

50376

1987

363

N° d'ordre : 172

50376

1987

363

THÈSE



présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE FLANDRES ARTOIS

Spécialité : BIOCHIMIE

par

Bruno CAMPION

**MISE EN EVIDENCE D'UNE POLYANTENNARISATION DES
GLYCANNES DE LA TRANSFERRINE HUMAINE DANS LE
SERUM DE FEMMES ENCEINTES ET DANS LES MILIEUX DE
CULTURE DES HEPATOCYTES.**

**ETUDE DE L'INTERACTION DES VARIANTES GLYCANNIQUES
AVEC LES RECEPTEURS MEMBRANAIRES PLACENTAIRES
ET HEPATOCYTAIRES**

Exemplaire corrigé après avis du jury

Présentée le 11 Décembre 1987 devant la Commission d'Examen

Président :	J. MONTREUIL
Rapporteur :	P. BRISSOT
Rapporteur :	G. STRECKER
Examineur :	P. ROUSSEL
Examineur :	G. SPIK

Ce travail a été réalisé sous la direction de Madame le Professeur G. SPIK dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois (Laboratoire Pilote du Ministère de l'Education Nationale et Unité Associée au CNRS n° 217 : Relations structure-fonctions des constituants membranaires - Directeur J. MONTREUIL).

L'étude a été conduite sous contrat du Ministère de la Recherche et de la Technologie (M.R.T.).

À MES PARENTS, AVEC TOUTE MA RECONNAISSANCE;

À MYRIAM ET JOFFREY, AVEC TOUT MON AMOUR.

Avec ce travail, je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à :

Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL,

Vous avez bien voulu m'accepter dans votre Laboratoire et vous m'avez confié un sujet intéressant que j'ai réalisé avec grand plaisir. Je voudrais vous exprimer ma plus vive gratitude et mon profond respect.

Mademoiselle le Professeur Geneviève SPIK,

Vous m'avez accueilli avec gentillesse et bienveillance dans votre groupe. Au cours de ces quatre années, j'ai pu apprécier votre expérience et votre compétence scientifique. Permettez-moi de vous exprimer ma plus vive reconnaissance.

Monsieur Didier LEGER, Maître de Conférence,

Didier, pendant ces trois années passées ensemble, j'ai pu apprécier, entre autres, tes connaissances sur les transferrines. Je te remercie pour l'aide et les précieux conseils que tu m'as donnés, avec patience et bonne humeur, tout au long de ce travail.

Qu'il me soit permis aussi de remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de ce travail.

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

RNA	: acide ribonucléique
DNA	: acide déoxyribonucléique
HTF	: sérotransferrine humaine
OTF	: ovotransferrine
LTF	: lactotransferrine
Con A	: concanavaline A
EGF	: epidermal growth factor
BSA	: serumalbumine bovine
IgG	: immunoglobuline du type G
Tf-I	: variant I de la sérotransferrine humaine
Tf-II	: variant II de la sérotransferrine humaine
Tf-III	: variant III de la sérotransferrine humaine
Man	: mannose
Fuc	: fucose
Gal	: galactose
GlcNAc	: N-acétylglucosamine
Neu5Ac	: acide N-acétylneuraminique
α MeGlc	: α -méthyl-D-glucopyranoside
GlcNAcol	: N-acétyl glucosaminitol
SDS	: sodium dodécylsulfate
DOC	: sodium déoxycholate
TRIS	: Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
EDTA	: sel disodique de l'acide éthylène diamine tétraacétique
DMEM	: milieu modifié essentiel de Dulbecco
PBS	: tampon phosphate mono/disodique 10 mM, chlorure de sodium 145 mM, pH 7,4
TBS	: tampon Tris/Hcl 50 mM, chlorure de sodium 150 mM, pH 7,8
kDa	: kilodalton
RMN	: résonance magnétique nucléaire

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

GENERALITES

INTRODUCTION

4

STRUCTURE ET CONFORMATION DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE

I - ETUDE DE LA PARTIE PROTEIQUE

A - SEQUENCE PEPTIDIQUE

6

1 - Structure primaire

6

2 - Structure secondaire

6

3 - Structure tertiaire

6

4 - Emplacement des ponts disulfures

9

5 - Domaines

9

B - SITES DE FIXATION DU FER

10

1 - Nature des métaux fixés

10

2 - Nature de l'anion

12

3 - Nature des ligands impliqués dans la fixation de l'anion
et du fer

12

4 - Différences entre les deux sites de fixation du fer

13

II - ETUDE DE LA PARTIE GLYCANNIQUE

A - STRUCTURE DES GLYCANNES

15

1 - Structure du glycanne biantenné

15

2 - Structure des glycannes triantennés

17

3 - Structure du glycanne tétraantenné

17

B - <u>CONFORMATION DES GLYCANNES</u>	17
1 - <u>Conformation en Y</u>	17
2 - <u>Conformation en T</u>	17
3 - <u>Conformation en "oiseau"</u>	19
4 - <u>Conformation en "aile brisée"</u>	19
5 - <u>Conformation en "parapluie"</u>	19
6 - <u>Dimensions</u>	19

C - <u>LOCALISATION DES GLYCANNES SUR LA CHAÎNE PEPTIDIQUE</u>	20
---	----

D - <u>LES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE</u>	20
--	----

E - <u>MODIFICATIONS DU TAUX DES VARIANTS DE LA SEROTRANSFERRINE</u>	21
---	----

<u>CONCLUSION</u>	24
--------------------------	----

INTERACTION DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE AVEC LES RECEPTEURS MEMBRANAIRES DES CELLULES

I - ROLE DE LA SEROTRANSFERRINE DANS LE METABOLISME DU FER

A - <u>ROLE DANS LE TRANSPORT DU FER</u>	25
B - <u>ROLE DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER</u>	25
C - <u>ROLE DANS L'ACTIVITE BACTERIOSTATIQUE</u>	27 *

II - LE RECEPTEUR MEMBRANAIRE DE LA SEROTRANSFERRINE

<u>A - MISE EN EVIDENCE DU RECEPTEUR MEMBRANAIRE DE LA SEROTRANSFERRINE</u>	28
1 - <u>Les réticulocytes</u>	28
2 - <u>Les hépatocytes</u>	28
3 - <u>Les cellules du placenta</u>	29
4 - <u>Les autres cellules</u>	29
<u>B - STRUCTURE ET PROPRIETES DU RECEPTEUR DE LA SEROTRANSFERRINE</u>	31
1 - <u>Structure et conformation</u>	31
2 - <u>Universalité du récepteur</u>	33
3 - <u>Spécificité de la fixation de la sérotransferrine sur son récepteur</u>	33
<u>C - REGULATION DU NOMBRE DE RECEPTEUR</u>	34

III - INTERACTION DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE AVEC SON RECEPTEUR

<u>A - PREMIERE HYPOTHESE : LA SEROTRANSFERRINE NE RENTRE PAS DANS LA CELLULE</u>	36
<u>B - DEUXIEME HYPOTHESE : LE COMPLEXE SEROTRANSFERRINE RECEPTEUR EST ENDOCYTE</u>	37
<u>C - EXISTENCE DE DEUX VOIES DISTINCTES DU RECYCLAGE DU COMPLEXE RECEPTEUR-SEROTRANSFERRINE</u>	38

IV - INTERACTION DE LA SEROTRANSFERRINE AVEC LES CELLULES DU PLACENTA

<u>A - LE RECEPTEUR PLACENTAIRE DE LA SEROTRANSFERRINE</u>	41
<u>B - INCORPORATION DU FER AU NIVEAU DU PLACENTA</u>	42

V - INTERACTION DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE AVEC LES HEPATOCYTES

A - <u>INTERACTION DE LA SEROTRANSFERRINE SIALYLEE</u>	43
B - <u>INTERACTION DE L'ASIALO-SEROTRANSFERRINE</u>	44
1 - <u>Le récepteur hépatique des asialo-glycoprotéines</u>	44
2 - <u>Rôle des glycanes de l'asialo-sérotransferrine</u>	44
3 - <u>Endocytose de l'asialo-sérotransferrine</u>	45
<u>CONCLUSION</u>	47

BIOSYNTHESE DE LA SEROTRANSFERRINE

I - BIOSYNTHESE ET SECRETION DE LA SEROTRANSFERRINE "IN VIVO"

A - <u>SITES DE SYNTHÈSE DE LA SEROTRANSFERRINE</u>	48
1 - <u>Le foie</u>	48
2 - <u>Les autres tissus</u>	48
B - <u>MECANISME DE SYNTHÈSE ET DE SECRETION DE LA SEROTRANSFERRINE PAR LES HEPATOCYTES</u>	49
1 - <u>Voie intracellulaire</u>	49
2 - <u>Précurseur intracellulaire de la sérotransferrine</u>	49
C - <u>FACTEURS INFLUENCANT LA SYNTHÈSE DE LA SEROTRANSFERRINE</u>	51
1 - <u>Influence des réserves en fer</u>	52
2 - <u>Influence des hormones</u>	52
3 - <u>Influence du régime alimentaire</u>	53

II - BIOSYNTHESE DE LA SEROTRANSFERRINE "IN VITRO"

A - BIOSYNTHESE DES PROTEINES PLASMATIQUES PAR LES HEPATOCYTES ISOLES OU EN CULTURE

54

1 - Nature de différents facteurs sur la croissance des hépatocytes

54

a - Rôle du sérum dans le milieu de culture

54

b - Hormones et facteurs de croissance dans un milieu
sans sérum

54

c - Autres facteurs

54

2 - Influence des différents conditions de culture sur la biosynthèse de la sérotransferrine

55

a - Influence de la composition du milieu

55

b - Influence du support

56

c - Influence d'autres types cellulaires

56

B - CONTROLE DE LA BIOSYNTHESE DE LA SEROTRANSFERRINE DANS LES CULTURES D'HEPATOCYTES

56

CONCLUSION

57

TRAVAUX PERSONNELS

AUGMENTATION DE LA TRIANENNARISATION DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE AU COURS DE LA GROSSESSE ET INTERACTION DES VARIANTES AVEC LES RECEPTEURS MEMBRANAIRES DU PLACENTA

INTRODUCTION

60

ANALYSIS OF THE PHYSIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF THE MARKED INCREASE OF HUMAN SEROTRANSFERRIN TRIANTENNARISATION DURING PREGNANCY	62
SUMMARY	63
INTRODUCTION	64
EXPERIMENTAL	64
Materials	64
METHODS	65
Preparation of the carbohydrate molecular variants of human serotransferrin	65
Determination of the structure of the glycans isolated from the serotransferrin carbohydrate molecular variants	66
ConA-crossed immuno-affinity electrophoresis of the serotransferrin carbohydrate molecular variants	66
Labelling of serotransferrin carbohydrate molecular variants	67
Preparation of the syncytiotrophoblast microvilli	67
Characterization of the transferrin-receptor complex and displacement of the endogeneous transferrin by the different carbohydrate molecular variants of serotransferrin	67
Standart binding assays	68
RESULTS	69
Isolation of the human carbohydrate molecular variants of serotransferrin	69
Determination of the glycan structure present in the three molecular variants of transferrin	69
Analysis of the ConA-crossed immuno-affinity electro- phoresis patterns	70
Analysis of the binding of the three transferrin carbo- hydrate variants to the placental membrane receptors	70

DISCUSSION	72
REFERENCES	75
LEGENDS TO FIGURES	78

CONCLUSION	86
------------	----

POLYANTENNARISATION DES
GLYCANNES DE LA TRANSFERRINE
ISOLEE DES MILIEUX
D'HEPATOCTES EN CULTURE ET
INTERACTIONS DES VARIANTES AVEC
LES RECEPTEURS MEMBRANAIRES
HEPATOCTAIRES

I - ETUDE DE L'HETEROGENEITE DE LA
TRANSFERRINE SYNTHETISEE DANS LES MILIEUX
DE CULTURE DES HEPATOCTES HUMAINS

A - <u>DOSAGE DE LA TRANSFERRINE DES MILIEUX DE CO-CULTURE</u>	90
--	----

B - <u>HOMOGENEITE DE LA TRANSFERRINE PRESENTE DANS LES MILIEUX DE CO-CULTURE</u>	90
---	----

C - <u>VARIATION DE LA REPARTITION DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA TRANSFERRINE DES HEPATOCYTES EN CO-CULTURE</u>	90
D - <u>DISCUSSION - CONCLUSION</u>	92
II - ETUDE DE L'HETEROGENEITE DE LA TRANSFERRINE ISOLEE DES MILIEUX DE CULTURE D'HEPATOCYTES PROVENANT D'UN HEPATOCARCINOME HUMAIN : LES CELLULES HEP G2	
A - <u>INTRODUCTION</u>	96
B - <u>ISOLEMENT ET MISE EN EVIDENCE DE L'HETEROGENEITE DE LA TRANSFERRINE SECRETEE DANS LE MILIEU DE CULTURE DES CELLULES HEP G2</u>	96
1 - <u>Estimation du taux de synthèse et de sécrétion de la transferrine dans le milieu de culture</u>	96
2 - <u>Isolement par chromatographie d'affinité de la transferrine synthétisée par les cellules Hep G2</u>	97
3 - <u>Mise en évidence de la microhétérogénéité de la transferrine isolée</u>	98
a - <i>Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS</i>	98
b - <i>Electrophorèse d'immuno-affinité de la transferrine isolée</i>	98
c - <i>Analyse de la chaîne polypeptidique de la transferrine isolée</i>	101
d - <i>Deglycosylation enzymatique de la sérotransferrine humaine et de la transferrine synthétisée par les cellules Hep G2</i>	103
C - <u>FRACTIONNEMENT DE LA TRANSFERRINE ISOLEE DES MILIEUX DE CULTURE DES CELLULES HEP G2</u>	105
1 - <u>Fractionnement de la transferrine Hep G2 par FPLC sur colonne Mono Q HR-5</u>	105

2 - <u>Electrophorèse d'immuno-affinité bidimensionnelle des différentes fractions de la transferrine isolée des milieux de culture des cellules Hep G2</u>	107
---	-----

D - <u>ETUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES DES FRACTIONS DE LA TRANSFERRINE ISOLEE DES MILIEUX DE CULTURE DES CELLULES HEP G2</u>	109
---	-----

1 - <u>Composition molaire en monosaccharides des différentes fractions de la transferrine isolée</u>	109
---	-----

2 - <u>Détermination de la structure des glycanes de la fraction C</u>	111
--	-----

a - <i>Libération des glycanes de la fraction C par hydrolyse alcaline douce</i>	111
--	-----

b - <i>Analyse des dérivés méthylés des oligosaccharides-alditols composant la fraction C</i>	112
---	-----

c - <i>Analyse des oligosaccharides-alditols de la fraction C par résonance magnétique nucléaire à 400 MHz</i>	114
--	-----

E - <u>DISCUSSION - CONCLUSION</u>	116
------------------------------------	-----

III - INTERACTIONS DES VARIANTES GLYCANNIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE AVEC LES RECEPTEURS MEMBRANAIRES DES CELLULES HEP G2

A - <u>INTERACTIONS DES VARIANTES GLYCANNIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE AVEC LES CELLULES HEP G2</u>	121
--	-----

B - <u>DISCUSSION</u>	122
-----------------------	-----

C - <u>CONCLUSION</u>	124
-----------------------	-----

CONCLUSIONS GENERALES	125
-----------------------	-----

BIBLIOGRAPHIE	130
---------------	-----

MATERIEL ET METHODES

I -	ISOLEMENT DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE	
A -	<u>CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE DE CONCANAVALINE A-SEPHAROSE</u>	151
B -	<u>SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS</u>	151
II -	INTERACTIONS DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE AVEC LES RECEPTEURS MEMBRANAIRES DU SYNCYTIOTROPHBLASTE DU PLACENTA HUMAIN	
A -	<u>PREPARATION DES MEMBRANES MICROVILLEUSES DU SYNCYTIOTROPHBLASTE DU PLACENTA HUMAIN</u>	152
B -	<u>INCUBATION DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE AVEC LES MEMBRANES DU SYNCYTIOTROPHBLASTE DU PLACENTA HUMAIN</u>	153
1 -	<u>Conditions d'incubation</u>	153
2 -	<u>Détermination des paramètres de fixation</u>	153
III -	CARACTERISATION DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA TRANSFERRINE SYNTHETISEE PAR DES HEPATOCYTES HUMAINS EN CO-CULTURE	
A -	<u>CULTURE DES HEPATOCYTES HUMAINS</u>	155
B -	<u>ETUDE DES VARIANTS DE LA TRANSFERRINE SYNTHETISEE PAR LES HEPATOCYTES EN CO-CULTURE</u>	156

IV - ISOLEMENT DES VARIANTS DE LA TRANSFERRINE SYNTHETISEE PAR LES CELLULES HEP G2

<u>A - IMMOBILISATION DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE</u>	156
1 - <u>Activation du Sepharose 4-B par le bromure de cyanogène</u>	157
2 - <u>Immobilisation de la sérotransferrine humaine</u>	157
<u>B - PREPARATION DE LA COLONNE D'IMMUNOAFFINITE</u>	157
1 - <u>Isolement des anticorps dirigés contre la séro-</u> <u>transferrine humaine</u>	157
2 - <u>Immobilisation des anticorps anti-sérotransferrine</u> <u>humaine</u>	158
<u>C - ISOLEMENT DE LA SEROTRANSFERRINE DES MILIEUX DE</u> <u>CULTURE DES CELLULES HEP G2</u>	
1 - <u>Récupération des milieux de culture</u>	158
2 - <u>Isolement de la sérotransferrine des milieux de culture</u>	159

V - INTERACTIONS DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE AVEC LES CELLULES HEP G2

<u>A - CULTURE DES CELLULES HEP G2</u>	159
<u>B - INCUBATION DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA</u> <u>SEROTRANSFERRINE HUMAINE AVEC LES CELLULES HEP G2</u>	160
1 - <u>Conditions d'incubation</u>	160
2 - <u>Détermination des paramètres de fixation</u>	161

VI - METHODES ANALYTIQUES

<u>A - METHODES CHIMIQUES</u>	161
1 - <u>Etude de la protéine</u>	161
a - <i>Dosage des protéines</i>	161
b - <i>Saturation en fer de la sérotransferrine humaine</i>	162

<i>c</i> - Marquage de la sérotransferrine humaine à l' ¹²⁵ I	163
2 - <u>Etude des glycanes</u>	163
<i>a</i> - Détermination des rapports molaires	163
<i>b</i> - Désialylation de la sérotransferrine humaine	164
<i>c</i> - Libération des oligosaccharides par hydrolyse alcaline douce	164
<i>d</i> - Libération des oligosaccharides par hydrazinolyse	165
<i>e</i> - Etude de la structure des glycanes par résonance magnétique nucléaire	165
<i>f</i> - Etude de la structure des glycanes en spectro- métrie de masse par analyse des dérivés méthylés	166
B - <u>METHODES ELECTROPHORETIQUES</u>	167
1 - <u>Electrophorèse en gradient de gel de polyacrylamide en présence de SDS</u>	167
2 - <u>Electrophorèse en gradient de gel de polyacrylamide en présence de Triton X-100 et de déoxycholate de sodium</u>	167
3 - <u>Electrotransfert sur feuille de nitrocellulose</u>	168
C - <u>METHODES IMMUNOLOGIQUES</u>	168
1 - <u>Préparation des immunsérums</u>	168
2 - <u>Immuno-diffusion radiale</u>	169
3 - <u>Affino-immunoélectrophorèse bidimensionnelle</u>	169
4 - <u>Immuno-révélation après électrotransfert</u>	170
5 - <u>Dosages radio-immunologiques</u>	170
D - <u>DOSAGES ENZYMATIQUES</u>	
1 - <u>Dosage de la phosphatase alcaline</u>	171
2 - <u>Dosage de la 5'-nucléotidase</u>	172
3 - <u>Déglycosylation par la N-Glycanase</u>	172

TAMPONS	174
----------------	-----

BIBLIOGRAPHIE DE L'APPENDICE TECHNIQUE	175
---	-----

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Depuis de nombreuses années, les transferrines et particulièrement la sérotransferrine humaine, ont fait l'objet de multiples études. La structure primaire de la partie protéique de la sérotransferrine est de nos jours complètement élucidée (MAC GILLIVRAY et al., 1983). Les recherches effectuées au Laboratoire sur la structure des glycanes de la sérotransferrine humaine ont permis de mettre en évidence l'hétérogénéité glycanique de la sérotransferrine (SPIK et al., 1974; MONTREUIL et SPIK, 1975) : les glycanes peuvent être de type biantenné ou triantenné.

La sérotransferrine humaine joue un rôle primordial dans le métabolisme du fer, l'étape préliminaire étant la reconnaissance par des récepteurs membranaires spécifiques, et représente donc un modèle intéressant pour l'étude de la participation des glycanes dans l'activité biologique et la reconnaissance de la sérotransferrine par des cellules cibles.

L'observation, dès 1982 par SPIK, de l'augmentation significative, dans certaines atteintes hépatiques, du taux des variants de la sérotransferrine humaine portants des glycanes triantennés a ouvert la voie à des recherches concernant la signification biologique de l'existence de ces variants.

Nos travaux s'inscrivent dans le cadre de la thématique du Laboratoire : "Relations structure-fonctions des transferrines" et font suite aux travaux de DEBRUYNE (1983). Le taux de sérotransferrine plasmatique augmentant au cours de la grossesse, nous avons étudié la modification de la répartition des variants glycaniques de la sérotransferrine dans le sérum des femmes enceintes.

Les besoins en fer du fœtus augmentant en fonction de sa croissance, nous avons étudié l'interaction des variants à structure glycanne triantennée avec les membranes du placenta humain afin de rechercher la présence éventuelle d'un récepteur de nature lectinique, reconnaissant principalement les acides N-acétylneuraminiques terminaux des glycanes triantennés et pouvant justifier un rôle dans le transport placentaire du fer.

Le foie étant l'organe essentiel de stockage du fer, nous avons élargi nos recherches aux hépatocytes en culture. Nous avons étudié l'évolution des variants glycanne de la transferrine synthétisée dans le milieu de culture d'hépatocytes humains. Nous avons choisi d'une part, des hépatocytes provenant d'un hépatocarcinome humain et établis en lignée continue, les cellules Hep G2 et d'autre part, des hépatocytes humains maintenus en co-culture avec des cellules épithéliales de foie.

La reconnaissance et l'interaction de chacun des variants glycanne de la sérotransferrine humaine a été réalisée sur les récepteurs membranaires des cellules Hep G2.

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

- Communication par affiche :

SPIK, G., LEGER, D., DECOTTIGNIES, J.P., CAMPION, B. et MONTREUIL, J.

A marked increase of triantennarisation of human serotransferrin in physiological, pathological conditions and in cell cultures

Proceedings of the IXth International Symposium on Glycoconjugates, Lille, France, 6-11 July 1987, A104.

- Publications :

LEGER, D., CAMPION, B., DECOTTIGNIES, J.P., MONTREUIL, J. et SPIK, G.

Analysis of the physiological significance of the marked increase of human serotransferrin triantennarisation during pregnancy.

Soumis à publication à Biochemical Journal.

CAMPION, B., LEGER, D., WIERUSZESKI, J.M., MONTREUIL, J. et SPIK, G.

Presence of fucosylated tetraantennary glycans in transferrin synthesised by human hepatocarcinoma cell line

En préparation pour European Journal of Biochemistry.

GENERALITES

INTRODUCTION

Les transferrines regroupent une famille de glycoprotéines dont le rôle est de transporter le fer chez les vertébrés (AISEN et LISTOWSKY, 1980) et chez les invertébrés (HUEBERS et al., 1982; MARTIN et al., 1983). Elles assurent le transport de 0,15 % du fer total de l'organisme et la répartition du métal entre les formes actives comme l'hémoglobine, la myoglobine et les cytochromes et les formes de stockage comme la ferritine et l'hémosidérine.

Cette famille comprend :

- l'**ovotransferrine** (ou conalbumine) isolée du blanc d'oeuf d'oiseau par SCHADE et CAROLINE en 1944.

- la **sérot transferrine**, initialement dénommée sidérophiline, isolée du plasma par SCHADE et CAROLINE en 1946 et LAURELL en 1947.

- la **lactotransferrine** (ou lactoferrine), présente dans le lait de mammifères et autres liquides de sécrétion, découverte et isolée du lait de Femme par MONTREUIL et MULLET, MONTREUIL et al., en 1960 puis par JOHANSON la même année.

- les **mélanotransferrines** (ou P 97) identifiées à la surface des cellules de mélanomes humains par WOODBURY et al., BROWN et al. et DIPPOLD et al. en 1980.

Les transferrines possèdent un certain nombre de propriétés communes :

- ce sont des glycoprotéines monocaténaires de masse moléculaire voisine de 80 000 (97 000 pour la P 97);

- elles fixent réversiblement deux ions ferriques (Fe^{3+}) et développent alors une couleur rose saumon dont le maximum d'absorption est situé à 465 nm;

- elles présentent de nombreuses homologues de séquence dans leur structure primaire et sont constituées de deux domaines structuraux fixant chacun un atome de fer;

- elles assurent le transport du fer au niveau de différents tissus en reconnaissant des récepteurs spécifiques situés à la surface des cellules et jouent un rôle extrêmement important dans le métabolisme du fer.

Notre étude ne concernant que la sérotransferrine humaine, nous nous limiterons à décrire la structure générale, les rôles biologiques et la biosynthèse de cette glycoprotéine.

STRUCTURE ET CONFORMATION DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE

I - ETUDE DE LA PARTIE PROTEIQUE

A - SEQUENCE PEPTIDIQUE

1 - Structure primaire

La séquence primaire de la chaîne peptidique de la sérotransferrine humaine a été réalisée par MAC GILLIVRAY et al., en 1982 et 1983, et est donnée dans la figure 1 p. 7. Cette structure a été confirmée par des études de séquences de cDNA du foie humain, codant pour la sérotransferrine humaine et isolés par UZAN et al. (1984) et YANG et al. (1984).

La sérotransferrine humaine est composée d'une seule chaîne peptidique comportant 679 résidus d'acides aminés. La connaissance du nombre et de la nature des acides aminés a permis de calculer précisément la masse moléculaire de cette glycoprotéine : elle est de 79650 daltons, y compris les glycannes.

2 - Structure secondaire

Les taux d'hélicité α et de structure plissée β ont été déterminés pour la sérotransferrine humaine par différents auteurs et sont rassemblés dans le tableau I p. 8.

Le taux d'hélicité est faible et n'est pas affecté par la fixation du métal.

3 - Structure tertiaire

La chaîne polypeptidique de la sérotransferrine humaine se

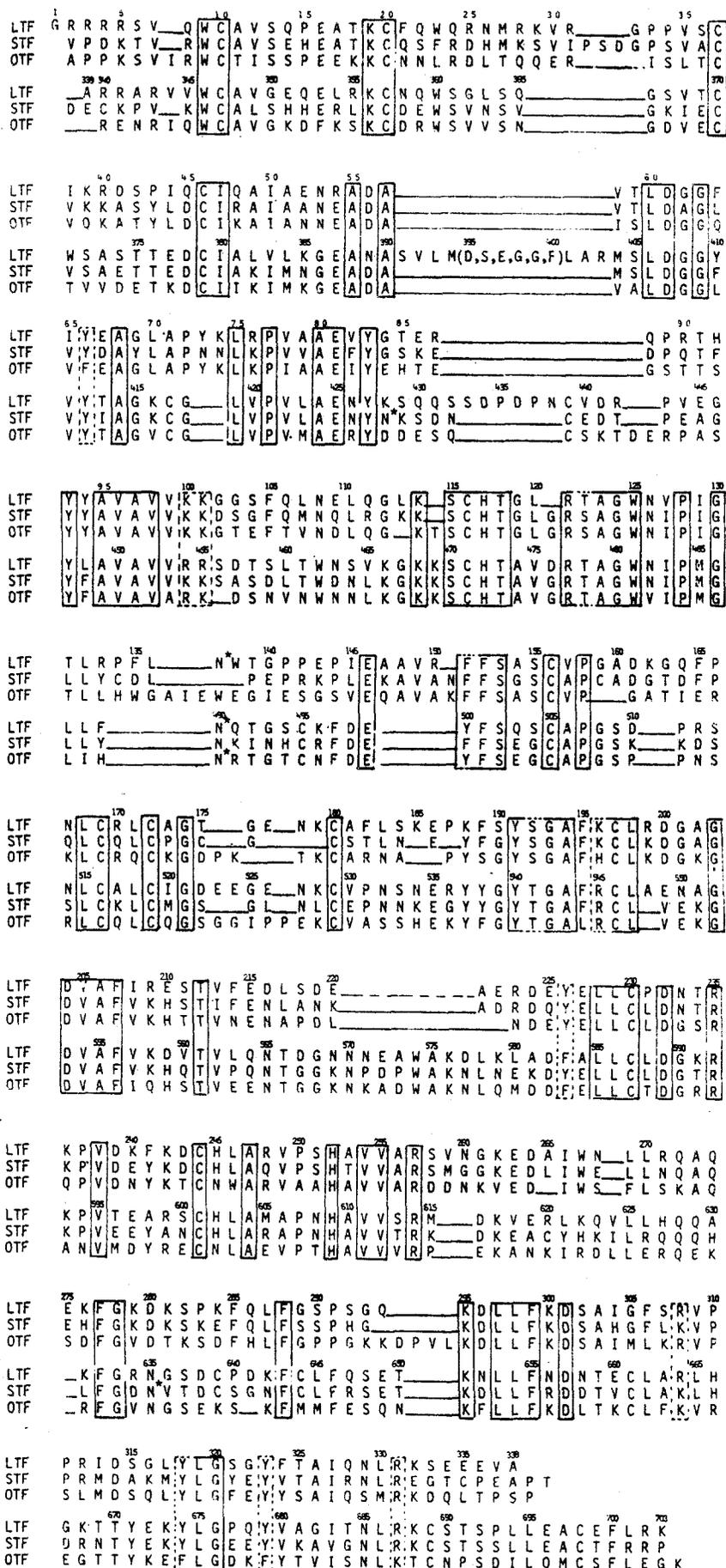


Figure 1 : Comparaison des séquences primaires des chaînes peptidiques de la sérotransferrine humaine (HTF) (MAC GILLIVRAY et al., 1983), de l'ovotransferrine (OTF) (JELTSCH et CHAMBON, 1982) et de la lactotransferrine humaine (LTF) (METZ-BOUTIGUE et al., 1984)

TABLEAU I

Etudes 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
Apo-sérotransferrine	17-18	-	NAGY <u>et al.</u> (1972) [1]
	21	-	TOMIMATSU <u>et al.</u> (1972) [2]
	20	40-45	VENTURA <u>et al.</u> (1973) [3]
	17	68	MAZURIER <u>et al.</u> (1976) [4]
Sérotransferrine saturée en fer	17-18	-	[1],[2],[3],[4]



scinde en deux régions compactes, de tailles sensiblement voisines, qui possèdent chacune un site de fixation du fer.

Par hydrolyse trypsique ménagée de la sérotransferrine humaine, EVANS et WILLIAMS (1978) obtiennent deux fragments de 36 000 et 43 000 daltons, le fragment N-terminal et le fragment C-terminal respectivement, chacun d'eux étant porteur d'un ion ferrique.

La partie N-terminale est formée des résidus d'acides aminés 1 à 336, la partie C-terminale, des résidus 337 à 679 (MAC GILLIVRAY et al., 1983).

4 - Emplacement des ponts disulfures

Les ponts disulfures jouent un rôle important dans la conformation de la protéine. La sérotransferrine humaine possède 19 ponts disulfures dont six seulement ont pu être localisés avec certitude (MAC GILLIVRAY et al., 1983) mais les autres ponts ont été positionnés par analogie avec les autres transferrines (BAKER et al., 1987). La partie N-terminale de la sérotransferrine possède huit ponts disulfures alors que la partie C-terminale en possède onze, ce qui rend cette dernière partie plus rigide et compacte que la précédente.

5 - Domaines

Dès 1975, MAC GILLIVRAY et BREW ont remarqué une grande homologie interne dans la séquence peptidique de la sérotransferrine et ont mis en évidence la présence de deux lobes possédant chacun un site de fixation du fer. Ils émettent ainsi l'hypothèse de la duplication d'un gène ancestral codant pour les transferrines. A l'examen de la structure primaire de la sérotransferrine humaine, MAC GILLIVRAY et al. (1977) conclurent à l'hypothèse d'une quadriplification d'un gène ancestral qu'appuyèrent des analyses statistiques informatisées (JELTSCH et CHAMBON, 1982).

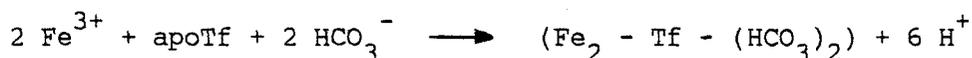
METZ-BOUTIGUE et al. (1981; 1984) et MAZURIER et al. (1983) émettent l'hypothèse de l'hexaplication du gène ancestral codant pour les transferrines.

Cependant, la détermination de la structure tridimensionnelle de la lactotransferrine humaine (ANDERSON et al., 1987) a permis de confirmer l'aspect bilobal de la molécule. Les deux lobes sont reliés

entre eux par une hélice contenant dix résidus d'acides aminés. Chaque lobe est divisé en deux domaines de taille égale N_1 , N_2 , C_1 et C_2 ayant des structures secondaires identiques et comprenant chacun environ 160 résidus d'acides aminés (Fig. 2 p. 11). Les nombreuses homologies de séquences primaires existantes pour toutes les transferrines argumentent le fait que leurs structures tridimensionnelles doivent être sensiblement similaires. Ces derniers travaux confirment donc la suggestion de MAC GILLIVRAY et al. (1977) et de JELTSCH et CHAMBON (1982) de la quadripllication d'un gène ancestral codant pour les transferrines.

B - SITES DE FIXATION DU FER

La sérotransferrine humaine peut fixer réversiblement deux atomes de fer. La fixation de chaque ion métallique nécessite la fixation d'un ion carbonate (WARNER et al., 1952; MASSON et al., 1966; AISEN et al., 1967) et la libération de trois protons (SCHADE et al., 1949; WARNER et al., 1952; TEUWISSEN et al., 1972) selon la formule suivante :



1 - Nature des métaux fixés

Les transferrines fixent de nombreux ions des métaux de transition autres que le fer ferrique, aussi bien divalents que trivalents, tout comme plusieurs lanthanides : Cu^{2+} , Zn^{2+} , V^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{3+} , Co^{3+} , Ga^{3+} , Hf^{3+} , Er^{3+} , Tb^{3+} , Eu^{3+} , Nd^{3+} , Pr^{3+} , Gd^{3+} (WINDLE et al., 1963; AASA et al., 1968; LUK et al., 1971; TEUWISSEN et al., 1972; HARRIS et al., 1974; CANNON et al., 1975; ZWEIER, 1978) à raison de deux ions par molécule de transferrine à l'exception de Nd^{3+} et Pr^{3+} où seul un ion est fixé.

Cependant, le fer ferrique est le métal qui présente le plus d'affinité pour les transferrines (TAN et al., 1969). La constante apparente de fixation du fer à la sérotransferrine est de l'ordre de $1 \times 10^{24} \text{ M}^{-1}$ (JARRIT et CHARLWOOD, 1976; AISEN et LEIBMAN, 1971). En revanche, le fer ferreux ne peut être fixé (BATES et al., 1973).

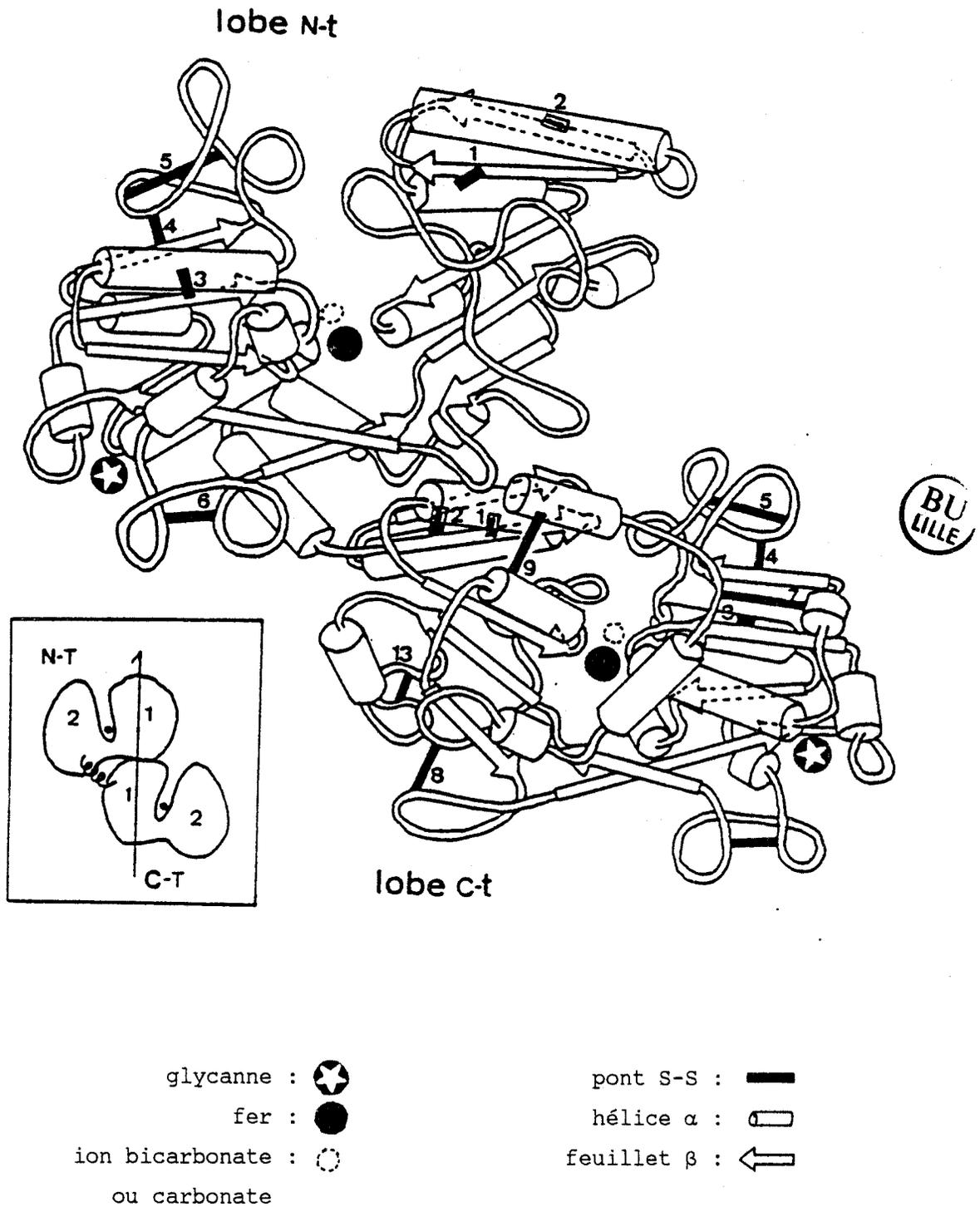


Figure 2 : Représentation schématique de la molécule de lacto-transferrine humaine.

D'après ANDERSON et al. (1987).

2 - Nature de l'anion

Tous les métaux qui se fixent à la sérotransferrine nécessitent simultanément la fixation d'un anion et la libération de trois protons (SCHADE et al., 1949; WARNER et WEBER, 1952). L'anion naturel est le carbonate ou le bicarbonate (SCHLABACH et al., 1975). En fait, selon CHASTEEN (1977), tout anion possédant une formulation du type $R-CH-COO^-$, où L est un donneur d'électron, peut convenir.



3 - Nature des ligands impliqués dans la fixation de l'anion et du fer

L'observation de spectres en ultra-violet (WOODWORTH et al., 1961; TAN et al., 1969; LEHRER, 1969; CANNON et al., 1975) ou en fluorescence (LUK, 1971) de complexes métal-transferrine indique la participation de quatre résidus de tyrosine par molécule de transferrine, résultat confirmé par méthodes chimiques (PHILLIPS et al., 1972) et par l'analyse de spectres Raman (TOMIMATSU et al., 1973; GABER et al., 1974). Cependant, la modification chimique des résidus de tyrosine par nitration suggère la participation de six (BEZKOROVAINY et al., 1972) ou sept (WILLIAMS, 1982) résidus de tyrosine.

La spectrométrie en résonance paramagnétique électronique des complexes cuivriques de la sérotransferrine donne un signal caractéristique de la coordination d'un seul résidu d'histidine pour chaque site de fixation (AASA et al., 1968; SWEIER et al., 1977). Cependant, ROGERS et al. (1977), après modification chimique, concluent à la présence de quatre résidus d'histidine par molécule de sérotransferrine et suggèrent deux résidus d'histidine impliqués dans chaque de site de fixation.

Plusieurs auteurs (LEHRER, 1969; TAN et al., 1970; TOMIMATSU, 1976) ont suggéré l'implication d'un résidu de tryptophane dans la fixation du fer mais sa liaison directe avec le métal n'a pas encore été démontrée (MAZURIER et al., 1976).

L'arginine a été proposée comme ligand de l'anion (BATES et al., 1973; ROGERS et al., 1977). La participation du groupement $\epsilon-NH_2$ de la lysine a aussi été évoquée dans la fixation de l'anion (ZWEIER, 1983).

Les travaux de KOENIG et al. (1969) montrent qu'une molécule d'eau est située à deux Å du métal et une autre à cinq Å.

Récemment, ANDERSON et al. (1987) ont déterminé la structure tridimensionnelle de la lactotransferrine humaine par cristallographie aux rayons X à 3,2 Å de résolution. Chaque atome de fer est coordonné à quatre ligands de la protéine : deux tyrosines, une histidine et un acide aspartique (Asp 61, Tyr 93, Tyr 191 et His 252 du côté N-terminal; Asp 407, Tyr 447, Tyr 540 et His 609 du côté C-terminal). L'anion bicarbonate est lié au fer et à un résidu d'arginine de la chaîne protéique (Fig. 3 p. 14).

Par cristallographie aux rayons X à 3,3 Å de résolution, BAILEY et al. (1987) montrent que les résidus d'acides aminés impliqués dans la fixation du fer de la sérotransferrine de Lapin sont conservés et que la géométrie des deux sites de fixation du fer est similaire à celle de la lactotransferrine humaine. De plus, HASNAIN et al. (1987) suggèrent que le sixième ligand du fer est une molécule d'eau. Ces travaux laissent supposer que les sites de fixation du fer de la sérotransferrine humaine sont identiques à ceux de la lactotransferrine humaine.

4 - Différences entre les deux sites de fixation du fer

En 1967, FLETCHER et HUEHNS ont émis l'hypothèse de la non-équivalence biologique des deux sites de fixation du fer de la sérotransferrine.

PRINCIOTTO et ZAPOLSKI en 1975, puis LESTAS en 1976, montrent que la dissociation du fer de la sérotransferrine humaine se réalise à deux pH différents : le premier fer est éliminé à pH 5,8 du site dit "acido-labile" et le second est éliminé à pH 4,8 du site dit "acido-stable".

KRISTEVA et al. (1975; 1976) suggèrent que l'un des sites est situé à la surface de la protéine tandis que l'autre est enfoui et donc moins accessible.

L'étude des spectres R.P.E. de la sérotransferrine humaine saturée en cuivre (MAZURIER et al., 1977; SWEIER, 1978) ou en vanadium (CHASTEEN, 1977) a permis de mettre en évidence une différence de comportement du métal suivant le site occupé.

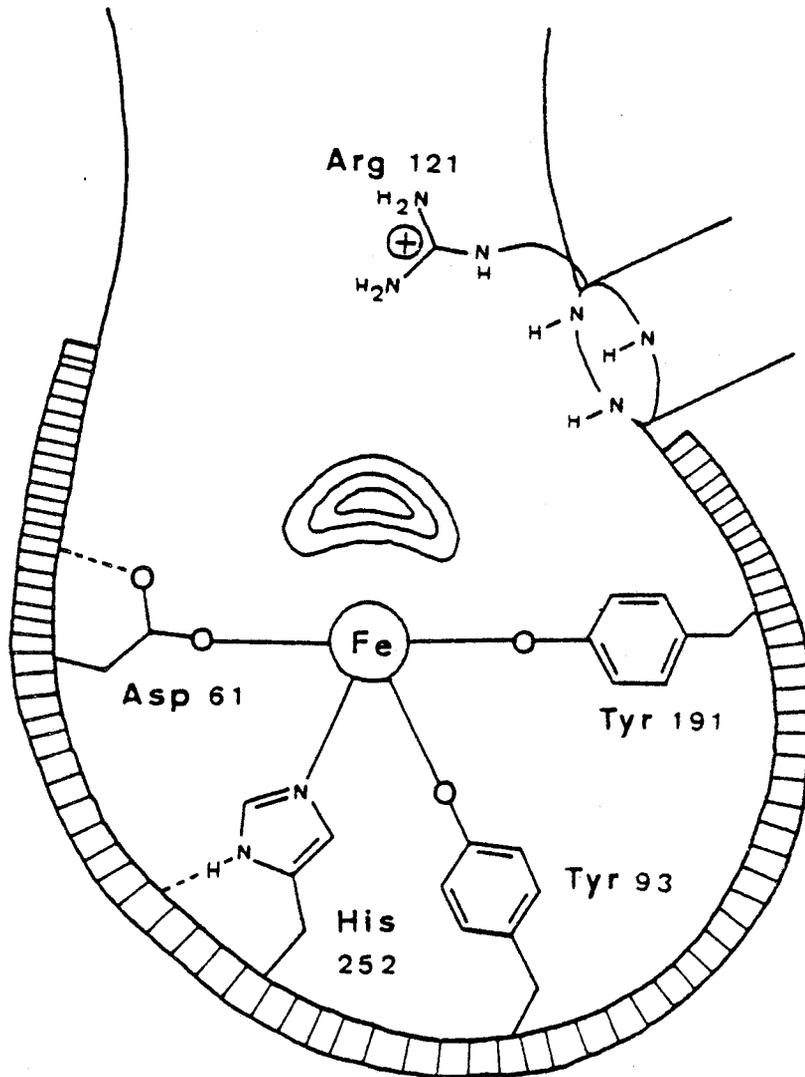


Figure 3 : Représentation schématique du site de fixation du fer du lobe Nt de la lactotransferrine. Dans le lobe Ct, les résidus d'acides aminés sont : Asp 407, His 609, Tyr 447, Tyr 540 et Arg 477. D'après ANDERSON et al. (1987).

Quatre formes de sérotransferrine humaine (apo-, monoferrique sur le site N ou C-terminal ou diferrique) ont pu être séparées soit par électrophorèse en gel de polyacrylamide (MAKEY et al., 1976), soit par électrofocalisation (VAN EIJK et al., 1978).

Dans le sérum, la forme majeure de la transferrine est la forme monoferrique, le fer étant fixé surtout sur le site "acido-labile" (LEIBMAN et al., 1979; WILLIAMS et al., 1980; MARX et al., 1982).

II - ETUDE DE LA PARTIE GLYCANNIQUE

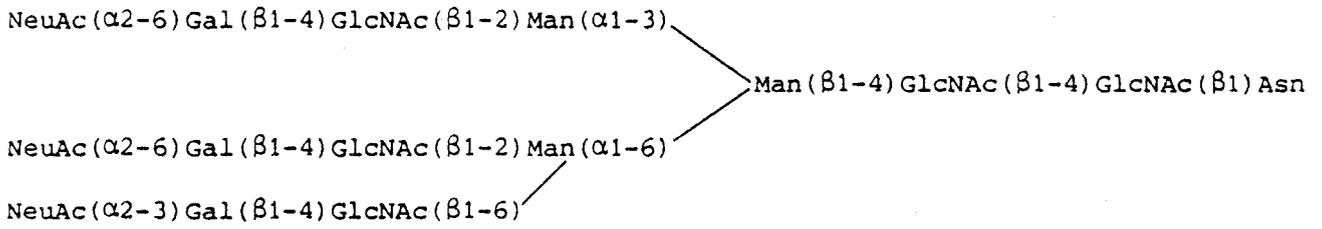
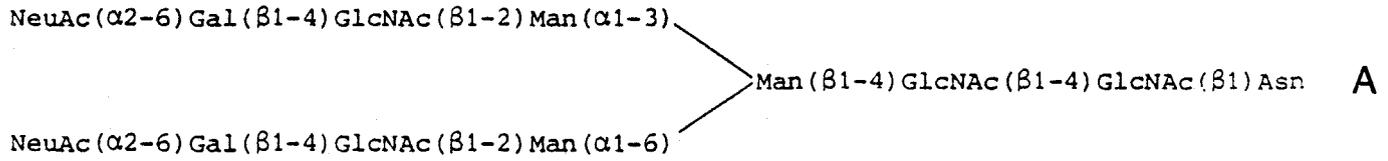
La nature glycannique de la sérotransferrine humaine a été reconnue par SCHULTZE et al. (1958). La protéine porte deux glycannes qui lui sont associés par une liaison de type N-(β -aspartyl)-N-acétyl glucosaminique (SPIK et al., 1965a; 1965b; 1969; SPIK, 1968).

A - STRUCTURE DES GLYCANNES

La structure des glycannes de la sérotransferrine humaine, comme ceux d'autres transferrines, a été essentiellement déterminée au Laboratoire. Les glycannes sont de type N-acétyl lactosaminique et sont soit biantennés, soit triantennés.

1 - Structure du glycanne biantenné

La séquence primaire des glycannes a été entreprise par MONTREUIL et al., dès 1962. La structure du glycanne biantenné a été définitivement établie par SPIK et al. (1974a; 1974b; 1975) par des méthodes chimiques puis confirmée par l'analyse des spectres de résonance magnétique nucléaire à 360 MHz par DORLAND et al. en 1977 (Fig. 4A p. 16).



B

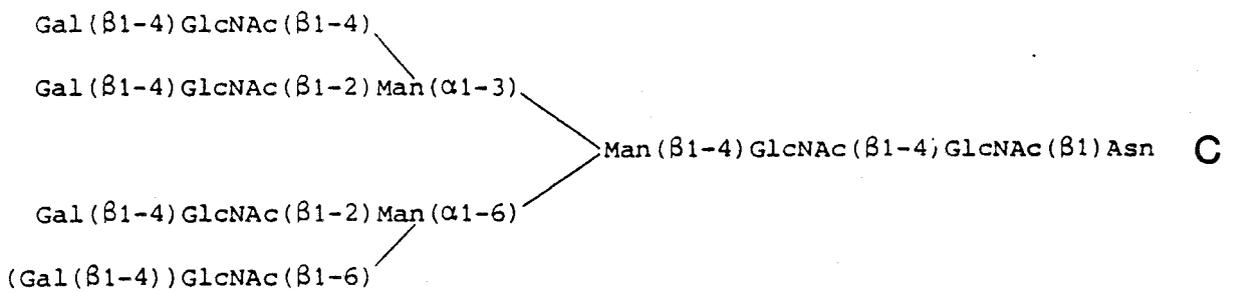
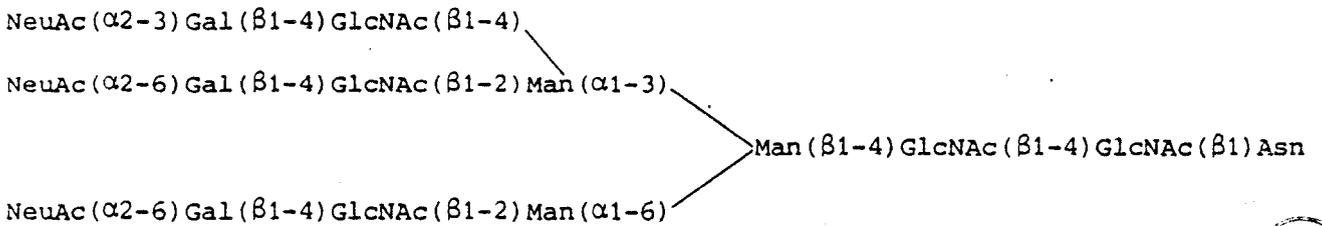


Figure 4 : Structure des glycanes de la sérotransferrine humaine.

D'après SPIK et al. (1973; 1974; 1975; 1982; 1985); DORLAND et al. (1977); MÄRZ et al. (1982).

2 - Structure du glycanne triantenné

Sur la base des résultats de méthylation, la présence de deux types de glycannes triantennés, différant par la nature du branchement de la troisième antenne sur un des résidus de mannose, a été suggérée par KRUSIUS et al. (1981).

La structure complète des glycannes triantennés a été réalisée au Laboratoire par DEBRUYNE et al. (1984) par des méthodes chimiques et confirmée par analyse des spectres de résonance magnétique nucléaire à 500 MHz par SPIK et al. (1985) (Fig. 4B p. 16).

3 - Structure du glycanne tétraantenné

La présence d'un glycanne de structure tétraantennée a été envisagée (MÄRZ et al., 1982; SPIK et al., 1985) (Fig. 4C p. 16).

B - CONFORMATION DES GLYCANNES

1 - Conformation en Y

La première image d'un glycanne fut donnée par MONTREUIL en 1975, après construction du modèle moléculaire du glycanne biantenné de la sérotransferrine humaine. En tenant compte des ponts hydrogène susceptibles d'exister sur la molécule, la conformation en Y fut adoptée (Fig. 5A p. 18).

2 - Conformation en T

Sur la base d'études de diffraction aux rayons X de cristaux du trisaccharide Man (α 1-3) Man (β 1-4) GlcNAc, MONTREUIL et al. (1979) et WARIN et al. (1979) montrent que le mannose lié en (α 1-3) est perpendiculaire au plan formé par le disaccharide Man (β 1-4) GlcNAc. L'antenne en (α 1-3) est disposée perpendiculairement à l'antenne en (α 1-6) d'où la conformation en T proposée par ces deux auteurs (Fig. 5B p. 18).

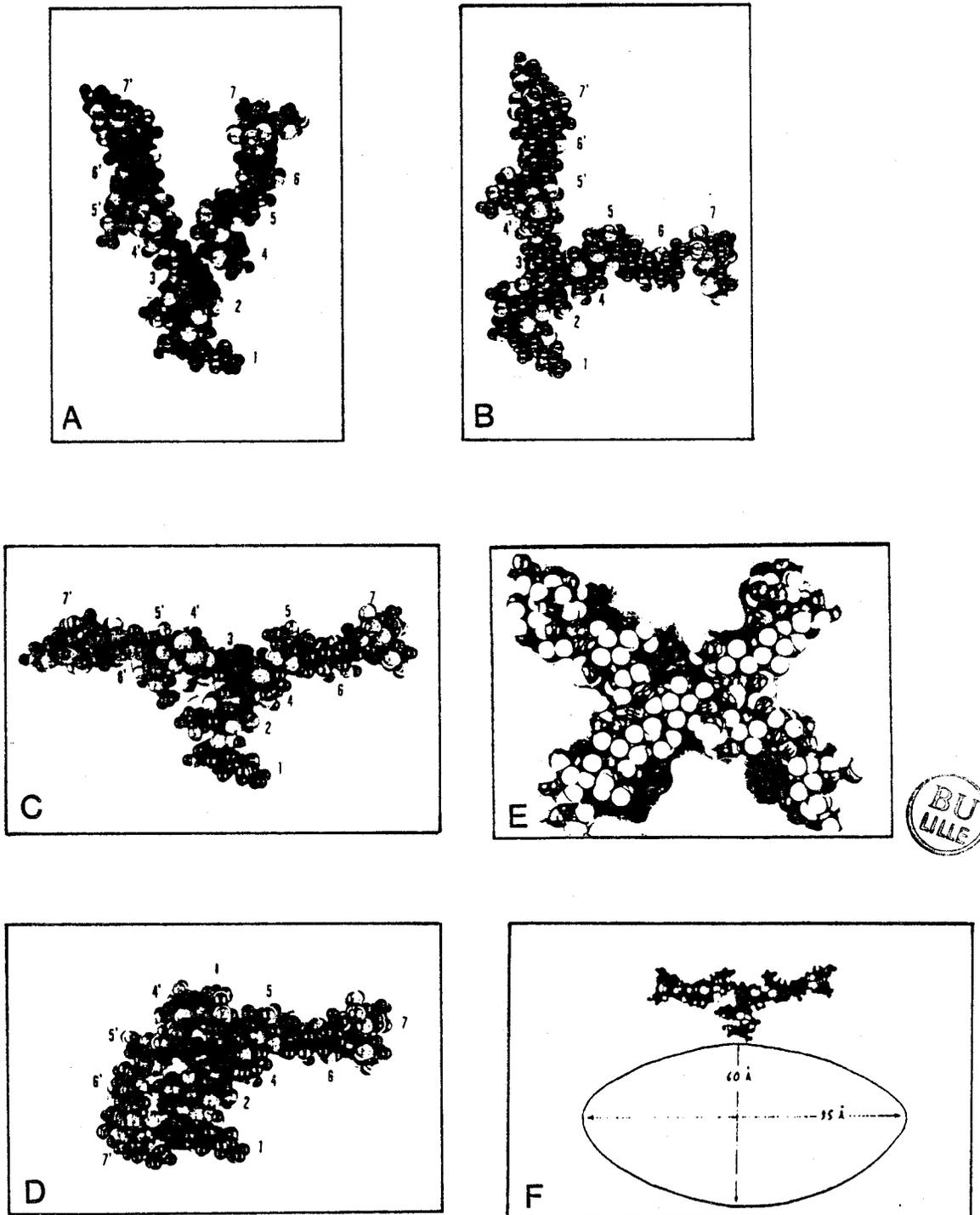


Figure 5 : Modèles moléculaires compacts des glycanes de type N-acétyl lactosaminiques.

A : conformation en "Y"

B : conformation en "T"

C : conformation en "oiseau"

D : conformation en "aile brisée"

E : conformation en "parapluie"

F : comparaison de la dimension d'un glycanne biantenné et de la partie protéique de la sérotransferrine.

D'après MONTREUIL (1975; 1980a; 1980b; 1982; 1983; 1984; 1986).

3 - Conformation en "oiseau"

La conformation en "oiseau" a été suggérée par MONTREUIL (1980; 1982; 1983), DEISENHOFFER (1981), BOCK et al. (1982) et SUTTON et al. (1983). Cette conformation est obtenue par une large rotation de la branche autour de la liaison (α 1-6) du mannose qui oblige les antennes à prendre deux directions opposées.

Ces trois conformations, Y, T et en "oiseau", sont interconvertibles en solution (DOUY et al., 1980a; 1980b). La flexibilité des antennes dans l'espace a été démontrée par DAVOUST et al. (1981). La conformation en "oiseau" est énergiquement la plus favorable (Fig. 5C p. 18).

4 - Conformation en "aile brisée"

Une conformation en "aile brisée" est proposée par MONTREUIL (1984), à la suite des travaux de BRISSON et CARVER (1983a; 1983b) et MEYER (1983) et dans laquelle la branche liée en (α 1-6) subit une large rotation qui la rabat contre le noyau du glycanne (Fig. 5D p. 18).

5 - Conformation en "parapluie"

Finalement, sur la base de la conformation en "oiseau", MONTREUIL (1982; 1983) propose une structure en "parapluie" pour les glycanes portant une branche supplémentaire sur les mannoses (α 1-6) et (α 1-3). Toutes les antennes sont disposées perpendiculairement dans le même plan et sont parallèles à la surface de la protéine. Cette conformation a été confirmée par résonance magnétique nucléaire à haut-champ (BOCK et al., 1982) et par diffusion de neutrons aux petits angles (LI et al., 1983) (Fig. 5E p. 18).

6 - Dimensions

Les dimensions du glycanne biantenné sialylé de la sérotransferrine humaine ou de Lapin sont : longueur 5,5 nm, hauteur 2,4 nm, épaisseur 0,5 nm et surface 2,75 nm² (MONTREUIL, 1986). Ces dimensions sont importantes comparées à celles de la protéine qui est

une sphère aplatie possédant des demi-axes de longueurs $4,66 \pm 0,14$ nm, $4,66 \pm 0,14$ nm et $1,58 \pm 0,38$ nm (GORINSKY et al., 1979) (Fig. 5F p. 18).

C - LOCALISATION DES GLYCANNES SUR LA CHAÎNE PEPTIDIQUE

Des recherches systématiques de la séquence Asn-X-Thr/Ser, codant pour la N-glycosylation des protéines, ont été réalisées sur chaque domaine des transferrines par MAZURIER et al. (1983). Dans la sérotransferrine humaine, deux séquences codes ont été observées sur le domaine C-terminal. MAC GILLIVRAY et al. (1983) positionnent les glycanes sur les résidus d'asparagine 413 et 611. De plus, ces résidus sont situés dans une conformation en β -turn (AUBERT et al., 1976).

E - LES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE

HUMAINE

La distribution relative des glycanes bi- et triantennés sur la molécule de sérotransferrine humaine a été longtemps controversée.

En 1975, MONTREUIL et SPIK concluent que le glycanne triantenné, quand il existe, est toujours lié au résidu d'asparagine du deuxième site de glycosylation (Asn 611). Cependant, HATTON et al. (1979) montrent que les glycanes triantennés peuvent être liés sur l'un ou l'autre des deux résidus d'asparagine.

D'après BAYARD et KERKAERT (1980; 1981) et KERKAERT et BAYARD (1982), la sérotransferrine humaine ne pourrait porter que deux glycanes biantennés ou deux glycanes triantennés sur une même chaîne polypeptidique.

Néanmoins, WONG et al. (1978), SPIK et al. (1982) et DEBRUYNE et al. (1984) ont isolés trois variants de la sérotransferrine humaine en fonction de leur affinité pour la Concanavaline A :

- le variant I, non retenu par la lectine, représente 1,5 % de la sérotransferrine totale et renferme deux glycanes triantennés par molécule de sérotransferrine;

- le variant II, retardé par la lectine, représente 23 % du total et renferme un glycanne biantenné et un glycanne triantenné par molécule de sérotransferrine;

- le variant III, retenu par la lectine, représente 75,5 % du total et renferme deux glycanes biantennés par molécule de sérotransferrine (Fig 6 p. 22).

Il semble donc bien qu'il existe trois variants glycaniques de la sérotransferrine humaine. La présence d'un glycanne tétraantenné, envisagée par MÄRZ et al. (1982) et SPIK et al. (1985), suggère l'existence d'un quatrième variant de la sérotransferrine humaine.

E - MODIFICATIONS DU TAUX DES VARIANTS TRANSFERRINIQUES

Par affino-immunoélectrophorèse, SPIK et al. (1983) et DEBRUYNE et al. (1984) ont montré que les proportions relatives de chacun des variants glycaniques de la sérotransferrine sont profondément modifiées dans certains cas pathologiques. Dans le sérum de sujets atteints de cirrhose alcoolique ou d'hépatite virale, le pourcentage des variants I et II par rapport à la sérotransferrine totale est augmenté alors que le pourcentage du variant III diminue. Cependant, la proportion relative des trois variants transferriniques n'est pas affectée chez des sujets atteints d'hémochromatose (tableau II p. 23).

De plus, selon STIBLER et BORG (1981), le taux d'acides sialiques de la sérotransferrine de patients consommant de grande quantité d'éthanol (60 g/jour), est diminué de deux résidus d'acides sialiques par molécule de sérotransferrine. Cette anomalie est réversible après deux semaines d'abstinence. SPIK et al. (1983), REGOECZI et al. (1984) et DEKKER et al. (1985) suggèrent que l'incorporation du fer de la sérotransferrine partiellement sialylée est plus active au niveau du foie du fait de la présence du récepteur de la sérotransferrine et du récepteur lectinique à galactose. L'augmentation du taux du variant I, qui a plus d'affinité pour le récepteur à galactose, pourrait donc

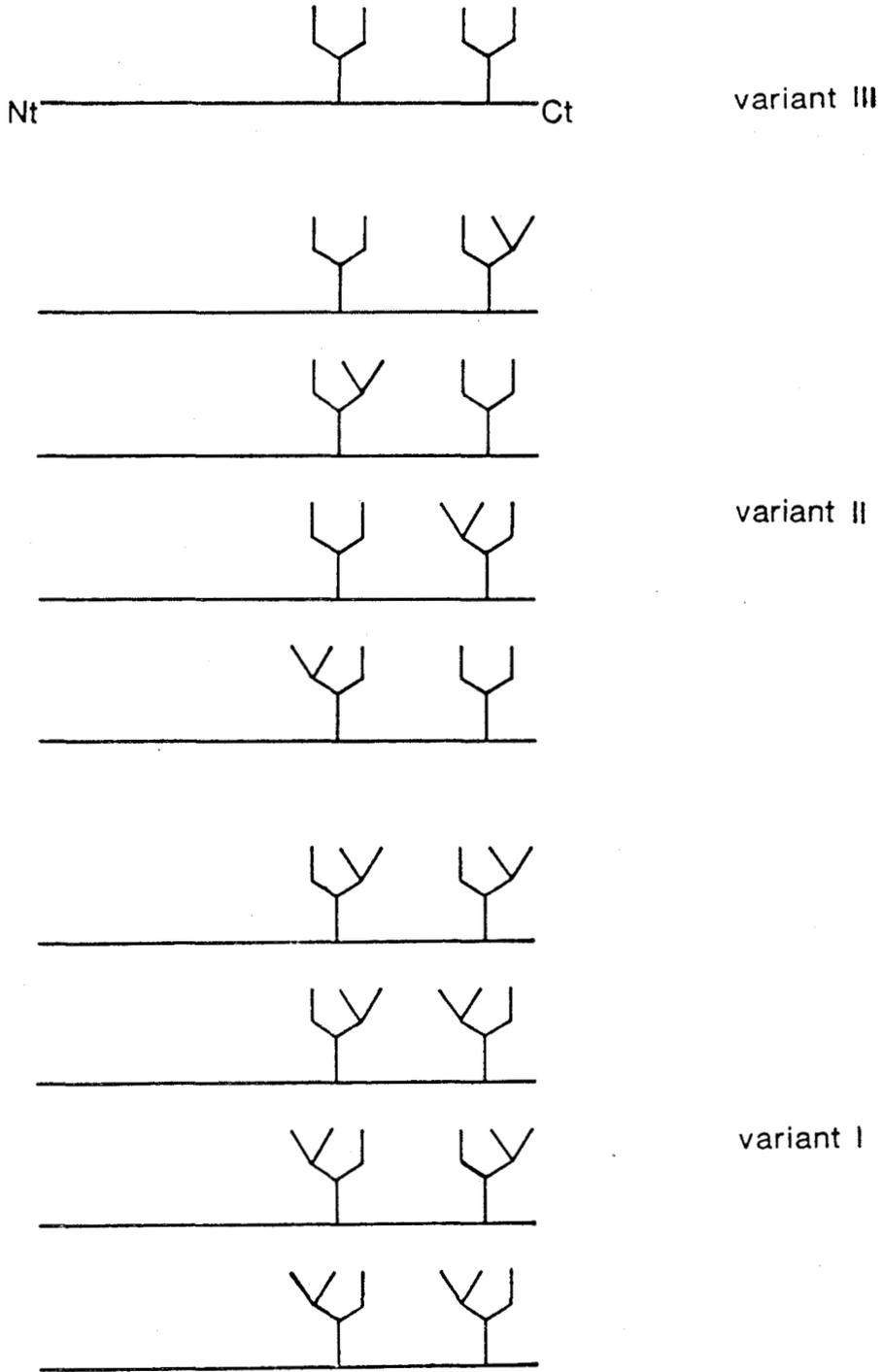


Figure 6 : Représentation schématique des différents variants glycaniques de la sérotransferrine. Glycane triantenné ayant la branche supplémentaire liée en :

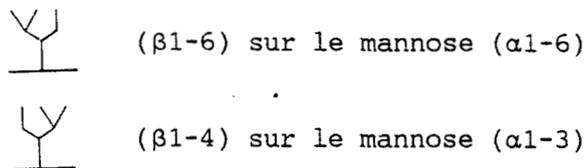


TABLEAU II

Proportions relatives des variants I, II et III de la sérotransferrine dans certains cas pathologiques, calculées d'après la surface des pics de précipitations obtenus par électrophorèse d'immuno-affinité.

D'après SPIK et al. (1983)

Origine du sérum	Nombre d'échantillons	% de la sérotransferrine totale			Protéine totale (mg/100ml)
		VARIANT I	VARIANT II	VARIANT III	
Normal	25	0	12 ± 3	88 ± 4	249 ± 26
Cirrhose	12	4 ± 2	27 ± 7	69 ± 7	149 ± 82
Hépatite virale	15	4 ± 3	24 ± 4	72 ± 7	241 ± 12
Hémochromatose	14	0	13 ± 3	87 ± 5	251 ± 66



expliquer la surcharge en fer hépatique observée chez les patients cirrhotiques.

STIBLER et al. (1986b) montrent que l'activité de la sialyltransférase du sérum ou des membranes d'érythrocytes n'est pas diminuée chez des patients alcooliques, indiquant que des abus quotidiens d'éthanol n'ont pas d'effets inhibiteurs sur la sialyltransférase.

Poussant plus loin ces investigations, STIBLER et BORG (1986a) montrent que la déficience en acides sialiques de la sérotransferrine de patients alcooliques est en fait l'indication d'un phénomène plus complexe affectant les structures glycaniques de la sérotransferrine : la déficience en saccharides n'affecte pas uniquement les acides sialiques mais aussi les résidus de galactose et de N-acétyl glucosamine qui constituent le trisaccharide terminal de la sérotransferrine. Cependant, cette forme de transferrine déficiente en sucre (CDT : Carbohydrate Deficient Transferrin) existe dans le sérum d'individus ne consommant pas ou peu (moins de 40 g/jour) d'éthanol à la concentration de 26 à 74 mg/l (150 individus testés). Pour les individus consommant plus de 60 g d'éthanol par jour, le taux de CDT est significativement augmenté : 34 à 372 mg/l (100 individus testés) (STIBLER et al., 1987).

CONCLUSION

Les nombreuses études réalisées sur la sérotransferrine humaine ont permis de préciser la structure générale de cette glycoprotéine.

La sérotransferrine possède trois variants glycaniques pour lesquels une signification biologique n'a pas encore été trouvée et dont les taux respectifs sont modifiés dans certains cas pathologiques.

Dans le chapitre suivant, nous allons décrire les principales propriétés biologiques de la sérotransferrine humaine, en particulier, son interaction avec des récepteurs spécifiques de cellules cibles.

INTERACTION DE LA SÉROTRANSFERRINE HUMAINE AVEC LES RECEPTEURS MEMBRANAIRES DES CELLULES

I - RÔLE DE LA SÉROTRANSFERRINE DANS LE MÉTABOLISME DU FER

La sérotransferrine constitue une plaque tournante du métabolisme du fer. Son rôle a fait l'objet de plusieurs revues générales : LANE (1976), HERSHKO (1977), AISEN et BROWN (1977) et BROCK (1985).

A - ROLE DANS LE TRANSPORT DU FER

La sérotransferrine prélève le fer au niveau des sites d'absorption (cellules muqueuses intestinales), des sites de réserve (parenchyme hépatique) et des sites de catabolisme de l'hémoglobine (cellules réticulo-endothéliales), le transporte et le délivre aux sites d'utilisation : la moelle osseuse, le placenta et toutes les autres cellules de l'organisme.

Le cycle du fer dans l'organisme humain est décrit dans la figure 7 page 26. Les globules rouges, au terme de leur vie, sont phagocytés par les macrophages qui catabolisent l'hémoglobine. Le fer libéré est alors capté par la sérotransferrine et est soit réutilisé immédiatement, soit stocké au niveau de la ferritine des cellules du système réticulo-endothélial ou des cellules parenchymateuses du foie, les hépatocytes.

B - ROLE DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER

L'absorption quotidienne de fer (1 à 2 mg), liée à une perte identique, fait intervenir un mécanisme complexe fortement régulé

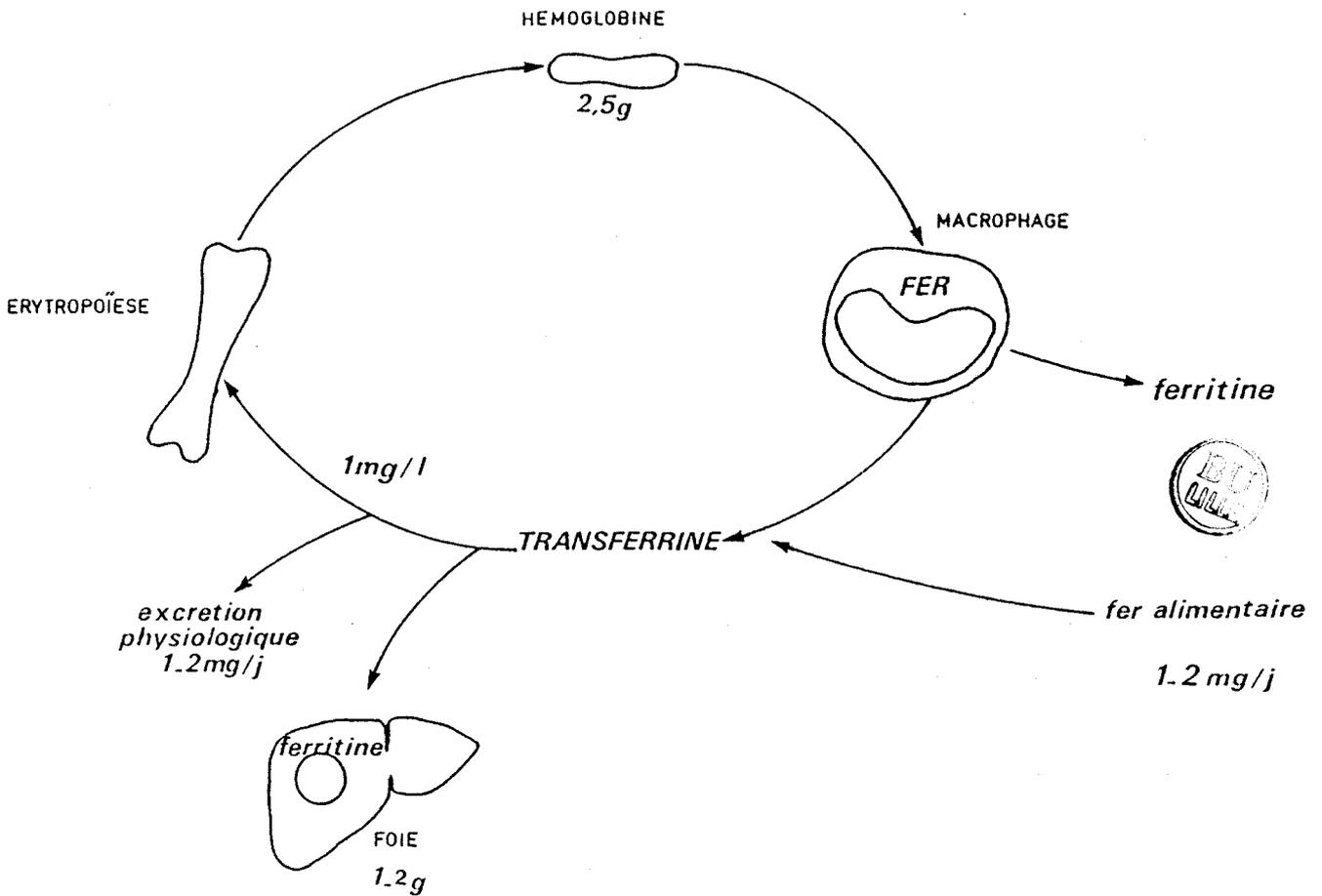


Figure 7 : Le cycle du fer dans l'organisme.
D'après RYMER (1981).

(FORTH et RUMMEL, 1973; TURNBULL, 1974; REFSUM et al., 1984). L'absorption a lieu au niveau de la bordure en brosse des entérocytes du jéjunum et du duodénum (LINDER et MUNRO, 1977) suivie du transfert de l'entérocyte vers la circulation sanguine. La fixation du fer sur l'entérocyte est controversée : elle nécessite soit l'intervention de la sérotransferrine (KIYOKO et al., 1982; HUEBERS et al., 1983; PURVES et al., 1984; REFSUM et al., 1984), soit l'implication de la lactotransferrine (COX et al., 1979; YOSHINO et al., 1983; MAZURIER et al., 1984; 1985) au niveau de la bordure en brosse du duodénum (HU et al., 1988). Les récents travaux de MAZURIER et al. (1984; 1985), PARMLEY et al. (1985) et de BEZWODA et al. (1986) suggèrent que la sérotransferrine ne joue pas de rôle physiologique dans l'absorption intestinale du fer.

C - ROLE DANS L'ACTIVITE BACTERIOSTATIQUE

L'activité bactériostatique de la sérotransferrine a été mise en évidence in vitro dès 1946 par SHADE et CAROLINE. En complexant le fer, la sérotransferrine empêche la multiplication d'agents infectieux pour lesquels ce métal est indispensable.

Lors d'une infection bactérienne ou virale, la sidérémie baisse brutalement (WEINBERG, 1974) au profit d'une augmentation du fer de réserve dans le foie et le macrophage (PEKAREK et al., 1969). D'autre part, l'absorption intestinale du fer diminue (DUBACH et al., 1948; BERESFORD et al., 1971). Ce qui a pour but de diminuer la croissance des bactéries par ferriprivation. Les leucocytes activés au contact de la bactérie libèrent dans le sang un "Leukocitic Endogenous Mediator" ou L.E.M. (KAMPSCHMIDT, 1975) qui interagit avec les neutrophiles pour entraîner une libération de la lactotransferrine dans le milieu extracellulaire (SPIK et MONTREUIL, 1983). Selon VAN SNICK et al. (1974; 1976; 1977), la lactotransferrine libérée sous forme apocapterait le fer de la sérotransferrine plasmatique et le délivrerait au niveau du macrophage où le fer serait stocké sous forme de ferritine. La sérotransferrine désaturée peut alors priver de fer la bactérie.

II - LE RECEPTEUR MEMBRANAIRE DE LA SEROTRANSFERRINE

La sérotransferrine est le principal transporteur du fer vers les différents organes et donc vers différents types de cellules; cela implique l'existence de récepteurs spécifiques de la sérotransferrine, situés à la surface des cellules où s'effectue le transfert. La structure, la fonction et la régulation du récepteur de la sérotransferrine font l'objet de plusieurs revues générales récentes (BOMFORD et MUNRO, 1985; HUEBERS et FINCH, 1987; WARD, 1987).

A - MISE EN EVIDENCE DU RECEPTEUR MEMBRANAIRE DE LA SEROTRANSFERRINE

1 - Les réticulocytes

L'incorporation du fer par les réticulocytes a été mis en évidence par WALSH et al. dès 1949. Mais l'existence d'un récepteur spécifique sur la membrane du réticulocyte a été suggérée pour la première fois par JANDL et al. en 1959. GARRET et al. (1973) ont montré que la sérotransferrine pouvait être extraite des membranes traitées aux détergents, liée à une autre macromolécule qu'ils ont identifiée comme étant le récepteur de la sérotransferrine. De nombreuses études concernant l'isolement et la caractérisation du récepteur de la sérotransferrine ont été menées par solubilisation des membranes de réticulocytes. Les résultats obtenus ont été très hétérogènes, particulièrement en ce qui concerne la masse moléculaire du récepteur isolé, les extrêmes étant de 30 000 (LIGHT, 1977) et 400 000 (LEIBMAN et AISEN, 1977) selon la méthodologie employée.

2 - Les hépatocytes

Environ 10 % du fer lié à la sérotransferrine est dirigé vers le foie pour être stocké dans les sous-unités de la ferritine. Au niveau de l'hépatocyte, le fer est amené par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques de la sérotransferrine dont l'existence a été

démontrée par GARDINER et MORGAN (1974), VAN BROCKXMEER et al. (1975) et GROHLICH et al. (1977; 1979).

Cependant, SODA et TAVASSOLI (1984) et TAVASSOLI et al. (1986) suggèrent que les hépatocytes ne possèdent pas de récepteurs de la sérotransferrine mais que ceux-ci sont situés sur la membrane des cellules endothéliales du foie.

Il faut signaler néanmoins qu'en 1983, DAUTRY-VARSAT et al. ont mis en évidence le récepteur de la sérotransferrine sur une lignée cellulaire humaine provenant d'un hépatome, les cellules Hep G2.

3 - Les cellules du placenta

Durant la gestation, les besoins en fer du fœtus sont pourvus grâce à l'apport du fer lié à la sérotransferrine maternelle (FLETCHER et SUTER, 1969).

La présence de récepteurs spécifiques de la sérotransferrine a été mise en évidence par KING (1976) puis par GALBRAITH et al. (1978) sur les microvillosités du syncytium trophoblastique, tissu directement en contact avec le sang maternel.

Récemment, VANDERPUYE et al. (1986) ont montré que la membrane basale du syncytiotrophoblaste, au contact de la circulation sanguine foetale, possède un récepteur de la sérotransferrine identique à celui de la membrane de la bordure en brosse.

4 - Les autres cellules

Des récepteurs de la sérotransferrine ont été mis en évidence sur de nombreuses lignées cellulaires humaines (Tableau III p. 30). La majorité des cellules nucléées possèdent des récepteurs de la sérotransferrine (NEWMAN et al., 1982) et ceux-ci font l'objet d'une attention toute particulière depuis que plusieurs auteurs ont montré que le nombre de récepteurs à la surface de la cellule est associé à la prolifération cellulaire (OCTAVE et al., 1979; LARRICK et CRESSWELL, 1979; LARSON et al., 1980; SUTHERLAND et al., 1981; URUSHIZAKI et al., 1983).

TABLEAU III

Récepteurs de la sérotransferrine sur différentes lignées cellulaires humaines.

Cellules	Nombre de récepteurs par cellule ($\times 10^3$)	Constante d'affinité pour la transferrine saturée en fer (M^{-1})	Références
lymphoblastoïdes T	60	1×10^8	LARRICK et CRESSWELL (1979)
lymphoblastoïdes B	30	1×10^8	
K 562 (leucémie)	150	$5,3 \times 10^8$	KLAUSNER <u>et al.</u> (1983)
Choriocarcinomes	370	$4,2 \times 10^8$	HAMILTON <u>et al.</u> (1979)
HeLa	2800	$3,7 \times 10^7$	WARD <u>et al.</u> (1982a)
Hépatome HepG2	60	$1,4 \times 10^8$	DAUTRY-VARSAT <u>et al.</u> (1983)
Fibroblastes	40	1×10^7	WARD <u>et al.</u> (1982b)
Mammocytes	210	$Kd = 13 \times 10^{-9}$	VANDEWALLE <u>et</u> <u>al.</u> (1985)



B - STRUCTURE ET PROPRIETES DU RECEPTEUR DE LA SÉROTRANSFERRINE

1 - Structure et conformation

L'utilisation d'anticorps monoclonaux développés chez des hybridomes de Souris a permis l'isolement et l'étude structurale du récepteur de la sérotransferrine (GODING et BURNS, 1981; TROWBRIDGE et LOPEZ, 1982; NIKINMAA et al., 1984). TROWBRIDGE et OMARY (1981) ont découvert que l'anticorps B3/25 dirigé contre une glycoprotéine membranaire associée à la prolifération d'une lignée cellulaire de leucémie érythroïde (cellules K562) réagit en fait avec le récepteur de la sérotransferrine. De même, SUTHERLAND et al. (1981) montrent que l'anticorps OKT9 dirigé contre une glycoprotéine membranaire des T-lymphocytes immatures, réagit lui aussi avec le récepteur de la sérotransferrine.

Le récepteur de la sérotransferrine est donc une glycoprotéine de masse moléculaire 180 000, composée de deux sous-unités de 90 000 daltons et pouvant fixer chacune une molécule de sérotransferrine (WADA et al., 1979; SCHNEIDER et al., 1982). Les deux sous-unités sont réunies entre elles par un pont disulfure.

Le récepteur est glycosylé : chaque sous-unité porte un glycanne de type N-acétyl lactosaminique et deux glycannes de type oligo-mannosidique.

Le récepteur est transmembranaire : chaque sous-unité est liée covalentiellement à un acide gras, l'acide palmitique, qui permet l'ancrage du récepteur à la membrane (OMARY et TROWBRIDGE, 1981a; 1981b). De plus, le récepteur est phosphorylé mais la phosphorylation n'est pas indispensable à l'internalisation du récepteur (ROTHENBERGER et al., 1987) (Fig 8 p. 32).

Le gène contrôlant la biosynthèse de ce récepteur a été situé sur le chromosome 3, tout comme celui de la sérotransferrine (ENNS et al., 1982; GOODFELLOW et al., 1982) et celui de la mélanotransferrine (ROSE et al., 1986).

La séquence peptidique du récepteur de la sérotransferrine humaine a été déduite de la séquence du mRNA par SCHNEIDER et al. (1984) et du cDNA par MAC CLELLAND et al. (1984). Chaque sous-unité polypeptidique est composée de 760 résidus d'acides aminés. La partie

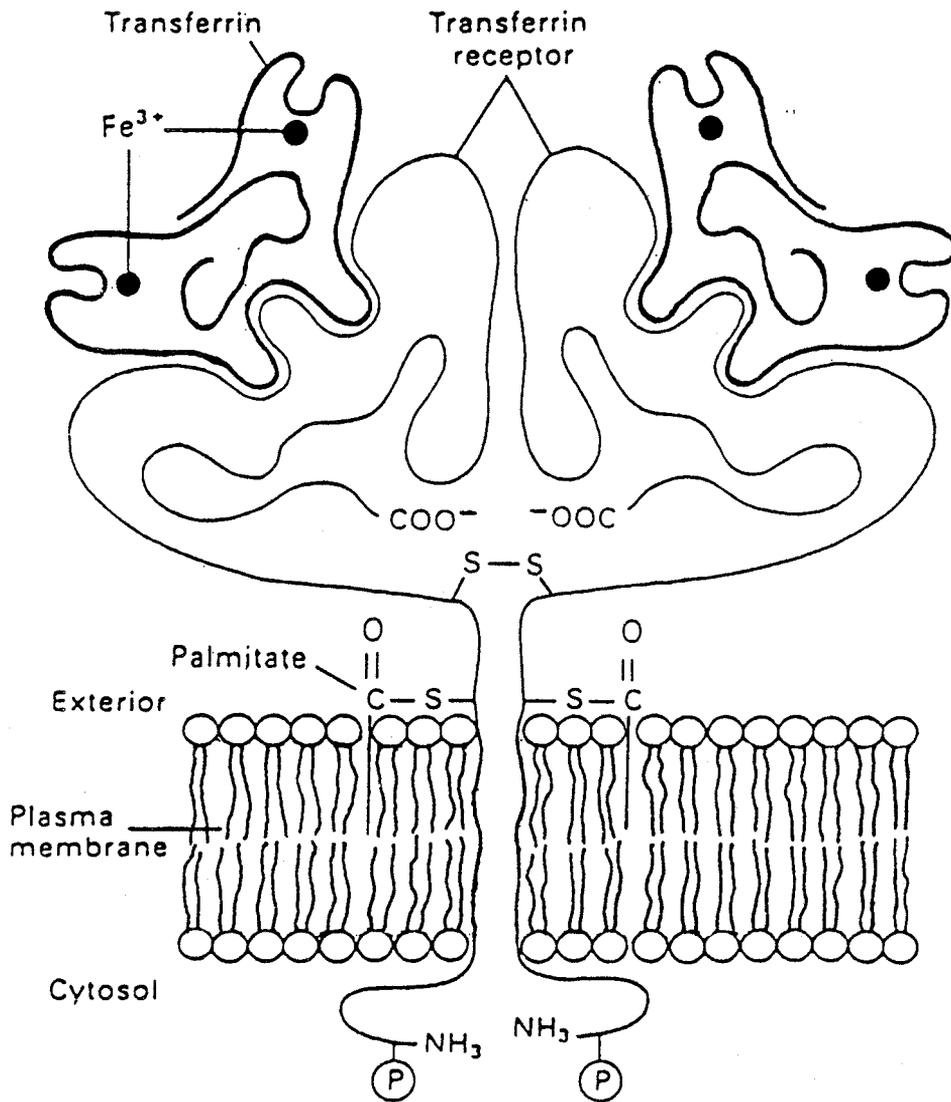


Figure 8 : Représentation schématique du récepteur de la séro-transferrine déduite de la séquence du cDNA.
D'après DAUTRY-VARSAT et LODISH (1984a).

N-terminale (62 résidus d'acides aminés) est orientée vers le cytoplasme. Le domaine cytoplasmique ou une partie de celui-ci est indispensable à l'internalisation du récepteur (ROTHENBERGER et al., 1987). La partie transmembranaire (26 résidus d'acides aminés) est très hydrophobe et sert à la fois d'ancrage et de signal de translocation dans la membrane (ZERIAL et al., 1987). La partie C-terminale (672 résidus d'acides aminés) est orientée vers l'extérieur. Chaque molécule possède cinq séquences codes Asn-X-Ser/Thr. Seules trois séquences codes situées sur la partie C-terminale sont glycosylées.

JING et TROWBRIDGE (1987) montrent que les résidus de cystéines 89 et 98, localisés dans le domaine extracellulaire sont impliqués dans le pont disulfure interchaîne. De plus, ils identifient le résidu de cystéine 62 comme étant le site d'acylation.

4 - Universalité du récepteur

L'hypothèse de l'universalité du récepteur de la sérotransferrine a été émise par HAMILTON et al. (1979) et WADA et al. (1979b) qui, par l'utilisation d'anticorps dirigés contre le récepteur placentaire de la sérotransferrine, ont caractérisé le récepteur sur différentes lignées cellulaires humaines. De plus, ENNS et SUSSMAN (1981b) ont montré qu'il existe de nombreuses similitudes entre les récepteurs de la sérotransferrine isolés du placenta humain et ceux des réticulocytes humains. La découverte des anticorps monoclonaux B3/25 et OKT9, qui reconnaissent le récepteur de la sérotransferrine, a permis de confirmer cette hypothèse. NEWMAN et al. (1982) ont isolé un seul type de récepteur de la sérotransferrine sur une grande variété de cellules : cellules de foie foetal, normoblastes, cellules leucémiques, neuroblastomes et cellules cancéreuses du pancréas.

3 - Spécificité de la fixation de la sérotransferrine sur son récepteur

Le récepteur est spécifique de la sérotransferrine humaine et pas de la lactotransferrine ou de l'ovotransferrine (PRINCIOTTO et ZAPOLSKI, 1976; BROCK et ESPARZA, 1979; COX et al., 1979; VAN BROCKMEER et MORGAN, 1982). La sérotransferrine bovine se fixe spécifiquement sur les cellules humaines K562 mais avec une affinité 2 000

fois plus faible que la sérotransferrine humaine (TSAVALER et al., 1986).

La fixation de la sérotransferrine sur son récepteur est pH dépendante. La fixation optimale se situe à pH 7-8. De plus, l'affinité de l'apo-sérotransferrine pour le récepteur est plus élevée à pH 5 qu'à pH 7 (DAUTRY-VARSAT et al., 1983; KLAUSNER et al., 1983).

La partie glycanique du récepteur semble être indispensable à la reconnaissance de la sérotransferrine (STEINER, 1980; LOH, 1982).

Les anticorps monoclonaux B3/25 et OKT9 n'affectent pas la fixation de la sérotransferrine (SUTHERLAND et al., 1981; TROWBRIDGE et LOPEZ, 1982) mais inhibent la croissance des cellules tumorales humaines (TROWBRIDGE et DOMINGO, 1981).

C - REGULATION DU NOMBRE DE RECEPTEUR

La disponibilité du fer pour les cellules peut être altérée par des changements du nombre de récepteurs de la sérotransferrine situés à la surface cellulaire. Ces changements sont dus, soit à une modification dans la synthèse du récepteur, soit à un déplacement de la proportion du nombre de récepteurs entre la surface cellulaire et la réserve endogène (BOMFORD et MUNRO, 1985) (Fig. 9 p. 35).

La synthèse du mRNA et sa transcription en récepteur de la sérotransferrine sont principalement régulées par le fer présent dans le milieu. Le nombre total de récepteurs à la surface de la cellule diminue en présence d'un excès de fer (LOUACHE et al., 1984; WARD et al., 1984; RUDOLPH et al., 1985). Par contre, il augmente en présence de chélateurs du fer (MATTIA et al., 1984; BRIDGES et CUDKOWICZ, 1984; BOTTOMLEY et al., 1985; BOMFORD et al., 1986).

Une modification rapide et réversible du nombre de récepteurs de la sérotransferrine à la surface cellulaire, provenant de la réserve endogène de récepteurs, peut être provoquée par les esters de phorbols (MAY et al., 1984; KLAUSNER et al., 1984; KOHNO et al., 1986) ou par des facteurs de croissance comme l'EGF (WILEY et KAPLAN, 1984) et par l'insuline (DAVIS et al., 1986). Le réservoir de récepteurs intracellulaires a été identifié comme étant l'endosome, un organite impliqué

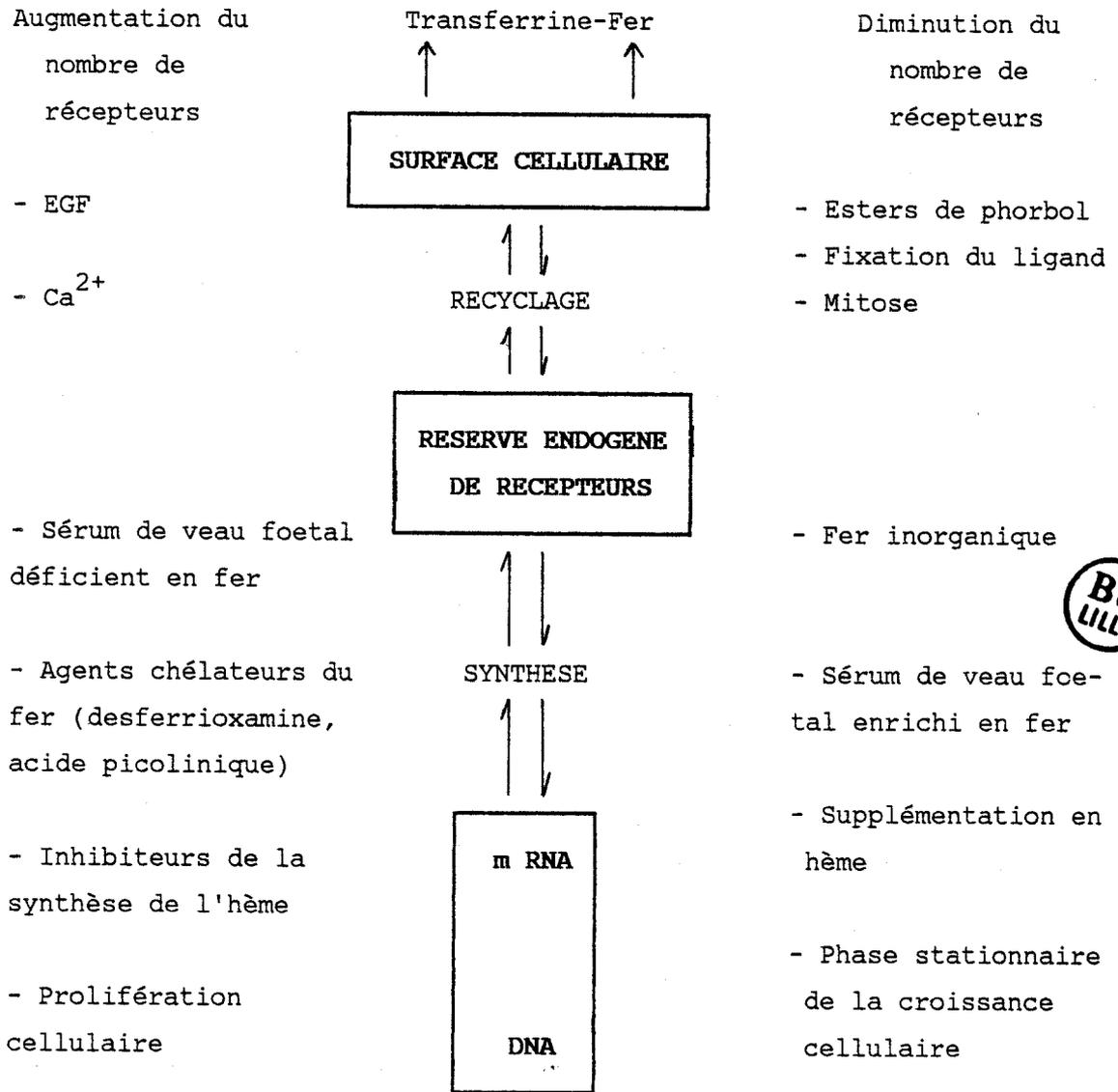


Figure 9 : Régulation du nombre de récepteurs de la sérotransferrine humaine.

D'après BOMFORD et MUNRO (1985).

dans le recyclage des récepteurs vers la surface membranaire (WARD et KAPLAN, 1986).

III - INTERACTION DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE AVEC SON RECEPTEUR

La sérotransferrine transporte le fer à travers tout l'organisme. La présence de récepteurs spécifiques et saturables de la sérotransferrine a été mis en évidence sur un grand nombre de cellules. Le transfert du fer de la sérotransferrine circulante vers la cellule se décompose en quatre étapes :

- 1 - reconnaissance et interaction de la sérotransferrine avec son récepteur membranaire spécifique;
- 2 - internalisation du complexe récepteur-sérotransferrine;
- 3 - libération du fer de la sérotransferrine à l'intérieur de la cellule;
- 4 - libération de l'apo-sérotransferrine hors de la cellule.

Le mécanisme par lequel le fer est libéré de la sérotransferrine et est incorporé dans la cellule reste controversé. Deux hypothèses ont été avancées.

A - PREMIERE HYPOTHESE : LA SEROTRANSFERRINE NE PENETRE PAS DANS LA CELLULE

L'apport de fer aux cellules érythroïdes se fait par l'intermédiaire de la sérotransferrine. Une fois fixée sur son récepteur membranaire, la sérotransferrine cède son fer à une protéine membranaire qui agit comme un intermédiaire dans l'incorporation cellulaire du fer. La sérotransferrine est alors relâchée dans le milieu extracellulaire. Au niveau du cytoplasme, le fer est pris en charge par des transporteurs (SPEYER et FIELDING, 1974; GLASS et al., 1980; VAN DER HEUL et al., 1980; NUNEZ et GLASS, 1983; MORLEY et al., 1985).

Il faut cependant noter que cette hypothèse ne fait pas l'unanimité. Il lui est généralement préférée l'hypothèse suivante.

B - DEUXIEME HYPOTHESE : LE COMPLEXE SEROTRANSFERRINE-RECEPTEUR EST ENDOCYTE

L'hypothèse de l'endocytose de la sérotransferrine a été observée par MORGAN et APPLETON (1969) puis par HEMMAPLARDH et MORGAN (1977). Après la fixation sur son récepteur, la sérotransferrine est endocytée et cède son fer à l'intérieur de la cellule.

Les études réalisées récemment, d'une part, sur les cellules de Mammifères (voir les revues générales d'OCTAVE et al., 1983; 1984) et d'autre part, sur des cellules cancéreuses humaines en culture (les cellules Hep G2, cellules d'hépatomes humains établies en lignée continue) par CIECHANOVER et al. (1983a; 1983b), GEUZE et al. (1983) et DAUTRY-VARSAT et al. (1983) ont permis de préciser le mécanisme d'incorporation cellulaire du fer de la sérotransferrine. De nombreuses revues générales lui ont été consacrées : DAUTRY-VARSAT et LODISH (1984b), PASTAN et WILLINGHAM (1985), SUSSMAN et al. (1985), WILEMAN et al. (1985), DAUTRY-VARSAT (1986), CRICHTON et CHARLOTEAUX- WAUTERS (1987).

La sérotransferrine se fixe sur son récepteur spécifique à la surface de la cellule. Le complexe est alors endocyté dans un puits recouvert ("coated-pits") qui est une invagination de la membrane tapissée d'une protéine appelée clathrine. Ce puits recouvert se détache de la membrane pour former une vésicule recouverte ("coated vesicle") puis perd son revêtement de clathrine. La vésicule se transforme alors en endosome (HELENIUS et al., 1983) ou receptosome (PASTAN et WILLINGHAM, 1981) à l'intérieur duquel le pH est acide, entre 5,0 et 5,5 (TICKO et MAXFIELD, 1982; VAN RENSWOUDE, 1982). L'acidité provoque la libération des deux atomes de fer de la sérotransferrine mais n'affecte pas la stabilité du complexe récepteur-sérotransferrine. Il se forme alors un compartiment de dissociation (ou CURL : "Compartment of Uncoupling of Receptors and Ligands"). Le fer est transporté à travers la membrane de l'endosome vers le cytoplasme par un mécanisme mal connu puis il est retrouvé associé à la ferritine (KLAUSNER et al., 1983). Le complexe récepteur-

aposérot transferrine est recyclé vers la membrane plasmique. A la surface de la cellule, le pH neutre du milieu extracellulaire dissocie l'aposérot transferrine de son récepteur. Celle-ci retourne dans la circulation sanguine où elle pourra refixer deux atomes de fer (Fig. 10 p. 39).

C - EXISTENCE DE DEUX VOIES DISTINCTES DU RECYCLAGE DU COMPLEXE RECEPTEUR-SEROTRANSFERRINE

Les études réalisées sur les cellules KB, cellules de carcinomes humains, par WILLINGHAM et al. (1984), HANOVER et al. (1984; 1985) et HANOVER et DICKSON (1985) ont permis de préciser l'exocytose du complexe récepteur-aposérot transferrine. D'après ces auteurs, la sérot transferrine est internalisée via les puits recouverts et les réceptosomes. Elle est retrouvée ensuite au niveau des tubules du trans-Golgi puis dans des structures vésiculaires en forme d'"haltères" près de la membrane plasmique (Fig. 11 p. 40). FISHMAN et FINE (1987) ont montré que les vésicules d'exocytose provenant du trans-Golgi contenaient de la sérot transferrine en cours de recyclage. YAMASHIRO et al. (1984) montrent que la sérot transferrine en cours d'exocytose, est retrouvée au niveau de compartiments faiblement acides (pH = 6,4) associés à l'appareil de Golgi.

BAKER et al. (1985) suggèrent que la sérot transferrine semble être endocytée par les hépatocytes et les cellules placentaires par deux voies intracellulaires, une voie recyclant rapidement la sérot transferrine et responsable de la majeure partie du fer incorporé dans les cellules et une deuxième voie recyclant plus lentement la sérot transferrine.

STEIN et al. (1984; 1985; 1986) et SUSSMAN et al. (1985) ont traité des cellules K562 (cellules érythroleucémiques) à la monensine. La monensine provoque l'arrêt du transport des vésicules membranaires de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique. Celle-ci provoque une réduction de 50 % maximum du nombre de récepteurs de la sérot transferrine à la surface cellulaire et une accumulation intracellulaire concomitante du complexe récepteur-sérot transferrine, interprétée comme étant une inhibition du recyclage du récepteur via l'appareil de

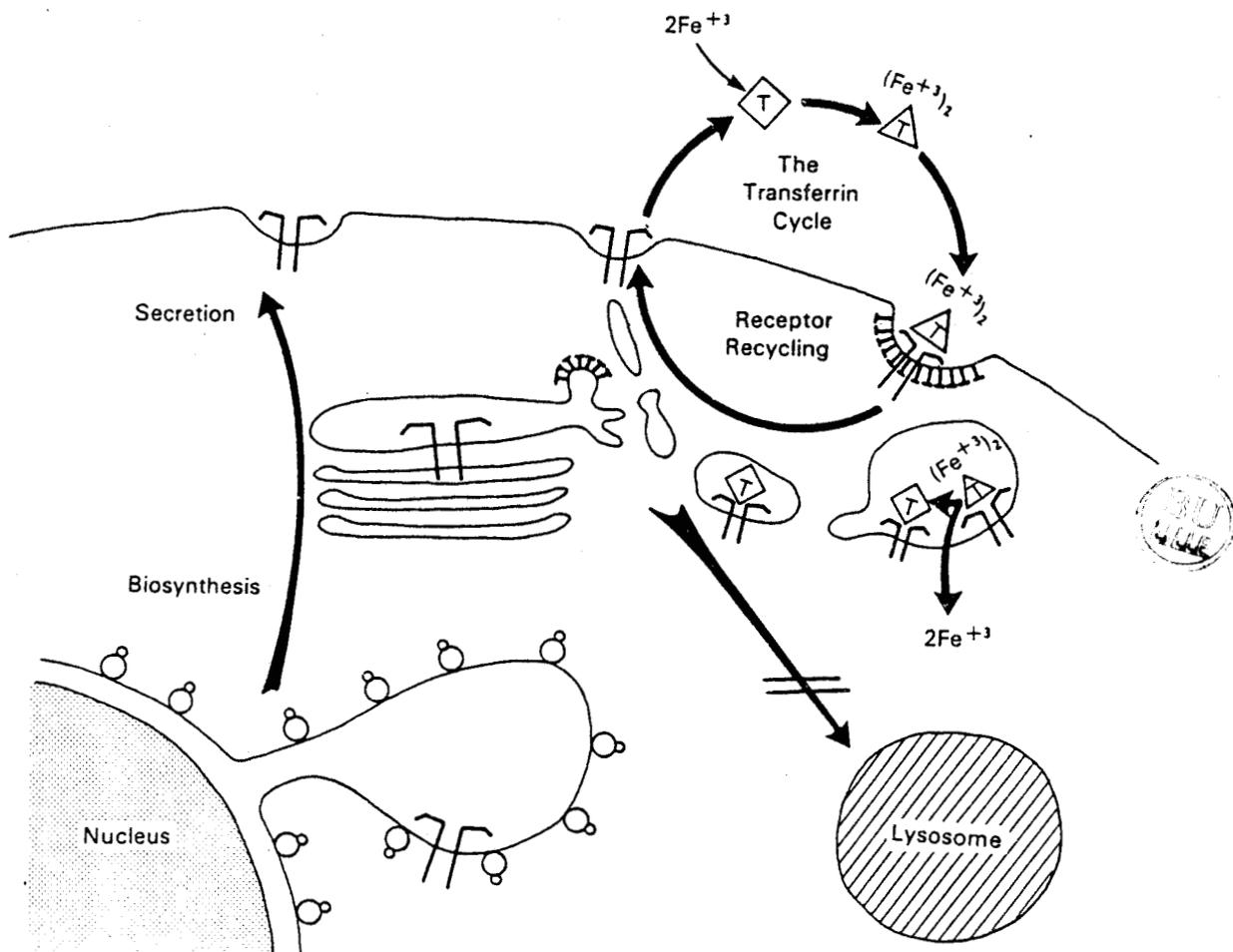
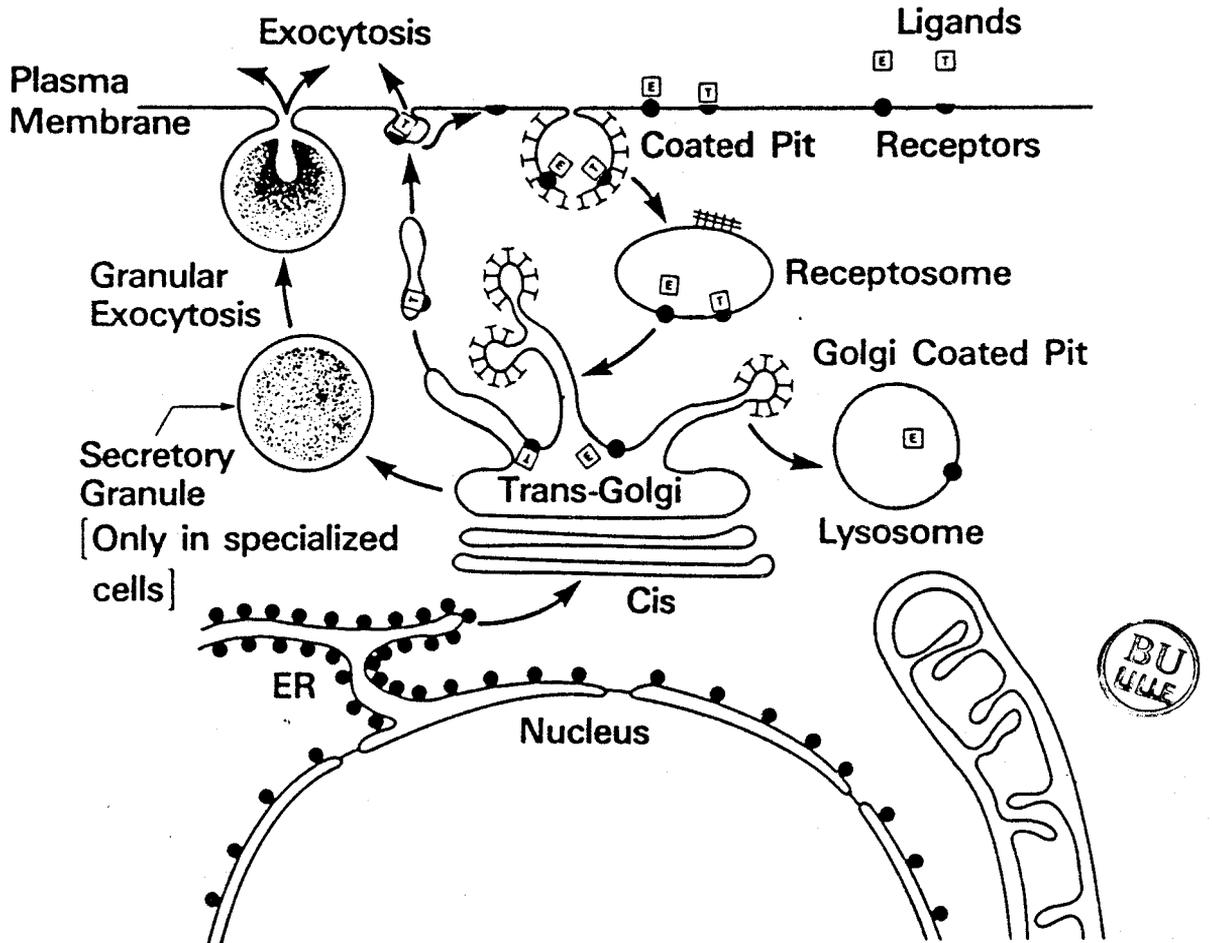


Figure 10 : Le cycle intracellulaire de la sérotransferrine humaine.

D'après HANOVER et DICKSON (1985).



Récepteur de l'EGF ● EGF □
Récepteur de la sérotransferrine ◐ Sérotransferrine ▣

Figure 11 : Schéma hypothétique résumant les différentes voies d'endocytose et d'exocytose de la sérotransferrine dans les cellules en culture.

D'après WILLINGHAM et al. (1984).

Golgi. Ces auteurs proposent deux voies distinctes d'exocytose du complexe récepteur-sérotransferrine : une voie, monensine sensitive, qui transite par l'appareil de Golgi et une autre, monensine résistante, indépendante de l'appareil de Golgi.

En outre, ces auteurs démontrent que le récepteur de la sérotransferrine peut-être internalisé en l'absence de la sérotransferrine.

IV - INTERACTION DE LA SEROTRANSFERRINE AVEC LES CELLULES DU PLACENTA

Le transport entre la mère et le foetus, à travers le placenta, fournit à l'embryon les nutriments essentiels dont il a besoin in utero. Pendant la vie intra-utérine, le foetus a besoin de 300 mg de fer (PRIBILLA et al., 1958).

Au cours de la grossesse, les cellules syncytiotrophoblastiques sont baignées par le sang maternel et le fer, lié à la sérotransferrine maternelle, est la source majeure de fer pour le foetus (MORGAN, 1974).

Le transfert du fer est réalisé unidirectionnellement, contre un gradient de concentration, le taux de fer plasmatique du foetus étant supérieur à celui de la mère (FLECHTER et SUTTER, 1969). Ce qui suggère que le transport du fer à travers le placenta met en jeu un mécanisme de transport actif (VAN DIJK, 1981).

A - LE RECEPTEUR PLACENTAIRE DE LA SEROTRANSFERRINE

L'existence du récepteur de la sérotransferrine au niveau du placenta a été postulée par FLECHTER et SUTTER (1969) puis mis en évidence par des techniques d'immunofluorescence. Il a été localisé sur la membrane apicale syncytiotrophoblastique, bordure en brosse directement en contact avec le sang maternel (KING, 1976; FAULK et

JOHNSON, 1977; JOHNSON et FAULK, 1978). Ce récepteur a été ensuite isolé et caractérisé du placenta total (SELIGMAN et al., 1979) et du syncytiotrophoblaste (WADA et al., 1979; LOH et al., 1980; GALBRAITH et al., 1980).

Dans le syncytiotrophoblaste, la concentration en récepteur de la sérotransferrine, déterminée par dosage radioimmunologique, est d'environ 35 µg/mg de protéines membranaires, ce qui est très élevé par rapport aux autres cellules mais adapté aux besoins énormes du fœtus (ENNS et al., 1981).

La constante d'affinité apparente du récepteur pour la sérotransferrine est de l'ordre de $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (SELIGMAN et al., 1979; WADA et al., 1979a; 1979b; ENNS et al., 1981; ENNS et SUSSMAN, 1981a; 1981b).

B - INCORPORATION DU FER AU NIVEAU DU PLACENTA

La membrane plasmique du syncytiotrophoblaste placentaire dispose de grandes quantités de régions recouvertes au niveau des microvillosités et les vésicules recouvertes sont abondantes dans le cytoplasme (OCKLEFORD et WHYTE, 1977). BOOTH et WILLIAMS (1981) et PEARSE (1982) ont démontré la présence de sérotransferrine fixée à son récepteur dans des vésicules recouvertes purifiées de placenta humain. Ils ont suggéré que l'incorporation du fer est réalisée par un mécanisme d'endocytose via les endosomes et d'exocytose de la sérotransferrine maternelle. Ceci a été confirmé par les travaux de CONTRACTOR et EATON (1986) qui montrent que le fer mais pas la sérotransferrine, est transféré lentement dans la circulation foetale, probablement depuis une réserve endogène régulatrice. La chloroquine, qui inhibe la libération du fer de la sérotransferrine par maintien du pH neutre dans les endosomes, inhibe complètement le transfert du fer vers le fœtus.

Récemment, VANDERPUYE et al. (1986) ont démontré l'existence d'un récepteur spécifique de la sérotransferrine sur la membrane basale du syncytiotrophoblaste, en contact avec la circulation foetale. Cependant, aucun rôle précis n'a pu lui être défini. Ces auteurs suggèrent que ce récepteur est situé de façon à participer au

transfert du fer de la mère vers le fœtus mais aurait aussi d'autres fonctions telles que la régulation de la prolifération cellulaire ou de la synthèse de l'ADN.

V - INTERACTION DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE AVEC LES HEPATOCYTES

Le foie est l'organe responsable du stockage de 30 % du fer de réserve de l'organisme. Ce fer est amené soit au niveau des cellules non parenchymateuses, les cellules de Küpffer qui capturent les érythrocytes sénescents, soit au niveau des cellules parenchymateuses, les hépatocytes.

Au niveau des hépatocytes, le fer est amené en grande partie par la sérotransferrine par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

A - INTERACTION DE LA SEROTRANSFERRINE SIALYLEE

Après sa fixation sur des récepteurs spécifiques membranaires, le complexe récepteur-sérotransferrine est endocyté. Le fer est relâché dans un compartiment acide non lysosomique (endosome) et l'aposérotransferrine, encore liée à son récepteur, est recyclée vers la surface cellulaire où elle se dissocie de son récepteur sous l'influence du pH intracellulaire.

Ces récepteurs ont été mis en évidence par GARDINER et MORGAN (1974), VAN BROCKXMEER et al. (1975) et GROHLICH et al. (1977; 1979) et sur des lignées cellulaires d'hépatome humain, les cellules Hep G2 par DAUTRY-VARSAT et al. (1983).

Cependant, SODA et TAVASSOLI (1984), TAVASSOLI et al. (1986) et KISHIMOTO et TAVASSOLI (1987) montrent que la présence de récepteurs de la sérotransferrine est limitée aux cellules endothéliales du foie. Celles-ci capteraient la sérotransferrine et la désialyleraient afin

de pouvoir être captée par l'hépatocyte grâce au récepteur à galactose hépatocytaire. Ces auteurs appellent ce phénomène "transcytose".

B - INTERACTION DE L'ASIALOSÉROTRANSFÉRINE

1 - Le récepteur hépatique des asialoglycoprotéines

Le récepteur des asialoglycoprotéines a été mis en évidence par MORELL et al. (1968) et est impliqué dans l'élimination des glycoprotéines circulantes ayant perdues leurs acides sialiques terminaux (MORELL et al., 1971).

Le récepteur des asialoglycoprotéines est une lectine qui reconnaît spécifiquement le galactose et la N-acétyl galactosamine. Les propriétés de ce récepteur sont décrites dans la revue générale de HARFORD et ASHWELL (1981). Il est localisé sur la membrane plasmique de l'hépatocyte et a été estimé à 500 000 récepteurs par cellule (GEUZE et al., 1982). Il a été mis en évidence sur les cellules Hep G2 (hépatome humain) par SCHWARTZ et al. (1981).

2 - Rôle des glycanes de l'asialosérotransferrine

La partie glycanique de la glycoprotéine joue un rôle dans la reconnaissance de l'asialosérotransferrine avec le récepteur lectinique. HATTON et al. (1979) ont montré que le glycanne biantenné de l'asialosérotransferrine interagit peu avec la lectine hépatique. REGOECZI et al. (1979) caractérisent trois types d'asialotransferrine:

- le type 1 qui contient deux glycanes de type biantennés
- les types 2 et 3 qui contiennent un glycanne de type biantenné et un glycanne de type triantenné. Dans le type 3, la troisième antenne est située sur le mannose lié en (α 1-3).

L'asialosérotransferrine de type 3 a 10 fois plus d'affinité pour la lectine hépatique que le type 2 et 100 fois plus que le type 1 (DEBANNE et al., 1981).

Cependant, BEZOUSKA et al. (1985) montrent que les asialoglycoprotéines ayant des glycanes biantennés sont préférentiellement

fixées au niveau des membranes plasmiques des leucocytes, ce qui compléterait la spécificité de la lectine hépatique.

3 - Endocytose de l'asialosérot transferrine

En général, l'endocytose des asialoglycoprotéines conduit à la dégradation de ces molécules au niveau des lysosomes.

Cependant, les travaux de l'équipe de REGOECZI (voir la dernière revue générale de REGOECZI, 1987) semblent montrer que l'asialosérot transferrine échappe à ce catabolisme, à condition qu'elle soit présente en faible quantité.

C'est ainsi que RUDOLPH et al. (1986) émettent l'hypothèse de l'implication possible de deux récepteurs différents dans l'incorporation du fer de l'asialosérot transferrine au niveau de l'hépatocyte. Le mécanisme est schématisé dans la figure 12 page 46 : au niveau de la membrane de l'hépatocyte, l'asialosérot transferrine entre en compétition avec la sérot transferrine sialylée pour se fixer sur le récepteur spécifique de la sérot transferrine. Cependant, exposant ses résidus de galactose terminaux, l'asialosérot transferrine se fixe préférentiellement sur la lectine hépatique, plus abondante et moins occupée. Par une action synergique des deux récepteurs, l'asialosérot transferrine se fixe simultanément sur le récepteur de la sérot transferrine et, c'est finalement liée aux deux récepteurs qu'elle est internalisée dans l'hépatocyte. Après acidification de l'endosome, l'asialosérot transferrine se dissocie de la lectine hépatique et suit la voie normale d'exocytose de la sérot transferrine. Cette voie a été appelée "diacytose" par TOLLESHAUG et al. (1981).

Au cours de l'exocytose, l'asialosérot transferrine peut être recyclée dans la circulation sanguine après avoir été partiellement resialylée (REGOECZI et al., 1986).

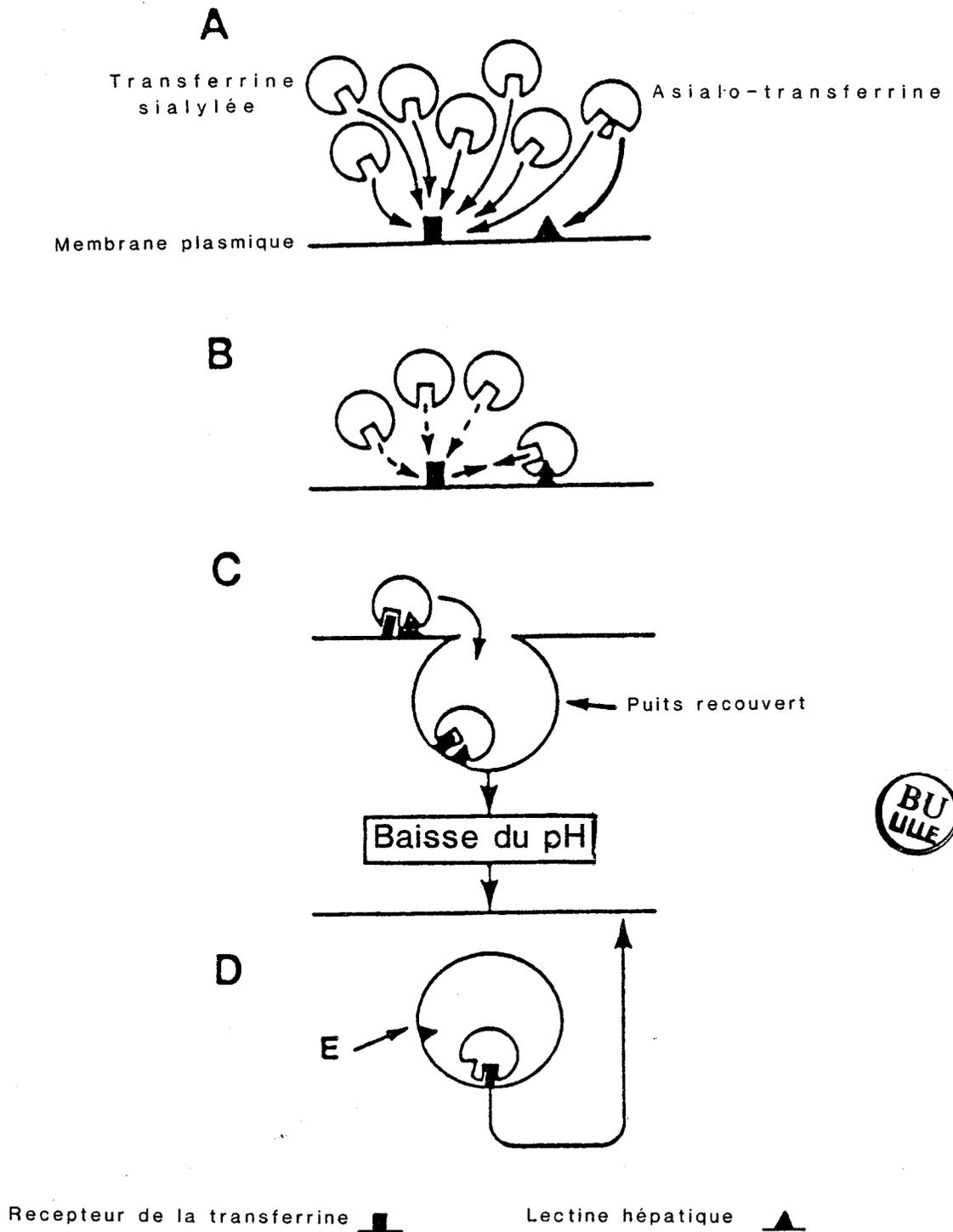


Figure 12 : Schéma illustrant le mécanisme hypothétique de la diacytose de l'asialo-sérotansferrine saturée en fer.
D'après REGOECZI et al. (1986).

CONCLUSION

La sérotransferrine est l'une des glycoprotéines plasmatiques la plus étudiée de par son rôle prépondérant dans le métabolisme du fer. Cependant, de nombreux points restent encore à éclaircir.

Les deux sites de fixation du fer possèdent une hétérogénéité physico-chimique mais l'hétérogénéité fonctionnelle suggérée par des auteurs n'a pas encore été démontrée.

Le rôle de la sérotransferrine dans l'absorption intestinale du fer est très controversé.

La découverte de l'universalité du récepteur de la sérotransferrine des cellules humaines en culture a permis de déterminer la structure du récepteur et de comprendre comment la sérotransferrine cède son fer à la cellule, bien que les idées s'opposent pour l'entrée ou non de la sérotransferrine dans la cellule. Le récepteur de la sérotransferrine semble aussi jouer un rôle important en tant que marqueur de la cancérisation, leur nombre augmentant à la surface des cellules cancéreuses.

L'existence de variants glycaniques de la sérotransferrine est maintenant bien établie. Cependant, le rôle de la partie glycanique dans la reconnaissance de la protéine par les récepteurs membranaires reste obscur. Les glycannes semblent avoir un rôle important dans la reconnaissance de l'asialosérotransferrine par la lectine hépatique qui a plus d'affinité pour les structures triantennées que pour les structures biantennées. L'augmentation du taux des variants triantennés de la sérotransferrine dans certains cas pathologiques laisse à penser que les glycannes pourraient avoir un rôle dans l'interaction de la sérotransferrine avec son récepteur.

BIOSYNTHESE DE LA SÉROTRANSFERRINE

I - BIOSYNTHESE ET SECRETION DE LA SÉROTRANSFERRINE "IN VIVO"

A - SITES DE SYNTHÈSE DE LA SÉROTRANSFERRINE

1 - Le foie

Le foie est le principal organe de synthèse de toutes les protéines plasmatiques, exceptées les immunoglobulines (MORGAN, 1981). La cellule hépatique responsable de cette synthèse est l'hépatocyte (FOUCRIER et al., 1979) et, aussi bien des morceaux de foie que des suspensions ou des cultures d'hépatocytes et des cultures cellulaires d'hépatome sont capables de synthétiser la sérotransferrine.

Les taux moyens en sérotransferrine plasmatique varient peu en fonction de la taille de l'espèce (REGOECZI et HATTON, 1980) et oscillent chez l'homme entre 2,5 et 4 g/l de sang. Le taux moyen de synthèse quotidienne est évalué à 10 % du taux plasmatique (WOCHNER et al., 1968; KERNOFF et BAKER, 1980). La sérotransferrine circule donc en circuit fermé puisque le taux de dégradation journalier varie entre 6 et 14 % du taux plasmatique (CROMWELL, 1964).

2 - Les autres tissus

La sérotransferrine peut aussi être synthétisée au niveau de nombreux tissus tels que la rate (PHILLIPS et THORBECKE, 1966), le macrophage péritonéal (HAURANI et al., 1973; CUSTER et al., 1982), la glande mammaire (MORGAN, 1981), les cellules de Sertoli des testicules (SKINNER et al., 1980; 1984), les lymphocytes T (LUM et al., 1986) et le cerveau (LEVIN et al., 1984). Au cours de la vie foetale, la sérotransferrine est d'abord synthétisée par le sac vitellin à des

taux plus élevés que dans le foie puis la synthèse décroît dans le sac vitellin pour augmenter dans le foie foetal (YEOH et al., 1974; 1979).

B - MECANISME DE SYNTHÈSE ET DE SÉCRETION DE LA SÉROTRANSFERRINE PAR LES HEPATOCYTES

1 - Voie intracellulaire

La voie intracellulaire de synthèse et de sécrétion de la sérotransferrine par le foie n'a pas été étudiée en détail mais semble similaire à celle de l'albumine (PETERS et al., 1971). Ces deux protéines sont synthétisées à partir de la même réserve d'acides aminés (MORGAN, 1966). La sérotransferrine, nouvellement synthétisée, reste localisée dans la fraction microsomale du foie : elle est véhiculée dans le réticulum endoplasmique rugueux et lisse puis dans l'appareil de Golgi avant d'être sécrétée dans la circulation sanguine (Fig. 13 p. 50). SCHREIBER et al. (1979) ont montré, après injection de leucine marquée au carbone 14, que le temps de sécrétion minimal est plus lent pour la sérotransferrine (21 minutes) que pour l'albumine (15 minutes). De plus, après injection de glucosamine marquée au carbone 14, la radioactivité apparaît au niveau de l' α_1 -glycoprotéine acide après 15 minutes et au niveau de la sérotransferrine, après 25 minutes. Ces résultats suggèrent que la biosynthèse protéique et la glycosylation se déroulent indépendamment pour chaque protéine. L'utilisation d'anticorps marqués à la peroxydase a permis de montrer qu'un hépatocyte donné est capable de synthétiser simultanément plusieurs protéines plasmatiques dont la sérotransferrine (FOUCRIER et al., 1979; KRAEMER et al., 1981). La sérotransferrine et les autres protéines plasmatiques sont donc synthétisées et sécrétées par le même hépatocyte mais les voies de biosynthèse intracellulaire sont indépendantes pour chacune de ces protéines.

2 - Précurseurs intracellulaires de la sérotransferrine

SCHREIBER et al. (1979) ont étudié les formes précurseurs de la sérotransferrine présentes dans le foie de Rat. Par chromatographie

CIRCULATION
SANGUINE

HEPATOCYTE

CIRCULATION
SANGUINE

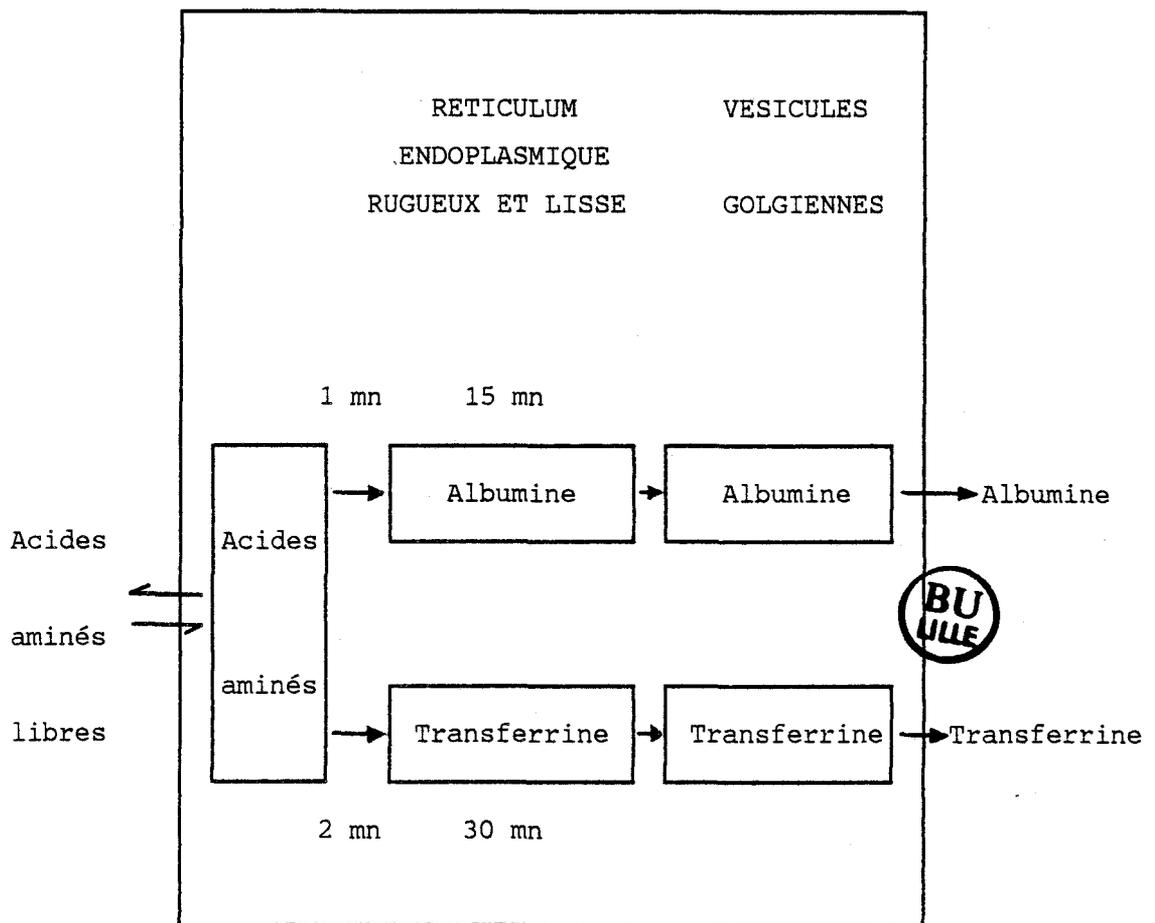


Figure 13 : Processus schématique de synthèse et de sécrétion de la sérotransferrine et de l'albumine dans l'hépatocyte de Rat in vivo. D'après MORGAN et PETERS (1977).

d'échange d'ions, ils ont pu séparer une forme majeure qui diffère de la sérotransferrine circulante par l'absence d'acide sialique et une forme mineure identique à la sérotransferrine circulante. La forme "asialo" semble être le précurseur de la forme sialylée, cette dernière étant identique à la sérotransferrine sécrétée dans le sang.

La partie glycanique de la forme majeure de la transferrine peut être coupée par traitement avec l'endoglucosaminidase H, indiquant que la chaîne oligosaccharidique est du type polymannosidique; la forme mineure ayant une partie glycanique de type N-acétyl lactosaminique (ANDUS et al., 1983).

Il apparaît que la sérotransferrine, comme les autres protéines sécrétées, soit synthétisée avec une extension polypeptidique N-terminale hydrophobe contenant 20 résidus d'acides aminés (BLOBEL et DOBBERSTEIN, 1975; THIBODEAU et al., 1978; SCHREIBER et al., 1979). Cette extension peptidique est coupée de la molécule aussitôt après sa synthèse et servirait en fait de signal de reconnaissance et d'ancrage aux ribosomes impliqués dans la biosynthèse de la protéine naissante. Cependant, la sécrétion de la sérotransferrine par les hépatocytes est bloquée par des inhibiteurs de protéases. Par contre, la tunicamycine, inhibiteur de la glycosylation, n'a pas d'effet sur la synthèse peptidique de la sérotransferrine ou sur la sécrétion par la cellule (STRUCK et al., 1978; SCHREIBER et al., 1979; BAUER et al., 1985). Les glycannes de la sérotransferrine ne sont donc pas nécessaires à la sécrétion de la protéine.

C - FACTEURS INFLUENCANT LA SYNTHÈSE DE LA SÉROTRANSFERRINE

Les principaux facteurs influençant la synthèse de la sérotransferrine sont le taux de fer de réserve, les hormones telles que les oestrogènes et l'état nutritionnel de l'individu.

Seul le taux de fer est spécifique de la sérotransferrine, les autres facteurs affectant aussi la plupart des protéines plasmatiques. Chez l'Homme, la concentration en sérotransferrine augmente au cours d'anémie due à une déficience en fer, au cours de la grossesse ou après l'administration d'oestrogènes. Par contre, le taux de

sérotransferrine décroît quand les réserves en fer sont élevées, au cours d'atteintes hépatiques telles que la cirrhose et en cas de malnutrition.

1 - Influence des réserves en fer

LAURELL (1947) a été le premier à observer une augmentation de la concentration en sérotransferrine plasmique chez des sujets atteints d'anémie due à une déficience en fer et une diminution du taux de sérotransferrine plasmatique associée à une surcharge en fer. Depuis, de nombreux travaux ont confirmé que l'élévation du taux de sérotransferrine de sujets présentant une déficience en fer est provoquée par une augmentation de synthèse de la protéine et que le traitement par apport de fer conduit à diminuer la synthèse (MORTON et al., 1976). Dans le foie, l'augmentation de la synthèse de sérotransferrine est consécutive à une augmentation proportionnelle de la transcription du DNA codant pour la sérotransferrine en mRNA. Cependant, le mécanisme par lequel le fer influence l'expression du gène de la sérotransferrine est encore inconnu (MORTON et TAVILL, 1977; MAC KNIGHT et al., 1980a; 1980b). Des études réalisées in vitro sur des hépatocytes de Rat montrent qu'en présence de chélateurs du fer, la diminution de la biosynthèse de la sérotransferrine n'a pas une origine transcriptionnelle mais serait plutôt d'origine translationnelle ou proviendrait d'une altération des mécanismes de sécrétion (DESVERGNES et al., 1987).

2 - Influence des hormones

Au cours de la grossesse, le taux de sérotransferrine plasmatique augmente remarquablement (MORGAN et MELB, 1961; ALEVIZOU-TERZAKI et al., 1974). Ceci est dû d'une part, à la diminution des réserves de fer pour couvrir les besoins du fœtus et d'autre part, à des effets hormonaux. POWELL et al. (1970) et HORNE et al. (1971) ont montré que les oestrogènes étaient responsables de l'augmentation de la sérotransferrine dans le sang des femmes enceintes ou sous contraception orale. Les oestrogènes stimulent la synthèse de la sérotransferrine au niveau des hépatocytes (LEE et al., 1978) mais la progestérone n'a aucun effet sur la synthèse de la sérotransferrine (LEE et al., 1980).

3 - Influence du régime alimentaire

La concentration en sérotransferrine plasmatique et en général des autres protéines circulantes, est diminuée en cas de carence protéique (REEDS et LADITAN, 1976). La carence protéique provoque une réduction de la synthèse des protéines due à une diminution des réserves en acides aminés. La réversibilité est cependant facilement réalisée par injection d'un mélange d'acides aminés (MORGAN et PETERS, 1971).

L'absorption d'éthanol diminue aussi la synthèse hépatique de la sérotransferrine (NALPAS et al., 1980; TEPPPO et MAURY, 1983). Dans l'hépatocyte, l'éthanol se transforme en acétaldéhyde qui inhibe la synthèse de la sérotransferrine (LIEBER, 1980). L'éthanol inhibe aussi la sécrétion de la sérotransferrine (SORELL et al., 1983).

II - BIOSYNTHESE DE LA SEROTRANSFERRINE "IN VITRO"

La plupart des protéines plasmatiques, dont la sérotransferrine, est synthétisée par le foie, dans les hépatocytes. La synthèse de ces protéines a lieu au niveau des ribosomes liés puis elles sont transportées vers l'espace extracellulaire via le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Elles sont généralement glycosylées pendant le transport intracellulaire, au niveau du réticulum endoplasmique rugueux et de l'appareil de Golgi (voir la revue générale de MONTREUIL, 1986).

La biosynthèse des protéines plasmatiques par le foie est régulée par de nombreux facteurs endogènes et exogènes dont le mode d'action a été beaucoup étudié ces dernières années, sur des hépatocytes isolés ou en culture (voir la revue générale de GUILLOUZO et GUGUEN-GUILLOUZO, 1986).

**A - BIOSYNTHESE DES PROTEINES PLASMATIQUES PAR LES
HEPATOCYTES ISOLES OU EN CULTURE**

**1 - Nature de différents facteurs sur la croissance des
hépatocytes**

a - Rôle du sérum dans le milieu de culture

Le sérum est nécessaire à la croissance de la plupart des lignées cellulaires. Les hépatocytes ont besoin de sérum pour leur attachement, leur étalement et leur survie en culture pendant plusieurs jours (HORIUTI et al., 1982). Le sérum est considéré comme étant une source d'hormones et de facteurs de croissance. Cependant, STRAIN et al. (1982) ont constaté qu'un sérum hétérologue, quelque soit son origine, est moins efficace pour stimuler la synthèse d'ADN dans les hépatocytes de Rat qu'un milieu sans sérum, enrichi en insuline et en EGF (Epidermal Growth Factor) ou un milieu contenant du sérum homologue.

b - Hormones et facteurs de croissance dans un milieu sans sérum

L'EGF a la propriété de stimuler la synthèse d'ADN dans les hépatocytes isolés, en association avec l'insuline et le glucagon (RICHMAN et al., 1976) mais le mécanisme est inconnu.

L'insuline, in vivo, joue un rôle dans la stimulation de la croissance du foie (BUCHER et SWAFFIELD, 1975). Elle stimule, en synergie avec l'EGF et le glucagon, la croissance des hépatocytes en culture, en doublant le taux de synthèse de l'ADN (RICHMAN et al., 1976).

D'autres composés comme l'AMP cyclique (FRIEDMAN et al., 1981), la noradrénaline (MICHALOPOULOS et al., 1984) et la vasopressine (RUSSEL et BUCHER, 1983) stimulent la synthèse d'ADN dans les hépatocytes.

c - Autres facteurs

Les glucocorticoïdes tels que l'hydrocortisone et la dexaméthasone

méthasone favorisent à la fois l'attachement initial et à long terme des cellules (LAISHES et WILLIAMS, 1976).

Les prostaglandines stimulent à la fois la synthèse de l'ADN et les mitoses (ANDREIS et al., 1981; ARMATO et ANDREIS, 1983).

2 - Influence des différentes conditions de culture sur la biosynthèse de la sérotransferrine

Les hépatocytes continuent de synthétiser et de sécréter des protéines plasmatiques après leur isolement. Généralement, les taux de synthèse des différentes protéines diminuent plus ou moins rapidement après plusieurs jours de culture. La composition des milieux et la nature des supports peuvent influencer fortement le taux de synthèse protéique.

a - Influence de la composition du milieu

La présence d'acides aminés dans le milieu d'incubation, à une concentration élevée, est indispensable pour maintenir les hépatocytes isolés dans un état anabolique (SEGLEN, 1977; SEGLEN et al., 1980; SCHWARZE et al., 1982). Quand la concentration en acides aminés exogènes est plus faible, le taux de synthèse protéique dépend de la quantité d'acides aminés endogènes amenés principalement par la voie lysosomique (TANAKA et al., 1979).

L'addition d'hormones telles que l'insuline, le glucagon, l'hydrocortisone, le cortisol, la triiodothyronine et l'hormone de croissance peut provoquer une augmentation du taux de synthèse de certaines protéines plasmatiques (JEEJEEBHOY et al., 1976; HOOPER et al., 1981).

Le sérum ajouté au milieu, quelque soit son origine, contient des facteurs qui stimulent la synthèse de la majorité des protéines plasmatiques d'origine hépatique (PLANT et al., 1981).

Enfin, une osmolarité de 400 mOsm dans le milieu, obtenue par addition de NaCl, est optimale pour la synthèse protéique (SCHWARTZE et al., 1982).

b - Influence du support

Les hépatocytes cultivés sur du collagène flottant sécrètent des quantités plus élevées de protéines, dont la sérotransferrine, que lorsqu'ils sont cultivés sur des supports organiques tels que le collagène ou la fibronectine ou sur des supports plastiques (SIRICA et al., 1979).

c - Influence d'autres types cellulaires

Alors que la biosynthèse des protéines plasmatiques diminue rapidement en culture pure d'hépatocytes, elle demeure relativement stable quand les hépatocytes sont co-cultivés avec des cellules épithéliales de foie et reste active pendant plusieurs semaines, même lorsque les co-cultures sont maintenues dans un milieu sans sérum (GUILLOUZO et al., 1984). FRASLIN et al. (1985) ont montré que le taux de transcription du DNA en mRNA est deux fois plus élevé dans les hépatocytes cultivés en co-culture que dans ceux cultivés en culture pure.

**B - CONTROLE DE LA BIOSYNTHESE DE LA SEROTRANSFERRINE
DANS LES CULTURES D'HEPATOCYTES**

Peu de travaux concernant les effets des hormones ou d'autres facteurs sur la biosynthèse de la sérotransferrine ont été réalisés in vitro.

L'addition d'un mélange d'hormones, comprenant l'insuline, des glucocorticoïdes et l'hormone thyroïdienne, provoque une légère stimulation de la synthèse de sérotransferrine dans des cultures d'hépatocytes de Rat (JEEJEEBHOY et al., 1975; FOUAD et al., 1981).

Des travaux réalisés par WHITE et JACOBS (1978) révèlent que l'addition de fer sous forme d'acide nitriloacétique ferrique (FeNTA) ou que l'addition de chélateur de fer sous forme de desferrioxamine, n'a pas d'effet sur la synthèse de la sérotransferrine. Cependant, DESVERGNE et al. (1987) montrent que, sur des cultures pures ou des co-cultures d'hépatocytes de Rat, lors d'une surcharge en fer amenée

par l'addition dans le milieu de FeNTA, la sécrétion de la sérotransferrine est diminuée de 30 %.

CONCLUSION

La synthèse et la sécrétion de la sérotransferrine ont de nombreux aspects communs caractéristiques de la majorité des autres protéines plasmatiques. Bien qu'elle soit une protéine majeure et homogène, la sérotransferrine est synthétisée dans un grand nombre de tissus autre que le foie.

La synthèse de la sérotransferrine est affectée par des facteurs non spécifiques tels que l'aspect nutritionnel et certains traitements hormonaux. Le taux de réserve en fer de l'individu est considéré comme étant le mécanisme de régulation spécifique de la synthèse de la sérotransferrine.

Chez l'Homme, le taux de sérotransferrine plasmatique augmente de façon significative au cours de l'adolescence, de la grossesse, d'anémie due à une déficience en fer et après administration d'oestrogènes. La diminution du taux de sérotransferrine humaine est consécutive à une augmentation des réserves en fer et à des atteintes hépatiques telles que la cirrhose.

TRAVAUX PERSONNELS

Les travaux, dont nous rapportons les résultats dans ce mémoire, font suite à ceux réalisés par DEBRUYNE (1983) et DEBRUYNE et al. (1984) qui ont mis en évidence l'existence de trois variants glycaniques de la sérotransferrine humaine par chromatographie d'affinité sur concanavoline A et ont précisé la structure des deux glycannes N-acétyllactosaminiques de type triantenné (SPIK et al., 1985). D'autre part, l'analyse de sérums d'individus cirrhotiques leur a permis de mettre en évidence une modification de la répartition des trois variants glycaniques de la sérotransferrine, notamment une augmentation des variants portant des structures glycaniques triantennées.

Dans le but de poursuivre ces études, nous avons élargi les recherches sur la modification de la répartition des variants glycaniques de la sérotransferrine et analysé des sérums de Femmes à divers stades de la grossesse. Le foie étant l'organe qui synthétise la majorité de la sérotransferrine plasmatique, nous avons étudié la répartition des variants glycaniques de la transferrine synthétisée d'une part, par des hépatocytes établis en co-culture avec des cellules épithéliales de foie et d'autre part, par des hépatocytes provenant d'un hépatocarcinome humain établis en lignée continue. Le rôle des glycannes triantennés a été envisagé dans l'interaction des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine avec son récepteur au niveau des membranes du syncytiotrophoblaste du placenta humain et au niveau des hépatocytes humains en culture.

AUGMENTATION DE LA
TRIANENNARISATION DE LA
SEROTRANSFERRINE HUMAINE AU
COURS DE LA GROSSESSE ET
INTERACTION DES VARIANTS AVEC
LES RECEPTEURS MEMBRANAIRES
DU PLACENTA

INTRODUCTION

Au cours de la vie intra-utérine, les besoins en fer du foetus sont énormes et relatifs à sa croissance. Ils s'élèvent à 5 mg par jour au cours du dernier mois de grossesse (FLETCHER et SUTTER, 1969). Cette demande accrue en fer induit une déficience en fer chez la plupart des femmes enceintes, ce qui se traduit par une augmentation de la concentration de la sérotransferrine plasmatique (LAURELL et al., 1968).

Le transport du fer de la mère vers le foetus est réalisé grâce à un transfert unidirectionnel du métal associé à la sérotransferrine de la circulation maternelle vers la circulation foetale. L'étape préliminaire de l'incorporation du fer dans les cellules de Mammifères est la fixation de la sérotransferrine sur son récepteur spécifique situé à la surface membranaire. Ceci a été démontré au niveau du placenta (SELIGMAN et al., 1979; WADA et al., 1979; GALBRAITH et al., 1980). La sérotransferrine maternelle complexée au récepteur est ensuite endocytée et le fer est retrouvé au niveau dans la circulation foetale, associé à la sérotransferrine foetale.

La mise en évidence de trois variants glycaniques de la sérotransferrine (SPIK, 1982) et le fait que leur répartition (augmentation des variants à structures glycaniques triantennées) soit modifiée dans certains cas pathologiques posent la question de savoir si ces variants glycaniques ont une signification biologique dans l'incorporation du fer au niveau des cellules, et plus particulièrement au niveau du placenta.

Sur la base des résultats obtenus par DEBRUYNE (1983), nous avons comparé, par électrophorèse d'immuno-affinité, la répartition des trois variants glycaniques de la sérotransferrine dans le sérum de femmes enceintes et de volontaires "sains". De plus, afin de vérifier l'existence éventuelle d'un récepteur de nature lectinique qui reconnaîtrait les structures glycaniques triantennées sialylées et qui serait impliqué dans l'incorporation du fer lié aux variants transferriniques possédant ces structures glycaniques, nous avons étudié l'interaction de chacun des variants de la sérotransferrine avec les membranes plasmiques du syncytiotrophoblaste du placenta humain.

Ces résultats font l'objet d'une publication, soumise à la revue Biochemical Journal, que nous rapportons dans les pages suivantes.

**ANALYSIS OF THE PHYSIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF THE MARKED INCREASE OF
HUMAN SEROTRANSFERRIN TRIANTENNARISATION DURING PREGNANCY**

Didier LEGER, Bruno CAMPION, Jean-Pierre DECOTTIGNIES, Jean MONTREUIL
et Geneviève SPIK

Laboratoire de Chimie Biologique (Unité Associée au CNRS n°217 et
Laboratoire Pilote du Ministère de l'Education Nationale), Université
des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, 59655 Villeneuve
d'Ascq Cedex, France

Key words : transferrin, placenta, glycan, receptor, serum, pregnancy.

Address to whom correspondence should be sent :

Professor G. SPIK
Laboratoire de Chimie Biologique
Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois
59655 Villeneuve d'Ascq Cedex
France

Abbreviations used : Tf, serotransferrin; ConA, concanavalin A; BSA,
bovine serum albumin; NaDOC, sodium deoxycholate; Tris, tris(hydroxy-
methyl)-aminomethan; HBSS, Hanks balanced salt solution.

SUMMARY

Human serotransferrin (Tf) presents a microheterogeneity based on the existence of biantennary and triantennary glycans of the N-acetyl-lactosaminic type. By affinity chromatography on ConA-Sepharose column in well defined conditions, human serotransferrin isolated from healthy donors was resolved into three carbohydrate molecular variants : Tf-I (less than 1%), Tf-II (17 p. 100) and Tf-III (82 p. 100) containing two triantennary, one triantennary and one biantennary and two biantennary glycans, respectively. In addition, two "isomers" of triantennary glycans containing the third antenna β -1,4-linked to the α -1,3-mannose residue or β -1,6-linked to the α -1,6-mannose residue were characterized by methylation analysis in the ratio 1 : 1 in both Tf-I and Tf-II variants.

On ConA-crossed immuno-affinity electrophoresis, the patterns exhibited by each of the three purified variants or by a mixture of these variants were compared to the patterns given by transferrin present in normal and pregnant sera. The results lead to the demonstration that the relative ratio of transferrin carbohydrate variants was unchanged when the level of transferrin was increased in serum from normal donors, while in the serum of pregnant women, especially in the last three months of pregnancy when the serum level of transferrin reached the value of 4.5 to 5 g/l, the relative ratio of the carbohydrate variants Tf-I and Tf-II was increased (6 ± 1 p. 100 and 26 ± 3 p. 100, respectively) and those of Tf-III decreased to 67 ± 3 p. 100.

The binding of the three transferrin carbohydrate variants to the receptor of the syncytiotrophoblast plasma membranes was determined using the Scatchard plot analysis and only a slight decrease (6 fold) in the affinity constant was observed with an increase in the number of triantennary glycans. Visualization of the transferrin-receptor complex by immunoblotting in the presence of non-dissociating detergents revealed the existence of only one type of receptor or of a receptor possessing similar properties involved in the binding of each of the three serotransferrin carbohydrate variants.

INTRODUCTION

The plasma iron level is submitted, in human, to large modifications under pathological and physiological conditions (Huebers & Finch, 1987). In particular, during pregnancy, the high requirement of iron for the foetus development (Fletcher & Sutter, 1969) induces an increase of plasma iron-binding capacity due to a rise of serum transferrin (or serotransferrin) level (Laurell *et al.*, 1968). In order to assess to what extent the increase of serotransferrin blood level during pregnancy is associated to a modification of the structure of transferrin molecule and, in particular, to a variation of the glycan structure, we have analyzed the serum of normal donors and of pregnant women by ConA-crossed immuno-affinity electrophoresis. The three serotransferrin carbohydrate variants which were isolated by affinity chromatography on ConA-Sepharose column were used as standards in the ConA-crossed immuno-affinity electrophoresis experiments. Moreover, as the serotransferrin is involved in the process of iron transfer to the foetus by a placental receptor-mediated mechanism (Wada *et al.*, 1979; Booth & Wilson, 1981; Pearse, 1982), the three purified carbohydrate variants of serotransferrin were used in order to define the binding parameters of serotransferrin variants present in pregnancy serum to human syncytiotrophoblast microvilli membranes.

The visualization of the placental receptor-transferrin complex by an electrophoretic method and the dissociation of this complex by each of the three serotransferrin carbohydrate variants were performed in order to prove the existence of only one type of transferrin membrane receptor.

EXPERIMENTAL

Materials

Samples of venous blood serum from 34 healthy gestating women at different terms through pregnancy were kindly obtained from a local Maternity Hospital and classified into the three following groups : group A : 1 to 3 months; group B : 4 to 6 months and group C : 7 to 9 months. Samples of venous blood serum from non-pregnant women which receive any oral contraceptive treatment, were collected at the local

Blood Transfusion Center. The sera were stored at 4°C, until used, in presence of 0.2 % (w/v) sodium azide.

Normal mature human placentae were obtained from a local Maternity Hospital within 30 min of vaginal delivery and placed immediately in cold-ice HBSS.

Human serotransferrin was purchased from Behringwerke (Marburg a. Lahn, West Germany). Antibodies to human serotransferrin were raised in rabbits according to the method of Vaitukaitis *et al.* (1971). Horse radish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (HRP-IgG) was purchased from Institut Pasteur (Paris, France). Agarose gel type II, medium EEO, bovine serum albumin (BSA), insoluble neuraminidase (from *Clostridium perfringens*, type VI-A), phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), aprotinin, Trasylol, dithiothreitol (DTT) and Triton X-100 were from Sigma Chem. Co. (St Louis, MO, USA). Concanavalin A (ConA) was supplied by Industrie Biologique Française (Clichy, France). Concanavalin A-Sepharose (ConA-Sepharose) containing 10 mg of ConA by ml of settled gel and Sephadex G-25 prepacked columns (PD-10) were purchased from Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden). Iodo-Gen or 1,3,4,6-tetrachloro-3 α , 6 α diphenyl glycoluril was provided from Pierce Eurochimie (Beijerland, Holland), iodine-125 (^{125}I) carrier free (NaI, 15.6 mCi/mg) from Amersham International (Amersham, U.K.), α -O-methyl-D-glucopyranoside from Koch-Light Laboratories (Colnbrook, England) and fat free powder milk from Gloria S.A. (France). Nitrocellulose membranes BA 85 were from Schleicher and Schuell (Dassel, West Germany). Airfuge polycarbonate tubes were from Beckman Instrument Inc. (Fullerton, CA, USA). All others reagents were of analytical grade.

METHODS

Preparation of the carbohydrate molecular variants of human serotransferrin.

0.6 g of human iron-saturated serotransferrin isolated from healthy donors sera, dialysed against buffer A (5 mM sodium acetate buffer, pH 6.9, containing 1 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ and 1 mM MnCl₂), were loaded on a ConA-Sepharose column (3.5 x 60 cm) equilibrated in buffer A at room temperature. Elution was first carried out

with the equilibrating buffer at a flow rate of 40 ml/h (volume of collected fractions : 4 ml) until the absorbance monitored at 280 nm was decreased to the base line. The bound serotransferrin was eluted by buffer A containing 15 mM α -O-methyl-D-glucoside. After dialysis against distilled water, the different fractions were freeze-dried. Desialylated carbohydrate molecular variants of transferrin were prepared according to Cornfield *et al.* (1978) using immobilized neuraminidase in 0.1 M sodium citrate buffer, pH 5.1.

Determination of the structure of the glycans isolated from the serotransferrin carbohydrate molecular variants.

The molar ratios of the monosaccharides were determined on the mixture of glycopeptides isolated from the pronase digest (Spik & Montreuil, 1969) of each of the three serotransferrin variants by methanolysis (Zanetta *et al.*, 1972) and gas-liquid chromatography of the trimethylsilylated methylglycosides (Kamerling *et al.*, 1975). Permethylation was carried out according to Finne *et al.* (1980) on the glycopeptides and identification of the methylated methyl-glycosides was realized by gas-liquid chromatography in combination with mass-spectrometry (Fournet *et al.*, 1981).

ConA-crossed immuno-affinity electrophoresis of the serotransferrin carbohydrate molecular variants.

The total amount of serotransferrin in normal and pregnancy sera was determined by single radial immuno-diffusion in agarose against human serotransferrin rabbit antibodies (Mancini *et al.*, 1965). The ratio of each serotransferrin carbohydrate molecular variant in the serum samples was estimated by ConA-crossed immuno-affinity electrophoresis in agarose according to Salier *et al.* (1980) and Nicollet *et al.* (1981). Briefly, samples of 3 μ l of serum were run for 3 h in the presence of 2 mg of ConA per ml of gel in the first dimension. The second dimension was developed overnight in the presence of 8-10 μ l of rabbit anti-human serotransferrin serum (titer : 2 mg/ml) and 10 mg of α -O-methyl-D-glucoside per ml of gel. Then, the electrophoresis plates were washed, dried, stained with Amidoblack and the ratio of the molecular variants was estimated from the area of the peaks.

Labelling of serotransferrin carbohydrate molecular variants.

Serotransferrin was iodinated by using the Iodo-Gen reagent and ^{125}I Na in a quantity just sufficient to statistically incorporate one iodine atom per mol of serotransferrin. The reaction was performed according to Fraker & Speck (1978) for 10 min in ice and excess of reagent was removed by gel filtration on Sephadex G-25 column equilibrated with the incubation medium.

Preparation of the syncytiotrophoblast microvilli.

The syncytiotrophoblast microvilli were isolated from placenta by using the method of Smith *et al.* (1977) modified by Booth *et al.* (1980). 1 mM of each of the following proteases inhibitors : aprotinin, Trasylol, PMSF, DTT and MgCl_2 , were added to the suspension before homogenisation in 10 mM mannitol, 2 mM Tris-HCl pH 7.1 and in the final pellet which was resuspended in HBSS complemented with 10 mM mannitol to give a final concentration of 2 mg of protein/ml. The protein concentration of microvillous membranes was determined according to Peterson (1977). The purity of microvillous preparation was checked by measurements of two microvillar marker enzyme activities : alkaline phosphatase (Beaufay *et al.*, 1974) and 5'nucleotidase (Aronson & Touster, 1974). The syncytiotrophoblast microvilli suspension was used for binding studies within 4 h or divided into aliquot fractions immediately after isolation and stored at -70°C .

Characterization of the receptor-transferrin complex and displacement of the endogeneous transferrin by the different carbohydrate molecular variants of serotransferrin.

Polyacrylamide gel electrophoresis was carried out as a 4 to 15 % acrylamide gradient in a discontinuous buffer of Laemmli (1970) where sodium dodecyl sulfate was replaced with a mixture of Triton X-100 and NaDOC in a ratio 3 : 1 as recommended by Dewald *et al.* (1974). All gels contain mixture of detergents at a final concentration of 0.1 %. Approximately, 20 to 40 μg of solubilized membrane proteins were loaded on 1.5 mm thick slabs gel in a vertical gel apparatus (Bio-Rad). Samples were prepared in the following conditions : the membranes (50 to 100 μg of proteins) untreated or preincubated with unlabelled or ^{125}I -labelled serotransferrin molecular variants were solubilized in 100 μl of sample buffer containing 0.75 % Triton X-100

and 0.25 % NaDOC. The samples were heated for 30 min at 37°C and centrifuged for 5 min at 110 000 g in a Beckman Airfuge. Molecular weight markers and commercial human serotransferrin were solubilized in the same conditions. Prerun was performed at 70 V until the front reached the separation gel and at 150 V overnight under refrigeration. Then, the gel was stained for proteins with Amidoblack or submitted to autoradiography for 3 days.

Placental membrane proteins separated by Triton X-100-NaDOC electrophoresis were transferred from acrylamide gel to nitrocellulose by Western Blotting and detected with specific human serotransferrin antibodies and HRP-labelled second antibodies raised against rabbit IgG according to Towbin *et al.* (1979) and Burnette (1981). For immunostaining, the nitrocellulose sheets were incubated overnight at 4°C with rabbit anti-human serotransferrin serum diluted 1 : 5000 in a solution containing 5 % (w/v) powder milk in 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 0.1 M NaCl (TBS) to prevent non-specific adsorption. The nitrocellulose sheets were washed 10 min successively with TBS, TBS with 0.05 % (w/v) Tween 20 and TBS, then incubated at 4°C for 4 h with anti-rabbit HRP-IgG diluted 1 : 5000 in TBS containing 5 % powder milk. After the same washing procedure, the peroxidase activity bound to nitrocellulose was developed in 0.04 % (w/v) diaminobenzidine in TBS containing 0.01 M hydrogen peroxide.

Standard binding assays.

The standard binding assays were carried out in 0.25 ml Airfuge polycarbonate tubes. The incubation mixture was constituted of 50 µl of placental brush border membrane proteins suspension (1 mg/ml) in HBSS containing 10 mM mannitol and 100 µl of ¹²⁵I-serotransferrin variants (10 µg/ml) in the same medium complemented with 1 % bovine serum albumin (w/v), pH 7.4. The mixture was incubated at 0°C for 30 min and centrifuged in a Beckman Airfuge for 3 min at 110 000 g. The packed membranes were washed twice with 150 µl of ice-cold HBSS, then transferred with 3 x 150 µl of HBSS into plastic tubes (13 x 75 mm) and estimated for residual radioactivity in a LKB Multigamma counter.

The apparent association constant K_a and the number of specific receptors per µg of membrane proteins were determined using ¹²⁵I-serotransferrin molecular variants at concentrations ranging from 80 to 2500 ng. Non-specific binding was estimated in the presence of 100-

fold molar excess of unlabelled serotransferrin carbohydrate molecular variant.

RESULTS

Isolation of the human carbohydrate molecular variants of serotransferrin.

Taking into account that the binding sites of 1 ml of ConA-Sepharose are saturated by 5 mg of serotransferrin variant Tf-III containing two biantennary glycans, a large scale affinity chromatography was performed in conditions in which the binding capacity of the ConA-Sepharose column was completely saturated by the Tf-III variant present in the analyzed sample of serotransferrin. In these conditions, as indicated in Fig. 1, a complete separation of Tf-III from Tf-II was achieved in a single step. The relative proportions of the three well resolved fractions were calculated to be 0.7 : 17 : 82 for Tf-I, Tf-II and Tf-III, respectively.

Determination of the glycan structure present in the three molecular variants of transferrin.

The glycan structure was determined on glycopeptides isolated from the pronase digest of each serotransferrin variant. The glycopeptides from Tf-II were previously separated by affinity chromatography on ConA-Sepharose column into non-retained and retained glycopeptides. The molar carbohydrate ratios and the methyl derivatives characterized in the different glycopeptides are listed in Table I and Table II.

From the obtained results, it was concluded that i) Tf-I contains two sialylated "isomeric" triantennary glycans with the third antenna β -1,4-linked to the α -1,3-mannose residue or β -1,6-linked to the α -1,6-mannose residue, in a relative ratio of about 1 : 1; ii) Tf-II contains one sialylated biantennary glycan and the two sialylated "isomeric" triantennary glycans in a relative ratio of 1 : 0.5 : 0.5 and iii) Tf-III contains only sialylated biantennary glycans. The complete structure of the sialylated biantennary glycans and of the two "isomeric" sialylated triantennary glycans was previously elucidated by a combination of methylation analysis and 500 MHz ^1H -n.m.r. spectroscopy realized on the glycopeptides isolated from a serotrans-

ferrin sample containing the mixture of the three variants (Spik et al., 1975; 1985; Dorland et al., 1977).

Analysis of the ConA-crossed immuno-affinity electrophoresis patterns.

ConA-crossed immuno-affinity electrophoresis was performed in a first step on purified serotransferrin variants which were used as standards. The electrophoretic migration of these variants was consistent with their behaviour on ConA-Sepharose column and with the affinity of the glycan structures to ConA (Fig. 2). A comparative analysis of the standard patterns with the patterns exhibited by normal and pregnancy sera allows to determine, semi-quantitatively, the changes in the proportions of the three transferrin variants and therefore, modifications of the glycosylation. The results summarized in Table III indicates that the 1.6 fold increase of serotransferrin level during pregnancy may be mainly explained by an increase of the level of serotransferrin variants containing triantennary glycans (Tf-I and Tf-II). In the same way, such a modification of the serotransferrin level in normal healthy donor serum may be explained by increase of the three serotransferrin variants. It may be suggested, therefore, that some of the physiological factors which occur during the pregnancy, particularly the increase of female sex hormones level, are able to induce an increase of triantennary glycans biosynthesis.

Analysis of the binding of the three transferrin carbohydrate variants to the placental membrane receptors..

The syncytiotrophoblast membrane vesicles preparations were characterized routinely by assessment of the increase of alkaline phosphatase and 5'nucleotidase activities. The final vesicle suspension (n = 3) contained $0.25 \pm 0.1\%$ of the homogenate proteins ($n \pm$ S.E.) and the enzyme activities corresponded to an enrichment relative to the whole homogenate of 25.

The purified syncytiotrophoblast membrane proteins were solubilized in a mixture of Triton X-100-NaDOC and visualization of the receptor-bound transferrin was performed after Triton X-100-NaDOC gradient polyacrylamide gel electrophoresis, followed by electrotransfer to nitrocellulose and immunological staining of the transferrin.

The separation profile shown in Fig. 3, lane B, indicates that in these conditions, the receptor-bound transferrin was detected as a single band with an apparent molecular weight of 340 kDa. As no free serotransferrin (M.W. : 80 kDa) was visible, it may be suggested that most of the placental serotransferrin receptors were saturated with endogeneous transferrin and that this complex was not dissociated in presence of the mixture of Triton X-100-NaDOC.

In order to check if each of the three carbohydrate molecular variants of serotransferrin was able to displace the receptor-bound endogeneous transferrin, the Triton X-100-NaDOC solubilized membrane proteins were incubated with an excess of each of the ^{125}I -labelled serotransferrin and the ^{125}I -activity was detected by autoradiography after Triton X-100-NaDOC polyacrylamide gel electrophoresis. As shown in Fig. 3, lanes C, ^{125}I -activity was not associated with material corresponding to an apparent molecular weight of 80 kDa but with a single band possessing an apparent molecular weight of 340 kDa. These results suggest that each of the serotransferrin variants was able to displace the endogeneous transferrin and to form a complex with a solubilized placental transferrin receptor. As these complexes possess an identical electrophoretic migration, it may be hypothesized that each of the three serotransferrin variants binds to a similar placental membrane receptor.

The binding parameters of the three serotransferrin variants to the placental membrane proteins were determined and, as seen from Fig. 4, the saturable binding of each of the serotransferrin variants to the membranes was observed at transferrin ranging from 100 to 150 ng. The mean values of the apparent affinity constants (K_a) determined from 5 series of experiments were 0.75 ± 0.15 , 1.7 ± 0.25 and $4.5 \pm 0.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ and the total numbers of specific binding sites calculated from the analysis of the Scatchard plots were 3.2 ± 0.3 , 2.8 ± 0.4 and $2.0 \pm 0.2 \times 10^{10}$ per μg of placental membrane proteins for Tf-I, Tf-II and Tf-III, respectively. From these results, it appears that the receptors represent an homogeneous population of high affinity binding sites with K_a values slightly decreasing as a function of increasing amount of triantennary glycans.

Similar values of K_a and number of receptors were found when the experiments were performed using the complete desialylated carbohydrate variants of serotransferrin, indicating that the sialic acids

and probably the sugar moieties do not seem to be involved in the interaction of the serotransferrin variants with the placental membrane receptors.

DISCUSSION

Affinity chromatography on ConA-Sepharose column allows to completely resolve human serotransferrin into three carbohydrate variants. These variants, the existence of which was suggested by Spik *et al.* (1974) and Montreuil & Spik (1975), were previously identified by ConA affinity chromatography (Wong *et al.*, 1978; Spik, 1982; Spik *et al.*, 1983; 1985). However, in the conditions which were described, the retarded serotransferrin variant (Tf-II) was not well separated from the retained serotransferrin variant (Tf-III) and a second affinity chromatography was necessary. In the present data, the method was improved by loading quantities of total serotransferrin such as the variant Tf-III saturates the ConA-Sepharose column. Therefore, during the chromatography, variant Tf-II slightly retained by the ConA was constantly removed by variant Tf-III firmly bound to the lectin. This modification allows to prepare in a single step large amounts of the three carbohydrate variants of the serotransferrin.

The structure of the glycans linked to the polypeptide chain of the three variants was analyzed by methylation. Identification and quantification of the di- and trimethyl derivatives of mannose confirm the existence in Tf-II of one biantennary and one triantennary glycan in equimolar ratio and, in addition, allows to determine the presence of two "isomeric" triantennary glycans in approximately equimolar ratio. Therefore, these results infirm the hypothesis of Bayard & Kerckaert (1980) and Kerckaert & Bayard (1982) concerning the uniformity of the glycan structures of glycoproteins, particularly of serotransferrin variants.

A comparative analysis of the electrophoretic behaviour of the isolated three serotransferrin variants used as standards and of the transferrin present in the serum of healthy donors and of healthy pregnant women leads to the conclusion that pregnancy induces the biosynthesis of serotransferrin variants Tf-I and Tf-II containing triantennary glycans. Similar results were previously obtained for

human α_1 -acid glycoprotein by Wells et al. (1981) who have shown that a relatively less ConA-binding material was found in association with and after an increase in female sex hormone level. Moreover, Strel'chyonok et al. (1982; 1984) have shown that transcortin from serum of normal healthy donors contains two triantennary and three biantennary glycans whereas transcortin from the serum of pregnant women contains five triantennary glycans of the same type. From these results, it may be suggested that the glycans of most of the serum glycoproteins, the level of which is increased during late pregnancy (Stimson, 1972), should be modified. In the present data, evidence has been brought that the glycan structure modification is not due to a general increase of the glycoprotein biosynthesis by the liver since in the case of non-pregnant women, an increase of serum transferrin level is correlated to an increase of the level of the three variants.

The selective and significant increase of Tf-I and Tf-II variants is not limited to the pregnancy since in the serum of cirrhotic patients where the level of serum transferrin is considerably decreased, an increase of these two variants has been previously noted (Spik et al., 1983; Debruyne et al., 1984). A shift of biantennary glycans towards tri- and tetraantennary glycans was also observed in α_1 -acid glycoprotein isolated from ascitic fluid of cirrhotic patients (Biou et al., 1987). These results raise the question of the biological function of transferrin variants containing triantennary glycans, particularly in the iron transport. As in the cirrhotic patients liver, an accumulation of iron was described (Murray & Stein, 1966; Chapman et al., 1983) and as the foetus iron requirements are important, mostly at the end of the pregnancy (Fletcher & Sutter, 1969), we have assumed that increase of Tf-I and Tf-II variants is correlated to an increase of iron transport and determined the binding capacity of each of the three serotransferrin variants by using as targets the syncytiotrophoblast microvilli membrane receptors. From the obtained results, the apparent association constants values were only slightly reduced for Tf-I and Tf-II as compared to Tf-III. These values are in the same order of magnitude as the values described by Wada et al. (1979) and Loh et al. (1980) and are consistent with the view that the increase of triantennary glycans does not significantly modify the binding parameters of the serotransferrin variants to the placental receptors.

A similar and repetitive 2 to 6 fold decrease of K_a according to the increase of triantennary glycans in serotransferrin variants was found by using rabbit reticulocytes and human hepatocarcinoma cells Hep G2 (Léger, D., Campion, B. & Spik, G., unpublished results) indicating that the decrease is most probably related to a steric encumbrance of triantennary glycans in regard of biantennary glycans.

The use of solubilized syncytiotrophoblast microvilli membranes does not allow the determination of placental iron uptake from the three serotransferrin variants. However, it may be noted that in previous experiments realized by Dekker *et al.* (1985), the iron uptake from carbohydrate variants of human serotransferrin by rat reticulocytes was found to be identical, suggesting no role of serotransferrin carbohydrate moiety in the mechanism of recognition and iron uptake.

As shown previously by Brown & Johnson (1981), the presence of a mixture of Triton X-100 and NaDOC does not dissociate the complex receptor-endogeneous transferrin. Characterization in our experiments of a band of apparent molecular weight of 340 kDa corresponding to a complex formed by a receptor associated to two transferrin molecules is in good accordance with the values of 364 kDa calculated by Enns & Sussman (1981). The small difference in the molecular weight values may be explained by the fact that in the non-dissociating detergent Triton X-100, the mobility of the membrane proteins is raised (Dewald *et al.*, 1974). No additional bands were found when the solubilized placental membranes were incubated with each of the labelled serotransferrin variants, suggesting that only one type of specific receptor or of a receptor of the same molecular weight is involved in the interaction with the three serotransferrin variants.

Binding site homogeneity and no profound differences between the association constants for the three serotransferrin variants do not exemplify the significance of the increase of serotransferrin triantennary glycans. Further studies concerning the nature and the role of the factors which affect the biosynthesis of serotransferrin glycans in physiological and pathological conditions are therefore necessary in order to assess if the selective increase of triantennarisation has any biological significance.

This work was supported in part by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, the Ministère de la Recherche et de la Technologie, the Ministère de l'Education Nationale and the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Associée n°217, Director : Professor J. Montreuil). We thank Dr. Querleu from the Maternité Gellé (Roubaix, France) for providing us with pregnant women sera, the Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille (Director : Professor J.J. Huart) for providing us with healthy donors sera and Professor Delecour, Director of the Maternité R. Salengro (Lille) for prelevement of the women placentae.

REFERENCES

- Aronson, N.N. & Touster, O. (1974) in *Methods in Enzymology* (S. Fleischer & L. Packer, eds.) **31**, pp.90-103, Academic Press, New-York
- Bayard, B. & Kerckaert, J.B. (1980) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **95**, 777-784
- Beaufay, H., Amar-Costesec, A., Feytmans, E., Thines-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M. & Berthet, J. (1974) *J. Cell Biol.* **161**, 188-200
- Biou, D., Konan, D., Féger, J., Agneray, J., Leroy, Y., Cardon, P., Fournet, B. & Durand, G. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **913**, 308-312
- Booth, A.G., Olaniyan, R.O. & Vanderpuye, O.A. (1980) *Placenta* **1**, 327-336
- Booth, A.G. & Wilson, M.J. (1981) *Biochem. J.* **196**, 355-362
- Brown, J.P. & Johnson, P.M. (1981) *Placenta* **2**, 1-10
- Burnette, M.N. (1981) *Anal. Biochem.* **112**, 195-203
- Chapman, R.W., Morgan, M.Y., Bell, R. & Sherlock, S. (1983) *Gastroenterology* **84**, 143-147
- Cornfield, A.P., Beau, J.M. & Schauer, R. (1978) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 1335-1342
- Debruyne, V., Montreuil, J. & Spik, G. (1984) in *Protides of the Biological Fluids* (H. Peeters, ed.) **31**, pp.63-68, Pergamon Press, Oxford
- Dekker, C.J., Kroos, M.J., Van Der Heul, C. & Van Eijk, H.G. (1985) *Int. J. Biochem.* **17**, 701-706
- Dewald, B., Delaney, J.T. & Touster, O. (1974) in *Methods in Enzymology* (S. Fleischer & L. Packer, eds.) **32**, pp.82-91, Academic Press, New-York

- Dorland, L., Haverkamp, J., Schut, B.L., Vliegenthart, J.F.G., Spik, G., Strecker, G., Fournet, B. & Montreuil, J. (1977) *FEBS Lett.* **77**, 15-20
- Enns, C.A. & Sussman, H.H. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 12620-12623
- Finne, J., Krusius, T. & Rauvala, H. (1980) *Carbohydr. Res.* **80**, 336-339
- Fletcher, J. & Sutter, P.E.N. (1969) *Clin. Sci.* **36**, 209-220
- Fournet, B., Strecker, G., Leroy, Y. & Montreuil, J. (1981) *Anal. Biochem.* **116**, 489-502
- Fracker, P. & Speck, J. (1978) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **80**, 849-857
- Huebers, H.A. & Finch, C.A. (1987) *Physiol. Rev.* **67**, 520-581
- Kamerling, J.P., Gerwig, G.J., Vliegenthart, J.F.G. & Clamps, J.R. (1975) *Biochem. J.* **151**, 491-495
- Kerckaert, J.B. & Bayard, B. (1982) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **105**, 1023-1030
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature* **227**, 680-695
- Laurell, C.B., Kullander, S. & Thorell, J. (1968) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **21**, 337-343
- Loh, T.T., Higushi, D.A., Van Brockxmeer, F.M., Smith, T.H. & Brown, E.B. (1980) *J. Clin. Invest.* **65**, 1182-1191
- Mancini, G., Carbonara, A.O. & Heremans, J.F. (1965) *Immunochemistry* **2**, 235-254
- Montreuil, J. & Spik, G. (1975) in *Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine* (R.R. Crichton, ed.) pp.27-38, Amsterdam, North-Holland
- Murray, J. & Stein, N. (1966) *Medicine* **45**, 507-512
- Nicollet, I., Lebreton, J.P., Fontaine, M. & Hiron, M. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **668**, 235-241
- Pearse, B.M.F. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 451-455
- Peterson, G.L. (1977) *Anal. Biochem.* **83**, 346-356
- Salier, J.P., Faye, L., Vergaine, D. & Martin, J.P. (1980) *Electrophoresis* **1**, 193-197
- Smith, C.H., Nelson, D.M., King, B.F., Donohue, T.M., Ruzyski, S.M. & Kelley, L.K. (1977) *Am. J. Obstet. Gynecol.* **128**, 190-196
- Spik, G. (1982) in *The Biochemistry and Physiology of Iron* (Saltman, P. and Hagenauer, J., eds.) pp.49-56, Elsevier North-Holland, Amsterdam

- Spik, G., Bayard, B., Fournet, B., Strecker, G., Bouquelet, S. & Montreuil, J. (1975) FEBS Lett. **50**, 296-299
- Spik, G., Debruyne, V. & Montreuil, J. (1983) in Structural Carbohydrates in the Liver (H. Popper, W. Reutter, E. Köttgen & F. Gudat, eds.) pp.477-483, MTP Press Limited, Basel
- Spik, G., Debruyne, V., Montreuil, J., Van-Halbeek, H. & Vliegenthart, J.F.G. (1985) FEBS Lett. **183**, 296-299
- Spik, G., Vandersyppe, R., Fournet, B., Bayard, B., Charet, P., Bouquelet, S., Strecker, G. & Montreuil, J. (1974) in Actes Coll. Intern. Glycoconjugués n°221 du CNRS (J. Montreuil, ed.) pp.483-499, Paris, CNRS
- Spik, G. & Montreuil, J. (1969) Bull. Soc. Chim. Biol. **51**, 1271-1285
- Stimson, W.M. (1972) Clin. Biochem. **5**, 3-12
- Strel'chyonok, O.A. Avvakumov, G.V. & Akhrem, A.A. (1984) Carbohydr. Res. **134**, 133-140
- Strel'chyonok, O.A. Avvakumov, G.V. Matveentseva, I.V., Akhrem, L.V. & Akhrem, A.A. (1982) Biochim. Biophys. Acta **705**, 167-173
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 1175-1179
- Vaitukaitis, J., Robbins, J.B., Nieschlag, E. & Ross, G.T. (1971) J. Clin. End. **33**, 988-991
- Wada, H.G., Hass, P.E. & Sussman, H.H. (1979) J. Biol. Chem. **254**, 12629-12635
- Wells, C., Bøg-Hansen, T.C., Cooper, E.H. & Glass, M.R. (1981) Clin. Chim. Acta **109**, 59-67
- Wong, K.L., Debanne, M.T., Hatton, M.W.C. & Regoeczi, E. (1978) Int. J. Peptide Protein Res. **12**, 27-37
- Zanetta, J.P., Breckenridge, W.C. & Vincendon, G. (1972) J. Chromatogr. **69**, 291-304

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. : Human serotransferrin affinity chromatography on ConA-Sepharose column. Tf-I and Tf-II were eluted in 5 mM sodium acetate, pH 6.9, containing 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 and 1 mM MnCl_2 . Tf-III was eluted in the same buffer containing 15 mM α -O-methyl-D-glucopyranoside.

Figure 2. : Crossed immuno-affinity electrophoresis in presence of ConA in the first dimension gel and rabbit anti-human serotransferrin IgG in the second dimension gel. A : serum from normal donor; B : serum from pregnant woman; C, D and E : serotransferrin variants Tf-I, Tf-II and Tf-III isolated on ConA-Sepharose column.

Coding system of glycan structure characterized in each of the serotransferrin variants is as follows : (●) GlcNAc; (◆) Man; (■) Gal; (Δ) (α 2-3)-linked NeuAc; (o) (α 2-6)-linked NeuAc.

Figure 3. : Visualization of the serotransferrin-receptor complex of the placental microvillous membrane by gradient polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of Triton X-100-NaDOC.

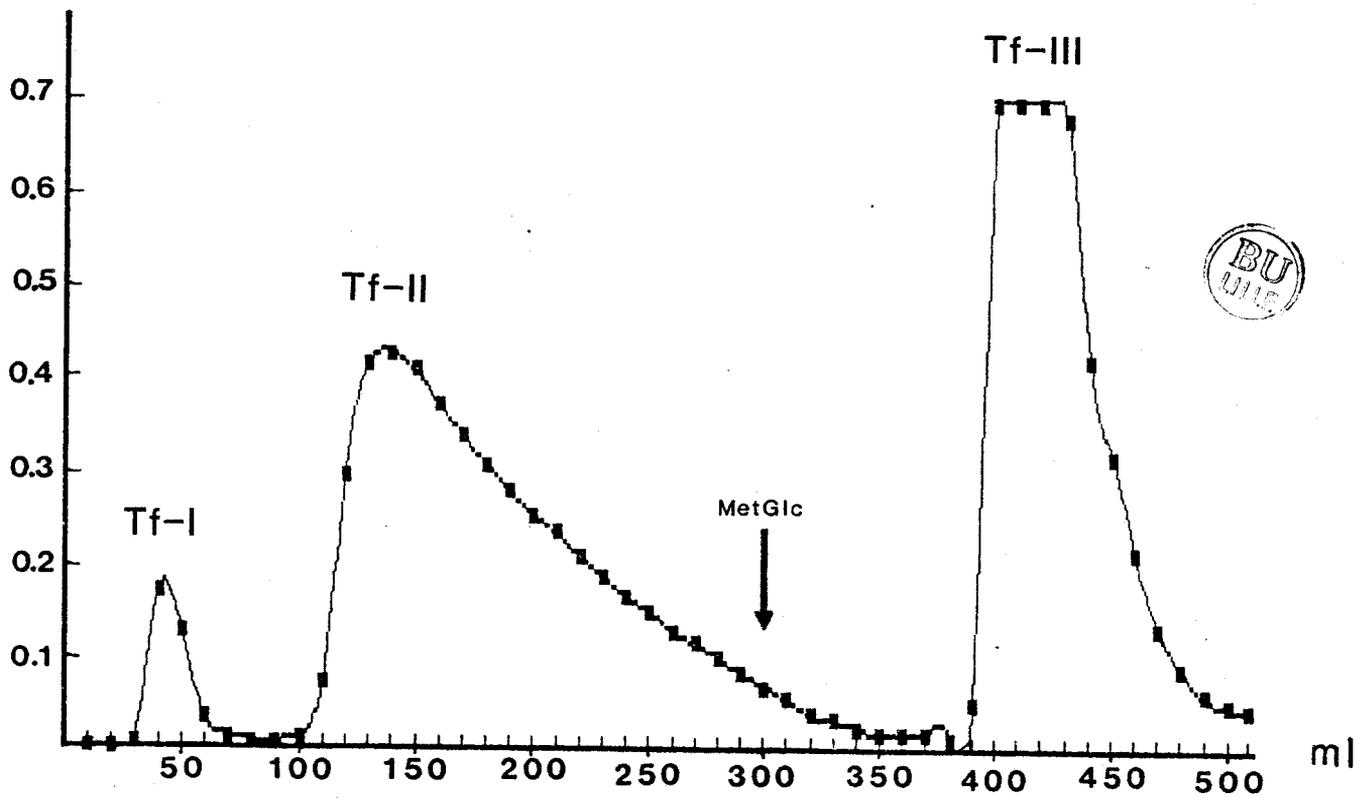
A : Amido-Black staining. 1 : standard molecular weights (thyroglobulin, ferritin, catalase, LDH, albumin) ; 2 : human serotransferrin; 3 : placental membrane proteins (50 μ g).

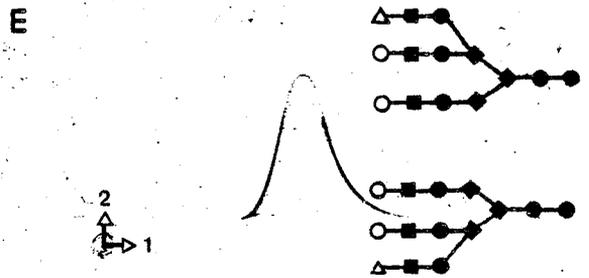
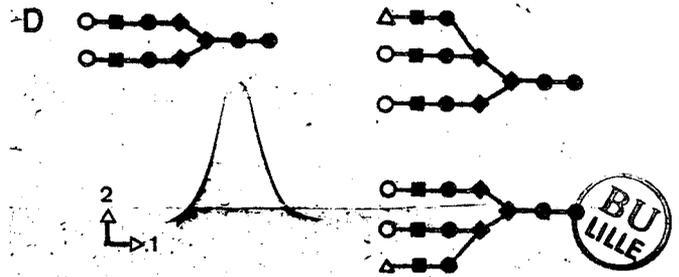
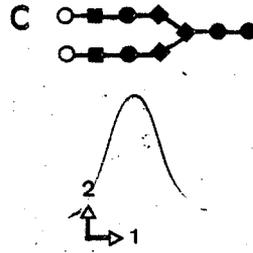
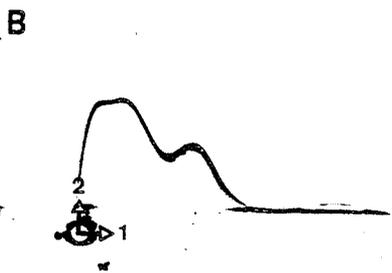
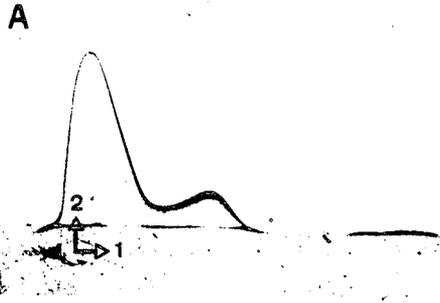
B : Immunological staining of human serotransferrin after electrophoretic transfer on nitrocellulose : placental membrane proteins (50 μ g); C : Autoradiographic revelation after incubation with each of the three ^{125}I -labelled human serotransferrin variants (5 : Tf-I, 6 : Tf-II and 7 : Tf-III) of placental membrane proteins (50 μ g).

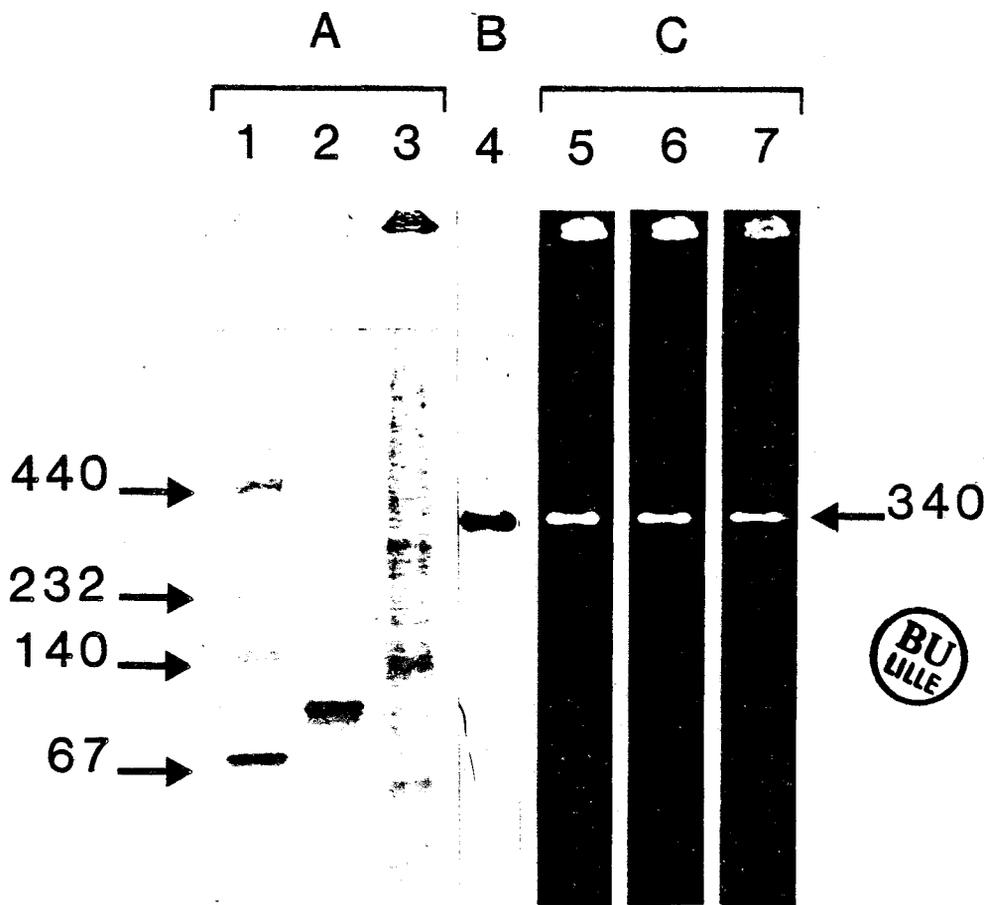
Figure 4. : Binding of each carbohydrate molecular serotransferrin variant to the human placental microvillous membranes (A : variant Tf-III; B : variant Tf-II and C : variant Tf-I). Reaction mixtures contained 50 μ g microvillous membrane proteins and varying amount of ^{125}I -labelled serotransferrin. Total binding (○). Non-specific binding (□) was measured by adding 100-fold molar excess of unlabelled transferrin to the assay mixtures. Specific binding (---).

D, E and F are the Scatchard analysis deduced from 5 different assays of respectively A, B and C.

O D 280 nm







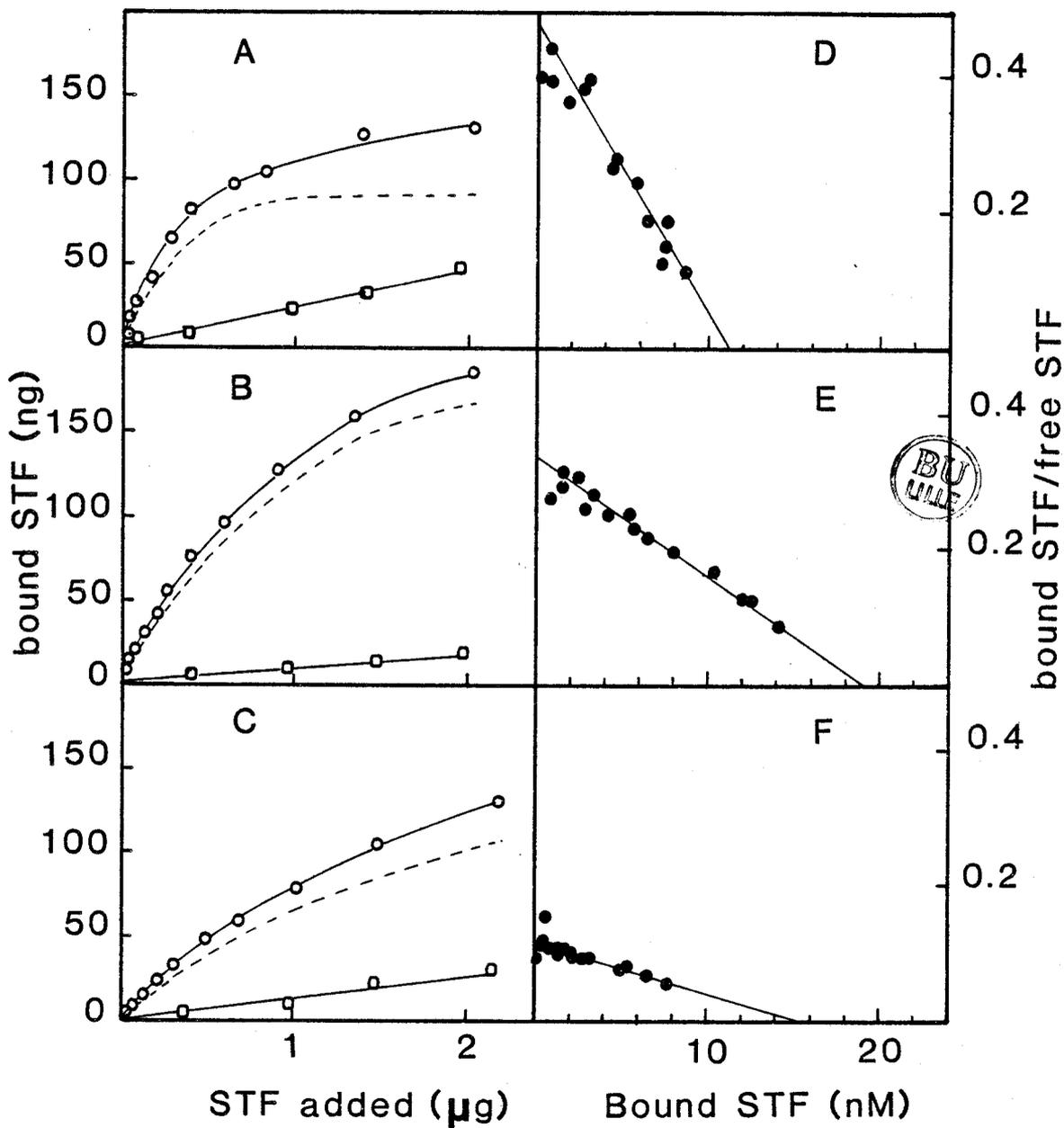


TABLE I : Molar carbohydrate composition of glycopeptides isolated from the three carbohydrate molecular variants of human serotransferrin.

Glycopeptides from	Monosaccharides *			
	NeuAc	Gal	Man	GlcNac
Tf-I	2.9	3.0	3	4.9
Tf-II	2.4	2.6	3	4.4
Tf-III	1.8	2.1	3	3.8

* Calculated on the basis of 3 mannose residues per mole of glycopeptide.



TABLE II : Molar ratio of monosaccharide methyl ethers present in the methanolysates of permethylated glycopeptides isolated from the three carbohydrate molecular variants of human serotransferrin.

Methyl ethers (mol/mol) **	Glycopeptides from		
	Tf-I	Tf-II	Tf-III
4,7,8,9 Me ₄ NeuAc	2.4	2.0	1.6
2,3,4,6 Me ₄ Gal	0.3	0.1	0.1
2,3,4 Me ₃ Gal	1.8	1.9	1.9
2,4,6 Me ₃ Gal	0.8	0.4	0
3,4,6 Me ₃ Man	0.9	1.4	1.9
3,6 Me ₂ Man	0.4	0.2	0
3,4 Me ₂ Man	0.5	0.2	0
2,4 Me ₂ Man	1	1	1
3,6 Me ₂ GlcNAc	3.6	3.0	3.2

** Calculated on the basis of 1 residue of (2,4)di-O-methylmannoside.



TABLE III : Modifications of the percentage and of the amount of the carbohydrate molecular variants of transferrin from pregnant women sera. Comparison with normal sera containing similar transferrin level.

Origin of serum	Total STF (a)	Tf-III	Tf-II	Tf-I
Group 1				
Pregnant women 0-3 months (n = 7)	2.76 ± 0.4	(b) 2.2 ± 0.35 (c) 79.0 ± 2.80	0.5 ± 0.06 19.4 ± 2.80	0.04 ± 0.02 1.7 ± 0.90
Normal serum (n = 25)	2.80 ± 0.3	(b) 2.25 ± 0.26 (c) 80.4 ± 2.5	0.54 ± 0.09 19.2 ± 3.1	0.01 ± 0.01 0.4 ± 0.9
Group 2				
Pregnant women 3-6 months (n = 12)	3.89 ± 0.6	(b) 2.93 ± 0.46 (c) 72.4 ± 3.5	0.99 ± 0.15 24.6 ± 2.1	0.15 ± 0.07 3.4 ± 1.6
Normal serum (n = 9)	3.86 ± 0.4	(b) 3.16 ± 0.35 (c) 81.8 ± 2.7	0.71 ± 0.1 18.2 ± 1.9	0.009 ± 0.01 0.25 ± 0.5
Group 3				
Pregnant women 6-9 months (n = 15)	4.41 ± 0.6	(b) 2.99 ± 0.46 (c) 67.6 ± 2.5	1.16 ± 0.15 26.5 ± 2.3	0.27 ± 0.06 6.1 ± 1.3
Normal Serum (n = 5)	4.40 ± 0.4	(b) 3.64 ± 0.37 (c) 82.7 ± 2.2	0.76 ± 0.04 17.3 ± 1.6	(d) (d)

(a) : g/l, estimated by single radial immuno-diffusion.

(b) : g/l, estimated from (c) and plasma serotransferrin level.

(c) : %, estimated from the area of the peak of each molecular variant by ConA-crossed immuno-affinity electrophoresis.

(d) : not determinated.

CONCLUSION

La chromatographie d'affinité sur concanavaline A permet de séparer la sérotransferrine humaine en trois variants glycaniques. Ces trois variants glycaniques ont été identifiés (SPIK, 1982; SPIK et al., 1983; DEBRUYNE et al., 1984; 1985). Le variant Tf-I contient deux glycanes triantennés, le variant Tf-II, un glycanne triantenné et un glycanne biantenné et le variant Tf-III, deux glycanes biantennés. La préparation des variants a été améliorée en déposant des quantités de variant Tf-III telles que la colonne de lectine soit saturée par celui-ci. Ainsi, le variant Tf-II, retardé par la lectine est constamment déplacé par le variant Tf-III plus fortement reconnu par la concanavaline A, ce qui permet de purifier les trois variants de la sérotransferrine en une seule étape.

L'étude des glycanes des fractions glycopeptidiques obtenues après chromatographie d'affinité sur concanavaline A de la sérotransferrine et hydrolyse pronasique, montre que les glycanes de la fraction Tf-II sont effectivement de type biantenné et triantenné, dans un rapport molaire 1 : 1. Ces résultats permettent de lever l'ambiguïté concernant l'existence du variant Tf-II ce qui confirme donc l'hypothèse de la présence de deux types de glycanes sur une même molécule de sérotransferrine et par conséquence, infirme l'hypothèse de l'uniformité du type de glycanne présent sur la molécule de sérotransferrine.

L'analyse des sérums de femmes enceintes nous a permis de constater que l'augmentation de la concentration en sérotransferrine plasmatique est essentiellement liée à l'augmentation du taux des variants Tf-I et Tf-II, possédant respectivement deux et un glycanes de type triantenné. Comparativement, l'analyse de sérums de donneurs "sains" montre que l'augmentation de la sérotransferrine circulante est uniquement liée à l'augmentation du variant Tf-III contenant deux glycanes de type biantenné.

L'étude de la fixation spécifique de chacun des variants de la sérotransferrine sur les membranes du syncytiotrophoblaste du placenta humain nous fournit des valeurs de constante d'affinité apparente (K_a) décroissantes avec l'augmentation du nombre de glycanes de type

triantenné sur la molécule de sérotransferrine. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'encombrement stérique des glycanes triantennés gêne la fixation de la sérotransferrine sur son récepteur en masquant partiellement la partie peptidique de la transferrine qui reconnaît le récepteur.

L'utilisation des techniques d'électrophorèse en présence de détergent non découplant nous montre que chacun des trois variants de la sérotransferrine déplace la sérotransferrine endogène fixée aux récepteurs des membranes placentaires. Nous pouvons donc conclure que la sérotransferrine se fixe fort probablement sur un seul type de récepteur spécifique, quelque soit le variant glycanique utilisé, excluant la présence d'un récepteur de nature lectinique reconnaissant les acides N-acétylneuraminiques terminaux des glycanes de type triantenné.

POLYANTENNARISATION DES
GLYCANNES DE LA TRANSFERRINE
ISOLEE DES MILIEUX
D'HEPATOCYTES EN CULTURE ET
INTERACTIONS DES VARIANTS
AVEC LES RECEPTEURS
MEMBRANAIRES HEPATOCYTAIRES

I - ETUDE DE L'HETEROGENEITE DE LA TRANSFERRINE SYNTHETISEE DANS DES MILIEUX DE CULTURE D'HEPATOCYTES HUMAINS

Le foie est l'organe responsable de la synthèse de la majeure partie de la sérotransferrine.

Dans le but d'étudier la modification de la répartition des variants glycaniques de la sérotransferrine, nous avons analysé la transferrine synthétisée par des hépatocytes humains en culture. Afin de rapprocher le plus possible des conditions physiologiques, nous avons choisi de travailler sur des hépatocytes humains normaux provenant de biopsies de donneurs sains. C'est pourquoi, nous avons établi une collaboration avec l'équipe du Dr A. GUILLOUZO (Rennes) qui pratique depuis plusieurs années les cultures primaires ou les co-cultures d'hépatocytes humains.

Les cultures primaires d'hépatocytes humains ou d'autres Mammifères ont été beaucoup employées pour l'étude de la synthèse et de la sécrétion des protéines plasmatiques. Cependant, ces hépatocytes adultes présentent au bout de quelques jours de culture des modifications phénotypiques caractéristiques des cellules parenchymateuses de foie fétal (GUGUEN-GUILLOUZO et GUILLOUZO, 1983). De plus, ce type de culture d'hépatocytes a le désavantage d'avoir une durée de vie très courte ne permettant pas des expérimentations de plusieurs jours.

GUGUEN-GUILLOUZO et al. (1983), GUILLOUZO et al. (1984) et LEBRETON et al. (1986) ont montré que des hépatocytes maintenus en co-culture avec une lignée de cellules épithéliales de foie voient leur capacité de synthétiser les protéines plasmatiques être maintenue durant plusieurs semaines.

Nous avons étudié par électrophorèse d'immuno-affinité la transferrine synthétisée par les hépatocytes en co-culture dans un milieu dépourvu de sérum de veau mais enrichi en hydrocortisone.

A - DOSAGE DE LA TRANSFERRINE DES MILIEUX DE CO-CULTURE

Une estimation de la transferrine synthétisée par les hépatocytes en co-culture a été réalisée par dosage radio-immunologique selon le protocole décrit à la page 170, utilisant la sérotransferrine humaine comme inhibiteur compétitif.

Le taux de transferrine sécrétée dans le milieu est de l'ordre de $0,5 \pm 0,1 \mu\text{g}$ pour 10^6 cellules le jour J-1 et de $1,4 \pm 0,5 \mu\text{g}$ pour 10^6 cellules entre le jour J-2 et le jour J-10. Le taux de sécrétion de la transferrine est constant tout au long de la co-culture des hépatocytes.

B - HOMOGENEITE DE LA TRANSFERRINE PRESENTE DANS LES MILIEUX DE CO-CULTURE

Afin de vérifier si la transferrine sécrétée par les hépatocytes en co-culture est homogène, nous avons réalisé une électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS (protocole décrit à la page 167) suivie d'un transfert électrophorétique sur nitrocellulose (protocole décrit à la page 168) et révélation par des anticorps anti-IgG de Lapin marqués à la peroxydase (protocole décrit à la page 170).

Nous constatons que la transferrine sécrétée par les hépatocytes en co-culture migre en une fraction homogène de masse moléculaire 80000 identique à un témoin de sérotransferrine humaine et ceci quelque soit la durée de la co-culture (Fig. 14 p. 91).

C - VARIATION DE LA REPARTITION DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA TRANSFERRINE DES HEPATOCYTES EN CO-CULTURE

Par électrophorèse d'immuno-affinité en présence de concanavoline A (protocole décrit à la page 169), nous avons étudié la variation de la répartition des variants glycaniques de la transferrine synthétisée par les hépatocytes entre le premier jour et

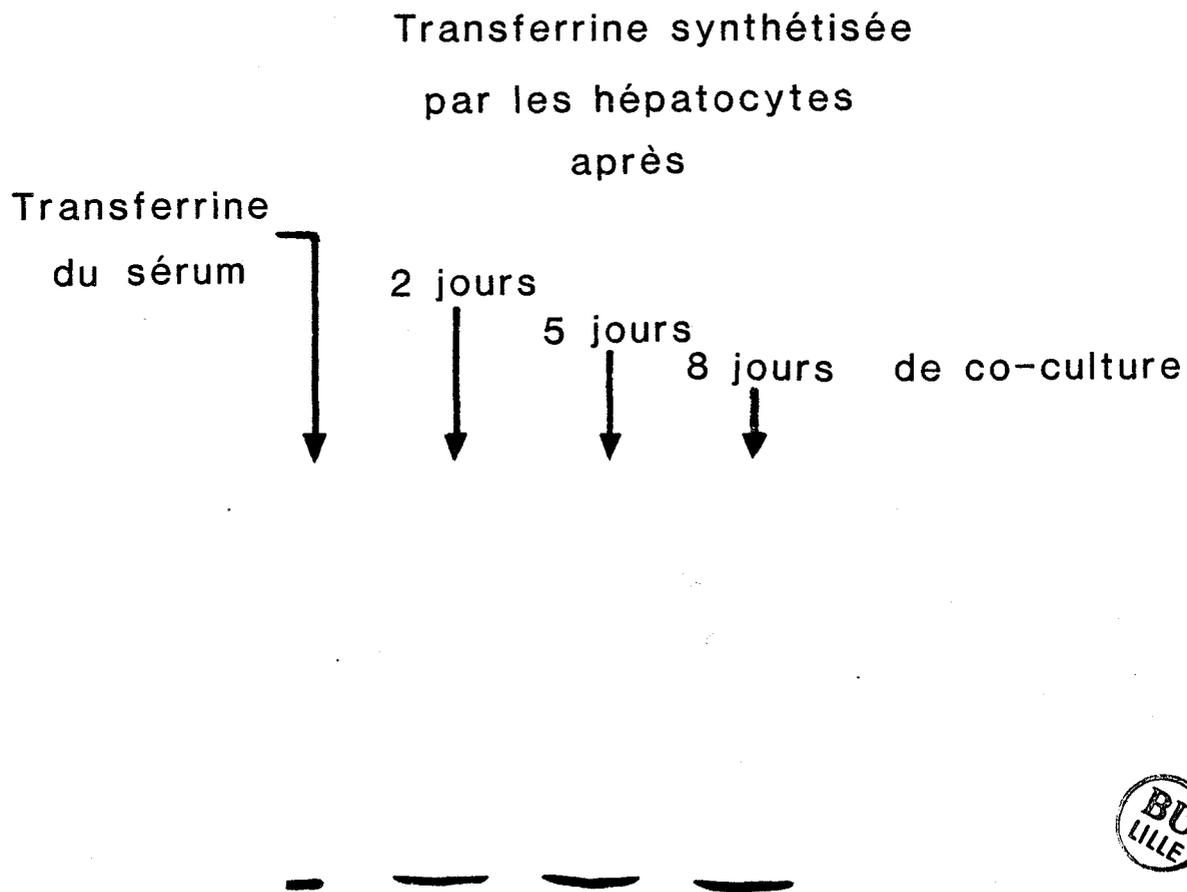


Figure 14 : Révélation de la transferrine par les anticorps marqués à la peroxydase après électrophorèse en gel d'acrylamide des protéines totales du milieu de co-culture des hépatocytes et transfert électrophorétique sur nitrocellulose.

le dixième jour de co-culture.

Il est tout d'abord intéressant de noter que la transferrine des hépatocytes en co-culture est séparée en trois variants comme pour la sérotransferrine humaine (Fig. 15 p. 93). De plus, des modifications significatives sont apparues dans la répartition de ces variants au cours de la durée de la co-culture. L'évolution des pourcentages relatifs de chacun des variants, calculés d'après la surface des pics de précipitation obtenus après électrophorèse bidimensionnelle, est représentée dans la figure 16 page 91. Nous constatons qu'entre le jour J-1 et le jour J-10, le pourcentage du variant retenu par la lectine décroît de 60 % à 28 % de la transferrine totale, le variant retardé par la lectine reste constant et représente environ 40 % de la transferrine totale et le variant non retenu par la concanavoline A augmente de 0 à 33 %.

D - DISCUSSION - CONCLUSION

Ces résultats suggèrent une augmentation de la triantennarisation des glycanes de la transferrine sécrétée par les hépatocytes en co-culture alors que le taux de synthèse de transferrine dans le milieu demeure constant. Jusqu'alors, les modifications de la répartition des glycanes de la sérotransferrine s'accompagnaient d'une augmentation de la concentration plasmatique en sérotransferrine dans le cas de la grossesse (voir le chapitre précédent) ou d'une diminution de la concentration dans le cas de la cirrhose et donc d'une variation du taux de synthèse de la sérotransferrine. Les travaux effectués par DEBRUYNE et al. (1984) sur des sérums de patients atteints d'hépatopathie alcoolique ont montré une baisse de la concentration en sérotransferrine plasmatique accompagnée d'une augmentation du taux des variants possédant des glycanes de type triantenné (Tf-I et Tf-II) et d'une diminution du taux du variant possédant deux glycanes de type biantenné (Tf-III).

Les facteurs pouvant influencer la modification de la répartition des variants de la transferrine synthétisée par les hépatocytes en co-culture sont de plusieurs types : la mise en culture *in vitro* des

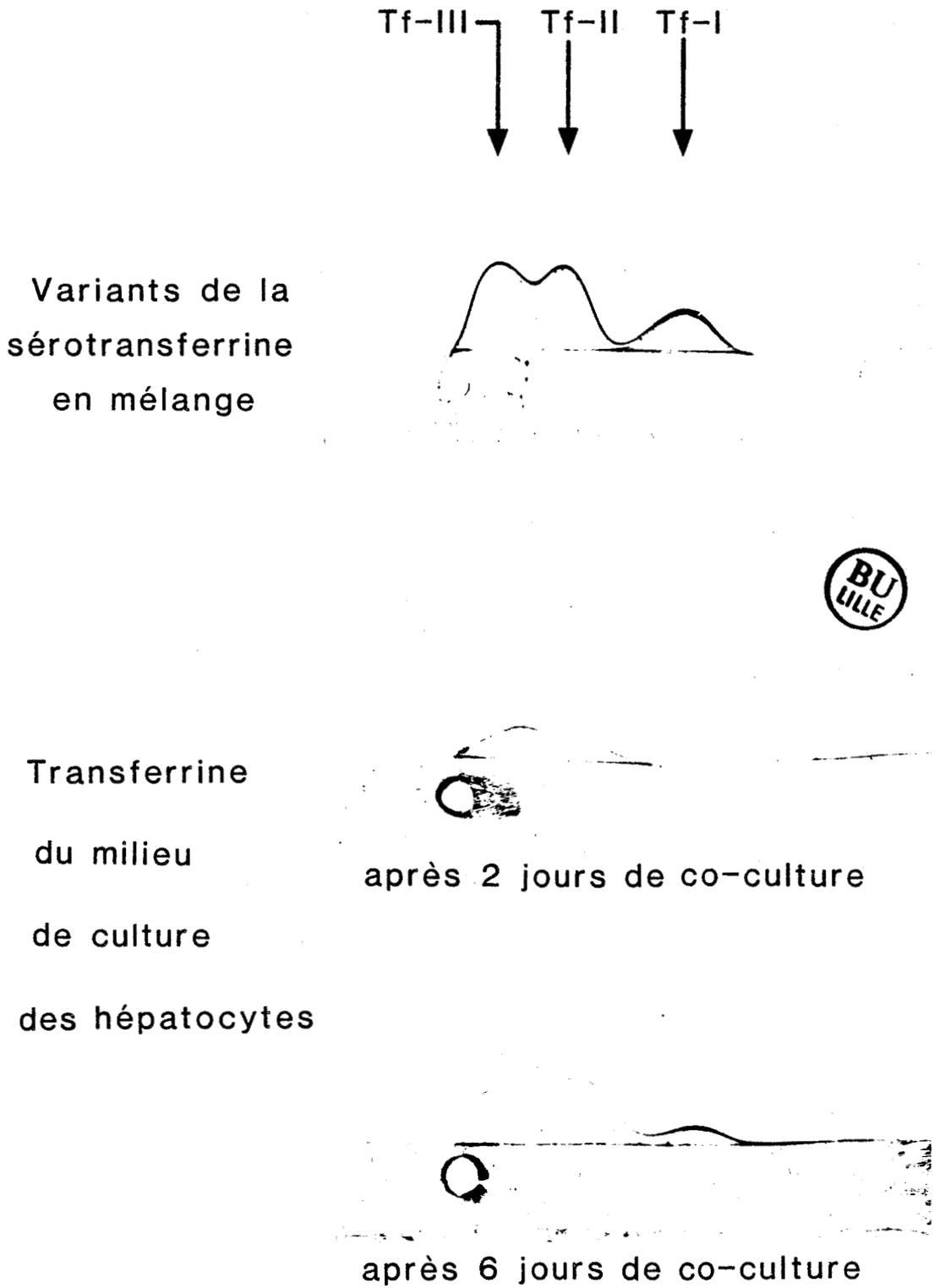


Figure 15 : Electrophorèse d'immuno-affinité bidimensionnelle en présence de concanavoline A dans la première dimension et d'anticorps dirigés contre la sérot transferrine humaine dans la deuxième dimension des protéines totales du milieu de co-culture des hépatocytes.

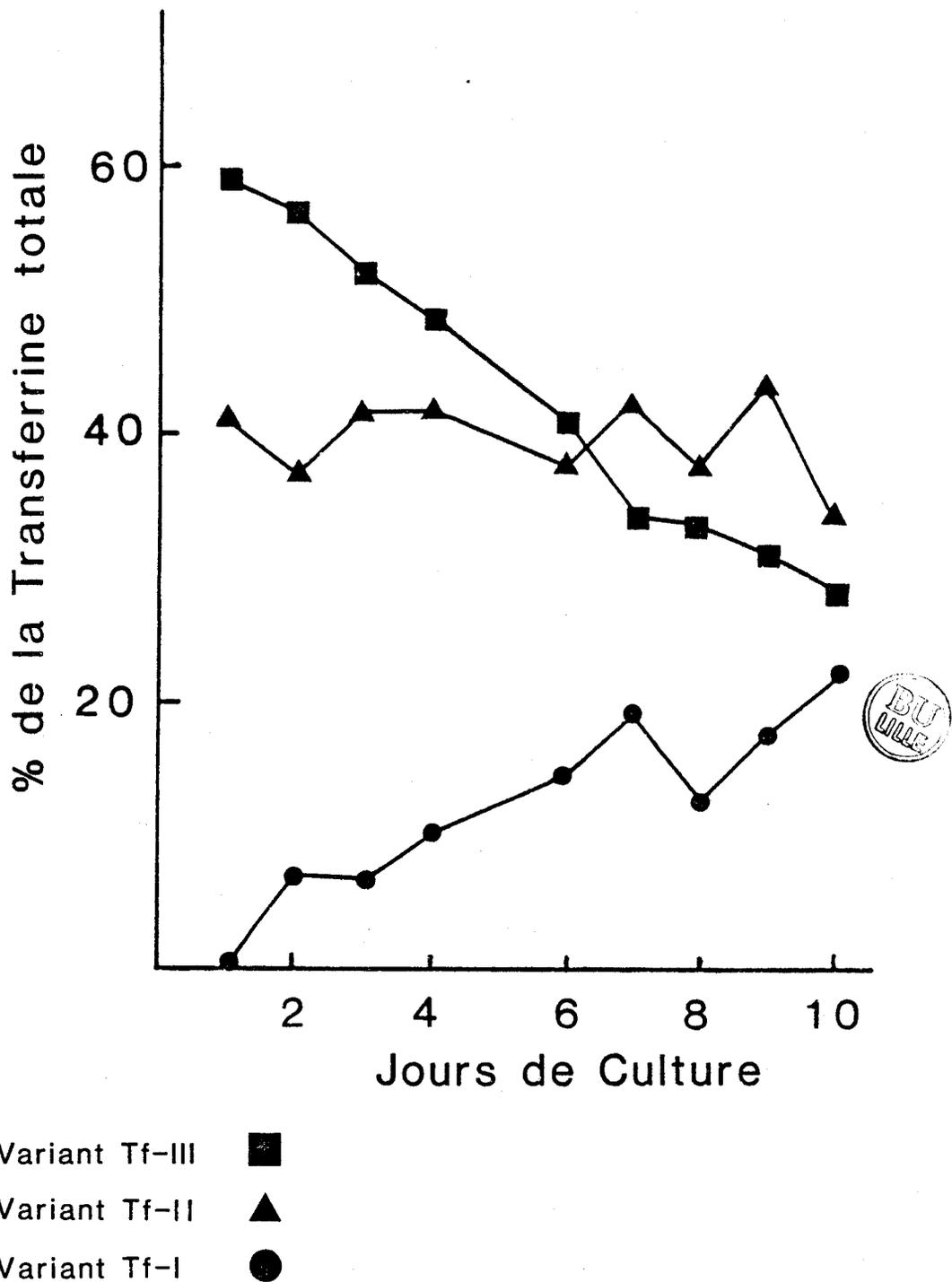


Figure 16 : Modification de la répartition des variants glycaniques de la transferrine sécrétée dans le milieu des hépatocytes en co-culture en fonction du temps de culture

hépatocytes, la présence des cellules épithéliales du foie qui peuvent sécréter des composés influençant la glycosylation de la transferrine et la présence d'hydrocortisone ajoutée dans le milieu de culture.

La difficulté d'obtenir ce type de matériel humain en quantité suffisante et le fait que les hépatocytes maintenus plusieurs jours en co-culture sécrètent des quantités relativement faibles de transferrine n'ont pas permis d'élargir l'étude de l'interaction des variants de la sérotransferrine humaine avec les récepteurs membranaires des hépatocytes humains en culture primaire ou en co-culture. Nous avons donc entrepris l'étude de la transferrine synthétisée par des hépatocytes établis en lignée continue, les cellules Hep G2.

II - ETUDE DE L'HETEROGENEITE DE LA TRANSFERRINE ISOLEE DES MILIEUX DE CULTURE D'HEPATOCYTES PROVENANT D'UN HEPATOCARCINOME HUMAIN : LES CELLULES HEP G2

A - INTRODUCTION

Pour étudier la modification de la répartition des variants de la sérotransferrine humaine et l'interaction de ces variants sur des hépatocytes humains, nous avons choisi un modèle expérimental synthétisant la transferrine d'une part et soumis à un développement cellulaire important d'autre part : les cellules Hep G2. Ces cellules, provenant d'un hépatocarcinome humain, sont établies en lignée continue. Elles ont conservé les propriétés biologiques et synthétiques des cellules parenchymateuses de foie normal, particulièrement la synthèse et la sécrétion de la majorité des protéines plasmatiques, dont la sérotransferrine (KNOWLES et al., 1980) et sont devenues un modèle très utilisé pour l'étude de la biosynthèse des protéines plasmatiques.

Nous avons isolé la transferrine du milieu de culture des cellules Hep G2 afin d'étudier la répartition des variants de la transferrine synthétisée par des hépatocytes en culture présentant un développement cellulaire important.

B - ISOLEMENT ET MISE EN EVIDENCE DE L'HETEROGENEITE DE LA TRANSFERRINE SECRETEE DANS LE MILIEU DE CULTURE DES CELLULES HEP G2

1 - Estimation du taux de synthèse et de sécrétion de la transferrine dans le milieu de culture

Les cellules Hep G2 sont cultivées à la concentration initiale de $0,5 \times 10^6$ cellules dans une boîte de culture de 25 cm^2 selon le protocole décrit à la page 159. La confluence des cellules

est obtenue au bout de 5 à 6 jours de culture. Le taux de transferrine nouvellement synthétisée et sécrétée dans le milieu de culture est estimé par dosage radio-immunologique utilisant la sérotransferrine humaine marquée à l' ^{125}I comme antigène compétitif (protocole décrit à la page 170). Le taux de sécrétion est mesuré chaque jour jusqu'à la confluence des cellules. Il augmente entre le premier jour et le quatrième jour de $1,0 \pm 0,1 \mu\text{g}$ à $3,8 \pm 0,4 \mu\text{g}$ pour 10^6 cellules. Ensuite, le taux de sécrétion demeure constant, aux environs de $4 \mu\text{g}$ de transferrine par 10^6 cellules. Nous pouvons observer que, par rapport aux hépatocytes en co-culture, le taux de sécrétion est 2 à 3 fois plus élevé pour les cellules Hep G2.

2 - Isolement par chromatographie d'affinité de la transferrine synthétisée par les cellules Hep G2

La transferrine sécrétée par les cellules Hep G2 est facilement isolée du milieu de culture, en une seule étape, par chromatographie d'immuno-affinité sur colonne d'IgG de Lapin anti-sérotransferrine humaine couplée au Sépharose 4-B selon le protocole décrit à la page 154.

Utilisant le même procédé de purification, nous avons isolé la sérotransferrine humaine d'un sérum normal avec un rendement final de l'ordre de 90 %, la concentration initiale en sérotransferrine du sérum ayant été mesurée par immuno-diffusion radiale.

Les cellules Hep G2 sont cultivées en présence de sérum de veau foetal contenant des quantités non négligeables de sérotransferrine bovine ($300 \mu\text{g/ml}$ de milieu). Aussi, afin de vérifier que la transferrine retenue sur la colonne d'IgG ne provenait pas du sérum de veau foetal, nous avons passé 250 ml de milieu DMEM contenant 10 % de sérum de veau foetal sur la colonne d'IgG anti-sérotransferrine humaine. L'élution de la colonne par le tampon glycolle-HCl, pH 2,8 a montré qu'aucune protéine n'était retenue par les anticorps couplés au Sépharose 4-B. Nous sommes donc en présence d'anticorps spécifiques de la sérotransferrine humaine.

8,25 litres de milieu de culture des cellules Hep G2 ont ainsi été chromatographiés par fraction de 250 ml. Finalement, nous avons isolé 28,5 mg de transferrine Hep G2, donnant une concentration moyenne de $3,4 \mu\text{g}$ de transferrine isolée par ml de milieu de culture.

3 - Mise en évidence de la microhétérogénéité de la transferrine isolée

a - *Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS*

La pureté et l'homogénéité de la transferrine isolée par chromatographie d'affinité ont été vérifiées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en gradient en présence de SDS (protocole décrit à la page 167), suivi d'un transfert électrophorétique des protéines sur feuille de nitrocellulose (protocole décrit à la page 168) et révélation par des anticorps anti-IgG de Lapin marqués à la peroxydase (protocole décrit à la page 170) (Fig. 17 p. 99).

La sérotransferrine humaine isolée du sérum donne une bande homogène unique identique à un témoin de sérotransferrine humaine commerciale (masse moléculaire apparente = 80 000). Par contre, la transferrine synthétisée par les cellules Hep G2 montre une certaine hétérogénéité puisqu'elle présente trois bandes différentes dont les masses moléculaires apparentes, déduites de leurs migrations électrophorétiques, sont de 83 000, 78 000 et 75 000. Il faut noter que la révélation par des anticorps anti-IgG de Lapin marqués à la peroxydase montre que les trois bandes de transferrine synthétisée par les cellules Hep G2 sont révélées par les anticorps comme étant de la sérotransferrine.

b - *Electrophorèse d'immuno-affinité de la transferrine isolée*

Nous avons réalisé l'électrophorèse d'immuno-affinité en présence de concanavaline A (protocole décrit à la page 169) de la transferrine isolée du milieu de culture des cellules Hep G2 (Fig. 18 p. 100).

De très grandes différences de comportements électrophorétiques et d'affinité avec la lectine sont observées entre la transferrine synthétisée par les cellules Hep G2 et la sérotransferrine humaine. Cette dernière est séparée en trois fractions selon l'affinité pour la concanavaline A, comme cela a été précédemment démontré (SPIK, 1982; DEBRUYNE et al., 1983; 1984).

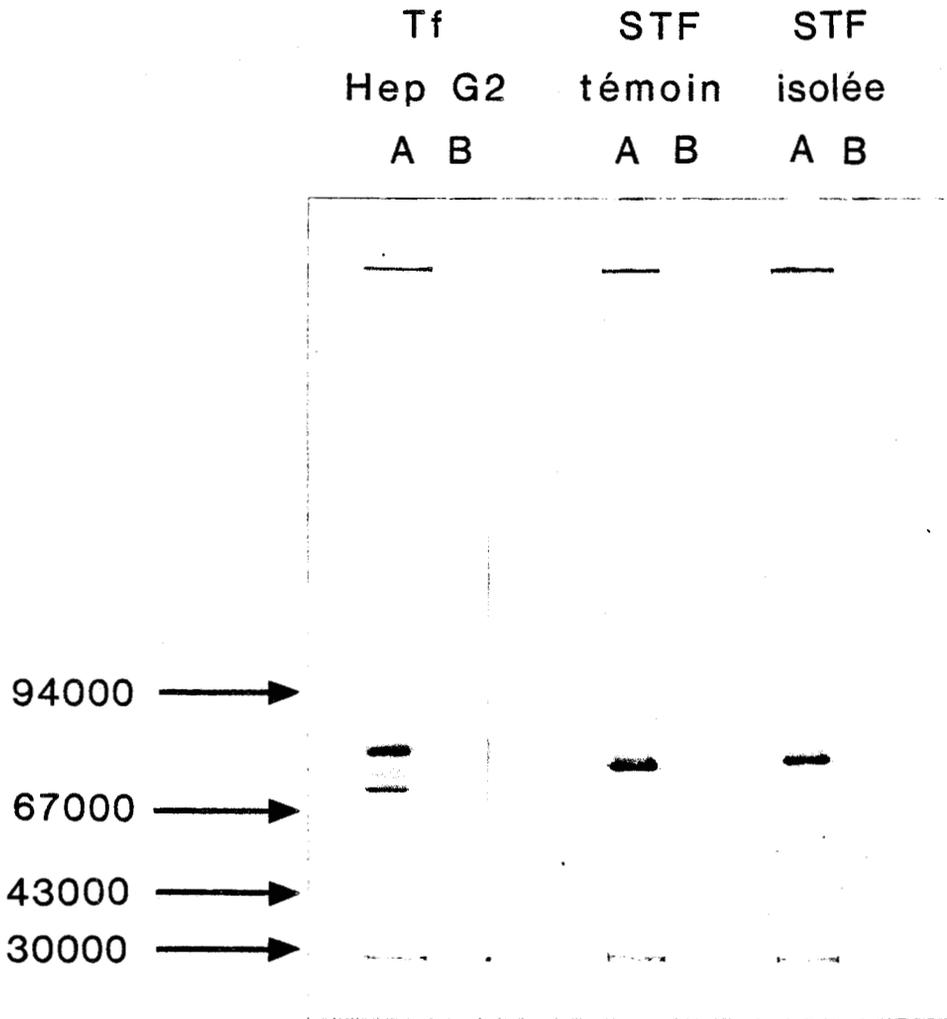


Figure 17 : Electrophorèse en gel d'acrylamide en gradient (5-15 %) de la transferrine isolée du milieu de culture des cellules Hep G2 (Tf Hep G2) et de la sérotransferrine isolée du sérum (STF isolée) par chromatographie d'affinité.

A : révélation du gel à l'Amidoschwartz

B : révélation immunologique après transfert sur nitrocellulose

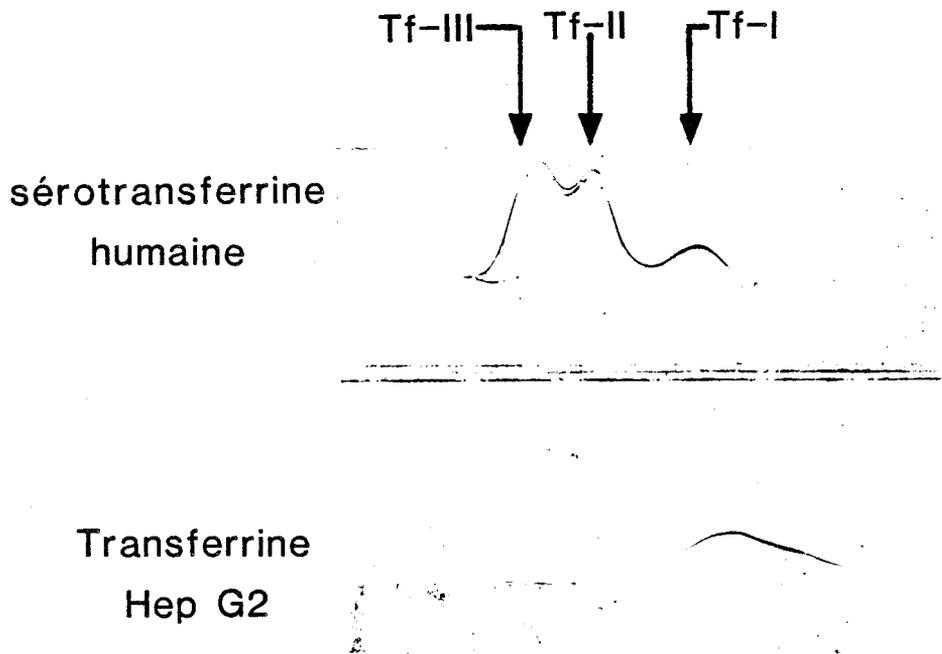


Figure 18 : Electrophorèse d'immuno-affinité bidimensionnelle en présence de concanavoline A dans la première dimension et en présence d'anticorps dirigés contre la sérotansferrine humaine dans la seconde dimension de la transferrine isolée des milieux de culture des cellules Hep G2 comparée à la sérotansferrine humaine

Par contre, la transferrine isolée du milieu de culture des cellules Hep G2 présente en électrophorèse d'immuno-affinité un profil très élargi avec une nette migration vers l'anode. La transferrine isolée se comporte donc comme un composé hétérogène n'interagissant pas avec la concanavaline A.

Ces résultats suggèrent d'une part une microhétérogénéité de la transferrine synthétisée par les cellules Hep G2, comme on l'a déjà remarqué en gel de polyacrylamide, et d'autre part, la présence de structures glycaniques triantennées voire même tétraantennées. De plus, nous pouvons dire que la transferrine isolée des milieux de culture des cellules Hep G2 ne semble pas posséder de glycanes de type biantenné.

c - Analyse de la chaîne polypeptidique de la transferrine isolée

Les arcs de précipitation formés au cours de la diffusion de la transferrine synthétisée par les cellules Hep G2 et de la sérotransferrine humaine contre un immunosérum anti-sérotransferrine humaine selon la méthode d'OUCHTERLONY, montrent que les protéines sont immunologiquement identiques puisque les arcs fusionnent complètement (Fig. 18 p.102).

Des résultats préliminaires concernant la structure primaire de ces deux transferrines montrent que leurs séquences peptidiques N-terminales sont identiques. En effet, l'analyse des acides aminés des parties N-terminales de la transferrine synthétisée par les cellules Hep G2 et de la sérotransferrine humaine par la dégradation d'Edman sur micro-analyseur * a permis de déterminer que les 15 premiers acides aminés sont identiques dans la partie N-terminale de ces deux protéines. Il semblerait donc que les chaînes peptidiques de ces deux transferrines présentent, comme toutes les transferrines, un pourcentage d'homologie élevé.

* Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur TARTAR, Laboratoire de Chimie des Biomolécules, Institut Pasteur, Lille, pour nous avoir effectué la séquence peptidique N-terminale de la transferrine synthétisée par les cellules Hep G2.

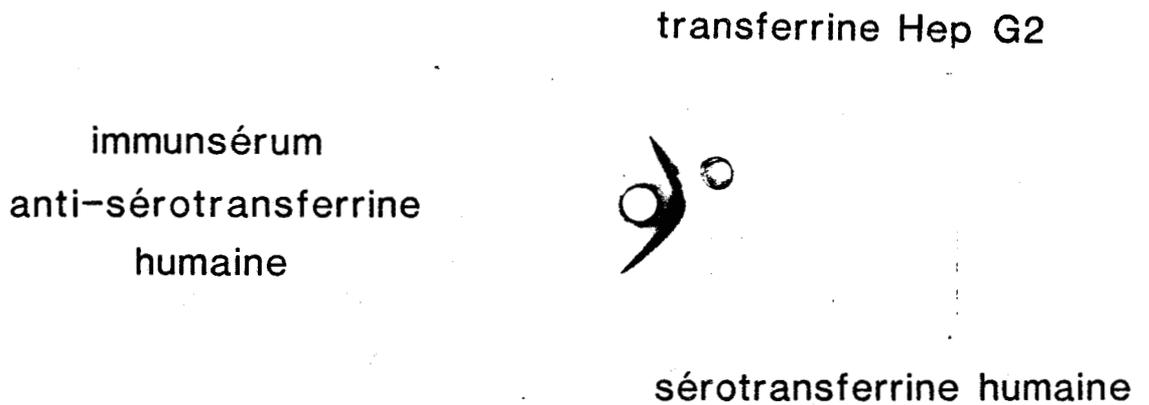


Figure 18 : Immuno-diffusion selon la méthode d'OUCHTERLONY de la transferrine isolée des milieux de culture des cellules Hep G2 et de la sérotransferrine humaine contre un immunsérum anti-sérotransferrine humaine

d - Déglycosylation enzymatique de la sérotransferrine humaine et de la transferrine synthétisée par les cellules Hep G2

Nous avons vu que la transferrine isolée du milieu de culture des cellules Hep G2 paraissait être identique du point de vue partie protéique à la sérotransferrine humaine. La microhétérogénéité observée en gel de polyacrylamide et en électrophorèse d'immuno-affinité bidimensionnelle semblerait donc être due essentiellement à une hétérogénéité liée à la présence des glycanes.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons déglycosylé la transferrine synthétisée par les cellules Hep G2 par la N-Glycanase selon le protocole décrit à la page 172.

Après action de la N-Glycanase, la sérotransferrine humaine et la transferrine Hep G2 sont analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS. Les résultats obtenus après l'action de l'enzyme sont représentés dans la figure 19 page 101.

La sérotransferrine humaine, après action de la N-Glycanase est décomposée en deux bandes d'intensité égale et de masse moléculaire apparente voisine de 78 000 et 75 000, inférieures à la masse moléculaire de la glycoprotéine totale (80 000 daltons environ). La sérotransferrine étant composée de deux glycanes dont le type biantenné est majeur, on peut supposer que la bande inférieure représente la sérotransferrine complètement déglycosylée alors que la bande supérieure représente la sérotransferrine partiellement déglycosylée (un seul glycanne enlevé). Cette hypothèse se justifie par le fait que la masse d'un glycanne de type biantenné est de l'ordre de 2200 daltons.

La transferrine Hep G2 présente initialement trois bandes de masse moléculaire 83 000, 78 000 et 75 000. Après action de la N-Glycanase, nous constatons la disparition des bandes à 83 000 et à 78 000 daltons mais apparition d'une bande très légèrement supérieure à 78 000 daltons.

Les conclusions que nous pouvons tirer de ces expériences de déglycosylation sont les suivantes : la transferrine Hep G2 présente une hétérogénéité liée à la présence des glycanes. La bande supérieure représente la transferrine possédant deux glycanes dont la structure serait polyantennée. L'action de la N-Glycanase induit une diminution de la masse moléculaire légèrement supérieure à 78 000,

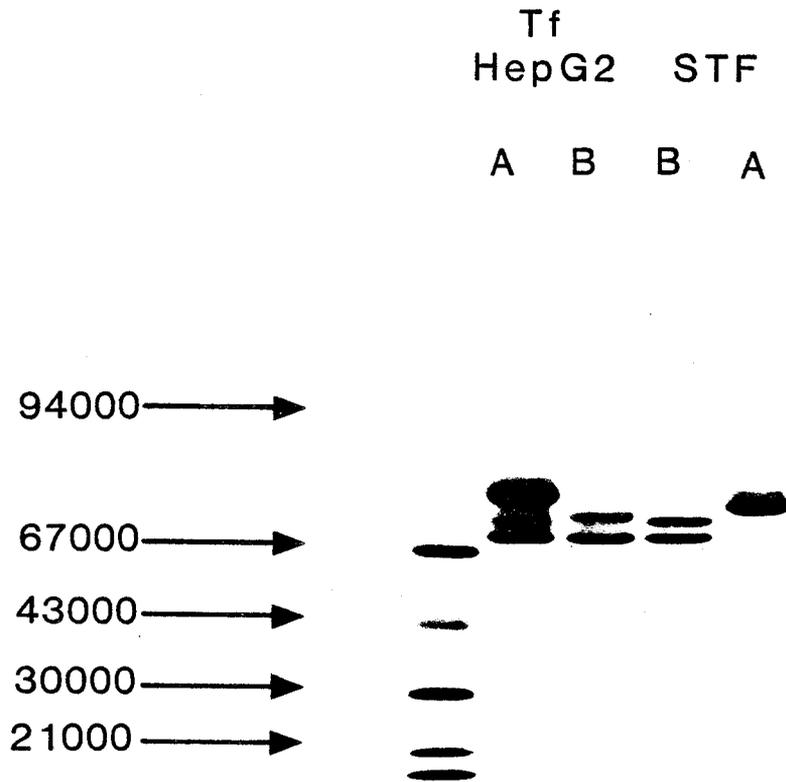


Figure 19 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS de la sérotransferrine humaine (STF) et de la transferrine synthétisée par les cellules Hep G2 (Tf Hep G2) avant l'action de la N-Glycanase (A) ou après l'action de la N-Glycanase (B).

laissant supposer qu'un seul glycanne a été libéré de la molécule de transferrine. La bande intermédiaire à 78 000 daltons a disparu, laissant supposer que la transferrine possède soit un seul glycanne, soit deux glycannes incomplets. La bande inférieure (75 000 daltons) semble être de la transferrine non glycosylée.

C - FRACTIONNEMENT DE LA TRANSFERRINE ISOLEE DES MILIEUX DE CULTURE DES CELLULES HEP G2

Dans le but de résoudre le problème de l'hétérogénéité de la transferrine isolée des milieux de culture des cellules Hep G2, nous avons tenté de la fractionner. Compte-tenu de la proximité des masses moléculaires des différents composés de la transferrine Hep G2, nous n'avons pas réussi à les séparer par tamisage moléculaire en HPLC.

Cependant, supposant une hétérogénéité au niveau des glycannes et donc au niveau du nombre d'acides sialiques, nous avons fractionné la transferrine Hep G2 par chromatographie d'échange d'ions.

1 - Fractionnement de la transferrine Hep G2 par FPLC sur colonne Mono Q HR-5

L'hétérogénéité, liée à la charge négative globale de la transferrine isolée des milieux de cultures des cellules Hep G2 a été mise en évidence par chromatographie d'échange d'ions sur colonne Mono Q HR-5 (groupements échangeurs : $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) par FPLC selon le protocole qui est décrit à la page 151.

La transferrine est résolue en 5 fractions éluées par un gradient discontinu en NaCl comme le montre la figure 20 page 106. Les pourcentages de chaque fraction, calculés sur une moyenne de 12 chromatographies par rapport à la quantité injectée de transferrine isolée du milieu de culture des cellules Hep G2, sont les suivants :

- fraction A : 7,4 ± 12 %
- fraction B : 2,8 ± 4 %
- fraction C : 48,5 ± 5,4 %
- fraction D : 22,5 ± 9,6 %
- fraction E : 12,1 ± 3,4 %.

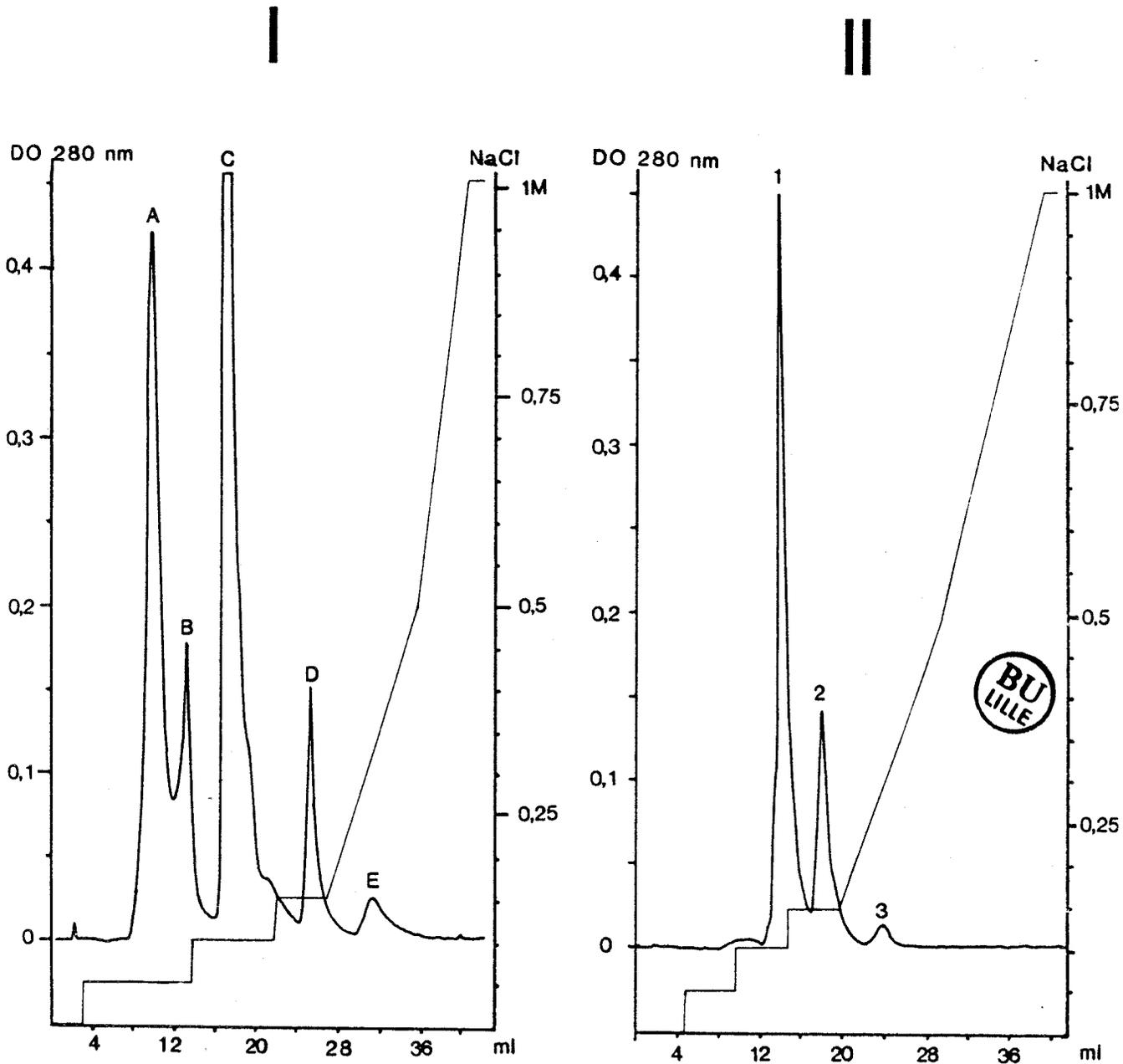


Figure 20 : Fractionnement en FPLC sur colonne mono Q HR-5 :

- transferrine isolée des milieux de culture des cellules Hep G2 : chromatogramme I

- transferrine isolée du sérum humain : chromatogramme II.

Tampon de départ : Tris-HCl, 50 mM pH 8,6

Tampon d'élution : tampon de départ + NaCl 1M

Débit : 1 ml/mn

Parallèlement, nous avons fractionné la transferrine humaine sérique dans les mêmes conditions. Le chromatogramme, représenté dans la figure 20 page 106, montre que la fraction C de la transferrine isolée des milieux de culture des cellules Hep G2 est éluée de la colonne comme le pic majeur de la sérotransferrine humaine, c'est-à-dire à une concentration de 0,1 M en NaCl.

La chromatographie d'échange d'ions sur colonne mono Q permet de séparer des fractions ayant des charges négatives totales différentes et il serait tentant de dire que les différentes fractions ont été séparées selon leur contenu en acides sialiques totaux.

2 - Electrophorèse d'immuno-affinité bidimensionnelle des différentes fractions de la transferrine isolée des milieux de culture des cellules Hep G2

Pour vérifier l'homogénéité des fractions de la transferrine isolée des milieux de culture des cellules Hep G2 obtenues après chromatographie d'échange d'ions, nous avons réalisé sur chacune des fractions des électrophorèses d'immuno-affinité bidimensionnelle en présence ou en absence de concanavaline A (protocole décrit à la page 169).

La présence de concanavaline A dans la première dimension ne produit pas de déplacement significatif dans la migration des différentes fractions de la transferrine isolée des milieux de cultures des cellules Hep G2. En effet, comme le montre la figure 21 page 108, la concanavaline A ne réagit pas avec les structures glycaniques des fractions A, B, C, D et E de la transferrine qui semblent être, cette fois, homogènes par rapport à la transferrine totale.

En absence de concanavaline A dans la première dimension, les différentes fractions migrent de la même façon qu'en présence de la lectine, ce qui indiquerait que les faibles différences de migration sont uniquement dues à une hétérogénéité du pHi de la protéine. En effet, si nous comparons leur migration par rapport à la sérotransferrine humaine, nous constatons que la mobilité électrophorétique des fractions A et B est légèrement inférieure à celle du variant Tf-I de la sérotransferrine humaine, suggérant une hyposialylation. La fraction C a la même mobilité que le variant Tf-I alors que

A

B



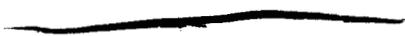
Transferrine Hep G2 fraction A



Transferrine Hep G2 fraction B



Transferrine Hep G2 fraction C



Transferrine Hep G2 fraction D

Figure 21 : Electrophorèse d'immuno-affinité bidimensionnelle des fractions obtenues après chromatographie d'échange d'ions de la transferrine isolée des milieux de culture des cellules Hep G2
A : en présence de concanavaline A dans la première dimension
B : en absence de concanavaline A dans la première dimension

la fraction D migre plus loin.

Nous pouvons donc conclure que les fractions de la transferrine synthétisée par les cellules Hep G2, n'interagissant pas avec la concanavaline A, possèdent des structures glycaniques polyantennées. Ces structures ne semblent pas être sialylées sur toutes les extrémités des chaînes oligosaccharidiques. De plus, contrairement à la sérotransferrine humaine, la transferrine synthétisée par les cellules Hep G2 ne possède pas de structure glycanique biantennée.

Ayant obtenu des fractions beaucoup plus homogènes, nous avons pu entamer la détermination des structures glycaniques des différentes fractions. Cependant, les fractions A, B, D et E étant minoritaires et en quantités insuffisantes, seule la fraction C a pu faire l'objet d'une étude structurale plus poussée.

D - ETUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES DES FRACTIONS DE LA TRANSFERRINE ISOLEE DES MILIEUX DE CULTURE DES CELLULES HEP G2

1 - Composition molaire en monosaccharides des différentes fractions de la transferrine isolée

Les compositions molaires en monosaccharides des différentes fractions de la transferrine Hep G2 ont été déterminées par chromatographie en phase gazeuse, après méthanolyse et triméthylsilylation selon le protocole décrit à la page 163. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau IV page 110.

La première remarque qui s'impose à la lecture de ce tableau est la présence de fucose en quantité non négligeable dans chacune des fractions obtenues, alors que la sérotransferrine humaine n'en possède pas. Ensuite, la présence de résidus d'acide neuraminique en quantité relativement faible est confirmée. D'autre part, nous constatons que ces quantités sont croissantes avec l'ordre d'élution des différentes fractions en chromatographie d'échange d'ions sur la colonne Mono Q.

La fraction A présente de faible quantité de galactose et de N-acétylglucosamine, suggérant la présence de glycanes incomplets.

TABLEAU IV

Composition molaire des monosaccharides présents dans les différentes fractions de la transferrine isolée des milieux de culture des cellules Hep G2 obtenues par chromatographie d'échange d'ions sur colonne Mono Q.

	MONOSACCHARIDES				
	Fuc	Man*	Gal	GlcNAc	Neu5Ac
Fraction A	0,35	3	1,09	2,52	0,28
Fraction B	1,67	3	3,62	3,03	0,70
Fraction C	2,15	3	3,59	4,44	1,30
Fraction D	1,80	3	3,98	5,02	2,00



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

Les fractions B et C présentent des quantités de galactose (3,62 et 3,69 résidus) et de N-acétylglucosamine (3,03 et 4,44 résidus) ne correspondant pas à des valeurs entières ce qui laisse supposer que les glycanes présents dans ces deux fractions ne possèdent pas des structures homogènes mais sont, en fait, un mélange de structures glycaniques de type triantenné et tétraantenné. La fraction C, étant la fraction majoritaire, nous avons pu calculer le pourcentage de sucres par rapport à la fraction protéique. Celui-ci a été évalué à 6,2 %. Il est légèrement supérieur à la sérotransferrine humaine, suggérant la présence de deux glycanes par molécule. Ce résultat a été confirmé par l'étude de la composition molaire en monosaccharides de la fraction C de la transferrine exprimée en résidus de monosaccharides par mole de protéine qui nous donne les valeurs suivantes: Fuc : 3,69 résidus; Man : 5,94 résidus; Gal : 5,98 résidus; GlcNAc : 8,88 résidus et Neu5Ac : 2,24 résidus. Ces résultats sont en faveur de la présence de deux glycanes fucosylés partiellement sialylés par molécule de transferrine.

Par contre, la fraction D renferme des monosaccharides dont les rapports molaires de 3,98 résidus pour le galactose et 5,02 résidus pour la N-acétylglucosamine seraient en faveur d'une structure tétraantennée possédant, de surplus, deux résidus de fucose.

2 - Détermination de la structure des glycanes de la fraction C

a - *Libération des glycanes de la fraction C par hydrolyse alcaline douce*

L'hydrolyse alcaline douce, selon la méthode de LEE et SCOCCA (1972) décrite page 164, de 5,7 mg de la fraction C de la transferrine isolée des milieux de culture des cellules Hep G2 nous a fourni, après toutes les étapes de dessalage, une quantité d'oligosaccharide-alditols voisine de 150 µg. La fraction C contenant de l'ordre de 6,2 % de sucres, le rendement de l'hydrolyse est proche de 50 %.

b - Analyse des dérivés méthylés des oligosaccharide-alditols composant la fraction C

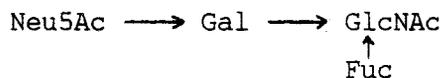
Les oligosaccharides de la fraction C libérés par hydrolyse alcaline selon LEE et SCOCCA (1972) puis N-réacétylés sont ensuite méthylés puis méthanolysés selon la méthode adaptée par FOURNET et al. (1981) et décrite page 166. Les éthers partiellement méthylés et acétylés sont analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Les proportions relatives des dérivés méthylés des oses neutres, des N-acétylglucosamines et de l'acide N-acétylneuraminique obtenues par intégration des pics des spectres de fragmentométrie sont rassemblées dans le tableau V page 113.

L'identification des dérivés 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-, 2,3,4-tri-O-méthyl- et 2,4,6-tri-O-méthylgalactose indique que les glycanes de la fraction C sont partiellement sialylés et que les résidus d'acide N-acétylneuraminique sont liés en (α 2-6) ou en (α 2-3) sur les résidus de galactose. La présence de 4,7,8,9-tétra-O-méthyl NeuAc est d'ailleurs confirmée mais en quantité relativement faible (0,85 résidu).

L'identification de trois dérivés di-O-méthylés du mannose (2,4; 3,4 et 3,6) en quantités importantes par rapport à celle du dérivé 3,4,6-tri-O-méthylmannose démontre que les oligosaccharide-alditols possèdent des structures glycaniques de type triantenné et tétraantenné avec une proportion plus importante pour ces dernières.

La présence de 2,15 résidus de fucose (voir tableau IV p. 110) et l'identification de 2,11 résidus de 6-mono-O-méthyl-N-acétyl glucosamine démontrent l'existence d'une séquence du type :



sur une ou deux branches des glycanes tri- ou tétraantennés. Cependant, compte tenu de la grande volatilité du résidu 2,3,4-tri-O-méthylfucose, la valeur obtenue (0,79 résidu) par analyse des dérivés perméthylés est plus faible que celle attendue.

De plus, l'identification de 3-mono-O-méthylmannose (0,43 résidu) permet de supposer qu'il existe également des structures glycaniques de type pentaantenné dans la fraction C.

TABLEAU V

Rapports molaires des dérivés méthylés des monosaccharides présents dans les oligosaccharides obtenus par hydrolyse alcaline de la fraction C de la transferrine Hep G2

Dérivés méthylés	Rapport molaire*
2,3,4-Tri-OMe-Fuc	0,79
2,3,4,6-Tétra-OMe-Gal	0,67
2,3,4-Tri-OMe-Gal	1,15
2,4,6-Tri-OMe-Gal	0,75
2-Mono-OMe-Man	0,02
3-Mono-OMe-Man	0,43
2,4-Di-OMe-Man	0,73
3,4-Di-OMe-Man	0,69
3,6-Di-OMe-Man	0,96
3,4,6-Tri-OMe-Man	0,17
3,6-Di-OMe-GlcNAcNMe	1,14
6-Mono-OMe-GlcNAcNMe	2,11
4,7,8,9-Tétra-OMe-NeuAc	0,85

* calculé sur la base de la somme de tous les dérivés méthylés du mannose égale à trois résidus de mannose

c - Analyse des oligosaccharide-alditols de la fraction C par résonance magnétique nucléaire à 400 MHz

Afin d'obtenir des renseignements complémentaires concernant la structure des glycanes, les oligosaccharide-alditols de la fraction C ont été étudiés en R.M.N. du proton à 400 MHz. L'échantillon est traité selon le protocole décrit page 163.

L'interprétation du spectre (Fig. 22 p. 115) ne permet pas d'établir une structure bien déterminée étant donné la complexité du mélange étudié. Tout au plus, nous pouvons donner quelques éléments structuraux. Le fait le plus marquant est l'absence de structures de type biantenné puisque les protons H-1 et H-2 des mannoses 3, 4 et 4', représentatifs de cette classe de composés sont absents ($\delta = 4,76, 5,12, 4,22, 4,94$ et $\delta = 4,25, 4,19$ et $4,11$, respectivement). Mais les déplacements chimiques des protons H-2 des mannoses 3, 4 et 4' ($\delta = 4,22, 4,22$ et $4,10$, respectivement) sont en faveur de structures de type tri- et tétraantenné; les structures triantennées étant les deux structures branchées en ($\beta 1-4$) ou en ($\beta 1-6$) puisqu'il existe deux protons anomériques pour le mannose 4' ($\delta = 4,942$ et $4,896$, respectivement). Ces résultats nous permettent donc de dire que la fraction C est constituée des oligosaccharide-alditols dont les structures sont identiques à celles des glycanes triantennés désialylés et du glycanne tétraantenné de la sérotransferrine humaine (Fig. 4 B et C p. 16).

La très grande hétérogénéité des oligosaccharide-alditols de la fraction C provient des substitutions périphériques par l'acide N-acétylneuraminique et le fucose. La présence d'au moins deux résidus de fucose liés en ($\alpha 1-3$) sur les N-acétylglucosamines 5' ou 7 ou 7' est démontrée par les déplacements chimiques des groupements méthyl et du proton anomérique ($\delta = 1,171$ et $1,173$ et $\delta = 5,127$, respectivement). Il existe également une très faible proportion de fucose lié en ($\alpha 1-6$) sur le N-acétylglucosaminitol. Ceci est démontré par la résonance du méthyl à $\delta = 1,224$.

Quant à l'acide N-acétylneuraminique, nous pouvons dire qu'il est lié en ($\alpha 2-3$) et en ($\alpha 2-6$) sur les résidus de galactose ($\delta_{H-3ax} = 1,798$ et $1,717$ et $\delta_{H-3eq} = 2,762$ et $2,673$, respectivement) et que ces deux types de liaison existent dans un rapport 1 : 1. A la vue de

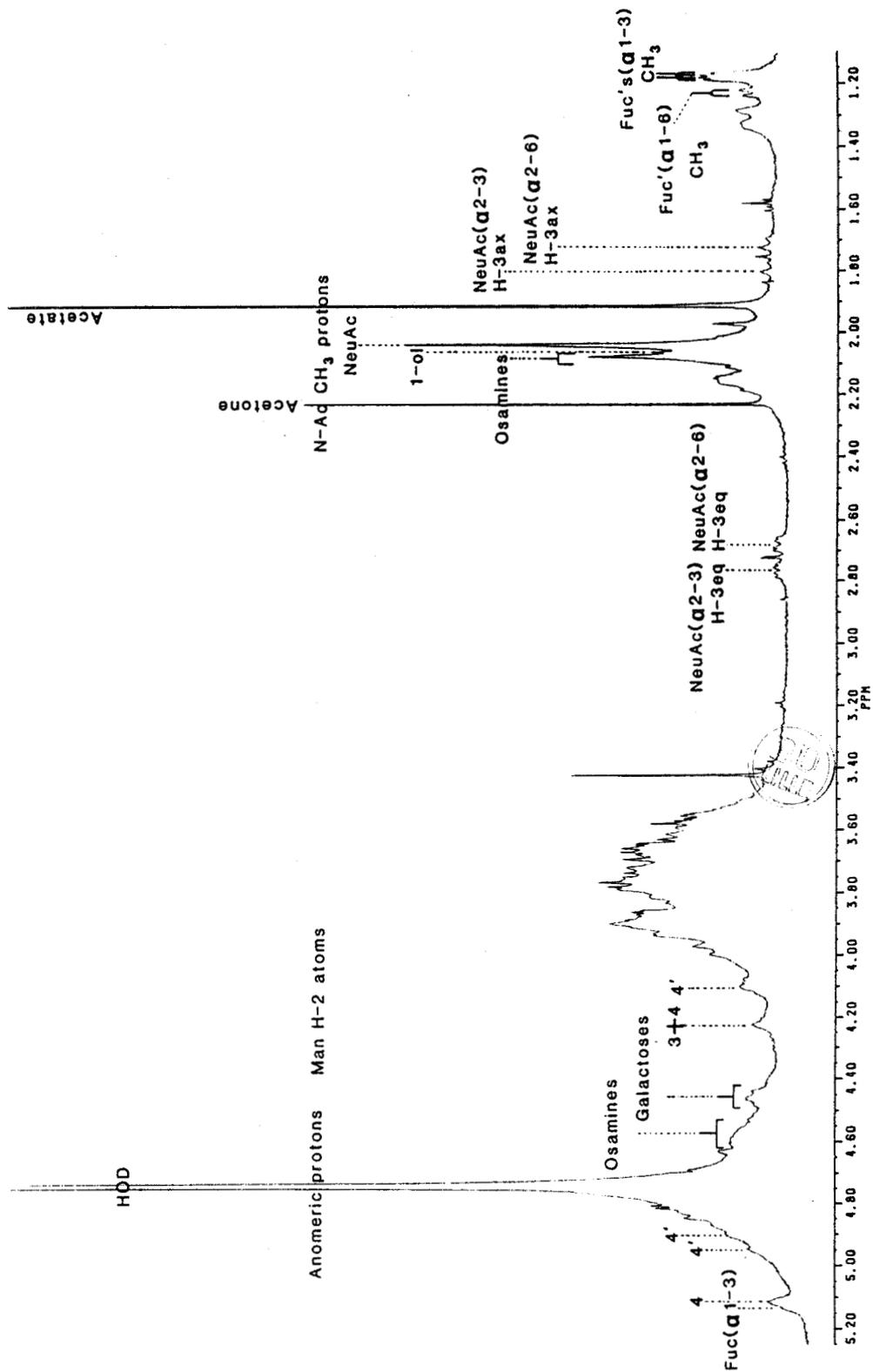


Figure 22 : Spectre de résonance magnétique nucléaire à 400 MHz des oligosaccharide -alditols composant la fraction C de la transferrine Hep G2.

l'intensité du groupement acétamido ($\delta = 2,031$), nous pouvons affirmer qu'au moins trois résidus d'acide N-acétylneuraminique sont présents.

En conclusion, vu la très grande complexité du mélange analysé, nous ne pouvons pas donner de structures bien établies. En effet, aucune information ne peut être tirée de l'analyse des zones de résonance des protons anomériques des galactoses et des N-acétylglucosamines et des groupements acétamido de ces dernières. Les quelques éléments déduits de l'interprétation du spectre de RMN du protons des oligosaccharide -alditols de la fraction C nous permettent de proposer l'hypothèse suivante : les oligosaccharide -alditols de la fraction C renferment des structures glycaniques de type tri-, tétra- et pentaantenné avec un grand nombre d'isomères mono-, di-, tri- ou tétrasialylés et mono-, di-, tri- ou tétrafucosylés. Ces structures simplifiées sont représentées dans les figures 23, 24 et 25 pages 117, 118 et 119.

E - DISCUSSION - CONCLUSION

La fraction majeure de la transferrine synthétisée par les cellules Hep G2 renferme deux glycanes N-acétyllactosaminiques qui peuvent être de type tri-, tétra- ou pentaantenné. De plus, ces glycanes renferment en moyenne deux résidus de fucose liés en ($\alpha 1-3$) sur les résidus de N-acétylglucosamine des antennes et sont partiellement sialylés, indifféremment en ($\alpha 2-3$) et en ($\alpha 2-6$) sur les résidus de galactose terminaux. Alors que les glycanes biantennés représentent la majorité des glycanes de la sérotransferrine humaine, ils sont absents de la transferrine synthétisée par les cellules Hep G2.

Il est maintenant bien connu que les glycanes des glycoprotéines membranaires des cellules cancéreuses ont subi de profondes modifications. Celles-ci concernent essentiellement les N-glycosylprotéines dont la proportion des glycanes N-acétyllactosaminiques de type tri- et tétraantenné augmente de façon très nette au détriment des structures biantennées (voir la revue générale de SMETS et VAN BEEK, 1984). Cette augmentation des structures tri- et

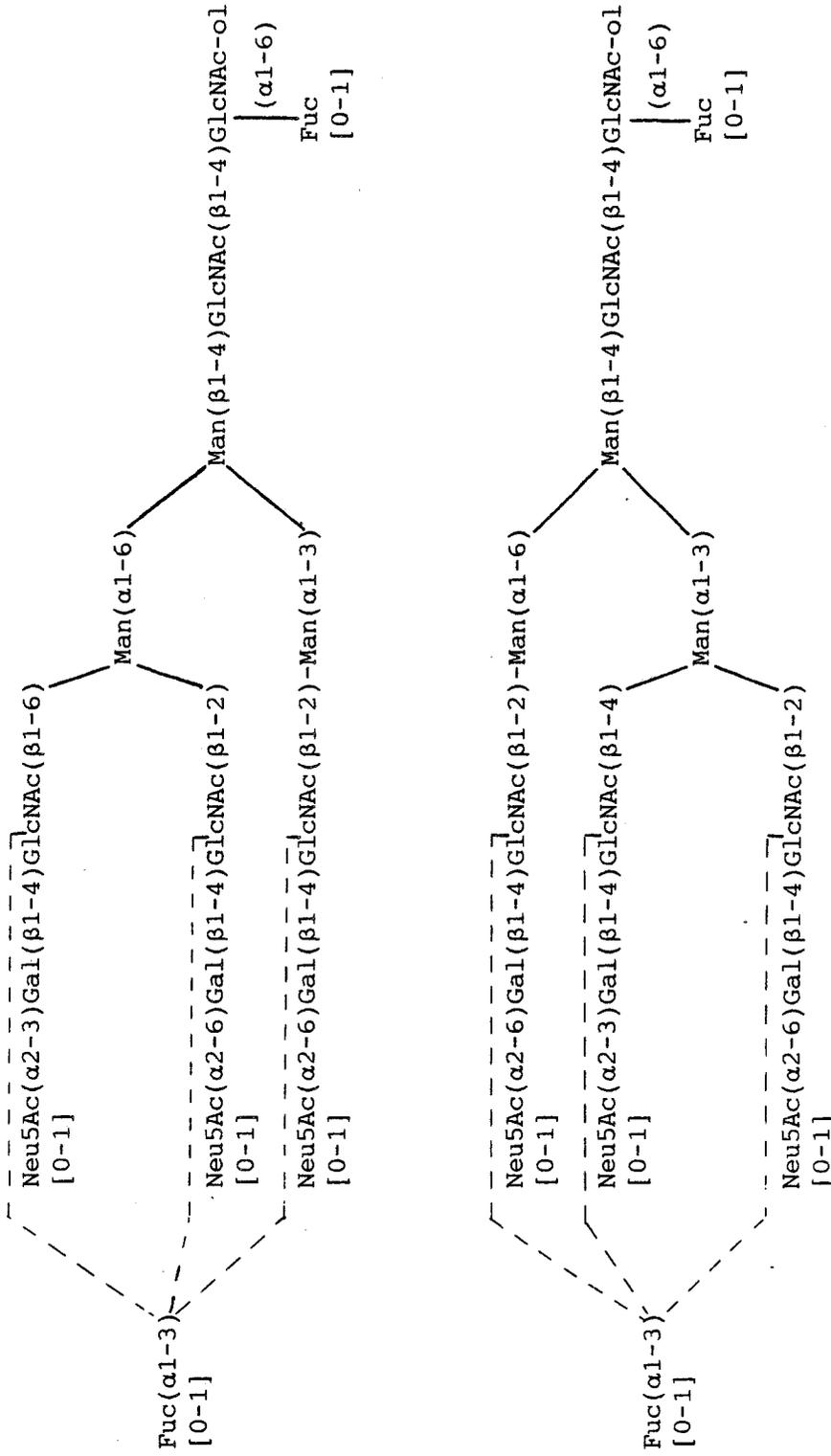


Figure 23 : Propositions de structure des glycanes triantennés fucosylés de la fraction C de la transferrine isolée des milieux de culture des cellules Hep G2

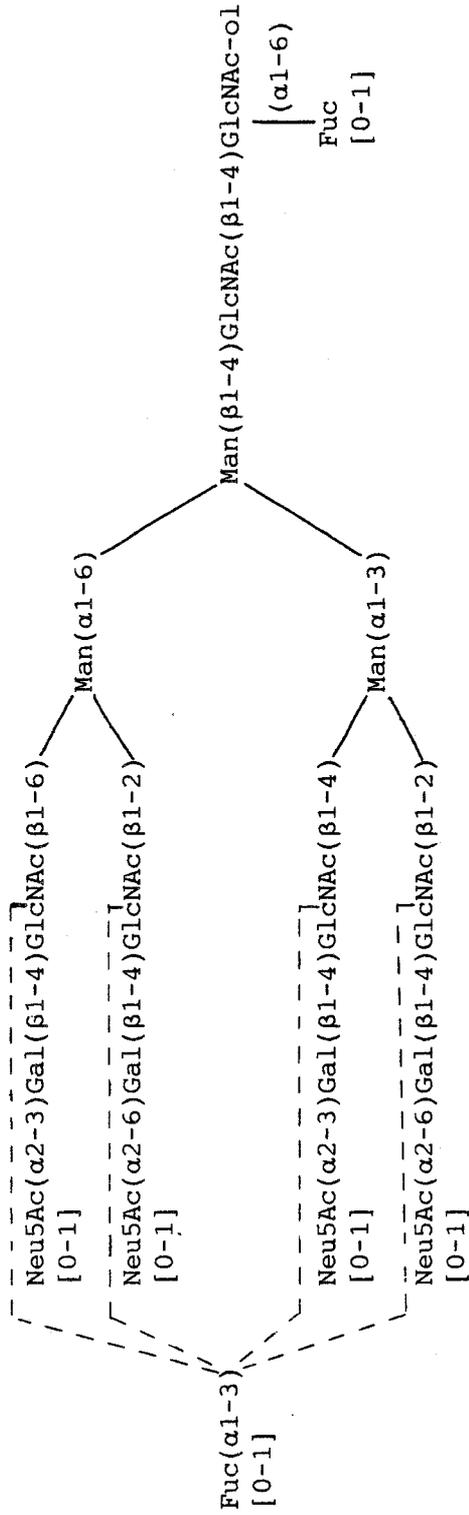


Figure 24 : Propositions de structure des glycanes tétraantennés fucosylés de la fraction C de la transferrine isolée des milieux de culture des cellules Hep G2

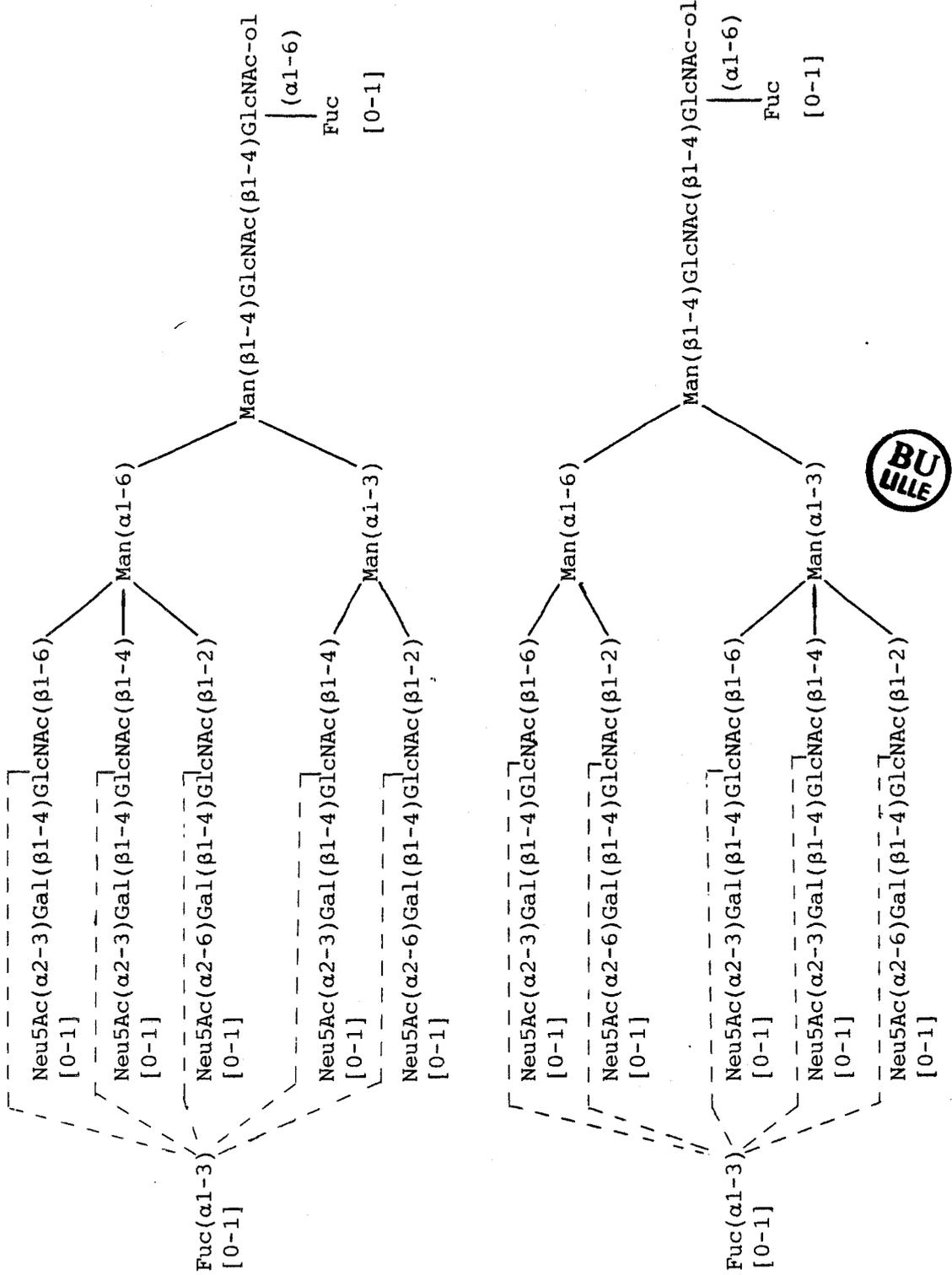


Figure 25 : Propositions de structure des glycanes pentaantennés fucosylés de la fraction C de la transferrine isolée des milieux de culture des cellules Hep G2

tétraantennées est en étroite corrélation avec le degré de transformation de la cellule (DEBRAY et al., 1986).

Cependant, il faut noter que ces études ont rarement été réalisées sur des glycoprotéines synthétisées et secrétées par des cellules transformées. L'inversion du rapport glycannes tri- + tétraantennés / glycannes biantennés a été observé pour la fibronectine (DELANNOY et al., 1985). Un grand nombre de glycoprotéines secrétées par des cellules en culture sont sulfatées, soit au niveau des résidus de tyrosine, soit au niveau des oligosaccharides N-acétyllactosaminiques (HORTIN et al., 1986). Mais, l'utilisation de méthodes chimiques telles que l'hydrazinolyse ou l'utilisation de bases fortes détruisent généralement les liaisons esters sulfates des glycannes (FREEZE et VARKI, 1986).

Des modifications de glycosylation des glycoprotéines ont aussi été observées de nombreuses fois lors de maladies diverses. C'est le cas de la sérotransferrine humaine de patients atteints d'hépatite virale (SPIK et al., 1983), des IgM dans la maladie de Waldenstrom (CAHOUR et al., 1983), de l' α_1 -glycoprotéine acide purifiée de liquide d'ascite de sujets cirrhotiques (BIOU et al., 1987) et des glycoprotéines spécifiques de la phase aiguë de l'inflammation secrétées par les cellules Hep G2 (ALM et ERIKSSON, 1986). Dernièrement, MACKIEWICZ et al. (1987) ont montré que, suite à un processus inflammatoire, les monokines libérées induisaient une augmentation du rapport glycannes biantennés / glycannes triantennés des glycoprotéines de la phase aiguë secrétées par une lignée cellulaire d'hépatocarcinome en culture (cellules Hep 3B).

Les glycannes présents sur la molécule de transferrine synthétisée par les cellules Hep G2 présentent un degré de branchement élevé. Différentes causes peuvent expliquer cette hyperglycosylation de la transferrine. D'une part, les cellules proviennent d'un hépatocarcinome et sont établies en lignée continue. D'autre part, la présence indispensable de sérum de veau fœtal dans le milieu peut influencer la régulation de la glycosylation des glycoprotéines secrétées.

III - INTERACTIONS DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE AVEC LES RECEPTEURS MEMBRANAIRES DES CELLULES HEP G2

Ces modifications importantes dans la répartition des variants au cours de la cirrhose ont amené DEBRUYNE (1983) à tenter de définir le rôle des glycanes dans l'interaction des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine les récepteurs des réticulocytes de Lapin.

Ces études étant réalisées en système hétérologue (sérotransferrine humaine - cellules de Lapin), nous avons repris ces études en système homologue. Pour ce faire, nous avons choisi les cellules Hep G2, déjà implantées au Laboratoire. Les cellules Hep G2 sont considérées comme étant l'une des lignées cellulaires d'hépatome humain la mieux définie et possèdent un grand nombre de récepteur de la sérotransferrine (CIECHANOVER et al., 1983 a; b). L'utilisation de cette lignée cellulaire a permis, comme nous l'avons vu dans le chapitre des généralités, de faire de nombreux progrès dans l'étude de la structure du récepteur de la sérotransferrine et la compréhension du mécanisme de l'endocytose.

Ayant isolé de faibles quantités de transferrine synthétisée par les cellules Hep G2 et celles-ci ayant été utilisées pour la détermination de la structure de ses glycanes, nous avons réalisé l'étude de l'interaction des différents variants de la sérotransferrine humaine avec les récepteurs membranaires des cellules Hep G2 .

A - INTERACTIONS DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE AVEC LES CELLULES HEP G2

Les cellules Hep G2 ($0,6 \times 10^6$ cellules par puits) sont incubées avec 0,4 ml de milieu contenant des concentrations croissantes, variant de 40 ng à 2,5 μ g de chacun des variants glycaniques de la sérotransferrine selon le protocole décrit page 160.

La fixation des variants transferriniques Tf-III, Tf-II et Tf-I sur le récepteur membranaire des cellules Hep G2 est représenté dans

la figure 26 A,B,C page 123. Pour les trois variants, la saturation de la fixation est obtenue à une concentration de l'ordre de 3 µg/ml. L'analyse des représentations de Scatchard (Fig. 26 D,E,F p. 123), tirée des courbes de saturation montre une population homogène de sites de haute affinité pour chacun des trois variants de la sérotransferrine. Cependant, les constantes apparentes de fixation K_a , calculées d'après trois expérimentations, ne sont pas identiques pour chacun des variants de la sérotransferrine: Nous observons que les valeurs de K_a diminuent avec l'augmentation du nombre de structures glycaniques de type triantenné présentes sur la molécule de sérotransferrine :

- variant Tf-III : $1,5 \pm 0,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$
- variant Tf-II : $1,0 \pm 0,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$
- variant Tf-I : $0,6 \pm 0,15 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$

Ces différences d'affinité constatées ne sont pas énormes mais la répétitivité des résultats obtenus laissent penser qu'elles sont effectives.

Le nombre de sites spécifiques de fixation calculé pour le variant Tf-III est de l'ordre de $1,1 \pm 0,4 \times 10^5$ sites par cellule et est identique pour les variants Tf-II et Tf-I : $1,5 \pm 0,3 \times 10^5$ sites par cellule.

B - DISCUSSION

Les résultats concernant la fixation des variants de la sérotransferrine humaine sur les cellules Hep G2 sont en accord avec ceux de la littérature. La constante apparente d'association déterminée pour la sérotransferrine totale est de l'ordre de $1,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (CIECHANOVER et al., 1983a) et le nombre de sites de fixation de la sérotransferrine à la surface de la cellule a été estimé à 50 000 sites (CIECHANOVER et al., 1983b). Parallèlement, la cellule posséderait 100 000 sites intracellulaires.

Les différences d'affinité relatives à la fixation des variants de la sérotransferrine sur son récepteur spécifique, à la surface des hépatocytes en culture, sont similaires à celles que nous avons obtenu avec les membranes du syncytiotrophoblaste du placenta humain. DEKKER

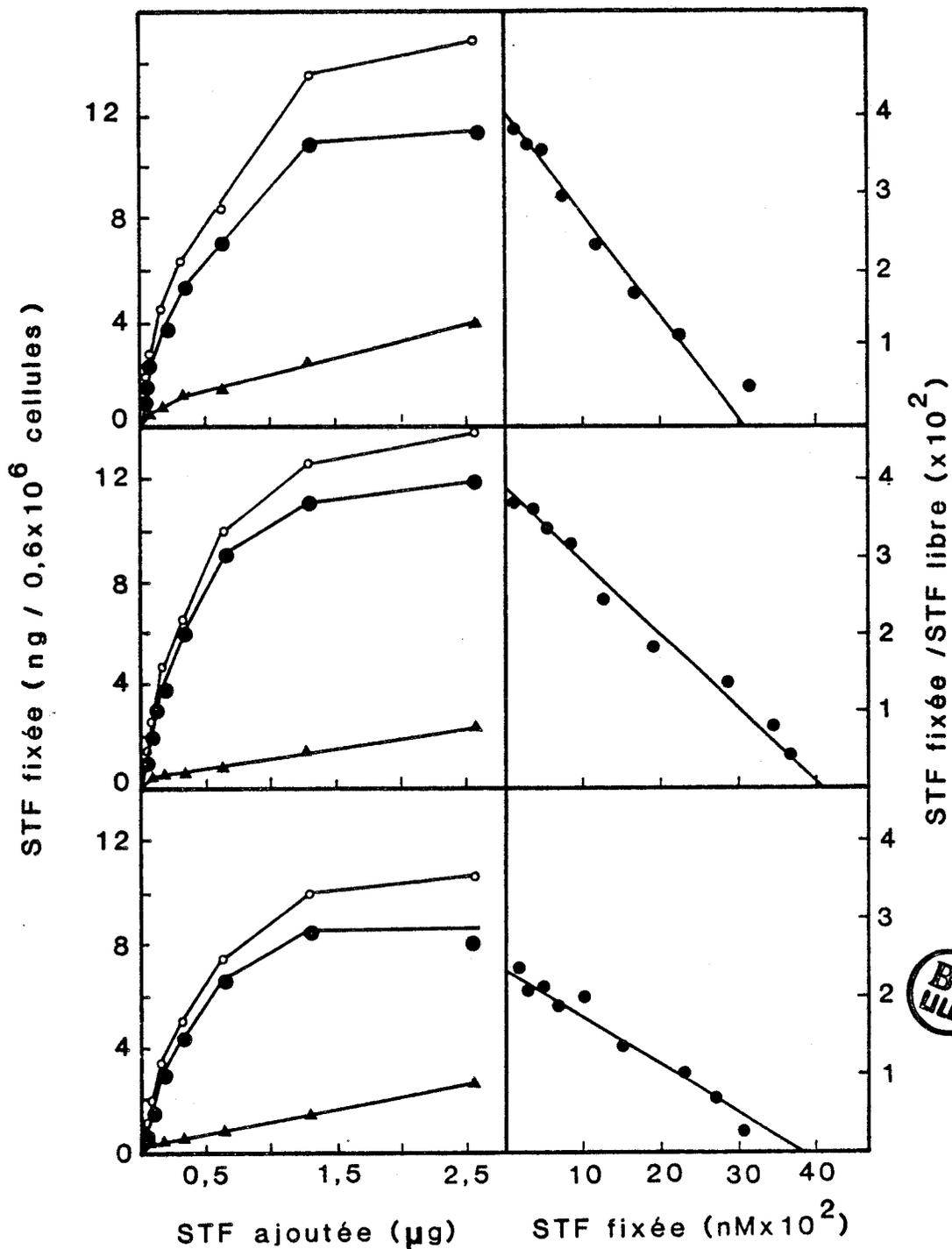


Figure 26 : Interaction des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine avec les cellules Hep G2 (A : variant Tf-III; B : variant Tf-II et C : variant Tf-I). $0,6 \times 10^6$ cellules sont incubées avec $400 \mu\text{l}$ de DMEM contenant des quantités croissantes des variants marqués à l' ^{125}I .

Fixation totale (o). Fixation non-spécifique (\blacktriangle) réalisée en présence de 100 excès molaire de sérotransferrine non radioactive. Fixation spécifique (\bullet).

D, E et F : représentation de Scatchard déduites de trois expériences de fixation A, B et C, respectivement.

et al. (1984, 1985), travaillant en système hétérologue, sérotransferrine humaine - réticulocytes de Rat ou hépatocytes de Rat, concluent que les structures glycaniques de la sérotransferrine ne sont pas directement impliquées dans la reconnaissance et la fixation de la glycoprotéine sur son récepteur spécifique. Par contre, des expériences réalisées en présence de sérotransferrine désialylée montrent une augmentation de l'incorporation du fer en système hétérologue, dépendante du nombre de résidus de galactose terminaux exposés, et est expliquée par la présence du récepteur des asialoglycoprotéines. En système homologue, le fer serait uniquement incorporé par le récepteur de la sérotransferrine.

Récemment, LEGER (1987) a montré que la déglycosylation enzymatique de la sérotransferrine de Lapin n'influe aucunement la reconnaissance et la fixation de la protéine sur le réticulocyte de Lapin et l'incorporation du fer dans les cellules.

C - CONCLUSION

Les conclusions que nous pouvons tirer de ces travaux sont donc que la nature des glycannes n'affecte pas la reconnaissance cellulaire de la sérotransferrine sialylée. Cependant, la diminution de l'affinité en relation avec l'augmentation du nombre de structures glycaniques de type triantenné pourrait provenir de l'encombrement stérique de ce type de glycanne, induisant de légères modifications de la conformation de la partie protéique de la sérotransferrine.

La question de la signification biologique de l'augmentation des variants triantennés de la sérotransferrine humaine lors d'atteintes hépatiques ou au cours de la grossesse reste entière. S'il n'ont pas une fonction biologique précise dans la reconnaissance du récepteur de la sérotransferrine ou dans l'incorporation cellulaire du fer, nous pouvons penser que leur présence ne serait due qu'à des modifications de la régulation de la glycosylation par différents facteurs dont la nature reste encore inconnue.

CONCLUSIONS

GENERALES

CONCLUSIONS GENERALES

Les travaux, dont nous rapportons les résultats dans ce mémoire, font suite à ceux réalisés par DEBRUYNE (1983) et DEBRUYNE et al. (1984) qui ont mis en évidence l'existence de trois variants glycaniques de la sérotransferrine humaine par chromatographie d'affinité sur concanavaline A et ont précisé la structure des deux glycannes N-acétyllactosaminiques de type triantenné (SPIK et al., 1985). D'autre part, l'analyse de sérums d'individus cirrhotiques leur a permis de mettre en évidence une modification de la répartition des trois variants glycaniques de la sérotransferrine, notamment une augmentation des variants portant des structures glycaniques triantennées.

Dans le but de poursuivre ces études, nous avons élargi les recherches sur la modification de la répartition des variants glycaniques de la sérotransferrine et analysé des sérums de Femmes à divers stades de la grossesse. Le foie étant l'organe qui synthétise la majorité de la sérotransferrine plasmatique, nous avons étudié la répartition des variants glycaniques de la transferrine synthétisée d'une part, par des hépatocytes établis en co-cultures avec des cellules épithéliales de foie et d'autre part, par des hépatocytes provenant d'un hépatocarcinome humain établi en lignée continue. Le rôle des glycannes triantennés a été envisagé dans l'interaction des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine avec son récepteur au niveau des membranes du syncytiotrophoblaste du placenta humain et au niveau des hépatocytes humains en culture.

Les conclusions que nous pouvons tirer de nos travaux sont les suivantes :

- 1 - Nous avons amélioré la préparation par chromatographie d'affinité sur colonne de concanavaline A-Sépharose des trois variants

glycanniques de la sérotransferrine humaine : en saturant la colonne d'affinité par le variant Tf-III, il est maintenant possible d'obtenir le variant Tf-II en une seule étape.

2 - La chromatographie d'affinité sur colonne de concanavoline A des glycopeptides pronasiques des trois variants glycanniques de la sérotransferrine humaine et l'étude de la structure de leurs glycannes par méthanolyse et méthylation a permis de confirmer que le variant Tf-II porte un glycanne de type biantenné et un glycanne de type triantenné sur la même chaîne polypeptidique. Ces résultats permettent de lever l'ambiguïté concernant l'existence de ce variant.

3 - L'étude des modifications de la répartition des trois variants glycanniques de la sérotransferrine humaine a été étudiée par électrophorèse d'immuno-affinité bidimensionnelle des sérums de femmes enceintes.

Au cours de chacun des trois trimestres de la grossesse, nous avons constaté que l'augmentation de la concentration en sérotransferrine plasmatique est essentiellement liée à l'augmentation du taux des variants Tf-I et Tf-II, portant respectivement deux et un glycannes triantennés. Comparativement, l'analyse de sérums de donneurs volontaires montre que l'augmentation de la concentration en sérotransferrine plasmatique est liée exclusivement à une variation du taux du variant Tf-III, portant deux glycannes biantennés.

4 - Les études réalisées sur la transferrine synthétisée par des hépatocytes normaux en co-culture avec des cellules épithéliales de foie, en présence d'hydrocortisone, montrent une augmentation des structures triantennées et une diminution des structures biantennées de la transferrine synthétisée par ces hépatocytes.

5 - Nous avons étudié la structure des glycannes de la transferrine synthétisée et sécrétée par des hépatocytes provenant d'un hépatocarcinome humain établis en lignée continue, les cellules Hep G2 :

a - Nous avons isolé la transferrine du milieu de culture des cellules Hep G2, en une seule étape, par chromatographie

d'immuno-affinité. Cette méthode permet d'isoler la sérotransferrine du sérum avec un rendement de l'ordre de 90 %.

b - La transferrine isolée du milieu de culture des cellules Hep G2 est immunologiquement identique à la sérotransferrine humaine et de plus possède la même séquence peptidique N-terminale.

c - Par électrophorèse en gel d'acrylamide, nous avons mis en évidence une hétérogénéité de la transferrine isolée du milieu de culture des cellules Hep G2, confirmée par électrophorèse d'immuno-affinité bidimensionnelle en présence de concanavoline A et par chromatographie d'échange d'ions (FPLC).

d - Cette hétérogénéité est essentiellement liée à la structure des glycanes de la transferrine synthétisée par les cellules Hep G2. La transferrine n'interagit pas avec la concanavoline A, suggérant l'absence de glycanne biantenné et la présence de glycanes polyantennés.

e - L'étude des oligosaccharides libérés de fraction majeure de la transferrine synthétisée par les cellules Hep G2, par méthanolyse, méthylation et résonance magnétique nucléaire a permis de déterminer que les glycanes étaient de type N-acétyllactosaminique triantenné, tétraantenné et même pentaantenné. De plus, contrairement à la sérotransferrine humaine, les glycanes portent statistiquement deux résidus de fucose liés en (α 1-3) sur les résidus de N-acétylglucosamine des antennes. Leurs positions exactes restent à être déterminées. Un résidu de fucose lié en (α 1-6) sur la N-acétylglucosamine du point d'attache a aussi été mis en évidence. Ces structures sont partiellement sialylées en (α 2-3) et (α 2-6) sur les résidus de galactose terminaux.

6 - Afin de justifier la signification biologique de l'augmentation du taux des variants contenant des structures glycaniques triantennées et compte tenu des besoins importants en fer du foetus au cours de la gestation, nous avons étudié le rôle que pourrait avoir les glycanes dans la reconnaissance et l'interaction de chacun des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine

avec les membranes de la bordure en brosse du syncytium trophoblastique du placenta humain et nous avons recherché la présence éventuelle d'un récepteur de type lectinique reconnaissant principalement les résidus d'acide N-acétylneuraminique en position terminale des structures glycaniques triantennées.

Nous avons montré par électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de détergents non découplants, suivi d'un transfert électrophorétique et révélation immunologique et autoradiographique, que les récepteurs placentaires de la sérotransferrine sont saturés en ligand endogène et que la sérotransferrine fixée est facilement déplacée par chacun de ses variants glycaniques. Nous avons donc conclu à la présence d'un seul type de récepteur, le récepteur de la sérotransferrine, excluant la présence d'un récepteur de type lectinique reconnaissant les résidus d'acide N-acétylneuraminique terminaux des structures glycaniques de la sérotransferrine.

7 - L'analyse des représentations de Scatchard, tirées des études de fixation des différents variants de la sérotransferrine sur les récepteurs des membranes du syncytiotrophoblaste du placenta montre que les constantes apparentes d'affinité des variants Tf-III, Tf-II et Tf-I diminuent d'un facteur 2 à 3 en relation avec l'augmentation du nombre de structures glycaniques triantennées du variant considéré.

Nous pouvons conclure que cette diminution d'affinité est en relation avec l'encombrement stérique des glycanes triantennés comparé à celui des glycanes biantennés, entraînant soit un masquage partiel de la partie peptidique reconnaissant le récepteur, soit de légères modifications de la conformation de la chaîne peptidique dues à la présence de la troisième antenne.

8 - Nous avons élargi l'étude de l'interaction des variants glycaniques de la sérotransferrine aux récepteurs d'hépatocytes humains établis en lignée continue (cellules Hep G2).

Nous avons retrouvé les mêmes différences d'affinité que sur les récepteurs placentaires, de même en système hétérologue sérotransferrine humaine - hépatocytes de Rat (expériences non décrites dans ce mémoire).

9 - Nous pouvons donc conclure que les glycanes et la nature des glycanes ne participent pas à la reconnaissance de la sérotransferrine sialylée. La question de la signification biologique de l'augmentation des structures glycaniques de la sérotransferrine dans les atteintes hépatiques et au cours de la grossesse reste entière.

10 - La détermination de la structure des glycanes de la transferrine synthétisée par les cellules Hep G2 permet de montrer que le système de régulation de la glycosylation de cette lignée cellulaire est complètement différent de celui des hépatocytes normaux. Par conséquent, il serait intéressant d'étudier l'influence de certains facteurs sur la régulation de la glycosylation de la transferrine. Les cellules Hep G2 ne représentant pas le modèle idéal pour réaliser cette étude du fait de l'hyperglycosylation de la transferrine excrétée dans le milieu, la suite de nos travaux devra tout d'abord consister à rechercher une souche d'hépatocytes synthétisant de la transferrine portant essentiellement des glycanes biantennés.

11 - Il serait intéressant de poursuivre les études concernant la structure des glycanes de la transferrine synthétisée par les cellules Hep G2. Actuellement, l'isolement de quantités importantes de transferrine est en cours afin de permettre une étude structurale plus complète des autres variants de la transferrine et l'isolement, structure par structure, des glycanes de la fraction majeure de la transferrine Hep G2.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- AASA, R. et AISEN, P. (1968) *J. Biol. Chem.*, 243, 2399-2404
- AISEN, P., AASA, R., MALMSTROM, B. et WANNGARD, T. (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 2484
- AISEN, P. et BROWN, E.B. (1977) *Semin. Haematol.*, 14, 31-53
- AISEN, P. et LEIBMAN, A. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, 257, 314-323
- AISEN, P. et LISTOWSKY, I. (1980) *Annu. Rev. Biochim.*, 49, 357-393
- ADEN, D.P., FOGEL, A., DAMJANOV, I., PLOTKIN, S. et KNOWLES, B.B. (1979) *Nature*, 282, 615-617
- ALEVIZOU-TERZAKI, V., GYFTAKI, H., VRETTOS, A.S., KESSE-ELLIAS, M. et MAVRIKAKIS, M. (1974) *Acta Haematol. Basel*, 45, 232-234
- ALM, R. et ERIKSSON, S. (1986) *FEBS Lett.*, 190, 157-160
- ANDERSON, B.F., BAKER, H.H., DODSON, E.J., NORRIS, G.E., RUMBALL, S.V., WATERS, J.M. et BAKER, E.N. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 1769-1773
- ANDREIS, P.G., WHITFIELD, J.F. et ARMATO, U. (1981) *Exp. Cell Res.*, 134, 265-272
- ANDUS, T., GROSS, V., TRAN-THI, T.A., SCHREIBER, G., NAGASHIMA, M. et HEINRICH, P.C., (1983) *Eur. J. Biochem.*, 133, 561-571
- ARMATO, U. et ANDREIS, P.G. (1983) *Life Sci.*, 33, 1745-1755
- ARONSON, N.N. et TOUSTER, O. (1974) *Meth. Enzymol.*, 31, 90-103
- AUBERT, J.P., BISERTE, G. et LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. (1976) *Arch. Biochim. Biophys.*, 175, 410-418
- AZARI, D. et BAUGH, R.F., (1967) *Arch. Biochim. Biophys.*, 118, 138-144
- BAILEY, S., JHOTI, H., GARRATT, R., GORINSKY, B., LINDLEY, P., SARRA, R. et EVANS, R. (1987) VIII^{ème} Colloque International sur les protéines de transport et d'emmagasinage du fer, Québec, Canada, p.3
- BAKER, E., MAC ARDLE, H.J. et MORGAN, E.H. (1985) in "Proteins of iron storage and transport", (G. Spik, J. Montreuil, R.R. Crichton et J. Mazurier, eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 131-142
- BATES, G.W. et SCHLABACH, M.R. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 3228-3232

- BATES, G.W., WORKMAN, E.F. et SCHLABACH, M.R. (1973) Biochim. Biophys. Res. Commun., 50, 84-90
- BAUER, H.C., PARENT, J.B. et OLDEN, K. (1985) Biochim. Biophys. Res. Commun., 128, 368-375
- BAYARD, B. et FOURNET, B. (1975) Carbohydr. Res., 46, 75-86
- BAYARD, B. et KERKAERT, J.P. (1980) Biochim. Biophys. Res. Commun., 95, 777-784
- BAYARD, B. et KERKAERT, J.P. (1981) Eur. J. Biochem., 113, 405-414
- BEAUFAY, H., AMAR-COSTESECC, A., FEYTMANS, E., THINES-SEMPOUX, D., WIBO, M., ROBBI, M. et BERTHET, J. (1974) J. Cell Biol., 161, 188-200
- BECKER, S. (1969) Immunochemistry, 6, 539-546
- BERESFORD, C.H., NEALE, A.D. et BROOKS, O.G. (1971) Lancet, 1, 568-572
- BEZKOROVAINY, A. et GROHLICH, D. (1972) Biochim. Biophys. Acta, 263, 645-651
- BEZOUSKA, K., TABORSKY, O., KUBRICHT, J., POSPISIL, M. et KOCOUREK, J. (1985) Biochem. J., 227, 345-354
- BEZWODA, W.R., MAC PHAIL, A.P., BOTWELL, T.H., BAYNES, R.D., DERMAN, D.P. et TORRANCE, D. (1986) Brit. J. Haematol., 63, 749-752
- BIOU, D., KONAN, D., FEGER, J., AGNERAY, J., LEROY, Y., CARDON, P., FOURNET, B., DURAND, G. (1987) Biochim. Biophys. Acta, 913, 308-312
- BLOBEL, G. et DOBBERSTEIN, B., (1975) J. Cell Biol., 67, 835-861
- BOCK, K., ARNAP, J. et LÖNNGREN, J. (1982) Eur. J. Biochem., 129, 171-178
- BOMFORD, A.B., ISAAC, J., ROBERTS, S., EDWARDS, A., YOUNG, S. et WILLIAMS, R. (1986) Biochem. J., 236, 243-249
- BOMFORD, A.B. et MUNRO, H.N. (1985) Hepatology, 5, 870-875
- BOOTH, A.G., OLANIYAN, R.O. et VANDERPUYE, O.A. (1980) Placenta, 1, 327-336
- BOOTH, A.G. et WILSON, M.J. (1981) Biochem. J., 196, 355-362
- BOTTOMLEY, S.S., WOLFE, L.C. et BRIDGES, K.R. (1985) J. Biol. Chem., 260, 6811-6815
- BRIDGES, K.R. et CUDKOWICZ, A. (1984) J. Biol. Chem., 259, 12970-12977

- BRISSON, J.R. et CARVER, J.P. (1983a) *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, 61, 1067-1078
- BRISSON, J.R. et CARVER, J.P. (1983b) *Biochemistry*, 129, 171-178
- BROCK, J.H. (1985) in "Metalloproteins. Part II : metal proteins with non-redox roles" (P. Harrison, ed.) *Topics in molecular and structural biology*, pp. 183-261
- BROCK, J.H. et ESPARZA, I. (1979) *Brit. J. Haematol.*, 42, 481
- BROWN, P.J. et JOHNSON, P.M. (1981) *Placenta*, 2, 1-10
- BROWN, J.P., WRIGHT, P.W., HART, C.E., WOODBURY, R.G., HELLSTRÖM, K.E. et HELLSTRÖM, I. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 4980-4983
- BUCHER, N.L.R. et SWAFFIELD, M.N. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 1157-1160
- BURNETTE, M.N. (1981) *Anal. Biochem.*, 112, 195-203
- CAHOURS, A., HARTMANN, L., DEBEIRE, P. et MONTREUIL, J. (1983) *Biochem. J.*, 211, 55-63
- CANNON, J.L. et CHASTEEN, M.D. (1975) *Biochemistry*, 14, 4573-4577
- CHASTEEN, M.D. (1977) *Coord. Chem. Rev.*, 22, 1-36
- CIECHANOVER, A., SCHWARTZ, A.L., DAUTRY-VARSAT, A. et LODISH, H.F. (1983a) *J. Biol. Chem.*, 258, 9681-9683
- CIECHANOVER, A., SCHWARTZ, A.L. et LODISH, H.F. (1983b) *Cell*, 32, 267-275
- CONTRACTOR, S.F. et EATON, B.M. (1986) *Cell Biochem. Funct.*, 4, 69-74
- COX, T.M., MAZURIER, J., SPIK, G., MONTREUIL, J. et PETERS, T.F. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, 588, 120-128
- CRICHTON, R.R. et CHARLOTEAUX-WAUTERS, M. (1987) *Eur. J. Biochem.*, 164, 485-506
- CROMWELL, S. (1964) *Prot. Biol. Fluids*, 11, 464-486
- CUATRECASAS, P., WILCHEK, M. et ANFINSEN, C.B. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 61, 636-643
- CUSTER, G., BALCERZAK, S. et RINEHART, J. (1982) *Amer. J. Haematol.*, 13, 23-26
- DAUTRY-VARSAT, A. (1986) *Biochimie*, 68, 375-381
- DAUTRY-VARSAT, A., CIECHANOVER, A. et LODISH, H.F. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2258-2262

- DAUTRY-VARSAT, A. et LODISH, H.F. (1984a) *Sci. Am.*, 250/5, 52
- DAUTRY-VARSAT, A. et LODISH, H.F. (1984b) *Pour La Science*, 81, 78-85
- DAVIS, R.J., CORCEVA, S. et CZECH, M.P. (1986) *J. Biol. Chem.*, 261, 8708-8711
- DAVOUST, J., MICHEL, V., SPIK, G., MONTREUIL, J. et DEVAUX, P.F. (1981) *FEBS Lett.*, 125, 271- 276
- DEBANNE, M.T., CHINDEMI, P.A. et REGOECZI, E. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 4929-4933
- DEBRAY, H., DECOUT, D., STRECKER, G., SPIK, G. et MONTREUIL, J. (1981) *Eur. J. Biochem.*, 117, 41-45
- DEBRAY, H., QIN, Z., DELANNOY, P., MONTREUIL, J., DUS, D., RADZIKOWSKI, C., CHRISTENSEN, B. et KIELER, J. (1986) *Int. J. Cancer*, 37, 607-611
- DEBRUYNE, V. (1983) Thèse de 3^{ème} cycle, Lille
- DEBRUYNE, V., MONTREUIL, J. et SPIK, G. (1984) *Prot. Biol. Fluids*, 31, 63-68
- DEISENHOFFER, J. (1981) *Biochemistry*, 20, 2361-2370
- DEKKER, C.J., KROOS, M.J., VAN DER HEUL, C. et VAN EIJK, H.J. (1984) *Int. J. Biochem.*, 16, 787-792
- DEKKER, C.J., KROOS, M.J., VAN DER HEUL, C. et VAN EIJK, H.J. (1985) *Int. J. Biochem.*, 17, 701-706
- DELANNOY, P., DEBRAY, H. et MONTREUIL, J. (1985) *C. R. Acad. Sci. Paris*, 301, 767- 772
- DESVERGNE, B., LESCOAT, G., GLAISE, D., KNEIP, B., DEUGNIER, Y., GUGUEN-GUILLOUZO, C., BOUREL, M. et BRISSOT, P. (1987) VIII^{ème} Colloque international sur les protéines de transport et d'emmagasinage du fer, Québec, Canada, p. 45
- DEWALD, B., DULANEY, J.T. et TOUSTER, O. (1974) *Meth. Enzymol.*, 32, 82-91
- DIPPOLD, W.G., LLOYD, K.O., LI, L.T., IKEDA, H., OETTGEN, H.F. et OLD, L.G. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 6114-6118
- DORLAND, L., HAVERKAMP, J., SCHUT, B.L., VLIEGENTHART, J.F.G., SPIK, G., STRECKER, G., FOURNET, B. et MONTREUIL, J. (1977) *FEBS Lett.*, 77, 15-20
- DOUY, A. et GALLOT, B. (1980) *Biopolymers*, 19, 493
- DOUY, A., GERVAIS, M. et GALLOT, B. (1980) *Macromol. Chem.* 181, 1199
- DUBACH, R., CALLENDER, S.T.E. et MOORE, C.V. (1948) *Blood*, 3, 526-542

- ELDER, J.H. et ALEXANDER, S. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 4540-4544
- ENNS, C.A., SHINDELMAN, J.E., TONIK, S.E. et SUSSMAN, H.H. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4222-4225
- ENNS, C.A., SUOMALAINEN, H.A., GEBHART, J.E., SCHRODER, J. et SUSSMAN, H.H. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 3241-3245
- ENNS, C.A. et SUSSMAN, H.H. (1981a) J. Biol. Chem., 256, 9820-9823
- ENNS, C.A. et SUSSMAN, H.H. (1981b) J. Biol. Chem., 256, 12620-12623
- EVANS, R.W. et WILLIAMS, J. (1978) Biochem. J., 173, 543-552
- FAULK, W.P. et JOHNSON, P.M. (1977) Clin. Exp. Immunol., 27, 365-375
- FERNANDEZ, J.A. et KLOS, D.J. (1980) Biochemistry, 19, 3904-3912
- FINNE, J., KRUSIUS, T. et RAUVALA, H. (1980) Carbohydr. Res., 80, 336-339
- FISHMAN, J.B. et FINE, R.E. (1987) Cell, 48, 157-167
- FLETCHER, J. et HUEHNS, E.R. (1967) Nature, 215, 584-588
- FLETCHER, J. et SUTTER, P.E.N. (1969) Clin. Sci., 36, 209-220
- FORTH, W. et RUMMEL, W. (1973) Physiol. Rev., 53/3, 746-753
- FOUAD, F.M., ABD-EL-FATTAH, M., SCHERER, R. et RUHENSTROTH-BAUER, G. (1981) Z. Naturforsch, 36C, 350-352
- FOUCRIER, J., KRAEMER, M., VASSY, J. et CHALUMEAU, M.T. (1979) Cell Diff., 8, 39-48
- FOURNET, B., STRECKER, G., LEROY, Y. et MONTREUIL, J. (1981) Anal. Biochem., 116, 489-502
- FRAKER, P. et SPECK, J. (1978) Biochim. Biophys. Res. Commun., 80, 849-857
- FRASLIN, J.M., KNEIP, B., VAULONT, S., GLAISE, D., MUNNICH, A. et GUGUEN-GUILLOUZO, C. (1985) E.M.B.O. J., 4, 2487-2491
- FREEZE, H.H. et VARKI, A. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun., 140, 967-973
- FRIEDMAN, D.L., CLAUS, T.H., PILKIS, S.J. et PINE, G. (1981) Exp. Cell Res., 135, 283-290
- GABER, B.P., MISKOWSKY, V. et SPIRO, T.G. (1974) J. Amer. Chem. Soc., 96, 6869
- GALBRAITH, G.M.P., GALBRAITH, R.M. et FAULK, W.P. (1980) Placenta, 1, 33-46

- GALBRAITH, G.M.P., GALBRAITH, R.M., TEMPLE, A. et FAULK, W.P. (1980) Blood, 55, 240-242
- GALBRAITH, G.M.P., TEMPLE, A., GALBRAITH, R.M., FAULK, W.P. et WANG, A.C. (1978) Federation Proc., 37, 1726
- GARRET, N.E., GARRET, N.J.B. et ARCHDEACON, J.W. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun., 52, 466
- GEUZE, H.J., SLOT, J.W., STROUS, G.J.A.M., LODISH, H.F. et SCHWARTZ, A.L. (1982) J. Cell Biol., 92, 865-870
- GEUZE, H.J., SLOT, J.W., STROUS, G.J.A.M., LODISH, H.F. et SCHWARTZ, A.L. (1983) Cell, 32, 277-287
- GLASS, J., NUNEZ, M.T. et ROBINSON, S.H. (1980) Biochim. Biophys. Acta, 598, 293-304
- GODIND, J.W. et BURNS, G.F. (1981) J. Immunol., 127, 1256-1258
- GOODFELLOW, P.N., BANTING, G., SUTHERLAND, R., GREAVES, M., SOLOMON, E. et POVEY, S. (1982) Somat. Cell Genet., 8, 197
- GORINSKY, B., HORSBURGH, C., LINDLEY, P.F., MOSS, D.S., PARKAR, M. et WATSON, J.L. (1979) Nature, 281, 157-158
- GRIENINGER, G. (1983) in "Plasma proteins secretion by the liver" (H. Glaumann, T. Peters et C. Redman, eds.) Academic Press, London, New-York, pp. 155-189
- GROHLICH, D., MORLEY, C.G.D. et BEZKOROVAINY, A. (1979) Int. J. Biochem., 10, 797-802
- GROHLICH, D., MORLEY, C.G., MILLER, R.J. et BEZKOROVAINY, A. (1977) Biochim. Biophys. Res. Commun., 76, 682-690
- GUGUEN-GUILLOUZO, C., CLEMENT, B., BAFFET, G., BEAUMONT, C., MOREL-CHANY, E. et GUILLOUZO, A. (1983) Exp. Cell Res., 143, 47-54
- GUGUEN-GUILLOUZO, C. et GUILLOUZO, A. (1983) Mol. Cell Bioch., 53, 35-56
- GUILLOUZO, A., DELERS, F., CLEMENT, B., BERNARD, N. et ENGLER, R. (1984) Biochim. Biophys. Res. Commun., 120, 311-317
- GUILLOUZO, A. et GUGUEN-GUILLOUZO, C. (1986) in "Recherche en... Hépatocytes isolés et en culture" (A. Guillouzo et C. Guguen-Guillouzo, eds.) INSERM, John Libbey Eurotext, pp. 161-178
- HAMILTON, T.A., WADA, H.G. et SUSSMAN, H.H. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 6404-6410
- HANK'S, J.H. et WALLACE, R.E. (1949) Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 71, 196

- HANOVER, J.A., BEGUINOT, L., WILLINGHAM, M.C. et PASTAN, I. (1985) J. Biol. Chem., 260, 15938-15945
- HANOVER, J.A. et DICKSON, R.B. (1985) in "Endocytosis" (I. Pastan et M.C. Willingham, eds.) Plenum Press, London et New-York, pp. 131-161
- HANOVER, J.A., WILLINGHAM, M.C. et PASTAN, I. (1984) Cell, 39, 283-293
- HARFORD, J. et ASHWELL, G. (1981) in "the Glycoconjugates" (Horowitz, ed.) Academic Press, New-York, IV, pp. 27-55
- HARRIS, D.C., GRAY, G.A. et AISEN, P. (1974) J. Molec. Chem., 249, 5261
- HASNAIN, S.S., EVANS, R.W., GARRAT, R.C. et LINDLEY, P.F. (1987) Biochem. J., sous presse
- HATTON, M.W.C., MARZ, L., BERRY, L.R., DEBANNE, M.T. et REGOECZI, E. (1979) Biochem. J., 181, 633-638
- HAURANI, F.I., MEYER, A. et O'BRIEN, R. (1973) J. Of. Ret. Soc., 14, 309-316
- HELENIUS, A., MELLMAN, I., WALL, D. et HUBBARD, A. (1983) Trends Biochem. Sci., 8, 245-250
- HEMMAPLARDH, D. et MORGAN, E.H. (1977) Brit. J. Haematol., 36, 85-96
- HERSHKO, P. (1977) Haematol., 10, 105-148
- HOOPER, D.C., STEER, C.J., DINARDELLO, C.A. et PEACOCK, A.C. (1981) Biochem. Biophys. Acta, 653, 118-129
- HORIUTI, Y., NAKAMURA, T. et ICHIHARA, A. (1982) J. Biochem. Tokio, 92, 1985-1994
- HORNE, C.H.W., MALLINSON, A.C., FERGUSON, J. et GOUDIE, R.B. (1971) J. Clin. Pathol., 24, 464-466
- HORTIN, G., GREEN, E.D., BAENZIGER, J.U. et STRAUSS, A.W. (1986) Biochem. J., 235, 407-414
- HU, W.L., MAZURIER, J., SAWATSKI, G., MONTREUIL, J. et SPIK, G. (1988) Biochem. J., 249, 435-441
- HUEBERS, H.A. et FINCH, C.A. (1987) Physiol. Rev., 67, 520-581
- HUEBERS, H.A., HUEBERS, E., CSIBA, E., RUMMEL, W. et FINCH, C.A. (1983) Blood, 61, 283-290
- HUEBERS, H.A., HUEBERS, E., FINCH, C.A. et MARTIN, A.W. (1982) J. Comp. Physiol., 148, 101-109

- JANDL, J.H., INMAN, J.K., SIMMONS, R.L. et ALLEN, D.W. (1959) J. Clin. Invest., 38, 161
- JARRIT, P.M. et CHARWOOD, P.A. (1976) Biochim. Biophys. Acta, 453, 319-331
- JEEJEEBHOY, K.N., BRUCE-ROBERTSON, A., HO, J., KIDA, S. et MULLER-EBERHARD, U. (1976) Can. J. Biochem., 54, 74-78
- JEEJEEBHOY, K.N., HO, J., GREENBERG, G.R., PHILLIPS, M.J., BRUCE-ROBERTSON, A. et SODTKE, U. (1975) Biochem. J., 146, 141-155
- JELTSCH, J. M. et CHAMBON, P. (1982) Eur. J. Biochem., 122, 291-295
- JING, S. et TROWBRIDGE, I.S. (1987) EMBO J., 6, 327-331
- JOHANSON, B. (1960) Acta Chem. Scand., 14, 510
- JOHNSON, P.M. et FAULK, W.P. (1978) Immunology, 34, 1027-1035
- JOHNSTONE, A. et THORPE, R. (1982) in "Immunochemistry in practise", Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edimburgh, pp. 233-255
- KAMERLING, J.P., GERWIG, G.J., Vliegenthart, J.F.G. et CLAMPS, J.R. (1975) Biochem. J., 151, 491-495
- KAMPSCHMIDT, R. F. et PULLIAM, L.A. (1975) Res. J. Reticuloendoth. Soc., 17, 162-169
- KERKAERT, J.P. et BAYARD, B. (1982) Biochim. Biophys. Res. Commun., 105, 1023-1030
- KERNOFF, L.M. et BAKER, G. (1980) Anal. Biochem., 106, 529-534
- KING, B.F. (1976) Anat. Records, 186, 151-160
- KISHIMOTO, T. et TASSAVOLI, M. (1987) Am. J. Anat., 178, 241-249
- KIYOKO, I. et YOSHINARI, I. (1982) in "The biochemistry and physiology of iron" (P. Saltman et J. Hegenaner, eds.) Elsevier North Holland Publisher, pp. 215-217
- KLAUSNER, R.D., ASHWELL, G., VAN RENSWOUDE, J., HARFORD, J.B. et BRIDGES, K.R. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 2263-2266
- KLAUSNER, R.D., HARFORD, J. et VAN RENSWOUDE, J. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3005-3009
- KNOWLES, B.B., HOWE, C.C. et ADEN, H.P. (1980) Science, 209, 497-499
- KOENIG, S. et SCHILLINGER, W. (1969) J. Biol. Chem., 244, 3283
- KOHNO, H., TAKETANI, S. et TOKUNAGA, R. (1986) Cell Struct. Funct., 11, 181-190

- KRISTEVA, M.A., MAZURIER, J. et SPIK, G. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 453, 484-493
- KRISTEVA, M.A., MAZURIER, J., SPIK, G. et MONTREUIL, J. (1975) *FEBS Lett.*, 56, 337-340
- KRUSIUS, T. et FINNE, J. (1981) *Carbohydr. Res.*, 90, 203-214
- LAEMMLI, U.K. (1970) *Nature*, 227, 680-685
- LAISHES, B.A. et WILLIAMS, G.M. (1976) *In vitro*, 12, 821-832
- LANE, R.S. (1976) in "Structure and function of plasma protein" (A.C. Allison, ed.) 2, 53-78
- LARRICK, J.W. et CRESSWELL, P. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, 483, 483-490
- LARSON, S.M., RASEY, R.S., ALLEN D.R., NELSON, N.J., GRUNBAUM, Z., HARP, G.D. et WILLIAMS, D.L. (1980) *J. Natl. Cancer Inst.*, 64, 41-53
- LAURELL, C.B. (1947) *Acta Physiol. Scand.*, 14S46, 1-29
- LAURELL, C.B. et INGELMAN, B. (1947) *Acta Chem. Scand.*, 1, 770
- LAURELL, C.B., KULLANDER, S. et THORELL, J. (1968) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 21, 337-343
- LEBRETON, J.P., DAVEAU, M., HIRON, M., FONTAINE, M., BIOU, D., GILBERT, D. et GUGUEN-GUILLOUZO, C. (1986) *Biochem. J.*, 235, 421-427
- LEE, D.C., MAC KNIGHT, G.S. et PALMITER, R.D. (1978) *J. Biol. Chem.*, 253, 3494-3503
- LEE, D.C., MAC KNIGHT, G.S. et PALMITER, R.D. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 1442-1450
- LEE, Y.C. et SCOCCA, J.R. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 5733-5758
- LEGER, D. (1987) Thèse Doctorat ès Science, Lille
- LEHRER, S.S. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 3613-3617
- LEIBMAN, A. et AISEN, P. (1977) *Biochemistry*, 16, 1268
- LEIBMAN, A. et AISEN, P. (1979) *Blood*, 53, 1058-1065
- LESTAS, A. (1976) *Brit. J. Haematol.*, 32, 341-350
- LEVIN, M.J., TUIL, D., UZAN, G., DREYFUS, J.C. et KAHN, A. (1984) *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 122, 212-217
- LI, Z.Q., PERKINS, S.J. et LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. (1983) *Eur. J. Biochem.*, 130, 275-279

- LIEBER, C.S. (1980) *Gastroenterology*, 79, 373-390
- LIGHT, N.D. (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, 495, 46
- LOH, T.T. (1982) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 9, 11
- LOH, T.T., HIGUCHI, D.A., VAN BROCKXMEER, F.M., SMITH, T.H. et BROWN, E.B. (1980) *J. Clin. Invest.*, 65, 1182-1191
- LOUACHE, F., TESTA, U., PELICCI, P., THOMOPOULOS, P., TITEUX, M. et ROCHANT, H. (1984) *J. Biol. Chem.*, 259, 11576-11582
- LOWRY, O.H., ROSEBROUCH, N.J., FARR, A.L. et RANDALL, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265
- LUK, C.K. (1971) *Biochemistry*, 10, 2838-2844
- LUM, J.B., INFANTE, A.J., MAKKER, D.M. et BOWMAN, B.H. (1986) *J. Clin. Invest.*, 77, 841-849
- MAC ARDLE, H.J., DOUGLAS, A.J. et MORGAN, E.H. (1985) *J. Cell Physiol.*, 122, 405-409
- MAC CLELLAND, A., KÜHN, L.C. et RUDDLE, F.H. (1984) *Cell*, 39, 267-274
- MAC GILLIVRAY, R.T.A. et BREW, K. (1975) *Science*, 190, 1306-1307
- MAC GILLIVRAY, R.T.A., MENDEZ, E. et BREW, K. (1977) in "Proteins of iron metabolism" (E.B. Aisen, J. Felding et R.R. Crichton, eds.) Grune and Stratton, New-York, pp. 133-141
- MAC GILLIVRAY, R.T.A., MENDEZ, E., SHEWALE, J.G., SINHA, S.K., SUTTON, M.A., LINEBACK-ZINS, J. et BREW, K. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 3543-3553
- MAC GILLIVRAY, R.T.A., MENDEZ, E., SINHA, S.K., SUTTON, M.R., LINEBACK-ZINS, J. et BREW, K. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 2504-2508
- MACKIEWICZ, A., GANAPATHI, M.K., SCHULTZ, D. et KUSHNER, I. (1987) *J. Exp. Med.*, 166, 253-258
- MAC KNIGHT, G.S., LEE, D.C., HEMMAPLARDH, D., FINCH, C.A. et PALMITER, R.D. (1980a) *J. Biol. Chem.*, 255, 144-147
- MAC KNIGHT, G.S., LEE, D.C. et PALMITER, R.D. (1980b) *J. Biol. Chem.*, 255, 148-153
- MAKEY, D.G. et SEAL, V.S. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 453, 250-256
- MANCINI, G., CARBONARA, A.O. et HEREMANS, J.F. (1965) *Immunochemistry*, 2, 235-254

- MARCH, S.C., PARIKH, I. et CUATRECASAS, P. (1974) *Anal. Biochem.*, 60, 149-152
- MARTIN, A.W., HUEBERS, E. et WEBB, J. (1983) in "Proteins of iron storage and transport" (I. Urushizaki, P. Aisen, I. Listowsky et J.W. Drysdale, eds.) Elsevier Biomedical, New-York, pp. 259-260
- MARX, J.J.M., KLEIN-GEJBINK, J.A.G., NISHISATO, T. et AISEN, P. (1982) *Brit. J. Haematol.*, 52, 105-110
- MÄRZ, L., HATTON, M.W.C., BERRY, L.R. et REGOECZI, E. (1982) *Can. J. Biochem.*, 60, 624-630
- MASSON, P.L. et HEREMANS, J.F. (1966) in "Protides in biological fluids" (H. Peters, ed.) Elsevier, Amsterdam, 14, 115
- MATTIA, E., KRISHNAMURTY, R., SHAPIRO, D.S., SUSSMAN, H.H. et KLAUSNER, R. (1984) *J. Biol. Chem.*, 259, 2689-2692
- MAZURIER, J., AUBERT, J.P., LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. et SPIK, G. (1976) *FEBS Lett.*, 66, 238-242
- MAZURIER, J., LHOSTE, J.M., SPIK, G. et MONTREUIL, J. (1977) *FEBS Lett.*, 81, 371-375
- MAZURIER, J., METZ-BOUTIGUE, M.H., JOLLES, J., SPIK, G., MONTREUIL, J. et JOLLES, P. (1983) *Experientia*, 39, 135-141
- MAZURIER, J., MONTREUIL, J. et SPIK, G. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, 821, 453-460
- MAZURIER, J., SPIK, G. et MONTREUIL, J. (1984) Abstracts of the Iron Club Meeting, Rennes, France
- MAY, W.S., JACOBS, S. et CUATRECASAS, P. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 2016-2020
- METZ-BOUTIGUE, M.H., JOLLES, J., MAZURIER, J., SCHOENTGEN, F., LEGRAND, D., SPIK, G., MONTREUIL, J. et JOLLES, P. (1984) *Eur. J. Biochem.*, 145, 659-676
- METZ-BOUTIGUE, M.H., MAZURIER, J., JOLLES, J., SPIK, G., MONTREUIL, J. et JOLLES, P. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, 670, 243-254
- MEYER, B. (1983) *Proc. VIIth Intern. Symp. on Glycoconjugates* (A. Chester, D. Heinegard, A. Lundblad et D. Svenson, eds.) Rhams, Lund, p. 126
- MICHALOPOULOS, G., HOUCK, K.A., DOLAN, M.L. et LUETTEKE, C. (1984) *Cancer Res.*, 44, 4414-4419
- MONTREUIL, J. (1975) *Pure Appl. Chem.*, 42, 431-477
- MONTREUIL, J. (1980) IXth Proc. Katzir-Katchalsky, Conf. on "Carbohydrate - proteins interactions", Kibbutz Kiryat Anavim, pp. 3-4

- MONTREUIL, J. (1982) in "Comprehensive Biochemistry" (A. Neuberger et L.L.M. van Deenen, eds) Elsevier, Amsterdam, 19B, 1-188
- MONTREUIL, J. (1983) Biochem. Soc. Trans., 11, 134-136
- MONTREUIL, J. (1984) Pure Appl. Biochem., 56, 859-877
- MONTREUIL, J. (1986) in "Molecular and cellular basis of digestion" (P. Desnuelle, H. Sjöström et O. Norén, eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 3-23
- MONTREUIL, J., FOURNET, B., SPIK, G. et STRECKER, G. (1978) C. R. Acad. Sci. Paris, 287D, 837-840
- MONTREUIL, J. et MULLET, S. (1960) C. R. Acad. Sci. Paris, 250, 1376
- MONTREUIL, J. et SPIK, G. (1975) in "Proteins of iron storage and transport in Biochemistry and Medicine" (R.R. Crichton, ed.) Elsevier North Holland, Amsterdam, p. 27
- MONTREUIL, J., SPIK, G. et CHOSSON, A. (1962) C. R. Acad. Sci. Paris, 255, 3493
- MONTREUIL, J., TONNELAT, J. et MULLET, S. (1960) Biochim. Biophys. Acta, 45, 413
- MORELL, A.G., GREGORIADIS, G., SCHNEIDER, I.H., HICKMAN, J. et ASHWELL, G. (1971) J. Biol. Chem., 246, 1461-1467
- MORELL, A.G., IRVINE, R.A., STERNLEIB, I., SCHEINBERG, J.H. et ASHWELL, G. (1968) J. Biol. Chem., 243, 155-159
- MORGAN, E.H. (1966) Am. J. Physiol., 211, 1486-1494
- MORGAN, E.H. (1974) in "Iron Biochemistry and Medicine" (A. Jacobs et M. Worwood, eds.), Academic Press, London et New-York, pp. 29-71
- MORGAN, E.H. (1981) in "Molecular aspects of Medicine", Oxford, Bergamon Press, pp. 1-123
- MORGAN, E.H. et APPLETON, T.C. (1969) Nature, 223, 1371-1372
- MORGAN, E.H. et MELB, M.B. (1961) Lancet, 1, 9-12
- MORGAN, E.H. et PETERS, T. (1971) J. Biol. Chem., 246, 3508-3511
- MORLEY, C.G.D., SOLBERG, L. et BEZKOROVAINY, A. (1985) in "Proteins of iron storage and transport" (G. Spik, J. Montreuil, R.R. Crichton et J. Mazurier, eds.) Elsevier Science Publishers, pp. 175-178
- MORTON, A.G., HAMILTON, S.M., RAMSDEN, D.B. et TAVILL, A.S. (1977) in "Plasma proteins turnover" (R. Bianchi, G. Mariani et A.S. Mac Farlane, eds.) University Park Press, Baltimore, pp. 165-177
- MORTON, A.G. et TAVILL, A.S. (1977) Brit. J. Haematol., 36, 383-394

- NAGY, B. et LEHRER, S.S. (1972) Arch. Biochim. Biophys., 148, 27-36
- NALPAS, B., BOIGNE, J.M., ZAFRANI, E.S., ZIMMERMANN, R. et BERTHELOT, P. (1980) Gastroenterol. Clin. Biol., 4, 646-654
- NEWMAN, R., SCHNEIDER, C., SUTHERLAND, R., VODINELICH, L. et GREAVES, M. (1982) Trends Biochem. Soc., 7, 397-400
- NICOLLET, I., LEBRETON, J.P., FONTAINE, M. et HIRON, M. (1981) Biochim. Biophys. Acta, 668, 235-241
- NIKINMAA, B., ENNS, C.A., TONIK, S.E. SUSSMAN, H.H. et SCHRODER, J. (1984) Scand. J. Immunol., 20, 441-447
- NUNEZ, M.T. et GLASS, J. (1983) J. Biol. Chem., 258, 9676-9680
- OCKLEFORD, C.D. et WHYTE, A. (1977) J. Cell Sci., 25, 293-312
- OCTAVE, J.N., SCHNEIDER, Y.J., HOFFMAN, P., TROUET, A. et CRICHTON, R.R. (1979) FEBS Lett., 108, 127-130
- OCTAVE, J.N., SCHNEIDER, Y.J., SIBILLE, J.C., CRICHTON, R.R. et TROUET, A. (1984) in "Protides of the biological fluids", XXXIth annual Colloquium (H. Peeters, ed.) Bergamon Press, pp. 77-80
- OCTAVE, J.N., SCHNEIDER, Y.J., TROUET, A. et CRICHTON, R.R. (1983) Trends Biochem. Sci., 8, 217-219
- OMARY, M.B. et TROWBRIDGE, I.S. (1981a) J. Biol. Chem., 256, 4715
- OMARY, M.B. et TROWGRIDGE, I.S. (1981b) J. Biol. Chem., 256, 12888
- PARMLEY, R.T., BARTON, J.C. et CONRAD, M.E. (1985) Brit. J. Haematol., 60, 81-89
- PASTAN, I. et WILLINGHAM, M.C. (1981) Science, 214, 504-509
- PASTAN, I. et WILLINGHAM, M.C. (1985) in "Endocytosis" (I. Pastan et M.C. Willingham, eds.) Plenum Publishing Corporation, pp.
- PAZ-PARENTE, J., CARDON, P., LEROY, Y., MONTREUIL, J., FOURNET, B. et RICART, G. (1985) Carbohydr. Res., 141, 41-47
- PEARSE, B.M.F. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 451-455
- PEKAREK, R.S., BOSTIAN, K.A., BARTELONY, P.J., CALIA, F.M. et BEISEL, W.R. (1969) Amer. J. Med. Sci., 258, 14-25
- PETERS, T., FLEISCHER, B. et FLEISCHER, S. (1971) J. Biol. Chem., 246, 240-244
- PETERSON, G.L. (1977) Anal. Biochem., 83, 346-356
- PHILLIPS, J.L. et AZARI, P. (1972) Arch. Biochim. Biophys., 151, 445
- PHILLIPS, M.E. et THORBECKE, G.J. (1966) Int. Arch. Allergy, 29, 553-558

- PLANT, P.W., LIANG, T. J., PINDICK, J. et GRIENINGER, G. (1981) Biochim. Biophys. Acta, 655, 407-422
- PLUMMER, T.H., ELDER, J.H., ALEXANDER, S., PHELAN, A.W. et TARENTINO, A.L. (1984) J. Biol. Chem., 259, 10700-10704
- POWELL, L.W., JACOBI, J.M., GAFFNEY, T.J. et ADAM, R. (1970) Brit. Med. J., 3, 194-195
- PRIBILLA, W., BOTHWELL, T.H. et FINCH, C.A. (1958) in "Iron in medical Medicine" (R.O. Wallerstein et S.R. Mettler, eds.) Berkeley, University of California Press, pp. 58-64
- PRINCIOTTO, J.V. et ZAPOLSKY, E.J. (1975) Nature, 255, 87-88
- PRINCIOTTO, J.V. et ZAPOLSKY, E.J. (1976) Biochim. Biophys. Acta, 421, 80-86
- PURVES, L.A., JONHSON, G. et JACOBS, P. (1984) in "Protides of the biological fluids" (A. Peter, ed.) 31, 103-104
- READING, C.L., PENHOET, E. et BALLOU, C. (1978) J. Biol. Chem., 253, 5600-5612
- REEDS, P.J. et LADITAN, A.A.O. (1976) Brit. J. Nutr., 36, 255-263
- REFSUM, S.B. et SCHREINER, B. (1984) Scand. J. Gastroenterol., 19, 867-874
- REGOECZI, E. (1987) in "Vertebrate lectin" (K. Olden et J.B. Parent, eds.) Van Nostrand Reinhold Company, New-york, pp. 124-151
- REGOECZI, E., CHINDEMI, P.A. et DEBANNE, M.T. (1984) Alcohol. Clin. Exp. Res., 8, 287-292
- REGOECZI, E., CHINDEMI, P.A., DEBANNE, M.T. et CHARLWOOD, P.A. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 2226-2230
- REGOECZI, E. et HATTON, M.W.C. (1980) J. Am. Physiol. Soc., R306-R310
- REGOECZI, E., TAYLOR, P., DEBANNE, M.T., MARZ, L. et HATTON, M.W.C. (1979) Biochrm. J., 184, 399-407
- RICHMAN, R.A., CLAUS, T.H., PILKIS, S.J. et FRIEDMAN, D.L. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 3589-3593
- ROGERS, T.B., BORENSEN, T. et FEENEY, R.E. (1978) Biochemistry, 17, 1105-1109
- ROGERS, T.B., GOLD, R.A. et FEENEY, R.E. (1977) Biochemistry, 17, 2299-2305
- ROSE, T.M., PLOWMAN, G.D., TEPLow, D.B., DREYER, W.J., HELLSTRÖM, K.E. et BROWN, J.P. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 1261-1265

- ROTHENBERGER, S., IACOPETTA, B.J. et KÜHN, L.C. (1987) *Cell*, 49, 423-431
- RUDOLPH, N.S., OHLSSON-WILHEM, B.M. et LEARY, J.F. (1985) *J. Cell Physiol.*, 122, 441-450
- RUDOLPH, J.R., REGOECZI, E., CHINDEMI, P.A. et DEBANNE, M.T. (1986) *Am. J. Physiol.*, 251, G398-G404
- RUSSEL, W.E. et BUCHER, N.L.R. (1983) *Am. J. Physiol.*, 245, G321-G324
- RYMER, J.C. (1981) *Path. Biol.*, 29/5, 301-304
- SALACINSKY, P.R.P., MAC LEAN, C., SYKES, S.E.C., LEMEN-JONES, V.V. et LOWRY, P.J. (1981) *Anal. Biochem.*, 117, 136-146
- SALIER, J.P., FAYE, L., VERGAINE, D. et MARTIN, J.P. (1980) *Electrophoresis*, 1, 193-197
- SCATCHARD, G. (1949) *Ann. New-York Acad. Sci.*, 51, 660-672
- SCHADE, A.L. et CAROLINE, L. (1944) *Science*, 100, 14-15
- SCHADE, A.L. et CAROLINE, L. (1946) *Science*, 104, 340-341
- SCHADE, A.L., REINHART, R.W. et LEWY, H. (1949) *Arch. Biochem.*, 20, 170
- SCHLABACH, M.R. et BATES, G.W. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 2182-2188
- SCHNEIDER, C., OWEN, M.J., BANVILLE, D. et WILLIAMS, J.G. (1984) *Nature*, 311, 675-678
- SCHNEIDER, G., SUTHERLAND, R., NEWMAN, R. et GREAVES, M. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257, 8516-8522
- SCHREIBER, G., DRYBURGH, H., MILLERSHIP, A., MATSUDA, Y., INGLIS, A., PHILLIPS, J., EDWARDS, K. et MAGGS, J. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 12013-12019
- SCHULTZE, H.E., SCHMIDTBERGER, R. et HAUPT, H. (1958) *Biochem. Z.*, 329, 490
- SCHWARTZ, A.L., FRIDOVICH, S.A., KNOWLES, B.B. et LODISH, H.F. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 8878-8881
- SCHWARZE, P.E., SOLHEIM, A.E. et SEGLEN, P.O. (1982) *In vitro*, 18, 43-54
- SEGLEN, P.O. (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, 496, 182-191
- SEGLEN, P.O., SOLHEIM, A.E., GRINDE, B., GORDON, P.B., SCHWARZE, P.E., GJESSING, R. et POLI, A. (1980) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 349, 1-7

- SELIGMAN, P.A., SCHLEICHER, R.B. et ALLEN, R.H. (1979) J. Biol. Chem., 254, 9943-9946
- SIRICA, A.E., RICHARDS, W., TSUKADA, C., SATTLER, C. et PITOT, H.C. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 283-287
- SKINNER, M.K., COSAND, W.L. et GRISWOLD, M.D. (1984) Biochem. J., 218, 313-320
- SKINNER, M.K. et GRISWOLD, M.D. (1980) J. Biol. Chem., 255, 9523-9525
- SMETS, L.A. et VAN BEEK, W.P. (1984) Biochim. Biophys. Acta, 738, 237-249
- SMITH, N.C., BRUSH, M.G. et LUCKETT, S. (1974) Nature, 252, 302
- SMITH, C.H., NELSON D.M., KING, B.F., DONOHUE, T.M., RUZYCKI, S.M. et KELLEY, L.K. (1977) Am. J. Obstet. Gynecol., 128, 190-196
- SORELL, M.F., NAUSS, J.M., DONOHUE, T. et TUMA, D.J. (1983) Gastroenterology, 84, 580-586
- SPEYER, B.E. et FIELDING, J. (1974) Biochim. Biophys. Acta, 332, 192-200
- SPIK, G. (1968) Thèse Doctorat ès Science, Lille
- SPIK, G. (1982) Falk Symposium on structural carbohydrates in the liver, Basel, n°34
- SPIK, G. (1982a) in "The Biochemistry and Physiology of Iron" (P. Saltman and J. Hagenauer, eds.) Elsevier North-Holland, 49-56
- SPIK, G., BAYARD, B., FOURNET, B., STRECKER, G., BOUQUELET, S. et MONTREUIL, J. (1975) FEBS Lett, 50, 296-299
- SPIK, G., DEBRUYNE, V. et MONTREUIL, J. (1983) in "structural carbohydrates in the liver" (H. Popper, W. Reutter, E. Köttgen et F. Gudat, eds.) MTP Press Limited, Proceedings of the 34th Falk Symposium, Basel, pp.477-483
- SPIK, G., DEBRUYNE, V., MONTREUIL, J., VAN HALBEEK, H. et Vliegenthart, J.F.G. (1985) FEBS Lett., 183, 65-69
- SPIK, G., FOURNET, B., BAYARD, B., VANDERSYPPE, R., STRECKER, G., BOUQUELET, S., CHARRET, P. et MONTREUIL, J. (1974) Arch. Inter. Physiol. Biochim., 82, 791
- SPIK, G., MONSIGNY, M. et MONTREUIL, J. (1965) C. R. Acad. Sci. Paris, 260, 4282-4284
- SPIK, G., MONSIGNY, M. et MONTREUIL, J. (1965) C. R. Acad. Sci. Paris, 261, 1137-1139

- SPIK, G. et MONTREUIL, J. (1969) Bull. Soc. Chim. Biol., 51, 1271-1285
- SPIK, G. et MONTREUIL J. (1983) Bull. Eur. Physiopath. Resp., 19, 123-130
- SPIK, G., VANDERSYPPE, R., FOURNET, B., BAYARD, B., CHARET, P., BOUQUELET, S., STRECKER, G. et MONTREUIL, J. (1974) Actes Coll. Intern., C.N.R.S. Paris, 221, 483-500
- SODA, R. et TAVASSOLI, M. (1984) Blood, 63, 271-276
- STEIN, B.S., BENSCH, K.G. et SUSSMAN H.H. (1984) J. Biol. Chem., 259, 14762-14772
- STEIN, B.S. et SUSSMAN H.H. (1985) in "Proteins of iron storage and transport" (G. Spik, J. Montreuil, R.R. Crichton et J. Mazurier, eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 191-194
- STEIN, B.S. et SUSSMAN, H.H. (1986) J. Biol. Chem., 261, 10319-10331
- STEINER, M. (1980) J. Lab. Clin. Med., 96, 1086
- STIBLER, H. et BORG, S. (1981) Alcohol. Clin. Exp. Res., 5, 545-549
- STIBLER, H. et BORG, S. (1986a) Alcohol. Clin. Exp. Res., 10, 61-64
- STIBLER, H. et BORG, S. (1986b) Drug Alcohol Dependence, 16, 331-340
- STIBLER, H., BORG, S., JOUSTRA, M. et HULTCRANRZ, R. (1987) Proceedings of the IXth International Symposium on the Glycoconjugates (J. Montreuil, A. Verbert, G. Spik et B. Fournet, eds.) Lille, France, E3
- STRAIN, A., MAC GOWAN, J.A. et BUCHER, N.L. (1982) In vitro, 18, 108-116
- STRUCK, D.K., SUITA, P.B., LANE, M.D. et LENNARZ, W.J. (1978) J. Biol. Chem., 53, 5332-5337
- SUSSMAN, H.H., STEIN, B.S. et TSAVALER, L. (1985) in "Proteins of iron storage and transport" (G. Spik, J. Montreuil, R.R. Crichton et J. Mazurier, eds.) Elsevier Science Publishers, pp. 143-153
- SUTHERLAND, R., DELIA, D., SCHNEIDER, C., NEWMAN, R., KEMSHEAD, J. et GREAVES, M. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4515-4519
- SUTTON, B.J. et PHILLIPS, D.C. (1983) Biochem. Soc. Trans., 11, 130-132
- SWEIER, J.L. (1978) J. Biol. Chem., 253, 7616-7621
- SWEIER, J.L. (1983) J. Biol. Chem., 258, 13759-13760
- SWEIER, J.L. et AISEN P. (1977) J. Biol. Chem., 252, 6090-6096

- TAN, A.T. et WOODWORTH R.C. (1969) *Biochemistry*, 819, 3711-3716
- TAN, A.T. et WOODWORTH, R.C. (1970) *J. Polym. Sci.*, 599, part C
- TANAKA, K., KISHI, K. et ICHIHARA, A. (1979) *J. Biol. Chem.*, 86, 863-870
- TARENTINO, A.L., GOMEZ, C.M. et PLUMMER, T.H. (1985) *Biochem. J.*, 24, 4665-4671
- TAVASSOLI, M., KISHIMOTO, T., SODA, R., KATAOKA, M. et HARJES, K. (1986) *Exp. Cell Res.*, 165, 369-379
- TEPPPO, A.M. et MAURY, C.P.J. (1983) *Clin. Chim. Acta*, 129, 279-286
- TEUWISSEN, B., MASSON, P.L., OSINSKY, P. et HEREMANS, J.F. (1972) *Eur. J. Biochem.*, 31, 239-245
- THIBODEAU, S.N., LEE, D.C. et PALMITER, R.D. (1978) *J. Biol. Chem.*, 253, 3771-3774
- TICKO, B. et MAXFIELD, F.R. (1982) *Cell*, 28, 643-651
- TOLLESHAUG, H., CHINDEMI, P.A. et REGOECZI, E. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 6526-6528
- TOMIMATSU, Y. et DONOVAN, J.W. (1976) *FEBS Lett.*, 71, 299-302
- TOMIMATSU, Y., KINT., S. et SCHERER, J.R. (1973) *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 54, 1067
- TOMIMATSU, Y. et VICKERY, L.E. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, 285, 72-83
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T. et GORDON, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350-4354
- TROWBRIDGE, I.S. et DOMINGO, D.L. (1981) *Nature*, 294, 171
- TROWBRIDGE, I.S. et LOPEZ, F. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 1175-1179
- TROWBRIDGE, I.S. et OMARY, M.B. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 3039-3043
- TSAVALER, L., STEIN, B.S. et SUSSMAN, H.H. (1986) *J. Cell Biol.*, 128, 1-6
- TSUNOO, H. et SUSSMAN, H.H. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 4118-4122
- TURBULL, A. (1974) in "Iron in Biochemistry and Medicine", (A. Jacobs et M. Worwood, eds.) Academic Press, London, pp.370-404
- URUSHIZAKI, I., KOHGO, Y., URUSHIZAKI, Y. et NIITSU, N. (1983) *Prot. Biol. Fluids*, 31, 81-86

- UZAN, G., FRAIN, M., PARK, I., BESMOND, C., HAESSEN, G., TREPAT, J.S., ZAKIN, M.M. et KAHN, A. (1984) *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 119, 273-281
- VAITUKATIS, J., ROBBINS, J.B., NIESCHLAG, E. et ROSS, G.T. (1971) *J. Clin. End.*, 33, 988-991
- VAN BROCKXMEER, F.M., HEMMAPLARDH, D. et MORGAN, E.H. (1975) in "Proteins of iron storage and transport in Biochemistry and Medicine" (R.R. Crichton, ed.) North Holland Amsterdam, pp. 111-119
- VAN BROCKXMEER, F.M. et MORGAN, E.H. (1982) *Comp. Biochem. Physiol.*, 71A, 211
- VAN DER HEUL, C., KROSS, M.J., DE JEU-JASPARS, C.H.M. et VAN EIJK, H.G. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, 601, 572-583
- VANDERPUYE, O.A., KELLEY, L.K. et SMITH, C.H. (1986) *Placenta*, 7, 391-404
- VANDEWALLE, B., GRANIER, A.M., PEYRAT, J.P., BONNETERRE, J. et LEFEBVRE, J. (1985) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 110, 71-76
- VAN DIJK, H.P. (1981) *Placenta*, S1, 139-164
- VAN EIJK, H.G., KROSS, M.J., VAN NOORT, W.L. et HEUL, L. (1978) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 16, 557- 560
- VAN RENSWOUDE, J., BRIDGES, K.R., HARFORD, J.B. et KLAUSNER, R.D. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 6186-6190
- VAN SNICK, J.L., MARKOWETZ, B. et MASSON, P.L. (1977) *J. Exp. Med.*, 146, 817-827
- VAN SNICK, J.L. et MASSON, P.L. (1976) *J. Exp. Med.*, 144, 1568-1580
- VAN SNICK, J.L., MASSON, P.L. et HEREMANS, J.F. (1974) *J. Exp. Med.*, 140, 1068-1084
- VENTURA, M., BASTOS-ARAGAO, J. et IKEMOTO, H. (1973) *An. Acad. Brasil*, 45, 450-452
- Vliegenthart, J.F.G., Dorland, L. et Van Halbeek, H. (1983) *Adv. Carb. Chem. Biochem.*, 41, 209
- Vliegenthart, J.F.G., Van Halbeek, H. et Dorland, L. (1981) *Pure Appl. Chem.*, 53, 45
- WADA, H.G., HASS, P.E. et SUSSMAN, H.H. (1979a) *J. Biol. Chem.*, 254, 12629-12635
- WADA, H.G., HASS, P.E. et SUSSMAN, H.H. (1979b) *J. Supramol. Struct.*, 10, 12629-12635
- WALCH, R.J., THOMAS, E.D., CHOW, S.K., FLUHARTY, R.G. et FINCH, C.A. (1949) *Science*, 110, 396

- WARD, J.H. (1987) Invest. Radiol., 22, 74-83
- WARD, J.H., JORDAN, I., KUSHNER, J.P. et KAPLAN, J. (1984) J. Biol. Chem., 259, 13235-13240
- WARD, J.H., KUSHNER, J.P. et KAPLAN, J. (1982a) J. Biol. Chem., 257, 10317-10323
- WARD, J.H., KUSHNER, J.P. et KAPLAN, J. (1982b) Biochem. J., 208, 19-26
- WARD MAC VEY, D. et KAPLAN, J. (1986) Biochem. J., 238, 721-728
- WARIN, V., BAERT, R., FOURET, G., STRECKER, G., SPIK, G., FOURNET, B., MONTREUIL, J. (1979) Carbohydr. Res., 76, 11-22
- WARNER, R.C. et WEBER, I. (1952) J. Am. Chem. Soc., 75, 5094-5101
- WEBB, P.D., EVANS, P.W., MOLLOY, C.M. et JOHNSON, P.M. (1985) Amer. J. Immunol. Microb., 8, 112-119
- WEINBERG, E.D. (1974) Science, 184, 952-956
- WHITE, G.P. et JACOBS, A. (1978) Biochim. Biophys. Acta, 543, 217-225
- WILEMAN, T., HARDING, C. et STAHL, P. (1985) Biochem. J., 232, 1-14
- WILEY, H.S. et KAPLAN, J. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7456-7460
- WILLIAMS, J. (1982) Biochem. J., 201, 647-651
- WILLIAMS, J. (1982) Trends Biochim. Sci., 7, 394-397
- WILLIAMS, J. et MORETON, A. (1980) Biochem. J., 185, 483-488
- WILLINGHAM, M.C., HANOVER, J.A., DICKSON, R.B. et PASTAN, I. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 175-179
- WINDLE, J.J., WIERSEMA, A.K., CLARK, J.R. et FEENEY, R.E. (1963) Biochemistry, 216, 1341-1346
- WOCHNER, R.D., WEISSMAN, S.M., WALDMAN, T.A., HOUSTON, D. et BERLIN, N.I. (1968) J. Clin. Invest., 47, 971-982
- WONG, K.L., DEBANNE, M.T., HATTON, M.W.C. et REGOECZI, E. (1978) Int. J. Peptide Protein Res., 12, 27-37
- WOODBURY, R.G., BROWN, J.P., YEH, M.Y., HELLSTRÖM, I. et HELLSTRÖM, K.E. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 2183-2187
- WOODWORTH, R. et SCHADE, A. (1961) Biochim. Biophys. Acta, 47, 403
- YAMASHIRO, D.J., TYCKO, B., FLUSS, S.R. et MAXFIELD, F.R. (1984) Cell, 37, 789-800

- YANG, F., LUM, J.B., MAC GILL, J.R., MOORE, C.M., NAYLOR, S.L., VAN BRAGT, P.H., BALWIN, W.D. et BOWMAN, B.H. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 2752-2756
- YEOH, G.C.T. et MORGAN, E.H. (1974) Biochem. J., 144, 215-224
- YEOH, G.C.T., WASSENBURG, J.A., EDKINS, E. et OLIVER, I.T. (1979) Biochim. Biophys. Acta, 565, 347-355
- YOSHINO, Y., HISAYASU, S., ORIMO, H. et HIRAI, Y. (1983) in "Structure and function of iron storage and transport proteins" (I. Urushizaki, P. Aisen, I. Listowsky et J.W. Drysdale, eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 419-421
- ZANETTA, J.P., BRECKENRIDGE, W.C. et VINCENDON, G. (1972) J. Chromatogr., 69, 291-304
- ZERIAL, M., HUYLEBROECK, D. et GAROFF, H. (1987) Cell, 48, 147-155

MATERIEL ET METHODES

I - ISOLEMENT DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE

A - CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUR COLONNE DE CONCAVALINE A-SEPHAROSE

La sérotransferrine humaine utilisée est une préparation commerciale qui nous est fournie par la firme Beringwerke (Marburg, RFA). Avant de séparer les variants transferriniques, la protéine est saturée en fer selon la méthode d'AZARI et BAUGH (1967).

La sérotransferrine, saturée en fer dans le tampon citrate bicarbonate, est dialysée 24 h contre deux fois 1 l du tampon de chromatographie suivant : acétate de sodium 50 mM, NaCl 1 M, pH 6,9, CaCl₂ 1mM, MnCl₂ 1 mM et MgCl₂ 1 mM (WONG et al., 1978).

La sérotransferrine (600 mg) est ensuite chromatographiée sur une colonne de concanavaline A-Sépharose 4-B (Pharmacia) (1,6 x 50 cm) équilibrée dans le tampon de chromatographie. Le déroulement de la chromatographie est suivie par l'enregistrement de l'absorbance à 280 nm. Après élution des variants non retenu et retardé, le variant retenu par la lectine est élué par le tampon de chromatographie supplémenté par de l' α -D-méthylglucoside 15 mM. Les fractions récupérées sont concentrées sur membrane immerisible CX-10 (Millipore), dessalées sur colonne de Biogel P-2 puis lyophilisées.

La pureté des variants obtenus est vérifiée par affino-immuno-électrophorèse bidimensionnelle en agarose.

B - SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS

La transferrine isolée des milieux de culture des cellules Hep G2 est chromatographiée en FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) sur une colonne mono-Q HR-5 (Pharmacia) dont les groupements échangeurs d'anions sont des amines quaternaires.

La transferrine (2 mg) est solubilisée dans 0,5 ml de tampon A : Tris 50 mM pH 8,6 puis filtrée sur filtre Millipore de 0,22 μ m. La colonne mono-Q est équilibrée dans le tampon A. Le débit est de 1 ml

/min. Après injection de la transferrine, la colonne est rincée par le tampon A pendant 5 min puis est éluée par le tampon B (Tris 50 mM, NaCl 1 M, pH 8,6) suivant le gradient :

- 95 % de A et 5 % de B pendant 15 min;
- 90 % de A et 10 % de B pendant 10 min;
- 85 % de A et 15 % de B pendant 10 min

puis passage de 15 % de B à 100 % de B en 15 min. La chromatographie est suivie par détection de l'absorbance à 280 nm.

II - INTERACTIONS DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE AVEC LES RECEPTEURS MEMBRANAIRES DU SYNCYTIOTROPHOBLASTE DU PLACENTA HUMAIN

A - PREPARATION DES MEMBRANES MICROVILLEUSES DU SYNCYTIOTROPHOBLASTE DU PLACENTA HUMAIN

Les placentas nous sont fournis par la Maternité Salengro de Lille (Directeur : Prof. DELECOUR). Les membranes microvilleuses du syncytiotrophoblaste sont préparées selon les méthodes décrites par SMITH et al. (1974), SMITH et al. (1977) et BOOTH et al. (1980).

Le placenta, placé dans le tampon de HANK'S et WALLACE (1949), est traité 20 à 30 min après la délivrance. Toutes les manipulations sont réalisées à 4°C. Le cordon ombilical et les membranes amniotiques sont éliminés du placenta qui est ensuite découpé grossièrement. Après lavage par du CaCl₂ 50 mM, NaCl 150 mM, les morceaux de placenta sont émincés en pièces de 5 à 10 mm et rincés trois fois dans le PBS. Le tissu est ensuite placé dans un béccher contenant 150 ml de PBS frais et mis sous agitation douce pendant 1 h. Les morceaux de tissus sont éliminés et le surnageant est filtré à travers une toile de nylon. Le

* Nous remercions Monsieur le Professeur DELECOUR pour nous avoir fourni les placentas.

filtrat obtenu est ensuite fractionné. Les différentes étapes sont schématisées dans la figure 27 page 154.

**B - INTERACTIONS DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA
SÉROTRANSFERRINE HUMAINE AVEC LES MEMBRANES DU
SYNCYTIOTROPHOBLASTE DU PLACENTA HUMAIN**

1 - Conditions d'incubation

Les incubations des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine, marqués à l' ^{125}I , avec les membranes du syncytiotrophoblaste sont réalisées dans des tubes de centrifugation en propionate de cellulose (5 x 20 mm) (Beckman). Le milieu d'incubation est composé de :

- 50 μl de la solution de membranes du syncytiotrophoblaste à raison de 1 mg de protéines par ml de milieu de Hank's et Wallace supplémenté en 10 mM mannitol;

- 100 μl d'une solution des différents variants glycaniques de la sérotransferrine, marqués ou non à l' ^{125}I , dans le tampon de Hank's et Wallace supplémenté avec 1,5 % de sérumalbumine bovine.

L'incubation est réalisée dans la glace pendant 30 min. Les membranes sont ensuite obtenues par centrifugation à 110 000 g pendant 3 min dans une ultracentrifugeuse "Airfuge" (Beckman). Le surnageant est éliminé et les membranes sont lavées par trois fois 150 μl du tampon de Hank's et Wallace puis reprises par trois fois 50 μl de tampon dans des tubes neufs. La radioactivité fixée aux membranes est comptée dans un compteur de radioactivité multigamma.

2 - Détermination des paramètres de fixation

La constante apparente de fixation K_a et le nombre de sites par μg de protéines membranaires sont déterminés en incubant différentes quantités des variants transferriniques marqués à l' ^{125}I (0,1 à 3,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de milieu d'incubation). Les essais sont réalisés en triple exemplaires.

Une fraction aliquote du milieu est prélevée après le temps

d'incubation afin de déterminer la quantité de sérotransferrine libre à l'équilibre. Après lavage, la radioactivité résiduelle fixée sur les membranes constitue la fixation totale.

La fixation non spécifique est déterminée en présence de 100 M excès de chaque variant glycanique non marqué à l'iode. La fixation spécifique est calculée en retranchant la fixation non spécifique de la fixation totale. Les résultats sont exprimés, d'une part en ng de sérotransferrine fixée en fonction de la concentration en sérotransferrine ajoutée et, d'autre part selon la technique de SCATCHARD (1949).

La représentation de Scatchard fait apparaître l'existence d'une ou de plusieurs catégories de sites de fixation d'un ligand sur son récepteur. En représentant la quantité de ligand fixé divisée par la quantité de ligand libre en fonction de la concentration en ligand fixé, on obtient une droite dont la pente est égale à $-K_a$ et dont l'intersection avec l'axe des abscisses donne n qui est le nombre maximum de sites de fixation. Les valeurs obtenues ont été calculées par ordinateur selon la méthode des moindres carrés pour une ou deux classes de sites.

III - CARACTERISATION DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA TRANSFERRINE SYNTHETISEE PAR DES HEPATOCYTES HUMAINS EN CO-CULTURE

A - CULTURE DES HEPATOCYTES HUMAINS

Les cultures d'hépatocytes humains ont été réalisées dans le Laboratoire du Professeur GUILLOUZO (Unité INSERM, U16, Rennes). Les hépatocytes humains sont maintenus en co-culture avec une lignée de cellules épithéliales de foie (GUGUEN-GUILLOUZO et al., 1983; GUILLOUZO et al., 1984 et LEBRETON et al., 1986). 2×10^6 hépatocytes sont cultivés entre le jour 1 et le jour 10 dans 3 ml d'un milieu de

culture qui est dépourvu de sérum de veau et enrichi en hydrocortisone (10^{-7} M).

B - ETUDE DES VARIANTS DE LA TRANSFERRINE SYNTHETISEE PAR LES HEPATOCYTES EN CO-CULTURE

Les milieux de co-culture d'hépatocytes humains nous sont parvenus sous forme lyophilisées. Les lyophilisats, provenant de 3 ml de milieu de culture, sont repris par 0,3 ml d'eau puis sont dessalés sur colonne de Biogel P-2. La fraction protéique est lyophilisée et reprise par 50 μ l de TBS, pH 7,8. 20 μ l de cette solution sont réservés pour une étude de la répartition des variants glycaniques de la transferrine par électrophorèse d'immuno-affinité bidimensionnelle en présence de concanavaline A. Le reste de la solution est utilisé d'une part, pour le dosage radio-immunologique de la transferrine présente dans le milieu de culture et d'autre part, pour vérifier l'homogénéité de la transferrine par électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS.

IV - ISOLEMENT DES VARIANTS DE LA TRANSFERRINE SYNTHETISEE PAR LES CELLULES HEP G2

A - IMMOBILISATION DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE

La sérotransferrine humaine (Behringwerke) est immobilisée sur le sépharose 4-B (Pharmacia) par la méthode au bromure de cyano-gène selon la méthode décrite par CUATRECASAS et al. (1968) et MARCH et al. (1974).

1 - Activation du sépharose 4-B par le bromure de cyanogène

100 ml de sépharose 4-B sont lavés sur un filtre en verre fritté (porosité = G3) par de grands volumes d'eau distillée froide. Le gel séché est transvasé dans un bécher contenant 100 ml de K_2CO_3 2 M, pH 11,8, placé dans la glace. Le gel est activé par addition de 4 ml de BrCN dans l'acétonitrile (0,25 mg de BrCN par ml d'acétonitrile) et agitation douce pendant 2 min. Le gel activé est ensuite transvasé dans un filtre en verre fritté, lavé abondamment par de l'eau froide et séché.

2 - Immobilisation de la sérotransferrine humaine

La sérotransferrine humaine saturée en fer (5 mg/ml de gel activé) est solubilisée dans 50 ml de $NaHCO_3$ 0,2 M, pH 8,5. Le gel activé et séché est mélangé à la solution de sérotransferrine et la suspension est agitée sur un mélangeur rotatif pendant 48 h à 4°C.

Le gel est ensuite transvasé dans un filtre en verre fritté et lavé par 500 ml de $NaHCO_3$ pour éliminer l'excès de protéine non couplée. Un dosage de protéines selon la méthode de PETERSON (1977) est réalisé sur le filtrat afin de déterminer le rendement de couplage. Le gel est ensuite resuspendu dans 50 ml d'éthanolamine 1 M pour bloquer les groupements actifs encore libres et agité 2 h à 20°C. Le gel est ensuite lavé successivement par 500 ml d'eau, 500 ml d'acétate de sodium 0,1 M, NaCl 1 M, pH 4,5, 500 ml de $NaHPO_4$ 0,1 M, NaCl 1 M, pH 8,15 et 500 ml de TBS. Le gel est ensuite monté dans une colonne (2,6 x 25 cm) et équilibré dans le TBS.

B - PREPARATION DE LA COLONNE D'IMMUNOAFFINITE

1 - Isolement des anticorps dirigés contre la sérotransferrine humaine

Les IgG anti-sérotransferrine humaine sont isolées de l'immunsérum préparé chez le Lapin par chromatographie d'affinité sur colonne de sérotransferrine humaine immobilisée sur le sépharose 4-B.

50 ml d'immunsérum de Lapin sont injectés sur une colonne de 100 ml de sérotransferrine-Sépharose 4-B équilibrée dans le TBS à un débit de 20 ml/h. La colonne est ensuite rincée par du TBS à un débit de 50 ml/h jusqu'au retour à la ligne de base de l'absorbance à 280 nm. Les protéines, retenues non spécifiquement sur le gel, sont éluées par 100 ml de TBS, NaCl 1 M puis le gel est rééquilibré par 50 ml de TBS. L'éluat des IgG anti-sérotransferrine est réalisée par le passage de tampon glycolle-HCl 0,2 M, pH 2,8. L'éluat est collecté dans des tubes contenant du Tris 1 M afin de ramener immédiatement le pH à 7 - 7,5. Après élution des IgG, la colonne est rééquilibrée dans le TBS.

La fraction IgG anti-sérotransferrine humaine est rassemblée et un dosage de protéines (PETERSON, 1977) sur une fraction aliquote est effectué.

2 - Immobilisation des anticorps anti-sérotransferrine humaine

Les IgG anti-sérotransferrine humaine sont mises à dialyser 48 h contre 4 fois 1 litre de NaHCO₃ 0,2 M pH 8,5 puis immobilisées sur du Sépharose 4-B activé au BrCN, selon la méthode décrite au paragraphe IV-A-2 p. 157, à raison de 5 mg de protéines par ml de gel.

Les IgG immobilisées sont ensuite montées dans une colonne de 10 ml (IBF) (1 x 10 cm) et équilibrées dans le TBS.

C - ISOLEMENT DE LA SEROTRANSFERRINE DES MILIEUX DE CULTURE DES CELLULES HEP G2

1 - Récupération des milieux de culture

15 x 10⁶ cellules Hep G2 sont cultivées dans 30 ml de DMEM enrichi en sérum de veau foetal et dans des flacons de 175 cm² sous les conditions décrites au paragraphe V-A p. 159. Au bout de 5 à 6 jours, le milieu de culture est récupéré. Après addition d'un cocktail d'antiprotéases (fluorure de phénylméthylsulfonate, 1 mM; dithiothréitol, 1 mM; aprotinine, 1 mM; MgCl₂, 1 mM et NaN₃, 0,02 % (p/v)), le milieu est centrifugé à 1000 t/min pendant 10 min afin d'éliminer les cellules flottantes.

2 - Isolement de la sérotransferrine des milieux de culture

La sérotransferrine, synthétisée par les cellules Hep G2, est isolée du milieu de culture par chromatographie d'affinité sur colonne d'anticorps anti-sérotransferrine immobilisés sur Sépharose 4-B.

L'injection du milieu de culture est réalisée à un débit de 10 ml/h. La chromatographie est suivie par détection de l'absorbance à 280 nm. Les différents lavages (TBS; TBS, NaCl 1 M; TBS) sont effectués à un débit de 30 ml/h. La sérotransferrine fixée aux anticorps est éluée par le tampon glyco-colle-HCl 0,2 M, pH 2,8. L'éluat est immédiatement ramené à pH 7,4 par addition d'1/10 du volume initial d'une solution de citrate trisodique 1 M, bicarbonate de sodium 1 M et du Tris rajouté en poudre. Après addition de la solution de chlorure ferrique d'AZARI et BAUGH (500 µg de FeCl₃ par ml), la sérotransferrine saturée en fer est concentrée sous vide à 3 ml par Immersible CX 10 (Millipore) puis est dessalée sur une colonne de Biogel P-2 (Biorad) (1,4 x 75 cm) équilibrée dans l'eau et enfin lyophilisée.

V - INTERACTIONS DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA SÉROTRANSFERRINE HUMAINE AVEC LES CELLULES HEP G2

A - CULTURE DES CELLULES HEP G2

Les cellules Hep G2, lignée cellulaire provenant de biopsies de tumeur de foie humain (ADEN et al., 1979; KNOWLES et al., 1980) nous ont été aimablement fournies par le Professeur TROUET de l'Université de Louvain.

Les cellules Hep G2 sont cultivées dans un milieu minimum essentiel de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM), tamponné par 10 mM Hépès pH 7,3, auquel sont ajoutés 10⁵ unités de pénicilline et 100 mg de streptomycine par litre. Le milieu est enrichi par 10 % de sérum de

veau foetal (Gibco). Les cellules sont placées dans une étuve humide à 37°C en présence de 5 % CO₂ *.

1 x 10⁶ cellules sont mises à proliférer dans un flacon de 25 cm² (Falcon) contenant 5 ml de DMEM enrichi en sérum de veau foetal. Après 5 jours, les cellules, dont la population a triplé, sont décollées par une solution de trypsine 0,25 %, EDTA 0,1 % dans le PBS. Après centrifugation à 1000 t/min pendant 10 min. et comptage d'une fraction aliquote sur cellule de Neubauer, les cellules sont réparties, soit dans des flacons de 25 cm² pour une nouvelle culture (1 x 10⁶ cellules par flacon), soit dans des boîtes de 24 puits de 2 cm² (Linbro) (0,3 x 10⁶ cellules par puits) afin de réaliser les incubations avec les variants radioactifs de la sérotransferrine.

B - INCUBATION DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA SÉROTRANSFERRINE HUMAINE AVEC LES CELLULES HEP G2

1 - Conditions d'incubation

Les incubations sont réalisées dans des boîtes de 24 puits de 2 cm² contenant 0,5 à 0,75 x 10⁶ cellules après 3 à 5 jours de culture (75 % de confluence minimum).

Les cellules sont d'abord lavées deux fois à 4°C avec 1 ml par puits de DMEM tamponné par de l'Hépès 25 mM pH 7,3 et non enrichi en sérum de veau foetal puis sont ensuite incubées à 37°C pendant une heure dans 1 ml par puits de DMEM identique au précédent, afin d'éliminer la transferrine endogène.

Le milieu est ensuite éliminé et remplacé par chacun des variants glycaniques de la sérotransferrine, marqués à l'¹²⁵I ou non marqués, dilué dans 400 µl de DMEM contenant 1 % de séralbumine bovine préalablement débarrassée des traces de transferrine bovine contaminante.

* Nous remercions Madame Myriam CONIEZ qui a réalisé l'entretien et le repiquage des cellules.

Les cellules sont ensuite incubées 2 h à 4°C en présence de 5 % CO₂ puis le milieu contenant les variants radioactifs est éliminé. Les cellules sont lavées trois fois par 1 ml de PBS, décollées par trois fois 0,2 ml de NaOH 0,1 N et la radioactivité fixée sur les cellules est comptée dans un compteur multigamma (Compugamma, LKB).

Un dosage de protéines selon la méthode de PETERSON (1977) est réalisé sur chaque point afin d'évaluer le nombre exact de cellules dans chaque puits, une gamme étalon étant réalisée en fonction du nombre de cellules (1 mg de protéines pour 4 x 10⁶ cellules).

2 - Détermination des paramètres de fixation

La constante apparente de fixation Ka et le nombre de sites par cellule sont déterminés en incubant des quantités croissantes des différents variants de la sérotransferrine marqués à l'¹²⁵I (0,1 à 3,2 µg/ml de milieu d'incubation) dans les conditions définies précédemment. Les essais sont réalisés en triple exemplaires.

Les résultats sont exprimés, d'une part en ng de sérotransferrine fixée en fonction de la concentration en sérotransferrine ajoutée et, d'autre part selon la représentation de SCATCHARD (1949) (voir le paragraphe II B-2 p. 153).

VI - METHODES ANALYTIQUES

A - METHODES CHIMIQUES

1 - Etude de la protéine

a - *Dosage des protéines*

La concentration en protéines des cellules Hep G2 et des membranes du syncytium trophoblastique est déterminée par la méthode de LOWRY et al. (1951) modifiée pour le dosage des protéines solubles et membranaires par PETERSON (1977).

5 à 100 µg de protéines en solution sont ajustés à 1 ml par de

l'eau distillée. Après addition de 0,1 ml de déoxycholate de sodium 0,15 %, les tubes sont agités et laissés à température ambiante pendant 10 min. Les protéines sont ensuite précipitées par addition de 0,1 ml d'une solution d'acide trichloracétique à 72 %. Après agitation et centrifugation à 3 000 g pendant 20 min, le surnageant est éliminé par aspiration.

Après addition d'1 ml d'eau, le culot protéique est solubilisé par 1 ml de réactif A, mélangé et laissé 10 min à température ambiante. 0,5 ml de réactif B sont ensuite ajoutés et la coloration est développée à l'obscurité pendant 30 min. La concentration en protéines est déterminée par lecture de l'absorbance à 750 nm contre une gamme étalon de séralbumine bovine variant de 5 à 100 µg.

Réactif A : 25 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 0,4 % et 25 ml de tartrate de potassium à 0,8 % sont mélangés lentement à 50 ml de carbonate de sodium à 20 %. Le réactif A est préparé par le mélange d'un volume de la solution précédente, d'un volume de NaOH 0,8N, d'un volume de dodécyl sulfate de sodium 10 % (SDS) et d'un volume d'eau. Il se conserve deux semaines à température ambiante et à l'obscurité.

Réactif B : un volume de réactif au phénol de Folin-Ciocalteu (Merk, Darmstadt) et 5 volumes d'eau. Le garder à l'obscurité.

Pour des concentrations de 1 à 20 µg de protéines, le dosage peut être effectué en divisant par 5 la quantité de réactif A et de réactif B.

b - Saturation en fer de la sérotransferrine humaine

La saturation en fer de la sérotransferrine est réalisée selon la méthode d' AZARI et BAUGH (1967).

La sérotransferrine est solubilisée dans un tampon citrate de sodium 0,1 M, bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 8,2, à raison de 100 mg de sérotransferrine par ml de tampon. La saturation en fer est réalisée par addition d'une solution de chlorure ferrique (260 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dissous dans 100 ml du tampon citrate bicarbonate 0,1 M.) La quantité de fer de cette solution est déterminée par dosage colorimétrique à la sulfobathophénantroline (Biopack-Fer, Biotrol, Paris). 0,15 µg de fer sont nécessaires pour saturer 1 mg de sérotransferrine,

à 4°C pendant 24 h.

c - Marquage de la sérotransferrine humaine à l'¹²⁵I

Le marquage de la sérotransferrine à l'¹²⁵I est réalisé par la méthode à l'Iodogène (Pierce) décrite par FRACKER et SPECK (1978) et SALINSCKY *et al.* (1981).

Des tubes à hémolyse en verre sont tapissés par 100 µg d'Iodogène mis en solution dans le chloroforme à raison de 1 mg/ml, après évaporation du chloroforme par un courant d'azote. La solution d'iode radioactive est composée de 2 µl d'¹²⁵I (NaI, sans entraîneur; 5 mCi/50 µl; Amersham) mélangés à 8 µl de NaI froid 20 mM dans un tampon phosphate 50 mM, pH 7,4.

La solution de sérotransferrine (500 µg/100 µl de tampon phosphate 50 mM, pH 7,4) est placée dans le tube contenant l'Iodogène. La solution d'iode radioactive est alors ajoutée et le tube est placé dans la glace, sous agitation douce, pendant 10 min.

La sérotransferrine marquée à l'¹²⁵I est séparée de l'iode en excès par dessalage sur une colonne de Séphadex G-25 (Pharmacia) équilibrée dans le tampon utilisé pour les incubations avec les cellules ou les membranes.

Le rendement de marquage (supérieur à 90 %) et la radioactivité spécifique sont déterminés après mesure de la concentration en protéine (absorbance à 280 nm) et comptage de la radioactivité d'une fraction aliquote dans un compteur multigamma (Compugamma, LKB).

2 - Etude des glycanes

a - Détermination des rapports molaires

La composition molaire en monosaccharides a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse, après méthanolyse et triméthylsilylation, selon la méthode décrite par KAMERLING *et al.* (1975). Cette technique permet de doser des quantités de l'ordre de 1 à 5 µg de monosaccharides.

25 à 50 µg d'oligosaccharides sont méthanolysés en présence de 1 µg de mésoinositol, utilisé comme témoin interne, par 0,25 ml de méthanol chlorhydrique 0,5 N à 80°C pendant 24 h. La N-réacétylation

est effectuée, en présence de quelques grains de carbonate d'argent, par addition de 10 µl d'anhydride acétique à 20°C, 18 h à l'obscurité. Après centrifugation, le surnageant, introduit dans une pipette Pasteur scellée à une extrémité, est délipidé trois fois par 0,25 ml d'heptane bidistillé puis évaporé sous courant d'azote. Le résidu sec est repris par 20 µl de pyridine et 20 µl de réactif de silylation (BSTFA : Bis-Silyl-Trifluoroacétamide). La réaction est effectuée en 3 h à 20°C. Les monosaccharides silylés sont analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire (0,32 mm x 20 m) CP Sil 5-B. La température varie de 120 à 240°C, à raison de 2°C/min. La pression d'entrée du gaz vecteur (hélium) est de 0,5 bars.

b - Désialylation de la sérotransferrine humaine

50 mg de sérotransferrine humaine solubilisés dans 1 ml de tampon citrate de sodium 0,1 M, pH 5,1, sont déposés sur une colonne de neuraminidase immobilisée sur billes d'agarose (1,6 x 2,5 cm) (Sigma, USA). Après recyclage pendant 48 h à 37°C, l'asialo-sérotransferrine est purifiée par dessalage sur colonne de Séphadex G-25 (1,6 x 10 cm) dans le tampon utilisé pour les incubations avec les cellules.

La désialylation complète de la sérotransferrine est vérifiée par chromatographie en phase gazeuse des produits triméthylsilylés, après méthanolyse et N-réacétylation. La méthode est décrite dans le paragraphe précédent.

c - Libération des oligosaccharides par hydrolyse alcaline douce

Les oligosaccharides sont préparés suivant la méthode de LEE et SCOCCA (1972) par hydrolyse alcaline des liaisons amides en milieu alcalin réducteur et à chaud.

5 mg de sérotransferrine sont solubilisés dans 0,5 ml d'une solution de NaOH 1 M, BH_4K 1 M et chauffés au bain marie à 100°C pendant 6 h. La réaction est ensuite arrêtée par refroidissement à 4°C et addition d'acide acétique jusqu'à pH 4. La solution est dessalée sur colonne de Biogel P-2 (1 x 30 cm) (Biorad) équilibrée dans l'eau. La fraction glucidique est ensuite concentrée à sec, reprise par 0,3

ml de NaHCO_3 saturé puis N-réacétylée par addition de cinq fois 20 μl d'anhydride acétique toutes les 20 min. Cette solution est dessalée sur colonne de Biogel P-2 et la fraction oligosaccharidique est lyophilisée.

d - Libération des oligosaccharides par hydrazinolyse

Les oligosaccharides de la sérotransferrine sont préparés par hydrazinolyse puis N-réacétylés selon la méthode de READING et al. (1978).

1 à 1,5 mg de sérotransferrine sont solubilisés dans 0,3 ml d'hydrazine anhydre. Le tube bouché hermétiquement est placé 2 h à 100°C. A la fin de la réaction, l'hydrazine est évaporée sous courant d'azote. Le culot est repris deux fois par 1 ml de toluène et évaporé sous azote puis repris par 0,5 ml d'eau et dessalé sur colonne de Biogel P-2. Après lyophilisation, la fraction oligosaccharidique est reprise par 0,3 ml de NaHCO_3 saturé et N-réacétylée par addition de cinq fois 10 μl d'anhydride acétique toutes les 20 min, à 20°C. La réaction est arrêtée par acidification avec de la résine Dowex 50 x 8, 25 - 50 mesh, sous forme H^+ . La résine est lavée par 10 ml d'eau et l'éluat est concentré à l'évaporateur rotatif et dessalé sur colonne de Biogel P-2. Les oligosaccharides sont ensuite réduits par addition de 1 mg de BH_4K , après avoir ajusté le pH à 9 avec NH_4OH 1 M. La réaction est arrêtée après 2 h par dessalage sur colonne de Biogel P-2 et la fraction contenant les oligosaccharides est lyophilisée.

e - Etude de la structure des glycanes par résonance magnétique nucléaire

Les analyses en résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton à 400 MHz des oligosaccharides ont été réalisées au Laboratoire dans le Centre Commun de Mesures de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois*.

* Nous remercions Monsieur Jean-Michel WIERUSZESKI qui a effectué les analyses et l'interprétation des spectres RMN.

Les analyses RMN sont réalisées sur des solutions oligosaccharidiques dans D₂O (99,95 %, CEA, France) préalablement échangées plusieurs fois par D₂O à 27°C avec lyophilisations intermédiaires de façon à obtenir un échange des hydrogènes mobiles.

Les analyses sont effectuées à l'aide d'un appareil BRUKER AM-400 WB (400 MHz) opérant en transformés de Fourier. Les glissements chimiques sont donnés par rapport au sodium-4, 4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonate (indirectement par rapport à l'acétone ajoutée dans D₂O; $\delta = 2,225$ ppm)

Les spectres RMN sont interprétés par comparaison avec les valeurs fournies par la littérature (VLIEGENTHART et al., 1981; 1983)

f - Etude de la structure des glycannes en spectrométrie de masse par analyse des dérivés méthylés

La méthylation des oligosaccharides est réalisée selon le protocole décrit par FINNE et al. (1980) et adapté au Laboratoire par FOURNET et al. (1981).

50 µg d'oligosaccharides sont lyophilisés dans un tube Sovirel. Après addition de 50 µl de DMSO (diméthylsulfoxyde) sous azote, la solution est soniquée 15 min. 50 µl de base de méthylation (lithium méthylsulfinyl carbanion), préparée selon PAZ-PARENTE et al. (1985) et préalablement chauffée à 37°C, sont ajoutés à la solution oligosaccharidique qui est ensuite soniquée pendant 1 h puis congelée à -20°C. L'excès de base est éliminé par addition de 150 µl d'iodure de méthyl et le tube est laissé à l'obscurité pendant 24 h.

Les extractions sont réalisées par addition de 1 ml d'eau milli-Q (Millipore) et de un ou deux cristaux de thiosulfate de sodium. La phase aqueuse est lavée trois fois par 1 ml de chloroforme. Les phases chloroformiques sont lavées cinq fois par 1 ml d'eau milli-Q puis déshydratées par addition de sulfate de sodium. La solution est filtrée sur laine de verre, évaporée sous azote et lyophilisée.

Les composés méthylés sont méthanolysés par 100 µl de méthanol chlorhydrique 0,5 N pendant 24 h à 80°C puis séchés sous courant d'azote. La peracétylation est effectuée par addition de 10 µl de pyridine et 100 µl d'anhydride acétique pendant 24 h à 20°C. Les produits méthylés et méthanolysés, séchés sous azote, sont repris par

100 µl de méthanol bidistillé.

Les éthers méthyliques peracétylés sont analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire OV-101, couplée au spectromètre de masse RIBER MAG 10-10.

B - METHODES ELECTROPHORETIQUES

1 - Electrophorèse en gradient de gel de polyacrylamide en présence de SDS

Les électrophorèses en gradient de gel de polyacrylamide sont réalisées dans un appareil vertical en plaques (1,5 x 140 x 180 mm) (Biorad) dans le système tampon préconisé par LAEMMLI (1970).

Le gel de séparation est constitué d'un gradient variant de 4 à 15 % en acrylamide dans un tampon Tris-glycocolle, HCl, pH 8,9. Le gel de concentration est à 4 % en acrylamide dans un tampon Tris-glycocolle, HCl, pH 6,8. Le tampon d'électrophorèse et les gels d'acrylamide contiennent 0,1 % de SDS.

Les échantillons (5 µg de protéines par dépôt) sont solubilisés dans 100 µl de tampon Tris-HCl, 10 mM, pH 8,9 contenant 1 % de SDS et 10 % de glycérol et placés au bain marie à 100°C pendant 3 min. 25 µl de la solution échantillon sont déposés sur le gel d'acrylamide.

L'électrophorèse est réalisée à 100 V pendant la nuit, sous réfrigération d'eau froide. Après la migration, les protéines sont révélées soit à l'Amidoschwartz, soit transférées sur feuille de nitrocellulose.

2 - Electrophorèse en gradient de gel de polyacrylamide en présence de Triton X-100 et de déoxycholate de sodium

Les électrophorèses en gradient de gel de polyacrylamide sont réalisées comme dans le paragraphe précédent. Cependant, le SDS est remplacé par un mélange de Triton X-100 et de déoxycholate de sodium (DOC) dans un rapport 3 : 1.

Le tampon d'électrophorèse et les gels d'acrylamide contiennent 0,075 % de Triton X-100 et 0,025 % de DOC.

Les échantillons (50 à 100 µg de protéines membranaires) sont solubilisés dans 100 µl de tampon Tris-HCl 10 mM, pH 8,9, contenant 0,75 % de Triton X-100, 0,25 % de DOC et 10 % de glycérol. Les protéines sont incubées à 37°C pendant 30 min puis centrifugées 3 min à 100 000 g dans une centrifugeuse "Airfuge" (Beckman). 20 à 40 µg de la solution protéique surnageante sont déposés sur le gel d'acrylamide.

L'électrophorèse est réalisée à 70 V jusqu'à ce que le témoin coloré de migration atteigne le gel de séparation puis à 150 V durant la nuit, sous réfrigération d'eau froide.

Après la migration, les protéines sont soit colorées à l'Amidoschwartz, soit transférées sur feuille de nitrocellulose.

3 - Electrotransfert sur feuille de nitrocellulose (Western blotting)

Les protéines, séparées par électrophorèse en gel d'acrylamide, sont ensuite transférées par électrophorèse (cellule de transfert Biorad) sur une feuille de nitrocellulose (Schleicher et Schüll) dans le tampon Tris 25 mM, glycolle 192mM, pH 8,4, contenant 20 % (v/v) méthanol selon la méthode décrite par TOWBIN et al. (1979) et BURNETTE (1981). L'électrophorèse est réalisée à 200 mA, à 4°C pendant 3 h.

Après le transfert, les protéines fixées sur la nitrocellulose sont révélées soit par l'Amidoschwartz, soit par immuno-révélation.

C - METHODES IMMUNOLOGIQUES

1 - Préparation des immunsérums

A 1 mg de sérotransferrine humaine solubilisée dans 1 ml de sérum physiologique, on ajoute 0,5 ml d'adjuvant complet de Freund. Le mélange est injecté sur le dos d'un lapin en une quarantaine d'intra-dermos selon la méthode de VAITUKATIS et al. (1971). Après 15 jours, l'injection de 0,5 mg de sérotransferrine solubilisée dans 0,5 ml de sérum physiologique et 0,25 ml d'adjuvant complet de Freund est réalisée en intra-musculaire dans la patte arrière et répétée 15 jours après.

Une semaine après la dernière injection, le lapin est saigné par incision de la veine marginale de l'oreille (10 ml de sang la première fois puis 20 à 30 ml tous les 15 jours). Le sang est laissé une nuit à 4°C puis est centrifugé. L'immunsérum obtenu est conservé à -20°C. L'immunsérum est testé par immunodiffusion radiale et son titre est déterminé selon la méthode de BECKER (1969).

2 - Immuno-diffusion radiale

La technique utilisée a été décrite par MANCINI et al. (1965). L'antigène diffuse dans la gélose contenant l'immunsérum. Lorsque la zone d'équivalence est atteinte, il se forme un anneau de précipitation dont la surface est proportionnelle à la quantité d'antigène déposé.

L'agarose (Sigma, type II, médium EEO) est préparée à 1 g/100 ml du tampon suivant : Tris-HCl 72 mM, véronal sodé 24 mM, lactate de calcium 0,4 mM, pH 8,6. Le gel (150 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) contenant de l'anti-sérum anti-sérotransferrine humaine (1,5 %) est coulé sur une plaque de verre (7,5 x 15 cm). Les échantillons à analyser (2 μl d'une solution à 1 mg/ml) sont déposés dans des puits pratiqués à l'emporte-pièce dans l'agarose. Après diffusion en chambre humide pendant 48 h, la plaque est lavée, séchée et colorée à l'Amidoschwartz.

3 - Affino-immuno-électrophorèse bidimensionnelle

L'affino-immuno-électrophorèse bidimensionnelle est réalisée selon les méthodes décrites par SALIER et al. (1980) et NICOLLET et al. (1981).

La concanavaline A (Con A) (IBF) est introduite dans le gel d'agarose à 1 % à raison de 2 mg de Con A par ml de gel. Le tampon utilisé est composé par Tris-HCl 72 mM, véronal sodé 24 mM, lactate de calcium 0,4 mM, pH 8,6, en présence de MnCl_2 , MgCl_2 et CaCl_2 1 mM.

2 μg des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine sont introduits dans des puits pratiqués à l'emporte-pièce et migrent dans la gélose sous une tension de 10 V/cm pendant 3 h dans un appareil LKB 2117 multiphor muni d'une plaque réfrigérante.

Pour la deuxième dimension, l'agarose utilisé contient l'anti-sérum anti-sérotransferrine humaine monospécifique (0,2 %, v/v) et 10

mg d' α -méthylglucoside par ml de gélose. La migration est réalisée sous une tension de 2 V/cm durant 18 h et à 4°C. Les plaques sont ensuite lavées, séchées et colorées à l'Amidoschwartz.

4 - Immuno-révélation après électrotransfert

Après électrophorèse en gel d'acrylamide, les protéines sont transférées sur feuille de nitrocellulose puis révélées par des anticorps spécifiques.

Après l'électrotransfert, les protéines fixées sur la nitrocellulose sont incubées 4 h à 20°C avec un immunosérum anti-sérotransferrine humaine préparé chez le lapin (titre = 1,7 mg/ml) dilué au 1/5000 dans le TBS supplémenté avec 5 % (p/v) de lait écrémé en poudre, pH 8,0.

La nitrocellulose est ensuite lavée successivement par du TBS (10 min), du TBS contenant 0,05 % (p/v) Tween 20 (10 min) et du TBS (10 min). Ensuite, la nitrocellulose est réincubée 4 h à 20°C avec des IgG anti-IgG de Lapin, préparées chez le Mouton (Pasteur Productions) sur lesquelles est couplée la peroxydase du Radis noir, diluées au 1/5000 dans le TBS contenant 5 % de lait en poudre. Après une série de lavage comme précédemment, l'activité peroxydasique est révélée par un réactif à la DAB (3, 3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride) (Fluka) : 40 mg de DAB pour 100 ml de TBS et addition d'1 ml d'eau oxygénée à 30 % (p/p) (à préparer extemporanément). La nitrocellulose est immergée dans le réactif à la DAB jusqu'à apparition de bandes de couleur marron puis lavée extensivement à l'eau et conservée à l'abri de la lumière. Cette méthode permet de détecter jusqu'à 5 ng de sérotransferrine.

5 - Dosage radio-immunologique

La concentration de la sérotransferrine sécrétée par les cellules Hep G2 et présente dans le milieu de culture est évaluée par dosage radio-immunologique selon la méthode décrite par JOHNSTONE et THORPE (1982).

200 μ l d'immunosérum anti-sérotransferrine humaine monospécifique dilués au 1/200 avec NaHCO_3 0,2 M, pH 9,2 sont mis à incuber pendant 18 h à 37°C dans des tubes à ailettes (Startubes Nunc). Après élimina-

tion de la solution d'immunsérum et lavage par du TBS, les sites non occupés par les anticorps sont saturés par de la séralbumine bovine en solution à 1 % dans NaHCO_3 0,2 M, pH 9,2, pendant 2 h à 37°C. Les tubes sont ensuite rincés par du TBS.

100 μl des milieux de culture à doser sont mis à incuber avec une quantité constante de sérotransferrine humaine marquée à $1,^{125}\text{I}$ (50 μl d'une solution à 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dans les tubes tapissés par les anticorps pendant 4 h à 37°C. Parallèlement, une gamme étalon de sérotransferrine humaine marquée à $1,^{125}\text{I}$ est réalisée, la concentration en sérotransferrine variant de 36 ng à 20 000 ng/ml. Chaque essai est réalisé en trois exemplaires. Les tubes sont ensuite vidés, rincés trois fois par 1 ml de TBS puis la radioactivité résiduelle est comptée dans un compteur multigamma (Compugamma LKB).

D - METHODES ENZYMATIQUES

1 - Dosage de la phosphatase alcaline

Le dosage de la phosphatase alcaline présente dans les membranes du syncytiotrophoblaste est réalisé par le dosage du para-nitrophénol obtenu après libération du phosphate, en milieu alcalin, du para-nitrophényl phosphate selon la méthode décrite par BEAUFAY et al. 1974).

A 100 μl d'une solution membranaire est ajouté 1 ml du réactif suivant : glycine-KOH 5 mM, pH 9,0, acétate de magnésium 5 mM, KCl 70 mM, para-nitrophényl phosphate 5 mM. Cette solution est incubée 10 min à 37°C. Une gamme étalon est réalisée en remplaçant la solution membranaire par de l'eau et le para-nitrophényl phosphate par du para-nitrophénol (la concentration variant de 0 à 5 mM). La réaction est arrêtée par addition de 3 ml de NaOH 0,1 N et refroidissement à 4°C. Après centrifugation 3 000 g, 5 min, le para-nitrophénol libéré est évalué par lecture de l'absorbance à 400 nm. Les résultats sont exprimés en nanomoles de para-nitrophénol libérées par mg de protéines par minute.

2 - Dosage de la 5'-nucléotidase

L'activité de la 5'-nucléotidase des membranes du syncytium trophoblastique est déterminée par évaluation du taux de libération du phosphate inorganique à partir du 5'-AMP selon la méthode d'ARONSON et TOUSTER (1974).

Le réactif est composé d'un volume de Na-AMP 50 mM, pH 7,0, de deux volumes de glycolcolle-NaOH 0,5 M, pH 9,1, d'un volume de $MgCl_2$ 0,1 M et de cinq volumes d'eau.

A 50 μ l d'une solution de protéines membranaires sont ajoutés 450 μ l du réactif précédent. Cette solution est mise à incuber 30 min à 37°C. Une gamme étalon est réalisée en remplaçant la solution de protéines membranaires par de l'eau et en ajoutant 450 μ l de phosphate de sodium (de 0 à 0,5 μ mole). La réaction est arrêtée par addition de 2,5 ml d'acide trichloracétique à 8 % (p/v) et refroidissement à 4°C. Les échantillons sont centrifugés à 3 000 g, 5 min. A 2 ml du surnageant sont ajoutés 2,3 ml d'eau et 0,5 ml de molybdate d'ammonium à 2,5 % (p/v) dans H_2SO_4 5 N puis, après avoir mélangé, 0,2 ml d'acide aminonaphtolsulphonique 10 mM dans $NaHSO_3$ 1,5 M et Na_2SO_3 10 mM. Après un repos de 10 min, le phosphate inorganique libéré est mesuré par lecture de l'absorbance à 660 nm. Les résultats sont exprimés en micromoles de phosphate libérées par mg de protéines membranaires et par minute.

3 - Déglycosylation par la N-Glycanase

La N-Glycanase (Genzyme, Boston, USA) est un enzyme purifié de cultures de *Flavobacterium meningosepticum* qui hydrolyse les oligosaccharides liés N-glycosidiquement à l'asparagine des glycoprotéines, libérant ainsi les oligosaccharides et la protéines avec un acide aspartique au niveau du site de glycosylation (ELDER et ALEXANDER, 1982; PLUMMER et al., 1984; TARENTINO et al., 1985).

Le protocole de déglycosylation est celui préconisé par la firme Genzyme. Brièvement, 10 μ l de solution de transferrine (2 mg/ml) sont chauffés à 100°C pendant 3 mn en présence de 0,5 % SDS et 0,1 M β -mercaptoéthanol. L'échantillon est dilué par addition de 10,8 μ l de tampon phosphate de sodium 0,55 M, pH 8,6, de 3 μ l de 1, 10 phénanthrolinehydrate 100 mM dans le méthanol et de 5 μ l de Nonidet

P-40 à 7,5 %. 0,3 unités de N-Glycanase sont alors ajoutées et la solution est incubée à 37°C pendant 24 heures.

TAMPONS

TAMPON PBS : Phosphate Buffered Saline

Solution A : NaH_2PO_4 , 2 H_2O 10 mM; NaCl 0,145 M (1 litre)

Solution B : Na_2HPO_4 , 12 H_2O 10 mM; NaCl 0,145 M (0,2 litre)

Ajuster la solution A à pH 7,4 avec la solution B.

TAMPON DE HANK'S ET WALLACE

NaCl : 8 g

KCl : 0,4 g

MgSO_4 : 0,2 g

Na_2HPO_4 : 0,11 g

K_2PO_4 : 0,06 g

Glucose : 1 g

H_2O q.s.p. 1 litre

TAMPON TBS : Tris Buffered Saline

Tris : 50 mM

NaCl : 150 mM

NaN_3 : 5 mM

Ajuster le pH à 7,8 avec HCl 2N; H_2O q.s.p. 1 litre

BIBLIOGRAPHIE DE L'APPENDICE TECHNIQUE

- ADEN, D.P., FOGEL, A., DAMJANOV, I., PLOTKIN, S. et KNOWLES, B.B. (1979) *Nature*, 282, 615-617
- ARONSON, N.N. et TOUSTER, O. (1974) *Meth. Enzymol.*, 31, 90-103
- AZARI, D. et BAUGH, R.F., (1967) *Arch. Biochim. Biophys.*, 118, 138-144
- BEAUFAY, H., AMAR-COSTESECC, A., FEYTMANS, E., THINES-SEMPOUX, D., WIBO, M., ROBBI, M. et BERTHET, J. (1974) *J. Cell Biol.*, 161, 188-200
- BECKER, S. (1969) *Immunochemistry*, 6, 539-546
- BOOTH, A.G., OLANIYAN, R.O. et VANDERPUYE, O.A. (1980) *Placenta*, 1, 327-336
- BURNETTE, M.N. (1981) *Anal. Biochem.*, 112, 195-203
- CUATRECASAS, P., WILCHEK, M. et ANFINSEN, C.B. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 61, 636-643
- ELDER, J.H. et ALEXANDER, S. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 4540-4544
- FINNE, J., KRUSIUS, T. et RAUVALA, H. (1980) *Carbohydr. Res.*, 80, 336-339
- FOURNET, B., STRECKER, G., LEROY, Y. et MONTREUIL, J. (1981) *Anal. Biochem.*, 116, 489-502
- FRAKER, P. et SPECK, J. (1978) *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 80, 849-857
- GUGUEN-GUILLOUZO, C., CLEMENT, B., BAFFET, G., BEAUMONT, C., MOREL-CHANY, E. et GUILLOUZO, A. (1983) *Exp. Cell Res.*, 143, 47-54
- GUILLOUZO, A., DELERS, F., CLEMENT, B., BERNARD, N. et ENGLER, R. (1984) *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 120, 311-317
- HANK'S, J.H. et WALLACE, R.E. (1949) *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 71, 196
- JOHNSTONE, A. et THORPE, R. (1982) in "Immunochemistry in practise", Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edimburgh, pp. 233-255

- KAMERLING, J.P., GERWIG, G.J., VLIEGENTHART, J.F.G. et CLAMPS, J.R. (1975) *Biochem. J.*, 151, 491-495
- KNOWLES, B.B., HOWE, C.C. et ADEN, H.P. (1980) *Science*, 209, 497-499
- LAEMMLI, U.K. (1970) *Nature*, 227, 680-685
- LEBRETON, J.P., DAVEAU, M., HIRON, M., FONTAINE, M., BIOU, D., GILBERT, D. et GUGUEN-GUILLOUZO, C. (1986) *Biochem. J.*, 235, 421-427
- LEE, Y.C. et SCOCCA, J.R. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 5733-5758
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. et RANDALL, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265
- MANCINI, G., CARONARA, A.O. et HEREMANS, J.F. (1965) *Immunochemistry*, 2, 235-254
- MARCH, S.C., PARIKH, I. et CUATRECASAS, P. (1974) *Anal. Biochem.*, 60, 149-152
- NICOLLET, I., LEBRETON, J.P., FONTAINE, M. et HIRON, M. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, 668, 235-241
- PAZ-PARENTE, J., CARDON, P., LEROY, Y., MONTREUIL, J., FOURNET, B. et RICART, G. (1985) *Carbohydr. Res.*, 141, 41-47
- PETERSON, G.L. (1977) *Anal. Biochem.*, 83, 346-356
- PLUMMER, T.H., ELDER, J.H., ALEXANDER, S., PHELAN, A.W. et TARENTINO, A.L. (1984) *J. Biol. Chem.*, 259, 10700-10704
- READING, C.L., PENHOET, E. et BALLOU, C. (1978) *J. Biol. Chem.*, 253, 5600-5612
- SALACINSKY, P.R.P., MAC LEAN, C., SYKES, S.E.C., LEMEN-JONES, V.V. et LOWRY, P.J. (1981) *Anal. Biochem.*, 117, 136-146
- SALIER, J.P., FAYE, L., VERGAINE, D. et MARTIN, J.P. (1980) *Electrophoresis*, 1, 193-197
- SCATCHARD, G. (1949) *Ann. New-York Acad. Sci.*, 51, 660-672
- SMITH, N.C., BRUSH, M.G. et LUCKETT, S. (1974) *Nature*, 252, 302
- SMITH, C.H., NELSON D.M., KING, B.F., DONOHUE, T.M., RUZYCKI, S.M. et KELLEY, L.K. (1977) *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 128, 190-196
- TARENTINO, A.L., GOMEZ, C.M. et PLUMMER, T.H. (1985) *Biochem. J.*, 24, 4665-4671
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. et GORDON, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350-4354



- VAITUKATIS, J., ROBBINS, J.B., NIESCHLAG, E. et ROSS, G.T. (1971) J. Clin. End., 33, 988-991
- Vliegenthart, J.F.G., Dorland, L. et Van Halbeek, H. (1983) Adv. Carb. Chem. Biochem., 41, 209
- Vliegenthart, J.F.G., Van Halbeek, H. et Dorland, L. (1981) Pure Appl. Chem., 53, 45
- Wong, K.L., Debanne, M.T., Hatton, M.W.C. et Regoeczi, E. (1978) Int. J. Peptide Protein Res., 12, 27-37
- Zanetta, J.P., Breckenridge, W.C. et Vincendon, G. (1972) J. Chromatogr., 69, 291-304

RESUME

La transferrine (Tf) plasmatique humaine présente une microhétérogénéité liée à l'existence de glycanes de type N-acétyllactosaminique biantenné ou triantenné. Par chromatographie d'affinité sur concanaviline A, la Tf du sérum humain a été séparée en trois variants glycaniques : les variants Tf-I (0 à 1%), Tf-II (15 à 18%) et Tf-III (75 à 80%) portant respectivement deux glycanes triantennés, un glycanne biantenné et un glycanne triantenné, deux glycanes biantennés.

Une augmentation du taux des variants Tf-I et Tf-II a été mise en évidence par immuno-affino-électrophorèse dans le sérum de femmes enceintes et, dans les milieux de culture des cellules Hep G2 (hépatocarcinome humain) seul le variant Tf-I a été détecté. La détermination de la structure des glycanes de la Tf isolée du milieu de culture a révélé la présence de structures tri-, tétra- et pentaantennées renfermant un à trois résidus de fucose, à l'exclusion de toute structure biantennée.

Au cours de la grossesse et de la transformation cancéreuse des hépatocytes, les besoins en fer sont augmentés; nous avons donc recherché une relation entre l'augmentation de la polyantennarisation des glycanes et la fixation des variants Tf-I et Tf-II sur les récepteurs membranaires du placenta humain et des cellules Hep G2. La mise au point d'une méthode d'électrotransfert en présence de détergents non-dissociants a permis de mettre en évidence le complexe Tf-récepteur et de démontrer que chacun des trois variants glycaniques se fixe sur un même récepteur avec une constante d'affinité qui diminue lorsque le nombre de glycanes triantennés augmente.

En conclusion, l'augmentation de la polyantennarisation provoque une faible modification de la fixation des variants sur le récepteur membranaire qui serait susceptible d'entraîner une modification du transfert du fer dans les cellules.

MOTS CLES

Sérotransferrine ; glycanes; polyantennarisation; grossesse; placenta; hépatocytes; hépatocarcinome; récepteurs membranaires.