

N° d'ordre : 1120

50376
1983
133

50376
1983
133

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MÉMOIRE

présenté à l'Université de Lille 1

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE TROISIÈME CYCLE

Spécialité Biochimie

par

Véronique DEBRUYNE



**HETEROGENEITE GLYCANNIQUE DE LA
SEROTRANSFERRINE HUMAINE : DETERMINATION
DE LA STRUCTURE, ROLE DES GLYCANNES
TRIAENNENNES ET MODIFICATION DE LA
REPARTITION DES VARIANTES GLYCANNIQUES DANS
DES CAS PATHOLOGIQUES**

Soutenu le 2 décembre 1983 devant la Commission d'Examen

Président
Rapporteur
Examineurs

M. J. MONTREUIL
Mlle G. SPIK
MM. A. CORTOT
G. STRECKER

Ces travaux ont été réalisés dans le Laboratoire de Chimie
Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I
(Laboratoire associé au C.N.R.S. n° 217, Directeur : Professeur
Jean Montreuil), sous la direction du Professeur Geneviève Spik.

A mes parents ,

avec toute ma reconnaissance et ma plus profonde affection .
Pour leur soutien et leur confiance .

A mon frère ,à ma soeur .

A Geneviève ,

vous avez dirigé mes recherches avec compétence pendant trois ans .
Je vous suis sincèrement reconnaissante pour la gentillesse, l'attention
et la réelle confiance que vous m'avez apportées. Merci .

A Monsieur le Professeur J. Montreuil ,

vous m'avez accueillie au sein du C₉ et confié un travail qui m'a
passionnée .Vous m'avez tout d'abord fait bénéficiaire de la qualité de
votre enseignement et de l'étendue de vos connaissances ;votre enthousiasme
et votre haute compétence scientifique ont ensuite suscité mon admiration .
Veuillez trouver dans cette thèse l'expression de mon profond respect et
de mon entière gratitude .

A Monsieur le Professeur A. Cortot ,

vous avez suivi nos travaux avec beaucoup d'intérêt, de rigueur et
d'enthousiasme .Votre collaboration efficace a été essentielle dans
l'aboutissement d'une partie de mes recherches .C'est avec gratitude
que je vous remercie d'avoir accepté de juger cette thèse .

A Monsieur G. Strecker ,

tu as toujours suivi mes travaux avec beaucoup d'intérêt .Tes conseils
et ta compétence m'ont souvent été très utiles .Je suis heureuse que
tu me fasses l'honneur de ta présence dans ce jury .

A Jean-Frédérique ,

tu as été pour moi un précieux collaborateur .Je te remercie sincèrement pour ton travail efficace et ton enthousiasme constant .Ensemble ,nous avons pu mener à bien une partie de ce travail .Soit assuré de ma reconnaissance et de mon amitié .

A Jean-Pierre ,

tu m'as enseigné les rudiments de la "bidi" et tu as contribué largement aux résultats que j'ai obtenu .Que ce mémoire soit pour moi l'occasion de t'exprimer ma réelle reconnaissance .

A Didier ,

je te remercie tout particulièrement pour ton aide et tes conseils .

A Mazu ,

merci pour tout .

A Sylvie ,avec ma plus profonde amitié .

A Annick ,Bernadette ,Florence ,Martine ,et Dominique .

A Jo Celen ,Brigitte et Gisèle .

A tout ceux qui m'ont aidée .

"We know now that the specificity of many natural polymers is written in terms of sugar residues ,not of amino acids or nucleotides ."

Nathan Sharon

Table des matières

INTRODUCTION

GENERALITES

STRUCTURE GENERALE DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE

I. DONNEES PHYSICO-CHIMIQUES

A - Dimensions

B - Structure cristallographique

II - ETUDE DE LA PARTIE PROTEIQUE

A - Séquence peptidique

1 - Structure primaire

2 - Structure secondaire

3 - Structure tertiaire

B - Domaines

C - Evolution

III - SITES DE FIXATION DU FER

A - Mécanisme de fixation du fer

B - Autres cations fixés

C - Différences entre les deux sites

D - Libération du fer

IV - ETUDE DE LA PARTIE GLYCANNIQUE

A - Structure des glycannes

- 1 - Structure du glycanne biantenné
- 2 - Structure du glycanne triantenné
- 3 - Structure du glycanne tétraantenné

B - Localisation des glycanes

C - Répartition des glycanes

D - Conformation des glycanes

V - CONCLUSION

PHYSIOPATHOLOGIE HEPATIQUE DE LA SEROTRANSFERRINE

I - METABOLISME DE LA SEROTRANSFERRINE

II - CONCENTRATION DE LA TRANSFERRINE PLASMATIQUE

A - Variations biologiques en fonction de l'âge

B - Variations biologiques en fonction du sexe

C - Autres facteurs de variation

III - PATHOLOGIE DE LA TRANSFERRINE - CAS PARTICULIER DE LA CIRRHOSE

ALCOOLIQUE

A - Variation de la concentration de la transferrine

B - Influence de l'alcool sur la synthèse et la sécrétion
de la transferrine

1 - Inhibition de la synthèse de la transferrine

2 - Inhibition de la sécrétion de la transferrine

3 - Conclusion

C - Hypersidérémie hépatique

D - Modification des glycanes de la transferrine

IV - CONCLUSION

INTERACTIONS TRANSFERRINE-CELLULES

I - INTERACTION DE LA TRANSFERRINE AVEC LES RETICULOCYTES

A - Le récepteur de la transferrine sur les réticulocytes

- 1 - Mise en évidence
- 2 - Nature du récepteur

B - Interaction de la transferrine avec son récepteur

- 1 - Rôle de la sérotransferrine dans l'interaction
 - a - Rôle de la partie protéique de la transferrine
 - b - Rôle de la partie glycanique de la transferrine
- 2 - Rôle du récepteur dans l'interaction
 - a - Rôle de la partie protéique du récepteur
 - b - Rôle de la partie glycanique du récepteur
- 3 - Rôle de la membrane réticulocytaire dans l'interaction

C - Transport du fer

- 1 - Hypothèse de Fielding et Speyer
- 2 - Hypothèse de Morgan
- 3 - Conclusion

D - Relargage du fer et expulsion de la transferrine

- 1 - Relargage du fer
- 2 - Relargage de la transferrine

E - Conclusion

II - INTERACTIONS DE LA TRANSFERRINE AVEC LES HEPATOCYTES

A - Interaction de l'asialosérotansferrine avec les hépatocytes

- 1 - Le récepteur d'Ashwell

2 - Interaction asialotransferrine-récepteur d'Ashwell

a - Introduction

b - Rôle des glycanes de l'asialotransferrine
dans l'interaction

3 - Endocytose de l'asialotransferrine

a - Catabolisme

b - Diacytose

4 - Conclusion

B - Interaction de la sérotransferrine sialylée avec les
hépatocytes

1 - Mise en évidence d'un récepteur

2 - Internalisation ou non de la transferrine ?

3 - Comparaison entre les interactions de la sérotransferrine
avec les hépatocytes et les réticulocytes

4 - Existe-t-il un récepteur spécifique de l'apotransferrine

5 - Conclusion

III - AUTRES INTERACTIONS DE LA TRANSFERRINE AVEC LES CELLULES

IV - CONCLUSION

TRAVAUX PERSONNELS

MATERIEL ET METHODES

I - PREPARATION DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE

A - Préparation de la sérotransferrine humaine

- 1 - Précipitation au rivanol
 - 2 - Chromatographie sur colonne de QAE Séphadex
- B - Préparation des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine
- 1 - Chromatographie d'affinité sur colonne de concanavaline A-Sépharose
 - 2 - Chromatographie d'affinité sur colonne de concanavaline A-Ultrogel

II - ANALYSE IMMUNOLOGIQUE DES VARIANTS DE LA SEROTRANSFERRINE

- A - Préparation de l'immunsérum antisérotransferrine
- B - Immunodiffusion radiale
- C - Immunoélectrophorèse monodimensionnelle
- D - Immunoélectrophorèse d'affinité bidimensionnelle
 - 1-Première dimension
 - 2-Deuxième dimension
- 3 - Calcul du pourcentage apparent des pics obtenus

III - ETUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES DE LA SEROTRANSFERRINE

HUMAINE ET DE SES VARIANTS

- A - Préparation des glycopeptides de la sérotransferrine totale et des variants
- B - Fractionnement des glycopeptides de la sérotransferrine humaine par chromatographie d'affinité
- C - Etude de la structure des glycanes
 - 1 - Détermination de la composition molaire des monosaccharides

- 2 - Libération des oligosaccharides
- 3 - Microméthylation
 - a - Réduction
 - b - Microméthylation
- 4 - Résonance Magnétique Nucléaire

IV - ETUDE DE L'INTERACTION DES VARIANTS DE LA SEROTRANSFERRINE

AVEC LES RECEPTEURS MEMBRANAIRES

- A - Matériel
- B - Désialylation des glycoprotéines
- C - Marquage par ⁵⁹ Fe
- D - Interaction transferrine-réticulocyte
 - 1-Préparation des réticulocytes
 - 2- Incubation
- E - Interaction transferrine-hépatocyte
 - 1 - Préparation des hépatocytes
 - 2 - Incubation

RESULTATS

STRUCTURE DES GLYCANNES DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE

I - PREPARATION DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE

II - ETUDE DES GLYCOPEPTIDES SEPARES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR

CONCAVALINE A-SEPHAROSE

- A - Chromatographie d'affinité des glycopeptides
- B - Composition molaire en monosaccharides des glycopeptides isolés
- C - Etude des oligosaccharides libérés par hydrazinolyse
- D - Conclusion

III - DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES TRIANTENNES

- A - Identification des dérivés méthylés
- B - Résonance Magnétique Nucléaire
- C - Conclusion

SEPARATION ET ISOLEMENT DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE SELON LEUR AFFINITE POUR LA CONCAVALINE A

I - ISOLEMENT DES VARIANTS TRANSFERRINIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE SUR COLONNE DE CONCAVALINE A.

- A - Chromatographie sur colonne de concanavaline A-Sépharose
- B - Chromatographie sur colonne de concanavaline A-Ultrogel
- C - Conclusion

II - SEPARATION DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE

PAR ELECTROPHORESE D'IMMUNOAFFINITE

III - ANALYSE DES GLYCANNES DES VARIANTS I, II et III DE LA

SEROTRANSFERRINE HUMAINE

- A - Composition molaire en monosaccharides

- B - Séparation des oligosaccharides libérés par hydrazinolyse
- C - Analyse des dérivés méthylés
- D - Répartition des glycanes des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine
- E - Conclusion

IV - DISCUSSION

SEPARATION DES VARIANTS DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE PAR ELECTROPHORESE D'IMMUNOAFFINITE - APPLICATION A L'ETUDE DE LA SEROTRANSFERRINE DE SERUMS NORMAUX ET PATHOLOGIQUES

I - ANALYSE PRELIMINAIRE DE SERUMS NORMAUX ET PATHOLOGIQUES

II - ANALYSE DE SERUMS DE SUJETS ATTEINTS DE CIRRHOSE ETHYLIQUE GRAVE

- A - Définition du score de Child
- B - Définition des patients étudiés
 - 1 - Groupe A
 - 2 - Groupe B
- C - Analyse des sérums
 - 1 - Variations du taux de transferrine des cirrhotiques éthyliques graves
 - 2 - Modification de la répartition des variants glycaniques de la sérotransferrine
- D - Conclusion

III - ETUDE STATISTIQUE : ANALYSE DISCRIMINANTE LINEAIRE

A - Définition des groupes de patients

1 - Groupe A

2 - Groupe B

3 - Groupe C

4 - Groupe D

B - Etude statistique

1 - Résultats obtenus pour les différents groupes

Comparaisons unidimensionnelles à l'aide du test t de Student, entre les valeurs de groupes indépendants

a - Groupe 1 des patients témoins non cirrhotiques non éthyliques

b - Groupe 2 des patients éthyliques, non cirrhotiques

c - Groupe 4 des sujets cirrhotiques non éthyliques Child < 10

d - Groupe 5 des sujets cirrhotiques éthyliques Child < 10

e - Groupe 6 des sujets cirrhotiques, éthyliques et non éthyliques Child < 10

f - Groupe 7 des sujets cirrhotiques éthyliques ou non Child > 10

g - Groupe 8 des sujets cirrhotiques éthyliques ou non, quel que soit le Child

h - Conclusion

2 - Analyse discriminante linéaire

a - Histogramme au Pas 7

b - Calcul des sensibilité et spécificité

IV - DISCUSSION

ROLE DES GLYCANNES DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE DANS LE
MECANISME DE RECONNAISSANCE CELLULAIRE

I - INTERACTION DES VARIANTS GLYCANNIQUES DESIALYLES DE LA SEROTRANSFERRINE

AVEC LES RECEPTEURS HEPATOCYTAIRES D'ASHWELL

II - INTERACTION DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE

AVEC LES RETICULOCYTES

A - Interaction des variants sialylés avec les réticulocytes

B - Interaction des variants désialylés avec les réticulocytes

C - Conclusion

III - CONCLUSION

CONCLUSIONS GENERALES

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

De nombreuses études ont été réalisées, ces dernières années, sur la structure primaire et le métabolisme des glycanes des glycoprotéines (Montreuil, 1980a, 1982, 1983). Cependant, les problèmes concernant la conformation, la localisation et les fonctions des glycanes ne sont pas entièrement résolus. La sérotransferrine humaine, dont le rôle est essentiel dans le métabolisme du fer, représente un modèle intéressant pour l'étude de la participation des glycanes dans la conformation structurale et l'activité biologique de la molécule de transferrine.

L'hétérogénéité de la structure des glycanes de la sérotransferrine humaine a été mise en évidence au laboratoire dès 1974 (Spik, Vandersyppe et al., 1974; Montreuil et Spik, 1975) : la transferrine porte des glycanes de structure biantennée et triantennée.

Les recherches que nous avons réalisées ont porté sur l'isolement des différents variants glycaniques de la sérotransferrine humaine afin de déterminer d'une part la structure des glycanes des variants, et de préciser d'autre part leur intervention éventuelle dans les interactions avec les récepteurs membranaires de cellules cibles.

L'exposé de nos travaux comporte essentiellement quatre parties qui concernent :

- la détermination de la structure des deux types de glycanes triantennés de la sérotransferrine humaine.
- la séparation et l'isolement des variants glycaniques de la sérotransferrine par chromatographie d'affinité sur colonne de concanavaline A.

- l'étude de la modification de la répartition des variants glycaniques dans le cas d'une atteinte hépatique : la cirrhose éthylique.
- l'interaction des variants glycaniques avec les récepteurs cellulaires des hépatocytes et des réticulocytes.

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

- Communications orales et par affiche

- Debruyne V., Montreuil J. et Spik G.

Modification de la répartition des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine dans des cas pathologiques.

X^{ème} Journées sur la Chimie et la Biochimie des Glucides, Paris,
5-7 Juillet 1982.

- Debruyne V., Montreuil J. et Spik G.

Variation of the glycan microheterogeneity of transferrins in liver diseases.

XXXIst Colloquium " Protides of the Biological Fluids", Bruxelles,
2-5 Mai 1983.

- Debruyne V., Colombel J.F., Cortot A., Montreuil J. and Spik G.

Glycan transformation of human sérotransferrin in liver diseases.

VIIth International Falk Symposium on Glycoconjugates, Lund, Ronneby, Suède, 18-23 Juillet 1983.

- Publications

- Spik G., Debruyne V. and Montreuil J. .

Alterations of the carbohydrate structure of human serotransferrin in liver disease.

In Falk Symposium on Structural Carbohydrates in the Liver, ed H. Hopper, W. Reutter, F. Gudat and E. Köttgen, MTP Press Limited, 1983 pp 477-483.

- Debruyne V., Montreuil J. and Spik G.

Crossed immunoaffinity electrophoresis of human transferrin in normal and cirrhotic sera.

Prot. Biol. Fluids, 31 th Colloquium, 1983, Pergamon Press (Sous Presse)

- Debruyne V., Colombel J.F., Cortot A., Montreuil J and Spik G.

Glycan transformation of human serotransferrin in liver disease.

Proceedings of the VIIth International Symposium on Glycoconjugates, 1983
Chester A., Heinegård D., Lundblad A. and Svensson S. (Eds.) p.171.

- Spik G., Mazurier J., Legrand D., Debruyne V and Montreuil J.

Location of the iron binding sites of transferrins and importance of the glycan structure in iron uptake.

Proceedings of the VI th International Conference on Proteins of Iron Storage and Transport, July 11-14, Sapporo- Japan, 1983 (Sous Presse).

GENERALITES

INTRODUCTION

Jusqu'à présent le terme de transferrine s'appliquait à la famille des transporteurs du fer que l'on rencontre chez les vertébrés. Ces formes de transport, qui véhiculent 0,1 % du fer total de l'organisme, assurent la répartition du métal entre les formes actives comme l'hémoglobine, la myoglobine, les cytochromes, et les formes de réserve comme l'hémosidérine et la ferritine.

La famille des transferrines de vertébrés comprend : l'ovotransferrine, la sérotransferrine et la lactotransferrine.

-L'ovotransferrine (ovoferrine ou conalbumine) provient du blanc d'oeuf des oiseaux. Son existence a été soupçonnée dès 1899 par Osborne, mais ce n'est qu'en 1944 que Schade et Caroline ont démontré ses propriétés de fixation du fer.

-La sérotransferrine était désignée par l'ancienne terminologie par les noms de sidérophiline (Schade et Caroline, 1946) ou de "beta-1 globuline fixatrice de métal" (Surgenor, 1949). Il y a 50 ans déjà, l'on savait que le fer plasmatique était fixé par une protéine (Barkan, 1927; Starkenstein et Harvalid, 1933), mais ce sont les travaux de Schade et Caroline en 1946, et plus particulièrement ceux de Laurell en 1947 puis en 1952, qui ont établis l'existence d'un transporteur protéique spécifique du fer.

-La lactotransferrine (lactoferrine) est présente dans le lait des mammifères, ainsi que 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 Johanson la même année.

De récents travaux (Huebers et al., 1982; Martin et al., 1983) permettent de penser que le terme de transferrine s'applique également à des transporteurs du fer présents chez les Invertébrés.

En effet, Huebers et al., en 1982 ont isolé du sang d'un Arthropode (*Cancer magister*) une protéine capable de fixer deux atomes de fer. Excepté le fait que cette protéine possède une masse moléculaire élevée (150.000 ± 10.000), elle détient tous les critères nécessaires pour que la dénomination de transferrine lui soit donnée.

De même Martin et al., en 1983 ont réussi à purifier, chez un Protochordé (*Pyura stolonifera*), une protéine fixant un atome de fer et possédant des critères significatifs qui permettent de lui attribuer le nom de transferrine.

Les transferrines jouent un rôle extrêmement important dans le métabolisme du fer. De nombreuses revues générales leur ont d'ailleurs été consacrées (Bezkorovainy et Zschocke, 1974; Aisen et Brown, 1975 et 1977; Lane, 1976; Hershko, 1977; Mazurier, 1980; Aisen et Listowsky, 1980; Gorinsky, 1982).

Notre étude ne concernant que la sérotransferrine humaine, nous contenterons de décrire la structure générale et le rôle biologique de cette glycoprotéine.

STRUCTURE GENERALE DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE

Depuis les premières études de Holmberg et Laurell, en 1945, et de Schade et Caroline, en 1946, la structure générale de la sérotransferrine humaine n'a cessé de se préciser. Il nous appartient dans ce chapitre de faire une synthèse des connaissances actuelles rassemblées sur ce sujet.

I - DONNEES PHYSICO-CHIMIQUES

A - Dimensions.

Les mesures effectuées par diffusion de neutron par Martel et al., en 1980 ont permis de montrer que la sérotransferrine humaine se présente comme un ellipsoïde de révolution possédant des demi-axes de 46.6, 46.6 et 15.8 Å - Le volume de l'ellipsoïde est de $144 (\pm 45) \times 10^3 \text{ Å}^3$ -

Ces paramètres hydrodynamiques, étudiés par sédimentation, diffusion et viscosité de la sérotransferrine varient en fonction du degré de saturation en fer des deux sites métalliques de la glycoprotéine (Rosseneu et al., 1971). Ils sont donnés dans le tableau I p 7. Un changement de conformation semble donc s'opérer lors de la fixation du métal.

B - Structure cristallographique

Les paramètres cristallographiques de la sérotransferrine de lapin ont été déterminés par Al Hilal et al., en 1976 puis par Gorinsky et al., en 1979. Ces derniers ont proposé un modèle moléculaire qui résulte

TABLEAU I

Dimensions de la sérotransferrine humaine d'après

Rosseneu et al., 1971.

Nature de la transferrine	Dimension de l'axe a (A)	Dimension de l'axe b (A)	Rapport des deux axes a/b
Apo-sérotransferrine	62	24,6	3
Sérotransferrine saturée	55,2	27,6	2



de la diffraction des rayons X des cristaux de la transferrine de lapin (Fig. 1 p 9) . La molécule apparait nettement constituée de deux lobes égaux qui creusés d'une cavité tournée vers l'axe de symétrie de la molécule forment entre eux un angle de 30° . Ils correspondent sans doute aux deux domaines de la protéine qui contiennent chacun un site de fixation du fer.

II - ETUDE DE LA PARTIE PROTEIQUE

A - Séquence peptidique

1 - Structure primaire

La séquence primaire de la chaîne peptidique de la sérotransferrine humaine a été entièrement déterminée par Mac Gillivray et al., en 1982 et 1983 (Fig.2 p 10). La sérotransferrine humaine est constituée d'une seule chaîne peptidique comportant 679 résidus d'acides aminés. Le nombre et la nature de ces acides aminés étant maintenant tout à fait connus, la masse moléculaire de la glycoprotéine a pu être calculée: elle est de 79.650 (les deux glycannes liés à la protéine sont également inclus dans ce calcul).

2 - Structure secondaire

Les taux d'hélicité α et de structure β ont été déterminés pour la sérotransferrine humaine. Ils sont rassemblés dans le tableau II p 11. 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 Gorinsky et al., en 1979, l'une des cavités serait délimitée par une hélice α La présence du métal sur la sérotrans-

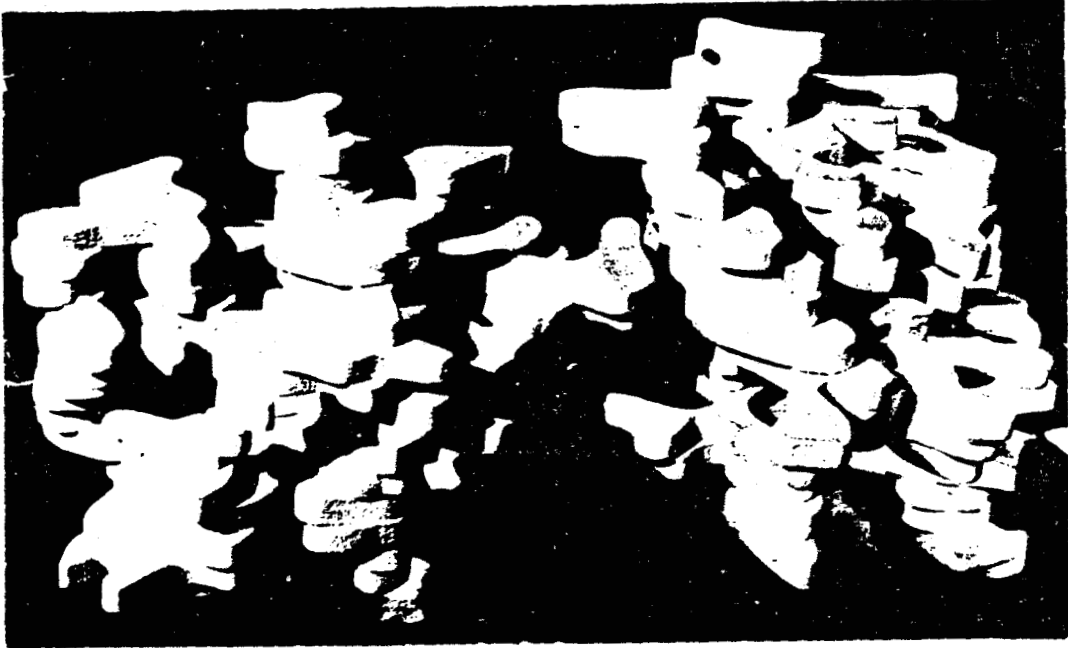


Fig. 1. Modèle de la molécule de sérotransferrine de lapin, d'après les études réalisées par diffraction des rayons X avec une résolution de 6 Å par Gorinsky et al., 1979



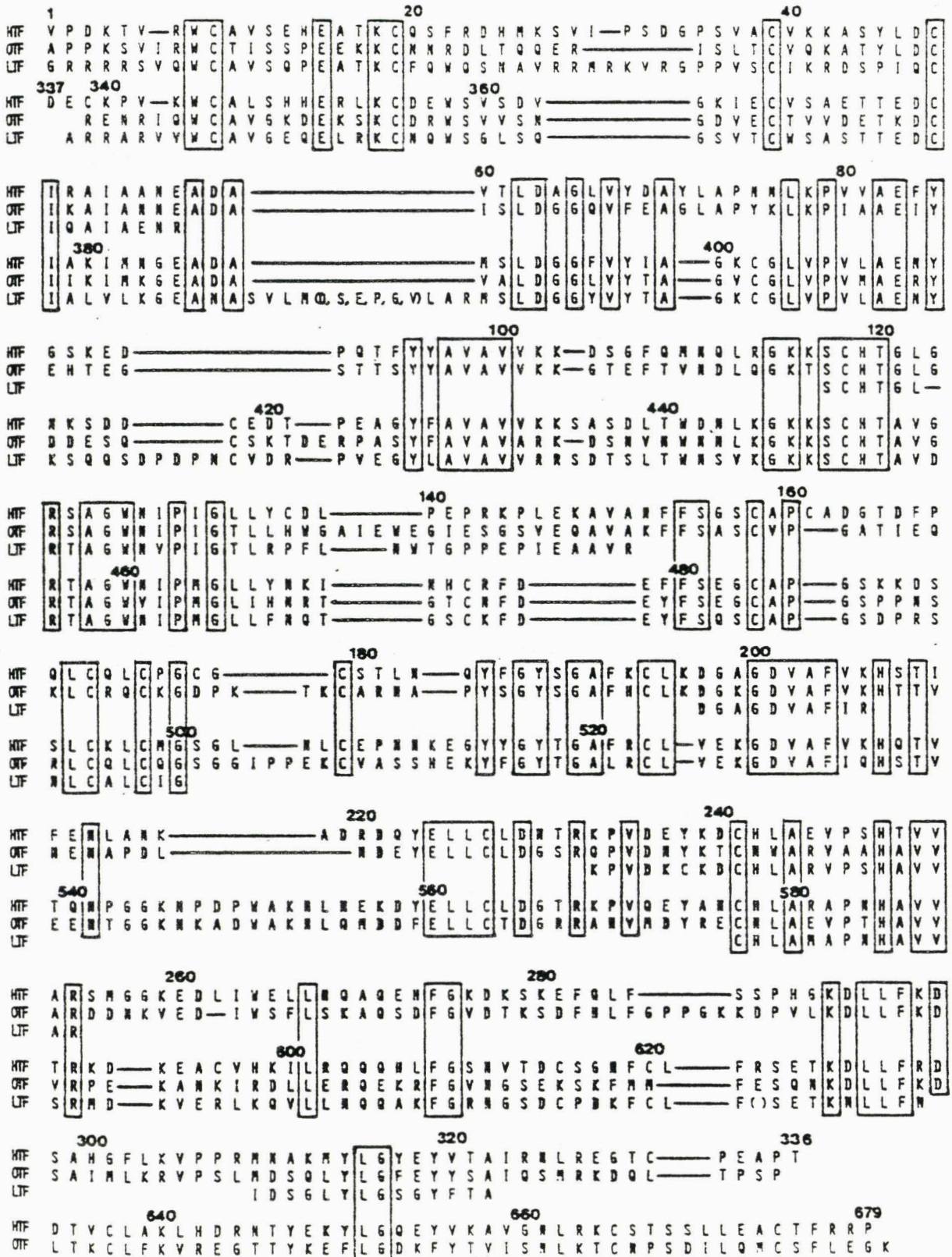


Fig. 2. Comparaison de la structure complète de la serotransferrine (HTF) humaine avec celle de l'ovotransferrine (OTF) et des régions de la lactotransferrine (LTF). (Mac Gillivray et al., 1983)

TABLEAU II

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)



ferrine ne semblerait pas induire de profond changement de conformation, même si les dimensions de la glycoprotéine varient en fonction de la saturation en fer des sites.

3 - Structure tertiaire

La chaîne polypeptidique de la transferrine se scinde en deux régions compactes qui possèdent chacune un site de fixation du fer. La première partie est formée des résidus d'acides aminés de 1 à 336, la seconde des résidus 337 à 679 (Mac Gillivray et al., 1983).

Deux méthodes essentiellement ont permis de mettre en évidence l'existence de deux parties structurellement indépendantes : les coupures enzymatiques et la dénaturation thermique.

Par action ménagée de la trypsine, Evans et Williams en 1978, ont réussi à couper la sérotransferrine humaine en deux parties. 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 molécule.

Donovan et Ross, en 1975, ont montré que chaque forme de transferrine, apo, monoferrique sur le site N-terminal et sur le site C-terminal, et di ferrique possède une température de dénaturation propre. Les deux parties de la transferrine semblent structurellement indépendantes, 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)

B - Domaines

Mac Gillivray et al., en 1977 ont observé que la sérotransferrine humaine pouvait être partagée en quatre régions structurales possédant de nombreuses homologies internes. Ils suggéraient alors que la molécule glycoprotéinique serait le descendant d'une protéine ancestrale quatre fois plus petite que la molécule actuelle.

En 1981, Metz- Boutigue et al., émettaient l'hypothèse de l'existence de six domaines chez la lactotransferrine mais aussi chez la sérotransferrine et l'ovotransferrine.

Mazurier et al., en 1983 ont confirmé cette hypothèse. Leurs études ont permis de préciser plusieurs points :

La sérotransferrine serait partagée en 6 domaines répartis 3 par 3 dans les parties N- terminales (N D ₁ à N D ₃) et C- terminales (C D ₁ à C D ₃) de la molécule Fig. 3 p 14.

Les 6 domaines constitués de 110 acides aminés ⁺ 10 présentent plusieurs homologies structurales : il existe 70 % d'homologie entre les domaines N D ₂ et C D ₂ ; 40 % entre les domaines N D ₁ et C D ₁, N D ₃ et C D ₃ .
Les domaines N D ₂ et C D ₂ sont impliqués dans la fixation du fer de la transferrine.

C - Evolution

Les transferrines possèdent des homologies internes relatives à l'enchaînement de leurs acides aminés : (Mac Gillivray et al., 1983)
la sérotransferrine humaine et la lactotransferrine ont 187 résidus d'acides aminés en commun soit 49,7 % de la structure de chacune des

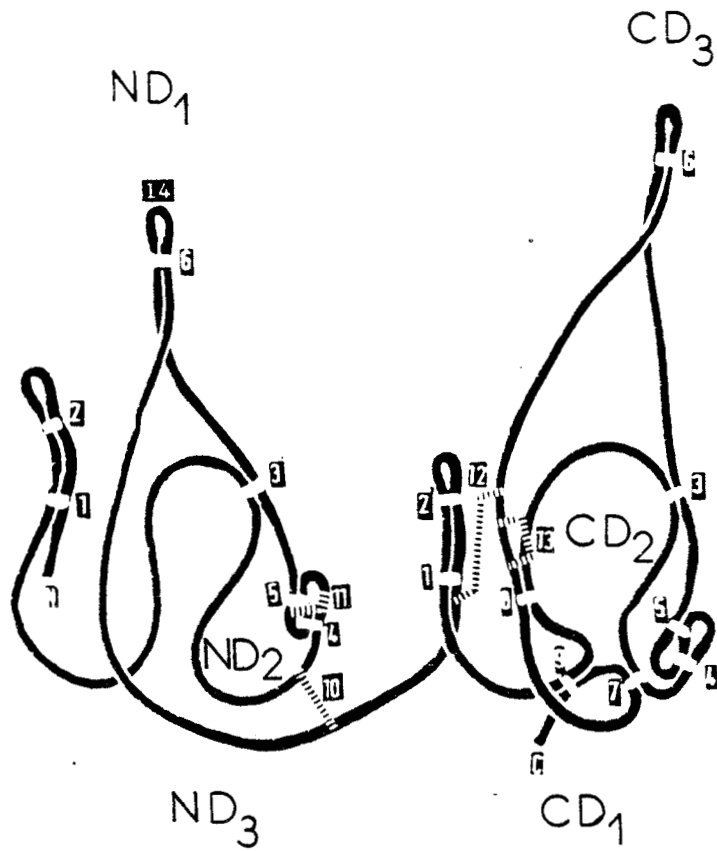


Fig. 3. Modèle de la molécule de transferrine avec localisation des 6 domaines d'après Williams, 1982 et modifié par Mazurier et al., 1983.




molécules, de même l'ovotransferrine et la lactotransferrine possèdent 167 résidus identiques soit 44 % de la molécule. Si l'on se rapporte plus précisément aux moitiés N et C terminales de la sérotransferrine et de l'ovotransferrine on constate qu'elles présentent 40 % de résidus identiques entre elles.

En terme d'évolution et d'après Williams, 1982, les parties N et C terminales sont homologues et sont les "descendantes" modifiées d'une protéine ancestrale commune.

Toutes les transferrines actuelles seraient issues d'un même gène. Leur précurseur ressemblait au domaine N de l'ovotransferrine actuelle, sa masse moléculaire était de 40.000 et il possédait un site de fixation pour un atome de fer ainsi que 6 ponts disulfures. On connaît actuellement une transferrine caractérisée chez un Protochordé (*Pyura stolonifera*) qui possède une masse moléculaire de 40.000 (Martin et al., 1983). Cependant Williams et al., 1982 ont montré que chaque moitié N et C terminales, isolée de l'ovotransferrine, injectée à une souris est rapidement éliminée de la circulation sanguine vers les reins.

En conséquence, la transferrine ancestrale ne serait pas une protéine sérique ou ne serait pas aussi petite qu'une moitié de molécule de transferrine ou encore, était-elle ancrée dans une membrane cellulaire où ses capacités de fixer le fer lui permettraient-elles de servir de récepteur du fer.

Metz-Boutigue et al., en 1981, et Mazurier et al., en 1983, en postulant l'existence de 6 domaines suggèrent la possibilité d'une hexaplication du même gène ancestral. La protéine ancestrale aurait dans ce cas 1/6 de la taille de la transferrine actuelle.



III - SITES DE FIXATION DU FER

La sérotransferrine humaine peut fixer deux ions ferriques (Fe^{+++}) 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 constante apparente de fixation du fer à la transferrine est de l'ordre de $10^{24} M^{-1}$ (Aasa et al., 1963; Aisen et Leibman, 1971; Jarrit et Charlwood, 1976). Le premier schéma de fixation du fer a été donné par Feeney et al., en 1966. Il est détaillé dans la revue générale de Chasteen, 1977.

A - Mécanisme de fixation du fer

Différentes méthodes d'analyse chimique, l'ultraviolet, la spectroscopie Raman et la résonance magnétique nucléaire (Aisen, 1980; Aisen et Brown, 1977; Bezkorovainy, 1980; Gelb et Harris, 1980) suggèrent que 2 à 3 résidus de tyrosine sont impliqués dans la fixation du fer par la transferrine. Il en est probablement de même pour deux résidus d'histidine (Mazurier et al., 1977).

Les résultats de résonance magnétique nucléaire indiquent qu'une molécule d'eau entre en jeu dans la fixation de chaque atome de fer et que c'est le ligand le plus labile de tous ceux impliqués dans ce mécanisme (Gaber et al., 1970; Koenig et Schillinger, 1969).

Pour chaque ion ferrique fixé à la transferrine un anion est simultanément fixé. Les connaissances actuelles ne peuvent préciser s'il s'agit d'un ion carbonate ou bicarbonate. Il existe une coopérativité entre le métal et l'anion: le premier ne peut se fixer sur le site qu'en présence du second, tandis que l'anion ne peut se fixer à la protéine

sans le métal (Aisen et al., 1969; Schlabach et Bates, 1975 ; Tsang et al., 1975) Fig. 4 p 18.

L'anion semble interagir directement avec un résidu protoné d'arginine (Rogers et al., 1978; Schlabach et Bates, 1975).

Enfin les résultats de Mazurier et al., en 1976, obtenus par dichroïsme circulaire, suggèrent que le tryptophane est impliqué dans la fixation du métal mais pas par liaison directe avec celui-ci.

B - Autres cations fixés

En l'absence de Fe ⁺⁺⁺ les sites de fixation peuvent fixer une variété de cations multivalents, surtout des première et deuxième séries de transition (Aisen, 1980; Aisen et Brown, 1977; Chasteen, 1977). La sérotransferrine semble être impliquée dans l'absorption du zinc et son transport dans la circulation portale (Evans et Winter, 1975). Elle transporterait également Cr ⁺⁺⁺ (Hopkins et Schwartz, 1964) et Mn ⁺⁺ (Keefer et al., 1970) ainsi que les éléments de la famille du transuranium, en particulier le très toxique Pu ⁺⁺⁺⁺ (Taylor, 1972).

C - Différences entre les deux sites

L'hypothèse de Fletcher et Huehns, 1967 et 1968, selon laquelle les sites de fixation du fer diffèrent dans leur fonction physiologique, a été le point de départ de nombreuses études et est encore aujourd'hui l'objet de conclusions contradictoires.

Princiotto et Zapolski en 1975 ont montré que la dissociation du fer de la sérotransferrine est un processus biphasique : le premier fer est libéré à pH 5.8, le second à pH 4.8. Il existe donc un site acido-labile et un site acido-stable.

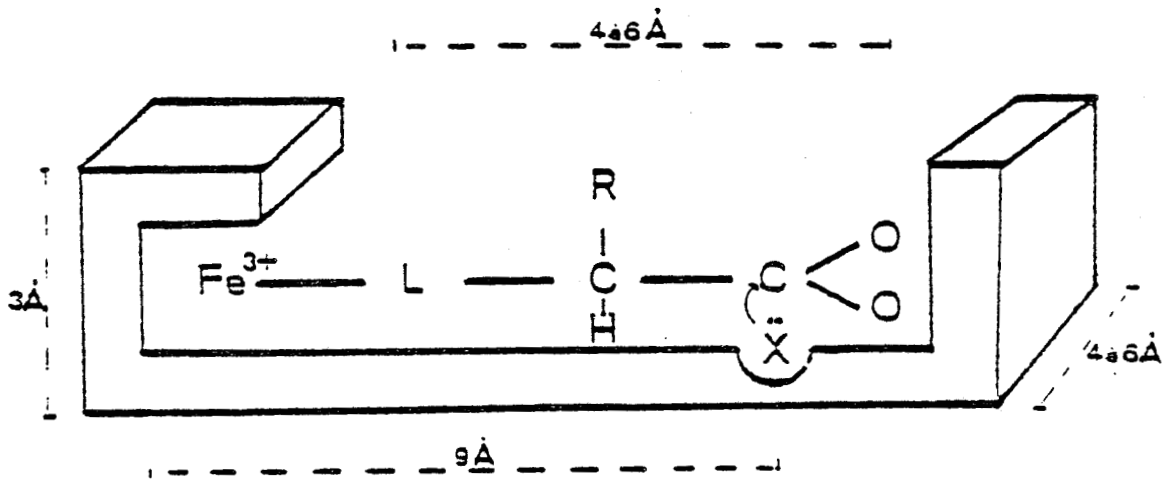


Fig. 4. Modèle des sites de fixation du fer et de l'anion d'après Schlabach et al., 1975. La distance entre le carbonate et le métal a été mesurée par Harris et al., 1974.

Ces résultats ont été confirmés par Mazurier et Spik en 1980 dans le cas de la lactotransferrine. Ces auteurs excluent ainsi la possibilité de l'équivalence des deux sites.

Krysteva et al., en 1975 et 1976 révèlent grâce à des études de spectres différentiels en ultraviolet que l'un des sites se trouve à la surface de la protéine tandis 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.

En 1977 Chasteen ainsi que Mazurier et al., puis Zweir en 1978 ont étudié les spectres R.P.E de la sérotransferrine après fixation de divers métaux. Tous ont pu mettre en évidence une différence de comportement du métal suivant le site occupé.

Aisen et al., en 1978 recalculant les constantes d'équilibre stoechiométriques ou thermodynamiques de la sérotransferrine humaine, ont démontré que, quel que 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 Eyk et al., en 1978 ont pu séparer les quatre formes de sérotransferrine humaine : apo, monoferrique sur les sites N-terminal et C-terminal, diferrique en utilisant l'électrophorèse en gel de polyacrylamide.

Enfin, Leibman et Aisen en 1979, Williams et Moreton en 1980, ont démontré que "in vitro", dans le sérum, la sérotransferrine fixe le fer surtout sur le site acido-labile. Marx et al., en 1982 corroborent d'ailleurs ces études.

Si la non-identité des sites de fixation du métal de la sérotransferrine humaine semble acquise, il reste à démontrer qu'ils interviennent dans le rôle biologique de la protéine. Van der Heul, en 1981 et Huebers et al., la même année n'ont pas pu mettre en évidence un tel rôle : aucune différence fonctionnelle entre les deux sites de fixation n'a pu être détectée in vitro.

D - Libération du fer

De nombreux facteurs chimiques sont impliqués dans la libération du fer de la transferrine (Aisen et Listowsky, 1980; Baldwin,1980)

Ces facteurs comprennent :

- la chélation par échange de ligand
- la réduction de Fe^{+++} en Fe^{++}
- la protonation des ligands responsables de la fixation du fer à la transferrine.
- la rupture des interactions carbonate-fer
- des changements conformationnels.

IV - ETUDE DE LA PARTIE GLYCANNIQUE

La nature glycoprotéinique de la sérotransferrine humaine a été reconnue par Schultze et al., en 1958. La composition en glucides est la suivante : galactose, mannose, N- acétyl-glucosamine, acide N-acétylneuraminique.

La protéine porte deux glycannes qui lui sont associés par une liaison de type N- (β aspartyl) - N- acétyl glucosaminique (Spik, Monsigny et Montreuil, 1965; Spik, 1968; Spik et Montreuil, 1969).

A - Structure des glycanes

La détermination de la structure glycanique de la sérotransferrine humaine, mais aussi d'autres transferrines, a été réalisée essentiellement au laboratoire et fait partie des premières structures glycaniques complètes ayant été identifiées.

Les glycanes de la sérotransferrine sont de type N- acétyllactosaminique comme l'a défini Montreuil en 1975.

1- Structure du glycanne biantenné

La séquence primaire des glycanes a été entreprise dès 1962 par Montreuil, Spik et Chosson et par Montreuil, Adam Chosson et Spik en 1965.

Des résultats partiels ont été obtenus par Jamieson et al., en 1971, Spik Monsigny et Montreuil en 1965, et Spik en 1968. La structure complète du glycanne de type biantenné a été définitivement établie par Spik, Vandersyppe et al., en 1974, Spik, Fournet et al., en 1974 et Spik, Bayard et al., en 1975.

Cette structure obtenue par des méthodes chimiques a été confirmée par l'analyse des spectres de Résonance Magnétique Nucléaire à 360 MHz par Dorland et al., en 1977.

La structure du glycanne biantenné est donnée Fig. 5 p 22.

2 - Structure du glycanne triantenné

Les premiers résultats de Spik, Vandersyppe et al., en 1974 ont démontré l'existence d'une troisième séquence : Neu Ac (α 2-6) Gal (β 1-4) Glc NAc dont le point d'attache était encore inconnu.

BUS
LILLE

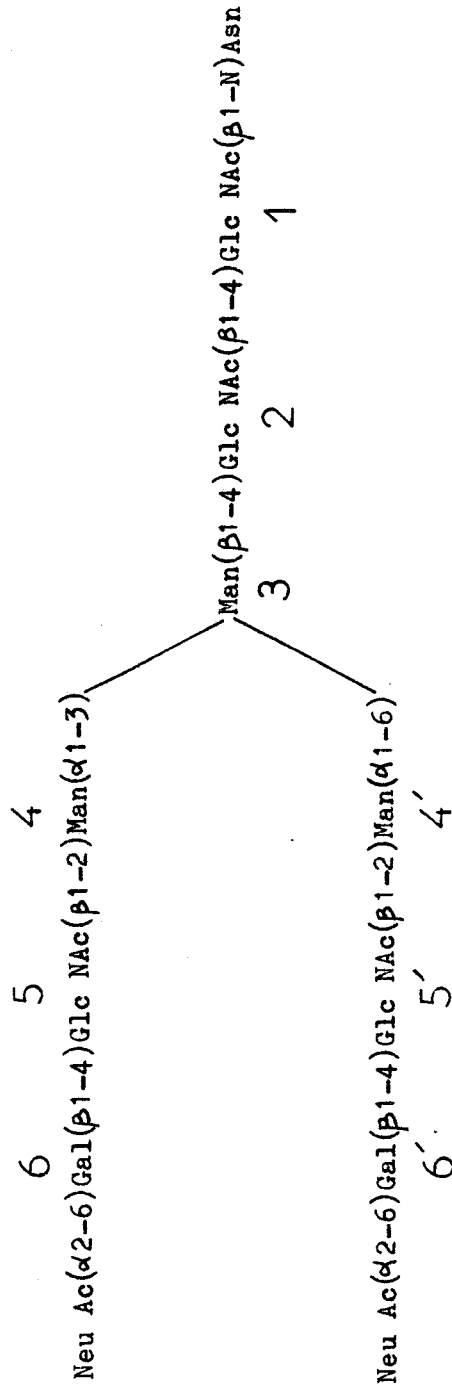


Fig. 5. Structure du glycanne biantenné de la sérotransferrine humaine d'après Spik et al., 1974

Sur la base de ces résultats, Montreuil et Spik en 1975 ont conclu que la sérotransferrine humaine possédait deux types de glycanes :

- le premier biantenné résultant de la substitution du noyau mannotriose -di- N- Acétyl-chitobiose par deux résidus α - N- acétylneuraminyl (2 \rightarrow 6) N- acétyl lactosaminique.

- le second triantenné résultant de la conjugaison d'un troisième résidu α - N- acétylneuraminyl (2 \rightarrow 3) N- acétyllactosaminique sur le même noyau.

Ces derniers résultats ont permis de mettre en évidence la liaison (α 2-3) entre les résidus d'acide N- acétylneuraminique et de galactose et présente uniquement sur la troisième branche du glycanne. La méthylation des glycanes de la sérotransferrine totale réalisée par Spik, Vandersyppe et al., en 1974 et par Krusius et al., en 1976 a permis de donner les deux structures possibles du glycanne triantenné représentées Fig. 6 p 24.

3- Structure du glycanne tétraantenné

La présence d'un glycanne de structure tétraantennée a été envisagée par März et al., en 1982. La structure de ce glycanne, parfois incomplète, est donnée Fig. 7 p 25.

B - Localisation des glycanes

Les deux glycanes de la sérotransferrine humaine sont localisés sur les fractions peptidiques séryl-aspartique et aspartyl-lysine de la chaîne protéique (Spik, Monsigny et Montreuil 1965; Spik 1968; Spik et Montreuil 1969).

BUS
LILLE

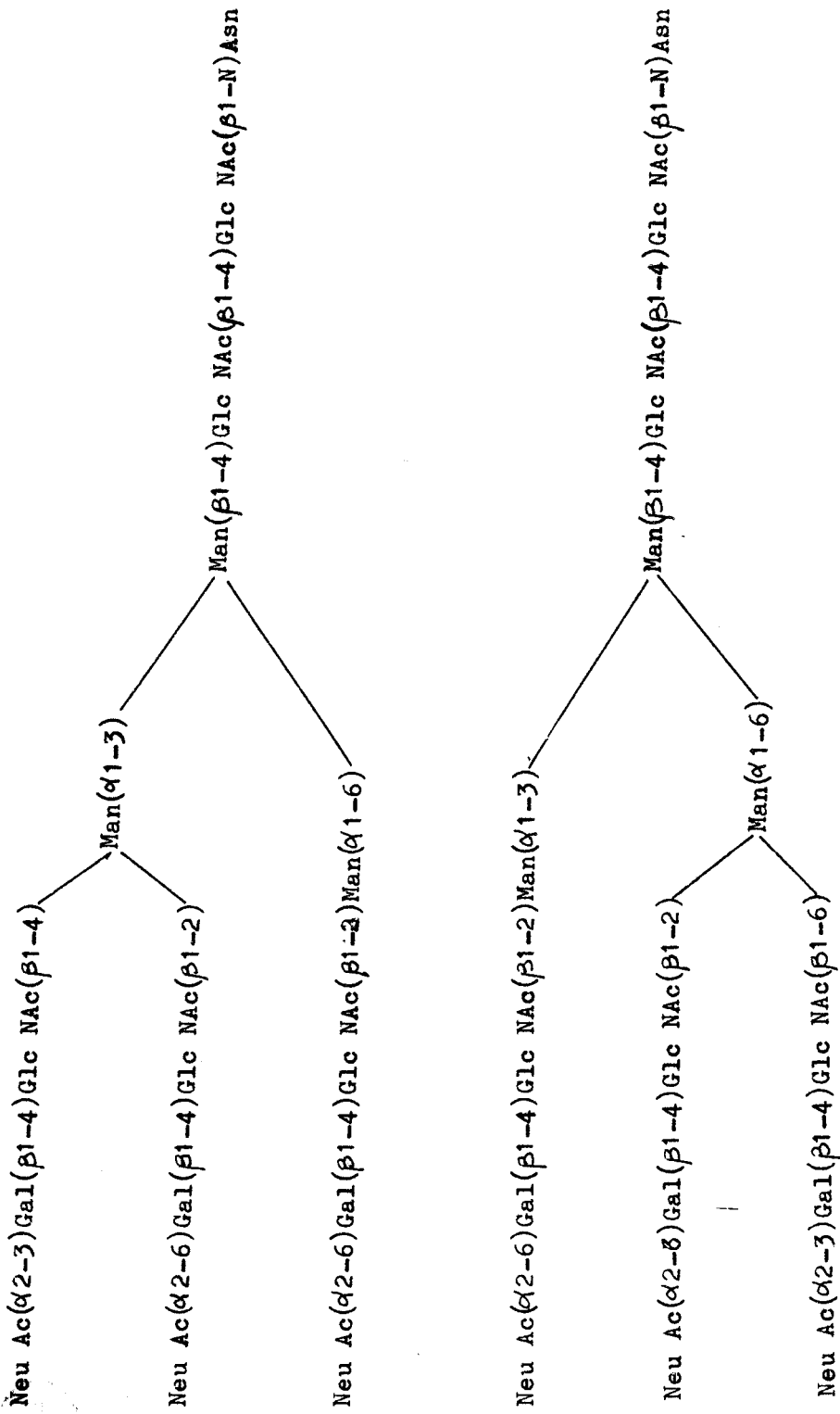


Fig. 6. Les deux types de structure du glycoprotéine triantennaire de la sérotransferrine humaine d'après Spik, Vandersyppe et al., 1974 et Krusius et al., 1976.

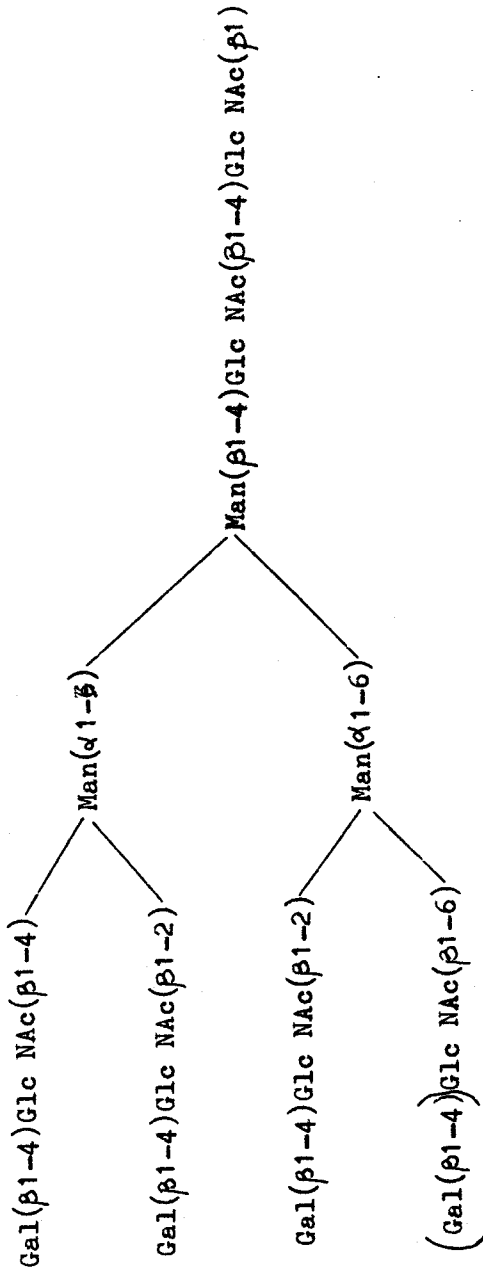


Fig. 7. Structure du glycanne tétraantenné de l'asialosérotans-ferrine humaine d'après Mařz et al., 1982. La parenthèse indique que cette branche peut être incomplète.



Les glycanes bi et triantennés sont situés indifféremment sur l'une ou l'autre de ces fractions (Hatton et al., 1979).

Les dernières études réalisées par Mac Gillivray et al., en 1983, en donnant la structure complète de la chaîne peptidique de la sérotransferrine humaine, positionnent précisément les glycanes sur les résidus d'asparagine 413 et 611.

Mazurier et al., en 1983 ont localisé les séquences d'acides aminés portant les glycanes au niveau des domaines C D₁ et C D₃ (Fig. 8 p 27). Les deux résidus d'asparagine de chaque séquence sont situés dans une conformation en β turn (Aubert et al., 1976 ; Beeley, 1976).

C - Répartition des glycanes

Les études actuelles sont destinées à résoudre le problème de l'uniformité ou non de la répartition des glycanes sur la chaîne peptidique. En effet deux théories se dégagent :

1 - La théorie de Bayard et Kerckaert, 1980 et 1981; Kerckaert et Bayard, 1982. Selon ces auteurs les glycoprotéines ne peuvent porter que des structures glycaniques identiques sur une même chaîne peptidique. La sérotransferrine humaine, dans ce cas, ne pourrait porter que deux glycanes biantennés ou deux glycanes triantennés sur la même chaîne peptidique. Ceci serait en accord avec l'hypothèse qu'ils ont émise et selon laquelle la glycosylation serait uniforme le long de chaque chaîne polypeptidique, produisant ainsi des unités oligosaccharidiques identiques à chaque site glycosylé.

2 - La théorie de Hatton et al., 1979 et de Spik, 1982 : la sérotransferrine humaine pourrait porter deux glycanes biantennés ou deux glycanes triantennés sur la même chaîne peptidique mais également

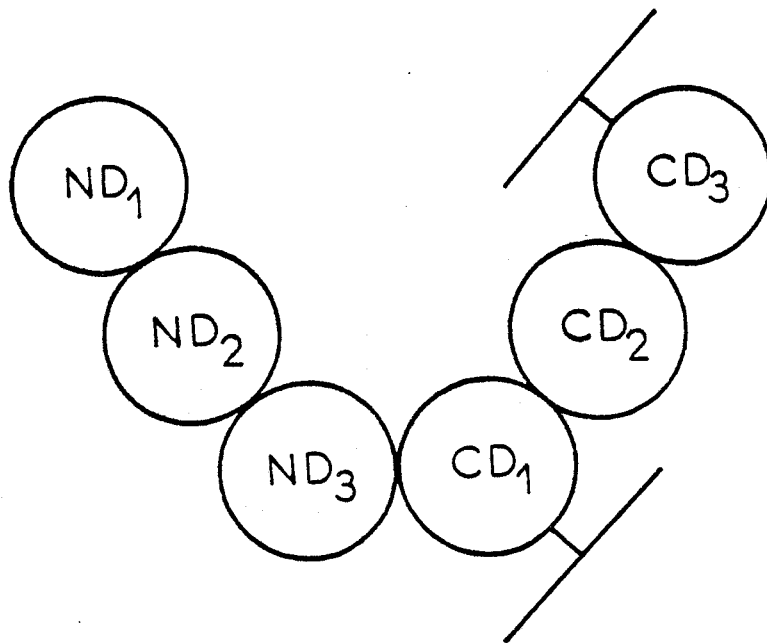


Fig. 8. Localisation des glycanes de la sérotransferrine humaine sur les domaines CD1 et CD3 d'après Mazurier et al., 1983.



un glycanne biantenné et un glycanne triantenné.

Les résultats les plus récents sont en faveur de la seconde théorie. (März et al., 1982 ; Spik, 1982).

La Fig. 9 p 29 représente les différentes localisations des structures glycaniques de la sérotransferrine humaine selon les hypothèses énoncées précédemment.

D- Conformation des glycanes

Les études concernant la conformation des glycanes des N- glycosylprotéines sont très récentes. Jusqu'ici celles-ci pouvaient être considérées comme spéculatives car seuls les modèles moléculaires étaient employés pour créer la vision d'une image spatiale des glycanes.

La première image fut donnée par Montreuil en 1975. Elle résultait de la construction de la molécule du glycanne biantenné de la sérotransferrine humaine. En tenant compte des ponts hydrogène susceptibles d'exister sur la molécule la conformation en Υ fut adoptée. Puis des études par diffraction des rayons X (Montreuil et al., 1978; Montreuil 1980a) permirent d'envisager la conformation en Γ .

Les paramètres définis par ces types de conformation sont les suivants :

1 - le noyau pentasaccharidique du mannotriosido -di- N- acétylchitobiose invariable est compact. Le trisaccharide $\text{Man}(\beta 1-4)\text{Glc NAc}(\beta 1-4)\text{Glc NAc}(\beta 1) \text{Asn}$ conjugué au résidu d'asparagine est disposé dans un plan, deux liaisons hydrogène semblent le stabiliser.

2 - les antennes constituées par l'enchaînement sialyl N- acétyllactosaminique s'enroulent en hélice.

3 - le résidu de mannose 4 (Fig 5 p 22) peut se disposer de deux manières par rapport au plan défini par le trisaccharide cité



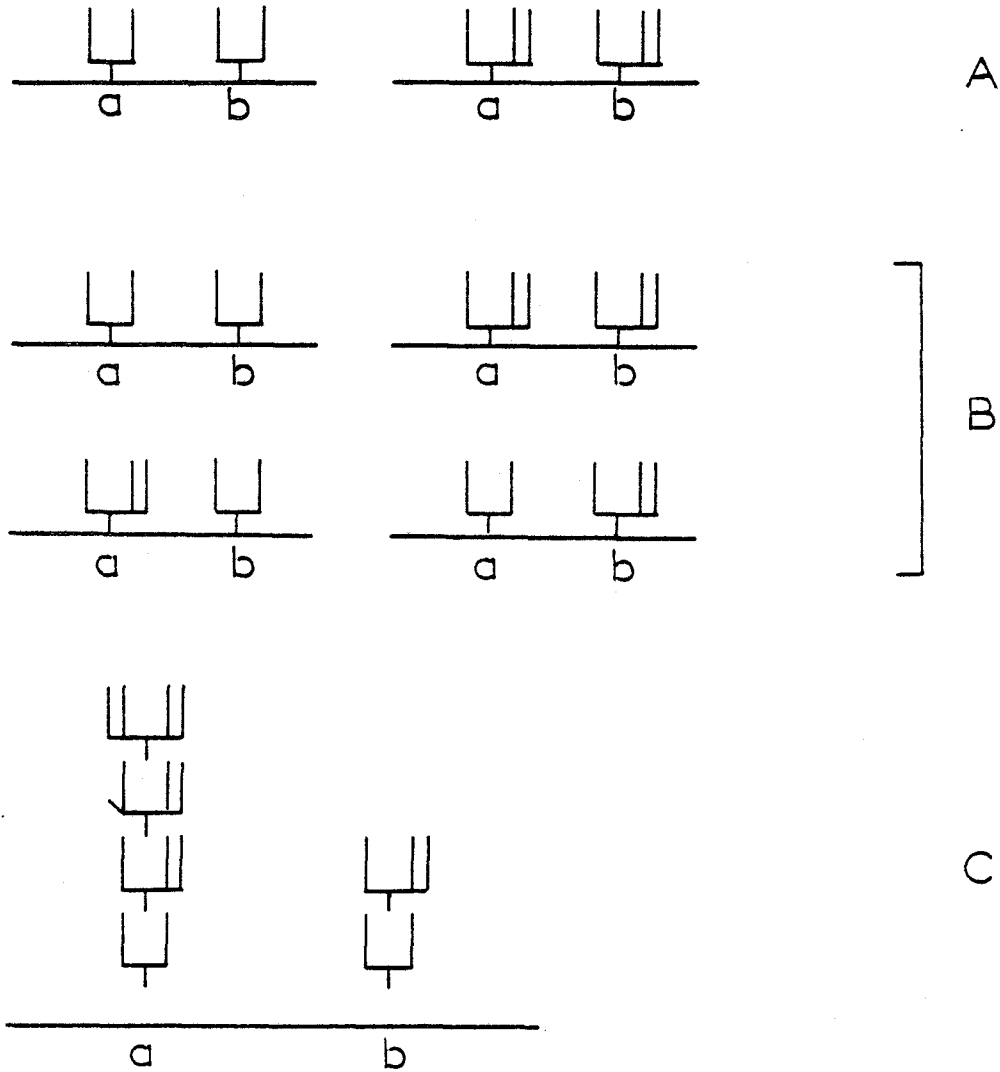
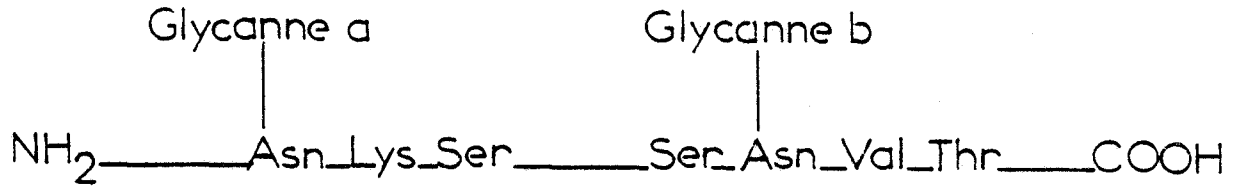


Fig. 9 . Localisation des structures glycanniques de la sérotransferrine humaine d'après :

A : Bayard et Kerckaert, 1980, 1981; Kerckaert et Bayard 1982

B : Hatton et al. 1979; Spik, 1982.

C : März et al., 1982.



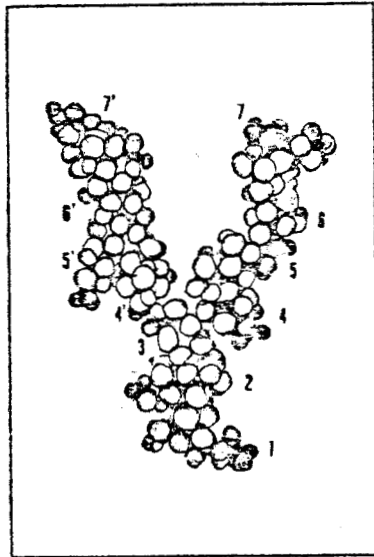
précédemment et donner ainsi soit une conformation en Y , soit une conformation en T .

Les données cristallographiques obtenues par Warin et al., en 1979 laissaient supposer que le modèle T était celui correspondant le mieux à la réalité.

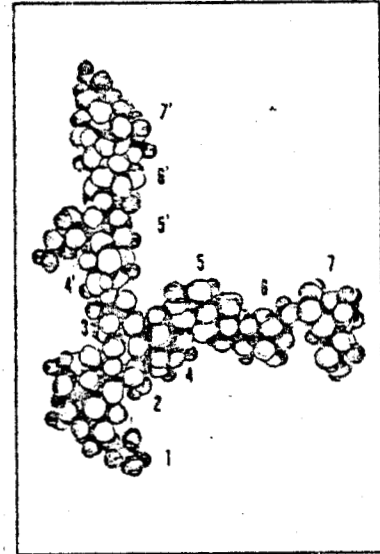
La conformation en oiseau fut suggérée par Montreuil, 1980 a, 1980 b, 1982 et 1983. Cette conformation a été obtenue par une large rotation autour du résidu de mannose lié en (α 1-6). D'après les études sur ordinateur de Perez et Warin (résultats non publiés) cette conformation est stériquement possible et énergétiquement la plus favorable.

Les trois formes en Y , T et oiseau sont probablement interconvertibles en solution, de même qu'elles ne doivent pas être considérées comme fixes ou rigides (Douy et al., 1980a et 1980b) : l'existence d'un degré interne de rotation des antennes dans l'espace a été démontrée en E.P.R par marquage des glycannes bi et triantennés avec un marqueur de spin sur les résidus d'acide N- acétylneuraminique ou de galactose (Davoust et al., 1981 ; Michel, 1981).

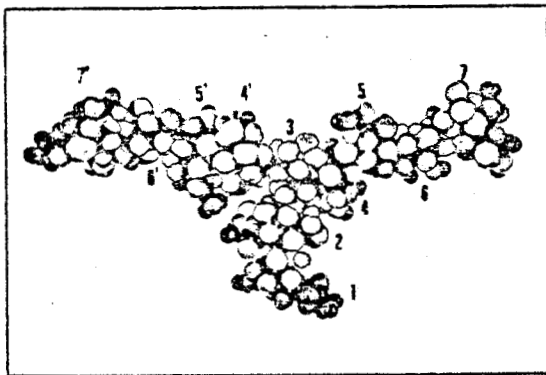
Le rôle fondamental du noyau mannotriosidique dans la conformation des glycannes a été récemment mis en évidence par Brisson et Carver; 1983. Grâce à l'utilisation de la R.M.N. ils ont montré que le trisaccharide avait deux conformations idéales : l'une linéaire et conduisant à l'image structurale en oiseau, l'autre repliée et conduisant à une conformation en oiseau blessé dans laquelle l'antenne liée en (α 1-6) est rabattue le long du résidu de -N - acétylchitobiose. La fig. 10 p 31 donne un aperçu des différentes conformations en Y , T , oiseau et oiseau blessé citées précédemment.



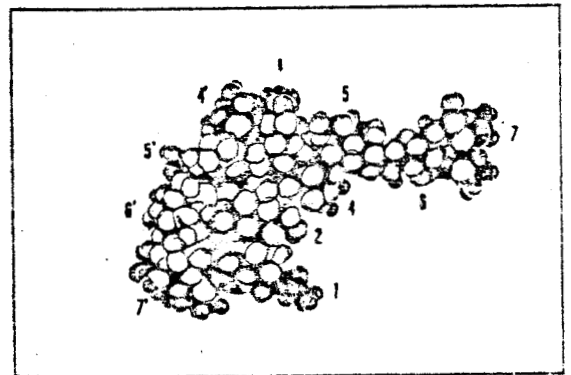
Conformation en Y



Conformation en T



Conformation en oiseau



Conformation en oiseau
blessé

Fig. 10. Modèles moléculaires compacts du glycanne biantenné de la sérotransferrine humaine d'après Montreuil *et al.*, 1978; Montreuil, 1980 a, 1980 b, 1982 et 1983; Brissonet Carver, 1983.



L'étude de la conformation des glycanes a permis de comparer les dimensions des glycanes et de la partie protéique. Les dimensions du glycanne biantenné de la sérotransferrine humaine ont été établies en mesurant le modèle moléculaire lui-même, grâce à l'analyse sur ordinateur (Perez et Warin, résultats non publiés) et d'après les résultats de Douy et al., 1980a, b. Elles sont les suivantes: longueur 55 Å, hauteur 24 Å, épaisseur 5 Å, surface 200 Å². Les deux glycanes couvrent donc une surface relativement importante de la molécule protéique (95 x 60 x 50 Å) (Fig. 11 p 33.)

V - CONCLUSION

Les nombreuses études réalisées jusqu'à présent sur la sérotransferrine humaine ont permis de préciser en grande partie qu'elle était la structure générale de cette glycoprotéine. Ceci nous permet d'aborder les chapitres concernant l'activité biologique de la sérotransferrine et tout d'abord celui consacré à la physiologie et la pathologie du métabolisme de la transferrine.



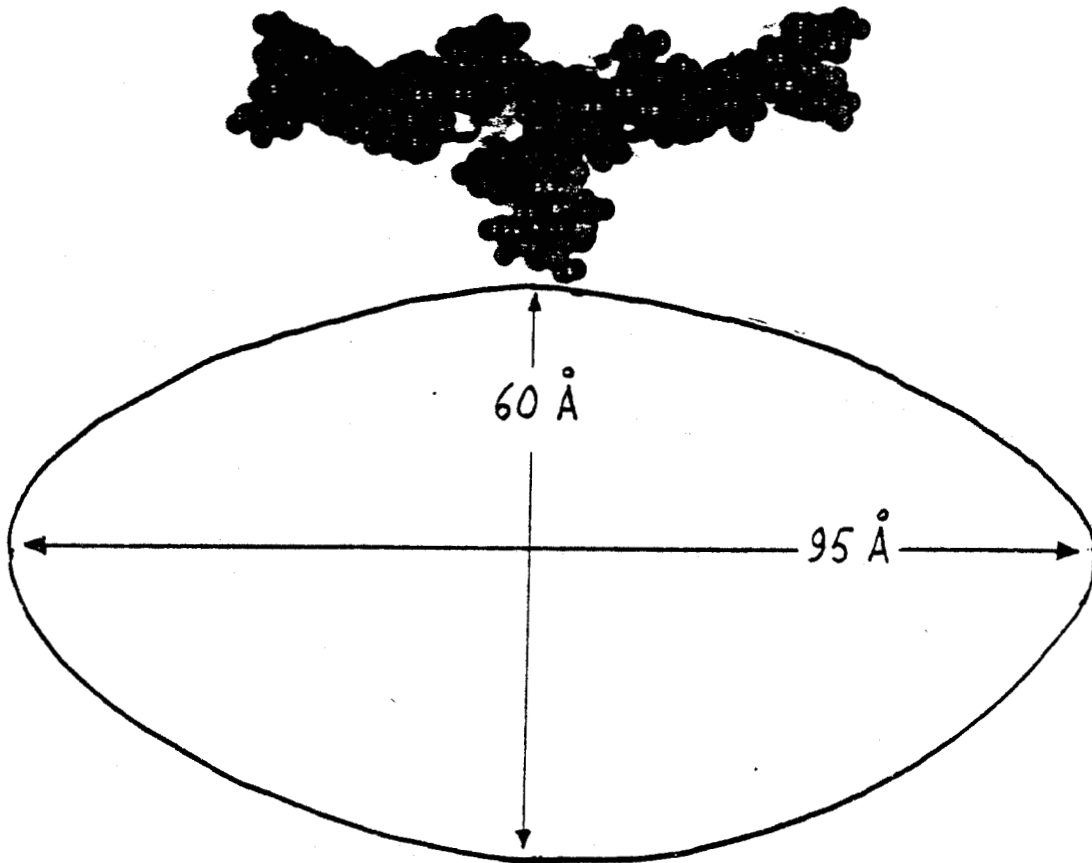


Fig. 11. Comparaison entre les dimensions des deux glycannes de la sérotransferrine humaine et les dimensions de la partie protéique (Montreuil, 1983).

PHYSIOPATHOLOGIE HEPATIQUE DE LA SEROTRANSFERRINE

Notre but n'est pas ici de dresser un catalogue des aspects physiologiques et pathologiques du métabolisme de la sérotransferrine. Nous ne développerons que quelques points essentiels qui serviront à la compréhension de nos travaux et en particulier les variations qui interviennent dans la concentration de la transferrine ainsi que dans la structure même de la molécule lors d'atteintes hépatiques.

I - METABOLISME DE LA SEROTRANSFERRINE

La majeure partie de la sérotransferrine (59%) est présente dans le plasma. La partie restante (41%) se retrouve dans la lymphe et les espaces extracirculants. De nombreux tissus sont capables de synthétiser la transferrine mais la plus grande partie de la transferrine plasmatique est produite au niveau du foie. La répartition de la transferrine dans les tissus humains est donnée dans le tableau III p 35.

Le taux de renouvellement de la sérotransferrine est de 10% par jour, alors que le fer est renouvelé toutes les 100 minutes; sa demi-vie est de 8 jours (Bothwell et al., 1979).

Le rôle essentiel de la transferrine est d'amener le fer à la moëlle érythropoïétique, son second rôle est de récupérer le fer fixé à la suite de l'hémolyse dans le système réticulaire, son troisième rôle enfin est de régulariser l'absorption du fer. En effet, le taux d'absorption du fer est augmenté si le taux de saturation de la transferrine est bas, et vice versa (Dreyfus, 1975). Le schéma général précisant le rôle

TABLEAU III

Répartition de la sérotransferrine humaine dans les tissus humains
d'après Mason et Taylor, 1978.

TISSUS	CELLULES
<u>Tractus gastrointestinal</u>	
Foie	Hépatocytes
Estomac	Cellules pariétales
Duodénum	Cellules épithéliales
Vésicule biliaire	Cellules épithéliales
<u>Glandes endocrines</u>	
Thyroïde	Colloïde
<u>Appareil urogénital</u>	
Rein	Tubules
Utérus	Epithelium cervical Cellules myoépithéliales
<u>Glandes exocrines</u>	
Tissu mammaire	Cellules périductulaires
<u>Système réticulo-endothélial</u>	
Histiocytes	Histiocytes activés
<u>Peau</u>	Cellules épidermiques



métabolique de la transferrine est donné dans la Fig. 12 p 37 d'après Van Moore, 1973.

Dans l'intestin, le mécanisme d'absorption du fer est encore mal connu, Huebers et al., 1983, ont proposé un schéma expliquant le rôle de la transferrine dans l'absorption intestinale du fer. Ce schéma est donné dans la Fig. 13 p 38.

II - CONCENTRATION DE LA TRANSFERRINE PLASMATIQUE.

La concentration de la transferrine est habituellement estimée par la mesure de la capacité de fixation du fer du plasma. Des méthodes immunologiques sont également utilisées. La concentration de la transferrine varie en fonction de nombreux facteurs biologiques.

A - Variations biologiques en fonction de l'âge

Chez le nouveau-né à terme, la concentration de transferrine dans le sang du cordon est d'environ 58 à 71 % celle de l'adulte (Vahlquist et al., 1975) et d'environ 45 à 47 % celle de la mère (Bonnet et al., 1978). A six mois, un taux proche de celui de l'adulte est atteint : $2,39 \text{ g.l}^{-1}$ (Vahlquist et al., 1975). Le taux de transferrine de l'adulte est atteint dès l'âge de deux ans (Chopin et al., 1983) . (Fig. 14 p 39).

B - Variations biologiques en fonction du sexe

Le taux de transferrine est plus élevé chez les femmes que chez les hommes de 20 à 60 ans, la différence la plus marquée se situe de 20 à 40 ans (8 % environ). De 4 à 20 ans par contre, la transferrinémie est plus élevée chez les garçons (Herbeth et al., 1983). (Fig. 14 p 39)

Le tableau IV p 39 donne les limites de référence de la transferrine en fonction de l'âge et du sexe.

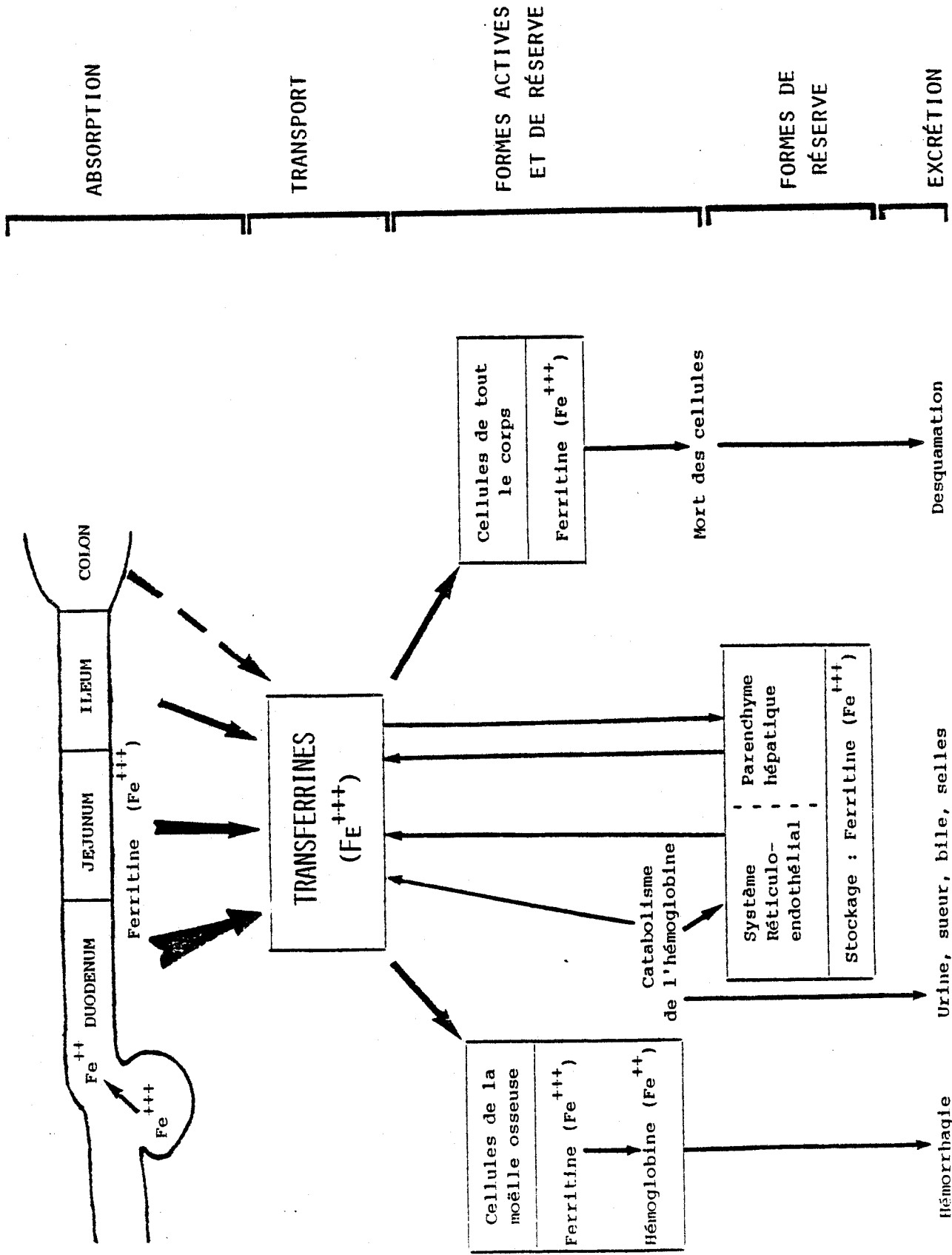


Fig 12. Schema général du métabolisme du fer chez l'homme selon Von Moore, 1973.

BUS LILLE

LUMIERE INTESTINALE

CELLULE DE LA MUQUEUSE

SANG

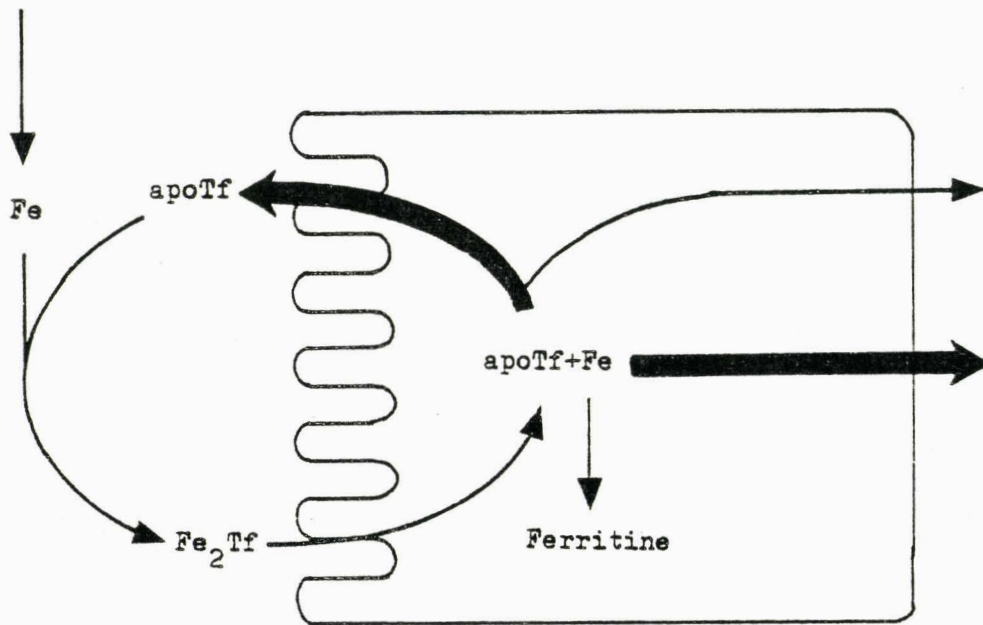


Fig. 13. Schéma proposé par Huebers et al., 1983, montrant l'absorption du fer au niveau intestinal (Duodénum et jejunum).



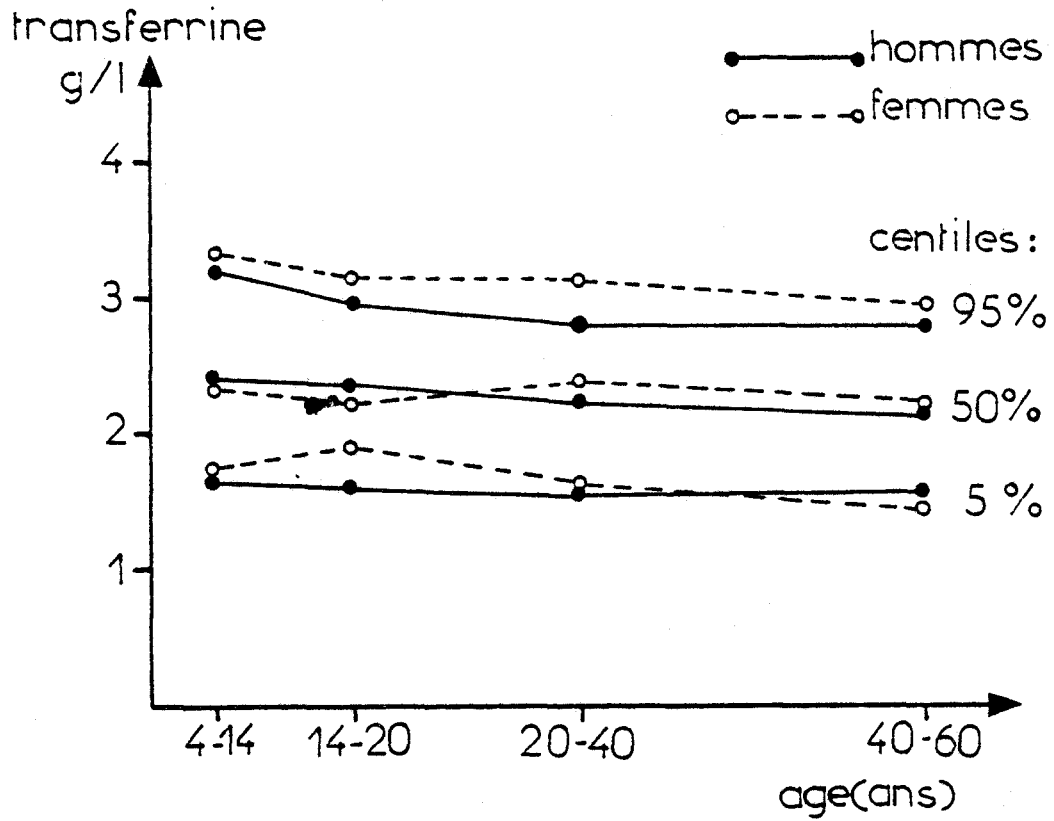


Fig. 14. Dispersion des valeurs de la concentration de la sérotransferrine en fonction de l'âge et du sexe d'après Herbeth et al., 1983

TABLEAU IV.

Limites de référence de la transferrine ($g.l^{-1}$)
d'après Herbeth et al., 1983.

Age (ans)	N	Hommes			N	Femmes		
		2,5	50	97,5		2,5	50	97,5
4-14	98	1,6	2,4	3,3	72	1,7	2,3	3,4
14-40	93	1,6	2,3	3,0	94	1,7	2,3	3,2
40-60	58	1,5	2,2	2,9	81	1,5	2,2	3,2

* Centiles 2,5-50-97,5 %.

C - Autres facteurs de variation

Pendant la grossesse, la concentration de transferrine augmente de 37 à 70 % environ (Vahlquist et al., 1975). Une élévation de 10 à 35 % de la transferrinémie est notée chez les femmes prenant des contraceptifs oraux normodosés (Gleichman et al., 1973). Les variations du taux de transferrine peuvent être dues également à un effort prolongé, la prise de médicaments, la dénutrition ou le changement de saison (pendant l'hiver, la transferrinémie est plus élevée de 8% par rapport à l'été) (Herbeth et al., 1983.)

III- PATHOLOGIE DE LA TRANSFERRINE - CAS PARTICULIER DE LA CIRRHOSE ALCOOLIQUE

Le foie étant le principal lieu de synthèse de la transferrine, toute atteinte hépatique peut entraîner des désordres physiologiques tant au niveau de la concentration plasmatique de la glycoprotéine qu'au niveau de la molécule elle-même. Dans le cas de la cirrhose alcoolique les deux phénomènes interviennent.

A - Variation de la concentration de la transferrine

La concentration sérique de la transferrine est de 17 % plus basse dans le cas d'une cirrhose alcoolique que dans un cas normal : la concentration passe de 3.0 ± 0.7 g/l pour une population témoin 2.5 ± 0.8 pour un groupe de patients atteints de cirrhose alcoolique (Nalpas et al., 1980; Teppo et Maury, 1983) (Fig. 15 p 41). Ce facteur de variation, lié à l'augmentation importante du taux d'immunoglobuline Ig A (Iturriaga et al., 1977) constitue un paramètre maintenant classique utilisé pour le diagnostic de la cirrhose alcoolique. L'identification précoce de l'atteinte hépatique chez l'alcoolique repose sur la collection d'éléments

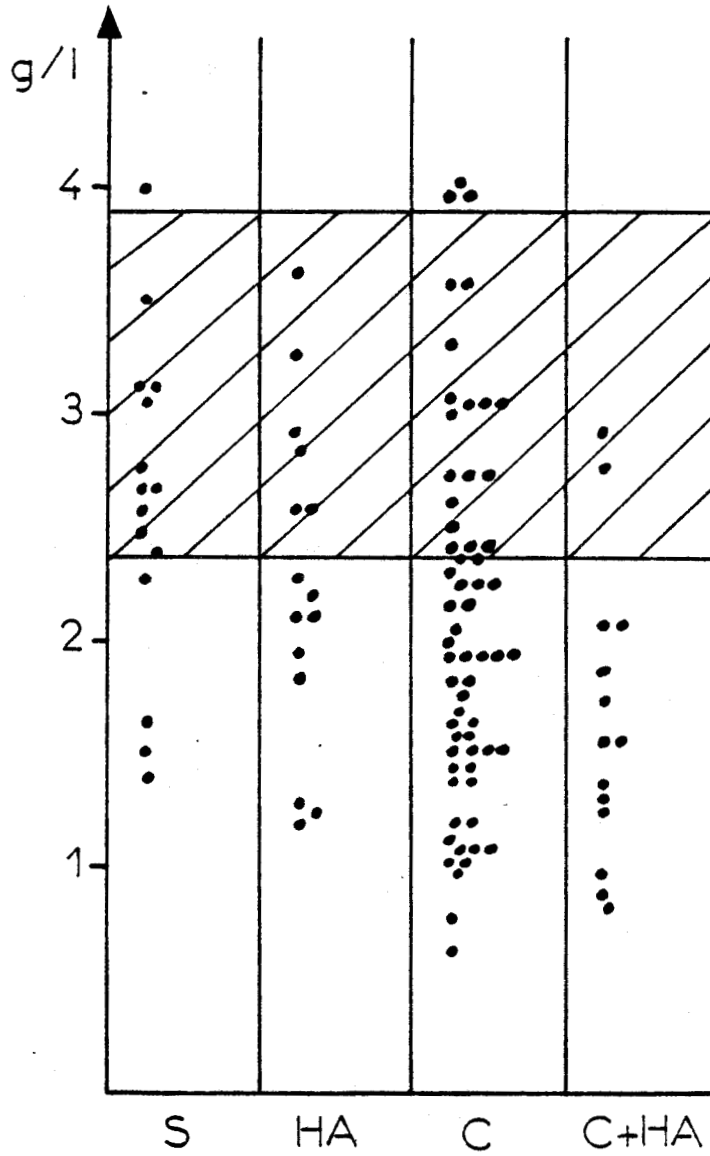


Fig. 15. Concentration plasmatique de la transferrine au cours des stéatoses (S), hépatites alcooliques (HA), cirrroses alcooliques (C) et cirrroses alcooliques avec hépatite alcoolique (C + HA). La zone hachurée représente la moyenne \pm 2 DS de la population de référence (Nalpas et al., 1980).



cliniques et biologiques dont la synthèse ne rend qu'un compte approximatif, exception faite de l'étude histologique impraticable à grande échelle. Le rapport Ig A / transferrine conserve une bonne performance sémiologique de l'hépatopathie alcoolique : il est normal jusqu'à 1.4, correspond à des lésions précirrhotiques de 1.5 à 2.4, au-delà, il atteste la cirrhose (Ollivier et al., 1981).

B - Influence de l'alcool sur la synthèse et la sécrétion de la transferrine

La présence d'alcool au niveau de l'hépatocyte entraîne des perturbations dans la synthèse et l'exportation des protéines du foie.

Fig. 16 p 43.

1 - Inhibition de la synthèse de la transferrine

Dans l'hépatocyte, l'éthanol se transforme en acétaldéhyde qui inhibe la synthèse de la transferrine. (Lieber, 1980). In vitro, l'inhibition de synthèse protéique s'accompagne d'une augmentation importante du rapport hépatocytaire lactate / pyruvate, reflet d'une intense perturbation du potentiel redox (Malpas et Berthelot, 1982)

2 - Inhibition de la sécrétion de la transferrine

Chez le rat alcoolique se développe en 4 à 6 semaines une hépatomégalie due à l'accumulation dans le foie non seulement d'acides gras mais de protéines (Baraona et al., 1975a). Cette accumulation ne semble concerner que des protéines destinées à être exportées, suggérant un blocage par l'éthanol, du transport des protéines hépatiques vers le plasma (Baraona et al., 1975_b). Ainsi, chez le rat alcoolisé, les molécules de transferrine nouvellement synthétisées apparaissent avec retard dans le

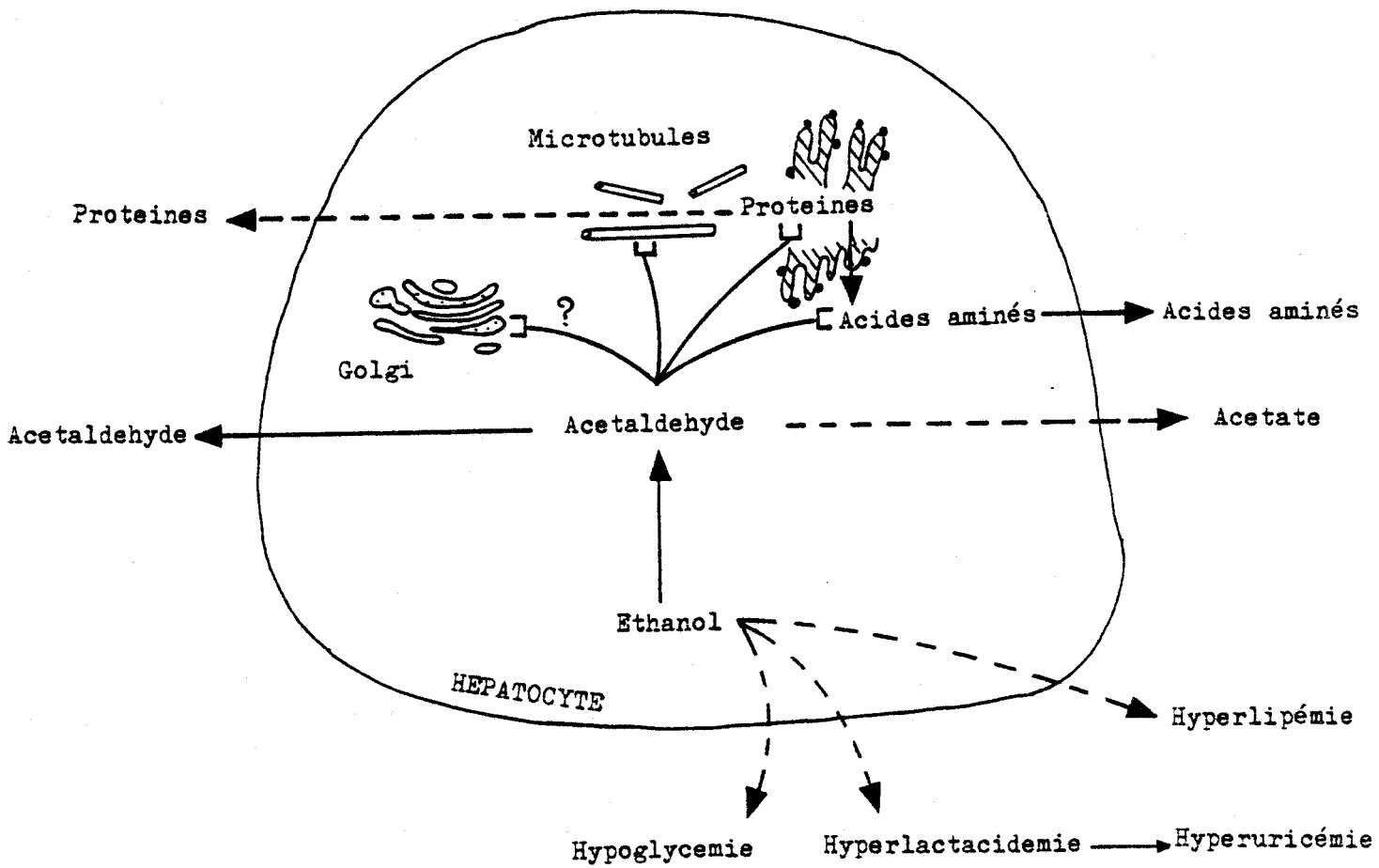


Fig. 16. Perturbations engendrées par l'oxydation de l'éthanol dans l'hépatocyte (Lieber, 1980).



plasma alors qu'elles s'accumulent dans le cytosol des hépatocytes (Baraona et al., 1977).

Deux mécanismes peuvent être invoqués pour expliquer ces faits (Nalpas et Berthelot, 1982) :

- Le premier met en cause la glycosylation. La majorité des protéines plasmatiques, hormis l'albumine, est synthétisée par le foie sous forme de glycoprotéines, la fraction glycosylée étant alors essentielle pour la sécrétion et la durée de vie plasmatique de ces protéines (Neufeld et Ashwell, 1980). Or il a été montré que l'étape de glycosylation était inhibée par l'acétaldéhyde (Sorell et al., 1977; Tuma et Sorell, 1981).

- Un deuxième mécanisme expliquant la non-exportation des protéines, et pas seulement celle des glycoprotéines, incrimine une altération, sous l'influence de l'alcool, du système microtubulaire des hépatocytes. Les microtubules sont des organites intracellulaires situés entre l'appareil de Golgi et la membrane de l'hépatocyte : leur rôle est de permettre la sécrétion des protéines de l'appareil de Golgi vers l'extérieur de la cellule. L'intégrité de cette fonction dépend du degré de polymérisation des protéines de structure des microtubules. Or l'absorption d'alcool, et la production d'acétaldéhyde diminue, chez le rat, la quantité de tubuline polymérisée et le nombre de microtubules visibles (Baraona et Lieber, 1982)

3 - Conclusion

L'alcool semble inhiber à la fois la synthèse et la sécrétion de la transferrine et des autres glycoprotéines plasmatiques (Sorell et al., 1983). En pratique clinique, cependant, il reste plusieurs phénomènes mal

expliqués :

- Chez l'alcoolique chronique, non cirrhotique, il est fréquent d'observer une augmentation, et non une diminution des concentrations plasmatiques de certaines protéines, telle l'haptoglobine et l' α_1 -glycoprotéine (Malpas et al., 1980).

- L'hypoalbuminémie n'est en général observée, chez l'alcoolique chronique, que s'il existe une cirrhose. En fait, l'inhibition de la synthèse et / ou l'exportation de la transferrine semble mieux s'expliquer par l'existence d'une cirrhose plutôt que par l'alcoolisme.

C - Hypersidérémie hépatique

Lors de la cirrhose se développe au niveau du foie une accumulation importante de fer (Murray et Stein 1966). La concentration en fer sérique est plus importante chez les cirrhotiques alcooliques. La synthèse de la transferrine est réduite mais son taux de saturation en fer est plus important, de même que le taux de fer libre circulant. Vernet-Nyssen et al., 1982 ont en outre observé chez des patients hypersidérémiques la présence d'une fraction de fer sérique non liée à la transferrine.

Ces facteurs favorisent l'accumulation du fer dans le foie. Cependant, l'augmentation des apports en fer seule n'est pas suffisante pour expliquer le taux élevé de fer accumulé dans le foie des cirrhotiques, d'autres facteurs doivent aussi jouer un rôle dans le développement de la sidérose (Chapman et al., 1983).

D - Modification des glycanes de la transferrine

La molécule de transferrine elle-même est affectée par la cirrhose alcoolique. Stibler et al., 1980 ont mis en évidence une micro-hétérogénéité anormale de la sérotransferrine humaine chez des alcooliques

chroniques : elle est due à une désialylation partielle des glycanes. La Fig. 17 p 47 montre la différence de contenu en acide sialique pour la transferrine d'alcooliques par rapport à celle d'une population témoin (Stibler et Borg, 1981). On constate une diminution de 22 % du contenu en acide sialique de la transferrine d'alcoolique . Aucune altération similaire n'a été observée pour les autres glycoprotéines sialylées du plasma (Stibler et al., 1980). Cependant une telle possibilité ne doit pas être exclue, les glycoprotéines désialylées étant rapidement éliminées de la circulation sanguine, leur détection s'avère difficile.

IV - CONCLUSION

La concentration plasmatique de la sérotransferrine varie peu en fonction de l'âge et du sexe. Dans les cas de cirrhoses alcooliques, par contre, le taux de transferrine est sujet à des variations considérables, atteignant parfois des valeurs très basses, inférieures à 1 g.l^{-1} .

La cirrhose alcoolique entraîne des troubles importants au niveau du foie et sur le plan métabolique : la synthèse et la sécrétion de glycoprotéines, dont la transferrine, sont inhibées par la formation d'acétaldéhyde, produit de transformation de l'éthanol dans les hépatocytes. Les glycanes même de la transferrine sont modifiés lors de la cirrhose : ils peuvent être désialylés à 22 %.

Enfin, la cirrhose alcoolique entraîne une accumulation considérable de fer au niveau du foie.

Dans le dernier chapitre, nous aborderons le problème de

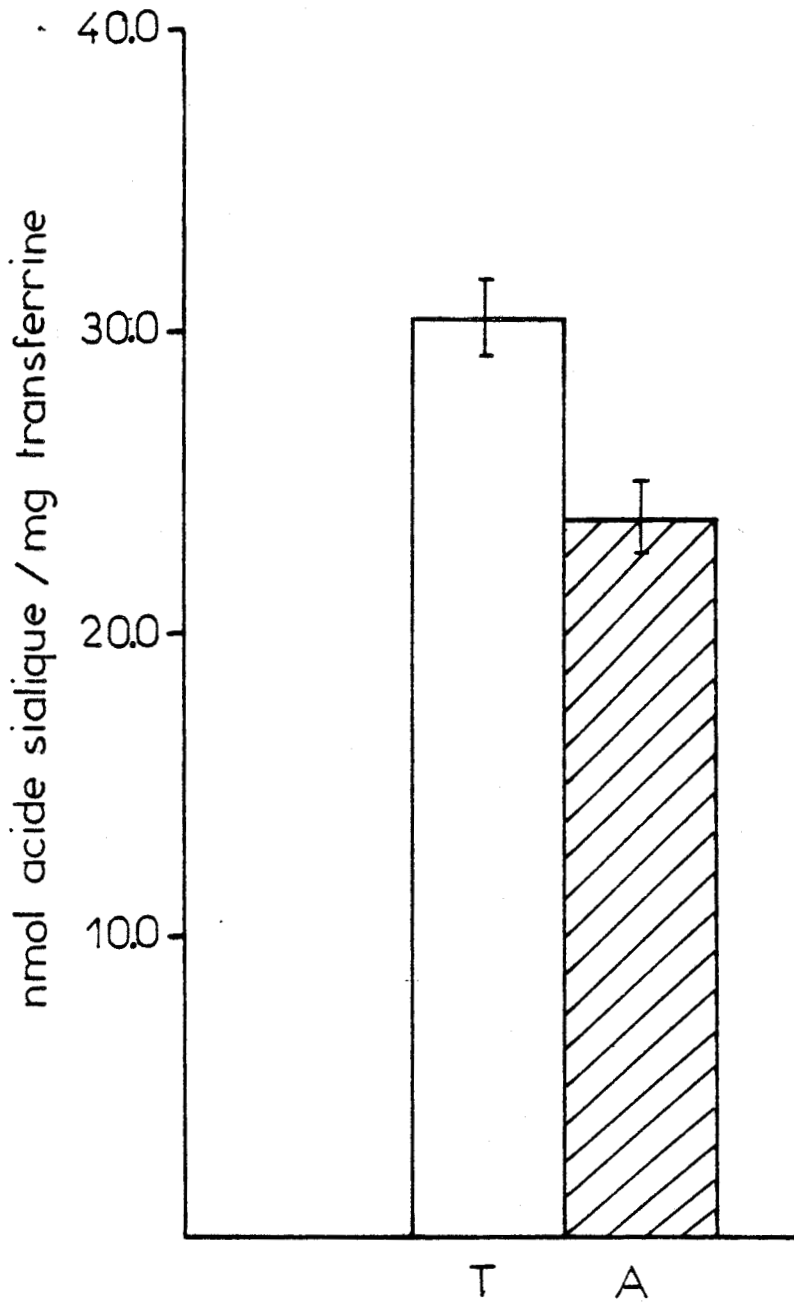


Fig. 17. Contenu en acide sialique de la transferrine de 8 témoins (T) normaux et de 8 alcooliques (A) d'après Stibler et Borg, 1981.



l'interaction de la transferrine avec les cellules, en particulier avec les réticulocytes et avec les hépatocytes.

INTERACTIONS TRANSFERRINE-CELLULES

Transporteurs du fer, les transferrines répartissent le métal dans tout l'organisme au niveau de différents tissus. Des récepteurs spécifiques de ces protéines sont présents à la surface des cellules des tissus où s'effectue le transfert du fer. La sérotransferrine reconnaît spécifiquement les récepteurs des réticulocytes et des hépatocytes, la lactotransferrine reconnaît ceux des macrophages et des entérocytes et l'ovotransferrine reconnaît les récepteurs des cellules sanguines d'embryon de poulet.

Il existe également des récepteurs des transferrines sur de nombreuses autres cellules comme celles de la moëlle osseuse (Philips, 1976), les fibroblastes d'embryon de rat (Octave et al., 1981) ou plusieurs lignées cellulaires humaines (Hamilton et al., 1979; Larrick et Cresswell, 1979; Galbraith et al., 1980b; Salomon, 1980). La liste des récepteurs transferriniques ne s'arrête pas à ces quelques exemples et les nombreuses études consacrées à ce sujet prouvent bien la multitude des interactions existant entre les transferrines et leurs récepteurs membranaires.

Ce chapitre constitue une synthèse des connaissances actuelles concernant les interactions transferrine-cellules. Nous développerons tout particulièrement les interactions de la sérotransferrine avec les réticulocytes, ainsi qu'avec les hépatocytes.

I - INTERACTION DE LA TRANSFERRINE AVEC LES RETICULOCYTES

Les globules rouges sont formés à partir de cellules de la moëlle osseuse, les érythroblastes qui, par divisions successives, puis expulsion du noyau, aboutissent en 4 à 5 jours aux réticulocytes. Ceux-ci passent dans la circulation et se transforment en 2 jours environ en globules rouges. Parmi les précurseurs des érythrocytes, seuls les réticulocytes sont encore capables de capter le fer de la transferrine. Ce besoin en fer nécessaire à la biosynthèse de l'hémoglobine, ainsi que son accessibilité dans la circulation sanguine, font du réticulocyte l'un des modèles les plus activement étudiés pour l'interaction transferrine-cellules.

Il faut distinguer trois phases essentielles dans le transfert du fer de la transferrine au réticulocyte :

1 - La transferrine se fixe sur son récepteur spécifique présent au niveau de la membrane plasmique cellulaire du réticulocyte.

2 - Elle transfère son fer dans la cellule pour la synthèse de l'hémoglobine.

3 - Elle retourne intacte dans la circulation pour un nouveau cycle de transport.

Cependant les détails de ces différentes étapes sont encore mal connus.

A - Le récepteur de la transferrine sur les réticulocytes

1 - Mise en évidence

En 1959, Jandl et al., ont remarqué que les cellules rouges traitées par la trypsine étaient incapables de fixer la transferrine pas plus que de capter son fer. Ils en ont conclu qu'un récepteur spécifique de la transferrine sur la membrane plasmique de la cellule avait été

dégradé par protéolyse.

Garrett et al., en 1973 ont trouvé une activité de fixation de la transferrine dans le surnageant de réticulocytes traités au détergent, ceci étant probablement dû à la présence des récepteurs libérés.

(Van Bockxmeer et Morgan, 1977).

Depuis, de nombreuses études ont été entreprises dans le but d'isoler et de caractériser le récepteur spécifique de la transferrine sur la membrane plasmique du réticulocyte, mais sans toutefois donner de résultats concordants.

2 - Nature du récepteur

Les estimations concernant la masse moléculaire du récepteur de la transferrine donnent des valeurs qui s'échelonnent de 18.000 à 450.000 (Aisen et Listowsky, 1980). Une si large échelle de valeurs peut s'expliquer par le fait que les propriétés du récepteur et celles de son complexe avec la transferrine dépendent énormément de la nature des détergents dans lesquels ils sont solubilisés (Nuñez et al., 1981). De plus, la protéolyse et la formation d'agrégats non spécifiques sont toujours envisageables.

Cependant, Sutherland et al., 1981 ont utilisé un anticorps monoclonal OKT9 qui réagit spécifiquement avec le récepteur de la transferrine des cellules humaines. Cet anticorps a permis d'isoler et de caractériser le récepteur (Schneider et al., 1982) : il s'agit d'une glycoprotéine (M M 180.000) constituée de deux sous-unités (M M 90.000) et dont le p H i est voisin de 5,2. Elle renferme des glycanes de type oligomannosidique et de type N- acétyllactosaminique. Ces glycanes ne semblent pas avoir de rôle dans l'interaction avec les anticorps monoclonaux.

Le récepteur semble être transmembranaire et phosphorylé . La majeure partie (40 %) de la molécule, qui porte les sites de la transferrine ainsi que ceux de l'anticorps OKT9, est exposée dans le milieu extracellulaire. Deux molécules de transferrine sont fixées par récepteur. Omary et al., 1981 ont montré qu'un acide gras, l'acide palmitohydroxamique était fixé covalamment au récepteur. En 1983, Schneider et al., ont réussi à synthétiser ce récepteur in vitro, à partir du RNA placentaire humain.

Néanmoins d'autres études ont été consacrées à ce sujet : Cole et al., 1983 ont montré que le récepteur de la sérotransferrine de souris sur les réticulocytes était une protéine similaire à la glycophorine. L'antisérum dirigé contre le récepteur montre une réactivité croisée avec la glycophorine de souris.

B - Interaction de la transferrine avec son récepteur

D'après Van Bockxmeer et al., 1978 l'interaction de la transferrine avec son récepteur est probablement un processus physico-chimique spécifique simple, réversible et obéissant aux lois de l'entropie. Elle ne serait en fait qu'un simple processus d'absorption-désorption (Woodworth, résultats non publiés).

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 un réticulocyte de lapin (Jandl et Katz, 1963; Baker et Morgan, 1969; Kornfeld, 1969).

Lors de l'interaction de la sérotransferrine avec son récepteur interviennent les structures mêmes de chacune des deux molécules. C'est pourquoi nous détaillons maintenant le rôle des parties protéiques et glycaniques de chacune d'elles lors de cette interaction.

1 - Rôle de la sérotransferrine dans l'interaction

Jandl et Katz, en 1963 puis Kornfeld, en 1969, ont observé que les différences d'affinité pour le réticulocyte, entre les transferrines humaines apo et saturée étaient dues à un changement de conformation de la molécule.

Baker et Morgan en 1969 n'ont pas observé les mêmes différences d'affinité en ce qui concerne les deux formes de sérotransferrine de lapin.

En 1972, Lane découvrait que les sérotransferrines humaine et de lapin saturées en fer ainsi que l'aposérotransferrine de lapin s'associaient rapidement aux réticulocytes de lapin. L'aposérotransferrine humaine par contre ne s'y liait que très peu.

Ces résultats montrent que la conformation de la sérotransferrine est importante lors de son interaction avec les réticulocytes. Un changement de conformation provoqué par la fixation du fer pourrait être responsable de la reconnaissance spécifique de la glycoprotéine par le récepteur cellulaire. Deux parties de la molécule sont susceptibles d'être impliquées dans le changement conformationnel : la partie protéique et la partie glycanique.

a - Rôle de la partie protéique de la transferrine

Kornfeld, en 1968, en modifiant les groupes aminés libres de la sérotransferrine humaine par des réactifs spécifiques, montre que les traitements employés altèrent dans tous les cas la propriété de fixation aux

réticulocytes de la glycoprotéine. Par contre, celle-ci conserve pratiquement inchangées ses propriétés de fixation du fer.

b - Rôle de la partie glycanique de la transferrine

Bezkorovainy, en 1966, montrait que la conformation de la sérotransferrine humaine est inchangée après élimination de l'acide sialique. De plus, la glycoprotéine désialylée est toujours capable de fixer le fer et de le transférer (Morgan et al., 1967; Kornfeld, 1968).

Kornfeld en 1968 montrait également que le transfert du fer n'était pas modifié lorsque la sérotransferrine humaine était déglycosylée à 40 à 50 %. Il concluait que les glycannes de la sérotransferrine ne jouent pas un rôle primordial dans l'interaction glycoprotéine-cellule.

Récemment, Léger et al., (résultats non publiés) ont montré que la déglycosylation totale de la sérotransferrine de lapin ne modifiait en rien les propriétés de fixation et de transfert du fer de la sérotransferrine sur le réticulocyte de lapin.

2 - Rôle du récepteur dans l'interaction

Leibman et Aisen en 1977 ont montré que le récepteur réticulocytaire était de nature glycoprotéinique. Sly et al., en 1978 confirmaient ces résultats et identifiaient des résidus d'hérose, de N-acétylhexosamine, de fucose et d'acide sialique portés par ce récepteur.

a - Rôle de la partie protéique du récepteur

Les études de Jandl et al., en 1959 avaient montré que le transfert du fer était impossible après digestion trypsique de la membrane des réticulocytes. Hemmaplardh et Morgan, en 1976 ont repris ces travaux et

observé que le traitement des cellules par la trypsine et la pronase altère les propriétés du récepteur qui ne peut plus reconnaître la sérotransferrine. Cependant, l'exposition des réticulocytes aux agents bloquant les groupements thiols, empêche la fixation de la sérotransferrine et l'incorporation du fer dans les cellules (Edwards et Fielding, 1971). Le relargage de la transferrine déjà liée aux récepteurs est aussi inhibé. (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.

b - Rôle de la partie glycanique du récepteur

Loh et Morgan, en 1975 ont étudié 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. L'incorporation du métal est fortement inhibé mais pas la fixation de la transferrine sur les réticulocytes est toujours possible. La lectine se fixerait sur les glycanes membranaires ainsi que sur ceux des récepteurs, 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. Le traitement de la membrane des réticulocytes par une neuraminidase n'empêche pas la fixation de la transferrine ni le transfert du métal (Hemmaplardh et Morgan, 1976). Ce traitement provoque seulement une diminution de 27 % de l'incorporation du fer dans les cellules.

D'après Steiner, 1980, la partie glycanique jouerait le rôle de signal de reconnaissance pour la transferrine.

3 - Rôle de la membrane réticulocytaire dans l'interaction

L'intégrité de la membrane du réticulocyte semble essentielle pour le maintien des propriétés du récepteur. Morgan et Baker en 1974 ont montré que des morceaux de membrane ne présentaient plus de spécificité vis-à-vis de la sérotransferrine. Hemmaplardh et al., la même année démontrent que l'altération des microtubules ainsi que d'autres composants structuraux de la membrane réticulocytaire inhibe la fixation de la transferrine et le transfert du fer. En 1977, Hemmaplardh et al., montrent que la composition en phospholipides de la membrane influence 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.

La membrane des cellules nécessite, en outre, la présence des ions Ca^{++} pour la fixation de la transferrine aux récepteurs (Hemmaplardh et Morgan 1977 b). En effet, Loh en 1982 observe que des agents chélateurs comme l'EDTA ou l'EGTA inhibe la fixation du fer dans la fraction cytosolique. Il en est de même pour d'autres facteurs comme les enzymes protéolytiques, la neuraminidase, la concanavaline A et la primaquine. Le mode d'action de ces composés se situe au niveau de la membrane cellulaire résultant de la perte du récepteur ou d'une réduction de la capacité de la protéine pour interagir avec le récepteur.

C - Transport du fer

Deux hypothèses ont été émises concernant le transport du fer de la transferrine à l'intérieur du réticulocyte.

1 - Hypothèse de Fielding et Speyer

En 1974, Fielding et Speyer émettent l'hypothèse que la trans-

ferrine ne pénètre pas dans le réticulocyte et relargue son fer au niveau de la membrane plasmique. Nuñez et Glass, en 1983, confirment encore cette hypothèse. En 60 secondes, le fer serait transféré de la transferrine aux cellules, avec une demi-période de 43 secondes.

2 - Hypothèse de Morgan

Dès 1969, Morgan et Appleton, 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. L'internalisation de la transferrine dans les réticulocytes est un phénomène encore contesté car il pourrait n'être dû, en fait, qu'à un remodelage général et permanent de la membrane réticulocytaire, phénomène indépendant de la fixation de la transferrine et certainement non indispensable au transfert du fer de la protéine à la cellule (Zaman et al., 1980).

Cependant, Hemmaplardh et Morgan, en 1977 _a, montrent que le phénomène d'internalisation de la transferrine est probablement un processus d'endocytose.

D'après Iacopetta et Morgan, 1983, l'endocytose de la transferrine de lapin s'effectue à la même vitesse que l'exocytose de l'apotransferrine -A 37° C, le taux maximum d'endocytose de la transferrine par les réticulocytes est approximativement de 500 molécules par cellule et par seconde. Quand l'équilibre entre l'endocytose et l'exocytose est atteint environ 90 % de la transferrine totale fixée à la cellule est interne. Les réticulocytes accumulent les atomes de fer de la transferrine diférique à un taux deux fois supérieur à celui de l'internalisation des molécules de transferrine. Ceci implique que le fer entre dans la cellule alors qu'il est encore lié à la transferrine.

Les études de Iacopetta et Morgan, 1983, semblent prouver que la transferrine saturée pénètre dans la cellule par endocytose du récepteur et que le fer est libéré à l'intérieur même de la cellule.

3 - Conclusion

Veldman et al., en 1983, ont trouvé un compromis entre les deux hypothèses et prétendent, qu'en fait, les deux mécanismes coexistent :

- 1-Le fer est libéré au niveau des sites récepteurs
- 2-La transferrine est endocytée avec son récepteur et relâche le fer dans des vacuoles acides.

L'hypothèse de l'équipe de Morgan et celle de Fielding et Speyer se vérifient encore toutes les deux à l'heure actuelle, les dernières études de Veldman offrent donc un compromis satisfaisant mais qui n'éclaire pas totalement le mécanisme réel du transport du fer. Le tableau V p 59 récapitule les différents temps de séjour de la molécule de transferrine dans le réticulocyte.

D - Relargage du fer et expulsion de la transferrine

1 - Relargage du fer

Le relargage du fer est probablement affecté par la protonation d'un ou plusieurs ligands des sites de fixation du métal. De même, la réduction du fer en Fe^{++} est indispensable à sa libération de la transferrine (Kojima et Bates, 1979).

Le site cellulaire de relargage du fer par la transferrine n'est pas connu avec certitude. Si la voie d'endocytose classique est empruntée par la transferrine, le fer sera libéré au niveau des lysosomes. Une autre hypothèse suggère que la transferrine donne directement son fer aux mitochondries où il est incorporé dans l'hème (Isobe et al., 1981).

TABLEAU V

Temps moyens de séjour de la transferrine dans différentes cellules

Système étudié	Transferrine/cellule	(Atomes de fer/cellule/minute) $\times 10^{-4}$	Temps moyen de séjour en minute	Références
Sérotransferrine humaine- -réticulocytes humains	80.000	2	8.0	Jandl et Katz, 1963
Sérotransferrine de lapin- -réticulocytes de lapin	124.000	9	2.8	Aisen et Leibman, 1973
Sérotransferrine de lapin- -Cellules érythroïdiennes immatures de souris	880.000	6.8	16	Nunez <u>et al.</u> , 1977
Sérotransferrine de souris- -cellules de Friend	160.000	14	2.2	Glass <u>et al.</u> , 1978
Sérotransferrine de lapin- -réticulocytes de lapin	110- 290.000	50-120	0.3- 0.5	Van Bockxmeer et Morgan, 1979
Sérotransferrine de lapin- -réticulocytes de lapin			3	Iacopetta et Morgan, 1983
Sérotransferrine de lapin- -réticulocytes de lapin			4	Núñez et Glass, 1983



Loh, 1982, a observé que l'action inhibitrice d'inhibiteurs métaboliques sur l'incorporation du fer dans les réticulocytes est accompagnée d'une accumulation de la transferrine et du fer dans le stroma, suggérant que le blocage de la libération du fer a lieu dans les mitochondries.

Egyed en 1977 a montré que le départ du fer de la sérotransferrine est un processus qui nécessite l'interaction entre la membrane et l'ATP.

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, 1974).

2 - Relargage de la transferrine

Quelques études ont été consacrées au mécanisme relatif au retour de la transferrine, dépourvue du fer qu'elle transportait, dans le milieu extracellulaire.

Jandl et Katz, en 1963, ont suggéré que les récepteurs réticulocytaires avaient une plus grande affinité pour la transferrine saturée que pour l'apoprotéine. Si tel est le cas, la libération de la transferrine de son récepteur pourrait être un simple processus de désorption situé au niveau de la surface de la cellule (Woodworth, résultats non publiés).

Les études concernant l'expulsion de la transferrine hors de la cellule sont actuellement en cours. Il semble clair, cependant, que quelque soient les mécanismes moléculaires sous-jacents, la molécule de transferrine et son récepteur restent tous deux intacts après que l'un et l'autre aient interagi.

E - Conclusion

Les études concernant l'interaction de la sérotransferrine avec le réticulocyte sont loin d'être complètes. De nombreux mécanismes restent encore obscurs. Il semble cependant que la conformation de la transferrine soit un facteur important dans la reconnaissance protéine-cellule et que l'intégrité de la membrane et la conformation du récepteur aient aussi leur importance.

Il reste donc à préciser la nature exacte du récepteur et le problème de l'internalisation ou non de la transferrine.

II - INTERACTIONS DE LA TRANSFERRINE AVEC LES HEPATOCYTES

Les interactions de la sérotransferrine humaine avec les hépatocytes sont de deux types : d'une part, l'interaction de la glycoprotéine sialylée, d'autre part, l'interaction de l'asialoglycoprotéine avec le foie. Dans ce dernier cas interviennent les récepteurs d'Ashwell qui reconnaissent spécifiquement les structures glycaniques possédant un galactose terminal (Morell et al., 1968).

Nous aborderons dans un premier temps, le cas de la transferrine désialylée auquel sont liés les travaux de l'équipe de Regoezi puis celui de la transferrine sialylée.

A - Interaction de l'asialosérotransferrine avec les hépatocytes

L'interaction de l'asialosérotransferrine avec les hépatocytes se situe au niveau de récepteurs découverts par Ashwell et son équipe (Morell et al., 1968).

1 - Le récepteur d'Ashwell

En 1968, Morell et al., découvraient que l'injection d'asialocé-

ruléoplasmine chez un lapin donnait lieu à une rapide élimination de la protéine de la circulation alors que la même céruléoplasmine sialylée y survivait plusieurs jours.

Cette découverte permit de mettre en évidence un récepteur unique impliqué dans la fixation, l'internalisation et la dégradation des glycoprotéines sériques possédant des groupements glycaniques à galatose terminal. Pour de plus amples renseignements concernant l'origine et le développement du catabolisme des asialoglycoprotéines, nous renvoyons aux nombreuses revues générales consacrées à ce sujet (Ashwell et Morell, 1974; Ashwell et Morell, 1978; Neufeld et Ashwell, 1980; Ashwell et Harford 1982; Harford et Ashwell, 1982; Mac Farlane, 1983).

Bien que la perte de l'acide sialique entraîne généralement une rapide élimination des protéines plasmatiques de la circulation, le catabolisme de chaque glycoprotéine varie en fonction de leur affinité pour le récepteur hépatique (Morell et al., 1971).

Ceci est particulièrement frappant dans le cas de l'asialo-transferrine qui était supposée, à l'origine, échapper à ce catabolisme. En effet, après injection chez le rat, toutes les glycoprotéines désialylées, à l'exception de l'asialotransferrine, sont rapidement captées du sang et catabolisées dans le foie, ceci dans des temps très courts allant de 5 à 90 minutes (Morell et al., 1971) (Fig. 18 p 63).

En fait, Regoeczi et al., 1974 ont démontré que, sur une plus longue période d'observation de 12 heures, l'asialotransferrine est clairement éliminée de la circulation, plus rapidement que la protéine intacte.

Le récepteur d'Ashwell est une glycoprotéine qui renferme 10% de sucres (Kawasaki et Ashwell, 1976). Il a été isolé et caractérisé par

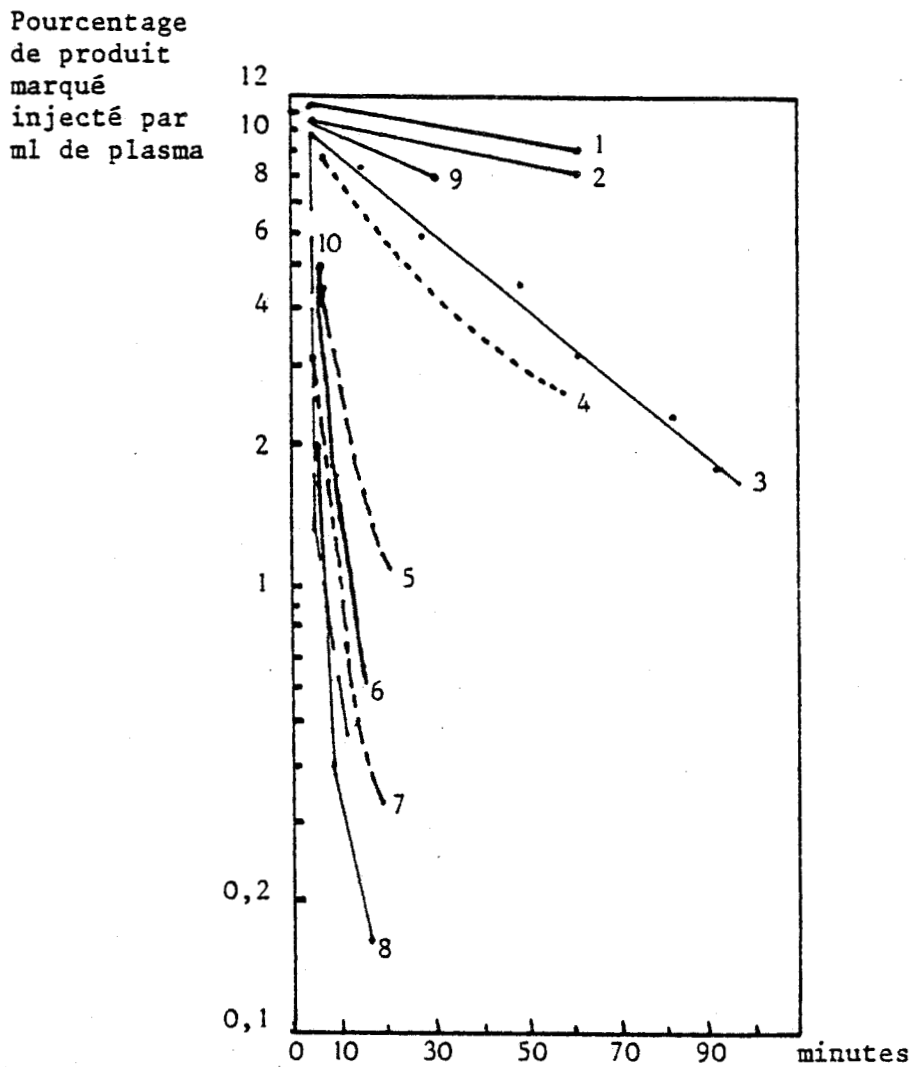


Fig 18. Temps de survie dans le plasma ,chez le rat ,de glycoprotéines désialylées et tritiées .(Morell et al., 1971)



1 : Asialotransferrine ; 2 : Céruléoplasmine ; 3 : Asialothyroglobuline ; 4 : Asialo α_2 -macroglobuline ; 5 : Asialohaptoglobuline ; 6 : Asialocéruléoplasmine ; 7 : Asialofétuine ; 8 : Asialoorosomucoïde ; 9 : Gonadotrophine chorionique humaine (^{125}I -HCG) ; 10 : Asialo-HCG.

Baenziger et Maynard en 1980. il est constitué d'une seule unité de masse moléculaire 41.000. Il est localisé sur la membrane sinusoidale des hépatocytes (Evans, 1980 et 1981).

2 - Interaction asialotransferrine-récepteur d'Ashwell

a - Introduction

Les récepteurs de l'asialotransferrine sur les hépatocytes sont au nombre de 110.000 par hépatocyte (Young et al., 1983). L'interaction de l'asialotransferrine avec le foie de rat peut être décrite par deux réactions chimiques consécutives dont la première est réversible :



avec P = asialotransferrine, P' = asialotransferrine endocytée et R = récepteur hépatique.

b - Rôle des glycanes de l'asialotransferrine dans l'interaction

La partie glycanique de la glycoprotéine joue un rôle dans la reconnaissance du récepteur- Hatton et al., en 1979 ont isolé les glycopeptides de la transferrine et montré que le glycopeptide biantenné interagissait peu avec la lectine hépatique de lapin immobilisée. Au contraire, le glycopeptide triantenné pouvait être différencié en deux classes : l'une retenue par la lectine, l'autre retardée.

Regoeczi et al., 1979 ont caractérisé trois types d'asialotransferrine préparés par chromatographie d'échange d'ions, désialylation puis chromatographie d'affinité sur une colonne de lectine hépatique de lapin immobilisée :

- le type 1 contient deux glycanes biantennés
- les types 2 et 3 contiennent un glycanne biantenné et un glycanne triantenné.

Ces trois types d'asialotransferrine réagissent différemment avec différentes lectines. Le tableau VI p 66 donne un aperçu de leurs interactions avec la lectine hépatique de lapin et la concanavaline A.

In situ, les trois types d'asialotransferrine ont des affinités différentes pour la lectine hépatique de rat. Debanne et al., 1981 ont étudié l'interaction des trois asialotransferrines avec des récepteurs de membrane purifiées de foie de rat. La fig. 19 p 67 représente leur fixation sur les récepteurs hépatiques d'Ashwell : il faut 10 fois plus de transferrine type 2 que de 3 et 100 fois plus de transferrine de type 1 que de 3 pour avoir la même quantité de protéine fixée sur les membranes. Les constantes d'association des trois types de transferrine sont données dans le tableau VII p 66 .

La différence d'affinité entre les transferrines type 2 et type 3, qui possèdent en fait les mêmes types de glycanes, pourrait être due à un arrangement spatial différent des trois galactose terminaux, à une variation dans le site de fixation de la partie N-acétyllactosaminique supplémentaire (Regoeczi et al., 1979).

3 - Endocytose de l'asialotransferrine

Regoeczi et al., 1978 ont étudié la capacité du foie de rat à fixer et endocyter l'asialotransferrine humaine. La fixation de l'asialotransferrine au récepteur spécifique de la membrane plasmique des hépatocytes n'est pas suivie d'un signal d'endocytose. La fixation et l'endocytose sont deux phénomènes distincts.

La fixation de l'asialotransferrine entraîne un changement de l'état physique du récepteur (Klausner et al., 1980) puis, lors de l'endocytose, est mis en jeu un système de coopération positive qui dépendrait

TABLEAU VI

Interaction des trois types d'asialotransferrine
avec différentes lectines (Regoczi et al., 1979)

	Lectine hépatique de lapin	Concanavaline A
Transferrine type 1	-	+
Transferrine type 2	-	-
Transferrine type 3	+	-

+ : retenu par la lectine ; - : nonretenu par la lectine

TABLEAU VII

Constantes d'association des trois types d'asialotransferrine
déterminées lors de leur interaction avec les récepteurs d'Ashwell de
membrane purifiées de foie de rat (Debanne et al., 1981)

	Constante d'association 22° C	Constante d'association 4° C
Transferrine type 1	$1.5 \times 10^6 \text{ mole}^{-1}$	$1.3 \times 10^6 \text{ mole}^{-1}$
Transferrine type 2	$1.4 \times 10^7 \text{ mole}^{-1}$	$8.2 \times 10^6 \text{ mole}^{-1}$
Transferrine type 3	$1.1 \times 10^8 \text{ mole}^{-1}$	$4.8 \times 10^7 \text{ mole}^{-1}$



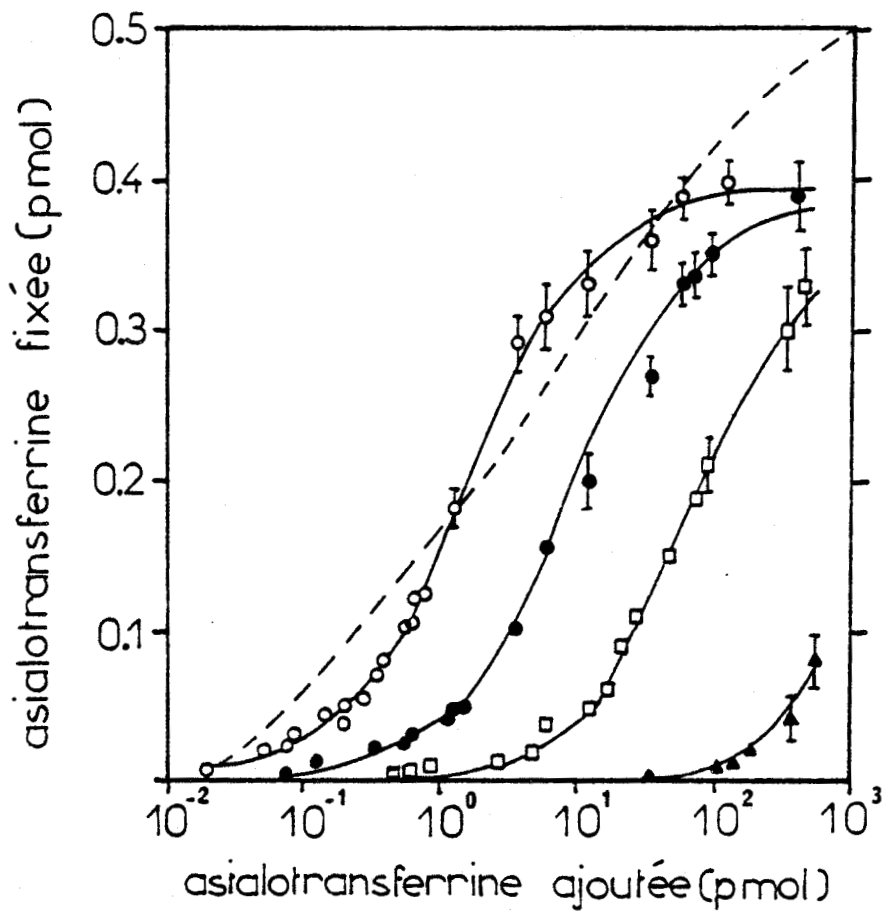


Fig. 19. Fixation des trois types d'asialotransferrine humaine et de l'asialotransferrine de lapin sur des membranes de foie de rat (Debanne et al., 1981)

(---: asialofétuine; ○—○ type 3; ●—● type 2; □—□ type 1; ▲—▲ asialotransferrine de lapin).



de la quantité de glycoprotéine endocytée (Debanne et al., 1981).

Il existe trois voies possibles pour la transferrine désialylée, une fois qu'elle est endocytée au niveau du foie (Mac Farlane, 1983) :

- 1 - Elle est endocytée avec son récepteur pour être catabolisée
- 2 - Elle est diacytosée
- 3 - Elle est transférée en petite quantité mais intacte dans les canaux biliaires.

Nous ne détaillerons pas la dernière voie dans laquelle l'hépatocyte n'est pas impliqué.

a * Catabolisme

L'asialotransferrine suit la voie classique lysosomiale des autres glycoprotéines désialylées en vue d'être catabolisée (Harford et Ashwell, 1982). Il est possible que l'internalisation des endosomes, vésicules d'endocytose, de la transferrine et de son récepteur, au niveau des lysosomes nécessite un signal intracellulaire (Tolleshaug et al., 1981). Mac Farlane, 1983 a proposé un modèle schématisant le catabolisme des asialoglycoprotéines. (Fig. 20 p 69).

D'après Regoeczi et al., 1978 _b, le récepteur de la transferrine désialylée est ensuite réutilisé.

b - Diacytose

Tolleshaug et al., 1981 ont étudié le comportement de l'asialotransferrine de type 3 après son endocytose. Ils ont observé que cette glycoprotéine pouvait suivre un chemin appelé diacytose différent de la voie lysosomiale. L'asialotransferrine de type 3 est associée avec des

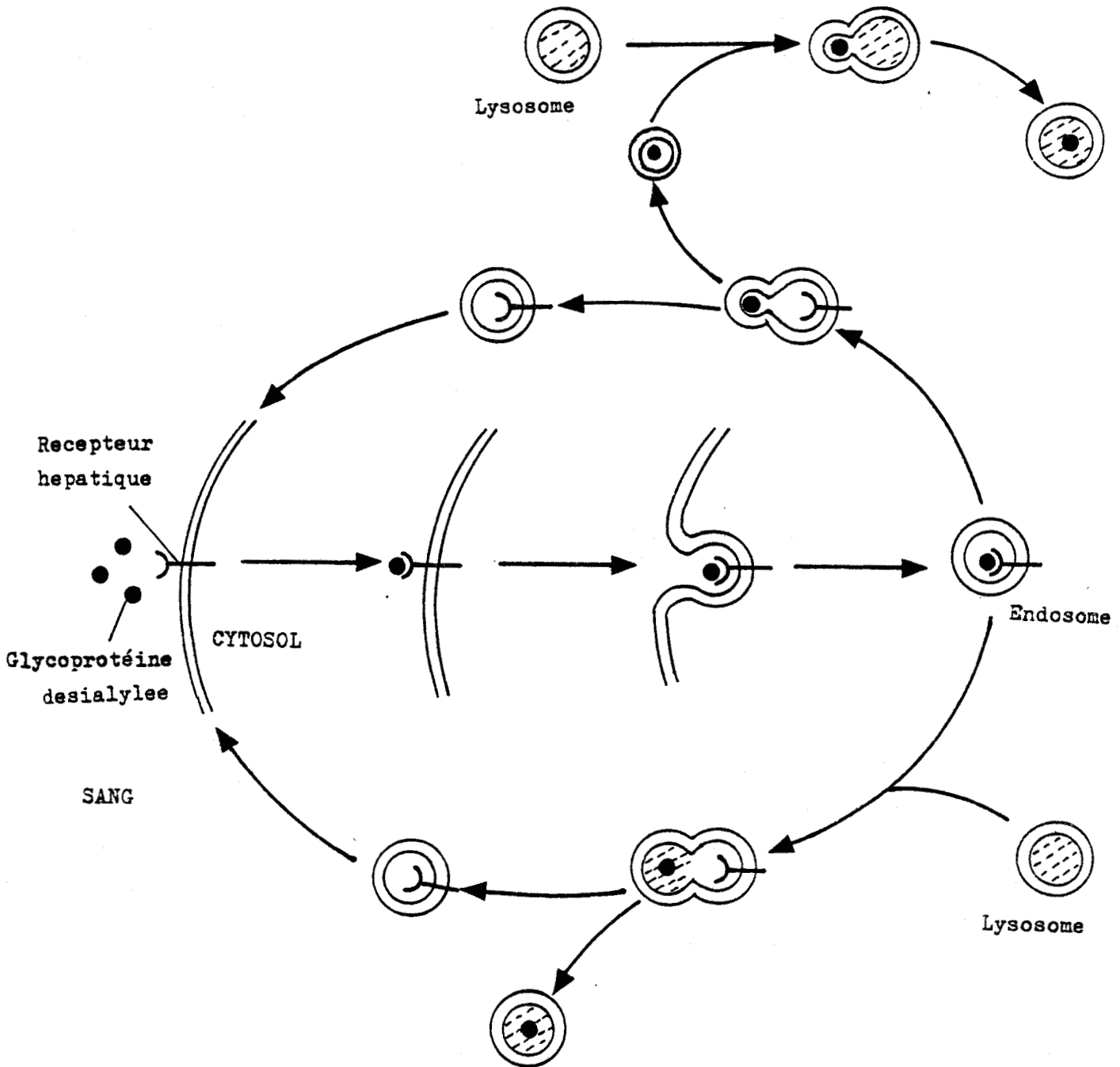


Fig. 20, Catabolisme des glycoprotéines désialylées d'après Mac Farlane, 1983.



endosomes différents de ceux destinés au catabolisme (Debanne et Regoeczi, 1981) . Le demi-vie de la diacytose est de 20 minutes (Tolleshaug et al., 1981). Elle ne fait l'objet d'aucune attaque protéolytique ou de séjour dans les lysosomes (Schneider et al., 1981). Les diacytosomes ne proviennent ni du Golgi, ni des lysosomes ou de la membrane plasmique (Debanne et al., 1982).

Les sites de fixation de l'asialotransferrine sont situés sur la surface cytoplasmique des diacytosomes. La glycoprotéine est ensuite réintégré dans la circulation sanguine.

Regoeczi et al., 1982 ont constaté que lors de son retour dans la circulation l'asialotransferrine de type 3 injectée à faible dose était partiellement resialylée. Leurs calculs ont déterminé qu'une molécule de transferrine sur quatre était resialylée. La resialylation semble être une conséquence de la diacytose.

4 - Conclusion

L'asialotransferrine suit deux voies essentielles après son internalisation dans les hépatocytes. Elle est soit catabolisée dans les lysosomes, soit diacytosée et recyclée dans la circulation sanguine avec resialylation partielle. Le foie semble jouer deux rôles : dans le catabolisme de la transferrine désialylée et dans la réparation de la molécule, en la resialylant, en vue d'un retour dans le sang.

B - Interaction de la sérotransferrine sialylée avec les hépatocytes

Le fer est transféré du sang au foie par l'intermédiaire de la sérotransferrine, dans le but d'être stocké au niveau de la ferritine.

C'est au niveau du foie que se trouvent les principales réserves de fer de l'organisme.

D'après Finch et al., 1975 la sérotransferrine ne livre son fer qu'aux cellules parenchymateuses du foie.

1 - Mise en évidence d'un récepteur

Gardiner et Morgan, en 1974, ont mis en évidence une fixation spécifique de la transferrine aux hépatocytes. L'existence d'un récepteur a été démontrée par Van Bockxmeer et al., en 1975 puis par Gröhlich et al., en 1979. 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.

Young et Aisen, 1980 et 1981, ont établi que le nombre de molécules de transferrine fixées par l'hépatocyte était de 37.000. Morley et al., 1983 ont déterminé qu'il y avait 31.000 ± 17.000 molécules de récepteur spécifique par hépatocyte de rat, avec une constante de dissociation de 0.3×10^{-7} mol/l.

2 - Internalisation ou non de la transferrine ?

Comme dans le cas des réticulocytes, il semble que le problème de l'internalisation ou non de la transferrine dans les hépatocytes ne soit pas résolu.

Milson et Batey, 1979, montrent que seule la transferrine dénaturée est pinocytée. Plus récemment, les études de Morley et al., 1983 suggèrent que la transferrine n'est pas internalisée pour le transfert du fer.

Cependant, pour Munro et Linder, 1978, l'absorption du fer implique la pénétration de la transferrine dans les cellules. Gröhlich et al., 1979 confirment cette hypothèse.

Octave et al., en 1983_a ont proposé un schéma d'internalisation de la transferrine dans les hépatocytes et les fibroblastes. La transferrine se fixerait à son récepteur spécifique membranaire et le complexe formé serait internalisé. Le relargage du fer aurait lieu dans un compartiment cellulaire acide, puis la transferrine apo retournerait à la surface de la cellule et serait relâchée dans le milieu extracellulaire. (Fig. 21 p 73).

Les études de ces auteurs, 1983_b, précisent en outre que le fer ne serait pas relâché dans les lysosomes mais au niveau de vésicules d'endocytose acides appelées endosomes ou réceptosomes et dont le p H interne serait voisin de 5.

3 - Comparaison entre les interactions de la sérotransferrine avec les hépatocytes et les réticulocytes

Il existe des similitudes entre la fixation de la transferrine aux hépatocytes et la fixation aux réticulocytes.

La constante apparente d'équilibre déterminée pour l'association de la transferrine aux hépatocytes est de $1.6 \times 10^7 \text{ l.mol}^{-1}$ (Aisen 1983). La valeur correspondante pour les réticulocytes est de $1.10^7 \text{ l.mol}^{-1}$ (Van Bockxmeer et al., 1978). En outre, les temps moyens d'interaction de la transferrine avec les hépatocytes sont voisins de ceux déterminés pour les réticulocytes (Aisen, 1983).

La fixation du fer par les cellules du foie est, comme pour les réticulocytes, dépendante de la température, linéaire avec le temps et elle s'accélère avec l'augmentation de la concentration de la transferrine (Young et Aisen, 1980).



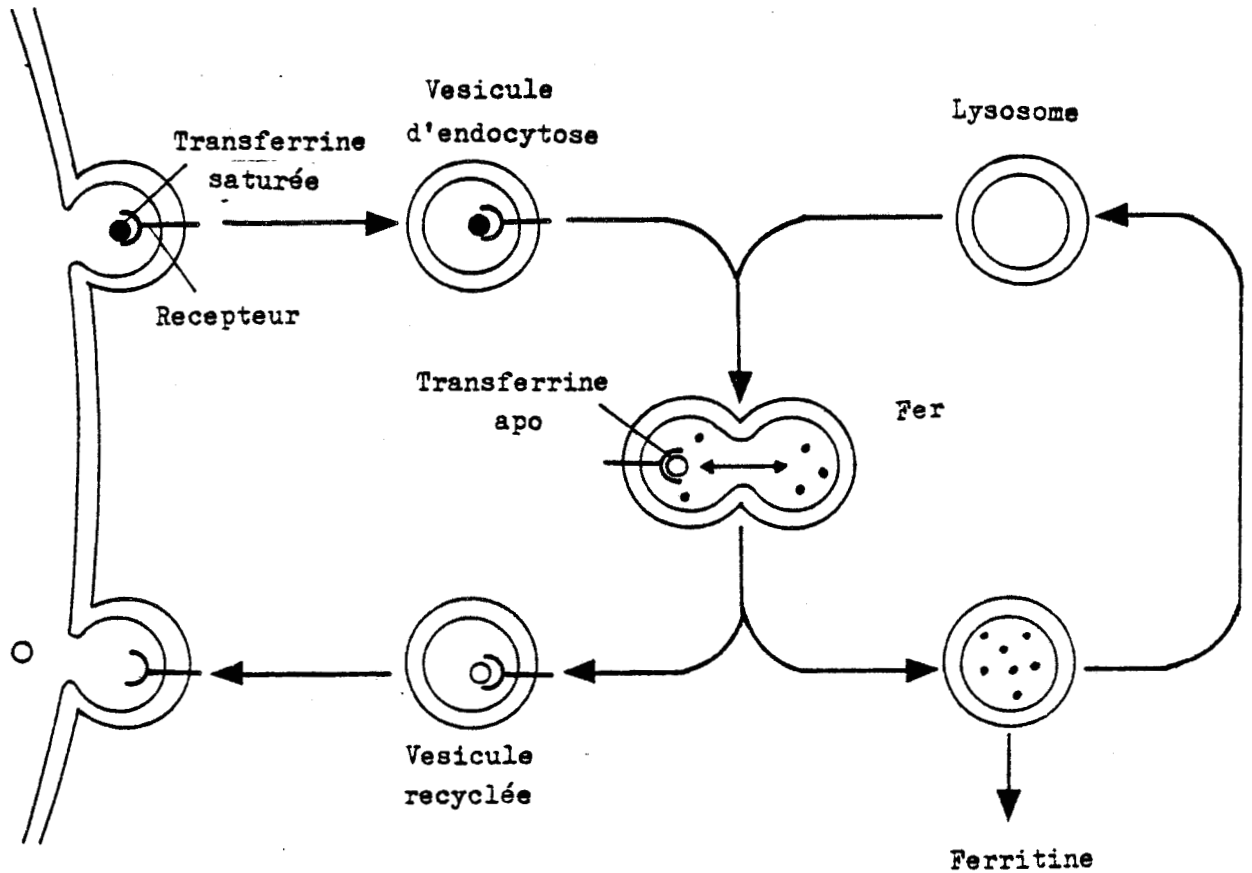


Fig. 21. Schéma d'internalisation de la transferrine dans les hépatocytes en culture d'après Octave et al., 1983 a.

Cependant, aucune preuve n'a été apportée quant à l'identité éventuelle des deux récepteurs. De plus l'hépatocyte diffère du réticulocyte sur un point essentiel : il sert aussi bien de donneur de fer que d'accepteur.

4 - Existe-t-il un récepteur spécifique de l'apotransferrine ?

Young et Aisen, 1980 ont démontré que l'apotransferrine inhibe le transfert du fer de la transferrine diferrique aux hépatocytes. Un récepteur spécifique de l'apotransferrine serait-il impliqué dans l'interaction apotransferrine-hépatocyte ?

Young et Aisen, 1981 ont examiné la fixation de l'apotransferrine aux hépatocytes dans un milieu totalement dépourvu de fer. Leurs conclusions sont les suivantes :

- la transferrine saturée se fixe aux hépatocytes 35 fois plus fortement que l'apotransferrine.
- des concentrations faibles de transferrine diferrique suffisent à abolir la fixation de l'apoprotéine.
- aucun récepteur spécifique préférant la forme sans fer à la forme saturée de la transferrine n'a pu être mis en évidence.

Ces résultats, en accord avec ceux de Baker et al., 1980 et ceux de Morgan, 1980, semblent indiquer qu'il n'existe pas de récepteur spécifique de l'apotransferrine sur les hépatocytes.

5 - Conclusion

Les hépatocytes, comme les réticulocytes, contiennent des récepteurs spécifiques de la transferrine. Cependant, les récepteurs des

hépatocytes, même s'ils ont des points communs avec ceux des réticulocytes servent de donneur et d'accepteur de fer : en effet dans les réticulocytes le fer est nécessaire à la synthèse de l'hème et ne ressort pas de la cellule, tandis que pour les hépatocytes le fer est destiné au stockage au niveau de la ferritine mais doit rester disponible pour tout besoin de l'organisme.

Le problème de l'internalisation de la transferrine est toujours soulevé bien que de nombreux arguments soient en faveur d'un tel processus. Aucun récepteur de l'apotransferrine n'a pu être mis en évidence.

III - AUTRES INTERACTIONS DE LA TRANSFERRINE AVEC LES CELLULES



Des récepteurs de la transferrine situés sur d'autres cellules, provenant de différents organes, ont été mis en évidence. S'ils n'ont pas tous été isolés et caractérisés, les preuves de leur existence ont cependant été apportées.

Le tableau VIII p 76 récapitule les différentes cellules sur lesquelles le récepteur de la transferrine a pu être mis en évidence. Nous ne détaillerons pas les mécanismes qui entrent en jeu lors de l'interaction de la transferrine avec ces cellules. Il faut préciser cependant que les cultures de cellules fournissent des modèles intéressants sur lesquels le travail est parfois plus facile que sur l'animal entier.

IV - CONCLUSION

Les mécanismes mis en jeu lors des interactions de la transferrine avec les cellules ne sont pas simples.

TABLEAU VIII

Mise en évidence de récepteurs de la sérotransferrine
sur différentes cellules.

Cellules	Références
Cellules du placenta	Galbraith <u>et al.</u> , 1980 a, c Loh <u>et al.</u> , 1980.
Cellules de la moëlle osseuse	Kailis et Morgan, 1974 Ragoeczi <u>et al.</u> , 1980
Lymphocytes activés	Philips, 1976 Galbraith <u>et al.</u> , 1980 d, e
Cellules leucémiques érythrocytaires de Friend	Hu <u>et al.</u> , 1977
Cellules rénales de rat	Fernandez- Pol et Klos, 1980
Cellules cancéreuses du poumon	Faulk <u>et al.</u> , 1980
Fibroblastes d'embryon de rat	Octave <u>et al.</u> , 1981
Fibroblastes humains	Ward <u>et al.</u> , 1982
Autres lignées cellulaires humaines	Hamilton <u>et al.</u> , 1979 Larrick et Cresswell, 1979 Galbraith <u>et al.</u> , 1980 b Salomon, 1980
Lignée cellulaire K562	Testa <u>et al.</u> , 1982

Dans le cas des réticulocytes, si le récepteur de la transferrine a pu être synthétisé in vitro (Schneider et al., 1983) il existe toujours deux hypothèses concernant le transport du fer. Même à l'heure actuelle, Nuñez et Glass, 1983, soutiennent le fait que la transferrine ne pénètre pas dans le réticulocyte tandis que Iacopetta et Morgan, 1983, défendent l'hypothèse de l'internalisation de la transferrine.

Ce problème se pose également dans le cas de l'interaction de la transferrine sialylée avec les hépatocytes.

L'interaction de l'asialotransferrine avec les hépatocytes, au niveau des récepteurs d'Ashwell est un phénomène intéressant. En effet, la partie glycanique de la glycoprotéine joue un rôle important dans la reconnaissance de la transferrine par le récepteur. Celui-ci possède plus d'affinité pour les structures glycaniques triantennées que pour les structures biantennées.

La diacytose est, de plus, un mécanisme caractéristique du foie qui vient s'ajouter à celui déjà bien connu du catabolisme des asialoglycoprotéines. Lors de la diacytose intervient une resialylation partielle de l'asialotransferrine (Regoeczi et al., 1982) qui retourne alors dans la circulation sanguine.

TRAVAUX PERSONNELS

- MATERIEL ET METHODES
- RESULTATS

MATERIEL ET METHODES

I - PREPARATION DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE

A - Préparation de la sérotransferrine humaine

1 - Précipitation au rivanol

La sérotransferrine humaine est préparée à partir de la fraction IV de Cohn * qui est précipitée au rivanol selon la technique de Reop et Putnam, 1967. Le surnageant dialysé est précipité à 55% puis à 70% de saturation en sulfate d'ammonium. Le dernier précipité obtenu est dialysé, lyophilisé puis chromatographié sur colonne de Q A E-Séphadex.

2 - Chromatographie sur colonne de Q A E - Séphadex

La colonne de Q A E - Séphadex est stabilisée dans un tampon Tris / HCl 0,01 M p H 8 renfermant du NaCl 0,1 M. Le précipité au sulfate d'ammonium à 70% est dissous dans le tampon Tris / HCl 0,01 M. La colonne est éluée par le tampon de départ puis par des tampons Tris / HCl 0,01 M p H 8 renfermant des concentrations croissantes en NaCl (0,2 et 1 M). Les fractions obtenues par le passage de ces trois tampons sont dialysées, lyophilisées et analysées par électrophorèse et immunoelectrophorèse.

* La fraction IV de Cohn nous a été aimablement fournie par le Professeur Goudmand, du Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille, que nous remercions.

B - Préparation des variants glycaniques de la
sérot transferrine humaine.

1 - Chromatographie d'affinité sur colonne de
concanavaline A- Sépharose

La colonne de concanavaline A - Sépharose 4 B (10 mg de concanavaline A / ml de gel ; Pharmacia) est équilibrée dans le tampon A : acétate de Na 5 m M; $MnCl_2$ 1mM; $MgCl_2$ 1mM; $CaCl_2$ 1mM p H 6,9 (Wong et al.,1978). La transferrine est dissoute dans le même tampon. L'élu tion des variants est effectuée par le passage d'un tampon B : tampon A contenant NaCl 0,1M, puis d'un tampon C : tampon B contenant de l' α - D- méthylglucoside 15 mM. Les fractions récupérées sont concentrées sur membrane immersible CX-10 (Milli-pore), dessalées sur colonne de Biogel P₆ puis réinjectées séparément sur la même colonne. Les fractions recyclées sont à nouveau concentrées, dessalées sur Biogel P₆ puis lyophilisées.

Le repérage des fractions s'effectue au spectrophotomètre à 280nm.

2 - Chromatographie d'affinité sur colonne de
concanavaline A - Ultrogel

La colonne de concanavaline A - Ultrogel (3 à 4 mg de conca-
navaline A / ml de gel ; I B F) est équilibrée dans le tampon A. Les con-
ditions expérimentales sont les mêmes que celles décrites ci-dessus.

II - ANALYSE IMMUNOLOGIQUE DES VARIANTS DE LA SEROTRANSFERRINE

A - Préparation de l'immunsérum antisérot transferrine

L'antisérum est préparé au laboratoire par injection intra-
musculaire , à un lapin (Fauve de Bourgogne), de sérot transferrine pure

(1 à 4 mg / 2 ml) en présence d'adjuvant de Freund (5ml). Les injections sont répétées quatre fois à une semaine d'intervalle. Le sang, prélevé à la veine de l'oreille du lapin, est centrifugé puis laissé à 4° C une nuit. Le sérum obtenu, riche en anticorps antitransferrine humaine, est conservé congelé.

Le titre de l'antisérum est déterminé par dosage de Mancini (Mancini et al., 1965) et calculé selon la méthode décrite par Becker, 1969.

B - Immunodiffusion radiale

La technique utilisée a été décrite par Mancini et al., 1965. L'agarose (1%) (Sigma, type II, Médium EEO) est préparé dans un litre de tampon suivant : Véronal acide 0,8 g, Véronal sodé 4,28 g p H 8,6. Le gel ($150 \mu\text{l} / \text{cm}^2$) contenant de l'antisérum antitransferrine (1,5%) est coulé sur une plaque de verre. Les produits à analyser ($2 \mu\text{l}$ d'une solution à 1%) sont déposés dans des puits pratiqués à l'emporte-pièce dans l'agarose. Après diffusion en chambre humide pendant 48 heures, la plaque est lavée, séchée et colorée au réactif à l'Amidoschwartz.

C - Immunoélectrophorèse monodimensionnelle

La méthode a été décrite par Scheidegger en 1955. Les solutions protéiques à analyser ($2 \mu\text{l}$ de solutions à 1%) sont déposées dans des puits réalisés dans de l'agar noble (1 ml / cm de plaque standard). La migration s'effectue une heure et demie à 30 volts. L'antisérum est alors introduit dans des gouttières pratiquées dans le gel. Après diffusion 48 heures en chambre humide, la plaque est lavée, séchée et colorée au réactif à l'Amidoschwartz.

D - Immunoélectrophorèse d'affinité bidimensionnelle

La technique est réalisée selon Bøg-Hansen et al., 1978 et Nicollet et al., 1981.

1 - Première dimension

La concanavoline A (I B F) (300 g/cm²) est introduite dans le gel d'agarose (type II, médium E E O, Sigma) à 1% dans le tampon Tris / H Cl 72 m M, Véronal sodé 24 m M, Lactate de calcium 0,4 m M p H 8,6 en présence des ions MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂ 1mM. La plaque de verre (10x10cm) est recouverte de 15 ml de gel contenant la lectine. Les solutions à analyser : 3 µl de sérotransferrine pure (0,5%; p/v) ou 3 µ l de sérum humain (300 mg de transferrine / dl) sont introduites dans 8 puits pratiqués à l'emporte-pièce. L'électrophorèse s'effectue 3 heures à 10 volts / cm dans un appareil LKB 2117 multiphor muni d'une plaque réfrigérante.

2 - Deuxième dimension

L'agarose utilisé pour la seconde dimension contient l'anti-sérum antitransferrine monospécifique (1%;v/v) et de l' α - D - méthylglucoside (1%; p/v) (Salier et al., 1980). La migration est réalisée 18 heures à 2 volts /cm. Les plaques sont ensuite lavées, séchées et colorées au réactif à l'Amidoschwartz.

3 - Calcul du pourcentage apparent des pics obtenus

Le pourcentage apparent de chaque pic a été calculé par découpage et pesée de fiches cartonnées sur lesquelles chacun des pics, obtenus par la technique d'électrophorèse d'immunoaffinité, a été reproduit.

III - ETUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES DE LA SEROTRANSFERRINE

HUMAINE ET DE SES VARIANTS.

A - Préparation des glycopeptides de la sérotransferrine totale et des variants

Les glycopeptides de la sérotransferrine et des variants glycaniques sont préparés par hydrolyse pronasique des glycoprotéines d'après les procédés décrits par Spik et Montreuil, 1969 et Spik et al., 1974. Ils sont purifiés par gel filtration sur colonne de Biogel P₆.

B - Fractionnement des glycopeptides de la sérotransferrine humaine par chromatographie d'affinité

Les glycopeptides sont fractionnés sur colonne de concanavaline A - Sépharose 4 B (10 mg de concanavaline A/ ml de gel; Pharmacia) d'après le protocole décrit par Krusius et al., 1976. Ils sont dissous dans le tampon acétate de Na 5 mM; MgCl₂ 1mM; MnCl₂ 1mM; CaCl₂ mM; p H 5,2. La colonne est équilibrée dans ce même tampon (tampon A). L'élution des fractions glycopeptidiques est réalisée par le passage du tampon B : tampon A contenant NaCl 0,1M, puis par le passage du tampon C : tampon B contenant de l' α -D-méthylglucopyranoside 0,015M.

Les fractions obtenues sont repérées par dépôt sur plaque de silice et révélation à l'orcinol sulfurique (200 mg d'orcinol dans H₂SO₄ 20%) Les fractions éluées par le tampon contenant l' α - D- méthylglucoside sont repérées par chromatographie en couche mince en utilisant le solvant rapide n - butanol / éthanol / eau / acide acétique / pyridine (10 : 100 : 30 : 3: 10; v/v) (Bayard et al., 1979).

C - Etude de la structure des glycanes

1 - Détermination de la composition molaire des monosaccharides

La méthode utilisée a été décrite par Zanetta et al., 1972. A 1 mg de glycoprotéine ou 50 μ g de glycopeptides sont ajoutés 10 μ g de mésoinositol (étalon interne) à 100 μ g/ml. Après lyophilisation, le produit est desséché sous P_2O_5 à 50° C. La méthanolyse est réalisée dans un microtube hermétiquement fermé, par 1 ml de CH_3OH / HCl 0,5 N pendant 24 heures à 80° C.

S'il s'agit d'une glycoprotéine il est nécessaire de centrifuger et de délipider à l'heptane avant d'évaporer à chaud CH_3OH / HCl sous azote.

Le résidu sec est repris par 40 μ l de CH_2Cl_2 et 40 μ l d'anhydride trifluoroacétique, chauffé 5 mn à 150° C dans un bain de sable, refroidi, puis réchauffé 5 mn à 150° C. Les monosaccharides trifluoroacétylés sont analysés en chromatographie en phase gazeuse (colonne de verre (0,3 x 300 cm) remplie de silicone OV 210 à 5% sur Varaport 30 "mesh" 80-100; température programmée de 90 à 220° C à raison de 2° C/ mn; débit de gaz vecteur (azote) 10 ml/mn)

2 - Libération des oligosaccharides

La libération de la partie glycanique est réalisée par hydrazinolýse selon la méthode décrite par Bayard et Montreuil, 1974 - 10mg de glycopeptides ou de glycoprotéine sont placés deux jours sous P_2O_5 à 50° C. L'hydrazine (500 μ l) est ajoutée sous hotte. Le tube scellé est placé dans une étuve à 105 ° C pendant 20 heures. L'évaporation est réalisée sous azote.

Le sirop obtenu est rincé deux fois par quelques gouttes de toluène et séché. Le résidu est placé sous excicateur à H_2SO_4 concentré une nuit, puis repris par $500\mu l$ d'acide acétique à 5%. La solution est injectée sur colonne de Biogel P_2 équilibrée dans l'acide acétique à 1%. Les oligosaccharides sont élués après le volume mort de la colonne et le repérage est effectué par dépôt sur couche mince et révélation à l'orcinoI sulfurique.

Les fractions renfermant les glycanes sont rassemblées et évaporées sous azote. Le résidu sec est repris par $400\mu l$ d'une solution de bicarbonate saturée et $100\mu l$ d'anhydride acétique sont ajoutés en 5 fois à 20 mn d'intervalle. La solution obtenue est injectée sur une colonne de Biogel P_2 . Les fractions contenant les glycanes sont concentrées à un volume déterminé.

La fraction hydrazinolysée est chromatographiée en couche mince sur plaque de silice en présence de solutions témoins. La migration s'effectue dans le solvant de Bayard et al., 1979. Les oligosaccharides libérés par hydrazinolyse sont révélés à l'orcinoI sulfurique.

3 - Microméthylation

La méthylation ne peut être effectuée que sur des glycopeptides ou des oligosaccharides réduits.

a - Réduction

1 mg d'oligosaccharides sont mis en contact, 24 heures, avec 1 ml de solution de KBH_4 (1 mg / ml). La réaction est arrêtée par addition de résine Dowex 50 x 8 (25-50 mesh). La solution est filtrée sur laine de verre, évaporée à sec sous vide puis reprise 5 fois par

C_2H_5OH / CH_3COOH (99:1; v/v) et évaporé. Le produit repris par 1 ml d'eau est dessalé sur colonne de Biogel P₂.

b - Microméthylation

Lors de la microméthylation certaines précautions élémentaires sont à prendre :

- n'utiliser que de la vaisselle rigoureusement propre et lavée au sulfochromique chaud. Ne rincer qu'à l'eau permutée puis à l'eau milli Q. Sécher complètement à l'étuve.

- le produit à méthyler doit être sec. Il est conseillé de commencer la méthylation dès que le produit sort de lyophilisation.

- utiliser de l'eau milli Q lors des extractions.

- le bain de sonication doit être à la température de la pièce.

En cas de surchauffe du bain lors de la première sonication changer l'éthanol ou ajouter de l'éthanol froid pour la deuxième sonication.

La méthylation est réalisée selon un protocole décrit par Finne et al., 1980. Le produit à méthyler (100 μ g de glycopeptides ou d'oligosaccharides réduits) est lyophilisé dans une pipette introduite dans un tube à méthanolyse- 100 μ l de DMSO (diméthylsulfoxyde) sont ajoutés sous azote. La base de méthylation (méthyl sulfinyl-potassium carbanion), qui a été préalablement chauffée à l'étuve à 37° C, est ajoutée (100 μ l) sous azote. Le tube est bouché hermétiquement, mis à soniquer 1 heure 30 mn puis congelé - 200 μ l d'iodure de méthyle sont ajoutés avant une deuxième sonication d'une heure.

Les extractions sont réalisées par l'addition dans un premier temps de 500 μ l d'eau milli Q froide, de 1 à 2 cristaux de thiosulfate et

de 300 μ l de chloroforme. La phase chloroformique inférieure est prélevée tandis que la phase aqueuse est conservée pour deux extractions supplémentaires avec 500 μ l de chloroforme. Les phases chloroformiques sont lavées 5 fois par 1 ml d'eau milli Q. L'excès d'eau restante est absorbé par du sulfate de sodium. La solution est filtrée sur laine de verre, le filtrat est ensuite évaporé sous azote puis lyophilisé pour éliminer toute trace de DMSO. La méthanolyse du produit méthylé est réalisée par l'addition de 100 μ l de $\text{CH}_3\text{OH} / \text{HCl } 0,5 \text{ N}$, 24 heures à 80° C. Après évaporation à sec, 20 μ l de pyridine et 50 μ l d'anhydride acétique sont ajoutés. Le tube est placé à 100° C 15 mn, agité puis replacé à 100° C 30 mn. Il est enfin évaporé pour être repris par une quantité déterminée de CH_3OH .

Les glycanes méthylés et méthanolysés sont analysés en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse d'après la technique de Fournet et al., 1981.

4 - Résonance Magnétique Nucléaire

L'analyse en RMN H500 MHz des glycopeptides a été réalisée dans le laboratoire du Professeur Vliegthart à Utrecht. La résonance magnétique nucléaire du proton est réalisée sur les glycopeptides préalablement traités par l'eau lourde (D_2O) à 27° C de manière à obtenir un échange de hydrogènes mobiles (fonctions hydroxyles). L'analyse des glycopeptides est effectuée sur un appareil Bruker HX 500 à 500 MHz opérant en transformées de Fourier. Les détails expérimentaux sont décrits dans les revues générales de Vliegthart et al., 1981 et 1983.

IV - ETUDE DE L'INTERACTION DES VARIANTES DE LA SEROTRANSFERRINE

AVEC LES RECEPTEURS MEMBRANAIRES.

A - Matériel

Les variants de la sérotransferrine sont préparés par chromatographie d'affinité de la sérotransferrine sur colonne de concanavaline A. Les sérotransferrines humaine et de lapin sont utilisées comme témoins lors des interactions avec les récepteurs.

B - Désialylation des glycoprotéines

Les variants transferriniques ainsi que la sérotransferrine humaine totale ont été désialylés sur une colonne de neuraminidase isolée de Clostridium perfringens, type VI-A, insolubilisée sur billes d'agarose (Sigma, n°N- 5254; 1 unité pour 1,6 ml de gel). L'hydrolyse est réalisée en circuit fermé à 37° C pendant 6 heures dans le tampon citrate 0,1 M p H 5,1. Le pourcentage de désialylation est contrôlé par analyse en chromatographie en phase gazeuse.

C - Marquage par ⁵⁹ Fe

Le marquage radioactif des glycoprotéines est réalisé par saturation des apoprotéines par du ⁵⁹ Fe (3 à 20 mCi /mg soit 3,710⁷ Bq/ml, 1 m Ci/ml; Radiochemical Centre, Amershan). La quantité de fer ⁵⁹ Fe ajoutée est de 1,6 µg par mg de protéine en présence de tampon citrate / bicarbonate 0,1M p H 8,6. Le fer ajouté sous forme de citrate ferrique est en solution dans HCl 0,1N qui est neutralisé par la quantité nécessaire de NaOH 0,1N au moment du marquage. La saturation s'effectue à température ambiante pendant deux heures. La solution est dessalée sur colonne de Dowex 1x4 (200x400 mesh) afin d'éliminer complètement le fer libre restant.

La radioactivité spécifique est déterminée par mesure précise au spectrophotomètre de la densité optique de la solution de protéine marquée, et par le comptage d'un aliquote de $10\ \mu\text{l}$ de la solution sur un compteur de radioactivité gamma (Autologic)

D - Interaction transferrine-réticulocyte

1-- Préparation des réticulocytes

L'enrichissement du sang en réticulocytes est obtenu en anémiant un lapin par phlébotomie. Quatre saignées à la veine interne de l'oreille sont réalisées tous les deux jours, à raison de 25 ml de sang prélevés par kg de lapin. Le dernier prélèvement est effectué sur héparine (10 unités/ml de sang). Le sang est centrifugé 10 mn à 600 g. Le culot de cellules rouges est lavé trois fois par le tampon de Hank's et Wallace, 1949, pH 7,35 et dont la composition est la suivante : NaCl 8 g/l; KCl 0,4 g/l; CaCl_2 sec 0,14 g/l; $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l; $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 0,12 g/l; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,6 g/l; Na HCO_3 0,35 g/l; Glucose 1 g/l.

Le culot contient les cellules rouges enrichies en réticulocytes (20 à 30 % alors que le taux normal est de 0,5 à 2 %).

2 - Incubation

Les incubations des différents variants sont réalisées à 37° C dans le tampon de Hank's et Wallace contenant de la sérualbumine bovine (S A B) 1%, avec une concentration en protéine de 750 nM ($60\ \mu\text{g/ml}$). Les incubats contiennent $1,8 \times 10^8$ réticulocytes /ml.

Des aliquotes sont prélevés au temps zéro et à des temps déterminés. La réaction est arrêtée par 100 volumes de tampon froid. Les cellules sont lavées et centrifugées 10 mn à 600 g, trois fois avant d'être comptées sur un compteur de radioactivité gamma (Autologic).

E - Interaction transferrine- hépatocyte

1 - Préparation des hépatocytes

Les hépatocytes sont isolés à partir du foie de rat Whistar (200 g) par une technique de perfusion par la collagénase (Seglen, 1976). Le foie est tout d'abord perfusé par le tampon de Hank's et Wallace sans Ca^{++} , puis par le même tampon contenant de l'EGTA 0,5 mM. Après rinçage par le tampon initial, le foie est perfusé par le tampon contenant du Ca^{++} 5 mM et la collagénase 0,03% (type IV, n° C-5138; Sigma). Les cellules sont dissociées avec une lame de rasoir, filtrées puis centrifugées à 40 g pendant 10 mn. Elles sont lavées deux fois par le tampon contenant du Ca^{++} 2,7 mM et de la sérum albumine bovine 1%, et centrifugées entre chaque lavage.

Le pourcentage de cellules vivantes est déterminé par coloration au bleu Trypan. Il est de 80% minimum.

2 - Incubation

Les incubations des variants sont réalisées à 37° C dans le tampon de Hank's et Wallace contenant de la sérum albumine bovine 1% avec une concentration en protéine de 750 nM ($60 \mu\text{g/ml}$). Les incubats contiennent $1,5 \times 10^7$ hépatocytes / ml.

Des aliquotes sont prélevés au temps zéro et à des temps déterminés. La réaction est arrêtée par 100 volumes de tampon froid. Les cellules sont lavées et centrifugées 3 mn à 40 g, trois fois avant d'être comptées sur un compteur de radioactivité gamma (Autologic).

RESULTATS

STRUCTURE DES GLYCANNES DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE

En 1974, Spik et al., et en 1975, Montreuil et Spik ont suggéré, sur la base des rapports molaires des glycopeptides isolés par électrophorèse en veine liquide, que la sérotransferrine humaine possédait deux types de glycanes : l'un de type biantenné, l'autre de type triantenné. La structure complète du glycanne de nature biantennée a été déterminée précédemment (Spik et al., 1975) et confirmée en R.M.N. (Dorland et al., 1977), tandis que celle du glycanne triantenné n'a pas été totalement établie.

Nous avons utilisé la chromatographie d'affinité pour isoler les glycanes triantennés, qui existent en quantité plus faible que les glycanes biantennés, afin d'en déterminer leur structure par l'application de méthodes physico-chimiques.

I - PREPARATION DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE.

La chromatographie sur colonne de QAE-Séphadex du précipité obtenu à partir de la fraction IV de Cohn, précipitée au rivanol et au sulfate d'ammonium à 70%, a fourni trois fractions dans les proportions suivantes :

- la fraction A, 81%, est éluée par le tampon Tris/HCl 0,01M; NaCl 0,1M, pH8.
- la fraction B, 13%, est éluée par le tampon Tris/HCl 0,01M; NaCl 0,2M, pH8.
- la fraction C, 6%, est éluée par le tampon Tris/HCl 0,01M; NaCl 1 M, pH8.

La fraction A s'est révélée homogène en électrophorèse en acétate de cellulose et immunoélectrophorèse. Cette fraction nous a servi de matériel de base pour les différentes études que nous avons entreprises.

II - ETUDE DES GLYCOPEPTIDES SEPARES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR

CONCAVALINE A-SEPHAROSE.

La concanavoline A est une lectine qui reconnaît spécifiquement, dans les glycanes des glycoprotéines, des structures internes tel le disaccharide Glc NAc(1-2)Man (Debray et al., 1981). La structure glycanique biantennée de la sérotransferrine qui renferme ce chaînon est reconnue par la concanavoline A. Cependant, la substitution des trois résidus de mannose du chaînon trimannosidique par un résidu de N-acétylglucosamine, de même que la substitution des résidus de mannose 4 ou 4' par un résidu N-acétyllactosaminique sialylé ou non, abolit complètement cette spécificité de reconnaissance.

Ainsi les structures glycaniques triantennées et tétraantennées de la sérotransferrine, si elles existent, ne seront pas reconnues par la lectine.

A - Chromatographie d'affinité des glycopeptides.

La chromatographie d'affinité des glycopeptides pronasiques sur colonne de concanavoline A-Sépharose nous a permis d'obtenir deux fractions; le profil d'éluion des fractions est donné dans la Fig. 22 p 92.

La fraction A, 15%, non retenue par la lectine est éluee par le tampon acétate de Na 5 mM; MgCl₂ 1mM; MnCl₂ 1 mM; CaCl₂ 1mM; NaCl 0,1M; pH 5,2.

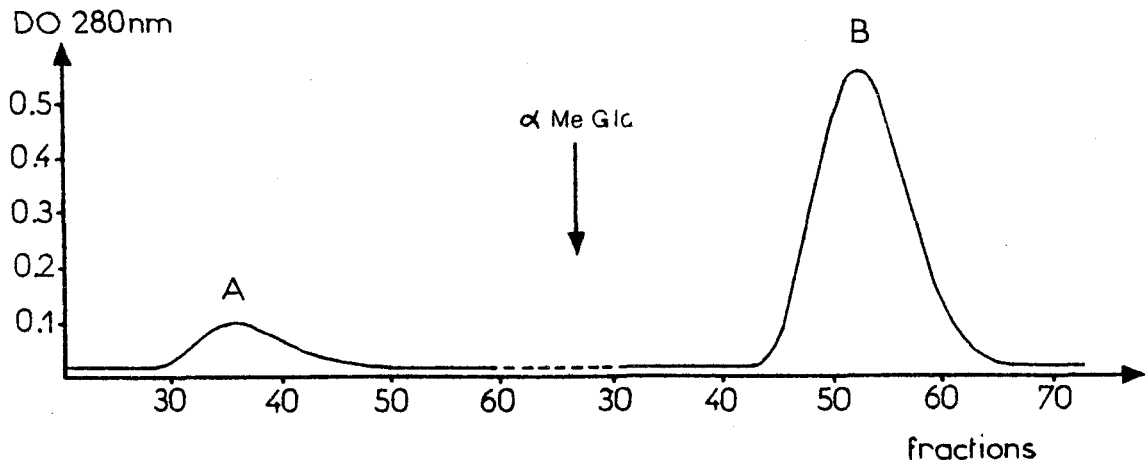


Fig. 22. Fractionnement des glycopeptides de la sérotransferrine humaine sur colonne de concanavaline A-Sépharose.

TABLEAU IX

Composition molaire en monosaccharides des fractions glycopeptidiques de la sérotransferrine humaine, isolées par chromatographie d'affinité sur colonne de concanavaline A-Sépharose.

Fraction	Monosaccharides			
	Gal	Man*	Glc NAc	NeuAc
Glycopeptides totaux	2,38	3	3,68	2,37
Glycopeptide de la fraction A	3,07	3	5,19	2,85
Glycopeptide de la fraction B	1,98	3	3,62	1,93

* les rapports molaires des différents monosaccharides ont été calculés sur la base de 3 résidus de mannose.



La fraction B, 85%, retenue est éluée par le même tampon contenant de l' α -D - méthylglucoside 15 mM. Les fractions A et B ont été rechromatographiées sur la même colonne afin d'éviter toute contamination de la fraction A par la fraction B.

B - Composition molaire en monosaccharides des glycopeptides isolés.

L'étude de la composition molaire des monosaccharides, déterminée par chromatographie en phase gazeuse, a conduit aux résultats donnés dans le tableau IX p 92.

Dans le cas des glycopeptides totaux de la sérotransferrine nous obtenons des valeurs telles que 2,38 Gal; 3,68 GlcNAc et 2,37 NeuAc. Ces chiffres ne correspondent pas à des valeurs entières ce qui laisse supposer que les glycanes présents dans cette fraction totale ne possèdent pas des structures homogènes.

Par contre, la fraction A renferme des monosaccharides dont les rapports molaires de 3,07 Gal; 5,19 GlcNAc et 2,85 NeuAc, seraient en faveur d'une structure glycanique triantennée.

Les rapports molaires en monosaccharides de la fraction B sont en faveur d'une structure glycanique biantennée.

C - Etude des oligosaccharides libérés par hydrazinolyse

Les glycopeptides des fractions A et B ont été hydrazinolysés, ceci afin d'éviter que les résidus d'acides aminés des fractions n'interfèrent lors de la chromatographie sur couche mince. Les oligosaccharides libérés sont désialylés.

Le schéma de séparation après chromatographie en couche mince et révélation à l'orcinoï sulfurique est donné dans la Fig. 23 p 94.

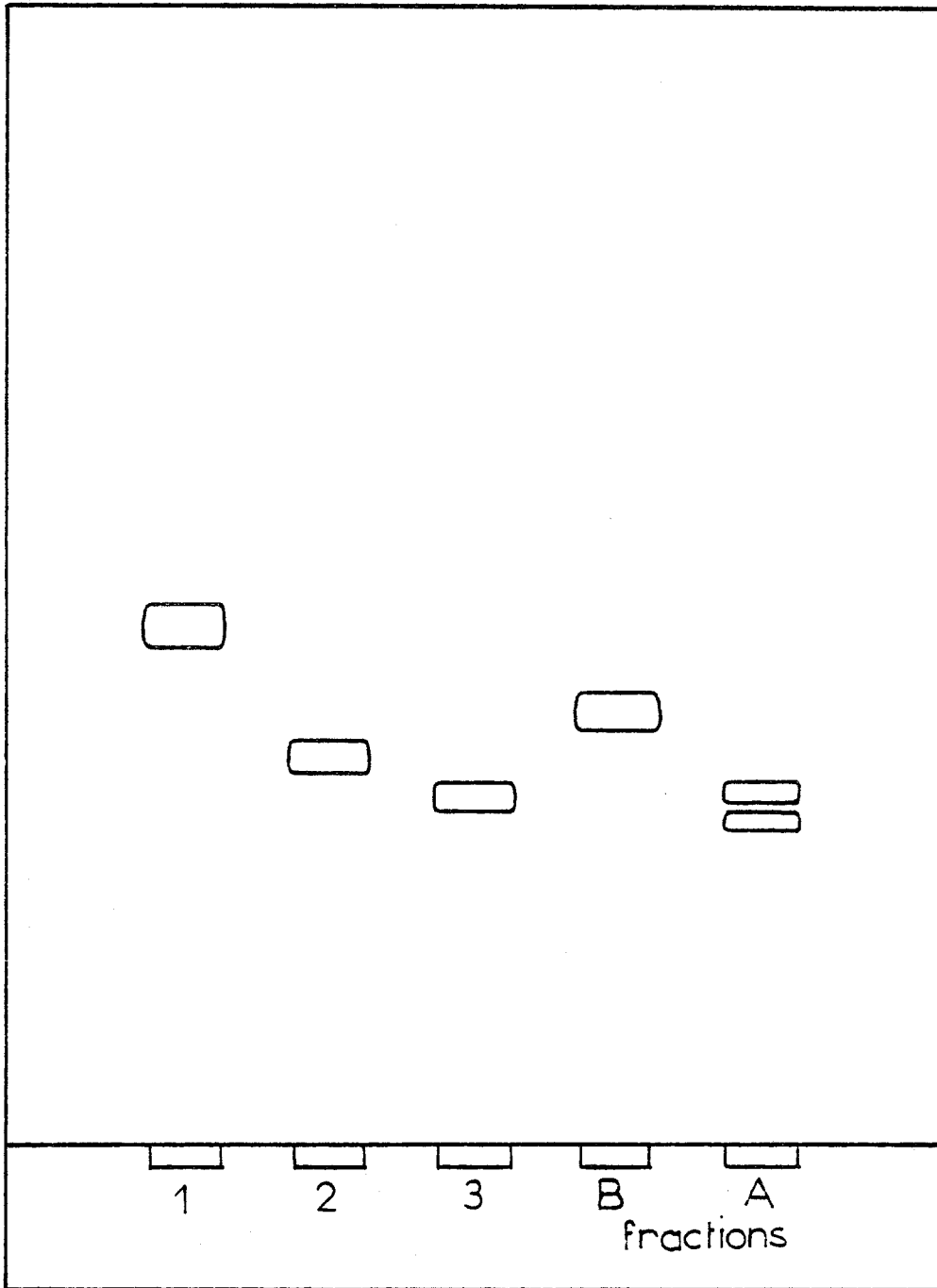
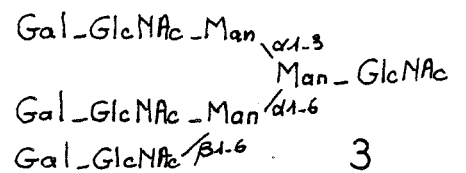
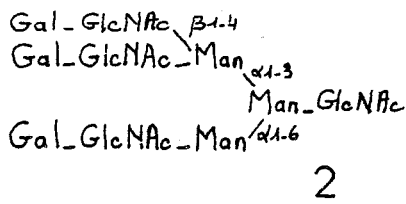
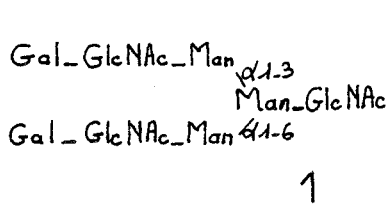


Fig. 23. Schéma de la plaque de silice après chromatographie et révélation à l'orcinol-sulfurique des fractions glycopeptidiques A et B hydrazinolysées et désialylées, en présence des témoins 1,2 et 3.

BUS
LILLE

Structure des oligosaccharides standards utilisés comme témoins de migration :



La fraction A renferme deux types d'oligosaccharides tandis que la fraction B , homogène, ne renferme qu'un seul type d'oligosaccharide.

La mobilité du glycanne de la fraction B est analogue à celle du témoin 1 *, oligosaccharide désialylé biantenné ne possédant pas la N-acétylglucosamine 1 du point d'attache. L'absence d'un monosaccharide dans la structure du témoin suffit à lui donner une mobilité sensiblement plus grande que celle de l'oligosaccharide de la fraction B qui posséderait donc une structure glycanne biantennée.

La fraction A renferme deux types d'oligosaccharides dont la mobilité est voisine de celle des témoins 2 et 3, oligosaccharides désialylés triantennés ne possédant pas la N-acétylglucosamine 1. Le témoin 2 possédant la branche N-acétyllactosaminique liée en (β 1-4) sur le mannose 4 migre plus loin que le témoin 3 dont la branche glycanne est liée en (β 1-6) sur le mannose 4'. La fraction A renfermerait donc les deux types de structures glycanne triantennées dont la séparation par chromatographie en couche mince est possible.

D - Conclusion

La chromatographie d'affinité sur colonne de concanavaleine A-Sépharose a permis d'isoler deux fractions glycopeptidiques de la sérotransferrine humaine.

La fraction glycopeptidique A renferme des glycanne dont la nature semble être biantennée. Cette fraction homogène, ne renferme qu'un seul type de glycanne.

* Nous remercions Monsieur Strecker pour nous avoir fourni les oligosaccharides standards provenant d'urines pathologiques.

La fraction glycopeptidique B non retenue renferme des glycanes qui pourraient être de type triantenné. Cette fraction n'est pas homogène, elle renferme deux types d'oligosaccharides qui ont pu être séparés par chromatographie en couche mince.

III - DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES TRIANTENNES

Nous avons déterminé la structure des glycanes triantennés de la sérotransferrine humaine à partir de la fraction glycopeptidique A par l'application des procédés de méthylation et de Résonance Magnétique Nucléaire.

A - Identification des dérivés méthylés

Les dérivés méthylés des monosaccharides ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse. Le diagramme des dérivés méthylés est donné dans la Fig. 24 p 97. Les rapports molaires de ces différents dérivés sont donnés dans le tableau X p 97.

La présence du dérivé (2,3,4,6) Me₄-Gal révèle une désialylation partielle des glycanes analysés. Ceci se confirme par le fait que nous n'obtenons que 2,32 résidus de (4,7,8,9) Me₄-NeuAcMe. Une valeur de 2,85 NeuAc avait été obtenue après méthanolyse.

Les rapports molaires des dérivés (3,6) Me₂Man, (3,4) Me₂Man et (3,4,6) Me₃-Man, comparés à celui du dérivé (2,4) Me₂Man pris comme base de calcul, indiquent que le glycanne de la fraction A est de nature triantennée: nous obtenons des rapports de 1,03 pour l'ensemble des deux dérivés (3,4) et 3,6) Me₂Man et de 0,90 dérivés de (3,4,6) Me₃Man pour 1 dérivé de (2,4)Me₂Man. Ces rapports nous permettent d'exclure la présence d'un glycanne de structure tétraantennée.

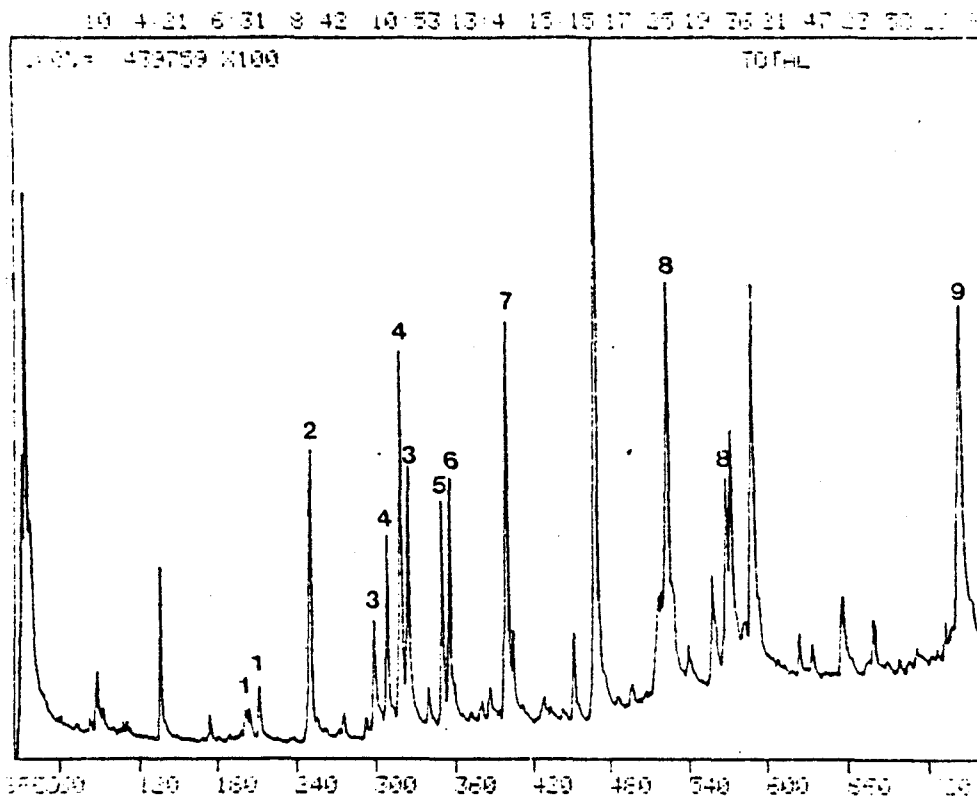


Fig. 24. Séparation des dérivés méthylés des monosaccharides présents dans le glycopeptide A par chromatographie gazeuse. L'identification des dérivés est donnée dans le tableau ci-dessous.

TABLEAU X

Identification et détermination des rapports molaires des dérivés méthylés des monosaccharides du glycopeptide A. Les calculs ont été réalisés sur la base d'un résidu de (2,4) Me₂Man.

Dérivés méthylés	Rapports molaires
pic 1 : (2,3,4,6) Me ₄ - Gal	0,36
pic 2 : (3,4,6) Me ₄ - Man	0,90
pic 3 : (2,4,6) Me ₃ - Gal	1,10
pic 4 : (2,3,4) Me ₃ - Gal	1,73
pic 5 : (3,6) Me ₂ - Man	0,57
pic 6 : (3,4) Me ₂ - Man	0,46
pic 7 : (2,4) Me ₂ - Man	1
pic 8 : (3,6) Me ₂ - GlcNAcMe	3,60
pic 9 : (4,7,8,9) Me ₄ - Neu Ac Me	2,32

La présence des deux dérivés (3,4) et (3,6) Me₂Man indique que deux types de structure triantennée sont présents.

Nous avons calculé les pourcentages des deux types de structure en nous basant sur les rapports molaires des dérivés méthylés obtenus. Le glycopeptide A renferme 45% de glycanne de structure triantennée dont la troisième branche N-acétyllactosaminique sialylée est liée en 1,4 sur le mannose 4, et 55% de glycanne de structure triantennée dont la troisième branche est liée en 1,6 sur le mannose 4'.

La présence de 1,10, résidu du (2,4,6) Me₃-Gal indique qu'au moins 1 résidu d'acide N-acétylneuraminique est lié en 2,3 sur le résidu de galactose. Comme dans la structure glycanne biantennée cette liaison n'a pas été mise en évidence, nous supposons que la liaison en 2,3 de l'acide sialique serait localisée sur la 3^e branche N-acétyllactosaminique du glycanne triantenné.

B - Résonance Magnétique Nucléaire

Les résultats obtenus en RMN confirment la présence de deux structures triantennées dans la fraction glycopeptidique A non retenue sur colonne de concanavaline A. Les déplacements chimiques du proton du Man-4' de 4.931 et de 4.862 et celui du Man 3 H-2 de 4.211 et de 4.251 sont spécifiques de la présence de glycannes avec une troisième antenne greffée respectivement en (β 1-4) sur le Man 4 et en (β 1-6) sur le Man 4'.

D'après l'intensité des signaux donnés par les protons des 2 Man, il est possible de déduire que le rapport des deux glycopeptides est de l'ordre de 6 pour 1.

D'autre part, d'après les résultats de RMN il est possible de déduire que les deux résidus de galactose 6 et 6' sont substitués en

(α 2-6) par un résidu d'acide N-acétylneuraminique alors que le Gal 8 et le Gal 8' qui appartiennent à l'antenne supplémentaire sont substitués en (α 2-3) par l'acide N-acétylneuraminique.

Les valeurs des déplacements chimiques des différents monosaccharides du glycopeptide triantenné possédant l'antenne supplémentaire lié en (β 1-4) sur le Man 4 ont été publiés précédemment (Endo et al., 1982) alors que ceux correspondant au deuxième type de glycanne triantenné n'ont pas été publiés jusqu'à présent. Les résultats que nous avons obtenus en RMN nous ont donc permis de préciser la structure des deux glycanes triantennés de la transferrine et d'apporter des valeurs nouvelles concernant les déplacements chimiques des protons des monosaccharides d'un des deux types de structure triantennée. (Tableau XI p 100)

IV- CONCLUSION

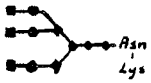
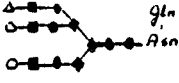
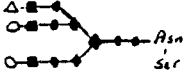
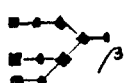

La chromatographie d'affinité sur colonne de concanavalline A nous a permis d'isoler une fraction glycopeptidique A de la sérotransferrine humaine, non retenue par la lectine. Cette fraction contient deux glycopeptides de nature triantennée dont les structures ont été déterminées par la méthylation couplée à la spectrométrie de masse et par la RMN.

D'après les résultats de méthylation, il semblait que le glycopeptide triantenné dont l'antenne supplémentaire est liée en (β 1-4) représentait 45 % de la fraction A, tandis que le glycopeptide dont l'antenne est liée en (β 1-6) représentait 55 % de la fraction A. En fait, les résultats du RMN nous montrent que les rapports respectifs de ces structures sont de 6 pour 1. Nous avons de plus démontré que l'acide N-acétylneuraminique est lié en (α 2-3) sur le galactose de la 3^e antenne.



TABLEAU XI

Analyse en RMN à 500 MHz de la fraction A glycopeptidique de la serotransferrine non retenue sur colonne de concanavoline A. (Etude des déplacements chimiques des différents groupements présents dans les monosaccharides constituant les glycopeptides, par comparaison avec ceux de glycopeptides et d'oligosaccharides témoins).

Groupe- ments présents	Résidus	Déplacements chimiques ^a des groupements présents dans les composés suivants:				
		 GP-II-5 [1]	 Cp-d ₂ [2]	 h-STF-A [3]	 Mor 4B [3]	 h-STF-B [3]
H-1	GlcNAc-1	5.092	5.040	5.047	-	5.047
	GlcNAc-2	4.614	4.614	4.61	4.721	4.61
	Man-3	4.755	4.77	4.77	4.770	4.77
	Man-4	5.120	5.131	5.130	5.131	5.136
	Man-4'	4.924	4.934	4.931	4.874	4.862
	GlcNAc-5	4.570	4.60	4.610	4.585	4.610
	GlcNAc-5'	4.580	4.60	4.610	4.592	4.610
	Gal-6	4.468	4.444	4.443	4.468	4.443
	Gal-6'	4.473	4.446	4.443	4.471	4.443
	GlcNAc-7	4.545	4.546	4.544	-	-
	GlcNAc-7'	-	-	-	4.555	4.56
	Gal-8	4.462	4.546	4.544	-	-
	Gal-8'	-	-	-	4.480	4.56
	H-2	Man-3	4.209	4.220	4.211	4.250
Man-4		4.218	4.220	4.211	4.200	4.202
Man-4'		4.108	4.112	4.109	4.098	4.10
H-3	Gal-8/8'	-	4.11	4.109	-	4.109
H-3ax	NeuAc(2+3)	-	1.801	1.797	-	1.797
	NeuAc(2+6)	-	1.717 ^b	1.718 ^b	-	1.718 ^b
H-3eq	NeuAc(2+3)	-	2.756	2.759	-	2.759
	NeuAc(2+6)	-	{ 2.670 2.673	{ 2.669 2.673	-	{ 2.669 2.673
NAC	GlcNAc-1	2.003	2.004	2.011	-	2.011
	GlcNAc-2	2.078	2.079	2.079	2.056	2.079
	GlcNAc-5	2.048	2.065	2.065	2.056	2.065
	GlcNAc-5'	2.045	2.065	2.065	2.046	2.065
	GlcNAc-7	2.075	2.073	2.072	-	-
	GlcNAc-7'	-	-	-	2.039	2.041
	NeuAc	-	2.030 ^c	2.031 ^c	-	2.031 ^c

a-Pour les explications concernant la nature des déplacements chimiques se reporter aux revues générales de Vliegenthart et al., 1981, 1983.

b-Signal donné par les 2 protons.

c-Signal donné par les 3 groupements CH₃.

(1: Van Halbeck et al., 1980; 2: Endo et al., 1982; 3: Michalski et al., 1982)

SEPARATION ET ISOLEMENT DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA
SEROTRANSFERRINE HUMAINE SELON LEUR AFFINITE POUR LA
CONCAVALINE A

Après avoir déterminé la structure des glycanes triantennés de la sérotransferrine humaine, nous avons cherché à isoler les variants glycaniques de la glycoprotéine : afin de connaître la répartition des glycanes sur la chaîne peptidique, et afin de déterminer d'autre part le pourcentage des deux types de glycanes triantennés dans chacun des variants transferriniques.

Les séparations ont été réalisées aussi bien par chromatographie sur colonne de concanavaline A que par électrophorèse d'immuno-affinité en présence de concanavaline A.

I - ISOLEMENT DES VARIANTS TRANSFERRINIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE SUR COLONNE DE CONCAVALINE A.

A - Chromatographie sur colonne de concanavaline A-Sépharose

La Fig. 25 p 102 représente le profil d'élution obtenu par chromatographie de la sérotransferrine humaine sur colonne de concanavaline A-Sépharose. Trois variants glycaniques ont été obtenus dans les proportions suivantes :

- le variant I, 1,5 %, n'est pas retenu par la lectine et est élué par le tampon de stabilisation de la colonne contenant NaCl 0,1 M.
- le variant II, 23 %, retardé, est élué par le tampon contenant 1' α -D-méthylglucoside 15 mM.
- le variant III, 75,5 %, retenu, est élué par le même tampon.

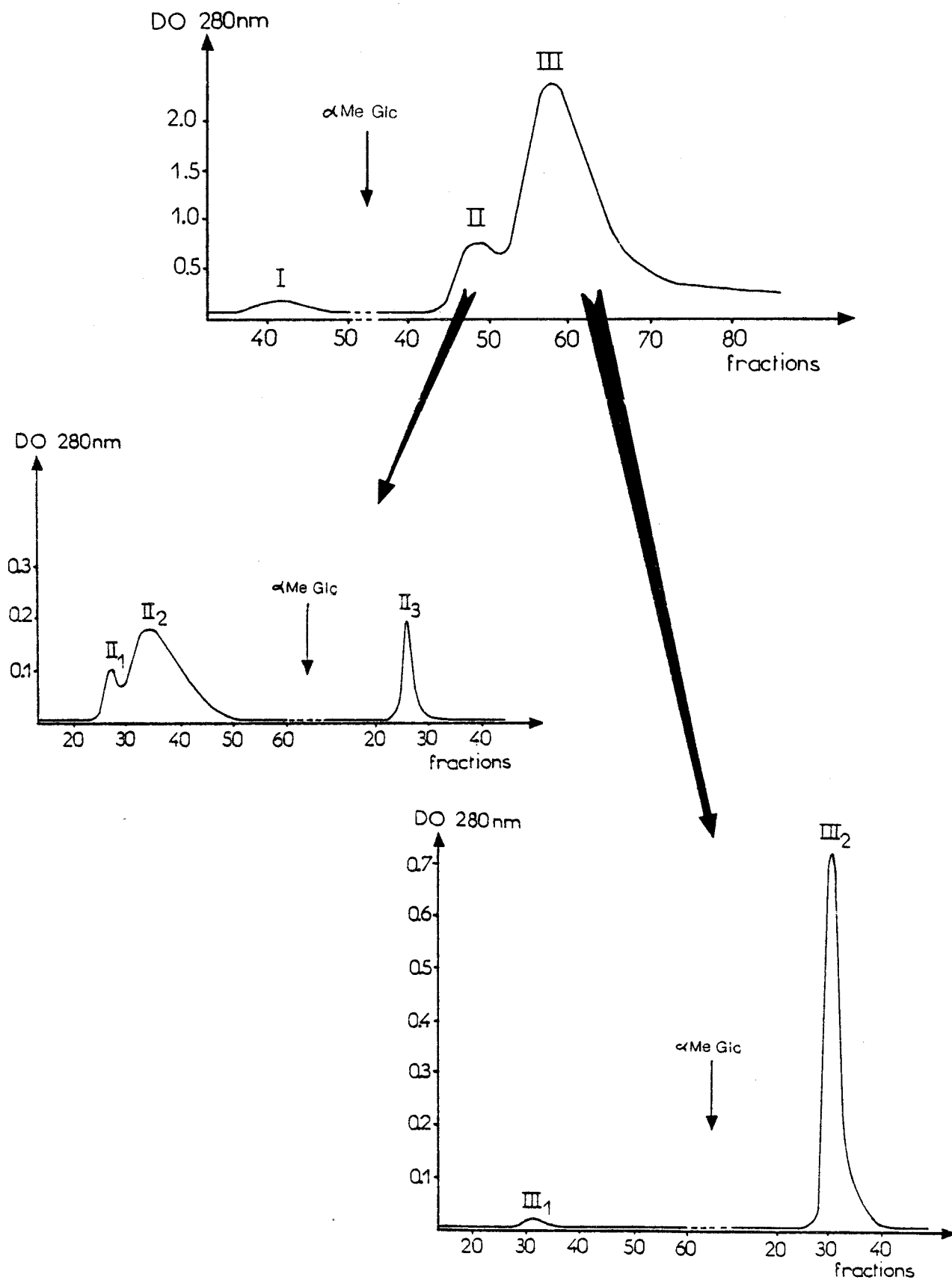


Fig. 25. Chromatographie d'affinité de la sérotransferrine humaine sur colonne de concanavoline A.Sépharose. Les variants II et III ont été rechromatographiés sur colonne de concanavoline A.Ultrogel.

B - Chromatographie sur colonne de concanavaline A-Ultrogel

Les variants II et III, retardés et retenus par la lectine couplée au Sépharose se comportent différemment sur colonne de concanavaline A couplée à l'Ultrogel.

Outre la nature différente du support de couplage, ces deux chromatographies diffèrent surtout par la capacité de fixation des deux colonnes. Dans le premier cas, la concanavaline A est couplée à raison de 10 mg de lectine par ml de Sépharose, dans le second cas, 3 à 4 mg seulement sont fixés par ml d'Ultrogel. La capacité de fixation du premier gel est supérieure à celle du second gel.

Les profils d'éluion des deux variants II et III sont donnés dans la Fig. 25 p 102.

Le variant II se sépare en deux fractions non retenues et une fraction retenue éluee par le tampon contenant l' α -D-méthylglucoside.

La chromatographie du variant III ne permet d'obtenir essentiellement qu'une fraction retenue sur la colonne.

C - Conclusion

La sérotransferrine humaine peut être séparée en trois fractions ayant des affinités différentes pour la concanavaline A. Ces fractions diffèrent par leur composition glycanique, les glycanes interagissant spécifiquement avec la lectine lors du passage sur la colonne. Le comportement des trois variants glycaniques est le suivant :

- Variant I : non retenu sur concanavaline A-Sépharose
- Variant II : retardé sur concanavaline A-Sépharose, non retenu sur concanavaline A-Ultrogel.
- Variant III: retenu sur concanavaline A-Sépharose et sur concanavaline A-Ultrogel.

II - SEPARATION DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE

HUMAINE PAR ELECTROPHORESE D'IMMUNOAFFINITE

Nous avons réalisé l'électrophorèse d'immunoaffinité de chacun des variants I, II, et III isolés sur colonne de concanavaline A-Sépharose. Le comportement de chacun d'eux est représenté dans la Fig. 26 p 105 :

- Le variant I n'est pas retenu par la concanavaline A et migre vers l'anode.
- le variant II est retardé par la lectine.
- le variant III est retenu par la lectine et migre peu.

La sérotransferrine humaine peut également être séparée en trois fractions, ou trois pics, par l'électrophorèse d'immunoaffinité en présence de concanavaline A.

Le pic I, dont le pourcentage est faible, migre fortement vers l'anode, il n'est pas retenu par la concanavaline A présente dans le gel, lors de l'électrophorèse.

Le pic II, 19%, migre beaucoup moins vers l'anode que le pic I, il est retardé lors de sa migration électrophorétique par la lectine.

Le pic III, 81%, est fortement retenu par la lectine, sa migration électrophorétique est pratiquement nulle.

L'association de ces résultats nous permet d'identifier chacun des pics I, II et III en les assimilant aux trois variants glycaniques I, II et III obtenus par chromatographie de la sérotransferrine sur colonne d'affinité.



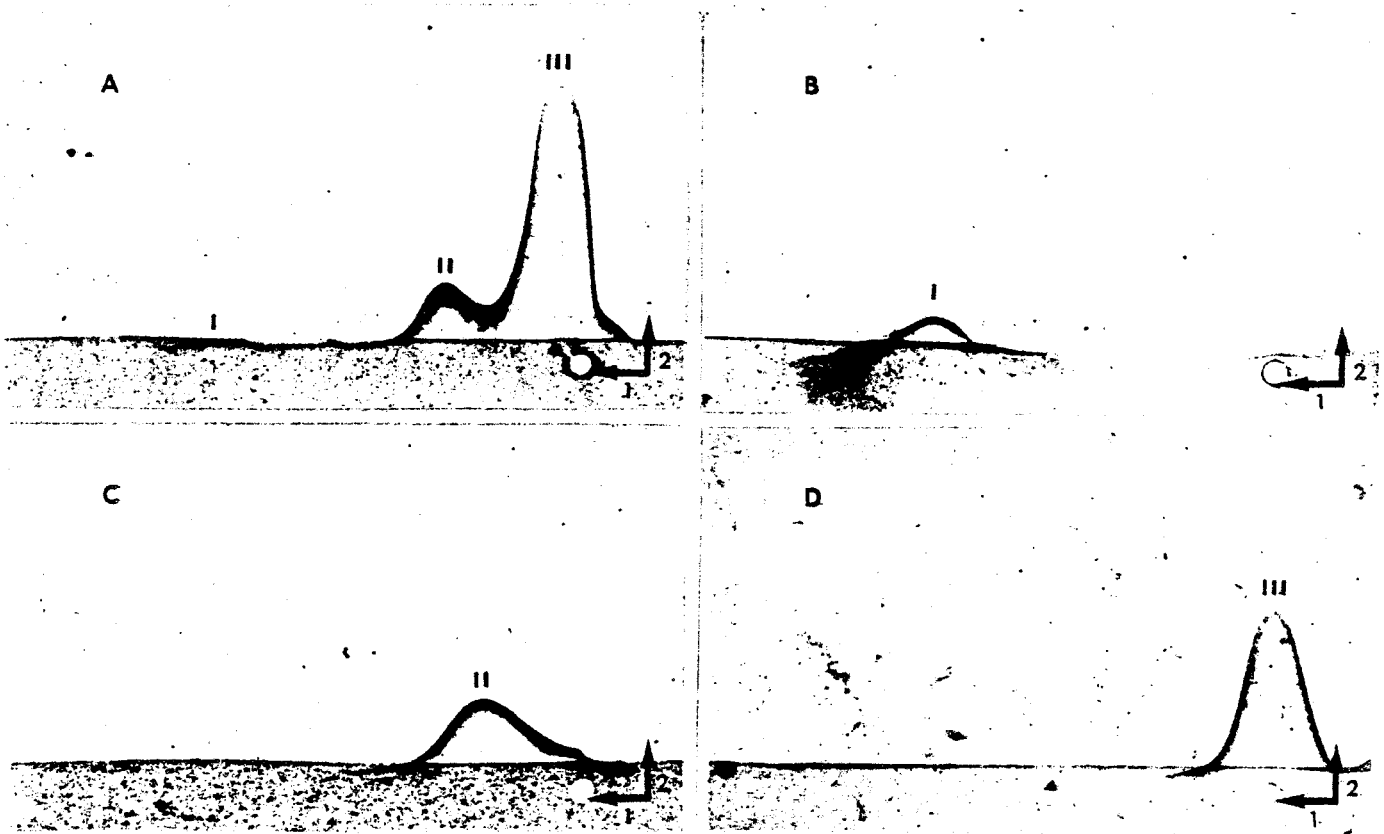


Fig.26. Electrophorèse d'immunoaffinité de la sérotransferrine humaine et des trois variants glycaniques de la sérotransferrine séparés sur colonne de concanavaline A.Sépharose.

- A - Sérotransferrine humaine
- B - Variant I
- C - Variant II
- D - Variant III

III - ANALYSE DES GLYCANNES DES VARIANTS I, II et III DE LA

SEROTRANSFERRINE HUMAINE

A - Composition molaire en monosaccharides

La composition molaire des monosaccharides présents dans les trois variants glycaniques de la sérotransferrine humaine est donnée dans le tableau XII p 107.

La présence de 3,28 résidus de galactose et de 5,08 résidus de N-acétylglucosamine dans la composition molaire en monosaccharides du variant I, suggère la présence d'un glycanne triantenné.

Dans le cas du variant II, les nombres 2,63 et 4,62 désignant respectivement les rapports molaires des résidus de galactose et de N-acétylglucosamine, indiquent que les glycanes présents dans cette fraction ne sont pas homogènes. Le variant II doit renfermer des glycanes de structures différentes.

Le variant III qui renferme 2,02 résidus de galactose et 4,24 résidus de N-acétylglucosamine possède une composition qui correspond à celle d'un glycanne biantenné classique.

Dans les trois cas, les rapports molaires en acide N-acétylneuraminique sont de 2,42; 2,07; 1,87 pour les variants I, II et III respectivement. Ceci suggère une désialylation partielle de chacun des glycanes des variants transferriniques.

B - Séparation des oligosaccharides libérés par hydrazinolyse

La fig 27 p 108 représente le schéma de la migration des oligosaccharides réduits et désialylés, libérés par hydrazinolyse des variants I, II et III.

TABLEAU XII

Composition molaire des monosaccharides présents dans les trois variants glycaniques de la sérotransferrine humaine.

Monosaccharides	Variant I	Variant II	Variant III
Gal	3,28	2,63	2,02
Man*	3	3	3
GlcNAc	5,08	4,62	4,24
Neu Ac	2,42	2,07	1,87

* Les rapports molaires des différents monosaccharides ont été calculés sur la base de 3 résidus de mannose.

TABLEAU XIII

Rapports molaires des dérivés méthylés des monosaccharides présents dans les trois variants glycaniques de la sérotransferrine humaine.

Dérivés méthylés	Variant I	Variant II
(2,3,4,6) Me ₄ -Gal	0,60	0,35
(3,4,6) Me ₃ -Man	0,80	1,26
(2,4,6) Me ₃ -Gal	0,50	0,48
(2,3,4) Me ₃ -Gal	1,90	1,81
(3,6) Me ₂ -Man	0,24	0,26
(3,4) Me ₂ -Man	0,79	0,39
(2,4) Me ₂ -Man*	1	1
(3,6) Me ₂ -GlcNAc Me	1,54	2,53
(4,7,8,9) Me ₄ -Neu Ac Me	0,34	1,31

* Les rapports molaires ont été calculés sur la base d'un résidu de (2,4) Me₂Man.



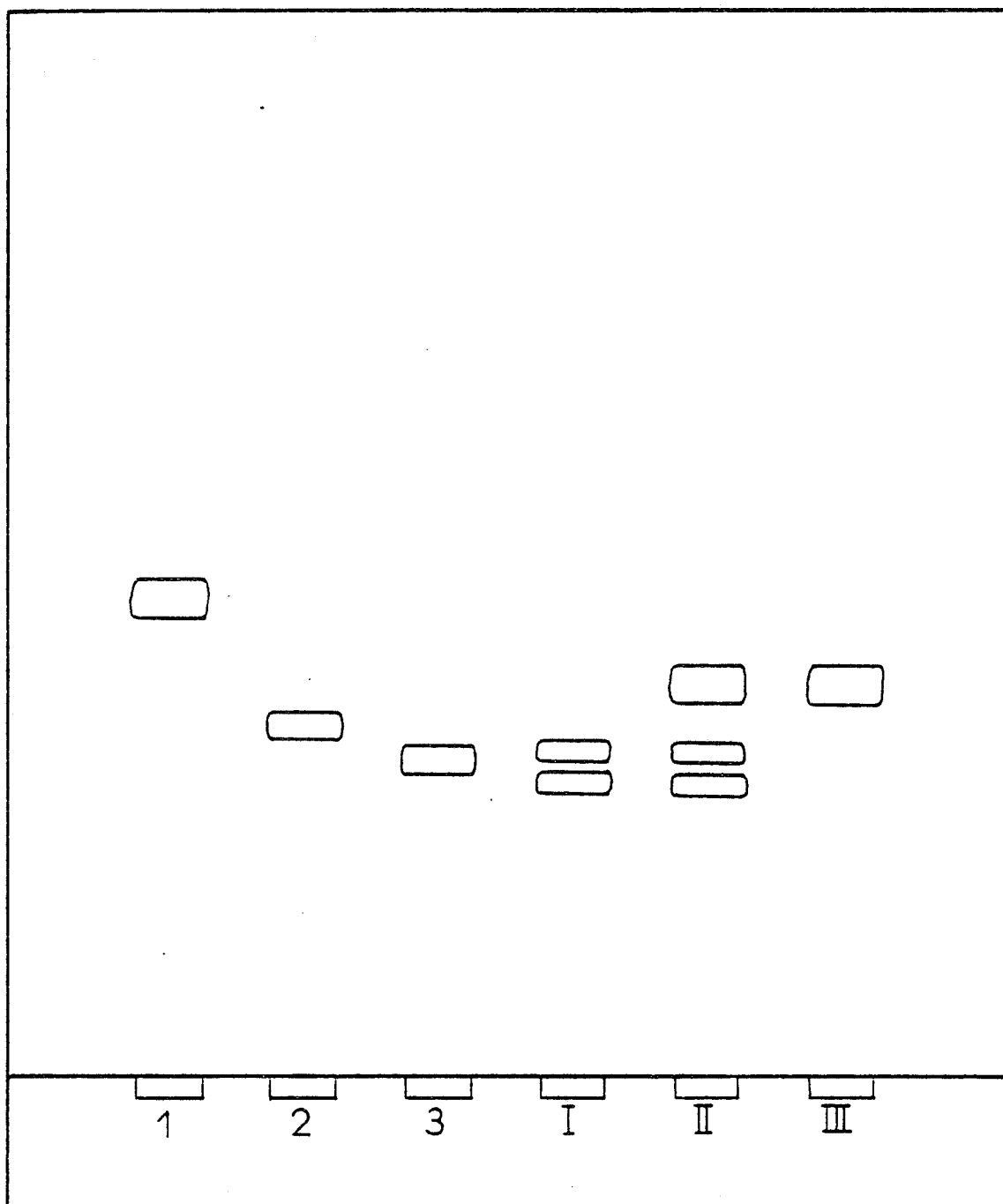


Fig. 27. Schéma de la migration des oligosaccharides réduits et désialylés, libérés par hydrazinolyse des variants I, II, et III.

La séparation est réalisée dans le solvant n-butanol/éthanol/eau/acide acétique/pyridine (10:100:30:3:10; v/v) (Bayard et al., 1979).

(La structure des témoins 1, 2 et 3 utilisés est donnée Fig. 23 p 94)



Le variant I renferme deux types de glycanes dont la migration est voisine de celle des témoins 2 et 3 triantennés : il contient les deux types de structures glycaniques triantennées.

Le variant II renferme trois types de glycanes : deux identiques à ceux du variant I et un troisième type, dont le nombre de monosaccharides est inférieur, et qui migre au niveau du glycanne témoin de structure biantennée.

Le variant III ne renferme qu'un seul type de glycanne dont la migration est voisine de celle d'un glycanne biantenné.

C - Analyse des dérivés méthylés

Les rapports molaires des différents dérivés méthylés des monosaccharides, présents dans les oligosaccharides libérés par l'hydrazinolyse des variants I et II, sont donnés dans le tableau XIII p 107. La présence du dérivé (2,3,4,6) Me₄-Gal, à la fois dans l'analyse du variant I et dans celle du variant II, indique que les glycanes de ces variants sont partiellement désialylés, en particulier le variant I. Ceci se confirme par les rapports faibles obtenus pour le dérivé (4,7,8,9) Me₄-Neu Ac Me. La présence des dérivés méthylés (3,6) Me₂-Man et (3,4) Me₂-Man indique que ces mannoses sont bisubstitués. Les variants I et II possèdent donc des glycanes qui seraient de nature triantennée, de plus les deux types de glycanes triantennés sont présents.

Dans le cas du variant I, les rapports molaires des dérivés (3,6) Me₂-Man, (3,4) Me₂-Man et (3,4,6) Me₃-Man, comparés à celui du dérivé (2,4) Me₂-Man, pris comme base de calcul indiquent que les glycanes de cette fraction sont uniquement de nature triantennée, les deux types de glycanes triantennés étant présents.



Dans le cas du variant II, les mêmes rapports molaires indiquent que les glycanes de cette fraction ne sont pas seulement de nature triantennée. Nous avons un rapport de 0,65 pour l'ensemble des deux dérivés (3,4) et (3,6) Me₂Man, alors que le rapport du dérivé (3,4,6) Me₃-Man est de 1,26, ceci indique que nous sommes en présence à la fois des deux types de glycanes triantennés, mais aussi du type biantenné.

D - Répartition des glycanes des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine.

D'après les rapports molaires des dérivés méthylés obtenus pour les variants I et II nous avons calculé les proportions relatives des différents types de glycanes présents dans ces fractions.

Pour le variant I, les rapports molaires des dérivés (3,6) et (3,4) Me₂-Man sont respectivement de 0,24 et 0,79 sur la base d'un résidu de (2,4) Me₂ Man. Ceci nous permet d'estimer que les structures des glycanes du variant I se répartiraient de cette façon : 75 % des glycanes possèdent une structure triantennée dont la 3^{eme} branche glycanique est liée en 1,6 sur le mannose 4', 25 % des glycanes possèdent l'autre structure triantennée dont la 3^{eme} branche glycanique est liée en 1,4 sur le mannose 4.

Pour le variant II, les rapports molaires des dérivés (3,6) et (3,4) Me₂-Man sont respectivement de 0,26 et 0,39, soit un total de 0,65 pour 1 résidu de (2,4) Me₂-Man.

Sur la base de ces résultats, le variant II renfermerait approximativement 40 % de glycanes de nature biantennée et 60 % de glycanes de nature triantennée. Les rapports 0,26 et 0,39, ramenés à 100 %, nous permettent d'estimer que la répartition des deux types de structure triantennée est

la suivante : 60 % des glycanes possèdent la 3^{eme} branche glycanique liée en 1,6 sur le mannose 4', 40 % ont la 3^{eme} branche liée en 1,4 sur le mannose 4.

Nous émettons cependant des réserves quant à l'expression de ces pourcentages, la précision des rapports molaires des dérivés méthylés étant insuffisante dans une telle estimation.

E - Conclusion

L'analyse des glycanes des variants I, II et III de la sérotransferrine humaine nous a permis de déterminer la structure des glycanes de ces fractions ainsi que leur répartition.

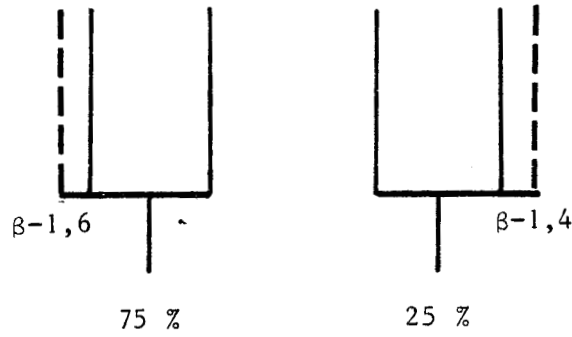
Le variant I renferme les deux types de glycanes triantennés, le variant II renferme un glycanne de nature biantenné et également les deux types de glycanes triantennés, le variant III ne renferme que le type glycanique biantenné.

La Fig 28p112 représente les proportions relatives des différents types de glycanes présents dans les variants I, II et III.

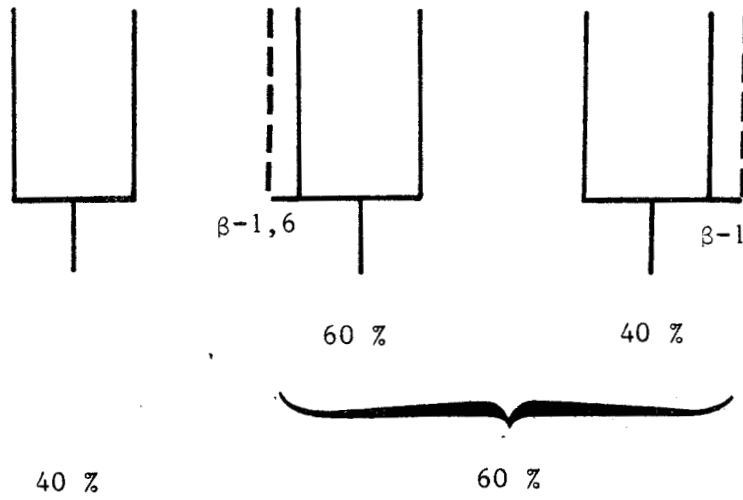
IV- DISCUSSION.

La chromatographie d'affinité de la sérotransferrine humaine nous a permis d'isoler trois variants glycaniques dont nous avons déterminé la composition en monosaccharides.

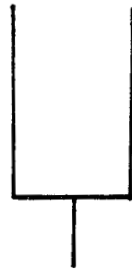
Des trois variants isolés, les variants I et III possèdent respectivement deux glycanes triantennés et deux glycanes biantennés sur leur chaîne peptidique. Le variant II contient à la fois des glycanes biantenné et triantennés dans des proportions qui sembleraient être de 40 à 60 % respectivement.



Variant I



Variant II



Variant III

Fig. 28. Proportions relatives des différents types de glycannes présents dans les variants I, II et III.



Nous avons cité dans le chapitre des généralités, les deux hypothèses concernant la répartition des glycanes de la sérotransferrine sur la chaîne peptidique. Nos résultats seraient en faveur de l'hypothèse de Hatton et al., 1979 et de Spik, 1982. La sérotransferrine humaine porterait donc des glycanes de structures identiques, biantennés ou triantennés, sur la même chaîne peptidique, mais également un glycanne biantenné et un glycanne triantenné sur la même chaîne. Cependant, des études plus approfondies seraient nécessaires en vue de déterminer l'exact pourcentage de glycanne triantenné dans le variant II.



SEPARATION DES VARIANTS DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE PAR ELECTROPHORESE D'IMMUNOAFFINITE - APPLICATION A L'ETUDE DE LA SEROTRANSFERRINE DE SERUMS NORMAUX ET PATHOLOGIQUES

L'électrophorèse d'immunoaffinité de la sérotransferrine humaine permet d'obtenir trois pics qui peuvent être identifiés aux trois variants glycaniques obtenus par chromatographie d'affinité de la transferrine sur colonne de concanavaline A-Sépharose.

Cette technique nous a donc servi de base dans l'analyse de sérums normaux et pathologiques, l'antisérum monospécifique révélant uniquement le profil de la sérotransferrine.

I - ANALYSE PRELIMINAIRE DE SERUMS NORMAUX ET PATHOLOGIQUES.

Nous avons effectué des analyses préliminaires de différents sérums : normaux et pathologiques, en particulier des sérums de patients atteints de cirrhose éthylique et d'hépatite virale, par électrophorèse d'immunoaffinité.

L'introduction de l' α -D-méthylglucoside lors de la seconde dimension, nous a permis d'éliminer toutes les interactions non spécifiques dues à la présence des autres glycoprotéines présentes dans le sérum (Salier et al., 1980) .

Le profil transferrinique obtenu à partir du sérum humain normal est identique à celui de la sérotransferrine humaine purifiée : trois pics sont obtenus, ils correspondent aux trois variants glycaniques I ,II et III.(Fig. 29 p 115) Nous observons que dans les cas de cirrhose éthylique et d'hépatite virale, les profils sont modifiés par rapport au

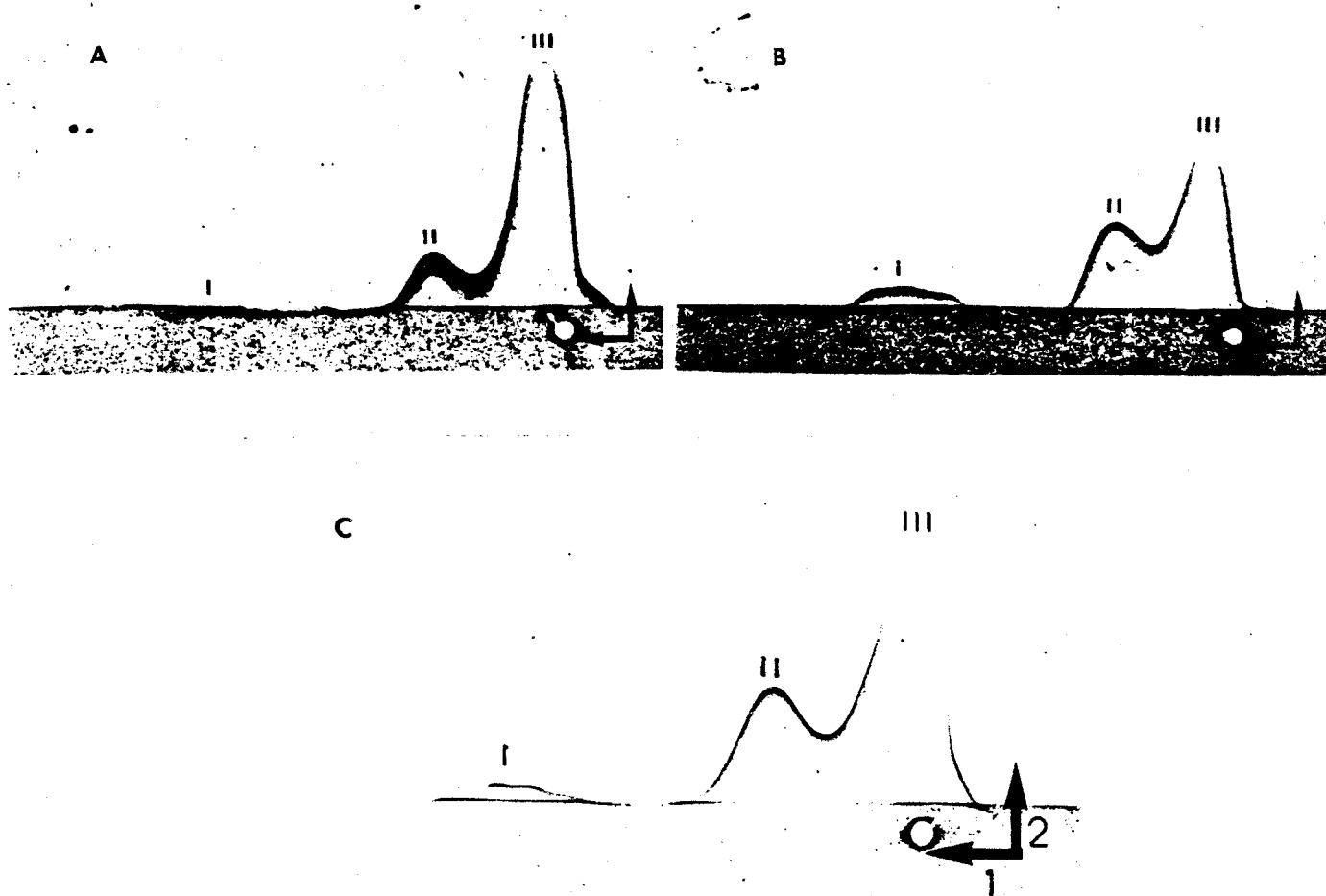


Fig. 29. Electrophorèse d'immunoaffinité de sérums normaux et pathologiques :

- A - Sérum normal
- B - Cirrhose éthylique
- C - Hépatite virale



profil transferrinique du sérum normal. Les proportions des variants I et II semblent augmentées par rapport à celle du variant III.

Ces observations intéressantes nous amènent à penser que des modifications de la répartition des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine interviennent dans les atteintes hépatiques.

Nous avons effectué une étude plus approfondie de ces modifications et avons choisi pour cela d'analyser des sérums de sujets cirrhotiques, ayant à notre disposition un échantillonnage appréciable de sérums de sujets dont les caractéristiques cliniques étaient parfaitement définies.

II - ANALYSE DE SERUMS DE SUJETS ATTEINTS DE CIRRHOSE ETHYLIQUE GRAVE.

Dans un premier temps, nous avons analysé des sérums de sujets normaux et de cirrhotiques éthyliques au stade C du score de Child.

A - Définition du score de Child.

La gravité de la cirrhose éthylique se définit du point de vue clinique, par différents stades établis d'après le score de Child, modifié par Pugh, 1973. Les stades du score de Child sont au nombre de trois : A , B et C. Le tableau XIV p 117 représente les critères principaux qui définissent la cirrhose, avec les différents points attribués selon les variations de ces critères. De 5 à 6 points, la cirrhose est au stade A du score de Child, de 7 à 9 points elle est au stade B, à partir de 10 points elle est au stade C.

B - Définition des patients étudiés.

Nous avons analysé deux populations de sérums :



TABLEAU XIV

Critères définissant les stades du score de Child modifié par Pugh, 1973.

Points attribués définissant le score Critères	1	2	3
Albumine g/l	>35	$30 < \leq 35$	<30
Bilirubine totale g/l	<20	$30 > \geq 20$	≥ 30
Ascite	Absence	Modérée	Abondante
Encéphalopathie	Absence	Modérée	Abondante + Troubles de conscience
Taux de prothrombine %	>60	$40 < \leq 60$	≤ 40

Stades de la cirrhose :

Stade A : Score de Child = 5-6
 Stade B : " = 7-8-9
 Stade C : " \geq 10



1 - Groupe A.

- Sérums provenant de sujets normaux, indemnes de toute intoxication éthylique, sans altérations hépatiques cliniques ou biologiques, provenant d'une population de donneurs de sang de l'Institut Pasteur de Lille*
- Nombre de sujets = 35.

2 - Groupe B.

- Sérums de cirrhotiques éthyliques au stade C du score de Child provenant du Service des Maladies de l'appareil digestif du CHR de Lille.
- Nombre de sujets = 48.

C - Analyse des sérums.

1 - Variations du taux de transferrine des cirrhotiques éthyliques graves.

Dans le cas de cirrhoses éthyliques graves, le taux de transferrine varie considérablement par rapport à la population témoin.

La Fig 30 p119 représente les différentes variations observées. Pour la plupart des sujets cirrhotiques, les valeurs du taux de transferrine se situent bien en-dessous de la moyenne des valeurs de la population de référence.

Dans un cas normal ce taux varie de 450 à 200 mg/dl alors que dans le cas de la cirrhose éthylique au stade C, il varie de 350 à 50 mg/dl.

2 - Modification de la répartition des variants glycaniques de la sérotransferrine

* Nous remercions Monsieur Gentilini, de l'Institut Pasteur de Lille, pour nous avoir fourni les sérums normaux.



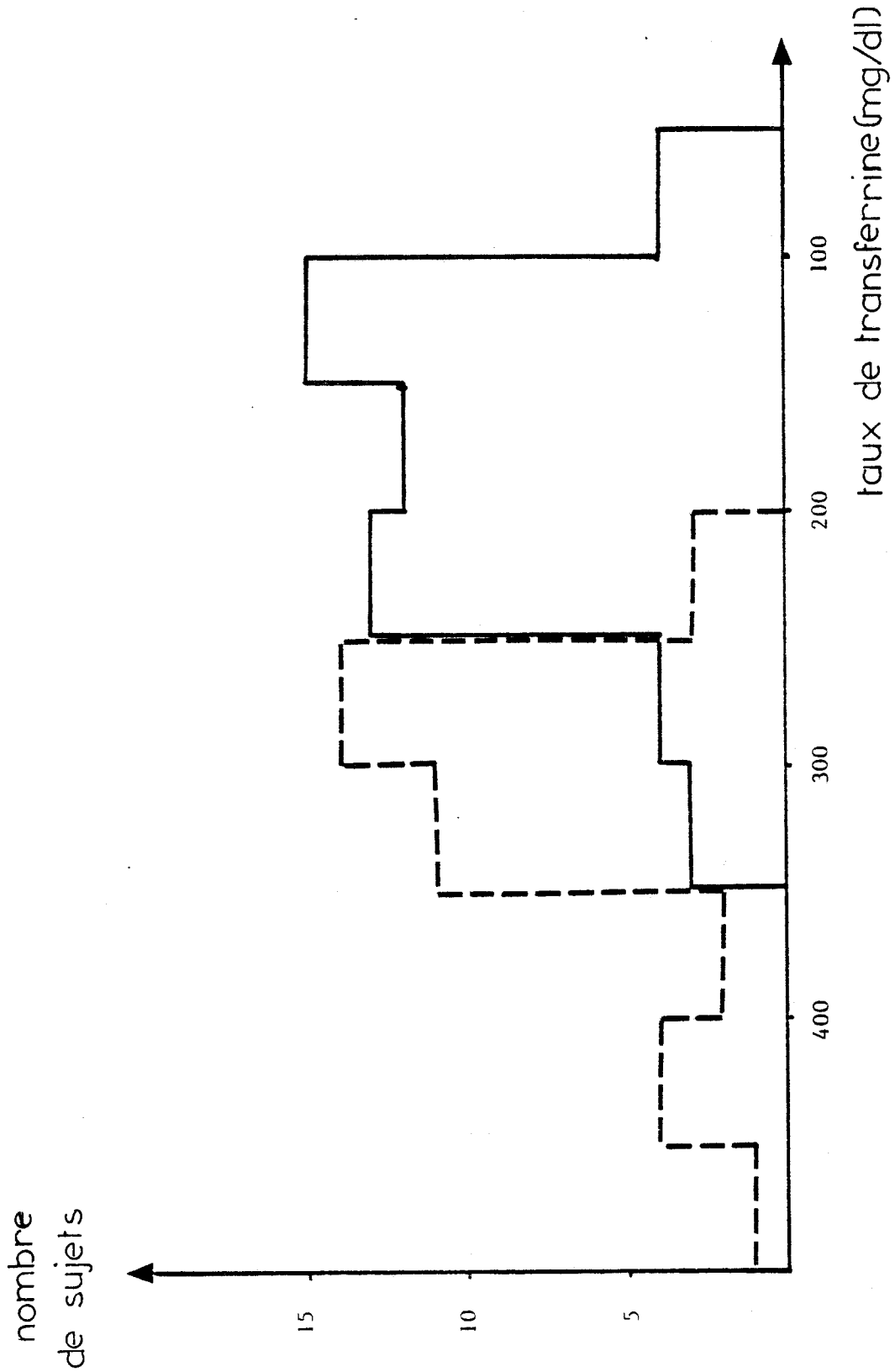


Fig. 30. Taux de transferrine dans les sérums de la population témoin (----) et les sérums de cirrhotiques éthyliques (—).

9US
LILLE

Le tableau XV p121représente les pourcentages apparents des variants I, II et III dans les cas normaux et dans les cirrhoses éthyliques graves.

Une modification importante de la répartition des variants s'observe dans la cirrhose : le variant I passe d'une valeur pratiquement nulle dans la population témoin à un pourcentage de 3,5 % en moyenne; le pourcentage du variant II augmente également de 18,6 à 27,6 % tandis que le pourcentage du variant III diminue de 81,3 à 68,6 %.

Les Fig. 31 et 32 p 122 , nous donnent un meilleur aperçu des variations observées dans les deux cas, en fonction du taux de transferrine. Nous observons pour la population témoin, que le pourcentage des variants II et III est pratiquement inchangé, quel que soit le taux de transferrine sérique. Par contre, dans la population de cirrhotiques, les pourcentages des variants I et II augmentent significativement et celui du variant III diminue tandis que le taux de transferrine est en baisse.

D - Conclusion

Les résultats que nous avons obtenus nous permettent de dégager quelques points essentiels et intéressants :

- Dans les cirrhoses éthyliques graves, le pourcentage apparent des variants glycaniques de la transferrine est modifié.

- Les pourcentages des variants I et II augmentent significativement tandis que celui du variant III diminue.

- L'augmentation des pourcentages n'est constatée que pour les variants porteurs de structures triantennées.



TABLEAU XV

Pourcentage apparent des variants I, II et III dans les sérums normaux et les cirrhoses éthyliques.

Nature des variants transferriniques	Sérums normaux (Population témoin) n = 35	Sérums de cirrhotiques éthyliques n = 48
Variant I	0	3,5 \pm 3,9 *
Variant II	18,6 \pm 2,2	27,6 \pm 4,4 **
Variant III	81,3 \pm 2,2	68,6 \pm 7,8 *

Les valeurs sont exprimées en fonction de la moyenne \pm écart type.

* significativement différent de la population témoin $p < 0,001$

** significativement différent de la population témoin $p < 0,01$



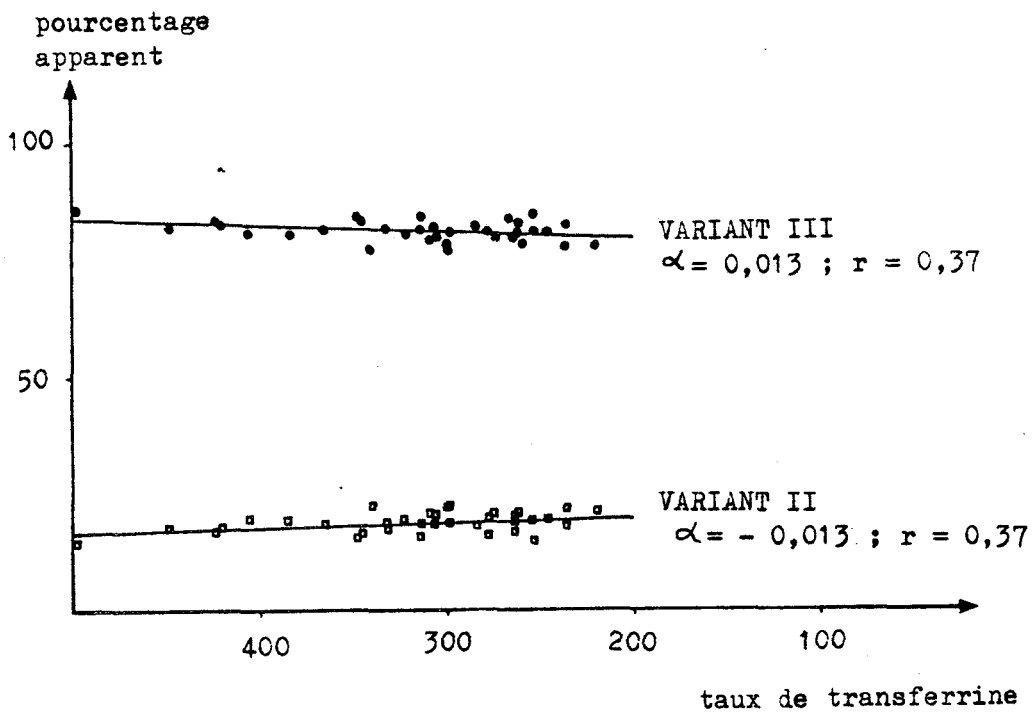


Fig. 31. Modification du pourcentage apparent des variants glycaniques de la sérotransferrine en fonction du taux de transferrine dans les sérums normaux.

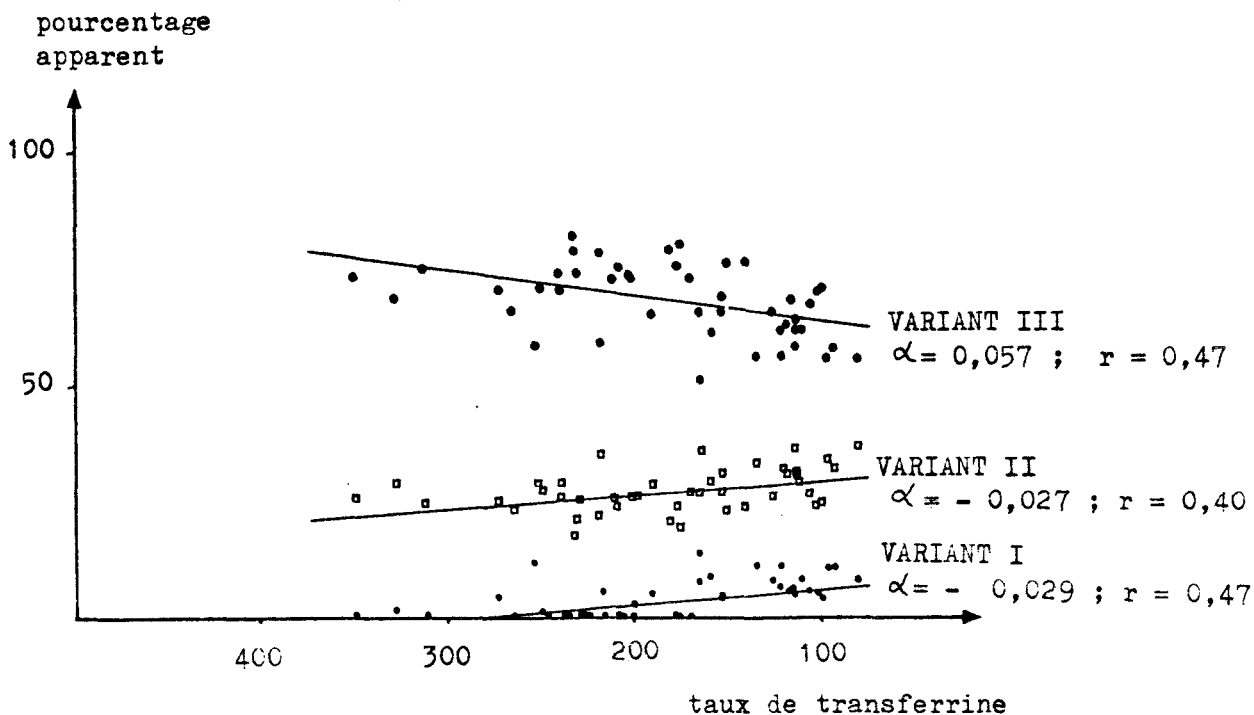


Fig. 32. Modification du pourcentage apparent des variants glycaniques de la sérotransferrine en fonction du taux de transferrine dans les cirrhoses éthyliques stade C.

Cette étude préliminaire nous a permis de mesurer l'importance d'une atteinte hépatique sur la répartition des variants de la transferrine. Cependant, le taux de transferrine des cirrhoses considérées était très bas, et peu comparable à celui de la population témoin. Si les variations observées sont dues à la cirrhose, l'éthylisme accompagnateur de cette atteinte hépatique est-il un facteur qu'il faut prendre en compte ? Observe-t-on ces variations dans les cas de cirrhoses stade A ou B ?

Nous avons entrepris de répondre à ces questions en augmentant le nombre de sujets analysés et en utilisant une méthode statistique performante.

III - ETUDE STATISTIQUE : ANALYSE DISCRIMINANTE LINEAIRE

Cette analyse a été réalisée avec la collaboration précieuse du service de Gastroentérologie et du service informatique du C.H.R. de Lille * . Notre étude porte sur un nombre élevé de sujets normaux, cirrhotiques éthyliques ou non, et éthyliques non cirrhotiques.

A - Définition des groupes de patients.

-191 sérums de sujets normaux et pathologiques ont été étudiés et répartis en quatre groupes.

1 - Groupe A

- Sérums de patients porteurs d'une cirrhose éthylique hospitalisés dans le service des maladies de l'appareil digestif.

* Nous remercions Monsieur le Professeur Cortot, Messieurs Beuscart et Vincent, Madame Wie, pour leur précieuse collaboration.

Nous remercions tout particulièrement Monsieur Colombel pour avoir sélectionné les nombreux sérums nécessaires à notre étude et pour nous avoir aidé dans l'analyse et l'expression de nos résultats.

- Nombre de sujets n = 90
- Age moyen = 53 ans.
- Sexe = 46 femmes, 44 hommes.
- Critères diagnostiques : les patients ont été répartis en fonction du score de Child modifié par Pugh, 19

Dans le cas où le score est inférieur à 8 (nombre de sujets n=18) le diagnostic a été porté sur la P B F (ponction biopsie de foie) confirmant le diagnostic de cirrhose.

Dans le cas où le score est supérieur à 8 (n = 72), le diagnostic a été porté sur les éléments cliniques et biologiques habituels, la P B F n'étant pas pratiquée en raison de troubles de l'hémostase dans la plupart des cas. Tous les patients, outre les éléments du score de Child, réunissaient plus de 6 ou au moins 6 des critères cliniques nécessaires au diagnostic de la cirrhose (ascite, angiomes stellaires, foie à consistance dure et à bord inférieur mince, V.O. en endoscopie)

- Critères pronostiques : là encore on distingue deux groupes en fonction du score de Child :
 - 1er groupe : score < 10 n = 32
 - 2e groupe : score \geq 10 n = 58

Il faut signaler que 58 patients sur les 72 étaient au stade C du score de Child soit un score $>$ 9.

L'éthylisme des patients a été évalué sur une consommation d'alcool pur (vin, bière ou autres) supérieure à 100 g/ jour. Les patients étaient non sevrés.

2 - Groupe B

- Sérums de sujets porteurs d'une cirrhose non éthylique hospitalisés dans le service des maladies de l'appareil digestif.
- Nombre de sujets n = 16
- Age moyen = 54 ans.

- Sexe = 9 femmes, 7 hommes.
- Critères diagnostic : tous les patients ont bénéficié d'une P B F par voie transcutanée ou jugulaire confirmant la cirrhose.
- Ethnologie de la cirrhose | 10 cirrhoses post hépatite virale Hbs +
| 1 cirrhose post médicamenteuse
| 5 cirrhoses biliaires primitives
- Critères pronostiques : 1er groupe : score de Child < 10 n= 15
2e groupe : score de Child >> 10 n= 1
- Tous les patients étaient indemnes de toute intoxication alcoolique.

3 - Groupe C

- Sérums de sujets porteurs d'une hépatopathie éthylique non cirrhotique hospitalisés dans le service des maladies de l'appareil digestif.
- Nombre de sujets n = 21
- Age moyen = 42 ans.
- Sexe = 21 hommes
- Critères diagnostiques : tous les patients ont eu une P B F retrouvant deux types de lésion : stéatose isolée, hépatite alcoolique.

L'éthylisme a été évalué sur une consommation d'alcool pur supérieure à 100 g/ jour. Les patients étaient non sevrés à la date du prélèvement.

4 - Groupe D

- Sérums de sujets témoins indemnes de toute intoxication éthylique sans altérations hépatiques cliniques ou biologiques provenant du service des maladies de l'appareil digestif et d'une population de donneurs de sang de l'Institut Pasteur de Lille considérés comme sains le jour du prélèvement.

- Nombre de sujets n = 64

- Age moyen = 43 ans.

Sexe = 29 hommes, 35 femmes.

B - Etude statistique

Notre analyse porte sur un nombre élevé de variables non indépendantes. Nous avons défini 8 variables dont les valeurs ont été calculées puis introduites dans l'ordinateur, ces variables sont les suivantes :

Variable 1 : numéro du groupe dans lequel est classé le sérum analysé (1 → sujet du groupe A, 2 → sujet du groupe B, 3 → sujet du groupe C, 4 → sujet du groupe D).

Variable n° 2 : valeur du taux de transferrine sérique en mg/dl déterminée par néphélométrie

Variations n° 3,4 et 5 : valeurs des pourcentages apparents des variants III, II et I respectivement.

Variations n° 6,7 et 8 : valeurs des poids des variants III, II et I respectivement exprimés en mg/dl et calculées d'après les pourcentages apparents de chacun des variants et le taux de transferrine correspondant.

Les groupes de patients A, B, C et D servaient à définir la pathologie des sérums étudiés, nous avons défini parmi les 191 sérums globalement étudiés, 8 groupes supplémentaires de sujets individualisés de la façon suivante :

- groupe 1 : sujets non cirrhotiques, non éthyliques ($\bar{C} \bar{E}$), n = 64

- groupe 2 : sujets éthyliques, non cirrhotiques ($\bar{C} E$) n = 21
- groupe 3 : sujets non cirrhotiques éthyliques ou non formés de la réunion du groupe 1 et 2 ($\bar{C} \bar{E} + \bar{C} E$) n = 85
- groupe 4 : sujets cirrhotiques non éthyliques dont le score de Child est < 10 ($C \bar{E}$, Child $< 10 \rightarrow$ stade A et B) n = 15
- groupe 5 : sujets cirrhotiques éthyliques dont le score de Child est < 10 ($C E$, Child $< 10 \rightarrow$ stade A et B) n = 32
- groupe 6 : sujets cirrhotiques éthyliques et non éthyliques dont le score de Child est < 10 formé par la réunion des groupes 4 et 5 ($C E$ et $C \bar{E}$, Child < 10) n = 47
- groupe 7 : sujets cirrhotiques éthyliques et non éthyliques dont le score de Child est ≥ 10 ($C E$ et $C \bar{E}$) Child $\geq 10 \rightarrow$ stade C) n = 59.
- groupe 8 : sujets cirrhotiques éthyliques et non éthyliques quel que soit le score de Child ($C E$ et $C \bar{E}$, \forall Child) n = 106.

1 - Résultats obtenus pour les différents groupes.

Comparaisons unidimensionnelles à l'aide du test t de Student, entre les valeurs de groupes indépendants.

Les résultats obtenus ont été consignés dans le tableau XVI p 128.

Pour chacun des groupes les observations sont les suivantes :

- a - Groupe 1 des patients témoins non cirrhotiques non éthyliques.

La transferrine sérique a une valeur moyenne de 261,9 mg/dl avec des valeurs basses (56,8 mg/dl) pour les sujets dénutris.

Les valeurs moyennes des pourcentages apparents des variants I, II et III sont respectivement de 0,2; 19,3 et 80,5 % avec peu de variations autour de ces moyennes.

TABLEAU XVI

Valeurs du taux de sérotransferrine et des différents variants I, II et III en pourcentage et en poids selon les différents groupes étudiés.

PARAMETRES	GROUPE 1 TEMOIN $\bar{C} \bar{E}$	GROUPE 2 $\bar{C} E$	GROUPE 3 $\bar{C} \bar{E} + \bar{C} E$	GROUPE 4 $C \bar{E} \text{ Child} < 10$	GROUPE 5 $C E \text{ Child} < 10$	GROUPE 6 $C \bar{E} + C E \text{ Child} < 10$	GROUPE 7 $C \bar{E} + C E \text{ Child} \geq 10$	GROUPE 8 $C E + C \bar{E} \text{ Child}$
TRANSFERRINE mg/dl	261,9 \pm 84,4	259,3 \pm 73,6 ns	259	280,1 \pm 91,1 ns	214,4 \pm 54,3 b	234,9 ns	173,2 \pm 61,9 c	201,2 c
POURCENTAGE DU VARIANT III %	80,5 \pm 3,2	80,2 \pm 4,9 ≡	80,4	73,7 \pm 5,8 c	73,2 \pm 8,6 c	73,4 c	68 \pm 8,3 c	70,4 c
POURCENTAGE DU VARIANT II %	19,3 \pm 2,8	19,5 \pm 4,8 ≡	19,4	24,7 \pm 4,3 c	23,7 \pm 5,2 c	24 c	27,6 \pm 4,6 c	26 c
POURCENTAGE DU VARIANT I %	0,2 \pm 0,8	0,3 \pm 0,9 ≡	0,2	1,6 \pm 2,1 a	3,1 \pm 4,4 b	2,6 b	4,4 \pm 4,5 c	3,6 c
POIDS DU VARIANT III mg/dl	211,8 \pm 72	210,6 \pm 68,4 ≡	209,6	206,6 \pm 70,1 ns	159,7 \pm 50,4 b	174,4 a	120,2 \pm 51 c	144,8 c
POIDS DU VARIANT II mg/dl	49,8 \pm 14,3	48 \pm 12,6 ≡	49	69,1 \pm 24,7 b	49,3 \pm 11,9 ≡	55,5 a	46,6 \pm 15,8 ns	50,6 ns
POIDS DU VARIANT I mg/dl	0,3 \pm 1,6	0,6 \pm 2,1 ≡	0,49	4,3 \pm 5,9 b	5,3 \pm 7,5 b	5 b	6,3 \pm 6,9 c	5,7 c

- Les moyennes des valeurs sont exprimées \pm écart type.

- n s : différence non significative par rapport à la valeur du groupe témoin; ≡ : identique, pas de différence par rapport au groupe témoin; a : $p < 0,025$; b : $p < 0,001$; c : $p < 0,0005$

b - Groupe 2 des patients éthyliques, non cirrhotiques.

La valeur moyenne du taux de transferrine sérique est peu différente de celle du groupe 1 : elle est de 259,4 mg/dl. Il en est de même pour les valeurs des pourcentages apparents des variants I, II et III qui sont de 0,3; 19,5 et 80,2 % et celles des poids des variants qui sont similaires.

c - Groupe 4 des sujets cirrhotiques non éthyliques Child < 10

La valeur du taux de transferrine sérique de ce groupe de sujets n'est pas significativement différente de celle du groupe de sujets témoins. Par contre, nous observons une diminution du pourcentage apparent du variant III qui passe de 80,5 % à 73,7 % tandis que le variant II augmente de 19,3 % à 24,7 % et que le variant I augmente de 0,2 à 1,6 %, tous les trois évoluant de façon significative.

La diminution du poids du variant III est faible par rapport au groupe témoin (nous passons de 211,8 à 206,6 mg/dl) tandis que l'augmentation des poids des variants II et I est nette : pour le variant II nous passons d'une valeur de 49,8 mg/dl pour la population témoin, à une valeur de 69,1 mg/dl; dans le cas du variant I les valeurs augmentent de 0,3 à 4,3 mg/dl.

d - Groupe 5 des sujets cirrhotiques éthyliques- Child < 10.

La diminution du taux de transferrine de cette population est plus marquée que pour le groupe précédent : nous atteignons une moyenne de 214,4 mg/dl.

L'évolution des pourcentages des variants est analogue à celle du groupe 4, cependant que l'évolution des poids des variants est différente. Ceci s'explique par la diminution du taux de transferrine des sujets de ce groupe : le poids du variant III diminue (159,7 mg/dl) tandis que celui du variant I augmente (5,3 mg/dl). Le poids du variant II est peu différent du poids des sujets témoins, l'augmentation de son pourcentage est insuffisante par rapport à la diminution du taux de transferrine pour que nous puissions voir un quelconque changement de poids de ce variant.

e - Groupe 6 des sujets cirrhotiques, éthyliques
et non éthyliques Child < 10.

Ce groupe rassemble l'ensemble des sujets des groupes 4 et 5. Il fait abstraction de l'éthylisme et ne tient compte que de la cirrhose, ici aux stades A et B du score de Child.

Nous observons : une diminution non significative du taux de transferrine, ce qui signifie que dans les cirrhoses de stade A et B, indépendamment de l'éthylisme, le taux de transferrine évolue peu par rapport à une population témoin.

Le pourcentage du variant III diminue (73,4 %) tandis que ceux des variants II (24 %) et I (2,6%) augmentent significativement.

L'évolution des poids des variants est moins nette mais cependant observable : le poids du variant III diminue (174,4 mg/dl) tandis que ceux du variant II (55,5 mg/dl) et du variant I (5 mg/dl) augmentent.

f - Groupe 7 des sujets cirrhotiques
éthyliques ou non Child ≥ 10

La diminution du taux de transferrine de ces sujets est

considérable (173,2 mg/dl), elle peut atteindre des valeurs de 80 mg/dl.

L'évolution des pourcentages des variants est hautement significative. C'est dans ce groupe que s'observent les plus grandes différences de valeurs des pourcentages apparents : le pourcentage du variant III est en baisse (68%) tandis que les pourcentages des variants II (27,6 %) et I (4,4 %) sont remarquablement en hausse.

De même, le poids du variant III diminue (120,2 mg/dl) et celui du variant I augmente (6,3 mg/dl). Ici aussi, la valeur moyenne du poids du variant II n'est pas significative, la diminution du taux de transferrine étant considérable par rapport à l'augmentation du pourcentage du variant.

g - Groupe 8 des sujets cirrhotiques éthyliques
ou non, quel que soit le Child.

Cette population regroupe l'ensemble des sujets cirrhotiques éthyliques et non éthyliques, aux stades A, B et C du score de Child. Elle regroupe en fait tous les sujets autres que ceux de la population témoin.

Globalement, nous observons les mêmes faits déjà énoncés précédemment : diminution du taux de transferrine (201,2 mg/dl), du pourcentage et du poids du variant III (70,4 %; 144,8 mg/dl), augmentation du pourcentage des variants II et I (26 %; 3,6 %) et du poids des variants II et I (50,6 mg/dl; 5,7 mg/dl).

h - Conclusion

Au vu de ces résultats nos premières conclusions sont les suivantes :

- le variant III, transferrine portant deux glycannes biantennés sur la même chaîne peptidique, n'est pas modifié chez les patients

éthyliques non cirrhotiques. Il diminue en pourcentage et en taux sérique chez les cirrhotiques sauf chez les cirrhotiques non éthyliques dont le score de Child est < 10 (Stades A et B) où ne diminue qu'en pourcentage.

- le variant II, transferrine portant un glycanne biantenné et un glycanne triantenné, n'est pas modifié chez les éthyliques non cirrhotiques. Il augmente en pourcentage chez l'ensemble des cirrhotiques, il augmente en taux sérique chez les cirrhotiques non éthyliques dont le score de Child est < 10 (Stades A et B).

- le variant I, transferrine portant deux glycanes triantennés, n'est pas modifié chez les éthyliques non cirrhotiques. Il augmente en pourcentage et en taux sérique chez l'ensemble des cirrhotiques

Nous avons représenté dans la Fig. 33 p 133

l'évolution du pourcentage apparent et du poids des variants en fonction de la pathologie.

2 - Analyse discriminante linéaire

L'analyse discriminante linéaire fournit, par l'ensemble des paramètres, la combinaison linéaire de ceux-ci, séparant au mieux deux groupes de sujets.

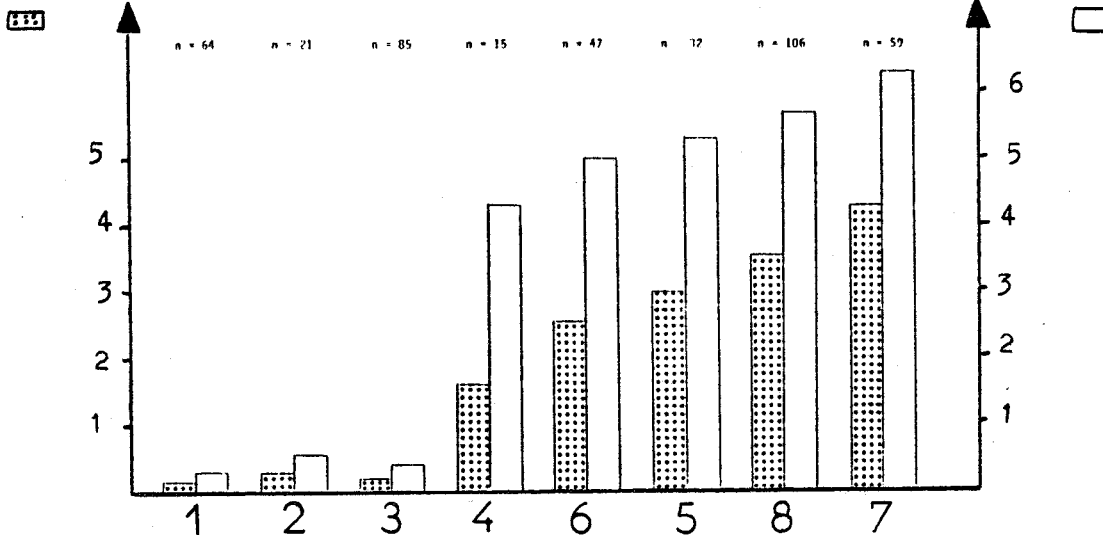
Cette analyse a été effectuée pas à pas, ce qui permet de déterminer successivement le paramètre, les deux paramètres, les trois paramètres , discriminant au mieux ces deux groupes.

L'analyse est définie par une fonction linéaire discriminante
Le tableau XVII p 134 représente l'analyse discriminante linéaire entre les groupes de sujets 8 et 3, c'est-à-dire entre les cirrhotiques de tout stade, éthyliques ou non, et entre les non cirrhotiques éthyliques et non éthyliques.



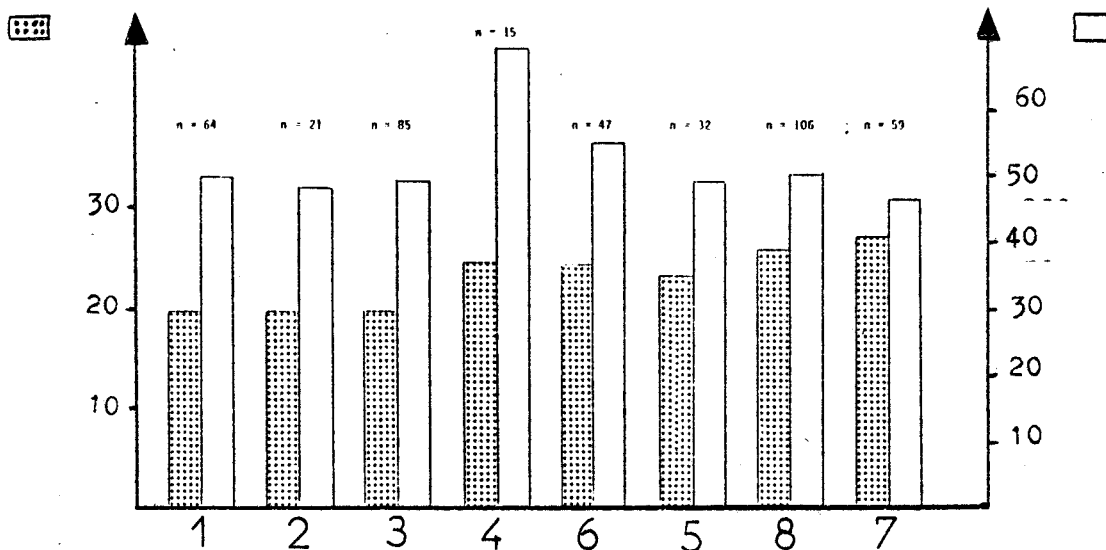
VARIANT I
en %

VARIANT I
en mg/dl



VARIANT II
en %

VARIANT II
en mg/dl



VARIANT III
en %

VARIANT III
en mg/dl

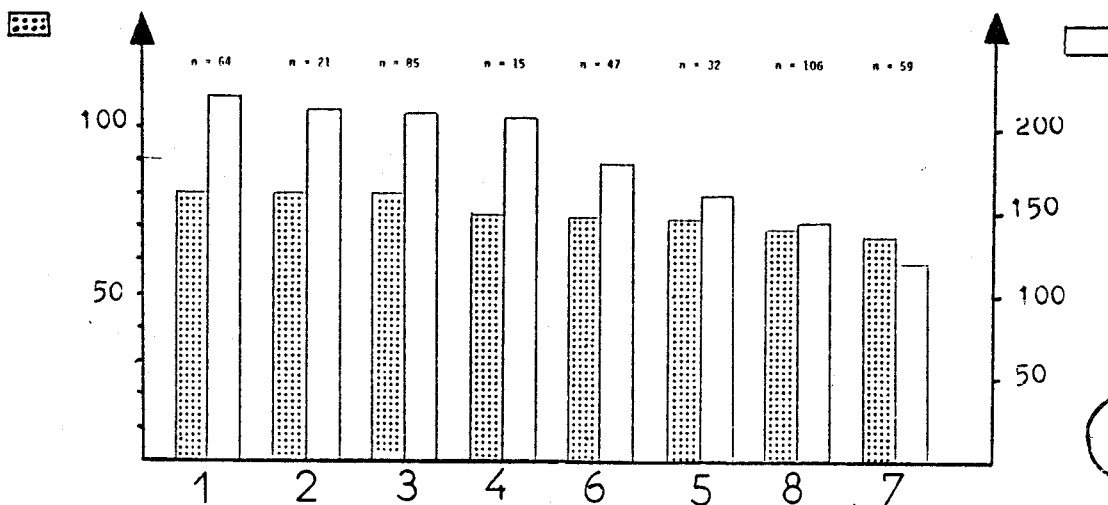


Fig 33. Evolution des variants I , II , III en pourcentage(%) et poids(mg/dl) dans les différents groupes 1 à 8.

(1: $\bar{C}\bar{E}$; 2: $\bar{C}E$; 3: $\bar{C}\bar{E}+\bar{C}E$; 4: $\bar{C}\bar{E}$ Child < 10 ; 5: CE Child < 10 ; 6: $\bar{C}\bar{E}+CE$ Child < 10 ; 7: $\bar{C}\bar{E}+CE$ Child \geq 10 ; 8: $CE+\bar{C}\bar{E}$ Child)

TABLEAU XVII

Analyse discriminante linéaire entre les groupes de sujets cirrhotiques de tout stade, éthyliques ou non et entre les non cirrhotiques éthyliques et non éthyliques.

Pas	Paramètres	Coefficients de la fonction discriminante	Pourcentage de bien classés
1	4 (Variant II %)	- 1,267	78,95
2	8 (Variant I poids)	- 0,127	76,84
3	6 (Variant III poids)	- 0,142	77,37
4	2(Taux de transferrine)	+ 0,127	78,42
5	3 (Variant III %)	- 1,307	78,42
6	5 (Variant I %)	- 1,246	79,47
7	7 (Variant II poids)	- 0,080	79,47

Formule de la fonction linéaire discriminante :

$$F L D = 129,806 + 4x (-1,267) + 8 (-0,127) + 6 x (-0,142) + 2 x (+0,127) + 3 x (-1,307) + 5 (-1,246) + 7 x (-0,080).$$

- La constante de la fonction est 129,806.
- Chaque paramètre est affecté d'un coefficient de la fonction
exemple : le paramètre Variant II % est affecté du coefficient 4.



La fonction discriminante à 7 paramètres permet de classer correctement 79,47 % des sujets. Néanmoins, le seul paramètre "pourcentage du variant II" permet déjà de classer 78,95 % des sujets.

Nous pouvons de même, déterminer pour d'autres groupes, le pourcentage de sujets bien classés par la fonction linéaire discriminante :

- groupes 8 et 1 : 80 % de sujets bien classés
- groupes 7 et 3 : 86,7 % de sujets bien classés
- groupes 7 et 1 : 88,6 % de sujets bien classés

a - Histogramme au Pas 7

L'histogramme donné Fig.34 p 136 représente les valeurs de la fonction linéaire discriminante au pas 7 chez les 191 sujets étudiés.

Sur l'axe horizontal figure les valeurs de la fonction linéaire discriminante de 0,4 en 0,4 unités.

Pour chaque sujet cirrhotique et non cirrhotique, la valeur de la fonction a été calculée d'après l'équation de la fonction. Les sujets dont la valeur de la fonction était proche ont été regroupés par colonne de 0,4 en 0,4 unités.

Les colonnes des sujets non cirrhotiques sont représentées en-dessous de l'axe horizontal, les colonnes des sujets cirrhotiques au-dessus.

Sur l'histogramme, les sujets cirrhotiques bien classés par la fonction linéaire discriminante sont situés à droite de l'axe vertical (fonction = 0), les sujets non cirrhotiques bien classés étant à gauche.

La moyenne de la fonction pour les sujets cirrhotiques est de + 0,68, pour les non cirrhotiques elle est de - 0,86.



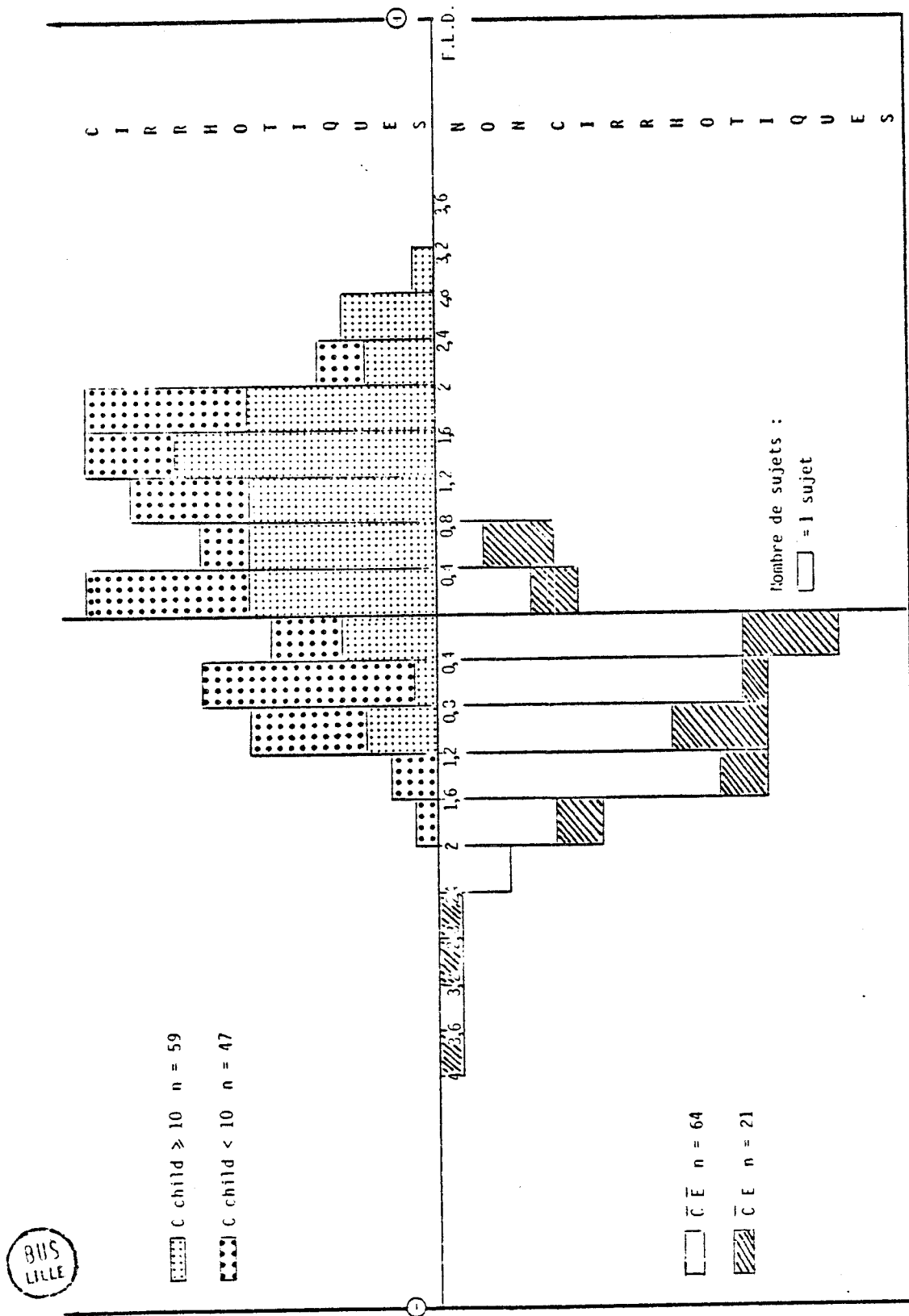


Fig. 34. Valeur de la fonction linéaire discriminante au pas 7 chez les 191 sujets .

b - Calcul des sensibilité et spécificité (Jenicek, 1980)

La sensibilité d'un signe est définie par le rapport du nombre de malades qui ont le signe pathologique sur l'ensemble des malades. Elle représente la fréquence du signe dans la maladie. Ici, si le signe est défini comme l'ensemble de l'évolution des 7 paramètres, la sensibilité chez les cirrhotiques est de 0,74.

La spécificité d'un signe est définie par le rapport du nombre de sujets indemnes avec un résultat d'examen normal à l'ensemble des sujets indemnes. Une spécificité égale à 1 caractérise un signe patognomonique. Sa présence affirme le diagnostic. La spécificité est ici chez les cirrhotiques de 0,9.

La sensibilité et la spécificité du signe permettraient d'étudier les valeurs prédictives positives (probabilité de l'existence d'une cirrhose quand le signe est présent) et négatives (probabilité de l'absence de cirrhose quand le signe est absent). Mais l'interprétation de ces valeurs nécessite la connaissance de la prévalence de la cirrhose dans la population.

Ne connaissant pas cette prévalence, nous ne pouvons calculer que l'indice de Youden (Youden, 1950) qui ne fait pas intervenir la prévalence.

$$\underline{\text{Indice prédictif}} = S e + S p - 1 = 0,9 + 0,74 - 1 = \underline{0,64}$$

IV - DISCUSSION

La répartition des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine est modifiée dans le cas de la cirrhose, qu'elle soit éthylique ou non. Par contre, l'éthylisme seul ne modifie pas cette répartition : ni le

pourcentage, ni le poids des variants I, II et III ne sont changés significativement par rapport à un groupe de sujets témoins. L'atteinte hépatique est par conséquent "Nécessaire" aux bouleversements observés dans les pourcentages et les taux sériques des variants glycaniques. L'éthylisme n'intervient pas.

Les paramètres que nous avons défini dans l'analyse discriminante linéaire nous permettent de "bien classer" 79,47 % des 191 sujets que nous avons étudiés. Ce qui signifie que les modifications de la répartition des variants, tant en pourcentage, qu'en poids, sont suffisantes dans 79,47 % des cas étudiés pour déterminer si un sujet est cirrhotique ou non.

Si nous considérons uniquement les sujets cirrhotiques éthyliques ou non au stade C du score de Child par rapport à la population témoin de sujets non cirrhotiques et non éthyliques, les 7 paramètres nous permettent de "bien classer" 88,6 % des sujets étudiés.

Dans d'autres termes, plus l'atteinte hépatique est grave, plus les modifications de la répartition des variants sont significatives.

Ceci se vérifie d'autant plus dans la mesure où l'indice prédictif, déterminé par le calcul de la sensibilité et de la spécificité des signes, est de 0,64.

Cependant, dans la pratique clinique, l'interprétation de ces valeurs nécessiterait la connaissance de la prévalence de la cirrhose dans la population.

Par comparaison, Seitz et al., 1983 ont découvert une nouvelle technique sophistiquée pour définir le diagnostic de la cirrhose : l'ultra-sonographie. Par l'utilisation de cette méthode les meilleurs indices prédictifs calculés à partir de la sensibilité et de la spécificité de

deux signes : la splénomégalie et l'hypertrophie du lobe hépatique de Speegel sont respectivement de 0,60 et 0,59. En outre, l'ultrasonographie permet de bien classer 73 % des sujets analysés.

Nous avons observé une augmentation des pourcentages des variants I et II dans le cas de la cirrhose, quelle qu'elle soit. Or ces deux variants renferment les structures glycaniques triantennées.

Dans certains cas pathologiques, une augmentation du taux des glycanes triantennés et tétraantennés de quelques glycoprotéines a été constatée : pour les Ig M de Waldenström (Cahour et al., 1982), dans certaines membranes cancéreuses et de cellules transformées (Tasaki et al., 1980; Smets, 1983; Montreuil et al., 1983).

Ces observations nous amènent à penser que le pourcentage des structures triantennées de la sérotransferrine humaine est augmenté. Dans le cas de la cirrhose éthylique, c'est non seulement la synthèse mais aussi l'excrétion de la transferrine qui sont affectées par l'atteinte hépatique. Nous pouvons supposer que la biosynthèse des glycanes de la transferrine est perturbée, et que la synthèse du glycanne de structure triantennée est augmentée au détriment de la structure biantennée.

La modification de la répartition des variants peut aussi, en partie, être due à une désialylation partielle des glycanes des variants. Stibler et al., 1981 ont observé que dans le cas de la cirrhose, la transferrine pouvait être désialylée à 30%. La présence de l'acide N-acétylneuraminique, chargé négativement, intervient dans la migration électrophorétique. Il faudrait donc envisager une étude sur la désialylation des variants glycaniques de la sérotransferrine et voir dans quelle mesure elle interviendrait sur les modifications du pourcentage des variants.

ROLE DES GLYCANNES DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE DANS LE
MECANISME DE RECONNAISSANCE CELLULAIRE

Nous avons caractérisé trois variants glycaniques de la sérotransferrine humaine par chromatographie d'affinité et électrophorèse d'immunoaffinité. Des modifications importantes dans la répartition des variants interviennent dans le cas de la cirrhose. Or, dans cette atteinte hépatique, une surcharge en fer au niveau du foie a été constatée. Nous avons vu dans le chapitre des généralités, que Regoeczi et ses collaborateurs avaient déterminé des constantes d'association pour différents variants glycaniques de l'asialosérotransferrine, ceci dans l'étude du récepteur d'Ashwell. Ces constantes variaient d'un facteur 10 à 100 selon qu'il s'agissait de variants portant des structures biantennées ou bi et triantennées sur leur chaîne peptidique. Nous avons étudié l'interaction des différents variants avec les récepteurs hépatocytaires et plus particulièrement le transfert du fer de ces trois variants, afin de mettre en évidence un éventuel rôle des glycanes dans cette interaction.

Nous avons également tenté de définir le rôle des glycanes dans l'interaction des variants glycaniques de la sérotransferrine avec les récepteurs réticulocytaires. Ce travail avait déjà été abordé par Tordera en 1978 et Michel en 1981. Leurs expériences sur l'inhibition du transfert du fer par l'emploi d'oligosaccharides et de glycopeptides, n'ont pas permis d'attribuer clairement un rôle particulier au glycanne de la sérotransferrine de lapin. De même, Léger et al., résultats non publiés, ont montré que la déglycosylation de la transferrine ne modifie en rien le passage du fer dans les réticulocytes. Nous avons voulu con-

firmer ou infirmer ces résultats en étudiant les cinétiques d'incorporation du fer des trois variants glycaniques I, II et III dans les réticulocytes.

I - INTERACTION DES VARIANTS GLYCANIQUES DESIALYLES DE LA SEROTRANSFERRINE

AVEC LES RECEPTEURS HEPATOCYTAIRES D'ASHWELL.

L'étude de l'incorporation du fer des variants désialylés a été réalisée en système hétérologue : asialotransferrine humaine/ hépatocytes de rat.

La cinétique d'incorporation du fer des trois variants désialylés par les hépatocytes est représentée dans la Fig. 35 p 142 Ces résultats montrent que la nature de la partie glycanique de la glycoprotéine intervient dans le processus de transfert du fer.

Cette étude complète les résultats obtenus par Regoeczi et al., 1979, et pour lesquels les constantes d'affinité de l'asialotransferrine portant un glycanne biantenné et un glycanne triantenné, pour les hépatocytes de rat, sont 100 à 10 fois supérieures à celle de l'asialotransferrine portant deux glycannes biantennés (Tableau VII p 66)

La constante d'association de l'asialotransferrine portant deux glycannes triantennés n'a pas encore été déterminée, cependant les études réalisées sur d'autres glycoprotéines montrent que les structures tétra puis triantennées ont plus d'affinité pour le récepteur d'Ashwell que les structures biantennées.

Il semblerait que le variant I portant deux glycannes triantennés possède non seulement une forte affinité pour le récepteur d'Ashwell mais aussi transferrait son fer plus rapidement que les autres variants.

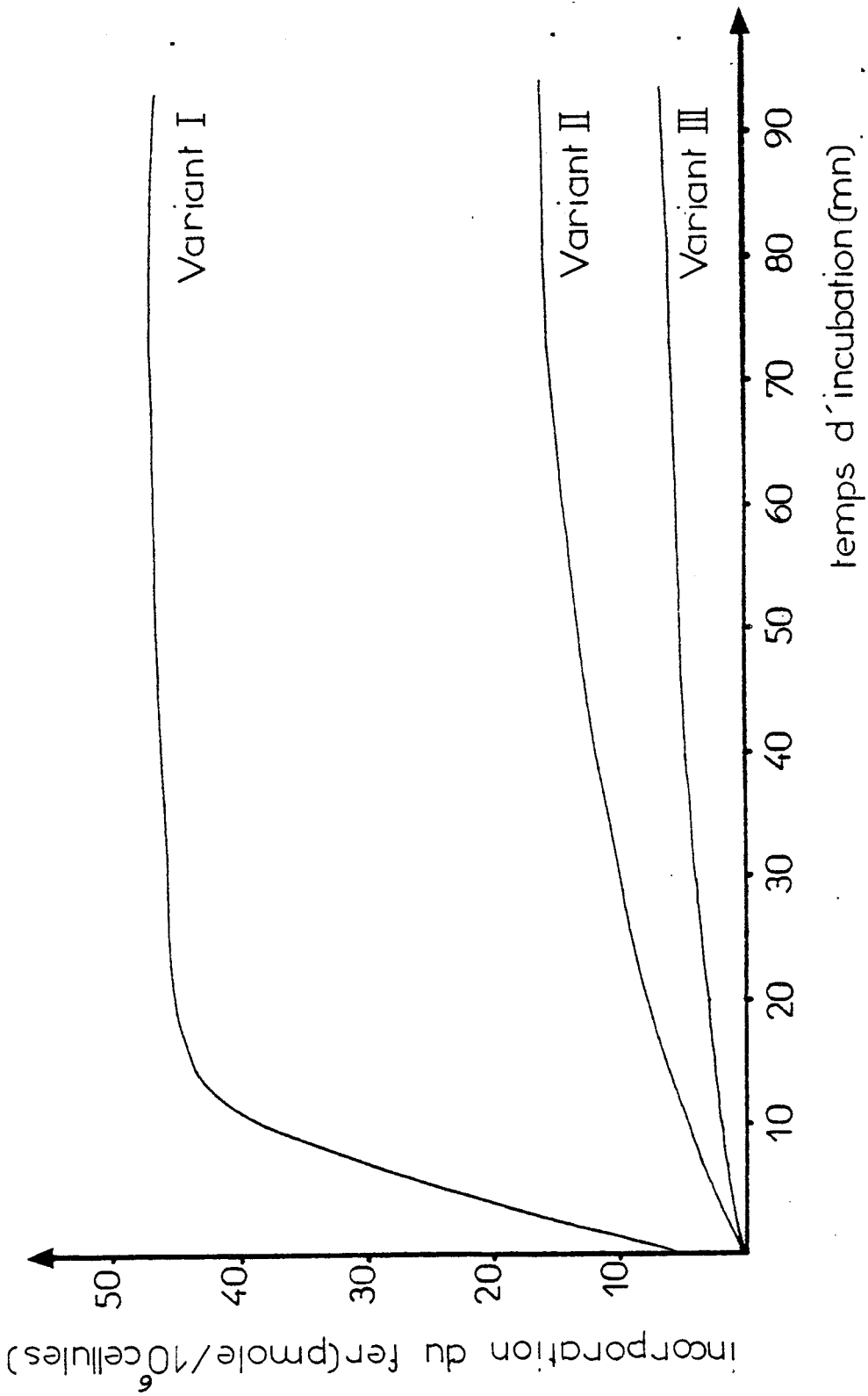


Fig. 35. Cinétique d'incorporation du fer des variants I, II et III d'ésialylés par les hépatocytes. Le volume des incubats est de 1 ml contenant 60 μ g de glycoprotéine/ml (750 nM) et $1,5 \times 10^7$ hépatocytes/ml.

INUS
LILLE

II - INTERACTION DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE

AVEC LES RETICULOCYTES.

Les incorporations du fer ont été effectuées en système hétérologue : sérotransferrine humaine / réticulocytes de lapin. Les trois variants ont été utilisés sous formes sialylés et désialylés.

A - Interaction des variants sialylés avec les réticulocytes.

La Fig. 36 p 144 représente le nombre de p mole de ^{59}Fe incorporées pour 1×10^6 réticulocytes en fonction du temps. Aucune différence d'incorporation n'a pu être observée quel que soit le variant qui transferrait son fer aux réticulocytes.

B - Interaction des variants désialylés avec les réticulocytes

La Fig. 37 p 144 représente la cinétique d'incorporation du fer des variants désialylés dans les réticulocytes. Dans ce cas, comme dans le précédent, nous n'observons pas de différence d'incorporation du fer. Le fait que les variants soient sialylés ou non n'intervient absolument pas dans le mécanisme de reconnaissance cellulaire.

C - Conclusion

Nous avons démontré que la cinétique d'incorporation du fer des trois variants de la transferrine, sialylés ou non sialylés, par les réticulocytes, est indépendante du type de glycosylation des composants étudiés. Ces résultats associés à ceux de Tordera, 1978, Michel, 1981 et Léger et al., résultats non publiés, démontrent sans ambiguïté que la fraction glycanique de la sérotransferrine humaine n'intervient pas dans le transfert du fer aux réticulocytes de lapin.

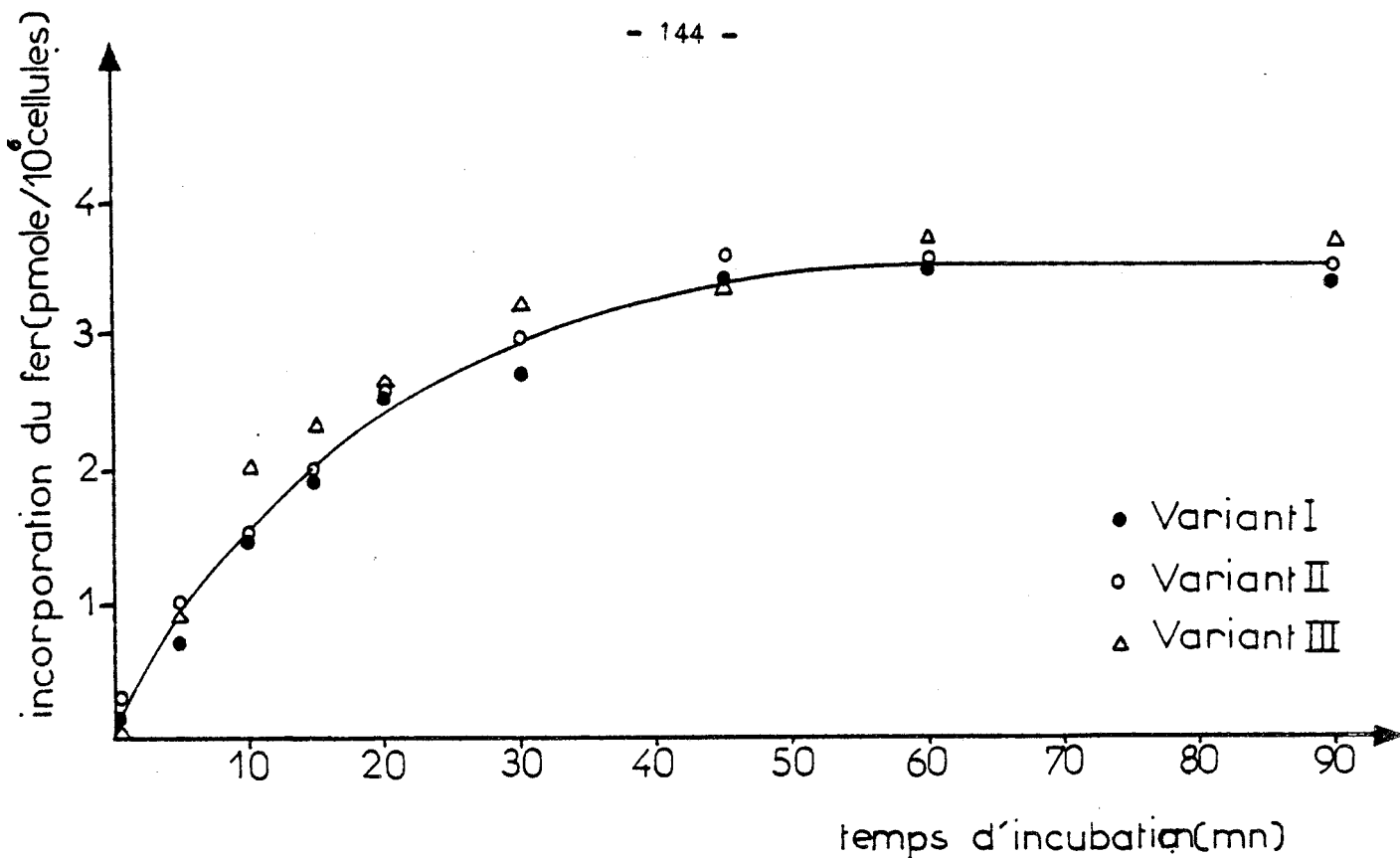


Fig. 36. Cinétique d'incorporation du fer des variants I, II et III sialylés par les réticulocytes. Le volume des incubats est de 650 μ l contenant 50 μ g de glycoprotéine/ml (625 nM) et $1,86 \times 10^8$ réticulocytes/ml.

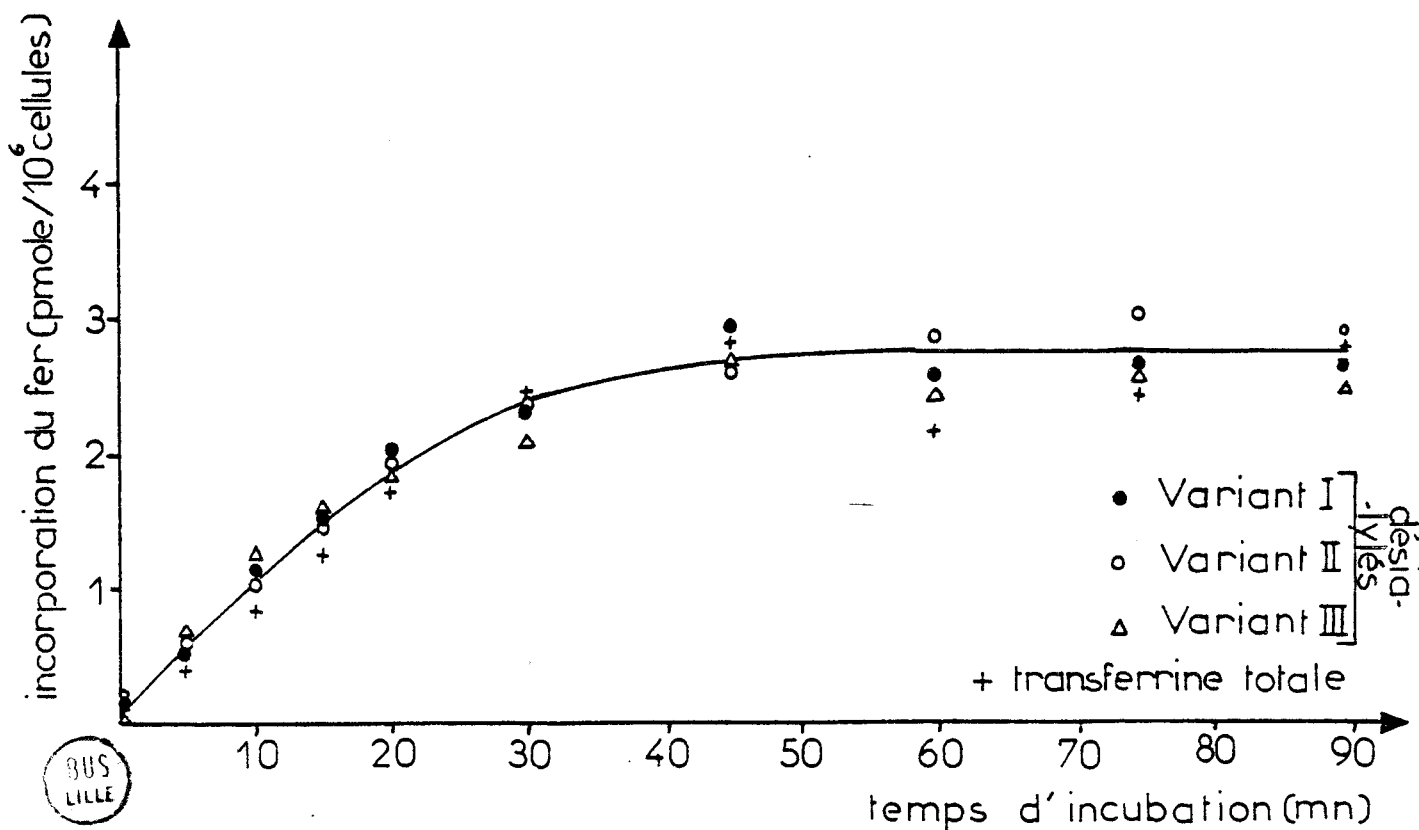


Fig. 37. Cinétique d'incorporation du fer des variants I, II et III désialylés et de la transferrine totale sialylée par les réticulocytes. Le volume des incubats est de 950 μ l contenant 70 μ g de glycoprotéine/ml (870 nM) et $3,85 \times 10^8$ réticulocytes/ml.



III - CONCLUSION

Les glycanes de la sérotransferrine humaine ne semblent jouer aucun rôle dans le transfert du fer de la glycoprotéine aux réticulocytes. Par contre, ils semblent intervenir au niveau du transfert du fer dans les hépatocytes. Le transfert du fer du variant I désialylé possédant deux glycanes triantennés est plus important que le transfert du métal à partir des variants II et III désialylés.

Nous avons constaté, dans le cas de la cirrhose éthylique, que le pourcentage apparent du variant I augmente de façon considérable alors que le taux de transferrine, à l'inverse, diminue. Cette diminution du taux de transferrine et donc du transporteur de fer, pourrait être compensée par l'augmentation du variant qui transfère le fer plus rapidement et dont l'affinité pour les récepteurs hépatiques d'Ashwell est la plus forte.

L'augmentation du pourcentage du variant I ainsi que l'augmentation du transfert du fer de ce variant, désialylé, pourrait expliquer la surcharge en fer observée dans les cas de cirrhoses.



CONCLUSIONS GENERALES

L'ensemble des recherches que nous avons effectuées sur la sérotransferrine humaine, nous a permis de mettre en évidence l'existence de trois variants glycaniques et de préciser la structure des deux glycanes N-acétyllactosaminiques de type triantenné. D'autre part, les modifications de la répartition des variants glycaniques de la sérotransferrine ont été analysées lors d'atteintes hépatiques et le rôle des glycanes triantennés, dans les mécanismes de reconnaissance cellulaire a été étudié. Les résultats obtenus peuvent se résumer de la manière suivante :

1 - La chromatographie d'affinité sur colonne de concanavoline A-Sépharose des glycopeptides de la sérotransferrine humaine nous a permis d'isoler une fraction glycopeptidique non retenue sur colonne et une fraction retenue dans les proportions de 15 % et de 85 % respectivement. L'application des techniques classiques de détermination de la structure des glycanes : méthanolyse, méthylation couplée à la spectrométrie de masse et Résonance Magnétique Nucléaire, nous a permis de démontrer que la fraction glycopeptidique non retenue sur colonne était constituée d'un mélange de deux glycopeptides N-acétyllactosaminiques triantennés. Le glycopeptide qui renferme l'antenne supplémentaire liée en (β 1-4) sur le Man 4 existe dans une proportion 6 fois plus importante que le glycopeptide isomère possédant l'antenne supplémentaire liée en (β 1-6) sur le Man 4'. Dans les deux cas, l'acide N-acétylneuraminique se trouve lié par une liaison (α 2-3) sur le galactose de la 3^{eme} antenne.

2 - Nous avons séparé trois variants glycaniques de la sérotransferrine humaine par chromatographie d'affinité sur colonne de concanavaline A. Nous avons établi la structure des glycannes de ces variants et défini leur répartition sur la chaîne peptidique de la transferrine. Nos résultats seraient en faveur de la répartition suivante :

- Variant I : deux glycannes triantennés.
- Variant II : un glycanne biantenné et un glycanne triantenné.
- Variant III : deux glycannes biantennés.

3 - La présence des trois variants glycaniques de la sérotransferrine a été confirmée par électrophorèse d'immunoaffinité en présence de concanavaline A.

4 - L'étude des modifications de la répartition des trois variants glycaniques de la transferrine a été étudiée par électrophorèse d'immunoaffinité dans les cas d'atteintes hépatiques. Une étude statistique a été réalisée sur 191 cas répartis en quatre groupes (sujets non cirrhotiques, non éthyliques témoins; sujets non cirrhotiques éthyliques; sujets cirrhotiques, non éthyliques; sujets cirrhotiques éthyliques) Des variations ont été observées dans le cas de la cirrhose qu'elle soit éthylique ou non. L'éthylisme n'intervient pas dans le changement de répartition des variants. Les pourcentages des variants I et II, porteurs de structures glycaniques triantennées, augmentent significativement par rapport à la population témoin. L'analyse discriminante linéaire réalisée sur les 191 sujets nous a permis d'apprécier l'intérêt clinique d'une telle modification dans la répartition des variants glycaniques de la sérotransferrine . La valeur de l'indice prédictif est une confirmation supplémen-

taire de la fiabilité de ces critères. Ces résultats pourraient être utilisés comme critères supplémentaires dans la détermination du diagnostic de la gravité de la cirrhose, à condition toutefois de connaître la prévalence de la cirrhose sur la population.

5 - L'étude du rôle des glycanes lors de la fixation et du transfert du fer a été réalisée en prenant comme modèle les hépatocytes de rat. Les résultats obtenus ont montré que les vitesses d'incorporation du fer des variants glycaniques I et II, désialylés, sont respectivement 9 fois et 3 fois supérieures à celle du variant III désialylé. Nous avons conclu que les glycanes de la sérotransferrine jouent un rôle dans la reconnaissance des récepteurs membranaires des hépatocytes de rat et dans le transfert du fer.

Par contre, l'étude du transfert du fer des trois variants, sialylés ou non, par les réticulocytes de lapin, nous a permis de conclure que les glycanes ne jouent aucun rôle dans l'interaction avec les récepteurs membranaires de ces cellules.

Il serait intéressant, au vu des résultats obtenus par l'analyse de sérums de cirrhotiques, de poursuivre l'étude de la modification de la répartition des variants glycaniques de la sérotransferrine : non seulement dans d'autres atteintes hépatiques, mais également, pendant la grossesse où à l'inverse des cas étudiés, le taux de transferrine sérique augmente.

De même, notre travail pourra être complété par la détermination des constantes d'association des trois variants transferriniques, sialylés ou non, sur les hépatocytes et les réticulocytes. Ces résultats venant confirmer les différences dans la fixation de la protéine des trois variants transferriniques sur les récepteurs membranaires.

BIBLIOGRAPHIE

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

- AASA R., MALMSTROM B., SALTMAN P., VANNGARD T., *Biochim. Biophys. Acta*, 75 (1963) 203-222 (16)
- AISEN P., in "Iron in Biochemistry and Medicine", II, ed. A. Jacobs et M. Worwood, Academic Press, London et New-York, (1980) 87-129 (16-17)
- AISEN P., *Biological Aspects of Metal and Metal- Related Diseases*, Bibudhendra Sarkar (ed.), Raven Press, New-York, (1983) 67-80 (72)
- AISEN P., AASA R., REDFIELD A.G., *J. Biol. Chem.*, 244 (1969) 4628 (17)
- AISEN P., BROWN E.B., *Prog. Hematol.*, 9 (1975) 25-56 (5)
- AISEN P., BROWN E.B., *Semin. Hematol.*, 14 (1977) 31-53 (5-16-17)
- AISEN P., LEIBMAN A., *Biochim. Biophys. Acta*, 257 (1971) 314-323 (16)
- AISEN P., LEIBMAN A., *Biochim. Biophys. Acta*, 304 (1973) 797-804 (59)
- AISEN P., LEIBMAN A., ZWEIR J., *J. Biol. Chem.*, 253 (1978) 1930-1937 (19)
- AISEN P., LISTOWSKY I., *Annu. Rev. Biochem.*, 49 (1980) 357-393 (5-20-51)
- AL HILAL P., BAKER E., CARLISLE C.H., GORINSKY B., HORSBURG R.L., LINDLEY P.F., MOSS D.S., SCHNEIDER H., STIMPSON R., *J. Mol. Biol.*, 108 (1976) 255-257 (6)
- ASHWELL G., HARFORD J., *Ann. Rev. Biochem.*, 51 (1982) 531-554 (62)
- ASHWELL G., MORELL A.G., *Adv. Enzymol.*, 41 (1974) 99-128 (62)
- ASHWELL G., MORELL A.G., in "The Glycoconjugates" (M.I. Horowitz and W. Pigman, eds), vol. II (1978) 231-234. Academic Press, New-York (62)
- AUBERT J.P., BISERTE G., LOUCHEUX-LEFEBVRE M.H., *Archs. Biochem. Biophys.*, 175 (1976) 410-418 (26)
- BAENZIGER J.U., MAYNARD Y., *J. Biol. Chem.*, 255 (1980) 4607-4613 (64)
- BAKER E., MORGAN E.H., *Biochemistry*, 8 (1969) 2954-2958 (52-53-55-60)
- BAKER R., MORTON A.G., TAVILL A.S., *Br. J. Haematol.*, 45 (1980) 607-620 (74)
- BALDWIN D.A., *Biochim. Biophys. Acta*, 623 (1980) 183-198 (20)
- BARAONA E., LEO M.A., BOROWSKY S.A., LIEBER C.S., *Science*, 190 (1975 a) 794-795 (42)
- BARAONA E., LEO M.A., BOROWSKY S.A., LIEBER C.S., *Gastroenterology*, 69 (1975 b) 805 (42)
- BARAONA E., LEO M.A., BOROWSKY S.A., LIEBER C.S., *J. Clin. Invest.*, 60 (1977) 546-554 (44)
- BARAONA E., LIEBER C.S., *Annu. Rev. Med.*, 33 (1982) 281-292 (44)
- BARKAN G., *Ztschr. Physiol. Chem.*, 171 (1927) 194-221 (4)

- BAYARD B., KERKAERT J.P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95 (1980) 777-784 (26-29)
- BAYARD B., KERKAERT J.P., *Eur. J. Biochem.*, 113 (1981) 405-414 (26-29)
- BAYARD B., KERKAERT J.P., ROUX D., STRECKER G., in *Protides of Biological Fluids*, Pergamon Press, (1979) 153-156 (82-84-108)
- BAYARD B., MONTREUIL J., *Actes du Colloque International n° 221 du C.N.R.S. sur les Glycoconjugués*, C.N.R.S. (Eds), Paris, (1974) 209-218 (83)
- BECKER W., *Immunochemistry*, 6 (1969) 539-546 (80)
- BEELEY J.G., *Biochem. J.*, 159 (1976) 335-345 (26)
- BEZKOROVAINY A., *Biochim. Biophys. Acta*, 127 (1966) 535 (54)
- BEZKOROVAINY A., in "Biochemistry of Nonheme Iron", by A. Bezkorovainy, Plenum Press, New-York and London, (1980) 127-206 (16)
- BEZKOROVAINY A., ZSCHOCKE R.H., *Arzneim-Forsch. (Drug Res.)*, 24 (1974) 476-485 (5)
- BØG- HANSEN T.C., PRAHL P., LØWENSTEIN H., *J. Immunol. Methods*, 22 (1978) 293-307 (81)
- BONNET M., KHALIC F., GUIBAUD S., *Comptes rendus du 4^e Colloque de Biologie Prospective*, Paris, Masson, (1978) 667-672 (36)
- BOTHWELL T.H., CHARLTON R.W., COOK J.D., FINCH C.A., in "Iron metabolism in Man". Blackwell (Ed.) (1979) (34)
- BRISSON J.R., CARVER J.P., *Biochemistry*, 22 (1983) 1362-1368 (30)
- CAHOUR A., HARTMAN L., DEBEIRE P., MONTREUIL J., *Biochem.J.*(1983)(139)
- CHAPMAN R.W., MORGAN M.Y., BELL R., SHERLOCK S., *Gastroenterology*, 84 (1983) 143-147 (45)
- CHASTEEN N.D., *Coord. Chem. Rev.*, 22 (1977) 1-36 (16-17-19)
- CHOPIN N. GELLER A., ALEXANDRE J., DUMONT G., BEFIDI R., LASTRAS J., LENOIR G., *Presse Médicale*, 12 (1983) 959 (36)
- COLE E.S., NUNEZ M.T., GLASS J., in *Proteins of Iron Storage and Transport*, VI th International conference, July 11-14, 1983 Sapporo, Japan, 66 (52)
- DAVOUST J., MICHEL.V., SPIK G., MONTREUIL J., DEVAUX P.F., *FEBS-Lett*, 125 (1981) 271-276 (30)
- DEBANNE M.T., CHINDEMI P.A., REGOECZI E., *J. Biol. Chem.*, 256 (1981) 4929-4933 (64-65-66-67)

DEBANNE M.T., EVANS W.H., FLINT N., REGOECZI E., Nature, 298 (1982)
398-400 (70)

DEBANNE M.T., REGOECZI E., J. Biol. Chem., 256 (1981) 11266-11272 (70)

DEBRAY H., DECOUT D., STRECKER G., SPIK G., MONTREUIL J., Eur. J.
Biochem., 117 (1981) 41-45 (91)

DONOVAN J.W., BEADSLER R.E., ROSS K.P., Biochem. J., 153 (1976) 631-639 (12)

DONOVAN J.W., ROSS K.P., J. Biol. Chem., 250 (1975) 6026 (12)

DORLAND L., HAVERKAMP J., SCHUT B.L., Vliegenthart J.F.G., SPIK G.,
STRECKER G., FOURNET B., MONTREUIL J., FEBS-Lett, 77 (1977) 15-20 (21-90)

DOUY A., GALLOT B., Biopolymers 19 (1980 a) 493 (30-32)

DOUY A., GERVAIS M., GALLOT B., Macromol. Chem., 181 (1980 b) 1199 (30-32)

DREYFUS B., dans "La Pathologie médicale" de Vallery-Radot, Hamburger et
F. Lhermitte, Flammarion medecine sciences, 1975 (34)

EDWARDS S.A., FIELDING J., Br. J. Haematol., 20 (1971) 405-416 (55)

EGYED A., in "Proteins of Iron Metabolism" Brown et al., (Eds) Grune
and Stratten, New-York, (1977) 237-244 (60)

ENDO M., SUZUKI K., SCHMID K., FOURNET B., KARAMANOS Y., MONTREUIL J.,
DORLAND L., VAN HALBEEK H., Vliegenthart J.F.G., J. Biol. Chem., 257
(1982) 8755-8760 (99-100)

EVANS W.H., Biochim. Biophys. Acta, 604 (1980) 27-64 (64)

EVANS W.H., Hepatology, 1 (1981) 452-458 (64)

EVANS R.W., WILLIAMS J., Biochem. J., 173 (1978) 543-552 (12)

EVANS G.W., WINTER T.W., Biochem. Biophys. Res. Commun., 66 (1975)
1218-1224 (17)

FAULK W.P., HSI B.L., STEVENS P.J., Lancet ü (1980) 390 (76)

FEENEY R.E., KOMATSU S.K., in "Structure and Bonding" Vol. 1, Springer
Berlin Heidelberg, New-York, (1966) 149 (16)

FERNANDEZ-POL J.A., KLOS D.J., Biochemistry 19 (1980) 3904 (76)

FIELDING J., SPEYER B.E., Biochim. Biophys. Acta, 363 (1974) 387-396 (56)

FINCH C.A., HOSAIN F., MORGAN E.H., MARSAGLIA G., GIBLETT E., HILLMAN R.S.,
Series Haemat., 6 (1975) 30 (71)

- FINNE J., KRUSIUS T., RAUVALA H., *Carb. Research*, 80 (1980) 336 (85)
- FLETCHER J., HUEHNS E.R., *Nature*, 215 (1967) 584-586 (17)
- FLETCHER J., HUEHNS E.R., *Nature*, 218 (1968) 1211-1214 (17)
- FOURNET B., STRECKER G., LEROY Y., MONTREUIL J., *Anal. Biochem.*, 116 (1981) 489-502 (86)
- GABER B.P., SCHILLINGER W.E., KOENIG S.H., AISEN P., *J. Biol. Chem.*, 245 (1970) 4251-4255 (16)
- GALBRAITH G.M.P., GALBRAITH R.M., FAULK W.P., *Placenta*, 1 (1980a) 33 (76)
- GALBRAITH G.M.P., GALBRAITH R.M., FAULK W.P., *Cell. Immunol.*, 49 (1980 b) 215 (49-76)
- GALBRAITH G.M.P., GALBRAITH R.M., TEMPLE A., FAULK W.P., *Blood*, 55 (1980 c) 240 (76)
- GALBRAITH G.M.P., GOUST J.M., MERCURIO S.M., GALBRAITH R.M., *Clin. immunopathol*, 16 (1980 d) 387 (76)
- GALBRAITH R.M., WERNER P., ARNAUD P., GALBRAITH G.M.P., *J. Clin. Invest.* 66 (1980 e) 1135 (76)
- GARDINER M. MORGAN E., *Aust. J. Exp. Biol. and Med. Sci.*, 52 (1974) 723-726 (71)
- GARRETT N.E., GARRETT R.J.B., ARCHDEACON J.W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 52 (1973) 466-474 (51)
- GELB M.H., HARRIS D.C., *Arch. Biochem. Biophys.*, 200 (1980) 93-98 (16)
- GLASS J., NUNEZ M.T., FISHER S., ROBINSON S.H., *Biochim. Biophys. Acta*, 542 (1978) 154-162 (59)
- GLEICHMAN W., BACHMANN G.W., DENGLER H.J., DUDECK J., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 5 (1973) 218 (40)
- GORINSKY B., in "Advances in Red Cell Biology", D.J. Weatherall et al., ed, Raven Press New-York, (1982) 7-17 (5)
- GORINSKY B., HORSBURG C., LINDLEY P.F., MOSS D.S., PARKAR M., WATSON J.L., *Nature*, 281 (1979) 157-158 (6-8-9)
- GROHLICH D., COLIN G., MORLEY G.G.D., BEZKOROVAINY A., *Int. J. Biochem.*, (1979) (71-72)
- HAMILTON T.A., WADA H.G., SUSSMAN H.H., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 76 (1979) 6406 (49-76)

HANK'S J.H., WALLACE R.E., Proc.Soc. Exptl.Biol.Med., 71 (1949) 196 (88)

HARFORD J., ASHWELL G., in "The Glyconjugates, M.I. Horowitz (Ed) (Academic, New-York), 4 (1982) 27-55 (62-68)

HARRIS D.C., GRAY G.A., AISEN P., J. Biol. Chem., 249 (1974) 5261 (18)

HATTON M.W.C., MARZ L., BERRY L.R., DEBANNE M.T., REGOECZI E., Biochem. J., 181 (1979) 633-638 (26)

HATTON M.W.C., REGOECZI E., WONG K.L., Can. J. Biochem., 52 (1979) 845-853 (26-29-113)

HEMMAPLARDH D., KAILIS S.G., MORGAN E.H., Br.J. Haematol., 28 (1974) 53-65 (56)

HEMMAPLARDH D., MORGAN E.H., Biochim.Biophys.Acta, 373 (1974) 84-99 (60)

HEMMAPLARDH D., MORGAN E.H., Biochim.Biophys.Acta, 426 (1976) 385-398 (55-56)

HEMMAPLARDH D., MORGAN E.H., Br.J. Haematol, 36 (1977 a) 85-96 (57)

HEMMAPLARDH D., MORGAN E.H., Biochim. Biophys.Acta, 468 (1977 b) 423-436 (56)

HEMMAPLARDH D. MORGAN R., MORGAN E.H., J. Membrane Biol., 33 (1977b) 195-212 (56)

HERBETH B., HENNY J., SIEST G., Ann.Biol.Clin., 41 (1983) 23-32 (36-39-40)

HERSHKO C., Haematology, 10 (1977) 105-148 (5)

HOLMBERG C., LAURELL C., Acta Physiol.Scand., 10 (1945) 307 (6)

HOPKINS L.L.Jr, SCHWARTZ K., Biochim. Biophys.Acta, 90 (1964) 484-491 (17)

HU H.Y.Y., GARDNER J., AISEN P., SKOULTCHI A.I., Science 197 (1977) 559 (76)

HUEBERS H., CSIBA E., JOSEPHSON B., HUEBERS E., FINCH C., Proc. Natl. Acad. Sci., 78 (1981) 621-625 (20)

HUEBERS H.A., HUEBERS E., CSIBA E., RUMMEL W., FINCH C., Blood, 61 (1983) 283-290 (36-38)

HUEBERS H.A., HUEBERS E., FINCH C.A., MARTIN A.W., J. Comp.Physiol., 148 (1982) 101-109 (5)

IACOPETTA B.J., MORGAN E.H., J. Biol.Chem., 258 (1983) 9108-9115 (57-58-59-77)

ISOBE K., ISOBE Y., SAKURAMI T., Acta Haematol., 65 (1981) 2-9 (58)

ITURRIAGA H., PEREDA T., ESTEVEZ A., UGARTE G., Ann. Clin. Res., 9 (1977) 39-43 (40)

JAMIESON G., JETT M., DEBARNADO S.L., J. Biol. Chem., 246 (1971) 3686-3693 (21)

- JANDL J.H., INMAN J.K. , SIMMONS R.L., ALLEN D.W., J.Clin.Invest.,
38 (1959) 161-185 (50-54-60)
- JANDL J.H., KATZ J.H., J. Clin.Invest., 42 (1963) 314-326 (52-53-59-60)
- JARRIT P.M.CHARLWOOD P.A., Biochim. Biophys.Acta, 453 (1976) 319-331 (16)
- JENICEK M.,Epidemiologie : Principes, Technique, Application, Maloine (Ed)
(1980) (137)
- JOHANSON B., Acta Chem. Scand., 14 (1960) 510 (5)
- KAILIS S.G., MORGAN E.H., Brit.J.Haematol 28 (1974) 37 (76)
- KAWA SAKI T., ASHWELL G., J. Biol.Chem., 251 (1976) 5292-5299 (62)
- KEEFER R.C., BARAK A.J., BOYETT J.D., Biochim. Biophys.Acta, 221 (1970)
390-393 (17)
- KERCKAERT J.P., BAYARD B., Biochem.Biophys. Res. Comm., 105 (1982)
1023-1030 (26-29)
- KLAUSNER R.D., BRIDGES K., TSUNOO H., BLUMENTHAL R., WEINSTEIN J.N., ASHWELL G.
Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A , 74 (1980) 5087-5091 (65)
- KOENIG S.H., SCHILLINGER W.E., J. Biol.Chem., 244 (1969) 6520-6526 (16)
- KOJIMA N., BATES G.W., J. Biol.Chem., 254 (1979) 8847-8854 (58)
- KORNFELD S., Biochemistry, 7 (1968) 945-954 (53-54)
- KORNFELD S., Biochim.Biophys.Acta, 194 (1969) 25-33 (52-53)
- KRUSIUS T., FINNE J., RAUVALA H., FEBS-Lett., 71 (1976) 117-120 (23-24-82)
- KRYSTEVA M.A., MAZURIER J., SPIK G., Biochim. Biophys.Acta, 453 (1976)
484-493 (19)
- KRYSTEVA M.A., MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J., FEBS -Lett., 56 (1975)
337-340 (19)
- LANE R.S., Br. J. Haematol., 22 (1972) 309-317 (53)
- LANE R.S., in"Structure and Function of Plasma Proteins" Vol.2, A.C.
Allison (Ed) (1976) 53-78 (5)
- LARRICK J.W., CRESSWELL P., Biochim. Biophys.Acta, 583 (1979) 483 (49-76)
- LAURELL C.B., Acta Physiol.Scandinav., 14 (suppl.46) (1947) 1-129 (4-16)
- LAURELL C.B., Pharmacol. Rev., 4 (1952) 371-395 (4)
- LEGER D., MICHEL V., MONTREUIL J., SPIK G., Résultats non publiés (54-140-143)

- LEIBMAN A., AISEN P., *Biochemistry*, 16 (1977) 1268-1272 (54)
- LEIBMAN A., AISEN P., *Blood*, 53 (1979) 1058-1065 (19)
- LIEBER C.S., *Gastroenterology*, 79 (1980) 373-390 (42-43)
- LOH T.T., *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 9 (1982) 11-20 (56-60)
- LOH T.T., HIGUCHI D.A., BOCKMEER F.M., SMITH C.H., BROWN E.B., *J. Clin. Invest.*, 65 (1980) 1182 (76)
- LOH T.T., MORGAN E.H., *Expth. Cell.Res.*, 91 (1975) 87-94 (55)
- MAC FARLANE I.G., *Clin. Sci.*, 64 (1983) 127-135 (62-68-69)
- MAC GILLIVRAY R.T.A., MENDEZ E., BREW K., in "Proteins of Iron Metabolism" Brown et al. (Ed) Grune and Stratton, New-York, (1977) 133-141 (13)
- MAC GILLIVRAY R.T.A., MENDEZ E., SINHA S.K., SUTTON M.R., LINEBACK-ZINS J., BREW K., *Proc. Natl.Acad. Science U.S.A.*, 79 (1982) 2504-2508 (8)
- MAC GILLIVRAY R.T.A., MENDEZ E., SHEWALE J.G., SINHA S.K., LINEBACK-ZINS J., BREW K., *J. Biol. Chem.*, 258 (1983) 3543-3553 (8-10-12-13-26)
- MAKEY D.G., SEAL V.S., *Biochim.Biophys.Acta*, 453 (1976) 250-256 (19)
- MANCINI G., CARBONARA A.O., HEREMANS J.F., *Immunochemistry*, 2 (1965) 235 (80)
- MARTEL P., KIM S.M., POWELL B., *Biophys.J. Biophysical Society*, 31 (1980) 371-380 (6)
- MARTIN A.W., HUEBERS E., WEBB J., VI International conference in "Proteins of Iron Storage and Transport", July 11-14, 1983 Sapporo, Japan (5-15)
- MARX J.J.M., KLEIN GEBBINK J.A.G., NISHISATO T., AISEN P., *Brit.J. Haematol.*, 52 (1982) 105-110 (19)
- MARZ L., HATTON M.W.C., BERRY L.R., REGOECZI E., *Can.J. Biochem.*, 60 (1982) 624-630 (19-23-25-28-29)
- MASON D.Y., TAYLOR C.R., *J. Clin.Path.*, 31 (1978) 316-327 (35)
- MAZURIER J., *Thèse Doct.es Sci.*, 1980, Lille (5)
- MAZURIER J., AUBERT J.P., LOUCHEUX-LEEBVRE M.H., SPIK G., *FEBS-Lett.*, 66 (1976) 238-242 (11-17)
- MAZURIER J., LHOSTE J.M., SPIK G., MONTREUIL J., *FEBS-Lett.*, 81 (1977) 371-375 (16-19)

MAZURIER J., METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., SPIK G., MONTREUIL J.,
JOLLES P., *Experientia*, 39 (1983) 135-141 (13-14-15-26-27)
MAZURIER J., SPIK G., *Biochim.Biophys.Acta*, 629 (1980) 399-408 (19)
METZ-BOUTIGUE M.H., MAZURIER J., JOLLES J., SPIK G., MONTREUIL J.,
JOLLES P., *Biochim. Biophys. Acta*, 670 (1981) 243-254 (13-15)
MICHALSKI J.C., STRECKER G., VAN HALBEEK H., DORLAND L., VLIAGENTHART J.F.G.,
Carbohydr. Res., 100 (1982) 351-363 (100)
MICHEL V., Thèse 3^e cycle, 1981 (30-140-143)
MILSON J.P., BATEY R.G., *Biochem.J.*, 182 (1979) 117-125 (71)
MONTREUIL J., *Pure Appl.Chem.*, 42 (1975) 431-477 (21-28)
MONTREUIL J., *Adv.Carbohydr.Chem. Biochem.*, 37 (1980a) 157-223 (1-28-30-31)
MONTREUIL J., Proc. Aharon Katzir-Katchalsky Conference on Carbohydrate-
Protein Interactions, Kibbutz Kiryat Anavim, 9 th, (1980 b) 3-4 (1-30-31)
MONTREUIL J., *Compr.Biochem.*, 19 B/II (1982) 1-188 (30-31)
MONTREUIL J., *Biochem.Soc. Transactions*, 11 (1983) 134-136 (1)
MONTREUIL J., ADAM-CHOSSON A., SPIK G., *Bull.Soc.Chim.Biol.*, 47 (1965)
1867 (21)
MONTREUIL J., DEBRAY H., DEBETRE P., DELANNOY P., in Falk Symposium
on Structural Carbohydrates in the Liver, Bâle, 1983, MTP Press, London
(sous presse)(139)
MONTREUIL J., FOURNET B., SPIK G., STRECKER G., *C.R.Acad.Sci.Paris.*,
287 D (1978) 837-840 (28-31)
MONTREUIL J., MULLET S., *C.R. Acad.Sci.*, 250 (1960) 1376 (5)
MONTREUIL J., SPIK G., in "Proteins of Iron Storage and Transport in
Biochemistry and Medicine " (1975). Crichton R.R. (Ed) North-Holland,
Amsterdam, 27-38 (1-23-90)
MONTREUIL J., SPIK G., CHOSSON A., *C.R. Acad.Sci.*, 255 (1962) 3493 (21)
MONTREUIL J., TONNELAT J., MULLET S., *Biochim. Biophys.Acta*, 45 (1960)
413 (5)
MORELL A.G., GREGORIADIS G., SCHEINBER I.H., HICKMAN J., ASHWELL G.,
J. Biol.Chem., 246 (1971) 1461-1467 (62-63)
MORELL A.G., IRVINE R.A., STERNLIEB I. SCHEINBERG I.H., ASHWELL G.,
J.Biol.Chem., 243 (1968) 155-159 (61)

- MORGAN E.H., Q.J. Exp. Physiol., 65 (1980) 239-252 (74)
- MORGAN E.H., APPLETON T.C., Nature, 223 (1969) 1371-1372 (57)
- MORGAN E.H., BAKER E., Biochim.Biophys.Acta, 363 (1974) 240-248 (56)
- MORGAN E.H., MARSAGLIA G., GIBLETT E.R., FINCH C.A., J. Lab. Clin. Med., 69 (1967) 370 (54)
- MORLEY C.G.D., DELMASTRO D., BEZKOROVAINY A., in Proteins of Iron Storage and Transport, VI th International Conference, Sapporo, Japan, (1983) 129 (71)
- MUNRO H.N., LINDER M.L., Physiol. Revs., 58 (1978) 317-396 (72)
- MURRAY J., STEIN N., Medicine, 45 (1966) 507-512 (45)
- NAGY B., LEHRER S.S., Arch.Biochem.Biophys., 148 (1972) 27-36 (11)
- NALPAS B., BERTHELOT P., Gastroenterol.Clin.Biol., 6 (1982) 85-92 (42-44)
- NALPAS B., BOIGNE J.M., ZAFRANI E.S., ZIMMERMANN R., BERTHELOT P., Gastroenterol.Clin.Biol., 4 (1980) 646-654 (40-41-45)
- NEUFELD E.F., ASHWELL G., in "The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans" W.J. Lennarz (Ed.), Plenum Press, New-York (1980) 241-266 (44-62)
- NICOLLET I., LEBRETON J.P., FONTAINE M., HIRON M., Biochim. Biophys.Acta, 668 (1981) 235-245 (81)
- NUNEZ M.T., GLASS J., J.Biol.Chem., 258 (1983) 9676-9680 (57-59-77)
- NUNEZ M.T., GLASS J., COLE E.S., Biochim. Biophys.Acta, 673 (1981) 137-146 (51)
- NUNEZ M.T., GLASS J., FISHER S., LAVIDOR L.M., LENK E.M., ROBINSON S.M., Br.J. Haematol., 36 (1977) 519-526 (59)
- OCTAVE J.N., SCHNEIDER Y.J., CRICHTON R.R., TROUET A., Eur.J. Biochem., 115 (1981) 611 (49-76)
- OCTAVE J.N., SCHNEIDER Y.J., CRICHTON R.R., TROUET A., in "Protides of Biological Fluids" XXXI annual colloquium, Brussels, Belgium, may 2-5, (1983 a) (72-73)
- OCTAVE J.N., SCHNEIDER Y.J., SIBILLE J.C., TROUET A., CRICHTON R.R., in "Proteins of Iron Storage and Transport" VI th international conference July 11-14, (1983 b) Sapporo, Japan, p.137 (72)
- OLLIVIER J.P., MUZELLEC J.J, DELAMOURD L., HUOT D., GAC J.R., FOLL Y., AUREGAN G., Médecine et Armées, 9(1981) 303-306 (42)
- OMARY M.B., TROWBRIDGE I.S., J. Biol. Chem., 256 (1981) 4715-4718 (51)

OSBORNE T.B.J., J.Am.Chem.Soc., 21 (1899) 477 (4)

PEREZ S., WARIN V., Résultats non publiés (30)

PHILIPS J.L., Biochem. Biophys. Res.Comm., 72 (1976) 634 (49-76)

PRINCIOTTO J.V., ZAPOLSKI E.J., Nature, 255 (1975) 87-88 (17)

PUGH R.N.M., Brit. J. Surg., 60 (1973) 646-649 (116-117)

REGOECZI E., CHINDEMI P.A., HATTON M.W.C., BERRY L.R., Arch.Biochem. Biophys., 205 (1980) 76-84 (76)

REGOECZI E., CHINDEMI P.A., DEBANNE M.T., CHARLWOOD P.A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79 (1982) 2226-2230 (70-77)

REGOECZI E., DEBANNE M.T., MARZ L., HATTON M.W.C., Biochim. Biophys. Acta, 541 (1978a) 372-384 (65-68)

REGOECZI E., HATTON M.W.C., WONG K.L., Can.J.Biochem., 52 (1974) 155-161 (62)

REGOECZI E., TAYLOR P., DEBANNE M.T., MARZ L., HATTON M.W.C., Biochem.J., 184 (1979) 399-407 (64-65-66-141)

REGOECZI E., TAYLOR P., HATTON M.W.C., WONG K.L., KOJ A., Biochem.J., 174 (1978b) 171-178 (65)

ROGERS T.B., BØRRESEN T., FEENEY R.E., Biochemistry, 17 (1978) 1105-1109 (17)

ROOP W.E., PUTNAM F.W., Biol. Chem., 242 (1967) 2507-2513 (78)

ROSSENEU-MORTREFF M.Y., SOETEWY F., LAMOTE R., PEETERS H., Biopolymers, 10 (1971) 1039 (6-7)

SALIER J.P., FAYE L., VERGAINE D., MARTIN J.P., Electrophoresis, 1 (1980) 193-197 (81-114)

SALOMON D., Exp.Cell.Res., 128 (1980) 311 (49-76)

SCHADE A.L., CAROLINE L., Science, 100 (1944) 14-15 (4)

SCHADE ALL., CAROLINE L., Science, 104 (1946) 340-341 (4-6)

SCHEIDEGGER J.J., Intern. Arch. Allergy.Appl. Immunol., 7(1955) 103 (80)

SCHLABACH M.R., BATES G.W., J. Biol. Chem., 250 (1975) 2182 (17-18)

SCHNEIDER C., ASSER U., SUTHERLAND D.R., GREAVES M.F., FEBS-Lett., 158 (1983) 259-264 (52-77)

- SCHNEIDER Y.J., DEDUVE C., TROUET A., J. Cell. Biol., 88 (1981) 380-387 (70)
- SCHNEIDER C., SUTHERLAND R., NEWMAN R., GREAVES M., J. Biol. Chem., 257 (1982) 8516-8522 (51)
- SCHULTZE H.E., SCHMIDTBERGER R., HAUPT H., Biochem.Z., 329 (1958) 490 (20)
- SEGLIN P.O., in "Methods in Cell. Biology (Prescott, D.M., Ed.), Academic Press, N.Y., San Francisco, London, XIII, (1976) 29-83 (89)
- SEITZ J.S., BOUSTIERE C., MAURIN P., AIMINO R., DURBEC J.P., BETTA B., ESCOSSIER J.M., GAUTHIER A.P., Gastroenterol.Clin.Biol., 7 (1983) 734-739 (138)
- SLY D.A., GROHLICH D., BEZKOROVAINY A., in "Cell Surface Carbohydrate Chemistry", R.E. Harmon (Ed.), Acad. Press, New-York, 640 (1978) 255-268 (54)
- SMETS L.A., in Falk Symposium on Structural Carbohydrates in the Liver, Bâle, 1983, MTP Press, London, (sous presse) (139)
- SORELL M.F., NAUSS J.M., DONOHUE T., TUMA D.J., Gastroenterology, 84 (1983) 580-586 (44)
- SORELL M.F., TUMA D.J., SCHAUER E.C., BARAK A.J., Gastroenterology, 73 (1977) 137-144 (44)
- SPEYER B.E., FIELDING J., Biochim. Biophys. Acta, 332 (1974) 192-200 (55)
- SPIK G., Thèse, Doct.ès-Sci., Lille (1968) (20-21-23)
- SPIK G., Falk Symposium n° 34 on Structural Carbohydrates in the Liver, Basel, 1982, Abstract p 42 and MTP Press Limited (à paraître) (26-28-29)
- SPIK G., BAYARD B., FOURNET B., STRECKER G., BOUQUELET S., MONTREUIL J., FEBS-Lett, 50 (1975) 296-299 (21-90)
- SPIK G., FOURNET B., BAYARD B., VANDERSYPPE R., STRECKER G., BOUQUELET S., CHARET P., MONTREUIL J., Arch. Intern. Physiol. Biochim., 82 (1974) 791 (21)
- SPIK G., MONSIGNY M., MONTREUIL J., C.R. Acad. Sci., 260 (1965) 4282-4284; 261 (1965) 1137-1139 (20-21-23)
- SPIK G., MONTREUIL J., Bull.Soc. Chim. Biol., 51 (1969) 1271-1285 (20-23-82)
- SPIK G., VANDERSYPPE R., FOURNET B., BAYARD B., CHARET P., BOUQUELET S., STRECKER G., MONTREUIL J., Actes Coll.Intern. n° 221 (1974) 483-500 C.N.R.S. Paris (1-21-22-23-24-82-90)
- STARKENSTEIN E., HARVALID Z., Arch. Exp. Path.u. Pharmacol., 172 (1933) 75-92 (4)
- STEINER M., J. Lab. Clin. Med., 96 (1980) 1086-1093 (55)

STIBLER H., BORG S., *Alcoholism*, 5 (1981) 545-549 (46-47-139)

STIBLER H., SYDOW O., BORG S., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 13 Suppl. 1 (1980) 47-51 (45-46)

SURGENOR D.M., KOECHLIN B.A., STRONG L.E., *J. Clin. Invest.*, 28 (1949) 73-96 (4-16)

SUTHERLAND D.R., DELIA D., SCHNEIDER C., NEWMAN R.A., KEMSHEAD J., GREAVES M.F., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 78 (1981) 4515-4519 (51)

TASAKI S., IKEHARA H., KOBATA A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92 (1980) 735 (139)

TAYLOR D.M., *Health Phys.*, 22 (1972) 575-581 (17)

TEPPO A.M., MAURY C.P.J., *Clinica Chimica Acta*, 129 (1983) 279-286 (40)

TESTA U., THOMOPOULOS P., VINCI G., TITEUX M., BETTAIEB A., VAINCHENKER W., ROCHANT H., *Experimental Cell. Research*, 140 (1982) 251-260 (76)

TOLLESSHAUG H., CHINDEMI P.A., REGOECZI E., *J. Biol. Chem.*, 256 (1981) 6526-6528 (68-70)

TOMIMATSO Y., VICKERY L.E., *Biochim. Biophys. Acta*, 285 (1972) 72-83 (11)

TORDERA V., *Thèse Doct. 3^e cycle*, Lille 1978 (140-143)

TSANG C.P., BYLE A.J., MORGAN E.H., *Biochim. Biophys. Acta*, 32 (1975) 386 (17)

TUMA D.J., SORELL M.F., *Gastroenterology*, 80 (1981) 273-278 (44)

VAHLQUIST A., RASK L., PETERSON P.A., BERG T., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 35 (1975) 569 (36-40)

VAN BOCKXMEER F., HEMMAPLARDH D., MORGAN E.H., in "Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine", Crichton R.R. (Ed.), North-Holland, Amsterdam, (1975) 111-119 (71)

VAN BOCKXMEER F.M., MORGAN E.H., *Biochim. Biophys. Acta*, 468 (1977) 437-450 (51)

VAN BOCKXMEER F.M., MORGAN E.H., *Biochim. Biophys. Acta*, 584 (1979) 76-83 (59)

VAN BOCKXMEER F.M., YATES G.K., MORGAN E.H., *Eur. J. Biochem.*, 92 (1978) 147-154 (52-72)

VAN DER HEUL C., KROOS M.J., VAN NOORT W.L., VAN EIJK H.G., *Clin. Sci.*, 60 (1981) 185-190 (20)

VAN EIJK H.G., NOORT W.L., KROOS M.J., HEUL L., *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 16 (1978) 557-560 (19)

VAN HALBEEK H., DORLAND L., VLIEGENTHART J.F.G., SCHMID K., MONTREUIL J., FOURNET B., HULL W.E., *FEBS -Lett.*, 114 (1983) 11-16 (100)

- VAN MOORE C., "in "Modern Nutrition in Health and Disease", Goodhart R.S. and Shilo M.E. (Ed.), Lea and Febiger, Philadelphia, (1973) 297-323 (36-37)
- VELDMAN A., VAN DER HEUL C., VAN EIJK H.G., in Proteins of Iron Storage and Transport, VI th International Conference, Sapporo, Japan, (1983) 179 (58)
- VENTURA M., BASTOS-ARAGAO J., IKEMOTO H., An.Acad.Brasil.Liêne, 45 (1973) 450-452 (11)
- VERNET-NYSSSEN M., ABRAMIAN S., GIRARD D., BEL A., Nouv. Presse Med., 11 (1982) 3725 (45)
- VLIEGENTHART J.F.G., DORLAND L., VAN HALBEEK H., Adv. Carb. Chem.Biochem. 41 (1983) 209 (86)
- VLIEGENTHART J.F.G., VAN HALBEEK H., DORLAND L., Pure Appl. Chem., 53 (1981) 45 (86)
- WARD J.H., KUSHNER P., KAPLAN J., Biochem.J., 208 (1982) 19-26 (76)
- WARIN V., BAERT F., FOURET R., STRECKER G., SPIK G., FOURNET B., MONTREUIL J., Carbohydr.Res., 76 (1979) 11-22 (30)
- WILLIAMS J., Trends Biochem.Sci., 7 (1982) 394-397 (14-15)
- WILLIAMS J. GRACE S.A., WILLIAMS J.M., Biochem.J., 201 (1982) 417-419 (15)
- WILLIAMS J., MORETON A., Biochem.J., 185 (1980) 483-488 (19)
- WONG K.L., DEBANNE M.T., HATTON M.W.C., REGOECZI E., Int.J. Peptide Protein Res., 12 (1978) 27-37 (79)
- WOODWORTH R.C., Résultats non publiés (52-60)
- YOU DEN W.J., Cancer, 3 (1950) 32-35 (137)
- YOUNG S.P., AISEN P., Biochim. Biophys.Acta, 633 (1980) 145-153 (71-72-74)
- YOUNG S.P., AISEN P., Hepatology, 1 (1981) 114-119 (71-74)
- YOUNG S.P., BOMFORD A., WILLIAMS R., J. Biol.Chem., 258 (1983) 4972-4976 (64)
- ZAMAN A., HEYMAN M.T., VERWILGHEN R.L., Biochim.Biophys.,Acta, 632 (1980) 553-561 (57)
- ZANETTA J.P., BRECKENBRIDGE W.C., VINCENDON G., J.Chromato., 69 (1972) 291 (83)
- ZWEIR J.L., J. Biol.Chem., 253 (1978) 7616-7621 (19)



RÉSUMÉ

La transferrine sérique humaine qui joue le rôle de transporteur du fer entre les réserves tissulaires de fer, accumulées dans la ferritine, et les cellules-cibles est une glycoprotéine monocaténaire possédant deux glycanes de type N-acétyllactosaminique.

L'hétérogénéité de la structure de ces glycanes ayant été mise en évidence au Laboratoire, notre travail a consisté à déterminer la structure des glycanes, leur répartition sur la chaîne polypeptidique, la variation de cette répartition dans les cas pathologiques et leur rôle dans les interactions transferrine-cellule.

L'application des méthodes de détermination chimique de la structure des glycanes associées à la RMN du proton à 500 Mc nous a permis d'établir la structure de 2 glycanes triantennés isomères possédant deux résidus d'acide N-acétylneuraminique liés en α -2,6 sur deux antennes et un résidu lié en α -1,3 sur la 3^{ème} antenne.

L'application de la chromatographie d'affinité sur colonne de Con A a permis de séparer des variantes de transferrine renfermant soit 2 glycanes biantennés, soit un glycanne biantenné et un glycanne triantenné, soit 2 glycanes triantennés. Des résultats identiques ont été obtenus par électro-immuno-affinité en présence de Con A et ont montré que, dans les cas d'atteinte hépatique (cancer, cirrhose, hépatite virale), le taux des sérotransférines possédant 2 glycanes biantennés était diminué tandis que celui des 2 autres variantes était augmenté. Une étude statistique réalisée sur 191 cas de cirrhose a montré que l'importance des variations était fonction de la gravité de la maladie et que la méthode d'électro-immuno-affinité pouvait être utilisée comme un critère diagnostique.

L'accumulation du fer dans la foie cirrhotique pourrait s'expliquer par l'augmentation de la sérotransferrine renfermant des glycanes triantennés qui, contrairement aux glycanes biantennés, sont reconnus par une lectine membranaire hépatocytaire, reconnaissance qui entraîne la fixation, l'endocytose de la transferrine et la libération du fer dans les cellules.

MOTS CLÉS : Transferrine, glycanne, cirrhose, hépatocyte, fer