risque de subir des dommages ; enfin, l'emploi consécutif de plusieurs enzymes abaisse considérablement le rendement final de la réaction.

L'utilisation d'endoglycosidases et en particulier, d'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase (EC 3.2.1-) paraît beaucoup plus appropriée. Il existe deux types d'enzymes utilisables sur notre système : l'endoglycosidase D et l'endoglycosidase B. Toutes deux, comme le montre la figure 13 p. 93, sont susceptibles de couper la liaison β -(1 \rightarrow 4) entre les deux résidus de N-acétylglucosamine du glycanne de la sérotransferrine (Ito et al., 1975 ; Bouquelet et al., 1980). L'endoglycosidase D, isolée de *Diplococcus pneumoniae* peut couper des glycannes de type

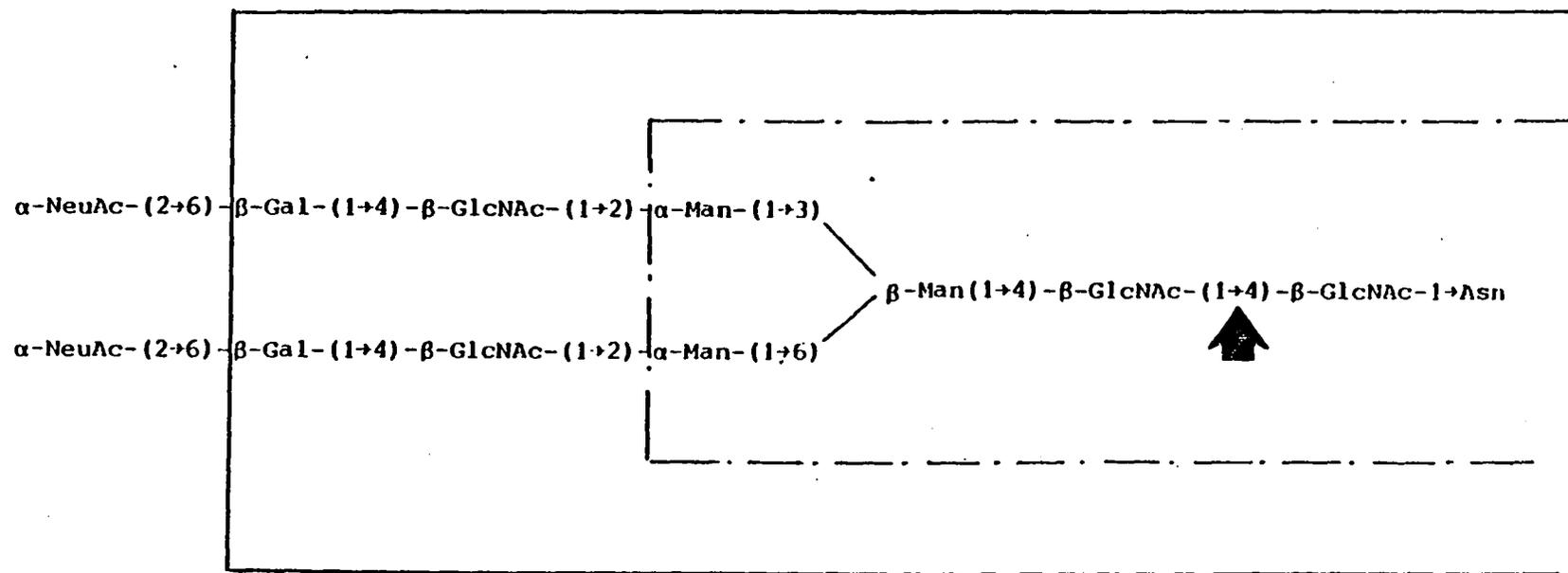


Figure 13

Substrats de l'endoglycosidase D (— · — ·) et de l'endoglycosidase B (————) et point de coupure () sur le glycanne de la sérotransferrine selon Ito et al., 1975 et Bouquelet et al., 1980.

N-acétyllactosaminique, mais le résidu d' α -mannose lié en (1 \rightarrow 3) au résidu de β -mannose doit être libre (Ito et al., 1975). Aussi faut-il, au préalable, employer des exoglycosidases et le problème revient alors à celui évoqué précédemment. Par contre, une endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase qui a été récemment caractérisée par Bouquelet et al., 1980 est capable d'hydrolyser des glycopeptides renfermant des glycannes biantennés de type N-acétyllactosaminique, mono- ou dé-sialylés. L'action de cet enzyme nécessite seulement l'emploi préalable d'une neuraminidase. Nous disposions de cette enzyme, préparée au laboratoire à partir d'un filtrat de Basidiomycètes et qui, loin d'être purifiée, devait cependant nous permettre d'obtenir la sérotransferrine sans glucides, hormis le résidu de N-acétylglucosamine du point d'attache.

B - MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 - HYDROLYSE PAR HF

a) Conditions d'hydrolyse

Nous avons pu réaliser ces hydrolyses dans le laboratoire du Professeur Dautrevaux à Lille, et grâce à l'aide précieuse de M. Perini* . En effet, l'emploi de cette technique nécessite un appareillage spécial, représenté dans la figure 14 p.95 et l'utilisation de récipients en Kel-F. Le système est clos et se compose d'un container d'acide fluorhydrique (A), d'un réservoir (B) contenant du trifluorure de cobalt (servant à éliminer toute trace d'eau dans l'acide), d'une chambre à réaction (C) contenant la glycoprotéine recouverte d'anisole (un agent qui réagit avec les dérivés fluorés formés au cours de la réaction, les empêchant ainsi d'agir sur les acides aminés aromatiques de la protéine), puis de

* Nous remercions vivement Monsieur Perini de nous avoir si aimablement aidés au cours de nos expériences.

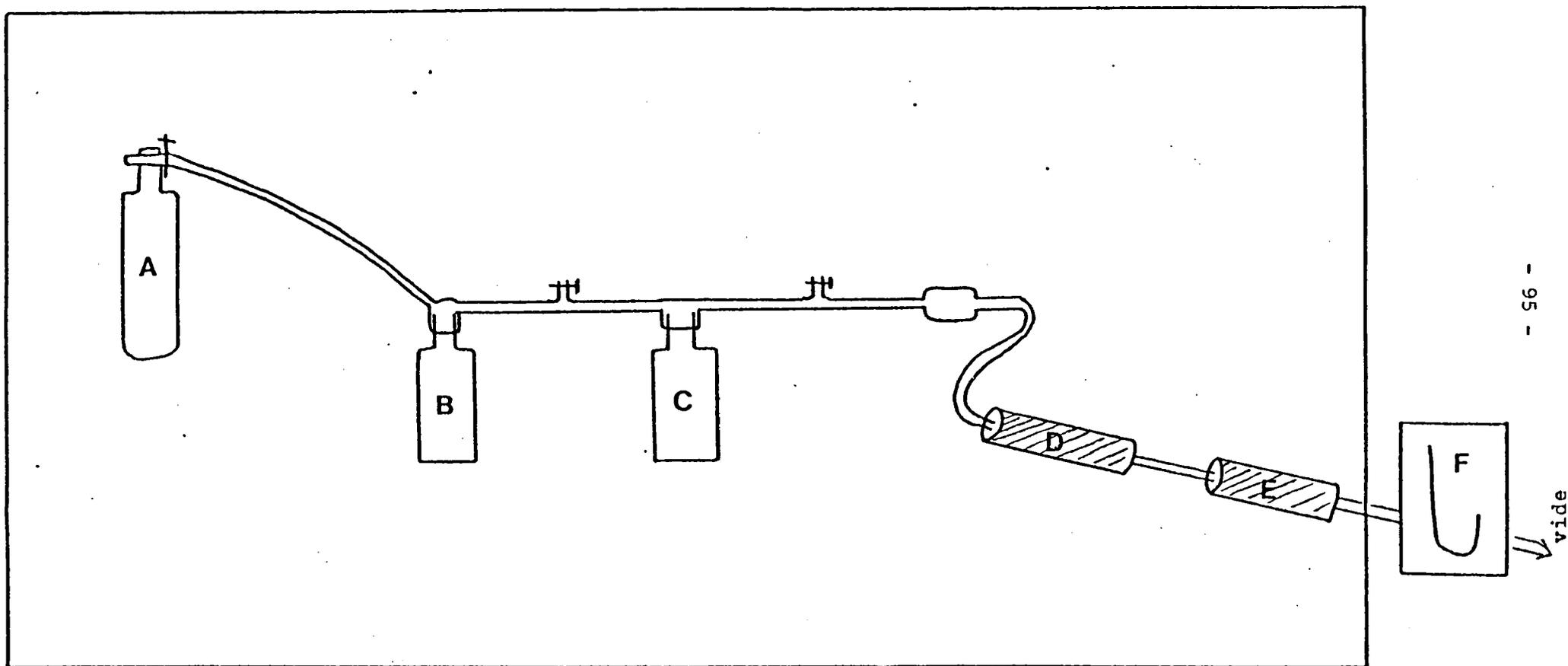


Figure 14



Schéma représentant l'appareillage spécial utilisé lors de l'hydrolyse fluorhydrique .

deux trappes (D) et (E) contenant de la potasse. Cet appareillage est relié à une trompe à vide munie d'un manomètre à mercure.

Nous avons donc employé la méthode décrite par Mort et Lamport, en 1977. L'aposérototransferrine (25 mg) est mise à dessécher, sous vide, à 37°C et en présence de P_2O_5 , la veille de l'expérience, dans le récipient qui sert de chambre à réaction (C). Dès que le vide est coupé, l'anisole (2 ml) est déposé sur la protéine et le récipient est replacé dans l'appareillage. Alors 20 ml d'HF sont introduits très lentement dans le réservoir (B) contenant le trifluorure de cobalt et refroidi par de l'azote liquide. Puis l'acide est distillé petit à petit dans la chambre à réaction (C) où se trouve donc la glycoprotéine. La solution est continuellement sous agitation pendant toute la durée de la réaction. Quand cette dernière est terminée, l'HF est éliminé par passage sur la potasse contenue dans les trappes (D) et (E) et l'on voit alors l'échantillon changer de couleur, du brun au rosé (l'anisole est rosé). L'appareillage est encore maintenu sous vide pendant au moins une heure pour se débarrasser au maximum de toute trace d'HF. Le produit d'hydrolyse est repris soit dans l'eau, soit dans une solution d'acide acétique à 10 % soit dans l'éther.

b) Isolement du produit d'hydrolyse

Les fractions solubles de la glycoprotéine hydrolysée sont immédiatement déposées sur Séphadex G-25 (colonne de 50 x 2,5 cm) afin de séparer les produits d'hydrolyses et les réactifs. La colonne est éluée par l'eau. La fraction protéique est repérée par lecture d'absorbance à 280 nm et par révélation au réactif à la ninhydrine. La fraction glycanique est recherchée par un repérage à l'orcinol-sulfurique (méthode de Tillmans et Philippi, 1929, modifiée par Rimington en 1940).

2 - HYDROLYSE PAR L'ENDOGLYCOSIDASE B

a) Désialylation

L'aposérotransferrine de lapin est tout d'abord soumise à l'action d'une neuraminidase afin d'ôter les résidus d'acide N-acétyl-neuraminique portés par le glycanne. Nous avons, pour cela, utilisé une enzyme isolée de *Clostridium perfringens*, de type IX A, insolubilisée sur billes d'agarose (Sigma n° N-2382) à raison de 16 mg d'agarose par ml de gel et de 30 U d'enzyme par g d'agarose.

L'hydrolyse est faite en tampon citrate 0,1 M pH 5,1. Une solution à 10 p. 100 d'aposérotransferrine dans le tampon d'hydrolyse, est déposée sur le gel porteur de la neuraminidase. L'hydrolyse a lieu pendant 24 h à 37° dans un circuit fermé contenant le gel coulé dans une seringue reliée à une pompe, ce qui permet à la solution de repasser continuellement à travers la préparation de neuraminidase insolubilisée. 2,5 ml de gel (soit 1,2 U d'enzyme) sont utilisés pour hydrolyser 100 mg de protéine.

Le pourcentage d'acides sialiques ôtés par l'enzyme est déterminé par dosage colorimétrique selon la méthode d'Aminoff, 1961, des résidus d'acide sialique libérés et par dosage colorimétrique selon la méthode de Werner et Odin, 1952, des résidus d'acide sialique totaux.

b) Déglycosylation

L'endoglycosidase nous a été fournie par Stéphane Bouquelet* . Le filtrat de culture de Basidiomycètes a tout d'abord été soumis à une précipitation au sulfate d'ammonium (80 p. 100 de saturation). Le

* Nous remercions monsieur S. Bouquelet de nous avoir fourni cette préparation d'enzyme insolubilisée.

précipité a été redissous dans l'eau distillée, concentré par ultrafiltration sur membrane Amicon XM-50, soumis à une étape de chromatographie sur colonne d'hydroxylapatite et enfin à une étape de tamisage moléculaire sur Ultrogel AcA-34.

La solution d'enzyme ainsi obtenue présente une couleur brune : elle contient encore des pigments présents dans le filtrat de culture de champignon. Cette solution a néanmoins été couplée sur Sépharose-4B après activation du gel au BrCN (Cuatrecasas, 1970). Le gel obtenu possède une activité d'hydrolyse des glycanes de type N-acétyllactosaminique de 0,9 mU par mg de protéine. Il y a 2 mg de protéine couplés par ml de gel. Nous disposons de 5 ml de gel soit de 4,5 mU d'enzyme insolubilisée, ne présentant pas, d'après les tests effectués sur la sérotransferrine marquée à l' ^{125}I sur sa partie peptidique, d'activité protéasique.

L'hydrolyse du glycanne de la sérotransferrine de lapin est faite en tampon Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 1 M, MnCl_2 1 mM, MgCl_2 1 mM et CaCl_2 1 mM. La sérotransferrine désialylée est déposée à raison de 6 mg dissous dans 1 ml de tampon d'hydrolyse, sur les 5 ml de gel ayant fixé l'enzyme, équilibrés dans le même tampon. Le gel est coulé dans une seringue montée dans un circuit fermé incluant une pompe. La solution est ainsi continuellement repassée sur le gel, pendant 15 h et à température ambiante.

c) Isolement des produits d'hydrolyse

Les produits d'hydrolyse élués de la seringue sont dialysés et concentrés par un système de dialyse-concentration sous vide (Schleicher et Schüll). La fraction dialysable qui doit contenir l'oligosaccharide coupé, est récupérée et débarrassée de ses sels par passage successif sur des colonnes (1 x 30 cm) d'échangeurs de cations (Dowex 50 x 8 ; 25-50 mesh ;

forme H^+) et d'échangeurs d'anions (Dowex 1 x 8 ; 25-50 mesh ; forme formiate). Puis elle est concentrée à siccité au moyen d'un évaporateur rotatif. La fraction dialysée est soumise à une étape de tamisage moléculaire sur colonne d'Ultrogel AcA-44 (1 x 50 cm) équilibrée dans le tampon d'hydrolyse. Les fractions protéiques éluées par ce même tampon sont ensuite soumises à une étape de chromatographie d'affinité sur concanavaline A-Sépharose (Pharmacia) de dimensions 1,5 x 13 cm, équilibrée toujours dans le même tampon. La fraction protéique non retenue par la concanavaline A est éluée par ce tampon. Par contre, la glycoprotéine retenue est éluée par l' α -méthyl-D-glucoside 0,15 M. Les fractions retenues et non-retenues sur concanavaline A sont dialysées contre l'eau et lyophilisées.

3 - ETUDE DES PRODUITS D'HYDROLYSE

a) Electrophorèse en gel de polyacrylamide en plaque en présence de SDS (Davis, 1964)

En présence de SDS, la migration électrophorétique de la protéine ne dépend plus que de la longueur de la chaîne peptidique. Sa charge étant toujours anionique à cause des fonctions sulfate du détergent complexé à la protéine.

- α) Réactifs :
- solution 1 A : 36,3 g Tris qsp 1000 ml H_2O pH 8,9
 - solution 1 B : 12,1 g Tris qsp 1000 ml H_2O pH 6,8
 - solution 2 A : 48 g d'acrylamide
1,28 g de bisacrylamide } qsp 100 ml H_2O
 - solution 3 A : 0,5 g de persulfate d'ammonium
+ 4,5 ml d' H_2O
 - solution C : Dodecylsulfate de sodium (SDS) 20 p. 100.

AUS
LILLE

β) Mode opératoire : - Gel inférieur : pour un gel à 7,5 p. 100 :
6,25 ml de 1 A, 7,5 ml de 2 A et 36 ml d'H₂O sont dégazés avant
l'addition de 37,5 µl de TEMED, de 37,5 µl de 3 A et de 250 µl de C.

- Gel supérieur : le gel de concentration à 5 p. 100
est réalisé en mélangeant 2,5 ml de 1 B, 2 ml de 2 A, 15,4 ml d'eau.
Après dégazage de cette solution, 15 µl de TEMED, 150 µl de 3 A et
100 µl de C sont additionnés.

γ) Electrophorèse : l'échantillon est dissout dans un tampon :
SDS 10 p. 100, glycérol 20 p. 100, 1 A 10 p. 100 et 2-mercapto-éthanol
5 p. 100, ε bleu de bromophénol. Les puits du gel supérieur contiennent
5 à 10 µl. Il y est déposé 15 µg à 20 µg de protéine. L'électrophorèse est
réalisée dans un tampon Tris 0,025 M, gly 0,18 M pH 8,6 à raison de 8v/cm.

b) Electrophorèse en gel de polyacrylamide en tubes en
présence de SDS (Neville, 1971)

α) Réactifs et mode opératoire : - Tampon du gel inférieur : pH 9,18
(pH 9,5 pendant l'électrophorèse)

Tris 0,4244 M

HCl 0,0308 N

- Composition du gel inférieur :

	Acrylamide 11 p. 100	} dissous dans le tampon du gel inférieur
	Bisacrylamide 0,1 p. 100	
ajoutés au dernier moment	TEMED 0,15 p. 100	
	Persulfate d'ammonium 0,05 p. 100	

- Tampon du gel supérieur : pH 6,1 (pH 8,64
pendant l'électrophorèse)

Tris 0,0541 M

H₂SO₄ 0,027 N

- Composition du gel supérieur :

ajoutés au dernier moment	{	Acrylamide 3 p. 100	} dissous dans le tampon du gel supér:
		Bisacrylamide 0,2 p. 100	
		TEMED 0,15 p. 100	
		Persulfate d'ammonium 0,05 p. 100	

Les gels sont coulés dans des tubes de 5 mm de diamètre.

β) Electrophorèse : L'échantillon est dissous à raison de 1 mg dans 1 ml de tampon : SDS 5 p. 100 Na_2CO_3 0,05 M, β-mercapto-éthanol 10 p.100, sucrose 40 p. 100, ε bleu de bromophénol. 10 à 30 γ de protéines sont déposées par gel. L'électrophorèse est réalisée à raison de 1,5 mA par tube, dans un Tampon T: 0,041 M, SDS 0,1 p. 100. Acide borique 0,04 M pH 7,64 pour le réservoir supérieur et Tris 0,4244 M, HCl 0,0308 N pH 9,18 pour le réservoir inférieur.

c) Electrophorèse en gel de polyacrylamide en plaque sans SDS

La migration électrophorétique de la protéine dépend de la masse et de la charge de la protéine.

Le protocole est le même que pour l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en plaque en présence de SDS si ce n'est l'omission de SDS dans les gels et dans la solution où l'échantillon est dissout.

d) Electrophorèse sur acétate de cellulose

Les électrophorèses sont réalisées sur des bandes de 2,5 cm x 16 cm (Poliphor), dans le tampon de Laurell, 1957, à pH 8,6, sous une tension de 120 v pendant 1 h 30 mn.

e) Immunoélectrophorèse sur gélose

Les immunoélectrophorèses sont réalisées selon la méthode de Grabar et Williams, 1955, modifiée, la même année, par Scheidegger. L'électrophorèse sur gélose est réalisée dans un tampon véronal pH 8,2

et sous une tension de 30 v pendant 1 h 30 mn. Elle est suivie d'une diffusion de 48 h contre un sérum de mouton anti-sérotransferrine de lapin*.

f) Séparation des oligosaccharides par chromatographie sur couche mince

La méthode employée est celle Bayard et al., 1979. Des solutions d'oligosaccharides sont déposées sur une plaque de silice, à raison de 1 µg à 5 µg par dépôt. Puis la plaque est plongée dans une cuve saturée par un solvant : éthanol/butanol/pyridine/acide acétique/eau dans le rapport 100/10/10/3/30.

Quand au bout de 5 à 6 h, le front du solvant atteint le haut de la plaque, cette dernière est séchée puis révélée par pulvérisation d'orcinol-sulfurique (200 mg d'orcinol dans 100 ml d'H₂SO₄ à 20 p. 100).

g) Analyse de la composition molaire en monosaccharides

Le produit est tout d'abord soumis à une méthanolyse puis à une chromatographie en phase gazeuse après trifluoroacétylation des méthyls glycosides (Méthode de Zanetta et al., 1972, modifiée par Fournet, 1973).

α) Méthanolyse. Un échantillon de glycoprotéines contenant 150 à 250 µg d'oses totaux est additionné de 50 µg de mésoinositol (témoin interne) puis lyophilisé et placé en dessiccation sous P₂O₅. Le résidu est repris pour 2 ml de méthanol chlorhydrique 0,5 N en HCl et mis à 80°C pendant 24 h. Le produit de la réaction est refroidi, le culot protéique non méthanolysé éliminé et le surnageant, contenant les glucides, délipidé par l'heptane avant d'être séché sous azote.

* Nous remercions Monsieur Falempin du laboratoire du Pr. Rousseaux, de nous avoir si gentiment aidés à obtenir ce sérum.

β) Trifluoroacétylation. Le résidu est repris par 200 µl de dichlorométhane et 200 µl d'anhydride trifluoroacétique. La trifluoroacétylation est effectuée à 150° pendant 2 fois 5 minutes entrecoupées d'un refroidissement rapide du tube contenant les réactifs sous l'eau courante. La solution est ensuite prête à l'analyse en chromatographie en phase gazeuse.

γ) Séparation par chromatographie en phase gazeuse. Les O-méthylglycosides trifluoroacétylés des monosaccharides neutres, des N-acétylosamines et de l'acide N-acétylneuraminique sont chromatographiés sur colonne (300 x 0,3 cm) de silicone OV 210 à 5 % sur Varaport à la température programmée de 110° à 210° (1° par mn) avec un débit de gaz vecteur azote de 7,5 ml/mn.

C - RÉSULTATS ET DISCUSSION

1 - HYDROLYSE PAR HF DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN

Reprenant les études de Mort et Lamport en 1977, nous avons réalisé deux types d'hydrolyse : l'une pendant 1 h à 0°C ; mais comme d'après les auteurs cités précédemment, tous les glucides risquaient de ne pas avoir été ôtés, nous avons également tenté une hydrolyse plus drastique : pendant 3 h à 23°C au bout desquelles il ne doit guère rester sur la protéine que le résidu de N-acétylglucosamine du point d'attache. Ces deux types de traitement étaient cependant censés, d'après les résultats des auteurs, obtenus sur diverses glycoprotéines, ne pas abîmer la partie peptidique.

a) Traitement de la sérotransferrine par HF à basse température

α) Isolement. Le traitement de la sérotransferrine à 0°C pendant 1 h donne naissance à deux fractions. En effet, le produit d'hydrolyse,

rosâtre, comporte une fraction I qui se dissout aisément dans l'eau et qui est immédiatement déposée sur Séphadex G-50. Eluée par l'eau, la fraction I donne un pic ninhydrine positif (la révélation par lecture de l'absorbance à 280 nm permet de voir l'anisole qui absorbe fortement à cette longueur d'onde), mais rien de détectable par la réaction au phénol sulfurique. Le profil d'élution sur colonne de Séphadex G-50 est donné dans la figure 15 p. 105.

Le culot rosâtre du produit d'hydrolyse, non soluble dans l'eau est redissous dans l'acide acétique 10 %, puis dilué et amené à une concentration en acide acétique de 2 %. Déposée sur colonne de Séphadex G-50 et éluée par l'eau, cette fraction II donne un profil d'élution également représentée dans la figure 15 p. 105.

β) Electrophorèse. Les deux fractions ont été testées par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 7,5 %, comme le montre la figure 16 p. 106.

La fraction I, encadrée de deux témoins constitués de sérotransferrine de lapin normale, présente en électrophorèse une bande protéique correspondant à une masse moléculaire plus faible que celle de la sérotransferrine témoin. D'après la gamme étalon, cela correspond à la perte d'un fragment d'environ 2000 à 3000 de masse moléculaire, ce qui représenterait la masse de la sérotransferrine déglycosylée. De plus, nous pouvons constater au trait de dépôt, une bande relativement importante correspondant à des protéines probablement agrégées, même en présence de mercapto-éthanol et de SDS et qui n'ont pu pénétrer dans les mailles du gel à 7,5 %.

La fraction II ne présente pas de bandes protéiques dans la zone correspondant à la sérotransferrine glycosylée intacte. Par contre, elle présente des bandes révélant des chaînes peptidiques

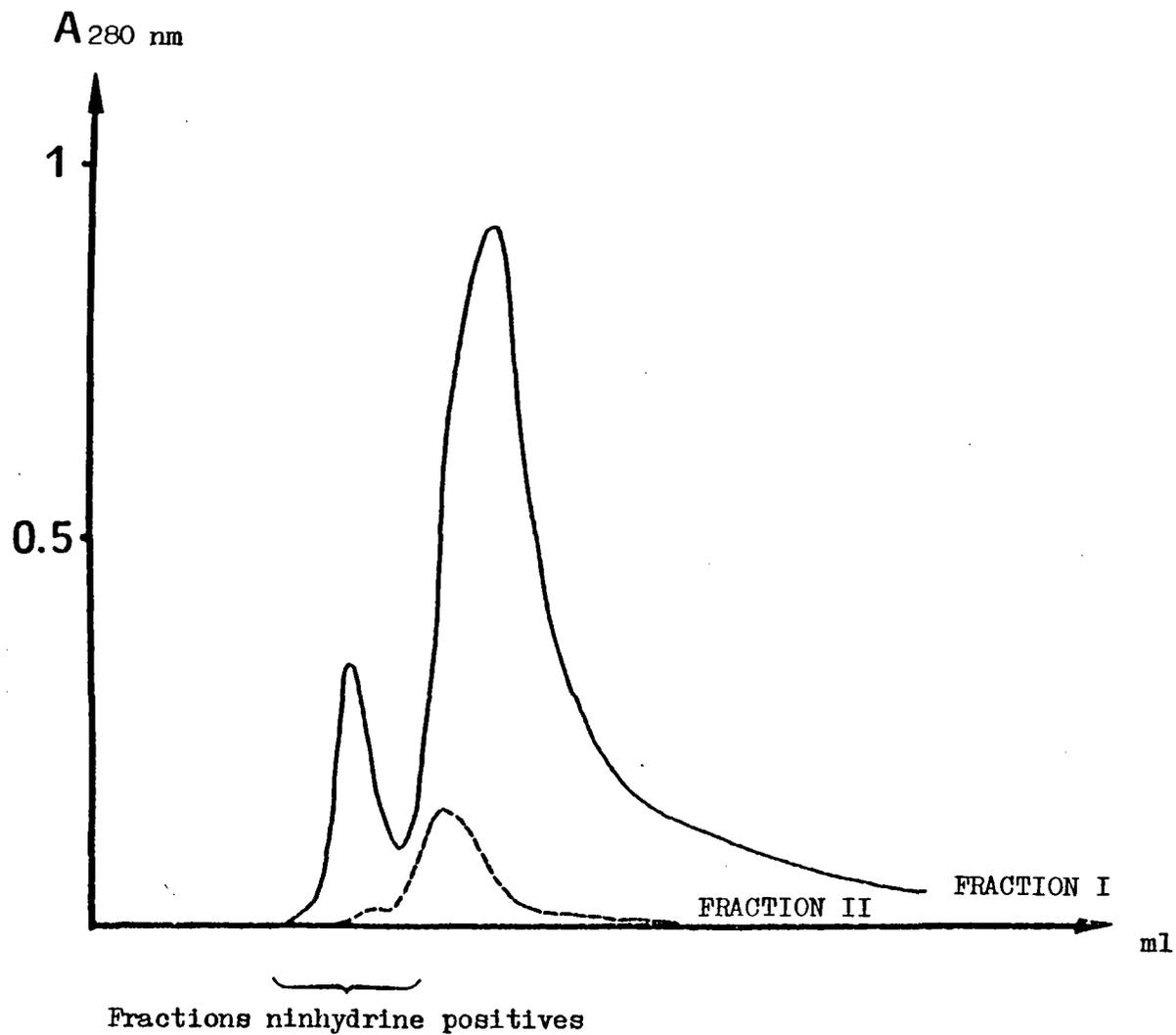


Figure 15

Profil d'élution sur colonne de Séphadex G-50 de la sérotransferrine hydrolysée par HF à basse température



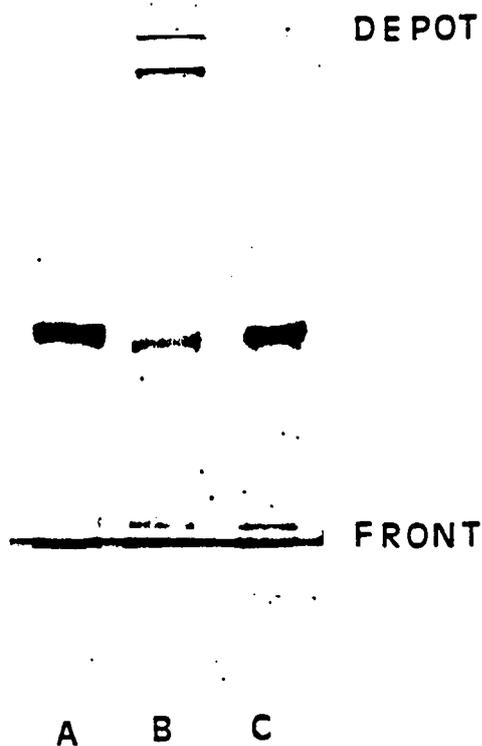


Figure 16

Electrophorèse en gel de polyacrylamide à 7,5 %, en présence de SDS, de la fraction I obtenue après hydrolyse de la sérotransferrine par HF

A et C : sérotransferrine témoin non hydrolysée

B : fraction I.



de masse moléculaire beaucoup plus petite donc l'existence de coupures au sein de la partie protéique de la sérotransferrine. Elle contient aussi une part importante d'aggrégats.

γ) Analyse de la composition molaire en monosaccharides. Seule la fraction I qui représente 90 p. 100 du produit d'hydrolyse, semble contenir la protéine qui nous intéresse, donc seule cette fraction a été analysée en chromatographie en phase gazeuse. Cette technique nous permet de voir qu'il reste de la glucosamine à raison de 1 mole par mole de protéine. Si l'on considère que la méthanolyse ne coupe pas la glucosamine du point d'attache, il reste donc deux glucosamines sur la sérotransferrine de lapin après 1 h d'hydrolyse par HF.

δ) Analyse par immunoélectrophorèse. La fraction I, testée en immunoélectrophorèse, donne un arc de précipitation situé au même endroit que celui obtenu pour la sérotransferrine témoin, non traitée (Figure 17 p. 108). Cette fraction présente donc une migration électrophorétique identique à celle de la glycoprotéine intacte : sa charge globale est restée la même après traitement par HF et elle a conservé des déterminants antigéniques présents sur la sérotransferrine normale. Par contre, l'arc de précipitation obtenu avec la protéine hydrolysée est moins net que celui fourni par la sérotransferrine témoin, ce qui peut indiquer, une légère dénaturation de la protéine dont la migration dans le gel est alors plus diffuse.

ε) Solubilité. Le diagramme obtenu par chromatographie en phase gazeuse, permet de voir aussi la présence de glucose. Ce monosaccharide doit provenir de l'étape de chromatographie sur colonne de Séphadex G-50, les traces résiduelles d'acide fluorhydrique ayant probablement abîmé

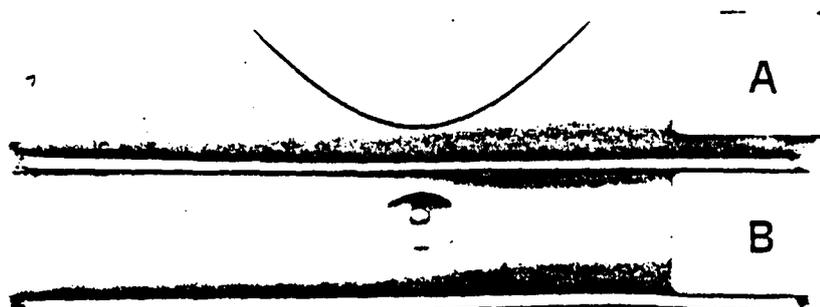


Figure 17

Immunoélectrophorèse de la fraction I obtenue après hydrolyse
de la sérotransferrine par HF

A : sérotransferrine témoin, non hydrolysée

B : fraction I.



le gel. Aussi avons-nous dialysé la fraction I contre l'eau pour nous débarrasser du glucose et aussi de l'anisole qui semble encore contaminer la solution protéique.

Après cette étape de dialyse, le produit est lyophilisé. Mis en présence de tampon citrate-bicarbonate 0,1 M pH 8,6 afin de tenter de saturer la protéine déglycosylée en fer, cette dernière se révèle alors insoluble et incapable de fixer du fer. Des essais pour la résolubiliser montrent que c'est simplement en urée 4 M que la protéine peut se redissoudre. Il devient donc impossible d'utiliser un tel matériel pour une incorporation de fer sur les réticulocytes.

b) Traitement de la sérotransferrine par HF à la température de la pièce

La transferrine a été traitée à 23°C pendant 3 h. Ce traitement, encore plus drastique que le précédent a permis de constater plus vite l'insolubilisation de la sérotransferrine hydrolysée, puisque dès l'extraction du produit d'hydrolyse, la majorité du matériel précipite. Cependant, un traitement du culot par l'éther repris ensuite par l'eau permet une dissolution partielle. Mais la fraction ninhydrine positive récupérée à la sortie de la colonne de Séphadex G-50, contenant encore beaucoup d'anisole est rechromatographiée et aucune fraction n'est récupérée à la sortie de la colonne. Le produit a précipité durant le fractionnement. Le gros culot insoluble dans l'éther est partiellement solubilisé dans l'urée 8 M.

c) Discussion

Après hydrolyse d'1 h à 0°C par HF, il reste, sur la sérotransferrine de lapin, 2 résidus de N-acétylglucosamine. La protéine a conservé des propriétés antigéniques. Mais le traitement

par HF semble, provoquer, au moins sur une petite fraction de la protéine traitée, des coupures dans la chaîne peptidique. Enfin, il y a, après purification de la sérotransferrine hydrolysée par HF, une nette insolubilisation du produit obtenu, qui ne nous permet pas d'utiliser la protéine ainsi déglycosylée pour des expériences de transfert du fer aux réticulocytes.

Ces problèmes de solubilité ont d'ailleurs été évoqués par plusieurs auteurs ayant employé cette méthode de déglycosylation sur des glycoprotéines. Mais ils ont pu être quelquefois contournés puisque les propriétés biologiques de produits déglycosylés ont été étudiées. Ainsi, Mort et Lamport en 1977, reprennent certains de leurs produits d'hydrolyse par l'acide acétique à 50 p. 100. Mais ces auteurs n'analysent pas ensuite les propriétés biologiques des protéines qu'ils ont déglycosylées. Glassman et al., en 1978, dissolvent le précipité obtenu, après hydrolyse par HF d'un antigène carcinoembryonnaire, dans le S.D.S. ; puis ils le dialysent contre une solution d'acide formique à 44 p. 100. La protéine soluble résultant de ce traitement a été néanmoins testée par "radio-immunoassay" et semble avoir conservé 15 p. 100 de ses propriétés antigéniques. Puis Sairam et Schiller en 1979, déglycosylent une hormone : la lutropine, et obtiennent des produits d'hydrolyse très peu solubles dans l'eau, redissous en partie, après précipitation à l'éthanol, dans l'ammoniaque et qui, à chaque étape de fractionnement permettant de les séparer, reprécipitent en partie. La fraction soluble finale est dissociée à 20 p. 100 en sous-unités. Testée pour ses propriétés biologiques, elle a conservé son activité immunologique et sa capacité de fixation à des récepteur cellulaires. Mais elle a perdu ses propriétés de stimulation de la synthèse d'hormones. Enfin, Pletcher et al., en 1980, ont ôté la partie glycanique de la prothrombine, qu'ils doivent alors

redissoudre dans le Tris et qui conserve aussi ses propriétés immunologiques et une partie de ses propriétés biologiques : elle est encore capable de se fixer aux membranes en présence de Ca^{++} , mais présente un degré d'auto-association plus important que celui de la prothrombine normale.

Le problème d'insolubilisation des produits traités par HF est donc courant et il semble que toutes les glycoprotéines qui ont subi une telle hydrolyse, en aient été ensuite altérées dans l'une quelconque de leurs propriétés biologiques et plus particulièrement dans ce qui touche à leur conformation. Mais les traitements, souvent assez drastiques, effectués pour redissoudre les protéines, s'accordent mal avec la recherche, par la suite, des modifications des propriétés biologiques qui ont pu être provoquées par la déglycosylation. On peut se demander d'ailleurs, si ce n'est pas précisément la déglycosylation qui est la cause d'un changement de conformation conduisant à l'insolubilisation. Les exemples sont nombreux de l'intervention des glycannes à ce niveau et nous ne citerons que le cas des mucines où la partie glycannique assure le maintien de la conformation de ces glycoprotéines (Gottschalk, 1960). Mais si cette hypothèse est vraie, il est difficile alors d'expliquer, au sujet des travaux de déglycosylation par HF cités précédemment, à quoi correspond la fraction soluble et déglycosylée étudiée par les différents auteurs ?. Il faut peut-être alors rechercher la cause de l'insolubilisation au niveau des dommages qui ont pu être subis par la partie protéique. En effet, le traitement par HF à 0°C n'est pas censé toucher aux liaisons peptidiques (Sakakibara, 1971), mais des traces d'HF aqueux, provenant d'une élimination incomplète de l'acide après le traitement, peuvent rompre certaines liaisons entre amino-acides. D'autre part, les travaux de Lenard et al., 1964 ont montré que l'hydrolyse par HF provoquait des coupures au niveau

des résidus de méthionine. Tout cela peut expliquer que nous ayons constaté sur une fraction de nos produits d'hydrolyse des coupures de la chaîne peptidique. Cependant, les auteurs cités précédemment, qui ont employé la même méthode de déglycosylation, n'ont pas vu de différence significative de la composition globale en aminoacides avant et après traitement par HF, ni d'apparition de nouvelles bandes correspondant à une hydrolyse importante de la partie protéique, en électrophorèse en gel de polyacrylamide. Mort et Lamport en 1977, pensent que les complications rencontrées après l'action d'HF, sont le résultat d'une dénaturation de la protéine, provoquée par cet acide qui est particulièrement susceptible de former des liaisons hydrogène.

Il faut noter enfin, que tous les auteurs cités précédemment ont pu ôter la majorité des groupements glycaniques présents sur les glycoprotéines qu'ils ont traité par HF, hormis les résidus de N-acétylglucosamine liés au point d'attache.

Il semble donc que le traitement par HF soit applicable à la déglycosylation de certaines glycoprotéines. Cela n'a malheureusement pas été le cas pour la sérotransferrine de lapin qui bien que déglycosylée s'est révélée particulièrement insoluble après hydrolyse. Comme notre but, en déglycosylant la protéine, était de tester ensuite ses propriétés biologiques, nous n'avons pas pu utiliser cette méthode pour accéder à nos fins. Aussi, nous sommes nous orientés vers un autre procédé d'hydrolyse, qui promettait d'être moins drastique et moins sujet à caution : l'hydrolyse par des enzymes spécifiques.

2 - HYDROLYSE DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN PAR L'ENDO-N-
ACETYL- β -D-GLUCOSAMINIDASE B

Nous avons dans un premier temps, soumis la glycoprotéine à l'action d'une neuraminidase. L'asialoglycoprotéine ainsi obtenue a été soumise à l'hydrolyse par l'endoglycosidase.

a) Désialylation

L'avantage d'utiliser une neuraminidase insolubilisée, outre, que la même solution d'enzyme peut être réutilisée maintes fois, réside dans le fait que, par simple élution de la colonne contenant le gel, les produits d'hydrolyse sont séparés de la neuraminidase. Cet avantage est particulièrement important dans notre cas, car il nous permet de nous débarrasser très facilement et très sûrement de l'enzyme qui ne doit pas contaminer la solution de sérotransferrine et interférer alors dans les expériences d'incubation avec les réticulocytes, auxquelles nous destinons notre glycoprotéine traitée.

La sérotransferrine est éluee après 24 h d'hydrolyse à 37°C. Le rapport des quantités d'acide sialique total et d'acide sialique libéré, mesurées par dosages colorimétriques, montre que la glycoprotéine a perdu 90 à 95 p. 100 de ses résidus d'acide N-acétylneuraminique.

b) Analyse du produit d'hydrolyse

Une fraction de la glycoprotéine hydrolysée est analysée pour sa composition molaire en monosaccharides. Après une méthanolyse suivie d'une trifluoroacétylation, les produits obtenus sont soumis à une chromatographie en phase gazeuse et révèlent qu'il reste moins de 10 p. 100 de résidus d'acide N-acétylneuraminique sur la glycoprotéine. Par contre, tous les autres résidus de monosaccharides sont encore présents, dans les quantités normales.

La sérotransferrine hydrolysée est aussi soumise à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de S.D.S. : elle présente une seule bande au même niveau que celle de la sérotransferrine témoin (Figure 18 p. 115).

Une immunoélectrophorèse de l'asialosérotransferrine effectuée en présence d'un antisérum sérotransferrine montre un seul arc de précipitation, déplacé par rapport à celui de la glycoprotéine témoin (Figure 19 p. 116). En effet, la désialylation a provoqué un changement de la charge globale de la sérotransferrine, par suite de la perte des résidus chargés d'acide N-acétylneuraminique : l'asialotransferrine reste plus près du pôle négatif (l'immunoélectrophorèse est faite en tampon véronal pH 8,2).

Ces diverses vérifications ont permis de voir que le traitement par la neuraminidase a effectivement ôté la majeure partie des résidus d'acide N-acétylneuraminique portée par la glycoprotéine sans toutefois provoquer de coupures de la chaîne peptidique, visibles par électrophorèse en présence de S.D.S., ou de dénaturation révélée par immunoélectrophorèse.

c) Déglycosylation par l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase B et isolement des divers produits d'hydrolyse

L'utilisation de l'enzyme sous une forme insolubilisée présente les mêmes avantages que ceux décrits à propos de l'hydrolyse par la neuraminidase. Toutes les étapes ont été réalisées dans le même tampon afin d'éviter au maximum dialyses, concentrations ou lyophilisations intermédiaires.

Après une hydrolyse à température ambiante pendant 15 h, la sérotransferrine est éluée de la colonne et tout d'abord soumise à une étape de dialyse-concentration. En effet, il faut dans un premier temps, séparer l'oligosaccharide libéré, de la protéine. Mais le volume de la

DEPOT

FRONT

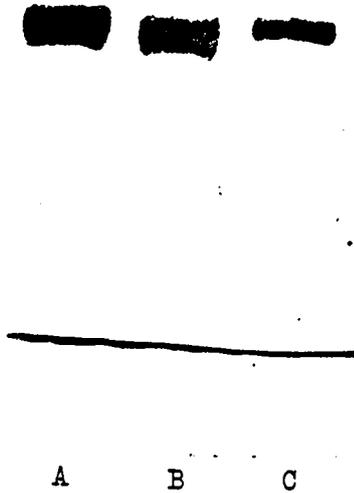


Figure 18

Electrophorèse en gel de polyacrylamide à 7,5 %, en présence de
SDS de la sérotransferrine

A : sérotransferrine désialylée. (témoin II)

B : sérotransferrine sialylée, traitée par l'endoglycosidase B.
(témoin III)

C : sérotransferrine non hydrolysée. (témoin I)



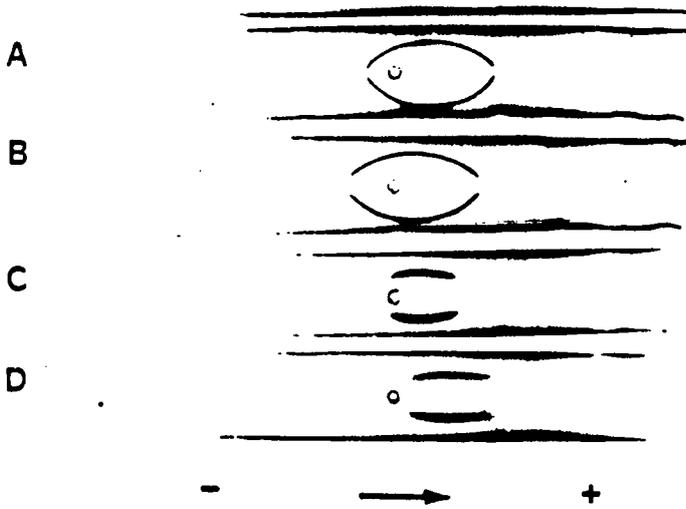


Figure 19 A

Immunoélectrophorèse de la sérotransferrine

- A : sérotransferrine normale. (témoin I)
- B : sérotransferrine désialylée. (témoin II)
- C : sérotransferrine désialylée, traitée par l'endoglycosidase B.
- D : sérotransferrine sialylée, traitée par l'endoglycosidase B. (témoin III)

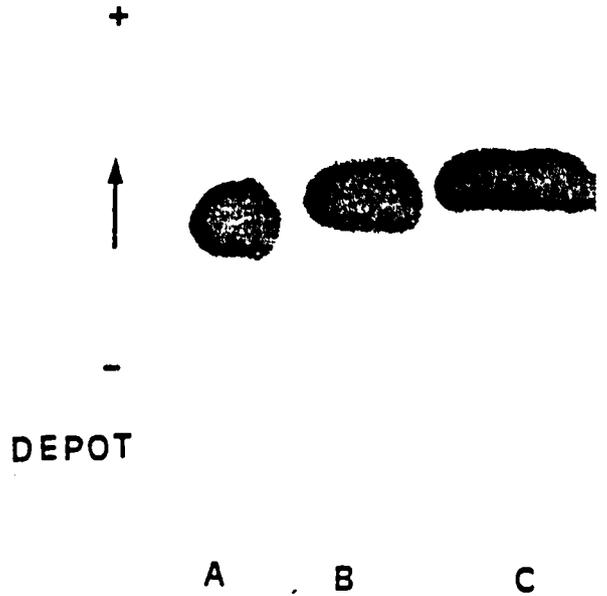


Figure 19 B

Electrophorèse sur acétate de cellulose de la sérotransferrine traitée par l'endoglycosidase B.

- A : sérotransferrine désialylée. (témoin II)
- B : sérotransferrine désialylée traitée par l'endoglycosidase B et non retenue sur concanavaleine A.
- C : sérotransferrine normale, non traitée (témoin I)

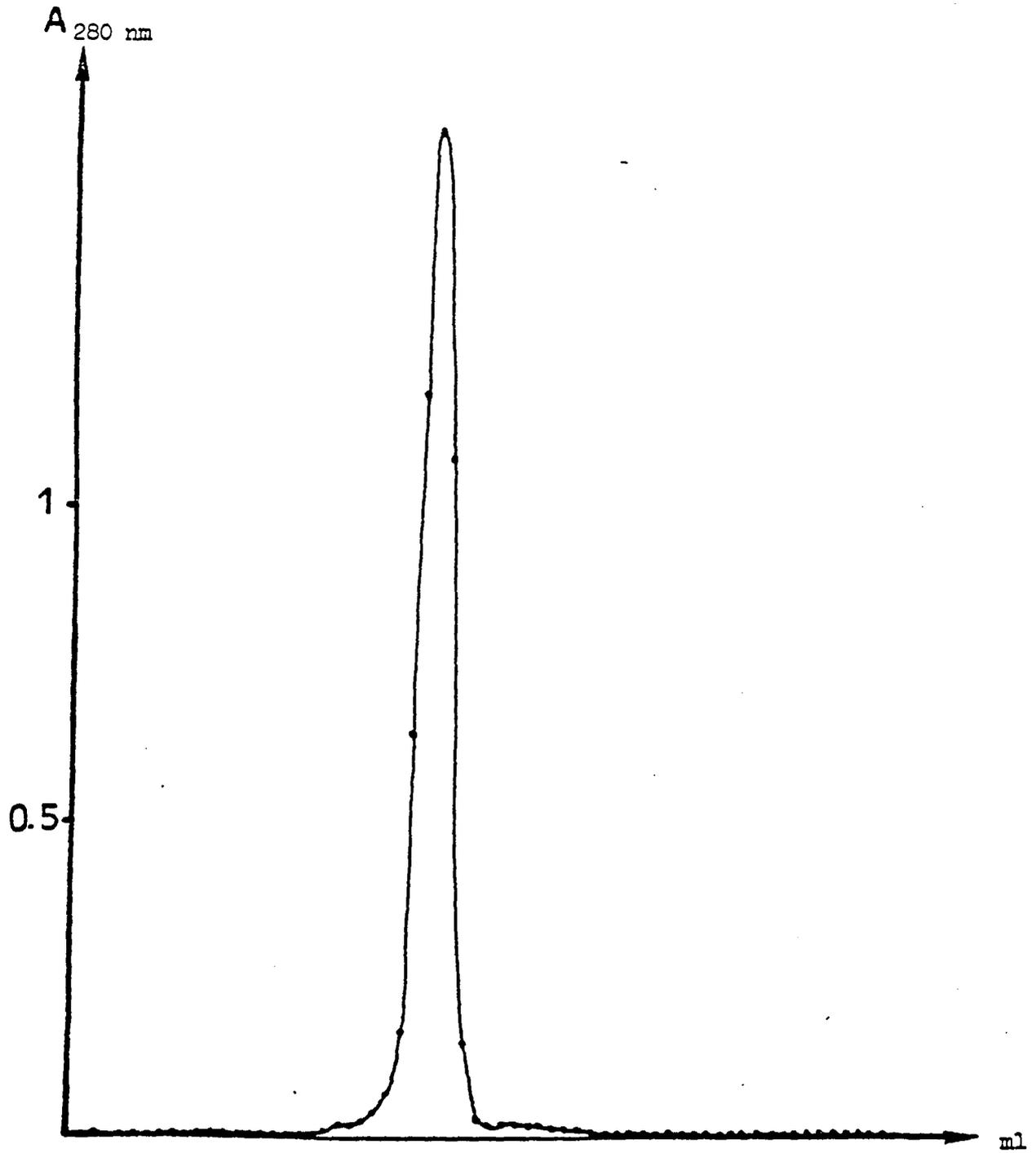


solution récupérée après hydrolyse est trop important, pour permettre une bonne séparation des produits par tamisage moléculaire. Aussi s'avère-t-il nécessaire de concentrer au préalable l'échantillon. Cette étape est réalisée d'un appareil de dialyse-concentration, sous-vide, en ultragaines, dont la limite de rétention (masses moléculaires d'au moins 25.000) permet la dialyse de l'oligosaccharide (de masse moléculaire 1030) libéré après action de l'endoglycosidase. Le dialysable est donc conservé et déssalé afin d'être analysé.

La protéine hydrolysée, une fois concentrée, est déposée sur colonne d'Ultrogel AcA-34 afin de séparer la fraction protéique de toute trace d'oligosaccharide n'ayant pas dialysé. Le profil d'élution obtenu est donné dans la Figure 20 p.118. Aucune fraction glucidique ne peut être révélée à l'orcinoI sulfurique ni au même niveau d'élution que la fraction protéique, ni plus loin.

Le pic protéique, symétrique est récupéré et chargé sur une colonne de concavaline A. Ce type de chromatographie doit permettre de séparer la protéine non hydrolysée, contenant encore un glycanne, donc susceptible d'être retenue par la lectine, de la protéine hydrolysée, sans glycanne donc non fixée par la concavaline A. Le profil d'élution est donné dans la figure 21 p. 119. 95 p. 100 du produit d'hydrolyse n'est pas retenu sur concavalin A. 5 p. 100 du produit est élué par l' α -D-méthyl-glucoside 0,15 M.

Les fractions protéiques récupérées dès l'élution de la colonne d'endoglycosidase, parfaitement solubles, sont de couleur brunâtre. Elles ont en effet, retenu des pigments présents dans la solution d'enzyme insolubilisée, et qui semblent s'adsorber particulièrement sur la sérotransferrine. Des essais de séparation entre les pigments et les



BIS
LILLE

Figure 20

Profil d'élution sur colonne d'Ultrogel AcA-34 de la sérotransferrine
après action de l'endoglycosidase B.

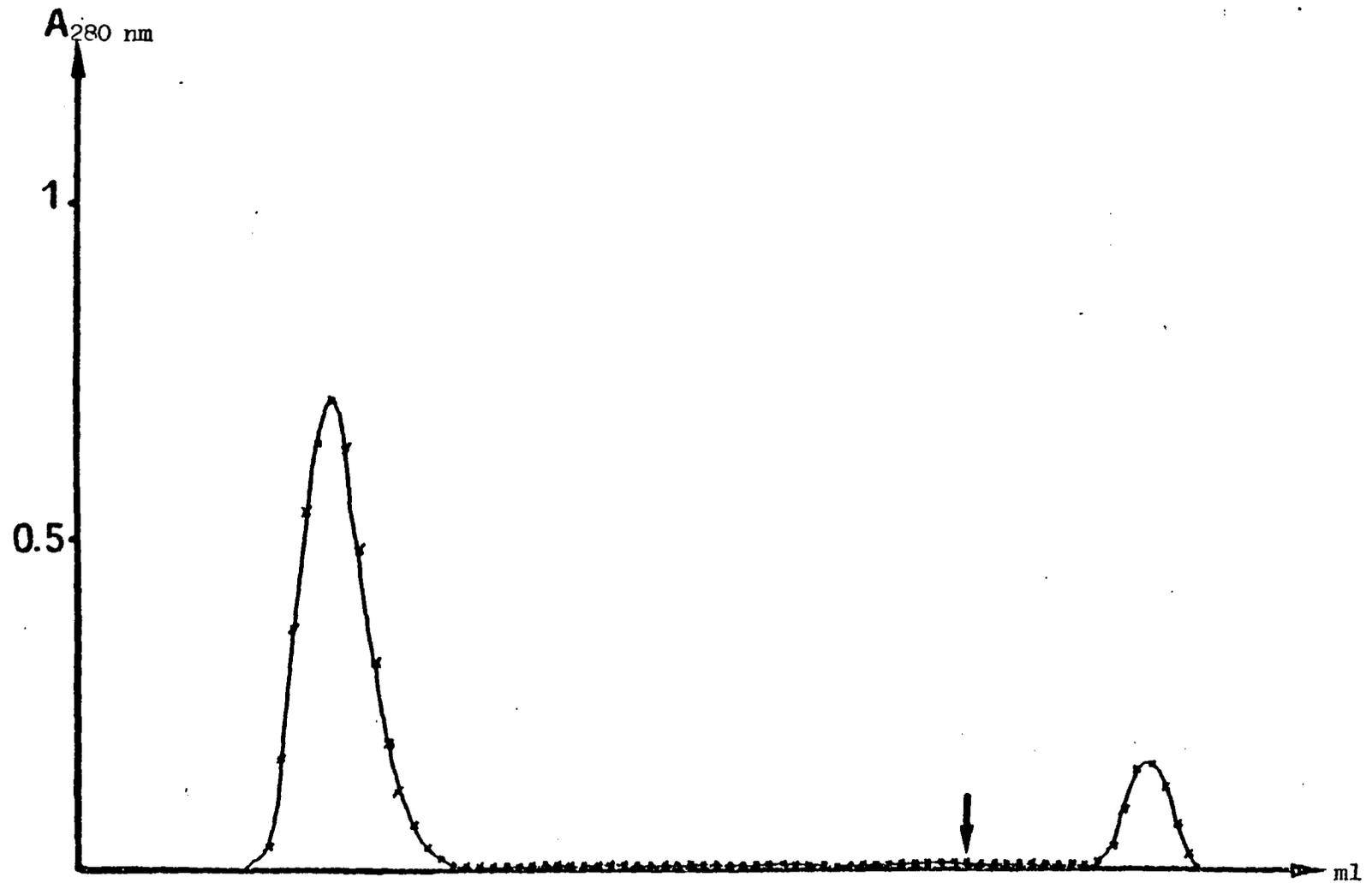


Figure 21

Profil d'élution sur colonne de concanavalin A-sépharose de la sérotransferrine après action de l'endoglycosidase B.
 La flèche indique l'application du tampon contenant l' α -D-méthyl glucoside.



protéines hydrolysées ont été tentés par passage du mélange sur colonnes de DEAE-cellulose ou d'hydroxylapatite, mais se sont tous révélés négatifs. Aussi avons-nous analysé dans un premier temps, en espérant obtenir une nouvelle préparation d'enzyme repurifiée les propriétés de la sérotransferrine hydrolysée et contaminée par les pigments. Nous avons utilisé pour témoins, un témoin I constitué de la sérotransferrine normale, un témoin II constitué de la sérotransferrine désialylée par la neuraminidase, et un témoin III constitué d'une solution de sérotransferrine sialylée, donc non hydrolysable par l'endoglycosidase B, mais qui a subi le même traitement que la sérotransferrine hydrolysée, c'est-à-dire : passage sur colonne d'endoglycosidase B, d'Ultrogel AcA-34 et de concanavaline A. Une telle protéine est aussi contaminée par les pigments.

d) Analyse des divers produits d'hydrolyse

α) Analyse de la fraction dialysable. Le dialysable obtenu après l'étape de dialyse-concentration est déssalé par passage sur résines échangeuses d'ions. Le produit obtenu est concentré à sec puis repris dans 10 µl d'eau et déposé sur une plaque de silice afin d'être analysé par chromatographie sur couche mince.

Après chromatographie et révélation par pulvérisation d'une solution d'orcinoï sulfureux, l'oligosaccharide contenu dans le dialysable présente une migration (Figure 22 p. 121) identique à celle d'un asialo-oligosaccharide témoin GM₁, isolé de l'urine de patients atteints de gangliosidose et qui présente la structure de l'oligosaccharide attendu après coupure de l'asialosérotransferrine par l'endoglycosidase B (Figure 13 p. 93). Il semble donc qu'un oligosaccharide libéré par hydrolyse ait dialysé à travers la membrane d'ultrafiltration employée lors de l'étape de dialyse-concentration.

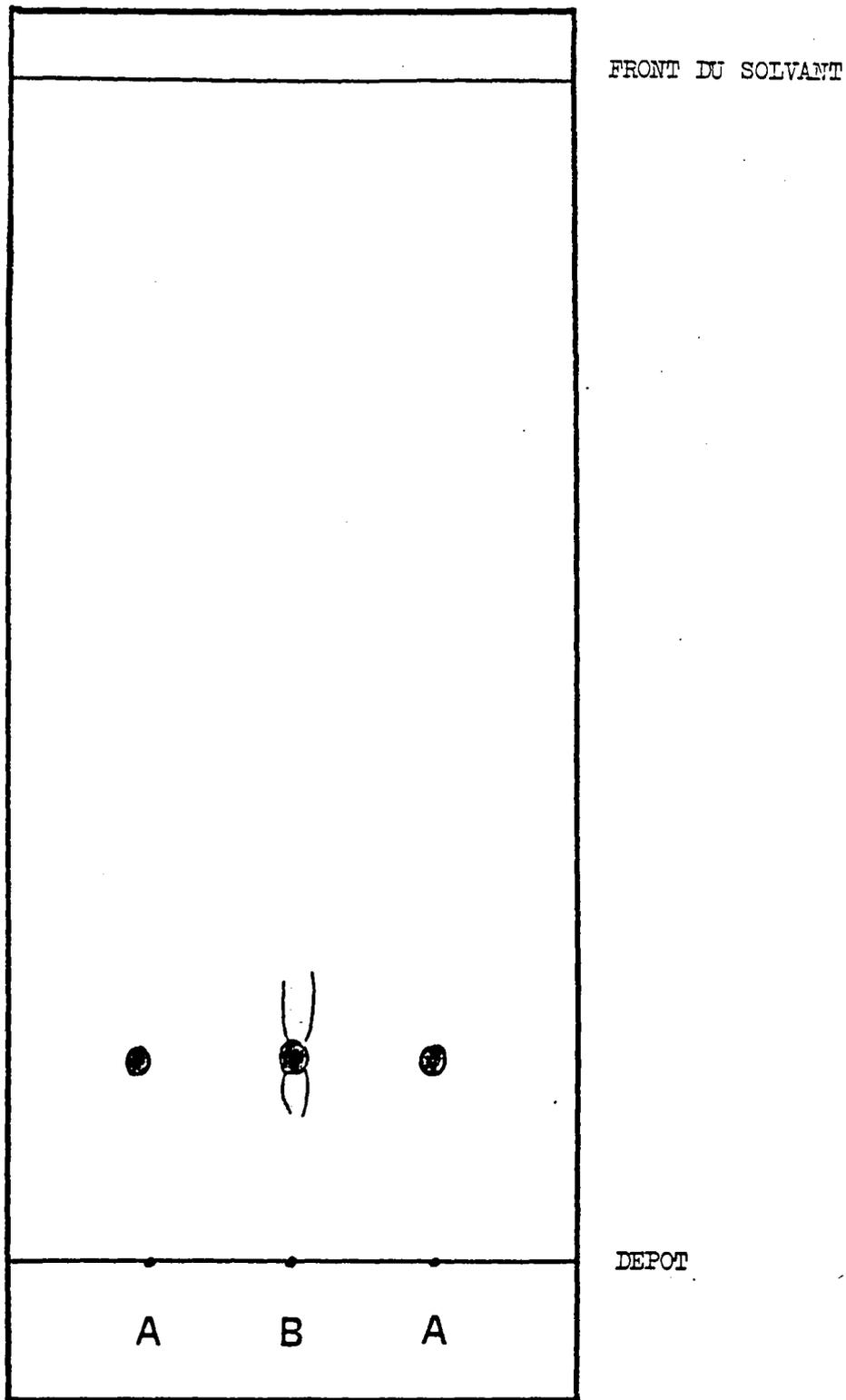


Figure 22



Schéma de la plaque de silice après chromatographie et révélation à l'orcinol-sulfurique de la fraction dialysable obtenue après action de l'endoglycosidase B sur la sérotransferrine

A : témoin GM₁

B : fraction dialysable

β) Analyse de la composition molaire en monosaccharides de la fraction protéique hydrolysée. Les fractions non retenues et retenues sur colonne de concanavoline A ont été dialysées, lyophilisées puis analysées par chromatographie en phase gazeuse ainsi que les témoins I, II et III après méthanolyse et trifluoroacétylation.

Cette technique nous permet de voir qu'il n'y a pas de monosaccharides libérés par méthanolyse sur la fraction non retenue par la lectine. Par contre, la fraction retenue par la concanavoline A renferme autant de glucides que la glycoprotéine désialylée témoin II. La méthanolyse du témoin III (protéine non hydrolysée) révèle des monosaccharides identiques et en quantité égale à ceux du témoin I (sérotransferrine normale). De plus, des pics parasites sont visibles sur les diagrammes d'élution de chromatographie en phase gazeuse dans les fractions retenues et non retenues sur concanavoline A ainsi que dans le témoin III, échantillons contenant tous des pigments.

Ainsi, la méthanolyse ne permet plus de révéler, sur la sérotransferrine traitée par l'endoglycosidase B et non retenue par la concanavoline A, la présence d'aucun résidu de monosaccharide. Nous savons, d'autre part, que l'enzyme coupe les glycopeptides de type N-acétyllactosaminique après la N-acétylglucosamine du point d'attache. Comme la fraction dialysable obtenue après concentration des produits d'hydrolyse, se comporte, en chromatographie sur couche mince, comme l'asialo-oligosaccharide GM₁, nous avons dès maintenant, de bonnes raisons de croire que l'endoglycosidase B peut hydrolyser la sérotransferrine de lapin, libérant le glycanne hormis la dernière N-acétylglucosamine du point d'attache.

γ) Analyse de la fraction protéique déglycosylée par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 7,5 p. 100, en présence de S.D.S. Une électrophorèse en tubes a été réalisée selon la méthode de Neville, 1971, en présence de SDS et de mercapto-éthanol, sur : la glycoprotéine normale (témoin I), la sérotransferrine déglycosylée (non retenue sur concanavoline A) et sur un mélange de ces deux protéines. La figure 23 p.124 montre les gels obtenus après coloration. La migration électrophorétique de la sérotransferrine déglycosylée est différente de celle de la glycoprotéine témoin. L'aglycoprotéine migre en effet plus loin dans le gel, ce qui en présence de SDS, révèle une masse moléculaire plus faible. La distance entre les deux bandes est représentative, sur ce type de gel et d'après la gamme étalon, d'une différence de masse correspondant à la perte du glycanne (Masse moléculaire 2000). Cette analyse apporte donc une preuve supplémentaire de l'hydrolyse effectuée par l'enzyme. De plus, elle montre que le traitement n'a pas provoqué, au niveau de la chaîne peptidique de la sérotransferrine, de coupures susceptibles de libérer des peptides qui soient révélés par électrophorèse en présence de SDS et de mercapto-éthanol.

D'autre part, une électrophorèse sur plaque, en présence de SDS du témoin II prouve que cette glycoprotéine n'a effectivement pas été coupée : elle migre au même niveau qu'une transferrine témoin non traitée (Figure 18 p. 115).

δ) Analyse de la fraction protéique déglycosylée par électrophorèse sur acétate de cellulose. La protéine déglycosylée migre à un niveau intermédiaire entre celui de la sérotransferrine normale (témoin I) et celui de la sérotransferrine désialylée (témoin II), qui, comme nous l'avons déjà vu, présente un pI plus basique que celui de la sérotransferrine normale (Figure 19 p. 116).

DEPOT

FRONT

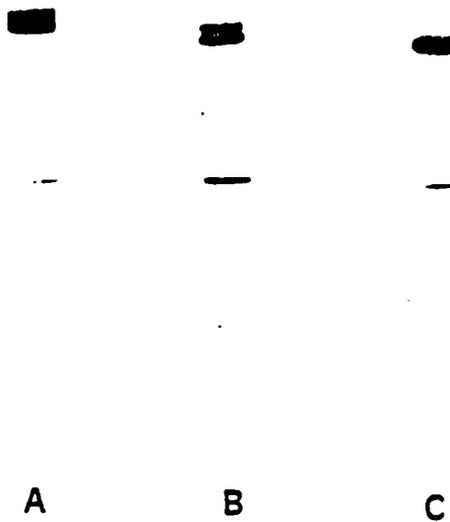


Figure 23

Electrophorèse en gel de polyacrylamide à 7,5 %, en présence de SDS, de la sérotransferrine traitée par l'endoglycosidase B.

A : sérotransferrine non traitée. (témoin I)

B : mélange contenant la sérotransferrine témoin I et la sérotransferrine traitée, non retenue sur concanavoline A.

C : sérotransferrine désialylée traitée par l'endoglycosidase B et non retenue sur concanavoline A.



La sérotransferrine déglycosylée aurait donc une charge globale intermédiaire entre celle des deux glycoprotéines témoins.

ε) Analyse de la fraction protéique déglycosylée par électrophorèse en gel de polyacrylamide sans SDS. Dans un tel type de gel, ces protéines migrent en fonction de leur charge. La figure 24 p.126 montre, qu'en effet, la sérotransferrine déglycosylée migre à un niveau intermédiaire entre celui des témoins I et II. Par contre, le témoin III apporte des renseignements supplémentaires : cette protéine non hydrolysée mais contaminée par les pigments, migre comme la sérotransferrine déglycosylée. La présence des pigments probablement adsorbée sur les fractions protéiques semble donc jouer considérablement lors de l'étude de leurs propriétés physicochimiques.

De plus, toutes les protéines analysées par électrophorèse sur ce type de gel, présentent plusieurs bandes, dont les intensités relatives sont partout les mêmes et qui correspondent probablement au polymorphisme génétique des transferrines. L'existence de tels variants a, en effet, été souvent décrite et mise en évidence par des techniques électrophorétiques du type de celle que nous avons employée (Feeney et Komatsu, 1966).

ζ) Analyse par immunoelectrophorèse. La figure 19 p.116 montre que la sérotransferrine déglycosylée est encore capable d'être reconnue par des anticorps spécifiques de la sérotransferrine normale. De plus, nous pouvons constater, que l'aglycoprotéine migre au même niveau que le témoin I, c'est-à-dire comme la sérotransferrine normale et non comme l'asialo-glycoprotéine. Mais là aussi, le témoin III, qui présente une migration électrophorétique plus proche du pôle positif que le témoin I, prouve que la présence des pigments doit gêner l'étude.

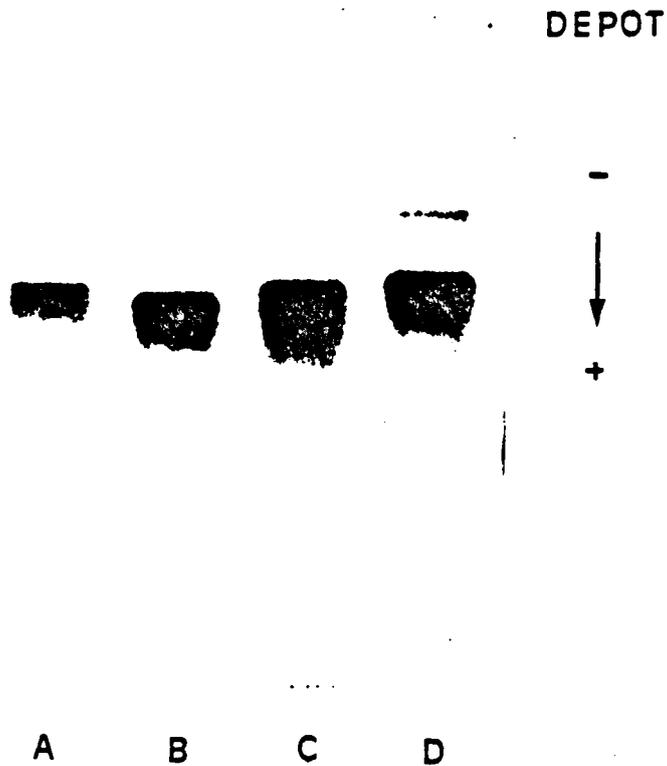


Figure 24

Electrophorèse en gel de polyacrylamide à 7,5 %, sans SDS, de la sérotransferrine traitée par l'endoglycosidase B.

A : sérotransferrine sialylée, traitée par l'endoglycosidase B.
(témoin III)

B : sérotransferrine normale, non traitée. (témoin I)

C : sérotransferrine désialylée traitée par l'endoglycosidase B
et non retenue sur concanavaine A.

D : sérotransferrine désialylée. (témoin II)



Pour le témoin III comme pour la protéine déglycosylée, les arcs de précipitation sont plus diffus que ceux obtenus avec les témoins I et II, pour les mêmes concentrations en protéine et en antisérum, ce qui indique un rapport différent entre les quantités d'antigènes et d'anticorps mis en présence. On peut expliquer ce phénomène soit par une concentration effective en protéine, dans le gel, inférieure à celle attendue, à cause d'une insolubilisation, d'une dénaturation, soit par une concentration en antigènes différente de celles des témoins, à cause du traitement (présence de contaminants masquant certains antigènes) ou à cause de l'hydrolyse (disparition de déterminants antigéniques en même temps que la disparition du glycanne).

e) Conclusion

Nous avons démontré que l'endoglycosidase B était capable d'hydrolyser la sérotransferrine de lapin. En effet, à partir d'échantillons d'asialosérotransferrine de 6 mg à 8 mg soumis pendant 15 h à une hydrolyse à température ambiante, les 95 p. 100 de la glycoprotéine sont déglycosylés. L'étude de la composition molaire en monosaccharides de cette fraction, son comportement électrophorétique en gel de polyacrylamide en présence de S.D.S. et l'étude de la fraction dialysable contenant l'oligosaccharide libéré par hydrolyse, tout cela révèle, en effet, qu'il y a une coupure du glycanne.

Mais, dès les expériences préliminaires réalisées dans le but de vérifier les propriétés de l'aglycoprotéine, nous avons pu constater que les contaminants présents dans la préparation enzymatique gênaient nos études. Ces divers tests effectués ne permettent pas de conclure si les propriétés différentes liées à la charge de l'aglycoprotéine sont dues à la déglycosylation ou à la présence des contaminants probablement en majorité d'origine pigmentaire. Néanmoins, la sérotransferrine déglycosylée

est toujours susceptible d'être reconnue par des anticorps dirigés contre la sérotransferrine normale. Elle donne une seule bande en électrophorèse en présence de S.D.S. et elle est parfaitement soluble.

3 - INCORPORATION DU FER DANS LES RETICULOCYTES PAR LA SEROTRANSFERRINE DEGLYCOSYLEE

Nous avons néanmoins réalisé des études préliminaires de fixation du fer sur l'aglycoprotéine contaminée par les pigments.

Après une saturation, réalisée selon le procédé décrit p. 82 , à 70 p. 100 en fer radioactif de l'aglycoprotéine, nous l'avons incubée en présence de réticulocytes en comparaison avec des sérotransferrines témoins normale et désialylée et saturées à 100 p. 100 en fer radioactif, et avons réalisé une cinétique d'incorporation du métal.

Le procédé d'incubation est identique à celui décrit p. hormis l'étape de préincubation en présence d'oligosaccharides. L'incubation comporte 500 µl de cellules et 500 µl de tampon de Hanks contenant 400 µg de protéine marquée au fer radioactif. Des prélèvements de 50 µl sont effectués à divers temps. La réaction est arrêtée dans la glace comme il est décrit p. 82 .

Les courbes représentant la cinétique d'incorporation du fer sont données dans la figure 25 p. 129. Elles montrent que les cinétiques sont tout-à-fait comparables pour les trois protéines.

Le glycanne de la sérotransferrine de lapin ne semble donc pas nécessaire dans le transfert du fer par la glycoprotéine aux réticulocytes.

%d'incorporation

100

50

SEROTRANSFERRINES NORMALE
ET DESIALYLEE

SEROTRANSFERRINE DEGLYCOSILEE

20

40

60

80

temps
(mn)

Figure 25

Cinétique d'incorporation du fer dans les réticulocytes par la sérotransferrine normale, la sérotransferrine désialylée et la sérotransferrine déglycosilée.



Nous n'avons pas poursuivi ces études, espérant obtenir une préparation d'enzyme repurifiée, qui nous permettrait d'avoir une aglycoprotéine utilisable pour des expériences sur un matériel biologique. Notre but était, en effet, de préparer de la sérotransferrine déglycosylée en grande quantité et d'en caractériser les principales propriétés physico-chimiques. Nous voulions aussi calculer les constantes d'association entre l'aglycoprotéine et les réticulocytes, espérant mettre en évidence des différences avec la sérotransferrine normale.

Les nouvelles préparations d'endoglycosidase B repurifiées se sont montrées très peu performantes et les trop faibles quantités de produit d'hydrolyse obtenues ne nous ont pas permis de poursuivre nos études dans cette direction. Néanmoins, il semble que la sérotransferrine déglycosylée, non contaminée par les pigments, ait perdu une grande partie de sa solubilité, ce qui serait à rapprocher des résultats obtenus après traitement de la glycoprotéine par HF. Mais encore une fois, ces résultats ne sont que préliminaires et toutes les études restent à faire sur la sérotransferrine de lapin déglycosylée.

D - CONCLUSION

Les expériences que nous avons faites ne nous ont pas permis d'attribuer jusqu'ici un rôle particulier au glycanne de la sérotransferrine de lapin. L'obtention de grandes quantités de sérotransferrine déglycosylée et pure permettra sans doute d'éclaircir cette question et de mettre en évidence, par exemple, des différences de conformation entre protéine glycosylée et déglycosylée.

L'une des méthodes d'investigation que nous envisageons d'employer au début de cette étude, afin d'élucider le rôle du glycanne

de la sérotransferrine lors de son interaction avec les réticulocytes, était la Résonance Paramagnétique Electronique. En fixant une sonde de manière spécifique sur des monosaccharides de la sérotransferrine, nous pensions en effet, être en mesure de détecter des variations dans le comportement du glycanne, au cours de l'interaction de la glycoprotéine avec le récepteur. Aussi, nous avons cherché, dans un premier temps, à obtenir un marquage spécifique de ces glycannes. Cela constitue l'objet du dernier chapitre de nos travaux.

ETUDE DE LA MOBILITE DES GLYCANNES BI- ET TRI-ANTENNES DE TYPE
N-ACETYLLACTOSAMINIQUE, PAR RESONNANCE PARAMAGNETIQUE
ELECTRONIQUE

A - INTRODUCTION

Comme nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre des généralités consacré à la structure des transferrines, les études théoriques des modèles moléculaires, effectuées par Montreuil et al., en 1978, ont permis de préciser plusieurs points concernant la conformation du glycanne biantenné de la sérotransferrine (figure 4 p.). D'après ces études, le glycanne comporte une partie compacte (le noyau pentasaccharidique) et deux antennes plantées sur le noyau qui sont plus flexibles. En effet, le résidu de mannose 4 peut se disposer de deux manières par rapport au plan défini par le trisaccharide terminal, ce qui permet deux orientations différentes pour les antennes, conduisant à deux configurations pour le glycanne : en T et en Y. De plus, il existe aussi une certaine flexibilité au niveau des résidus d'acide N-acétylneuraminique qui peuvent se disposer très librement dans l'espace. Les études de Warin et al., en 1979 ont ensuite précisé quelque peu ce modèle : après cristallisation du trisaccharide α -Man-(1 \rightarrow 3)- β -Man-(1 \rightarrow 4)- α -GlcNAc, les auteurs ont pu déterminer la structure moléculaire du cristal et en déduire qu'à l'état solide, la conformation spatiale du glycanne de la sérotransferrine est de type T. De plus, le trisaccharide présente, déplié, une longueur de 12 Å à 15 Å et la maille du cristal, comportant deux molécules, a des dimensions de 9,894 Å x 10,372 Å x 11,816 Å. Des calculs théoriques, ont permis à Warin en 1980, de proposer une longueur de 35 Å à 40 Å pour le glycanne biantenné totalement déplié. Même si l'on admet, d'après les études de Montreuil et al., en 1978, que les antennes sont enroulées en hélice,

donc que cela doit raccourcir quelque peu la longueur totale du glycanne, il apparaît néanmoins que ce glycanne présente une taille importante, surtout si on la compare aux dimensions de la partie protéique de la sérotransferrine de lapin. En effet, Gorinski et al en 1979 avaient déterminé, par cristallographie, les dimensions de la glycoprotéine : 95 x 60 x 50 Å. Il ne faut pas oublier, d'autre part, que les sérotransferrines sont constituées de deux domaines de taille identique, chaque domaine représentant donc la moitié du volume total de la glycoprotéine. Il advient, d'après toutes ces données, et dans le cas de la sérotransferrine de lapin, que le domaine portant le glycanne doit être recouvert en grande partie par l'oligosaccharide, d'autant plus que les études effectuées d'après les modèles moléculaires (Montreuil et al., 1978) laissent présager une grande flexibilité du glycanne. Un schéma de cette hypothèse est donné, dans la figure 26 p. 134.

N'ayant pu, dans un premier temps, grâce aux expériences que nous avons faites jusqu'alors, mettre en évidence un rôle particulier du glycanne de la sérotransferrine de lapin, nous nous sommes alors tournés vers l'étude de la flexibilité des glycannes. En effet, nous pensions que de par leur taille, et par la place qu'ils occupent en regard de la partie protéique, l'étude de leur mobilité nous permettrait d'avoir une idée plus précise de leurs possibilités de mouvements et nous orienterait alors vers la recherche des rôles qu'ils peuvent présenter au sein de la glycoprotéine.

Nous avons envisagé, pour cette étude, d'utiliser la R.P.E. des radicaux nitroxydes, en collaboration avec Jean Davoust du Laboratoire du Pr. P. Devaux à Paris.

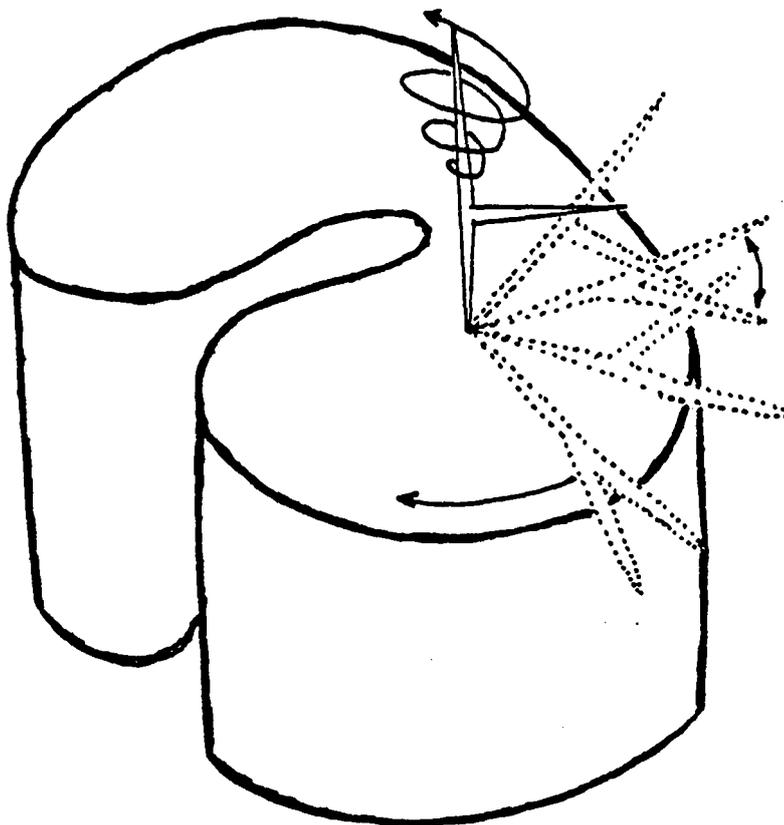


Figure 26

Modèle de la sérotransferrine de lapin tendant à montrer la taille et la mobilité du glycanne par rapport à la partie protéique.



Plus sensible que la R.M.N., la R.P.E. offre un domaine de fréquences observables très large puisque la même sonde paramagnétique permet de couvrir des temps de corrélation allant de 10^{-11} s à 10^{-3} s. Cette méthode présente d'autre part l'inconvénient de perturber le milieu, puisqu'on y introduit un marqueur. Elle ne donne donc que des renseignements indirects sur les mouvements moléculaires et les interactions locales. Mais les caractéristiques magnétiques du radical nitroxyde sont bien connues et les spectres de R.P.E. de cette sonde peuvent donner beaucoup d'informations :

- la forme des spectres R.P.E. d'une sonde paramagnétique dépend de la polarité du milieu dans l'entourage immédiat du marqueur.

- la forme des spectres dépend aussi de la nature et du mouvement du radical. Pour un mouvement isotrope rapide, caractérisé par un temps de corrélation rotationnel $\tau_c < 10^{-7}$ s, le spectre est constitué de 3 raies bien séparées qui peut être isotrope ou comporter une légère contribution anisotrope. Pour des temps τ_c plus longs, le spectre devient anisotrope.

- les spectres peuvent aussi servir à déterminer les quantités relatives des marqueurs de spins situés dans un environnement différent. La surface des raies permet de calculer la quantité totale de marqueur de spin présente dans la solution étudiée. L'extrême sensibilité de la méthode permet de détecter des concentrations en spin à partir de $5 \mu\text{M}$.

- lorsque des espèces paramagnétique interagissent à des distances très faibles, il y a des effets d'interaction dipolaires ou des effets d'interaction d'échange de spin qui provoquent des modifications de la forme des raies. L'analyse des spectres donne alors des informations sur la distance entre deux marqueurs adjacents ou sur la fréquence des collisions entre ces marqueurs.

Récemment plusieurs groupes d'auteurs se sont intéressés à l'étude de la mobilité des glycanes par l'emploi d'une telle méthode. Ainsi, Willan et al., en 1977, Nezlin et al., en 1978 et Timofeev et al., en 1978 ont fixé un marqueur de spin sur la partie glycanique des immunoglobulines alors que Aplin et al., en 1979, Lee et Grant en 1979 et Feix et Butterfield en 1980 ont lié le marqueur aux glycanes des glycoprotéines membranaires pour en étudier la mobilité et le comportement. Mais ces auteurs n'ont pas, jusqu'à présent, utilisé des systèmes bien définis et n'ont pu établir de relation entre la structure des glycanes qu'ils ont marqués et leur flexibilité.

Ayant pour but d'étudier la mobilité du glycanne de la sérotransferrine, tant sur la glycoprotéine libre et non saturée en métal, que lors de son interaction avec le fer et avec le récepteur des réticulocytes, nous nous sommes, dans un premier temps, intéressés à la fixation spécifique d'un radical nitroxyde sur le glycanne. Et nous avons, pour ce faire, entrepris des études préalables de fixation d'un marqueur de spin sur des glycopeptides de structure bien définie : les glycopeptides de type N-acétyl-lactosaminique bi- et tri-antennés, ceux que l'on rencontre sur la sérotransferrine humaine et sur la sérotransferrine de lapin.

Nous avons réalisé un marquage spécifique des résidus d'acide sialique portés par ces glycanes, donc à l'extrémité des antennes, à un niveau dans la molécule supposé très flexible et susceptible de mouvements variés. Cela permet ensuite l'étude des modifications de la mobilité des molécules marquées, en fonction de la température et de la présence de concanavoline A. Cette lectine interagit, en effet, selon Narasimhan et al., 1979, fortement avec le glycanne biantenné, mais beaucoup moins avec le triantenné. Son interaction avec le glycanne va donc peut être nous fournir un exemple de modification du mouvement décelable au niveau du marqueur de spin.

Ce sont les résultats de ces études préliminaires effectuées sur les glycopeptides, que nous allons décrire maintenant.

B - MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 - PREPARATION DES GLYCOPEPTIDES

Les glycopeptides sialylés ont été préparés après digestion pronasique de la sérotransferrine humaine (Spik et Montreuil, 1969) et de la fraction IV de Cohn. Cette fraction contient, outre le glycanne biantenné, un glycanne triantenné dont la structure a été déterminée par les méthodes classiques de méthylation, hydrazinolyse-désamination nitreuse et spectrométrie de masse ainsi que par analyse en R.M.N. du proton à 360 MHz (Spik, 1980).

2 - MARQUAGE DES GLYCOPEPTIDES SIALYLES

La méthode employée est basée sur une oxydation périodique ménagée des résidus d'acide N-acétylneuraminique (Van Lenten et Aschwell, 1971) et sur la réactivité des groupements aldéhydes ainsi formés avec le marqueur de spin présentant une extrémité amine (le 4 amino 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-1-oxyl). Un schéma de la réaction est donné dans la figure 27 p. 138.

Chaque glycopeptide est dissous dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,4, 0,02 M en métaperiodate de sodium de manière à être en 5 molaire excès de métaperiodate par rapport aux résidus d'acide sialique présents dans la solution. L'oxydation a lieu pendant 10 minutes à 4° et à l'obscurité. Elle est stoppée par l'addition d'éthylène-glycol également en 5 molaire excès par rapport à la concentration en acide sialique.

Les solutions sont alors dessalées par passage sur colonne de Séphadex G-25 (P.D. 10, Pharmacia 1,5 x 9,5 cm) équilibrées dans l'eau.

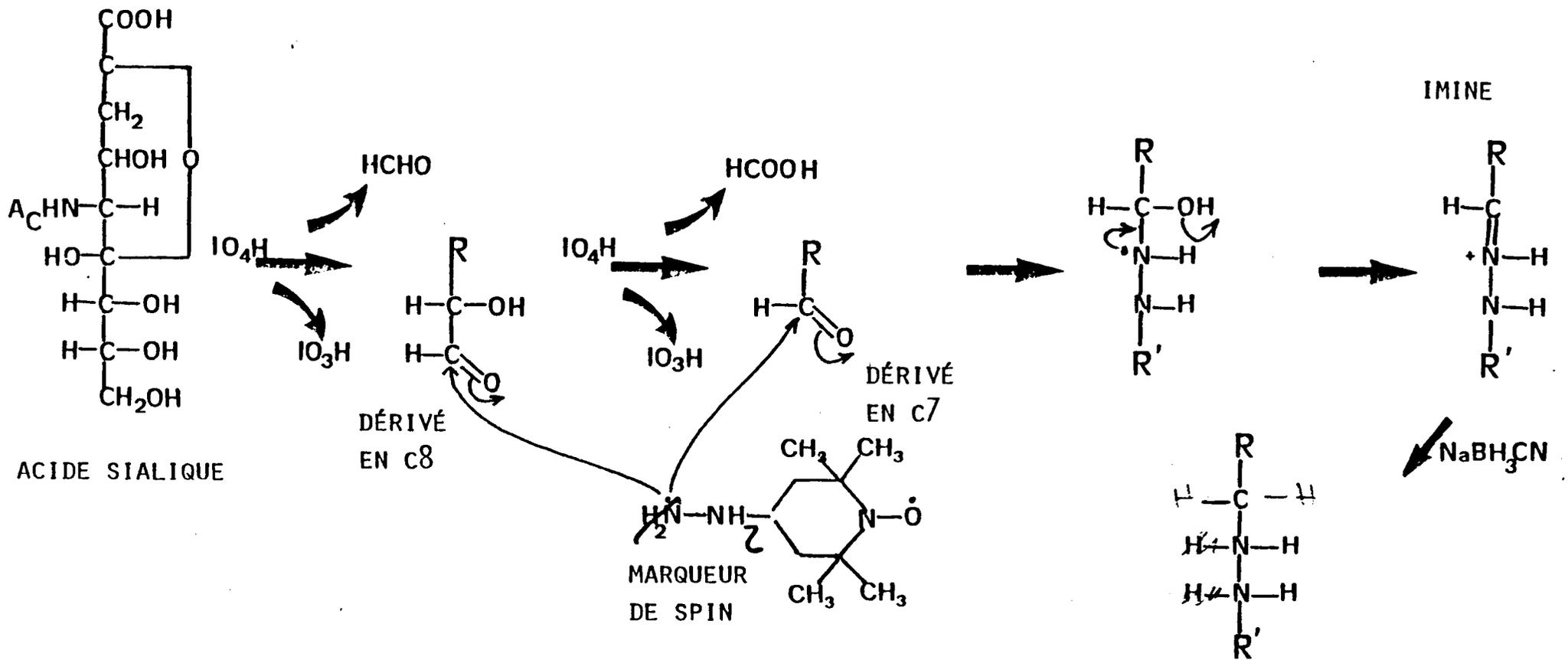


Figure 27

Schéma de la réaction de couplage entre l'acide sialique et le marqueur de spin



La solution de glycopeptide, éluée dans l'eau, est ensuite évaporée à sec au moyen d'un évaporateur rotatif. Puis le glycopeptide est repris dans le tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 pour obtenir une solution 4 mM.

L'addition du marqueur de spin se fait à partir d'une solution stock 1 M dans l'éthanol, le marqueur étant ajouté en 20 molaire excès par rapport à la quantité d'acide sialique présente dans la solution. L'addition de la solution alcoolique ne doit pas excéder 10 p. 100 du volume total de la solution glycopeptidique, afin d'éviter toute précipitation.

L'addition du réducteur a lieu en même temps que celle du marqueur de spin et dans le même rapport, c'est-à-dire en 20 molaire excès par rapport à la quantité d'acide sialique. Le réducteur employé est le cyanoborohydrure, qui, à pH 7.4, réduit seulement l'imine formée au cours de la réaction et non l'aldéhyde.

L'étape de couplage-réduction dure 24 heures à température ambiante. Au bout de ce temps, les réactifs sont séparés du glycopeptide par une étape de tamisage moléculaire sur Biogel P-2 (colonne de 40 x 1,3 cm) équilibrée dans le tampon phosphate 0,1 M pH 7.4. L'élution du glycopeptide, par le même tampon, est suivie par la méthode de repérage à l'orcinol-sulfurique et par test des fractions en R.P.E. qui présentent des signaux différents suivant que le marqueur est libre ou lié.

3 - DETERMINATION DU TAUX DE MARQUAGE

La concentration en glycopeptide dans chaque échantillon est estimée par détermination de la quantité d'oses neutres, par la méthode de dosage à l'orcinol-sulfurique.

La modification de l'acide N-acétylneuraminique transformé , au cours de l'oxydation periodique, en ses dérivés en C-7 et C-8 a été suivie par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et trifluoroacétylation du glycopeptide oxydé.

Le taux de marquage est calculé, pour chaque glycanne, d'après le rapport de la quantité d'acide N-acétylneuraminique modifié et la quantité de marqueur de spin, présent dans la solution, et estimée à partir du spectre de R.P.E. à 20°C.

4 - INTERACTION AVEC LA CONCAVALINE A

La lectine est ajoutée à la solution de glycopeptide dans le tampon phosphate à raison de 2,5 mg de concanavaline A pour 20 nmoles de glycopeptide biantenné et pour 10 nmoles du triantenné. Après un mélange à l'agitateur vortex pendant 2 minutes, les complexes sont étudiés par R.P.E..

Pour vérifier la spécificité d'interaction lectine-glycanne, les spectres de R.P.E. sont comparés à ceux obtenus après dissociation de tout complexe en ajoutant de l' α -méthyl-D-mannoside en 10 molaire excès par rapport à la concentration en concanavaline A.

5 - EXPERIENCES DE R.P.E.

Les expériences ont été faites avec un spectromètre Varian E 109 équipé d'un appareil de verouillage de champ-fréquence et relié à un calculateur Tektronix 4051 utilisé pour l'accumulation des données et les calculs effectués à partir des spectres. La température de l'échantillon est modifiée au moyen d'un courant d'azote liquide traversant un dewar dans lequel se trouve la cellule de mesure. Cette dernière est plate et peut contenir jusqu'à 50 μ l de solution. Un thermocouple cuivre/constantan, contrôle, en continu la température de l'échantillon dans la cellule de mesure.

Les expériences ont été faites avec un niveau de puissance en radiofréquence de 10 mW et une modulation d'amplitude de détection de 0,5 à 1 G.

Les concentrations en marqueur de spin ont été systématiquement diluées de 600 μM à 10 μM pour éviter d'observer des interactions spin-spin intermoléculaires.

Enfin, le temps de corrélation de rotation τ_c du radical nitroxyde a été évalué chaque fois que le spectre consistait en des raies fines, en utilisant les formules de Keith et al., 1970 ; cela conduit apparemment à une estimation correcte du mouvement anisotrope que l'on peut attribuer à une chaîne polysaccharidique.

C - RÉSULTATS

1 - MARQUAGE ET ISOLEMENT DES GLYCOPEPTIDES MARQUÉS

La structure des glycanes bi- et tri-antennés est donnée dans le tableau VIII p.142 aussi que les taux de marquage de ces deux glycopeptides.

Après l'étape de couplage-réduction, l'élution du marqueur de spin fixé covalamment aux glycopeptides, a été suivie, à la sortie de la colonne de Biogel P-2, au moyen du signal de R.P.E.. Dans ces conditions, nous pouvons constater une séparation complète entre le marqueur de spin lié aux glycopeptides et le marqueur libre, dont les signaux sont bien différents. Le spectre de R.P.E. des glycopeptides biantennés marqués est donné dans la figure 28 p.143. Un témoin constitué des mêmes glycopeptides, traités dans les mêmes conditions, mais avec un marqueur de spin non réactif, n'a donné aucun signal en R.P.E. associé au pic d'élution des glycanes.

TABLÉAU VIII

Structure des glycopeptides bi - et tri - anténnés marqués et leur taux de marquage

Structure des glycopeptides	A=concentration de chaque glycopeptide (μ M)	B=concentration de l'acide N-acétylneuramique modifié dans chaque glycopeptide (μ M)	C=concentration de marqueur de spin lié covalemment à chaque glycopeptide (μ M)	$\frac{C}{B}$	$\frac{C}{A}$	
α -NeuAc-(2 \rightarrow 6)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3)	β -Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow)-Asn	550 \pm 55	905 \pm 90	690 \pm 35	0,77 \pm 0,11	1,3 \pm 0,17
α -NeuAc-(2 \rightarrow 6)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 6)						
α -NeuAc-(2 \rightarrow 3)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)	β -Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow)-Asn	365 \pm 40	960 \pm 96	790 \pm 40	0,83 \pm 0,13	2,2 \pm 0,3
α -NeuAc-(2 \rightarrow 6)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3)						
α -NeuAc-(2 \rightarrow 6)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 6)						



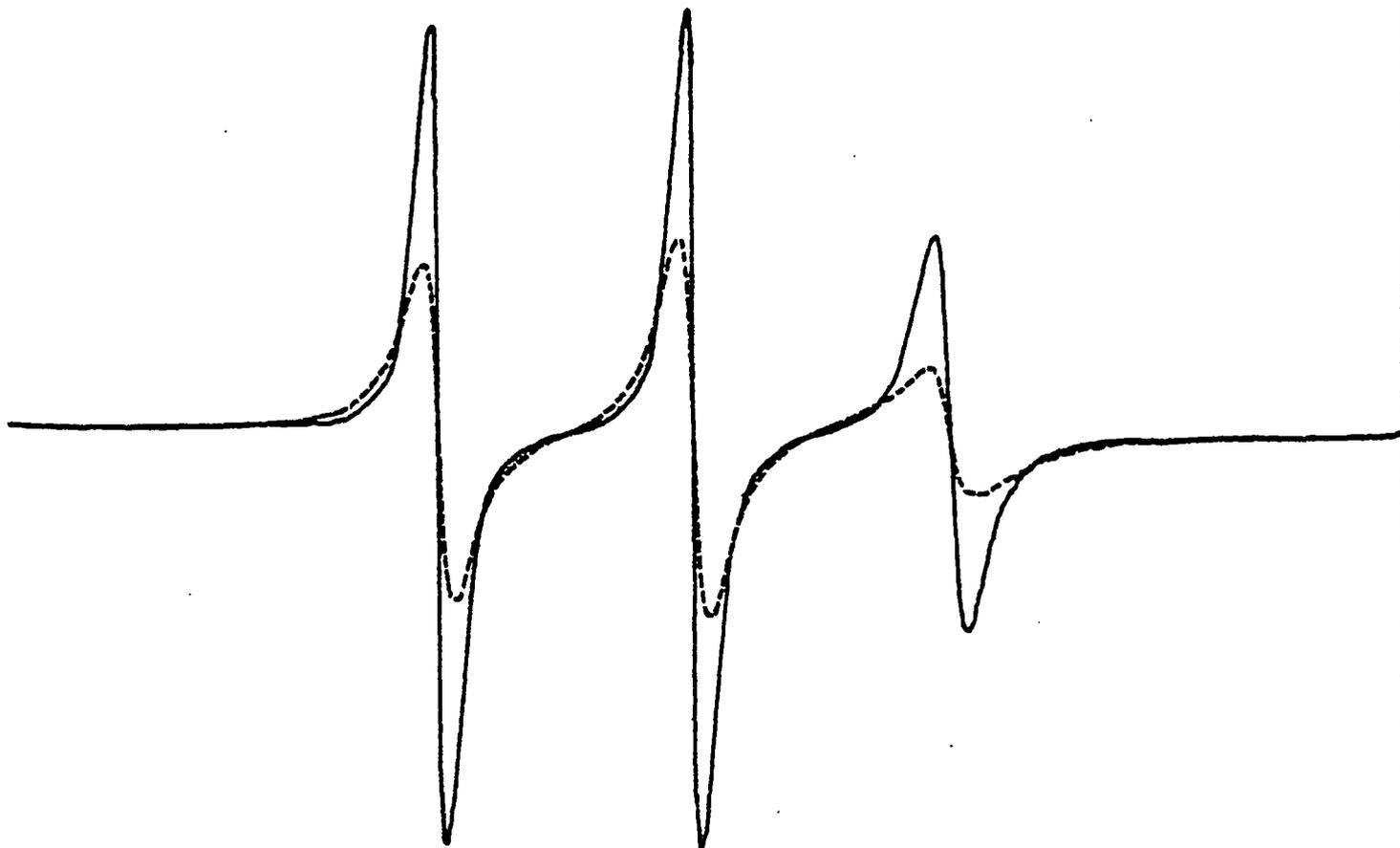


Figure 28

Spectres de R.P.E. du glycopeptide marqué biantenné, à 20 ° C.

(—) en tampon phosphate 0,1 M pH 7,4

(- - - -) après addition de concanavaline A



Dans les deux cas, les concentrations en glycopeptides sont identiques.

Le taux de marquage covalent des glycopeptides par le marqueur de spin est reporté dans le Tableau VIII p.142. Les conditions que nous avons employées permettent donc d'obtenir un taux de marquage reproductible et quantitatif, puisque le rapport : marqueur de spin fixé par résidu d'acide sialique oxydé est proche de 1.

Nous savons enfin que, grâce à la très grande sensibilité de la méthode de R.P.E. (une concentration au moins égale à 5 μM , en spin est détectable) nous pouvons utiliser des quantités de glycopeptide très faibles : jusqu'à 4 μM en glycopeptide, compte-tenu du taux de marquage le plus faible, ce qui représente 0,2 nmoles de produit dans les 50 μl de la cellule de mesure.

2 - MOBILITE ROTATIONNELLE DES GLYCOPEPTIDES MARQUES

Chacun des deux glycopeptides marqués et isolés au cours de cette étude, fournissent des spectres de R.P.E., entre 0°C et 50°C, caractéristiques d'un mouvement rapide comme on peut le voir sur la figure 28 p. 143, dans le cas du glycopeptide biantenné (temps de corrélation $\tau_c = 0,63 \pm 0,09 \times 10^{-9}$ s à 20°C). La forme globale du spectre (le rapport des pics et la largeur des raies) varie avec la température. Il y a donc variation du temps de corrélation en fonction de la température (figure 29 p. 145). La représentation d'Arrhénius de ce temps de corrélation donne une droite unique, pour les deux glycopeptides, et à partir de laquelle on peut calculer une énergie d'activation de rotation égale à $6,9 \pm 1,0$ Kcal/°C.

3 - INTERACTIONS SPIN-SPIN DANS LES GLYCANNES BI- ET TRI- ANTENNES

Les spectres obtenus au-dessus de 20°C pour les deux types de glycopeptides étudiés, présentent non seulement un rétrécissement de

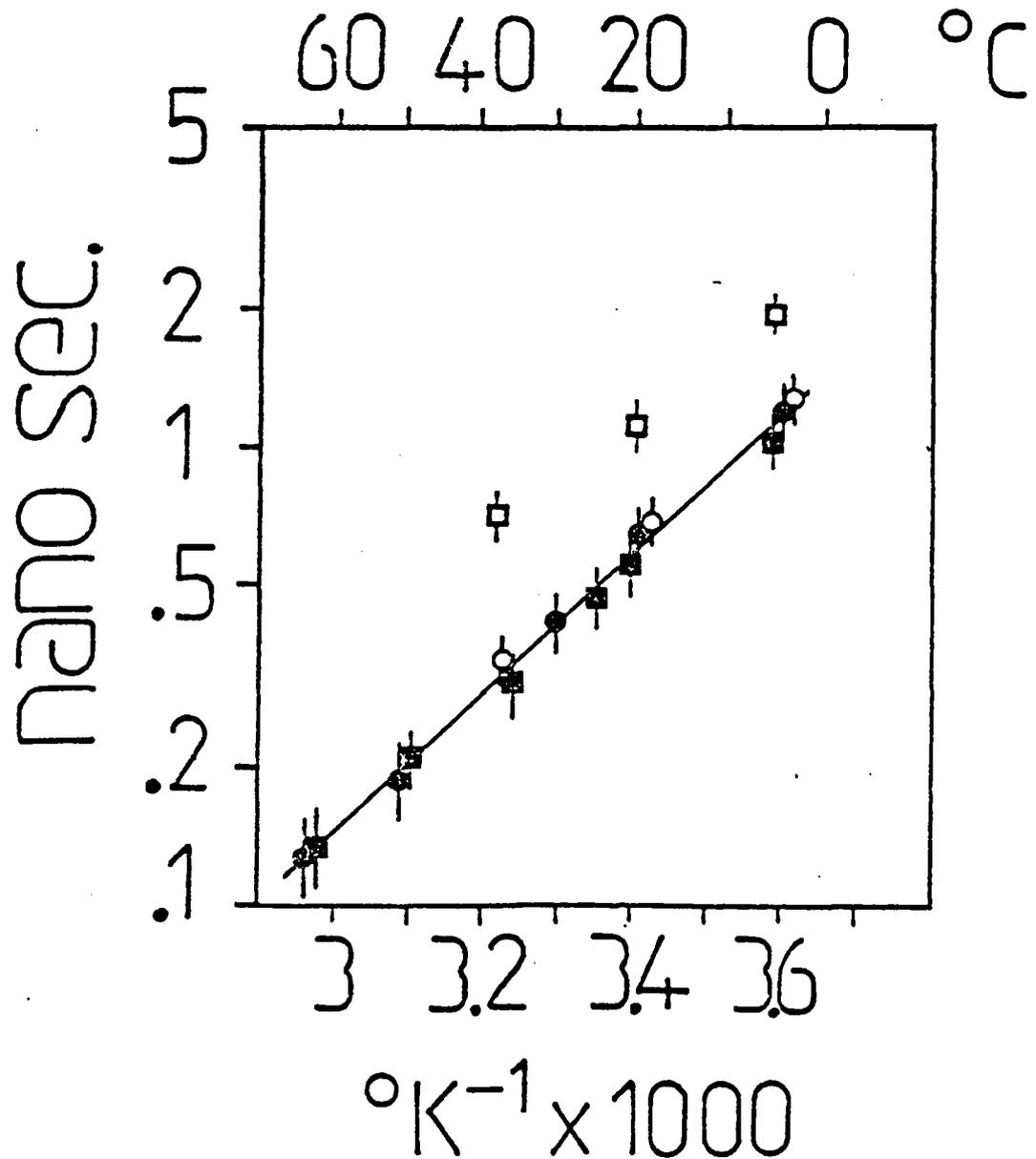


Figure 29

Représentation d'Arrhénius du temps de corrélation τ_c estimé d'après les spectres de R.P.E. des glycopeptides marqués, en tampon phosphate (0,1 M pH 7,4).



- glycopeptide biantenné
- glycopeptide triantenné
- glycopeptide biantenné + con A
- glycopeptide triantenné + con A

La barre d'erreur est calculée avec une incertitude de $\pm 0,5$ mm sur les mesures des pics.

la largeur des raies mais aussi une augmentation du rapport des hauteurs des deux premiers pics, comme le montre l'encadré de la figure 30 p. 147. Ce fait peut être attribué, sans ambiguïté à des interactions spin-spin qui proviennent d'une collision entre marqueurs, comme l'ont indiqué Devaux et Davoust en 1979. Ces caractéristiques spectrales ne disparaissent pas, même après une dilution au 60ème des glycopeptides marqués. Nous pouvons alors attribuer cet effet à des collisions internes dues à l'augmentation de la température, entre les résidus d'acide N-acétylneuraminiques portant les marqueurs de spin et situés sur la même molécule de glycanne.

Afin de comparer les interactions spin-spin intramoléculaires entre les glycannes bi- et tri-antennés nous avons systématiquement mesuré un paramètre spectral (H_1/H_0) à toutes les températures. Les résultats sont reportés dans la figure 30 p. 147. Le glycanne triantenné semble subir des collisions intramoléculaires plus prononcées que le glycanne biantenné. La valeur plus importante du rapport H_1/H_0 obtenu pour le glycopeptide à trois branches indique que les collisions intramoléculaires doivent provenir de la branche supplémentaire du glycanne triantenné qui rencontre les deux autres branches, puisque les deux glycopeptides étudiés ont fixé une quantité équivalente de marqueur de spin par résidu d'acide sialique.

D'ailleurs, quand par l'emploi de conditions de réaction non optimales, le taux de marquage est abaissé à un résidu d'acide sialique marqué par glycopeptide, alors, le rapport H_1/H_0 reste inférieur à l'unité, quelle que soit la température et pour les deux types de glycopeptide.

$\frac{H_1}{H_0}$

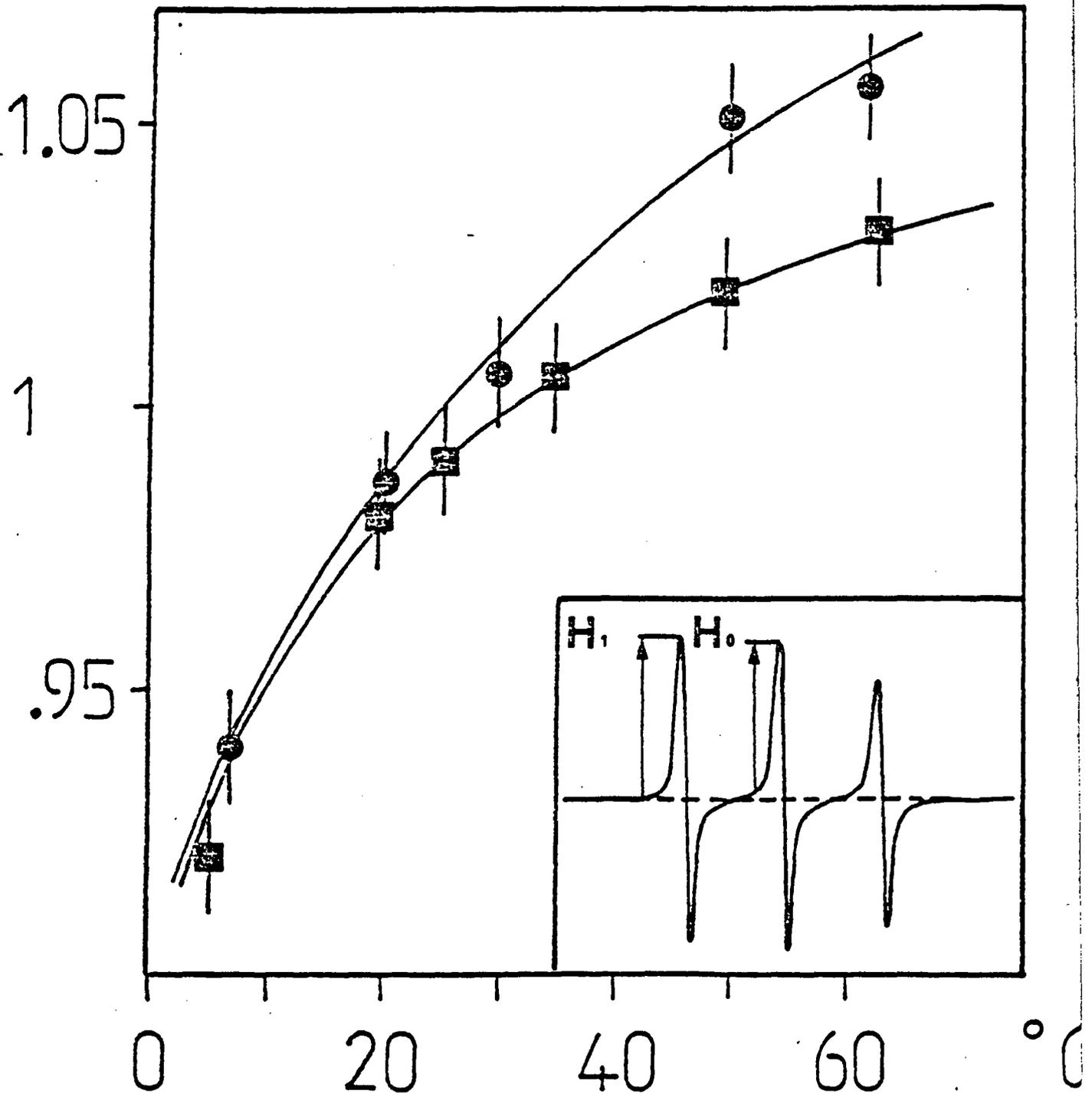


Figure 30

Rapport H_1/H_0 en fonction de la température. Ce rapport est mesuré comme représenté dans l'encart. La barre d'erreur est calculée avec une incertitude de $\pm 0,5$ mm sur H_1 et H_0 .

■ glycopeptide biantenné ● glycopeptide triantenné

Spectre dans l'encart : glycopeptide triantenné à 62,5 ° C.

BHS
JULÉ

4 - EFFET DES BASSES TEMPERATURES

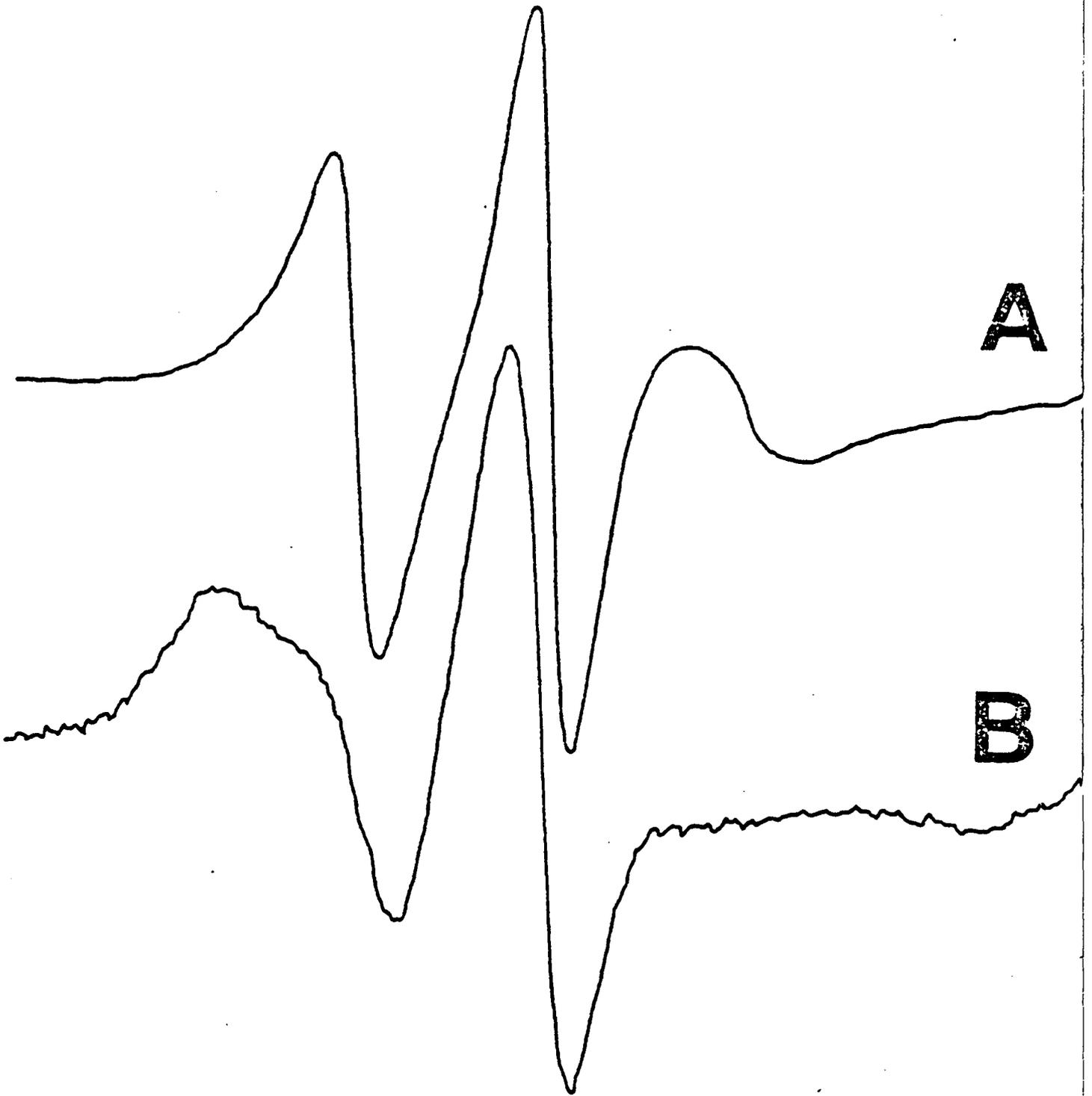
Dans une zone de températures allant de -2°C à -10°C , les spectres du glycanne biantenné montrent l'existence d'un mouvement de rotation rapide, bien que le tampon soit congelé (figure 31 A p. 149, pour une température de -10°C). Le même glycanne donne un spectre caractéristique d'un temps de corrélation plus lent que 10^{-7} s à -17°C (figure 31 B p. 149). Ce résultat peut provenir d'un phénomène de retard à la congélation de l'eau au voisinage direct du marqueur.

On peut tirer la même conclusion des spectres obtenus avec le glycopeptide triantenné en dessous de -20°C . Mais l'immobilisation de ce glycanne survient dès -10°C , ce qui révèle encore des propriétés dynamiques différentes entre les deux glycanes.

5 - MODIFICATION DU MOUVEMENT DUE A L'INTERACTION AVEC LA CONCAVALINE A

L'addition de concanavaline A en excès par rapport à la concentration en mannose dans chaque échantillon, réduit très légèrement la mobilité de la sonde liée au glycanne biantenné, comme le montre la figure 28 p. 143. ($\tau_c = 1,10 \pm 0,15 \times 10^{-9}$ s à 20°C). Par contre, l'addition de la lectine ne réduit pas du tout la mobilité du marqueur lié au glycanne triantenné. Cependant, en présence de concanavaline A la relation entre température et mouvement reste la même et les nouvelles valeurs mesurées pour le temps de corrélation de rotation (figure 29 p. 145) ne sont certainement pas représentatives du mouvement du complexe : lectine-glycanne biantenné. La masse moléculaire de la concanavaline A, protéine tétramérique, ne pourrait en effet donner lieu qu'à un temps de corrélation beaucoup plus lent.

Après addition d' α -méthyl-D-mannoside, afin de dissocier le complexe, le temps de corrélation τ_c retrouve sa valeur première, obtenue



BUS
LILLE

Figure 31

Spectres de R.P.E. des glycopeptides biantenné (A) et triantenné (B),
en tampon phosphate, en dessous de la température de congélation.

sans addition de la lectine. Cela suggère donc que nous avons bien observé le résultat d'une fixation spécifique de la concanavaline A avec le glycanne biantenné, mais que cette interaction n'augmente que légèrement le temps de corrélation global τ_c de ce glycopeptide.

D - DISCUSSION

Les collisions internes entre les marqueurs de spin situés sur la même molécule, ainsi que le mouvement relativement rapide mis en évidence même quand le glycopeptide interagit avec la concanavaline A, tout cela indique la grande flexibilité des glycanes et l'existence d'un degré de liberté interne, important, dans la structure des glycopeptides.

D'autres auteurs ont pu tirer de leurs études les mêmes conclusions. Ainsi, Lee et Grant en 1979, ont utilisé un procédé de marquage de spin identique au nôtre, sur la glycophorine. Que la glycoprotéine soit étudiée libre ou incorporée dans des modèles membranaires, le sonde fixée sur ses résidus d'acide sialique présente toujours un mouvement très rapide ($\tau_c = 6 \times 10^{-10}$ s à 8×10^{-10} s). L'addition d'une lectine (la W.G.A.) induit une immobilisation du même ordre que celle observée au cours de nos études ($\tau_c = 4 \times 10^{-10}$ s). Plus intéressantes sont les conclusions apportées par Cherry et al., en 1980. Ces auteurs ont employé une technique quelque peu différente : ils ont fixé sur les membranes d'érythrocyte, et plus particulièrement sur la glycophorine, un marqueur fluorescent, après oxydation des résidus d'acide N-acétylneuraminique et de galactose. Le marqueur permet également l'étude des mouvements dans une large gamme (10^{-11} s à 10^{-1} s). De plus, étant plus encombrant et moins mobile que le marqueur de spin, il est sensible aux mouvements plus lents. En effet, Cherry et al., ont pu observer des mouvements de deux types :

- très rapides ($\tau_c = 3 \times 10^{-9}$ s). Pour les auteurs, il s'agit de la mobilité liée au marqueur lui-même et aussi à un court segment de la chaîne oligosaccharidique, proche du marqueur.
- plus lents ($\tau_c = 10^{-7}$ à 10^{-5} s pour les marqueurs liés aux résidus d'acide sialique et $\tau_c = 10^{-8}$ à 10^{-3} s pour ceux liés aux résidus de galactose). Cela correspondrait à un mouvement d'ensemble de la chaîne oligosaccharidique. Mais il faut noter aussi que la conformation de la chaîne polypeptidique portant le glycanne peut intervenir et contribuer au mouvement d'ensemble des résidus marqués. Néanmoins, les résultats de Cherry et al., sont en accord avec la conception des glycanes en tant que signaux de reconnaissance, présentant un mouvement d'ensemble assez lent dû à leur fixation à la membrane, mais présentant une grande flexibilité à l'extrémité de la chaîne, ce que nous retrouvons aussi au cours de notre étude et de celle de Lee et Grant.

L'environnement local du radical nitroxyde subit donc l'influence de modifications structurales apportées au glycanne, telles que la présence d'une antenne supplémentaire, ou bien l'interaction avec une lectine. Cela prouve que ce type de sonde peut très bien détecter des modifications fonctionnelles importantes des glycanes. Par contre, si la technique de marquage de spin est sensible aux changements de conformation, même subtils, elle provoque néanmoins une perturbation assez grande de la molécule étudiée, à cause de la taille non négligeable du radical. Dans notre cas, le noyau pipéridine lié au résidu d'acide sialique est aussi encombrant qu'un monosaccharide et peut, de plus, tourner autour de la liaison covalente qu'il forme avec l'acide N-acétylneuraminique modifié. C'est pourquoi, nous considérons, dans cette étude, que le marqueur de spin, même fixé au glycopeptide, reste néanmoins sensible

à son environnement hydrophile local, comme c'est le cas, aussi, pour les molécules marquées dans une membrane et soumises à un environnement hydrophile.

Compte-tenu de ces remarques, nous ne pouvons attribuer le phénomène de retard à la congélation observé lors de l'étude des spectres de R.P.E. à basse température, plus particulièrement aux composés glucidiques, bien qu'une telle observation ait déjà été faite par Vandenneede et al., en 1972 : la glycoprotéine "antifreeze" d'un poisson de l'Antarctique, possède des groupements glycaniques responsables de l'abaissement du point de congélation du sang de cet animal. Les glucides interviennent de manière à orienter les molécules d'eau de façon à éviter la formation des cristaux de glace. Mais la grande mobilité propre du marqueur de spin et son environnement hydrophile nous interdisent d'éliminer l'hypothèse de la participation du marqueur lui-même dans un tel phénomène.

E - CONCLUSION

A cause de sa position terminale, à l'extrémité de la chaîne polysaccharidique, la sonde révèle les mouvements de rotation rapide et elle est sensible aux perturbations moléculaires locales. Ainsi, elle détecte la présence d'un autre marqueur de spin dans son entourage immédiat, ou bien la légère immobilisation, par la concavaline A, de la partie de la chaîne glycanique adjacente. Mais, dans tous les cas, le mouvement global de la sonde résulte à la fois des mouvements internes du glycanne et aussi de la libre rotation de la molécule entière. Une distinction entre ces deux types de mouvement requiert l'étude de la sérotransferrine entière, marquée sur le glycanne.

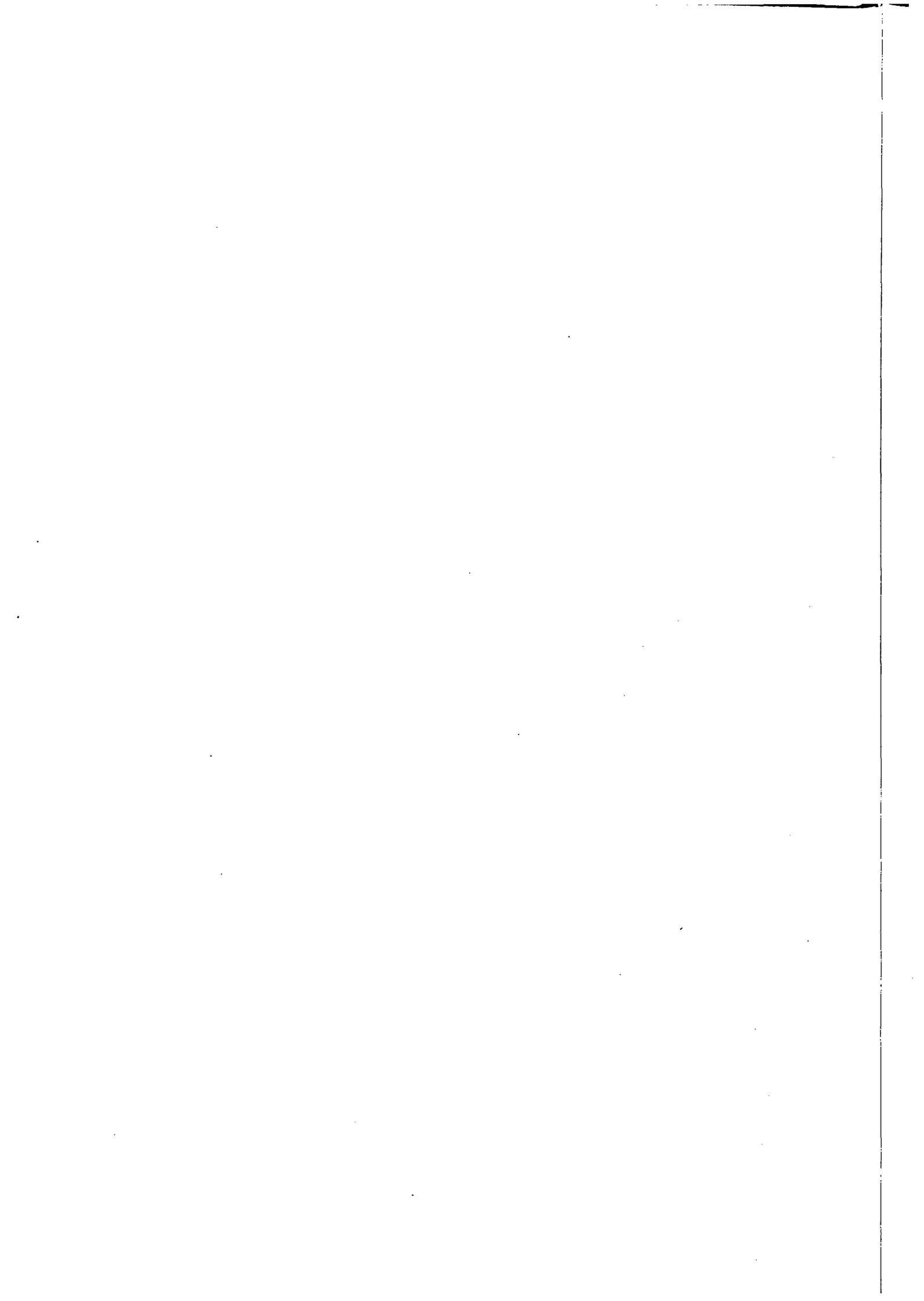
Or, des expériences préliminaires nous ont permis de voir qu'il était tout-à-fait possible de fixer spécifiquement le marqueur de spin sur la partie glycanique de la sérotransferrine. Cela ouvre alors

un champ d'investigation très large : la chaîne polysaccharidique pourrait servir de détecteur des interactions de la glycoprotéine avec le fer ou bien avec ses récepteurs membranaires. Il est possible aussi d'utiliser les propriétés paramagnétiques du fer -ou de tout autre métal susceptible de se fixer sur la sérotransferrine- pour tenter d'observer des changements de conformation intervenant au niveau du site de fixation du métal, lors de l'interaction avec les cellules. Un marquage simultané sur le glycanne et dans le site métallique pourrait permettre de voir, si elles existent, des interactions entre ces deux domaines. Il est possible encore, de fixer spécifiquement un marqueur de spin, non seulement sur la partie glycanne, mais aussi sur la partie protéique de la molécule et d'observer les interactions qui existent entre ces deux parties.

Une autre approche intéressante consiste en l'emploi de lectines fixant spécifiquement les résidus de N-acétylglucosamine ou de galactose, ou même d'acide N-acétylneuraminique si sa modification n'empêche pas sa reconnaissance par la lectine. En effet, la concanaviline A reconnaît les résidus de mannose du glycanne biantenné donc une partie du glycopeptide assez éloignée du marqueur. L'emploi d'autres lectines pourrait permettre de voir l'influence, au niveau du nitroxyde, d'une immobilisation, peut-être plus importante, de la chaîne glycanne, en un point plus proche du marqueur. Dans le même ordre d'idée, l'étude systématique de glycopeptides ou d'oligosaccharides de taille de plus en plus réduite et de structure diverse, après fixation spécifique du marqueur de spin, conjuguée à l'emploi d'une gamme de lectines reconnaissant spécifiquement les monosaccharides, doivent fournir des renseignements intéressants sur la mobilité, point par point de différents types de chaîne polysaccharidique.

Ces études préliminaires nous ont, en effet, permis de voir que radical nitroxyde se révélait un outil très utile dans l'établissement des propriétés liées à la mobilité des glycannes. Il reste maintenant à l'employer pour poursuivre plus loin les investigations.

CONCLUSIONS



CONCLUSIONS GENERALES

Au cours de notre étude, nous avons tenté d'élucider le rôle de la partie glycanique de la sérotransferrine de lapin lors de la fixation de la sérotransferrine sur les membranes des réticulocytes. Dans un premier temps, nous avons employé des glycopeptides et des oligosaccharides en tant qu'inhibiteurs de l'interaction entre la sérotransferrine et les réticulocytes. Puis, nous avons cherché à obtenir une sérotransferrine déglycosylée pour en comparer les propriétés à celles d'une glycoprotéine intacte. Enfin, nous avons étudié par R.P.E. la flexibilité de glycopeptides de structure N-acétyllactosaminique, dans le but d'étudier ensuite la mobilité du glycanne de la sérotransferrine lors des diverses interactions auxquelles la glycoprotéine peut être soumise.

1 - Les essais d'inhibition de transfert du fer sur les réticulocytes, par l'utilisation de glycopeptides et d'oligosaccharides de structure connue, ne nous ont pas permis de conclure à la participation directe et exclusive du glycanne de la sérotransferrine, lors de son interaction avec les cellules. En effet, pour des concentrations de 2500 molaire excès par rapport à la sérotransferrine présente dans le milieu, ces inhibiteurs empêchent à 50 % le transfert du métal dans les réticulocytes. Mais ils ne semblent pas empêcher la fixation de la glycoprotéine aux cellules. D'autre part, aucune structure précise de ces glycopeptides ou oligosaccharides n'est spécialement reconnue par les réticulocytes. Par les techniques que nous avons employées, nous avons dû observer l'intervention des inhibiteurs dans plusieurs mécanismes, ce qui a gêné notre étude concernant l'interaction spécifique sérotransferrine-réticulocytes et l'intervention du glycanne de la sérotransferrine dans ce

mécanisme. Et, par exemple, il n'est pas exclu que nous ayons inhibé l'interaction sérotransferrine-récepteur, non pas seulement au niveau de la participation de la sérotransferrine, mais aussi au niveau de celle du récepteur. Il ne faut pas oublier, en effet, que le récepteur est lui-aussi une glycoprotéine et que sa partie glycanique peut aussi intervenir dans la reconnaissance de la sérotransferrine et/ou dans le transfert du métal. Il ne faut pas oublier, non plus, que les composés membranaires susceptibles d'intervenir dans le transfert, sont, pour plusieurs groupes d'auteurs, de divers types : la reconnaissance de la sérotransferrine par la cellule et le transfert du métal seraient deux processus distincts qui intéresseraient deux protéines membranaires différentes. Les études que nous avons faites au niveau des inhibiteurs ne nous ont donc pas permis d'éclaircir un point précis de ces mécanismes complexes.

2 - Nous avons d'autre part cherché à ôter le glycanne de la sérotransferrine, pour vérifier de manière définitive et sûre, son rôle au sein de la glycoprotéine. Une première série d'expériences, concernant la déglycosylation par voie chimique, ne nous a apporté que peu de renseignements : il est possible d'hydrolyser la glycoprotéine par l'acide fluorhydrique mais le produit obtenu est tellement insoluble qu'il est pratiquement inutilisable pour tout type d'étude. Et nous ne pouvons conclure quand à l'effet du départ du glycanne sur la solubilité de la glycoprotéine. Car il semble que le traitement par l'acide provoque des dénaturations qui peuvent fort bien rendre compte de l'insolubilisation du produit.

La déglycosylation effectuée par voie enzymatique nous apporte, en revanche, un peu plus d'éclaircissements : il est possible d'obtenir une sérotransferrine déglycosylée, soluble, par l'action d'une endoglycosidase spécifique. L'aglycoprotéine peut encore fixer le fer, et le transférer aux

réticulocytes. Il semble donc que le glycanne ne soit pas important dans l'interaction entre la sérotransferrine et la cellule. Mais ces résultats ne sont que préliminaires et en particulier, la présence de contaminants provenant de la préparation d'enzyme gêne considérablement l'étude des propriétés physicochimiques de l'aglycoprotéine. Aussi, l'unique analyse concernant les propriétés biologiques de cette sérotransferrine déglycosylée, contaminée par des pigments, n'a que peu de valeur. De plus, tant que nous n'avons pas fait d'études cinétiques sur l'interaction réticulocyte-sérotransferrine déglycosylée, nous ne pouvons véritablement tirer de conclusions.

Intéressants, peut-être, sont les résultats, bien que préliminaires, obtenus à partir de nouvelles préparations d'endoglycosidases qui semblent révéler une insolubilisation du produit d'hydrolyse, cette fois non contaminé par les pigments. Mais, en raison de l'activité d'hydrolyse très faible de ces nouvelles préparations, il faut utiliser des temps d'hydrolyse plus longs et à des températures plus élevées, qui peuvent expliquer l'intervention d'une dénaturation du produit d'hydrolyse. Les quantités d'aglycoprotéine obtenues sont si faibles qu'elles n'ont pas encore permis de faire beaucoup d'analyses sur les nouvelles propriétés de la sérotransferrine déglycosylée. Il semble néanmoins, si l'on considère les quelques résultats obtenus jusqu'alors, que la protéine déglycosylée soit plus vulnérable et se dénature assez facilement. De tels comportements des glycoprotéines ont déjà été maintes fois décrits dans la littérature, qui prouvent que les glycanes interviennent dans la conformation de la glycoprotéine ou servent dans sa protection contre l'attaque protéolytique. Pour toutes ces références, la revue générale de Montreuil, 1980, fournit plus d'un exemple des différents rôles attribués à divers types de glycanes. Mais, encore une fois, en ce qui

concerne nos résultats, il est difficile de conclure sur des expériences préliminaires.

3 - Dans la dernière partie de notre étude, nous avons pu fixer de manière covalente et spécifique, un marqueur de spin sur les résidus d'acide N-acétylneuraminique de glycopeptides de type N-acétyllactosaminique. Les études réalisées ensuite par R.P.E. prouvent que, conformément aux prédictions faites d'après les modèles moléculaires, ces glycanes sont dotés d'une flexibilité très grande, au moins au niveau de leurs antennes. En effet, les temps de corrélation de rotation T_c mesurés pour le marqueur fixé sur les glycopeptides, sont, à 20°C, de l'ordre de la nanoseconde. Les deux types de glycanes étudiés présentent des interactions spin-spin intramoléculaires, dues aux collisions entre marqueurs fixés sur la même molécule. Mais le glycopeptide triantenné, qui comporte donc une branche supplémentaire par rapport au biantenné, présente des interactions spin-spin intramoléculaires plus importantes que le glycanne à deux branches. Seul, le glycopeptide biantenné interagit avec la concanavalin A et le T_c calculé alors, d'après les spectres de R.P.E. est légèrement plus long qu'en absence de lectine, mais toujours de l'ordre de la nanoseconde. Enfin, les glycanes bi- et tri-antennés possèdent aussi un comportement différent à basse température : l'immobilisation (T_c supérieur à 10^{-7} s) du glycopeptide à trois branches survient à - 10°C alors que celle du glycopeptide à deux branches ne survient qu'à - 17°C.

Cette étude par R.P.E., après liaison covalente d'un radical nitroxyde sur les résidus d'acide N-acétylneuraminique des glycopeptides, nous a donc permis de révéler la grande flexibilité des glycanes étudiés, même après fixation d'une lectine. Cette méthode permet, en outre, de

déceler des changements de conformation, au sein des glycanes, aussi subtils que la fixation d'une lectine ou la présence d'une branche supplémentaire.

D'ores et déjà, d'après les calculs basés sur les études par cristallographie et compte-tenu du fait que les glycopeptides sont très flexibles, il paraît difficilement concevable, qu'une telle mobilité pour un glycanne présentant une telle taille par rapport à la protéine globulaire et compacte, ne soit pas le reflet de l'existence d'une fonction importante pour la sérotransferrine. Il faut, bien entendu, vérifier avant tout, que le glycanne fixé sur la glycoprotéine a toujours la même mobilité, mais nos expériences préliminaires réalisées par R.P.E. sur la sérotransferrine après marquage spécifique de sa partie glycanne vont tout-à-fait dans ce sens. Aussi, reste-t-il maintenant à continuer ce type d'études sur la glycoprotéine entière.

Mais, pour l'instant, le rôle du glycanne de la sérotransferrine de lapin est toujours inconnu. Intervient-il dans la solubilité de la glycoprotéine, dans le maintien de sa conformation, dans la reconnaissance du récepteur cellulaire ou bien dans le transfert du métal ? Intervient-il dans plusieurs de ces mécanismes ou dans un tout autre rôle encore insoupçonné ? Toutes les hypothèses sont encore possibles.

BIBLIOGRAPHIE

(Les nombres, entre parenthèses, renvoient à la page du mémoire).

- AASA R., MALMSTRÖM B., SALTMAN P., VÄNNGÅRD T., 1963, *Biochim. Biophys. Acta*, 75, 203-222 (27)
- AISEN P., AASA R., REDFIELD A.G., 1969, *J. Biol. Chem.*, 244, 4628 (27)
- AISEN P., BROWN E.B., 1977, *Semin. Hematol.*, 14, 31-53 (7, 26)
- AISEN P., KOENIG S.H., SCHILLINGER W.E., SCHEINBERG D.H., MANN K.G., FISH W., 1970, *Nature*, 226, 859 (13)
- AISEN P., LEIBMAN A., 1971, *Biochim. Biophys. Acta*, 257, 314-323 (27)
- AISEN P., LEIBMAN A., ZWEIR J., 1978, *J. Biol. Chem.*, 253, 1930-1937 (31)
- ALDERTON G., WARD W.H., FEVOLD H.L., 1946, *Arch. Biochem.*, 11, 9 (69)
- AL HILAL P., BAKER E., CARLISLE C.H., GORINSKI B., HORSBURG R.L., LINDLEY P.F., MOSS D.S., SCHNEIDER H., STIMPSON R., 1976, *J. Mol. Biol.*, 108, 255-257 (15)
- AMINOFF D., 1961, *Biochem. J.*, 81, 384 (97)
- APLIN J.D., BERNSTEIN M.A., CULLING C.A., HALL L.D., REID P.E., 1979, *Carbohydr. Res.*, 70, C9-C12 (136)
- ASHWELL G., MORELL A.G., 1974, *Adv. Enzymol.*, 41, 99-128 (70)
- AWAI M., CHIPMAN B., BROWN E.B., 1975, *J. Lab. Clin. Med.*, 85, 769 (66)
- AZARI P., BAUGH R.F., 1967, *Arch. Biochem. Biophys.*, 118, 138 (78)
- BAKER E., MORGAN E.H., 1969, *Biochemistry*, 8, 2954-2958 (34, 41, 50, 54, 55, 56, 61)
- BAKER E., MORTON A.G., TAVILL A.S., 1975, in "Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine" Crichton R.R. (Ed.) North-Holland Amsterdam, 173-180 (60)
- BAKER E., SHAW D.C., MORGAN E.H., 1968, *Biochemistry*, 7, 1371-1378 (13)
- BARKAN G., 1927, *Physiol. Chem.*, 171, 194-221 (7)
- BAYARD B., KERKAERT J.P., ROUX P., STRECKER G., 1979, in "Protides of Biological Fluids", 27th Colloquium 1979, Pergamon Press, 153-156 (102)
- BEAMISH M.R., KEAY L., OKIGAKI T., BROWN E.B., 1975, *Br. J. Haematol.*, 31, 479-491 (60)

- BEZKOROVAINY A., 1966 (a), *Biochim. Biophys. Acta*, 126, 286 (14)
- BEZKOROVAINY A., 1966 (b), *Biochim. Biophys. Acta*, 127, 535 (51)
- BEZKOROVAINY A., ZSCHOCKE R., GRÖHLICH D., 1969, *Biochim. Biophys. Acta*, 181, 295 (12)
- BLACKBURN G.W., MORGAN E.E., 1977, *Biochim. Biophys. Acta*, 497, 728-744 (47)
- BOTHWELL T.H., PRIBILLA W.F., MEBUST W., FINCH C.A., 1958, *Am. J. Physiol.*, 193, 615-622 (60)
- BOUQUELET S., STRECKER G., MONTREUIL J., SPIK, G., 1980, *Biochimie*, 62, 43-49 (92, 93, 94)
- BRETSCHER M.S., 1976, *Nature*, 260, 21-23 (42)
- CHARET P., 1975, *C.R. Acad. Sci.*, 280D, 2049-2052 (20)
- CHASTEEN N.P., 1977, *Coordination Chem. Rev.*, 22, 1-36 (26, 27, 31)
- CERNELCH M., BROWN E.B., 1970, *Nature*, 226, 356 (66)
- CHERRY R.J., NIGG E.A., BEDDARD G.S., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 5899-5903 (150)
- COX T.M., MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J., PETERS T.J., 1979, *Biochim. Biophys. Acta*, 588, 120-128 (58, 68)
- CUATRECASAS P., 1970, *J. Biol. Chem.*, 245, 3059 (98)
- DAVIS B., 1964, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 404-427 (99)
- DEVAUX P.F., DAVOUST J., 1979, in "ESR and NMR of Paramagnetic Species in Biological and Related Systems", Bertini I. and Drago R.S. (Eds.), Reidel Publishing Company, 381-397 (146)
- DONOVAN J.W., BEADSLEE R.E., ROSS K.P., 1976, *Biochem. J.*, 153, 631-639 (21)
- DONOVAN J.W., ROSS K., 1975, *J. Biol. Chem.*, 250, 6026 (21)
- DORLAND L., HAVERKAMP J., SCHUT B.L., VLIEGENTHART J.F.G., SPIK G., STRECKER G., FOURNET B., MONTREUIL J., 1977, *FEBS-Letters*, 77, 15-20 (22)
- DOUGLAS W.W., 1979, *Biochem. Soc. Symp.*, 39, 1-28 (55)

- ECAROT-CHARRIER B., GREY V., WILCZYNSKA A., SCHULMAN H.M., in "Proteins of Iron Metabolism" Brown et al. (Ed.), Grune and Stratten, New York, 291-298 (36, 37)
- EDWARDS S.A., FIELDING J., 1971, Br. J. Haematol., 20, 405-416 (54)
- EGYED A., 1974, Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., 9, 43-52 (56)
- EGYED A., 1977, in "Proteins of Iron Metabolism" Brown et al. (Ed.), Grune and Stratten, New York, 237-244 (55)
- ESPARZA I., BROCK J.H., 1980, Biochim. Biophys. Acta, 622, 297-307 (21)
- ESPARZA I., BROCK J.H., 1980, Biochim. Biophys. Acta, 624, 479-489 (66)
- EVANS R.W., WILLIAMS J., 1978, Biochem. J., 173, 543-552 (18, 31)
- FEENEY R.E., KOMATSU S.K., 1966, in "Structure and Bonding" Vol. 1, Springer Berlin Heidelberg, New York, 149 (125)
- FEIX J.B., BUTTERFIELD D.A., 1980, FEBS-Letters, 115, 185-188 (136)
- FIELDING J., SPEYER B.E., 1974, Biochim. Biophys. Acta, 363, 387-396 (36, 37, 43, 44)
- FIELDING J., SPEYER B.E., 1977, in "Proteins of Iron Metabolism" Brown et al. (Ed.), Grune and Stratten, New York, 311-318 (43)
- FINCH C.A., HOSAIN F., MORGAN E.H., MARSAGLIA G., GIBLETT E., HILLMAN R.S., 1965, Series Haemat., 6, 30 (59)
- FLETCHER J., HUEHNS E.R., 1967, Nature, 215, 584-586 (29, 65)
- FLETCHER J., HUEHNS E.R., 1968, Nature, 218, 1211-1298 (65, 66, 67)
- FORTH W., RUMMEL W., 1973, Physiol. Revs., 53, 724-792 (57)
- FOURNET B., 1973, Thèse Doct. ès Sci., Lille (102)
- FRIEDEN E., AISEN P., 1980, Trends Biochem. Sci., 5 n°1, XI (30)
- GALBRAITH G., GALBRAITH R., TEMPLE A., FAULK W.P., 1980 (a), Blood, 55, 240-242 (61)
- GALBRAITH G., GALBRAITH R., FAULK W.R., 1980 (b), Cell Immunol., 49, 215-222 (64, 65)

- GARDINER M., MORGAN E., 1974, Aust. J. Exp. Biol. and Med. Sci., 52, 723-736
(59)
- GARRETT N.E., GARRETT R.J.B., ARCHDEACON J.W., 1973, Biochem. Biophys. Res. Commun., 52, 466-474 (35, 37, 41)
- GLASS J., NUNEZ M.T., FISCHER S., ROBINSON S., 1978, Biochim. Biophys. Acta, 542, 154-162 (64)
- GLASS J., NUNEZ M.T., ROBINSON S.H., 1977, Biochem. Biophys. Res. Commun., 75, 226-232 (45, 47)
- GLASS J., NUNEZ M.T., ROBINSON S.H., 1980, Biochim. Biophys. Acta, 598, 293-304 (37, 38, 40, 43, 46)
- GLASSMAN J.N.S., TODD C.W., SHIVELY J.E., 1978, Biochem. Biophys. Res. Commun., 85, 206-216 (91, 110)
- GORINSKI B., HORSBURG R.L., LINDLEY P.F., MOSS D.S., PARKAN M., WATSON J.C., 1979, Nature, 281, 157-158 (15, 16, 18, 133)
- GOTTSCHALK A., 1960, Nature, 186, 949-951 (111)
- GRABAR P., WILLIAMS C.A., 1955, Biochim. Biophys. Acta, 17, 65 (101)
- GRAHAM I., WILLIAMS J., 1975, Biochem. J., 145, 263-279 (20)
- GREENE F., FEENEY R., 1968, Biochemistry, 7, 1366 (13)
- GROHLICH D., COLIN G., MORLEY G.G.D., BEZKOROVAINY A., 1979, Int. J. Biochem., in press (59, 60)
- HAHN D., 1973, Eur. J. Biochem., 34, 311-316 (66)
- HALLIDAY J.W., POWEL L.W., MACK V., 1976, Br. J. Haematol., 34, 237-250 (58)
- HAMILTON T.A., WADA H.G., SUSSMAN H.H., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci., 76, 6406-6410 (48, 63)
- HAMILTON T.A., WADA H.G., SUSSMAN H.H., 1980, J. Supramol. Struct., 11, 503-515 (63)
- HANKS J.H., WALLACE R.E., 1949, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 71, 196 (80,81,82)

- HARRIS D.C., AISEN P., 1975, *Biochemistry*, 14, 262-268 (66)
- HARRIS D.C., GRAY G.A., AISEN P., 1974, *J. Biol. Chem.*, 249, 5261 (28)
- HAYASHI I., SATO G.H., 1976, *Nature*, 259, 132-134 (63)
- HEMMAPLARDH D., KAILIS S.G., MORGAN E.H., 1974, *Br. J. Haematol.*, 28, 53-65
(47, 54)
- HEMMAPLARDH D., MORGAN E.H., 1974, (a) *Biochim. Biophys. Acta*, 373, 84-99 (56)
- HEMMAPLARDH D., MORGAN E.H., 1974, (b) *Exptl. Cell. Res.*, 87, 207-212 (63)
- HEMMAPLARDH D., MORGAN E.H., 1976, *Biochim. Biophys. Acta*, 426, 385-398 (47,53)
- HEMMAPLARDH D., MORGAN E.H., 1977, (a) *Br. J. Haematol.*, 36, 85-96 (47)
- HEMMAPLARDH D., MORGAN E.H., 1977, (b) *Biochim. Biophys. Acta*, 468, 423-436
(55)
- HEMMAPLARDH D., MORGAN R., MORGAN E., 1977, *J. Membrane Biol.*, 33, 195-212
(47, 54)
- HERSHKO C., 1977, *Haematology*, 10, 105-148 (7)
- HERSHKO C., COOK J.D., FINCH C.A., 1972, *J. Lab. Clin. Med.*, 80, 624-634 (59)
- HOLMBERG C., LAURELL C., 1945, *Acta Physiol. Scand.*, 10, 307 (7)
- HU H.Y.Y., AISEN P., 1978, *J. Supramol. Struct.*, 8, 349-360 (36,37,38,40,41,42)
- HU H.Y.Y., GARDNER J., AISEN P., SKOULTCHI A., 1977, *Science*, 197, 559-561
(64)
- HUDSON B.G., OHNO M., BROCKWAY W.J., CASTELLINO F.J., 1973, *Biochemistry*, 12,
1047-1053 (13, 25)
- HUEBERS H., HUEBERS E., CRICHTON R.R., 1974, *FEBS-Letters*, 44, 302 (58)
- HUEBERS H., HUEBERS E., RUMMEL W., CRICHTON R., 1976, *Eur. J. Biochem.*, 66,
447-455 (58)
- ITO S., MURAMATSU T., KOBATA A., 1975, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 63,
938-944 (92, 93, 94)
- JANDL J.H., INMAN J.K., SIMMONS R.L., ALLEN D.W., 1959, *J. Clin. Invest.*, 38,
161 (33, 52, 53, 56, 70)

- JANDL J.H., KATZ J.H., 1963, J. Clin. Invest., 42, 314-326 (33, 34, 41, 50)
- JARRIT P.M., CHARLWOOD P.A., 1976, Biochim. Biophys. Acta, 453, 319-331 (27)
- JOHANSON B., 1960, Acta Chem. Scand., 14, 510 (7)
- KAILIS S.G., MORGAN E.H., 1977, Biochim. Biophys. Acta, 464, 389-398 (55, 56)
- KAUFMAN N., WYLLIE J.L., NEWKIRK M., 1977, Biochim. Biophys. Acta, 497,
719-727 (58)
- KAWASAKI T., ETOH R., YAMASHINA I., 1978, Biochem. Biophys. Res. Commun., 81,
1018 (89)
- KEITH A., BULFIELD G., SNIPES W., 1970, Biophys. J., 10, 618-629 (141)
- KING B.F., 1976, Anat. Rec., 186, 151-159 (61)
- KONOPKA K., ROMSLO I., 1980, Eur. J. Biochem., 107, 433-439 (48)
- KONOPRA K., TURSKA E., 1979, FEBS-Letters, 105, 85-89 (48)
- KORNFELD S., 1968, Biochemistry, 7, 945-954 (51, 52, 73, 88)
- KORNFELD S., 1969, Biochim. Biophys. Acta, 194, 25-33 (34, 41, 50)
- KRYSTEVA M., MAZURIER J., SPIK G., 1976, Biochim. Biophys. Acta, 453,
484-493 (29)
- KRYSTEVA M., MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J., 1975, FEBS-Letters, 56,
337-340 (29)
- LANE R.S., 1971, Biochim. Biophys. Acta, 243, 193 (12)
- LANE R.S., 1972, Br. J. Haematol., 22, 309-317 (34, 50)
- LANE R.S., 1976, in "Structure and Function of Plasma Proteins" Vol. 2,
A.C. Allison (Ed.), 53-78 (7)
- LARRICK J.W., CRESSWELL P., 1979 (a), Biochim. Biophys. Acta, 583, 483-490 (64)
- LARRICK J.W., CRESSWELL P., 1979 (b), J. Supramol. Struct., 11, 579-586 (64)
- LARSON S.M., RASEY J.S., ALLEN D.R., MELSON N.J., GRUNBAUM Z., HARP G.D.,
WILLIAMS D.L., 1980, J. Nat. Cancer Inst., 64, 41-53 (64)
- LAURELL A.B., 1957, Vox Sanguinis, 2, 312 (101)
- LAURELL C.B., 1947, Acta Physiol. Scand., 14 suppl. 46 (26)

LEE P.M., GRANT C.W.M., 1979, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 90, 856-863
(136, 150)

LEGER D., 1979, *Communication Personnelle* (21)

LEGER D., TORDERA V., SPIK G., DORLAND L., HAVERKAMP J., VLIEGENTHART J.F.G.,
1978, *FEBS-Letters*, 93, 255-260 (2, 13, 25, 78, 79)

LEIBMAN A., AISEN P., 1977, *Biochemistry*, 16, 1268-1272 (52)

LEIBMAN A., AISEN P., 1979, *Blood*, 53, 1058-1065 (31)

LENARD J., SCHALLY A.V., HESS G.P., 1964, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 14,
498 (111)

LEVINE P.H., LEVINE A.J., WEINTRAUB L.R., 1972, *J. Lab. Clin. Med.*, 80,
333-341 (58)

LIGHT N.D., 1977, *Biochim. Biophys. Acta*, 495, 46-57 (37, 39, 40, 41, 62, 69)

LIGHT N.D., 1978, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 81, 261-267 (41, 42)

LIGHT N.D., TANNER M.J., 1977, *Biochem. J.*, 164, 565-578 (41)

LOH T.T., HIGUCHI D.A., VAN BOCKXMEER F.M., SMITH C.H., BROWN E.B., 1980,
J. Clin. Invest., 65, 1182-1191 (62)

LOH T.T., MORGAN E.H., 1975, *Exptl. Cell. Res.*, 91, 87-94 (52)

LOH T.T., YEUNG Y.G., YEUNG D., 1977, *Biochim. Biophys. Acta*, 471, 118-124 (45,47)

LYNCH S.R., LIPSCHITZ D.A., BOTHWELL T.H., CHARLTON R.W., 1974, in
"Iron in Biochemistry and Medicine" Jacobs A. et Wordwood M. (Ed.),
Acad. Press, London, 564-589 (35, 59)

MacGILLIVRAY R.T.A., BREW K., 1975, *Science*, 190, 1306-1307 (18)

MacGILLIVRAY R.T.A., MENDEZ E., BREW K., 1977, in "Proteins of Iron
Metabolism" Brown et al. (Ed.), Grune and Stratten, New York, 133-141
(13, 15, 17, 20, 25)

MAKEY D.G., SEAL V.S., 1976, *Biochim. Biophys. Acta*, 453, 250-256 (31)

MANN K.G., FISH W.W., COX A.L., TANFORD C., 1970, *Biochemistry*, 9, 1348 (13)

MARTINEZ-MEDELLIN J., SCHULMAN H.M., 1972, *Biochim. Biophys. Acta*, 264,
272-284 (47)

- MARTINEZ-MEDELLIN J., SCHULMAN H.M., 1973, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 53, 32 (78)
- MAZUR A., CARLETON A., 1965, *Blood*, 26, 317 (59)
- MAZURIER J., 1980, Thèse Doct. ès Sci., Lille (7, 27)
- MAZURIER J., AUBERT J.P., LOUCHEUX-LEFEBVRE M.H., SPIK G., 1976, *FEBS-Letters*, 66, 238-242 (19)
- MAZURIER J., LEGER D., TORDERA V., SPIK G., 1980, *Eur. J. Biochem.*, sous presse (31)
- MAZURIER J., LHOSTE J.M., SPIK G., MONTREUIL J., 1977, *FEBS-Letters*, 81, 371-375 (31)
- MILSON J.P., BATEY R.G., 1979, *Biochem. J.*, 182, 117-125 (48, 60)
- MONSIGNY M., ADAM-CHOSSON A., MONTREUIL J., 1968, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50, 857 (80)
- MONTREUIL J., 1975, *Pure and Applied Chem.*, 42, 431-477 (22)
- MONTREUIL J., 1981, in "Comprehensive Biochemistry", Florin M. et Stoz E.M. (Eds.), Elsevier North-Holland, 19B part II, sous presse (157)
- MONTREUIL J., BISERTE G., MULLET S., SPIK G., LEROY N., 1961, *C.R. Acad. Sci.*, 252, 40-65 (20)
- MONTREUIL J., FOURNET B., SPIK G., STRECKER G., 1978, *C.R. Acad. Sci.*, 387, 837-840 (22, 24, 132, 133)
- MONTREUIL J., LEGER D., SPIK G., 1976, *Communication Personnelle* (71, 72)
- MONTREUIL J., MULLET S., 1960, *C.R. Acad. Sci.*, 250, 1376 (7)
- MONTREUIL J., TONNELAT J., MULLET S., 1960, *Biochim. Biophys. Acta*, 45, 413 (7)
- MONTREUIL J., VLIEGENTHART J.F.G., 1979, *Proceeding of the fourth International Symposium on Glycoconjugates*, 1, 35-78 (22)
- MORGAN E.H., 1964, *Br. J. Haematol.*, 10, 442-452 (34)

MORGAN E.H., 1974, in "Iron in Biochemistry and Medicine", A. Jacobs and M. Worwood, (Ed.), Acad. Press, New York, 29-71 (61)

MORGAN E.H., APPLETON T.C., 1969, Nature, 223, 1371 (34, 47)

MORGAN E.H., BAKER E., 1974, Biochim. Biophys. Acta, 363, 240-248 (54)

MORGAN E.H., MARSAGLIA G., GIBLETT E.R., FINCH C.A., 1967, J. Lab. Clin. Med., 69, 370 (51, 88)

MORT A.J., LAMPORT D.T.A., 1977, Anal. Biochem., 82, 289-309 (92,96,103,110,112)

MUNRO H.N., LINDER M.L., 1978, Physiol. Revs., 58, 317-396 (60)

MURPHY J.R., 1973, J. Lab. Clin. Med., 82, 334-341 (83)

MYRTHE M., 1964, Scand. J. Clin. Lab. Invest., 16, 201-219 (42)

NAGY B., LEHRER S.S., 1972, Arch. Biochem. Biophys., 148, 27-36 (19)

NARASIMHAN S., WILSON J.R., MARTIN E., SCHACHTER H., 1979, Can. J. Biochem., 57, 83-96 (136)

NEVILLE D.M.J., 1971, J. Biol. Chem., 246, 6328-6334 (100, 123)

NEZLIN R.S., TIMOFEEV V.P., SYKULEV Y.K., ZURABYAN S.E., 1978, Immunochemistry, 15, 143-144 (136)

NUNEZ M.T., FISCHER S., GLASS J., LAVIDOR L., 1977, Biochim. Biophys. Acta, 490, 87-93 (37, 39, 40, 42)

NUNEZ M.T., GLASS J., ROBINSON S.H., 1978, Biochim. Biophys. Acta, 509, 170-180 (45, 47)

OCTAVE J.N., SCHNEIDER Y.J., HOFFMANN P., TROUET A., CRICHTON R.R., 1979, FEBS-Letters, 108, 127-130 (48)

OSBORNE T.B.J., 1899, J. Am. Chem. Soc., 21, 477 (7)

PALMOOR R.M., SUTTON H.E., 1971, Biochemistry, 10, 4026-4032 (13)

PHILIPS J.L., 1976, Biochem. Biophys. Res. Commun., 72, 634-639 (64)

PLETCHER C.H., RESNICK R.M., WEI G.J., BLOOMFIELD V.A., NELSESTUEN G.L., 1980, J. Biol. Chem., 255, 7433-7438 (110)

- POLLACK S., LASKY F.D., 1975, in "Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine" Crichton R.R. (Ed.), North Holland, Amsterdam, 389-394 (58)
- PRINCIOTTO J.V., ZAPOLSKI E.J., 1975, Nature, 255, 87 (29)
- PRINCIOTTO J.V., ZAPOLSKI E.J., 1978, Biochim. Biophys. Acta, 539, 81-87 (31)
- RIMINGTON C., 1940, Biochem. J., 34, 931 (96)
- ROBERTS R.C., MAKEY D.G., SEAL V.S., 1966, J. Biol. Chem., 241, 4907 (13)
- ROMSLO I., ULVIK R., 1979, in "Abstracts of the fourth International Conference on Proteins of Iron Metabolisms", Davos, 23 (45)
- ROOP W.E., PUTNAM F.W., 1967, J. Biol. Chem., 242, 2507-2513 (78)
- ROSSENEU-MORTREFF M.Y., SOETEWAY F., LAMOTE R., PEETERS H., 1971, Biopolymers, 10, 1039 (14)
- SAIRAM M.R., SCHILLER P.W., 1979, Arch. Biochem. Biophys., 197, 294-301 (110)
- SAKAKIBARA S., 1971, in "Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins", B. Weinstein (Ed.), Dekker, New York, 51-85 (111)
- SCHADE A.L., CAROLINE L., 1944, Science, 100, 14-15 (7, 9)
- SCHADE A.L., CAROLINE L., 1946, Science, 104, 340-341 (7)
- SCHADE A., REINHART R.W., LEVY H., 1949, Arch. Biochem., 20, 170 (27)
- SCHEIDEGGER J.J., 1955, Inter. Arch. Allergy Appl. Immunol., 7, 103 (101)
- SCHLABACH M.R., BATES G.W., 1975, J. Biol. Chem., 250, 2182 (27, 28)
- SELIGMAN P.A., SCHLEICHER R.B., ALLEN R.H., 1979, J. Biol. Chem., 254, 9943-9946 (61)
- SHARON N., LIS H., 1972, Science, 177, 949-959 (76)
- SLY D.A., GRÖHLICH D., BEZKOROVAINY A., 1978, in "Cell Surface Carbohydrate Chemistry", R.E. Harmon (Ed.), Acad. Press, New York, 640, 255-268 (37,38,40,43, 52)
- SPEYER B.E., FIELDING J., 1974, Biochim. Biophys. Acta, 332, 192-200 (35, 54)

- SPEYER B.E., FIELDING J., 1979, Br. J. Haematol., 42, 257 (43, 45)
- SPIK G., 1968, Thèse Doct. ès Sci., Lille (13, 20)
- SPIK G., 1971, Ann. Nutr. Alim., 25, A-81 (13)
- SPIK G., 1980, Communication Personnelle (137)
- SPIK G., BAYARD B., FOURNET B., STRECKER G., BOUQUELET S., MONTREUIL J., 1975, FEBS-Letters, 50, 296-299 (22)
- SPIK G., MONSIGNY M., MONTREUIL J., 1965, C.R. Acad. Sci., 261, 1137 (22)
- SPIK G., MONTREUIL J., 1966, C.R. Soc. Biol., 160, 94 (51)
- SPIK G., MONTREUIL J., 1969, Bull. Soc. Chim. Biol., 51, 1271-1285 (80, 137)
- SPIK G., VANDERSYPPE R., FOURNET B., BAYARD B., CHARET P., BOUQUELET S., STRECKER G., MONTREUIL J., 1974, Actes Coll. Intern. n° 221 CNRS, Paris, 483-500 (2, 22, 23, 80)
- STEINER M., 1980, Biochem. Biophys. Res. Commun., 94, 861-866 (37, 40)
- STRICKLAND D.K., HAMILTON J.W., HUDSON B.G., 1979, Biochemistry, 18, 2549-2554 (25)
- STRICKLAND D.K., HUDSON B.G., 1978, Biochemistry, 17, 3411-3418 (25)
- SULLIVAN A.L., GRASSO J.A., WEINTRAUB L.R., 1976, Blood, 47, 133 (47)
- SURGENOR D.M., KOEHLIN B.A., STRONG L.E., 1949, J. Clin. Invest., 28, 73 (26)
- SUSSMAN S.S., 1974, in "Iron in Biochemistry and Medicine" Jacobs A. and Wordwood M. (Ed.), Acad. Press n° 4, 649-679 (9)
- TILLMANS J., PHILIPPI K., 1929, Biochem. J., 215, 36 (96)
- TIMOFEEV V.P., DUDICH I.V., SYKULEV Y.K., NEZLIN R.S., 1978, FEBS-Letters, 89, 191-195 (136)
- TKACZ J.S., LAMPEN J.O., 1975, Biochem. Biophys. Res. Commun., 65, 248-257 (91)
- TOMIMATSU Y., VICKERY L.E., 1972, Biochim. Biophys. Acta, 285, 72-83 (19)
- TORDERA V., 1978, Thèse Doct. 3è Cycle, Lille (2,20,25,73,76,82,83,86,88)
- TSANG C.P., BYLE A.J., MORGAN E.H., 1975, Biochim. Biophys. Acta, 32, 386 (27)

- TURNBULL A., 1974, in "Iron in Biochemistry and Medicine", Jacobs A. and Wordwood M. (Ed.), Acad. Press, London, 370-404 (57)
- ULMER D.D., 1969, Biochim. Biophys. Acta, 18, 305-310 (12)
- VAN BOCKXMEER F., HEMMAPLARDH D., MORGAN E.H., 1975, in "Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine", Crichton R.R. (Ed.), North-Holland, Amsterdam, 111-119 (59, 61, 63)
- VAN BOCKXMEER F., MORGAN E.H., 1977, Biochim. Biophys. Acta, 468, 437-450 (37,38)
- VAN BOCKXMEER F., MORGAN E.H., 1979 (a), Biochim. Biophys. Acta, 584, 76-83 (42)
- VAN BOCKXMEER F., MORGAN E.H., 1979 (b), in "Abstracts of the fourth International Conference on Proteins of Iron Metabolisms", Davos, 18 (69)
- VAN BOCKXMEER F., YATES G.K., MORGAN E.H., 1978, Eur. J. Biochem., 92, 147-154 (38, 47)
- VAN DEN HEEDE J.R., AHMED A.I., FEENEY R.E., 1972, J. Biol. Chem., 247, 7885-7889 (152)
- VAN DER HEUL C., KROOS M.J., VAN EIJK H.G., 1977, in "Proteins of Iron Metabolism", Brown et al. (Ed.) Grune and Stratten, New York, 299-304 (36,37,43)
- VAN EIJK H.G., NOORT W.L., KROOS M.J., HEUL L., 1978, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 16, 557-560 (31)
- VAN LENTEN L., ASHWELL R.J., 1971, J. Biol. Chem., 246, 1889-1894 (137)
- VAN SNICK J.L., MARKOWETZ B., MASSON P.L., 1977, J. Exp. Med., 146, 817-827 (68)
- VAN SNICK J.L., MASSON P.L., 1976, J. Exp. Med., 144, 1568-1580 (68)
- VENTURA M., BASTOS-ARAGAO J., IKEMOTO H., 1973, An. Acad. Brasil. Liêne, 45, 450-452 (19)
- VAN MOORE C., 1973, in "Modern Nutrition in Health and Disease", Goodhart R.S. and Shils M.E. (Ed.), Lea and Febiger, Philadelphia, 297-323 (8)
- WADA H.G., HASS P.E., SUSSMAN H.H., 1979, (a), J. Biol. Chem., 254, 12629-12635 (61)
- WADA H.G., HASS P.E., SUSSMAN H.H., 1979, (b), J. Supramol. Struct., 10, 287-305 (63)

- WALSH R.J., THOMAS E.D., CHOW S.K., FLUNARTY R.G., FINCH A., 1949, *Science*, 110, 396-398 (33)
- WARIN V., 1980, *Communication Personnelle* (132)
- WARIN V., BAERT F., FOURNET B., STRECKER G., SPIK G., MONTREUIL J., 1979, *Carbohyd. Res.*, 76, 11-22 (22, 132)
- WARNER R.C., WEBER F., 1952, *J. Amer. Chem. Soc.*, 75, 5094 (27)
- WEINBERG S., 1978, *Microbiological Reviews*, 42/1, 45-66 (9)
- WERNER I., ODIN L., 1952, *Acta Soc. Med. Upsaliensis*, 57, 230 (97)
- WILLAN K.J., GOLDING B., GIVOL D., DWEK R.A., 1977, *FEBS-Letters*, 80, 133-136 (136)
- WILLIAMS J., MORETON A., 1980, *Biochem. J.*, 185, 483-488 (31)
- WITT D.P., WOODWORTH R.C., 1975, in "Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine", Crichton R.R. (Ed.), North-Holland, Amsterdam, 133-140 (69)
- WITT D.P., WOODWORTH R.C., 1978, *Biochemistry*, 17, 3913-3917 (37, 38, 42)
- WONG H., TERNER U.K., ENGLISH D., NOUJAIM A.A., LENTLE C., HILL J.R., 1980, *Int. J. Nucl. Med. Biol.*, 7, 9-16 (64)
- WORKMAN E.F., BATES G.W., 1974, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 58, 787-794 (45, 47)
- WORKMAN E.F., GRAHAM G., BATES G.W., 1975, *Biochim. Biophys. Acta*, 399, 254-264 (42)
- YAMASHINA I., MAKINO M., 1962, *J. Biochem.*, 51, 359 (80)
- ZANETTA J., BRECKENRIDGE W., VINCENDON G., 1972, *J. Chromatogr.*, 69, 291-304 (102)
- ZAPOLSKI E.J., GANZ R., PRINCIOTTO J.V., 1974, *Am. J. Physiol.*, 226, 334-339 (66)
- ZWEIR J.L., 1978, *J. Biol. Chem.*, 253, 7616-7621 (31)