

Exemplaire provisoire

consultation sur place
uniquement

Exclu du
pét.

Mémoire présenté à

l'Université des Sciences et Techniques

de Lille Flandres-Artois

pour

l'obtention du grade de Docteur ès Sciences Naturelles

par

Didier LEGER

ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE FONCTIONS DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN.
Influence de la modification de la partie peptidique, glycanique et des
sites de fixation du fer sur l'incorporation du fer par les réticulocytes
de Lapin.

TABLE DES MATIERES



PAGES

INTRODUCTION GENERALE

GENERALITES

INTRODUCTION

I. REPARTITION DU FER DANS L'ORGANISME	1
II. LE GROUPE DES TRANSFERRINES	1
LOCALISATION DE LA SEROTRANSFERRINE	4
I. CONCENTRATION DE LA SEROTRANSFERRINE DANS LE PLASMA	4
II. SYNTHESE ET CATABOLISME DE LA SEROTRANSFERRINE	4
STRUCTURE ET CONFORMATION DE LA PARTIE PROTEIQUE DES SEROTRANSFERRINES	5
I. STRUCTURE PRIMAIRE DES SEROTRANSFERRINES	5
A. Masse moléculaire	5
B. Séquence peptidique des sérotransferrines	5
1. <u>Sérotransferrine humaine</u>	5
2. <u>Autres sérotransferrines</u>	5
C. Homologies des séquences peptidiques des transferrines	8
D. Emplacement des ponts disulfures	8
E. Emplacement des glycanes des sérotransferrines	10
F. Polymorphisme des transferrines	10
1. <u>Polymorphisme de la sérotransferrine humaine</u>	10
2. <u>Polymorphisme des autres sérotransferrines animales</u>	10
II. CONFORMATION DE LA SEROTRANSFERRINE	11
A. Dimensions de la sérotransferrine	11
B. Structure secondaire de la sérotransferrine	11
C. Structure tertiaire de la sérotransferrine	11

1. <u>Données cristallographiques</u>	11
2. <u>Isolement des domaines structuraux des transferrines</u>	11
STRUCTURE ET CONFORMATION DE LA PARTIE GLYCANNIQUE DES TRANSFERRINES	
	14
I. STRUCTURE COVALENTE DES GLYCANNES	14
A. Structure des glycanes de la sérotransferrine	14
B. Structure de la partie glycanique des autres sérotransferrines	14
II. CONFORMATION DES GLYCANNES DE TYPE N-ACETYL LACTOSAMINIQUE	14
A. Conformation en "Y"	14
B. Conformation en "T"	17
C. Conformation en "oiseau"	17
D. Conformation en "aile brisée"	17
E. Conformation en "parapluie"	17
III. LES VARIANTS GLYCANNIQUES DES SEROTRANSFERRINES	19
A. Les variants glycaniques de la sérotransferrine humaine	19
B. Les variants glycaniques des autres transferrines	20
C. Conclusion	20
STRUCTURE ET CONFORMATION DES SITES DE FIXATION DU FER	
	22
I. NATURE DES METAUX FIXES	22
II. LA FIXATION DU FER	22
A. Propriétés chimiques et géométrie du fer	22
B. Mécanisme de fixation et de libération du fer de la sérotransferrine	23
1- <u>Nature de l'anion</u>	23
2- <u>Mécanisme de fixation du fer</u>	23
3- <u>Mécanisme de libération du fer</u>	25
C. Nature et localisation des ligands impliqués dans la fixation du métal	25

1- <u>Nature des ligands</u>	25
2- <u>Localisation des ligands du fer</u>	26
3- <u>Discussion</u>	27
III. DIFFERENCES ENTRE LES DEUX SITES DE FIXATION DU FER	27
A. Mise en évidence d'une différence entre les deux sites	27
B. Les différentes formes de saturation en fer de la sérotransferrine	29
C. Influence des ions sur la forme de saturation de la sérotransferrine	29
D. Différence de conformation entre les formes apo et saturées en fer des transferrines	31
1. <u>stabilité à la dénaturation</u>	31
2. <u>Preuves physiques de la différence de conformation</u>	31
3. <u>Différences d'antigénicité</u>	31
4. <u>Preuves biologiques de la différence de conformation</u>	31
.	
FONCTIONS BIOLOGIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE	32
I. ROLE DE LA SEROTRANSFERRINE DANS LE METABOLISME DU FER	32
1. <u>Rôle dans le transport du fer</u>	32
2. <u>Rôle dans l'absorption intestinale du fer</u>	32
3. <u>Rôle dans l'activité bactériostatique</u>	34
II. INCORPORATION CELLULAIRE DU FER DE LA SEROTRANSFERRINE	37
A. Le récepteur membranaire de la sérotransferrine	37
1. <u>Historique de la mise en évidence d'un récepteur membranaire</u>	37
2. <u>Universalité du récepteur de la sérotransferrine</u>	38
3. <u>Spécificité de la fixation de la sérotransferrine sur le récepteur</u>	39
4. <u>Structure et conformation du récepteur de la sérotransferrine</u>	39
B. Le récepteur de la sérotransferrine et l'entrée du fer dans la cellule	41
1. <u>La transferrine ne rentre pas dans la cellule</u>	41

2. <u>Endocytose de la transferrine par l'intermédiaire de son récepteur</u>	43
a. Hypothèse d'Octave <u>et al.</u>	43
b. Hypothèse de Dautry-Varsot et Lodish	43
c. Hypothèse de Pastan et Willingham	45
d. Existence de deux voies de recyclage du complexe transferrine-récepteur	45
e. Cas particulier de la transferrine dans l'endocytose via un récepteur et son recyclage	47
3. <u>Transport intracellulaire du fer</u>	49
C. Relation entre l'expression du récepteur et la prolifération cellulaire	49
D. Régulation du nombre de récepteurs de la sérotransferrine	50
E. Cas particulier de l'interaction sérotransferrine-hépatocyte	53
 CONCLUSIONS	 55
 TRAVAUX PERSONNELS	
 PURIFICATION DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN	 57
I. DIFFERENTES ETAPES DE LA PURIFICATION DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN	57
1. <u>Précipitation du plasma</u>	57
2. <u>Chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Séphadex</u>	57
3. <u>Chromatographie d'échange d'ions sur SP-Séphadex</u>	59
4. <u>Chromatographie d'affinité sur Con A-Sépharose</u>	59
5. <u>Chromatographie d'échange d'ions haute performance</u>	59
II. ANALYSE DES DIFFERENTES FRACTIONS OBTENUES AU COURS DE LA PURIFICATION	61
A. Electrophorèse en gel de polyacrylamide	61
B. Analyse de la composition en glycane des fractions isolées	61
1. <u>Composition centésimale et molaire en glucides</u>	61
2. <u>Affino-immuno-électrophorèse</u>	64
III. CONCLUSION	66

STRUCTURE ET CONFORMATION DE LA CHAINE
PEPTIDIQUE DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN 67

I. STRUCTURE PRIMAIRE DE LA CHAINE POLYPEPTIDIQUE 67

A. Masse moléculaire 67

B. Composition molaire en acides aminés 67

C. Détermination des séquences peptidiques 67

1. Séquence N-terminale 67

2. Séquence peptidique au niveau du point d'attache
du glycanne 69

II. CONFORMATION DE LA CHAINE POLYPEPTIDIQUE 69

A. Détermination de la structure secondaire de la
protéine par dichroïsme circulaire 69

1. Analyse des spectres dichroïques entre 180 et 250 nm 69

2. Analyse des spectres dichroïques entre 250 et 550 nm 69

3. Discussion 69

B. Isolement du domaine C-terminal par hydrolyse
protéolytique ménagée 69

1. Protéolyse ménagée de la serotransferrine de Lapin 71

2. Fractionnement des hydrolysats 71

3. Propriétés électrophorétiques des fragments
chymotrypsiques 71

4. Purification des fragments chymotrypsiques 71

5. Propriétés physico-chimiques des fragments purifiés 75

6. Discussion 75

III. CONCLUSIONS 77

ETUDE DES SITES DE FIXATION DU FER
DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN 78

I. INTRODUCTION 78

II. CARBETHOXYLATION DES RESIDUS D'HISTIDINE 78

A. Principe 78

B. Détermination des coefficients d'extinction
molaire de la carbéthoxy-histidine 79

C. Cinétique de carbéthoxylation des apo-transferrines	79
D. Capacité de fixation du fer des sérotransferrines carbéthoxylées en milieu non dénaturant	82
1. <u>Quantification du nombre de résidus d'histidine modifiés</u>	82
2. <u>Capacité résiduelle de fixation du fer des sérotransferrines modifiées</u>	82
3. <u>Spécificité de la modification</u>	84
4. <u>Régénération des résidus d'histidine modifiés</u>	84
E. capacité de fixation du fer des sérotransferrines carbéthoxylées en présence d'urée	84
1. <u>antification du nombre de résidus d'histidine modifiés en présence d'urée</u>	86
2. <u>Capacité résiduelle de fixation du fer des apo sérotransferrines modifiées en présence d'urée</u>	86
III. DIFFERENCE DE STABILITE DES DEUX SITES DE FIXATION DU FER EN FONCTION DU PH, DE LA FORCE IONIQUE ET DES CHELATEURS	90
A. saturation en fer	90
1. <u>Détermination de la capacité totale de fixation du fer de la sérotransferrine de Lapin</u>	90
2. <u>Influence du pH sur la saturation en fer des sérotransferrines</u>	90
3. <u>Fixation sélective du fer sur les sites N- et C-terminaux de la sérotransferrine de Lapin</u>	90
B. Désaturation en fer des sérotransferrines	92
1. <u>Influence du pH et des chélateurs du fer</u>	92
2. <u>Cinétiques de désaturation de la sérotransferrine de Lapin à différents pH, en présence de phosphate et d'EDTA</u>	95
IV. DISCUSSION	95
STRUCTURE ET ROLE DU GLYCANNE DANS LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET IMMUNOLOGIQUES DE LA SERO-TRANSFERRINE DE LAPIN	98
I. ETUDE DE LA STRUCTURE DU GLYCANNE DE LA SERO-TRANSFERRINE DE LAPIN	98
A. Hydrolyse pronasique	98
B. Fractionnement de l'hydrolysate pronasique	98

G.	Analyse des deux fractions glycopeptidiques	98
1.	<u>Composition en acides aminés</u>	98
2.	<u>Composition en glucides</u>	99
3.	<u>Perméthylation des glycopeptides</u>	99
4.	<u>Etude des spectres de RMN du proton à 360 Hz</u>	99
II.	DEGLYCOSYLATION ENZYMATIQUE DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN	103
A.	Préparation de la sérotransferrine déglycosylée	103
B.	Comportement chromatographique et électrophorétique de la sérotransferrine déglycosylée	103
C.	Composition en acides aminés et en sucres de la sérotransferrine déglycosylée	106
D.	Caractéristiques spectrales et dénaturation thermique	106
E.	Résistance à la protéolyse de la sérotransferrine déglycosylée	106
F.	Immunoréactivité de la sérotransferrine déglycosylée	109
II.	CONCLUSIONS	109
	INTERACTIONS DES SEROTRANSFERRINES HUMAINE ET DE LAPIN AVEC LES RETICULOCYTES DE LAPIN	112
I.	FIXATION DES SEROTRANSFERRINES HUMAINE ET DE LAPIN NON MODIFIEES ET TRANSFERT DU FER AUX RETICULOCYTES DE LAPIN	112
A.	Cinétique d'incorporation du fer	112
B.	Paramètres de la fixation des sérotransferrines sur les réticulocytes de Lapin	112
C.	Discussion	115
II.	INFLUENCE DU DEGRE DE SATURATION EN FER SUR LE TRANSFERT DU FER AUX RETICULOCYTES DE LAPIN	115
III.	INFLUENCE DES MODIFICATIONS DE LA CHAINE PEPTIDIQUE SUR L'INCORPORATION DU FER PAR LES RETICULOCYTES	117
1.	<u>Modification des résidus d'histidine</u>	117
2.	<u>Incorporation du fer par les fragments obtenus après hydrolyse chymotrypsique ménagée</u>	117
IV.	INFLUENCE DE LA PARTIE GLYCANNIQUE DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN DANS L'INTERACTION AVEC LES RETI-	

CULOCTES	117
A. Inhibition du transfert du fer aux réticulocytes par des glycopeptides et des oligosaccharides	117
1. <u>Utilisation des inhibiteurs natifs</u>	120
2. <u>Utilisation des dérivés sialylés neutralisés par la soude puis rechromatographiés sur Biogel P-2</u>	120
3. <u>Discussion</u>	123
B. Interaction de la sérotransferrine de Lapin déglycosylée avec les réticulocytes de Lapin	123
1. <u>Paramètres de la fixation</u>	123
2. <u>Incorporation du fer</u>	125
V. INFLUENCE DE LA PARTIE GLYCANNIQUE DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE DANS L'INTERACTION AVEC LES RETICULOCYTES DE LAPIN	125
1. <u>Paramètres de la fixation</u>	125
2. <u>Incorporation du fer</u>	125
3. <u>Discussion</u>	129
VI. CONCLUSION ET DISCUSSION	129
VARIANTS GLYCANNIQUES TRIANTENNES DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE: AUGMENTATION PENDANT LA GROSSESSE ET INTERACTION AVEC LE RECEPTEUR PLACENTAIRE	131
I. INTRODUCTION	131
II. EVOLUTION DU TAUX DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE PENDANT LA GROSSESSE	131
III. FIXATION DES VARIANTS GLYCANNIQUES SUR LES MEMBRANES MICROVILLEUSES DU PLACENTA	134
IV. VISUALISATION DU COMPLEXE SEROTRANSFERRINE-RECEPTEUR ET DEPLACEMENT DE LA SEROTRANSFERRINE ENDOGENE PAR PAR LES DIFFERENTS VARIANTS GLYCANNIQUES	136
1. <u>Visualisation de la sérotransferrine endogène</u>	136
2. <u>Essai de découplage du complexe sérotransferrine-récepteur</u>	136
3. <u>Refixation des variants sur les membranes traitées par NH SCN</u>	138
4. <u>Déplacement de la sérotransferrine endogène par les variants glycaniques</u>	138
V. DISCUSSION	138

CULOCTES	117
A. Inhibition du transfert du fer aux réticulocytes par des glycopeptides et des oligosaccharides	117
1. <u>Utilisation des inhibiteurs natifs</u>	120
2. <u>Utilisation des dérivés sialylés neutralisés par la soude puis rechromatographiés sur Biogel P-2</u>	120
3. <u>Discussion</u>	123
B. Interaction de la sérotransferrine de Lapin déglycosylée avec les réticulocytes de Lapin	123
1. <u>Paramètres de la fixation</u>	123
2. <u>Incorporation du fer</u>	125
V. INFLUENCE DE LA PARTIE GLYCANNIQUE DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE DANS L'INTERACTION AVEC LES RETICULOCYTES DE LAPIN	125
1. <u>Paramètres de la fixation</u>	125
2. <u>Incorporation du fer</u>	125
3. <u>Discussion</u>	129
VI. CONCLUSION ET DISCUSSION	129
VARIANTS GLYCANNIQUES TRIANTENNES DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE: AUGMENTATION PENDANT LA GROSSESSE ET INTERACTION AVEC LE RECEPTEUR PLACENTAIRE	131
I. INTRODUCTION	131
II. EVOLUTION DU TAUX DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE PENDANT LA GROSSESSE	131
III. FIXATION DES VARIANTS GLYCANNIQUES SUR LES MEMBRANES MICROVILLEUSES DU PLACENTA	134
IV. VISUALISATION DU COMPLEXE SEROTRANSFERRINE-RECEPTEUR ET DEPLACEMENT DE LA SEROTRANSFERRINE ENDOGENE PAR PAR LES DIFFERENTS VARIANTES GLYCANNIQUES	136
1. <u>Visualisation de la sérotransferrine endogène</u>	136
2. <u>Essai de découplage du complexe sérotransferrine-récepteur</u>	136
3. <u>Refixation des variants sur les membranes traitées par NH SCN</u>	138
4. <u>Déplacement de la sérotransferrine endogène par les variants glycaniques</u>	138
V. DISCUSSION	138

CONCLUSIONS GENERALES

141

BIBLIOGRAPHIE

APPENDICE TECHNIQUE

INTRODUCTION GENERALE

Les travaux dont nous rapportons les résultats, dans ce mémoire, s'inscrivent dans le cadre de ceux entrepris depuis longtemps au Laboratoire, sur l'étude des transferrines. La structure complète des deux glycanes biantennés de la sérotransferrine humaine a été réalisée au Laboratoire, ainsi que la mise en évidence d'une hétérogénéité glycanique, les glycanes pouvant être triantennés (Spik et al., 1974 ; Montreuil et Spik, 1975). La sérotransferrine, dont le rôle est essentiel dans le métabolisme du fer, représente un modèle intéressant pour l'étude de la participation des glycanes dans la reconnaissance des cellules-cibles.

C'est pourquoi, en 1975, nous a été confiée l'étude du rôle de la partie glycanique de la sérotransferrine dans l'interaction avec le réticulocyte, seule cellule reconnue à cette époque pour posséder un récepteur spécifique de la transferrine.

La plupart des travaux réalisés à ce moment, utilisaient un système hétérologue sérotransferrine humaine - réticulocytes de Lapin ; cependant les premières études de Jandl et al. (1963) avaient montré que l'incorporation du fer en système homologue (sérotransferrine de Lapin - réticulocytes de Lapin) était deux fois plus importante qu'en système hétérologue (sérotransferrine humaine - réticulocytes de Lapin). Nous avons pensé qu'il était préférable de travailler en système homologue, et étant donné la difficulté de se procurer des réticulocytes humains, en grand nombre, nous avons choisi le Lapin comme système homologue.

Si la sérotransferrine humaine était déjà bien connue à l'époque, nous ne connaissions presque rien de la sérotransferrine de Lapin. Le but de nos travaux a donc consisté, tout d'abord, à mettre au point une méthode de préparation de sérotransferrine de Lapin pure et à préciser ses principales propriétés physio-chimiques.

Afin de définir le rôle de la partie glucidique dans l'interaction avec le réticulocyte, nous avons été amenés à isoler la fraction glycopeptidique et à déterminer sa structure. Celle-ci est identique à celle des glycanes biantennés de la sérotransferrine humaine, la seule différence porte sur le nombre de groupements glycaniques, un seul dans la sérotransferrine de Lapin contre deux dans la sérotransferrine humaine.

Nous avons ensuite réalisé des expériences d'inhibition du transfert du fer de la sérotransferrine de Lapin aux réticulocytes en présence du glycopeptide isolé de la transferrine ainsi qu'en présence d'oligosaccharides voisins de structure connue. Les différences constatées ne permettant pas de trancher en faveur du rôle du glycanne, nous avons voulu savoir si la différence d'activité entre la sérotransferrine humaine et de Lapin vis-à-vis du réticulocyte de lapin provenait d'une différence dans les sites de fixation du fer, plutôt que dans les glycanes.

Nous avons étudié la modification des résidus d'histidine des sites de fixation du fer des deux transferrines, ainsi que l'influence de cette modification dans le transfert du fer aux réticulocytes.

Ensuite, toujours pour préciser quelle est la partie de la molécule qui s'attache sur le récepteur, nous avons coupé la transferrine de Lapin en deux par hydrolyse protéolytique ménagée, isolé le domaine portant le glycanne unique et vérifié son activité vis-à-vis des réticulocytes.

Enfin, nous avons enlevé, à l'aide d'une β -endo-N-acétyl-glucosaminidase isolée au Laboratoire par Bouquelet et al. (1980), la partie glycanne de la sérotransferrine de Lapin. Après avoir vérifié l'intégrité de la conformation de la molécule déglycosylée, nous avons étudié son activité vis-à-vis des réticulocytes de Lapin, et ainsi apporté la preuve directe de la non-intervention du glycanne dans l'interaction de la sérotransferrine avec le réticulocyte.

Par la suite, la découverte de récepteurs de la sérotransferrine sur un nombre considérable de cellules, nous a amené à changer de cellule - cible. En effet, si la structure primaire de la sérotransferrine humaine est maintenant bien connue, Mac Gillivray et al. (1983) pour la partie protéique et Spik et al. (1974, 1985) pour la partie glucidique, nous ne savons toujours pas à quoi servent réellement ses glycannes, ni pourquoi dans certaines affections pathologiques du foie, le taux des variants portant des glycannes triantennés augmente de manière non négligeable (Spik, 1982).

Nous avons montré que cette augmentation est encore plus considérable, dans le sérum des femmes enceintes près du terme, en relation avec l'augmentation du taux de la sérotransferrine plasmatique. Aucune étude n'ayant encore été réalisée, sur l'interaction des variants glycanne de la sérotransferrine humaine avec des cellules humaines, nous avons voulu relier l'augmentation de leur taux aux besoins en fer accrus du fœtus au cours de la gestation. Nous avons recherché la présence éventuelle d'un autre récepteur de nature lectinique, pouvant justifier d'une fonction biologique de ces variants dans le transport du fer au placenta.

Ce mémoire se compose de deux parties :

- Le chapitre consacré aux généralités, qui fournit l'essentiel des connaissances acquises au cours de ces dix dernières années sur la structure des sérotransferrines et leur interaction avec les récepteurs membranaires.

- Le chapitre consacré à nos travaux personnels, qui rapporte les principaux résultats que nous avons obtenus au cours des études dont nous venons de retracer les grandes lignes.

GENERALITES

INTRODUCTION

I. REPARTITION DU FER DANS L'ORGANISME

Le fer, métal indispensable à la vie, joue un rôle important dans le transport physiologique et le stockage de l'oxygène moléculaire, dans le métabolisme oxydatif d'un très grand nombre de composés, dans l'hydroxylation de nombreux métabolites, dans le processus de transfert des électrons et dans la décomposition ou l'utilisation de l'eau oxygénée.

Il est pondéralement le plus important des métaux lourds dans l'organisme. Un adulte moyen de 70 kg possède approximativement 4 g de fer (Moore et Brown, 1969 ; Frieden et Osaki, 1974). La répartition du fer est résumée dans le Tableau I p. 2 . Plus des deux tiers du fer servent à transporter l'oxygène dans les tissus par l'intermédiaire de l'hémoglobine , et à stocker cet oxygène dans les tissus par l'intermédiaire de la myoglobine.

Une importante proportion du fer est stockée dans les cellules sous forme de ferritine ou d'hémosidérine , et ceci essentiellement dans les cellules réticulo-endothéliales de la rate, du foie et de la moëlle osseuse, mais aussi dans les cellules parenchymateuses du foie.

La transferrine ne représente que 0,15 % du fer total, mais son rôle est extrêmement important car c'est elle qui prend en charge le fer ferrique (qui lui est insoluble dans les conditions de pH et de pression en oxygène du sang) et le répartit entre les différents tissus.

II. LE GROUPE DES TRANSFERRINES

Le terme de transferrine s'applique à une famille de glycoprotéines fixant le fer, se trouvant dans les liquides physiologiques chez les vertébrés (Aisen et Listowsky, 1980) et mis en évidence chez les invertébrés (Huebers et al., 1982; Martin et al., 1983). Cette famille comprend :

- La sérotransferrine (sidérophiline) dont l'existence a été soupçonnée dans le plasma par Barkan (1927), puis isolée et purifiée par Schade et Caroline (1946), Laurell et Ingelman (1947) en tant que transporteur spécifique du fer.

- L'ovotransferrine (conalbumine), se trouvant dans le blanc d'oeuf d'oiseaux, soupçonnée par Osborne (1899), et isolée en 1944 par Schade et Caroline en tant que protéine fixant le fer.

- La lactotransferrine (lactoferrine), présente dans le lait de mammifères ainsi que dans de nombreux autres liquides de sécrétion , a été isolée à partir du lait de femme par Montreuil et Mullet (1960); Montreuil et al. (1960), et par Johansson (1960).

TABLEAU I

REPARTITION DU FER DANS L'ORGANISME HUMAIN ADULTE

COMPOSES RENFERMANT DU FER				
NOM	NATURE	FER (G)	FER (% DU TOTAL)	FONCTION
HEMOGLOBINE	PROTEINE HEMINIQUE	2,6	65,9	TRANSPORT DE L'OXYGENE DANS LE SANG
MYOGLOBINE	PROTEINE HEMINIQUE	0,13	3,3	STOCKAGE DE L'OXYGENE DANS LE MUSCLE
FERRITINE	Fe ³⁺ - PROTEINE	0,52	13,2	STOCKAGE DU FER DANS LA PLUPART DES CELLULES
HEMOSIDERINE	Fe ³⁺ - PROTEINE	0,48	12,1	STOCKAGE DE L'EXCES DE FER
TRANSFERRINE	Fe ³⁺ - PROTEINE	0,006	0,15	TRANSPORT DU FER
ENZYMES	PROTEINES HEMINIQUES ET NON HEMINIQUES	0,01	0,25	OXYDATION, AUTRES ENZYMES
NON IDENTIFIES	POUR LA PLUPART DES PROTEINES	0,2	5	PROBABLEMENT DES ENZYMES OU DES PROTEINES UTILES
TOTAL		3,95	99,9	

Les transferrines possèdent en commun un certain nombre de propriétés:

- ce sont des glycoprotéines monocaténaires de masse moléculaire voisine de 80 kDa (kilo Dalton)
- elles fixent réversiblement deux ions Fe^{+++} sur deux sites spécifiques par l'intermédiaire d'un ion bicarbonate pour chaque site , en développant une coloration rose saumon dont le maximum d'absorption se situe à 465 nm ;
- elles sont constituées de deux domaines structuraux possédant chacun un site de fixation du métal ;
- elles présentent de nombreuses homologies dans leur structure primaire ;
- elles assurent le transport du fer jusqu'à une cellule-cible en reconnaissant un récepteur spécifique ;
- elles possèdent une activité bactériostatique.

De nombreuses revues générales ont été consacrées ces dernières années à la structure et à la fonction des transferrines (Aisen et Listowski, 1980; Morgan, 1981; Chasteen, 1983a; Montreuil et al., 1985; Brock, 1985) décrivant en détail les aspects concernant la synthèse, le catabolisme, les problèmes cliniques et l'activité bactériostatique de toutes les classes de transferrine.

Dans la première partie de ces généralités nous développerons l'essentiel des connaissances se rapportant à la structure et la conformation des parties protéique et glycanique et des sites de fixation du fer de la sérotransferrine , bien que la plupart des connaissances aient été acquises par comparaison des trois classes de la famille des transferrines.

Dans la deuxième partie se rapportant à la fonction biologique nous nous intéresserons essentiellement à l'interaction de la sérotransferrine avec ses cellules-cibles.

LOCALISATION DE LA SEROTRANSFERRINE

La majeure partie de la sérotransferrine, environ 60 % est présente dans le plasma, les 40 % restant se répartissent entre la lymphe et les espaces extra-circulants.

I. CONCENTRATION DE LA SEROTRANSFERRINE DANS LE PLASMA

Les concentrations en sérotransferrine du plasma varient peu en fonction de la taille de l'espèce (Regoeczi et Hatton, 1980) et tournent autour de 2,5 à 3,5 g/l, à l'exception du Chien et du Cochon d'Inde, chez qui elles sont plus élevées. Chez l'Homme, la concentration moyenne est de l'ordre de 3 g/l, mais peut varier suivant les individus de 2 à plus de 4 g/l.

Le taux de sérotransferrine est légèrement plus élevé chez les femmes, environ 8 %, que chez les hommes et ne varie pas en fonction de l'âge (Herbeth et al., 1983), le taux normal étant atteint dès l'âge de deux ans (Bonnet et al., 1978). Chez le nouveau-né la concentration en sérotransferrine ne représente que 58 % à 71 % de celle de l'adulte, et chez la femme enceinte elle augmente considérablement de 37 à 70 % (Vahlquist et al., 1975).

Le taux de sérotransferrine diminue d'environ 17 % dans les cas de cirrhose alcoolique (Nalpas et al., 1980 ; Teppo et Maury, 1983) ce qui donne une valeur moyenne d'environ 2,5 g/l. Cette diminution est sans doute due à une inhibition de la synthèse de la transferrine par l'éthanol qui s'est transformé en acétaldéhyde dans l'hépatocyte (Lieber, 1980), et à une inhibition de la sécrétion de la transferrine et des autres glycoprotéines plasmatiques (Sorell et al., 1983). La cirrhose alcoolique entraîne d'ailleurs une hémochromatose, qui consiste en une augmentation du taux de saturation en fer de la sérotransferrine plasmatique et en une hypersidérémie hépatique.

II. SYNTHÈSE ET CATABOLISME DE LA SEROTRANSFERRINE

Le taux de renouvellement de la sérotransferrine est de 10 % par jour et sa demi-vie de 8 jours, alors que le "turn-over" du fer est de 100 minutes. La plus grande partie de la sérotransferrine est synthétisée par le foie (Morgan, 1981a) mais de nombreux tissus sont aussi capables de la synthétiser, tels que la rate (Phillips et Thorbecke, 1966), le macrophage péritonéal (Haurani et al., 1973; Custer et al., 1982), les cellules de la glande mammaire (Morgan, 1981 a), les cellules de Sertoli (Skinner et al., 1984), le muscle, les lymphocytes et le cerveau (Levin et al., 1984). Le foie est aussi le site majeur du catabolisme de la sérotransferrine cependant Morell et al., (1971) ont constaté que la sérotransferrine présentait un cas particulier dans l'élimination des asialoglycoprotéines circulantes. Cette question sera abordée dans l'interaction avec les hépatocytes. La revue générale de Morgan (1981 a) décrit en détail la synthèse et le catabolisme de la sérotransferrine.

STRUCTURE ET CONFORMATION DE LA PARTIE PROTEIQUE
DES SEROTRANSFERRINES

I STRUCTURE PRIMAIRE DES SEROTRANSFERRINES

A. Masse moléculaire

L'échelle des masses moléculaires des sérotransferrines de différentes espèces, citées dans la littérature, s'étale de 41 à 94 kDa (Bobak et al., 1983). Les valeurs les plus récentes sont comprises entre 74 et 80 kDa. Ces valeurs ont été déterminées pour la plupart par des méthodes physiques qui ne permettent d'obtenir que des masses apparentes.

A l'heure actuelle, la connaissance de la séquence peptidique complète de certaines transferrines permet de calculer une valeur beaucoup plus exacte de leur masse moléculaire. Ainsi la masse moléculaire calculée de la sérotransferrine humaine, qui est constituée d'une seule chaîne peptidique de 679 résidus d'acides aminés et de deux glycanes biantennés est de 79,570 kDa (Mc Gillivray et al., 1983).

B. Séquence peptidique des sérotransferrines

1. Sérotransferrine humaine.

La détermination de la séquence peptidique de la sérotransferrine humaine, par coupure des liaisons méthionyles au bromure de cyanogène, a été entreprise en 1967 par Jeppson, par Sutton et Brew en 1974 et par Charet en 1975. La structure définitive a été réalisée par Mac Gillivray et al. (1982, 1983) et est donnée dans la Fig. 1, p.6. Cette structure a été confirmée par l'étude de la séquence d'un mRNA de foie humain, responsable de la synthèse de la sérotransferrine, isolé par Uzan et al. (1984) et codant pour les résidus 403 à 679, et la séquence du cDNA (Yang et al. 1984). Les différences entre ces deux séquences sont mineures et portent sur la transformation des résidus Asn 417 en Asp, Glu 512 et 653 en Gln, Pro 539 en Thr 542 en Pro et Glu 672 en Gly. Les structures des deux autres transferrines séquencées ont été mises à titre de comparaison.

2. Autres sérotransferrines

Très peu d'études ont été réalisées sur les autres sérotransferrines, les seuls résultats cités dans la littérature concernent les séquences N-terminales de différentes sérotransferrines, et les séquences peptidiques au voisinage du point d'attache des glycanes, qui sont rassemblées dans le Tableau II, p.7.

Les séquences N-terminales des différentes sérotransferrines présentent une très grande homologie, tant dans la nature que dans la position des acides aminés. Les séquences au voisinage du point d'attache ne montrent pas d'homologie à l'exception de la séquence code Asn-X-Ser/thr, et seront discutées dans le paragraphe I-E p.10.

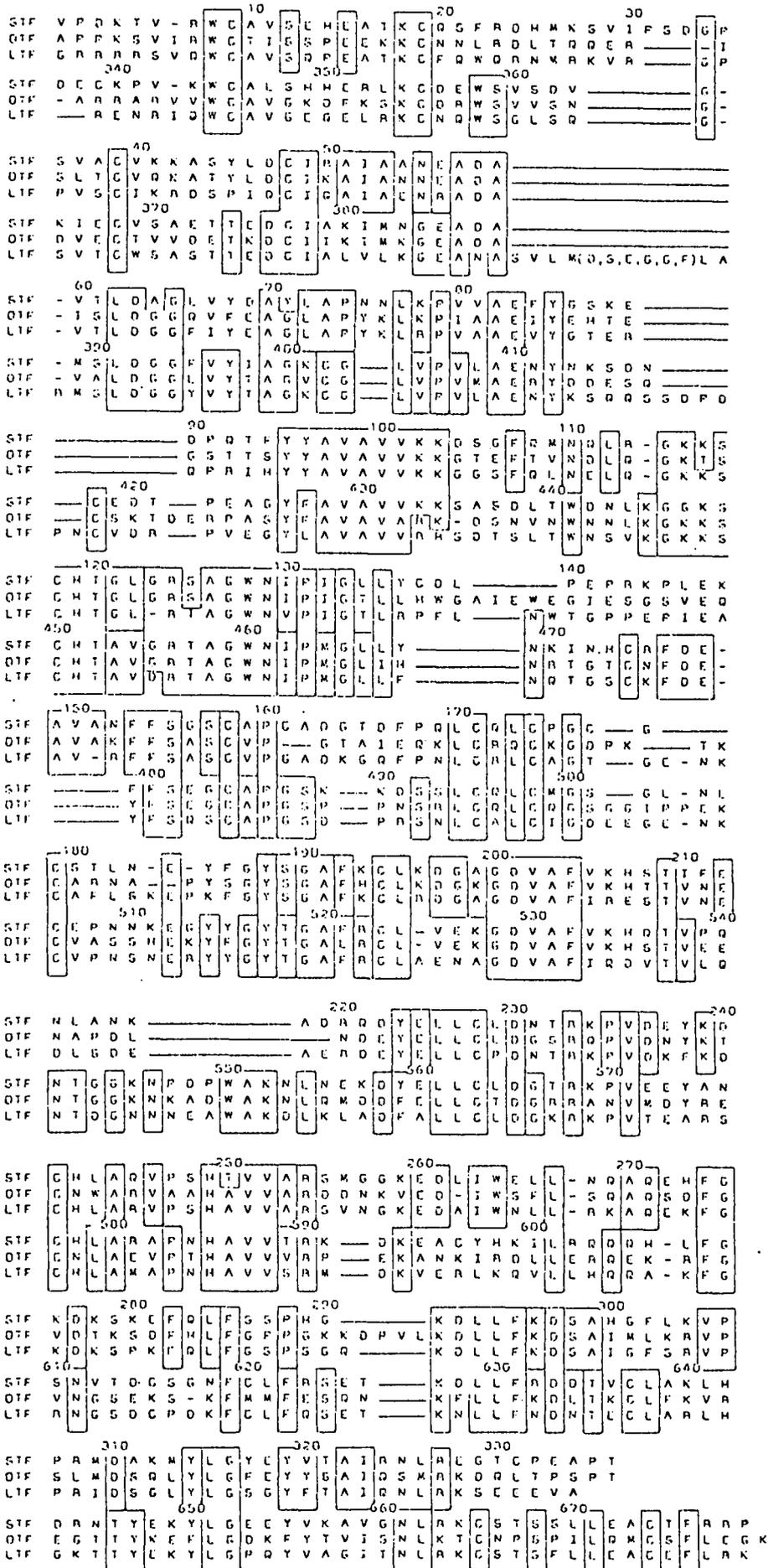


Figure 1 : Structures primaires des trois transferrines déjà séquencées soulignant les homologies entre les motifs N- et C-terminaux. (STF) : sérotransferrine humaine; (OTF) : ovotransferrine de Poulet ; (LTF) : lactotransferrine humaine .

TABLEAU II

Séquences peptidiques N-terminales, et au voisinage du point d'attache des glycanes, des sérotransferrines de plusieurs espèces animales

ORIGINE	SEQUENCE PEPTIDIQUE	Références
N - Terminale		
HOMME	Val - Pro - Asp - Lys - Thr - Val - Arg - Trp - Cys	Mac Gillivray <u>et al.</u> (1982, 1983)
LAPIN	Val - Thr - Glu - Lys - Thr - Val - Asn - Trp - Cys	Heaphy et Williams (1982)
RAT	Val - Pro - Asp - Lys - Thr - Val - Lys - Trp - Cys	Schreiber <u>et al.</u> (1979)
PORC	Val - Pro - Glu - Lys - Thr	Graham et Williams (1975)
MOUTON	Ser - Pro - Glu - Lys - Thr - Val - Arg - Trp	Guerin <u>et al.</u> (1976)
BOEUF	Asp - Pro - Glu - Arg - Thr - Val - Arg	Brocket <u>et al.</u> (1980)
au voisinage du point d'attache TYPE A.		
HOMME	Asn (CHO) - Lys - Ser - Asp - Asn - Cys	
PORC	Asn (CHO) - Arg - Ser - Leu - Thr - Val	
TYPE B.		
HOMME	Asn (CHO) - Val - Thr - Asp - Cys - Ser	
PORC	Asn (CHO) - Ser - Ser - Ser - Ala - Phe	
BOEUF	Asn (CHO) - Ser - Ser - Leu - Gln - Thr	Graham et Williams (1975)

C. Homologies des séquences peptidiques des transferrines

La superposition des moitiés N et C-terminales de chaque transferrine montre de grandes homologies de séquence, 41 % dans la sérotransferrine humaine, 37 % dans la lactotransferrine humaine et 33 % dans l'ovotransferrine de poule. Mc Gillivray et Brew dès 1975, avaient remarqué une grande homologie interne des séquences des deux parties de la chaîne peptidique de la sérotransferrine humaine, et avaient émis l'hypothèse de la duplication d'un gène ancestral, responsable de la synthèse de la protéine. Au vu des nouveaux résultats concernant la structure primaire de la sérotransferrine, Mac Gillivray et al., en 1977, suggéraient l'hypothèse d'une quadruplication du gène ancestral.

D. Emplacement des ponts disulfures

Aucune des transferrines séquencées n'a montré l'existence de résidus de cystéine, excluant donc la présence de groupements thiols libres. La connaissance de la position des ponts disulfures est indispensable à la compréhension de la conformation de la protéine.

La position des ponts disulfures de la sérotransferrine humaine n'a pu être réalisée que par l'étude comparée des trois séquences. L'ovotransferrine est la plus connue, sur ses 15 ponts disulfures, 10 ont été positionnés avec certitude par Elleman et Williams (1970). Il existe 6 ponts dans la moitié N-terminale, numérotés de 1 N à 6 N, et 9 dans la partie C-terminale, numérotés de 1 C à 9 C. La position hypothétique des ponts de la partie C-terminale a été réalisée par analogie entre les moitiés N- et C-terminales.

La même numérotation a été reprise pour la sérotransferrine, qui possède le plus grand nombre de ponts disulfures, 19 dont 6 seulement ont pu être localisés avec certitude (Mac Gillivray et al., 1983). La position des autres ponts a été déterminée par analogie avec les deux autres transferrines. Sur les quatre ponts supplémentaires par rapports à l'ovotransferrine (3 par rapport à la lactotransferrine), il en existe deux dans la partie N-terminale : le 10 N et le 11 N, et deux dans la partie C-terminale le 12 C et le 13 C.

La position des ponts disulfures de la sérotransferrine est montrée dans la Fig 2, p.9 sur un modèle en ficelle inspiré de Williams et al. (1982) pour l'ovotransferrine. Les ponts 1 à 6 sont très conservés dans les deux moitiés de la sérotransferrine et le pont 10 N est en position homologue du pont 7 C.

La présence de 4 ponts supplémentaires, dans la partie C-terminale de la sérotransferrine en position non homologue de la partie N-terminale, les ponts 8 C, 9 C, 12 C et 13 C rend cette région beaucoup plus rigide et compacte que la partie N-terminale. La disposition des ponts disulfures sur les parties N- et C-terminales indique clairement que la sérotransferrine est constituée de deux domaines indépendants. Les preuves cristallographiques et chimiques de l'existence des deux domaines seront développées dans le paragraphe conformation.

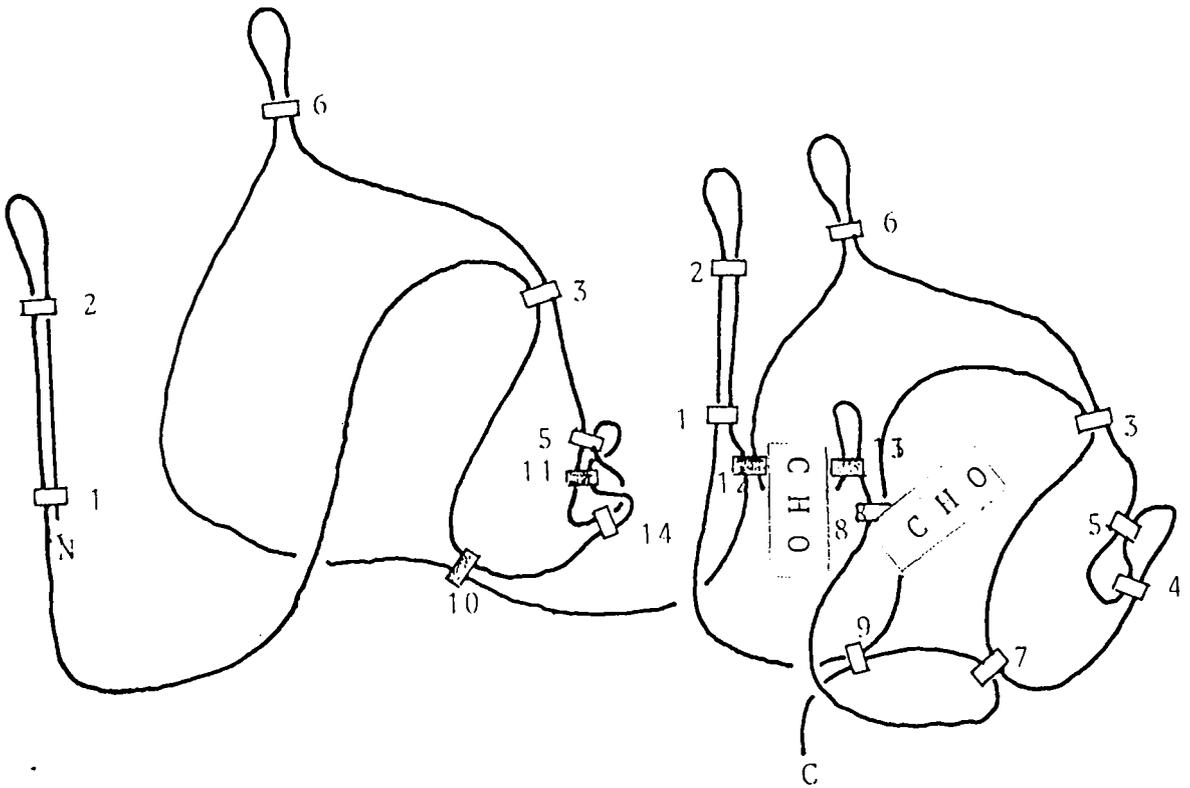


Figure 2 : Représentation de la molécule de sérotransferrine humaine selon un modèle "en ficelle" inspiré de Williams et al.(1982) montrant l'existence des deux domaines, la position des ponts disulfures et la position des glycanes

□ : ponts disulfures communs aux trois transferrines séquencées

■ : ponts disulfures supplémentaires de la sérotransferrine

CHO : Emplacement des glycanes.

E. Emplacement des glycanes des sérotransferrines.

Dans la sérotransferrine humaine, deux séquences Asn-X-Thr/Ser codant pour la N-glycosylation ont été observées les deux sont glycosylées (Asn 413 et Asn 611). La fig.2 (p.9) montre que les deux glycanes de la sérotransferrine humaine sont en fait placés très près l'un de l'autre dans l'espace. Cette localisation rapprochée pourrait expliquer la grande résistance de la partie C-terminale à la protéolyse, par la surface couverte par les glycanes. Ce point sera discuté plus en détail p.19.

Les séquences des acides aminés au voisinage du point d'attache des glycanes de diverses transferrines sont différentes comme le montre le Tableau II, p. 7 . Graham et Williams (1975) ont classé ces séquences en deux types, suivant la nature du résidu en position X dans la séquence Asn(CHO)-X-Thr/ser: le type A possède un acide aminé basique , et le type B un acide aminé aliphatique.

F. Polymorphisme des transferrines

1. Polymorphisme de la sérotransferrine humaine

Le polymorphisme de la sérotransferrine humaine a été mis en évidence par Smithies (1957) par électrophorèse bidimensionnelle en gel d'amidon. Il montre qu'en plus de la bande habituelle de la sérotransferrine désignée par la lettre C, il existe dans certains sérums une bande supplémentaire, de migration plus rapide (bande B), ou plus lente (bande D) toutes deux identifiées à la sérotransferrine. Chacune de ces bandes B et D présente, en outre, des variations de mobilité. On connaît environ 22 variants génétiques de la sérotransferrine humaine. Tous ces variants fixent deux atomes de fer, présentent les mêmes réactions immunologiques et possèdent une teneur en acide sialique identique ainsi que la même constante de sédimentation.

La forme la plus commune est la sérotransferrine C trouvée dans chaque population comme la forme prépondérante . Deux variants atteignent des fréquences non négligeables, le variant D1 chez les Africains , et le variant D-Chi chez les populations orientales. Les variants génétiques se différencient par des modifications ponctuelles de certains acides aminés dont la position exacte a été déterminée par Mac Gillivray et al. 1983). La séquence peptidique de la partie C-terminale , déduite de la séquence du cDNA (Uzan et al., 1984) montre trois différences avec la séquence de Mac Gillivray : Pro (539), Thr (542), et Gly (672) qui pourraient être attribuées au polymorphisme de la sérotransferrine.

Aucune étude n'a été réalisée sur la partie glycanique de ces variants génétiques à l'exception des acides sialiques.

2. Polymorphisme des autres sérotransferrines animales.

Des études ont été réalisées sur les variations génétiques des sérotransferrines dans d'autres espèces de vertébrés, essentiellement chez les Primates, ou plusieurs formes de transferrines ont été mises en évidence (Wang et al., 1966). Il semblerait que ce polymorphisme se retrouve dans d'autres espèces, par exemple chez les Bovins la sérotransferrine présente une hétérogénéité électrophorétique (Ashton, 1958) qui ne provient pas de la partie glycanique (Hatton et al., 1977). Des variants génétiques ont aussi été mis en évidence dans la sérotransferrine de Cheval (Glasnak et Jarolimova, 1980; Chung et Mc Kenzie, 1985)

II. CONFORMATION DE LA SÉROTRANSFERRINE

A. Dimensions de la sérotransferrine

Les mesures, effectuées en diffusion de neutrons par Martel et al. (1980), présentent la sérotransferrine humaine comme un ellipsoïde de révolution dont la dimension des demi-axes est de 46,6 x 46,6 x 15,8 Å et le volume de 144 x 45 x 10 Å³.

L'étude des paramètres hydrodynamiques de la molécule, par Rosseneu-Mortreff et al., (1971), montre que le rapport des axes varie en fonction de la saturation en fer, passant de 3 pour la forme apo à 2 pour la forme saturée.

B. Structure secondaire de la sérotransferrine.

La sérotransferrine humaine possède 17 à 21 % d'hélice α (Nagy et al., 1972; Tomimatsu et al., 1972; Ventura et al., 1973; Mazurier et al., 1976). Le taux de structure β est plus imprécis et varie de 40 à 68 %, le reste étant constitué de structure non organisée.

La fixation du métal n'entraîne pas de variation de la structure secondaire de la chaîne protéique dans la sérotransferrine.

C. Structure tertiaire de la sérotransferrine .

Les homologies de séquences entre les moitiés N- et C-terminales et la disposition des ponts disulfures des transferrines ont fait suggérer à de nombreux auteurs l'existence de deux domaines structuraux indépendants dans les transferrines. La mise en évidence de ces deux domaines s'est effectuée par deux voies différentes: les études de cristallographie aux rayons X et l'isolement de fragments après protéolyse ménagée.

1. Données cristallographiques

La sérotransferrine de Lapin est la première transferrine à avoir été cristallisée et les paramètres cristallographiques de la protéine saturée en fer ont été déterminés par Al Hilal et al. (1976), puis par Gorinsky et al., (1979). Ces derniers auteurs ont construit un modèle moléculaire (Fig. 3, p. 12) selon lequel la glycoprotéine aurait les dimensions suivantes : 95 x 60 x 50 Å et apparaîtrait nettement constituée de deux parties de volume sensiblement identique. Chacun de ces lobes, dont les axes forment entre eux un angle de 30°, est creusé d'une cavité tournée vers l'axe de symétrie de la molécule.

Abola et al. (1982) ont aussi réalisé des études aux rayons X de l'ovotransferrine de Poule, à 5 Å de résolution, et confirmé une structure bilobale, comme pour la sérotransferrine de Lapin, avec deux domaines indépendants apparaissant comme une région globulaire. Un des sites de fixation du fer serait situé près de la surface de la protéine.

2. Isolement des domaines structuraux des transferrines

Le premier isolement d'un fragment fixant le fer, de 35 kDa, dérivé de la moitié N-terminale de l'ovotransferrine de Poule saturée en fer à 30 %, a été réalisé par Williams (1974) par hydrolyse trypsique et chymotrypsique. L'hydrolyse par la subtilisine



Figure 3 : Modèle moléculaire de la sérotransferrine de Lapin construit par Gorinsky et al. (1979) d'après les données cristallographiques.

de l'ovotransferrine diferrique, a amené Williams (1975) à isoler un autre fragment fixant le fer, de 35 kDa, provenant cette fois-ci, de la moitié C-terminale. L'isolement simultané des domaines de l'ovotransferrine de Poule a été réalisé par Keung et al (1982) en utilisant la subtilisine immobilisée. Les deux fragments ainsi obtenus ont une masse moléculaire de 40 kDa.

Ces expérimentations ont été étendues à la sérotransferrine humaine. Evans et Williams en 1978, par hydrolyse trypsique de la sérotransferrine saturée en fer à 30 %, soit sur le site N-terminal, soit sur le site C-terminal, obtiennent respectivement deux fragments de 36 kDa et 43 kDa. Lineback-Zins et Brew (1980) ne libèrent par la thermolysine, que la partie N-terminale de la sérotransferrine humaine diferrique.

Les deux lobes de la sérotransferrine bovine ont été obtenus par Brock et Arzabe (1976 a,b) par hydrolyse trypsique : 32 et 36 kDa pour les parties N- et C-terminales.

La sérotransferrine de Lapin a été coupée en deux par Heaphy et Williams (1982) par la chymotrypsine.

Esparza et Brock (1980) ont réussi à couper par la trypsine, les différentes sérotransferrines diferriques, d'Homme, de Lapin, de Boeuf, de Cochon et de Cheval, quoiqu'avec de très faibles rendements pour la sérotransferrine de Lapin.

On peut dire en conclusion, que la présence d'une grande homologie de séquence entre les moitiés N- et C-terminales des transferrines, et la localisation des ponts disulfures, associées aux données cristallographiques et à la possibilité de couper en deux toutes les transferrines, démontrent bien l'existence de deux lobes de taille sensiblement voisine, possédant chacun un site de fixation du fer.

STRUCTURE ET CONFORMATION DE LA PARTIE
GLYCANNIQUE DES TRANSFERRINES

I. STRUCTURE COVALENTE DES GLYCANNES

A. Structure des glycanes de la sérotransferrine

La nature glycoprotéinique de la sérotransferrine humaine a été reconnue par Schultze et al. (1958). Deux glycanes liés à la protéine par une liaison du type N-(β aspartyl)-N-acétyl-glucosaminyl-aminique ont été identifiés par Spik et al. (1965).

Les glycanes de la sérotransferrine humaine sont de type N-acétyl lactosaminique et peuvent être biantennés, (Spik et al., 1974 a,b ; Montreuil, 1975 ; Montreuil et Spik, 1975 ; Dorland et al., 1977) ou triantennés (Debruyne et al., 1984 ; Spik et al., 1985). La présence d'un glycanne de structure tétraantennée a été envisagée par März et al. (1982), puis identifié par Spik et al. (1985) dans une proportion de l'ordre de 5 %.

La structure de ces glycanes est donnée dans la Fig. 4 p. 15

B. Structure de la partie glycanique des autres sérotransferrines

Le Tableau III, p.16 donne les compositions molaires en glucides des sérotransferrines d'un certain nombre de mammifères, et montre qu'il existe un grand désaccord sur le nombre de glycanes de chaque sérotransferrine, dû en partie à la non homogénéité des fractions étudiées. Dès 1974, Hatton et al., avaient postulé que les sérotransferrines de Boeuf, de Porc, de Lapin et de Chien ne contenaient qu'un seul glycanne par opposition aux sérotransferrines d'Homme et de Babouin qui en renfermaient deux.

Les travaux récents de Codeville (1987) réalisés au Laboratoire montrent que les glycanes sont essentiellement de nature bi-antennée.

II. CONFORMATION DES GLYCANNES DE TYPE N-ACETYL
LACTOSAMINIQUE

Les différents types de conformation des glycanes sont représentés dans la Fig. 5, p. 18

A. Conformation en "Y"

La première image d'un glycanne a été donnée par Montreuil (1975) après construction du modèle moléculaire du glycanne biantenné de la sérotransferrine humaine.

La conformation en "Y" fut proposée pour tenir compte des ponts hydrogènes qui la stabilisent.

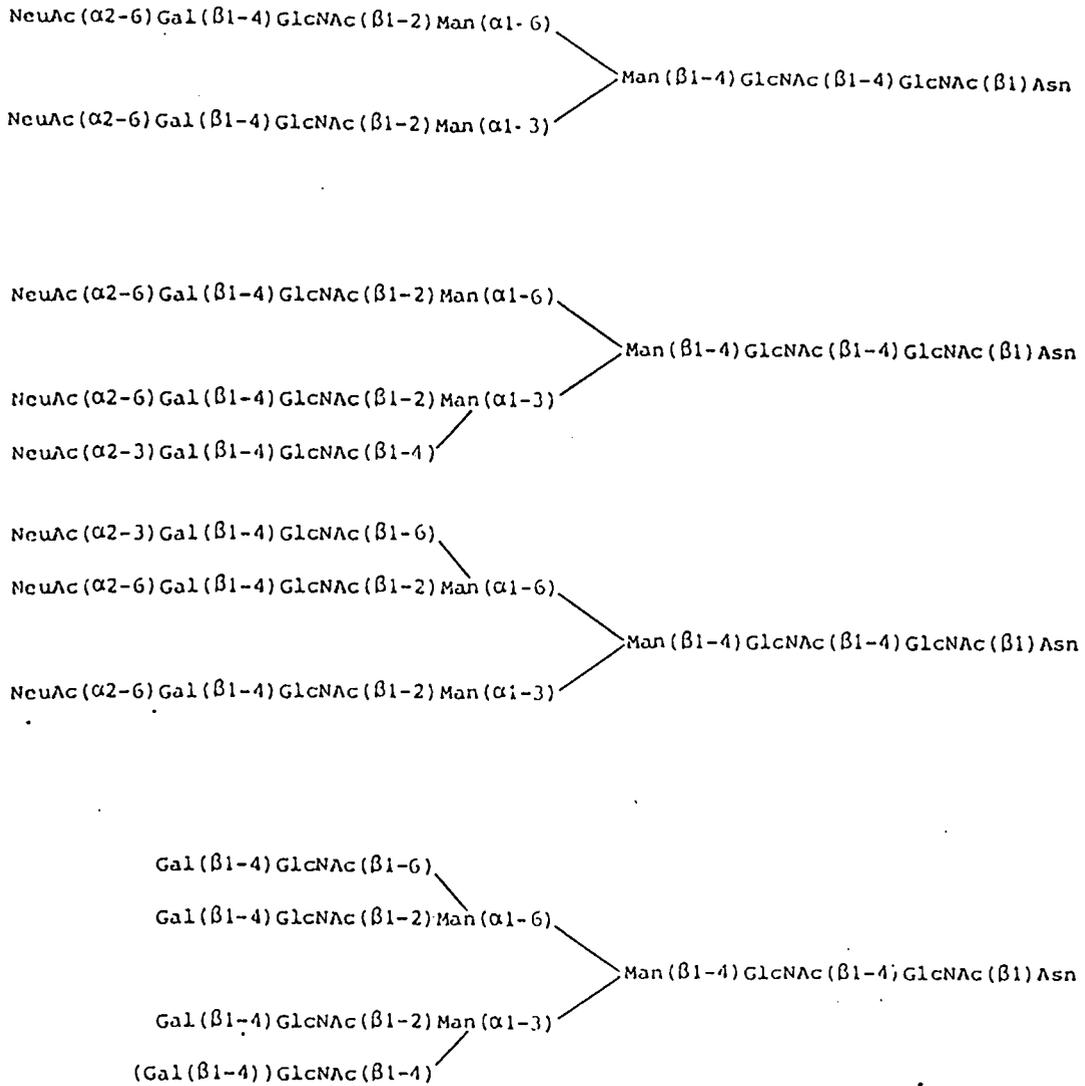


Figure 4 : Structure des glycanes de la sérotransferrine humaine (Spick et al., 1973 ; 1974 ; 1975 ; 1982 ; 1985 ; Dorland et al., 1977; Marz et al., 1982)).

TABLEAU III. COMPOSITION MOLLAIRE EN GLUCIDES DES SEROTRANSFERRINES
DE DIFFERENTES ESPECES DE VERTEBRES

MONOSACCHARIDES	BOEUF			PORC		CHEVAL	POULET	LAPIN	HOMME
	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(a)	(d)	(a)	(e)
Gal	2	6,2	2	8	3,1	6	3,5	5	4
Man	3	7,2	3	9	4,3	4	1,8	4	6
GlcNac	3,4	8,8	3,3	14	5,6	9	5,7	5-6	8
Neu-Ac	2	2	2 et 3	7,8	2	4	1,7	4	3 ou 4
Fuc	1	2	0,13	3,4	1	2	1	2	
NOMBRE DE GROUPEMENTS GLYCANNIQUES EMIS EN HYPOTHESE PAR LES AUTEURS	1	2	1	4	1	2	1	2	2

(a) HUDSON ET AL., 1973

(b) GRAHAM ET WILLIAMS 1975

(c) HATTON, REGOECZI ET WAUR, 1977

(d) WILLIAMS

(e) SPIK

B. Conformation en "T"

La conformation en "Y" a été modifiée, par la suite, afin de tenir compte des résultats obtenus par diffraction des rayons X sur des cristaux de trisaccharide Man (α 1,3) Man (β 1,4) GlcNac (Warin et al., 1979) et la conformation en "T" a été proposée par Montreuil et al. (1978) et Montreuil (1980 a). Dans cette conformation, l'antenne en (α 1-3) serait disposée perpendiculairement à l'antenne branchée en (α 1-6).

C. Conformation en "oiseau"

La conformation en "oiseau" a été suggérée, plus tard, par Montreuil (1980 b, 1982, 1983), Deisenhofer (1981), Bock et al. (1982) et Sutton et Phillips (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. Selon Douy et al. (1980 a, b) ces trois conformations en "Y", "T" et "oiseau" sont interconvertibles en solution. La flexibilité des antennes dans l'espace a été démontrée par les études en R.P.E. de glycopeptides porteurs d'un marqueur de spin sur les résidus d'acide sialique ou de galactose réalisées par Davoust et al. (1981) et Michel (1981).

Cependant la conformation en "oiseau" est favorisée quand le glycanne est lié à une chaîne peptidique supérieure à 7 kDa ainsi qu'à des concentrations plus élevées (Douy et al., 1980 a, b). Sur la base de résultats non publiés de Perez et Warin, Montreuil (1982, 1983) cite aussi cette conformation comme étant énergétiquement la plus favorable et stériquement possible.

D. Conformation en "aile brisée"

Dans cette conformation proposée par Montreuil (1984 a, b) sur la base des résultats de Brisson et Carver (1983 a; b) et Meyer (1983), la branche liée en (α 1-6) subit une plus grande rotation qui la rabat contre le noyau du glycanne. Cette dernière conformation est fortement stabilisée dans le cas de la lactotransferrine humaine, par la présence de quatre groupements méthyles hydrophobes (deux résidus de N-acétyl glucosamine et deux de fucose) sur la branche liée en (α 1-6) qui deviennent ainsi confluents et peuvent interagir avec des parties hydrophobes de la chaîne peptidique (Montreuil, 1984, a, b).

E. Conformation en "parapluie"

Sur les bases de la conformation en "oiseau", Montreuil (1980b, 1982, 1983) propose une structure en "parapluie" pour le glycanne portant des branches supplémentaires sur les mannoses (α 1-6) et (α 1-3). Dans cette conformation toutes les antennes sont disposées perpendiculairement dans le même plan, et sont parallèles à la surface de la protéine avec laquelle elles peuvent interagir par des liaisons ioniques ou hydrogènes.

La comparaison des dimensions relatives des glycanes et de la partie protéique de la transferrine a été réalisée par Montreuil (1983). Le schéma de la Fig. SF (p. 18) montre, qu'en comparant les dimensions d'un glycanne biantenné possédant une conformation en "oiseau" = 55 x 24 x 5 Å (Douy et al., 1980 a, b) à celle de la protéine (Gorinsky et al., 1979) pour la transferrine de Lapin = 95 x 60 x 50 Å, le glycanne couvre une surface de 200 Å².

95 x 60 x 50 Å , le glycanne couvre une surface de 200 Å .

Selon Montreuil (1983; 1984 a; b) le masquage important de la protéine par les glycanes , surtout dans les glycoprotéines possédant plusieurs glycanes de type polyantenné, expliquerait leur résistance aux protéases, et leur faible antigénicité. En regardant la position des deux glycanes de la sérotransferrine humaine sur le modèle de la Fig.2, p.9, nous constatons qu'ils sont très rapprochés, et doivent couvrir une surface très importante du lobe C-terminal.

III. LES VARIANTS GLYCANNIQUES DES SEROTRANSFERRINES

A. Les variants glycaniques de la sérotransferrine humaine

Nous avons vu précédemment que les deux glycanes sont liés sur les asparagines 413 et 611 des domaines CD1 et CD3.

Spik et al.(1974) positionnent le glycanne triantenné sur le deuxième site de glycosylation. Ensuite, Hatton et al.(1979) montrent que le glycanne triantenné peut se trouver soit sur le premier, soit sur le second site de glycosylation. Ces mêmes auteurs isolent d'ailleurs deux variants glycaniques triantennés de la sérotransferrine humaine par chromatographie d'affinité sur une colonne de lectine hépatique de Lapin immobilisée, ces deux variants contenant chacun un glycanne bi- et un glycanne triantenné.

Bayard et Kerckaert (1980, 1981) et Kerckaert et Bayard (1982) sur la base de résultats obtenus sur l' α -foetoprotéine et la transferrine postulent que seuls des glycanes de structure identique peuvent être présents sur une même chaîne polypeptidique. La sérotransferrine humaine ne pourrait porter, dans ce cas que deux glycanes biantennés ou deux glycanes triantennés par chaîne.

Wong et al. (1978), ont séparé la sérotransferrine humaine en trois pics, par chromatographie d'affinité sur Con A - Sépharose. Spik (1982), Debruyne (1983) et Debruyne et al.(1983, 1984) ont réalisé la même séparation et isolé trois fractions désignées par leur ordre d'élution :

- Le pic I, non retenu par la lectine, représente 1,5 % du total
- Le pic II, retardé par la lectine, représente 23 % du total.
- Le pic III, retenu par la lectine, représente 75,5 % du total.

Ces fractions , analysées en électrophorèse d'immuno-affinité bidimensionnelle en présence de ConA, ont donné les mêmes profils que la chromatographie d'affinité. La nature des glycanes de ces fractions et les proportions relatives de chacun d'entre eux ont été déterminées d'après les résultats de méthylation. La fraction III ne contient que deux glycanes biantennés de type A. La fraction II, renferme 40 % du glycanne biantenné A, 25 % du glycanne triantenné B et 35 % du glycanne triantenné C. La fraction I contient 25 % du glycanne triantenné B et 75 % du glycanne triantenné C.

Il semble qu'il existe bien au moins trois types de sérotransferrine portant respectivement: deux glycanes biantennés, un glycanne biantenné et un glycanne triantenné , deux glycanes triantennés. La présence de structure tétraantennée, trouvée par März et al. (1982) et Spik et al. (1985) suggère l'existence d'un

quatrième type de sérotransferrine.

Les données récentes, obtenues au Laboratoire, suggèrent que l'attachement de ces glycanes peut se faire indifféremment sur les deux sites de glycosylation, ce qui porte à neuf, minimum, le nombre de variants glycaniques de la sérotransferrine humaine, en tenant compte uniquement des glycanes bi- et triantennés (Fig.6, p. 21).

B. Les variants glycaniques des autres transferrines

Le polymorphisme glycanique des sérotransferrines a été moins étudié dans les autres espèces animales, et essentiellement chez le Boeuf, le Cheval, le Rat et la Souris.

Deux composants de la sérotransferrine de Rat se différencient par leur comportement électrophorétique : un composant rapide, plus acide, F (fast) et un composant lent, S (slow) (Huebers *et al.*, 1976 ; Young *et al.*, 1983). Le composant F, longtemps soupçonné d'être un variant triantenné est en fait un variant biantenné contenant un troisième résidu d'acide sialique greffé sur la GlcNAc de la branche inférieure (Coddeville, 1987). Une faible proportion de ces glycanes est fucosylée en (α 1,6) sur la Glc-NAc du point d'attache. Il existe aussi une hétérogénéité dans l'anomérisation des liaisons de ce variant possédant trois résidus d'acide sialique : NeuAc lié en (α 2,3) sur un Gal lié (β 1,3) de la branche inférieure pour l'un des variants, et cette même structure sur les deux branches pour l'autre variant.

La transferrine de Souris isolée du sérum possède un seul glycanne de structure biantennée classique alors que la transferrine isolée du lait de Souris, possédant des propriétés immunologiques communes à celle du sérum, possède un résidu de fucose greffé en (α 1,6) sur la glucosamine du point d'attache, comme la lactotransferrine de Souris (Leclercq *et al.*, 1987).

La sérotransferrine bovine ne possède qu'un groupement glycanique avec deux variants possédant respectivement deux et trois résidus d'acide sialique (Hatton *et al.*, 1977).

La variation électrophorétique, constatée dans la sérotransferrine de Cheval (variants D et R) serait due à l'existence d'un variant possédant un glycanne biantenné et d'un variant possédant deux glycanes biantennés (Stratil *et al.*, 1984). Une hétéro-supplémentaire a été trouvée au niveau de la nature de l'acide sialique : la présence d'acide N-acétyl,4-O-acétyl,neuraminique (Coddeville, 1987).

C. Conclusion.

Si les variations glycaniques existent dans les sérotransferrines de nombreuses espèces animales, l'Homme semble actuellement être la seule espèce à posséder des variants glycaniques triantennés. On peut se poser la question de la signification biologique de l'existence de tels variants dans la sérotransferrine humaine et de la modification de leur taux dans certains cas pathologiques (Spik, 1982). Nous allons tenter de répondre à cette question dans la partie réservée à nos travaux personnels.

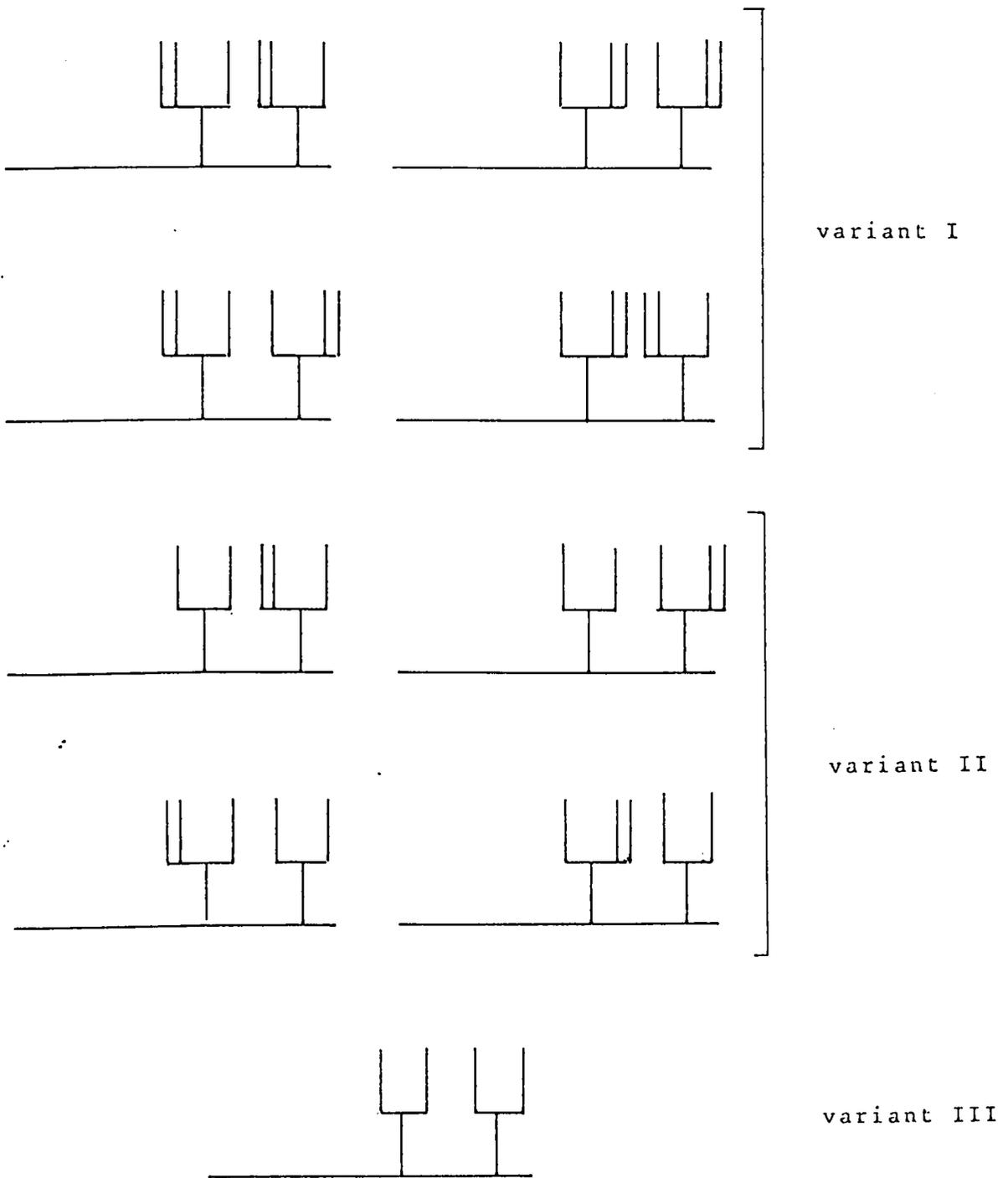


Figure 6 : Les différents variants glycaniques probables de la sérotransferrine humaine.

 glycanne triantenné de type C. (branche supplémentaire liée en $(\beta 1-6)$ sur le mannose $(\alpha 1-6)$)

 glycanne triantenné de type B (branche supplémentaire liée en $(\beta 1-4)$ sur le mannose $(\alpha 1-3)$)

STRUCTURE ET CONFORMATION DES SITES
DE FIXATION DU FER

I. NATURE DES METAUX FIXES

Holmberg et Laurell (1947) ont trouvé que la sérotransferrine pouvait fixer le fer et le cuivre mais que l'affinité pour le fer était beaucoup plus forte, tandis que le cuivre se fixait préférentiellement à la céruléoplasmine. Laurell et Ingelman (1947) et Surgenor et al. (1949) ont rapporté que deux atomes de fer ou de cuivre sont fixés par molécule de transferrine. Ces derniers ont trouvé que le fer se fixait sous forme d'ion ferrique plutôt que de manière covalente et en développant une coloration rouge dont le maximum d'absorption est centré à 465 nm. Fraenkel-Conrat et Feeney (1950) ont obtenu des résultats similaires sur l'ovotransferrine notant que le cuivre est moins fortement fixé que le fer. Ils ont aussi rapporté que le complexe se formait plus rapidement en présence de bicarbonate et de citrate.

Aisen et al. (1969) ont précisé que le Cr, le Mn et le Co pouvaient se fixer spécifiquement sur le site du fer. Il est maintenant connu que la transferrine fixe de nombreux autres métaux de transition, ainsi que les lanthanides dont voici la liste : Cu⁺⁺, Zn⁺⁺, V^{o++}, Cr⁺⁺⁺, Mn⁺⁺, Co⁺⁺⁺, Ga⁺⁺⁺, Hb⁺⁺⁺, Er⁺⁺⁺, Tb⁺⁺⁺, Eu⁺⁺⁺, Nd⁺⁺⁺, Pr⁺⁺⁺, Gd⁺⁺⁺, (Windle et al., 1963; Luk, 1971; Aasa et Aisen, 1968 ; Zweir, 1978 ; Teuwissen et al., 1972).

Cependant le fer reste le métal qui possède le plus d'affinité pour les transferrines (Tan et al., 1969). La constante apparente de fixation du Fe⁺⁺⁺ à la sérotransferrine est (pour une pression partielle de CO et un pH voisin de ceux du sang) de l'ordre de 10¹⁰ M (Jarrit et Charlwood, 1976 ; Aisen et Leibman, 1972). Ces derniers auteurs trouvent une constante de dissociation du fer de la lactotransferrine 260 fois plus élevée que de la sérotransferrine ce qui suggérerait que la première peut prélever le fer de la seconde. Quand au fer ferreux (Fe⁺⁺) il ne peut être fixé (Bates et al., 1973).

La distance entre les deux sites de fixation du métal varie entre 2,5 et 4,3 nm suivant les auteurs (Meares et Ledbetter, 1977 ; O'Hara et al., 1981 ; Luk, 1971).

II LA FIXATION DU FER

A. Propriétés chimiques et géométrie du fer

Le fer est un métal de transition. Sa formule électronique est la suivante : $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^6$. Les états d'oxydation du fer en solution aqueuse sont le fer ferreux (Fe⁺⁺) qui a perdu les deux électrons de la sous couche 4s et le fer ferrique (Fe⁺⁺⁺) qui a perdu un électron supplémentaire de la sous couche 3d, et possède donc cinq électrons célibataires sur sa dernière couche qui sont distribués selon les axes des cinq orbitales 3d.

Le fer ferrique est un acide de Lewis fort, qui accepte les électrons de donneurs pour former des liaisons de covalence, mais il peut aussi former une liaison de coordinence par l'intermédiaire de son orbitale 4s libre. L'arrangement le plus courant du fer ferrique est une forme hexacoordinée, possédant une géométrie octaédrique, mais il est aussi trouvé sous une forme tétracoordinée et tétraédrique (Castner et al., 1960).

Le Fe⁺⁺⁺, de rayon ionique 0,67 Å, montre une très grande affinité pour les ligands à oxygène tels que l'eau, les carboxylates, les carbonates, les phosphates et les phénols. Le Fe⁺⁺ plus gros, 0,83 Å, possède une forte affinité pour de nombreux ligands plus doux, par l'intermédiaire de liaisons, tels que les tétrapyrroles et d'autres amines insaturées.

Le Fe⁺⁺⁺ est virtuellement insoluble dans l'eau distillée à pH neutre ou basique, son K_s étant de 10⁻¹⁸ M à pH 7, tandis que le Fe⁺⁺ est soluble jusqu'à une concentration de 0,1 M. Le Fe⁺⁺⁺ ne peut donc être maintenu en solution, dans ces conditions, qu'en déplaçant les molécules d'eau coordonnées au fer par des agents chélateurs puissants.

B. Mécanisme de fixation et de libération du fer de la sérotransferrine

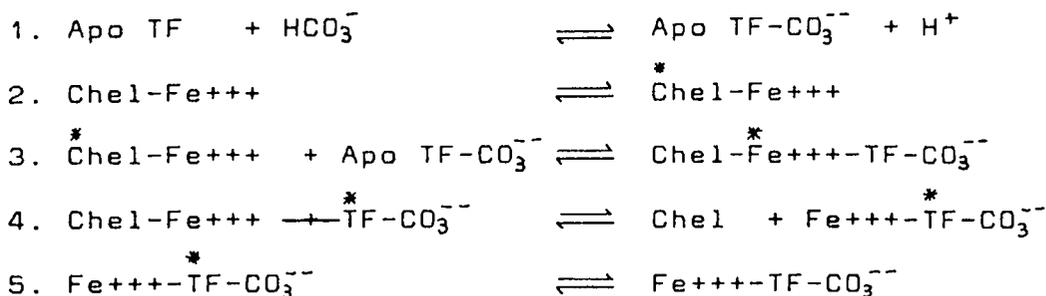
Tous les métaux et lanthanides qui se fixent à la sérotransferrine nécessitent simultanément la fixation d'un anion et la libération de trois protons (Schade et al., 1949 ; Warner et Weber, 1952) ..

1 - Nature de l'anion.

L'anion naturel est le carbonate ou le bicarbonate (Schlabach et al., 1975). En effet, selon Chasteen (1977), tout anion, possédant une formule du type R-CH(L)-COO où L est donneur d'électrons peut convenir.

2 - Mécanisme de fixation du fer

Bates, dans sa revue générale de 1982, a proposé un mécanisme en cinq étapes pour expliquer le transfert du fer des chélateurs aux transferrines :



Chel, Apo TF et TF représentent respectivement un chélateur, l'apotransferrine et la transferrine. $\overset{*}{\text{Chel-Fe}^{+++}}$ et $\overset{*}{\text{Fe}^{+++}}-\text{TF-CO}_3^-$ des états activés où le fer est partiellement exposé. Ce mécanisme est schématisé dans la Fig. 7, p. 24

Dans la première étape, l'apotransferrine fixe réversiblement le bicarbonate, la fixation de l'anion se faisant par l'intermédiaire d'un pont hydrogène avec un résidu d'acide aminé chargé positivement.

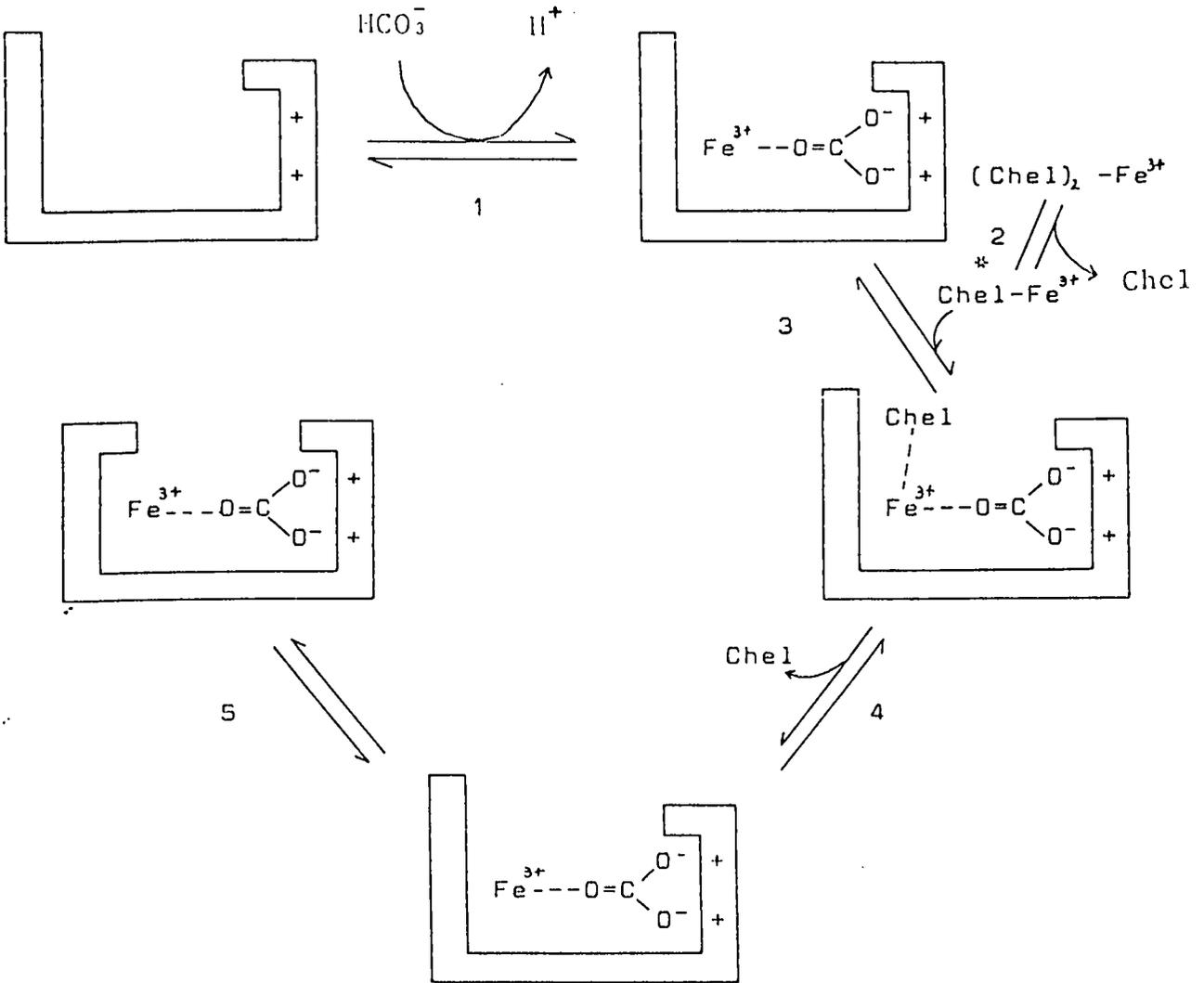


Figure 7 : Représentation schématique du transfert du Fe⁺⁺⁺, des chélateurs aux transferrines, d'après Bates (1982).

La deuxième étape représente la conversion du complexe Fe^{+++} -chélate en une forme activée où le Fe^{+++} serait exposé. Lorsque le chélateur est le citrate, le complexe $Fe^{+++}(\text{citrate})_2$ perd un citrate, exposant ainsi le Fe^{+++} à une attaque par le complexe apo $TF-CO_3^-$. Il y a alors compétition entre l'apo $TF-CO_3^-$ et le citrate en excès (Bates et al., 1967 a). La réaction en présence de nitri-lotriacétate serait plus rapide, le complexe Fe^{+++} NTA étant té-tracoordiné, les deux axes libres du fer seraient occupés par de l'eau qui s'échange beaucoup plus rapidement et faciliterait ainsi l'attaque par l'apo $TF-CO_3^-$. Ce mécanisme est impossible dans le complexe Fe^{+++} EDTA, qui possède six liaisons entre le fer et le chélateur, l'échange est beaucoup plus lent (Bates et al., 1967 b).

La troisième étape est la formation du complexe quaternaire. Dans certains cas cependant, en présence de faibles concentrations en bicarbonate, il se forme un complexe ternaire $Fe^{+++}-TF-Chel$, où le chélateur (NTA ou EDTA) prend la place du carbonate dans le site de fixation de l'anion (Aisen et al., 1967 ; Bates et al., 1967 b ; Rogers et al., 1977 ; Schlabach et Bates, 1975). Le chélateur peut être déplacé par le bicarbonate.

Cependant, quand la concentration en bicarbonate est suffisante le véritable intermédiaire est le complexe quaternaire : $Chel-Fe^{+++}-TF-CO_3^-$ qui se forme en quelques secondes et qui dépend des concentrations en $Fe^{+++}-Chel$, apo TF et HCO_3^- .

La quatrième étape qui représente le départ du chélateur, est plus lente, environ deux minutes.

La cinquième étape représente le passage de la transferrine à une conformation du site où le fer n'est plus exposé.

Les étapes 3, 4 et 5 ne pourraient effectivement s'expliquer que par un possible changement de conformation du site. Deux conformations étant possibles, la première, de type Apo TF est ouverte et permet l'accession au site, la deuxième est fermée et représente la forme saturée en fer. Cette hypothèse est renforcée par les différences de conformation observées entre les formes apo et saturées des transferrines.

3 - Mécanisme de libération du fer.

Le transfert du fer des transferrines se ferait aussi par l'intermédiaire de chélateurs. L'étape limitante dans ce cas étant le changement de conformation du site dans l'étape 5, permettant l'accessibilité du fer aux chélateurs. Dans le transport intracellulaire du fer, l'abaissement du pH provoquerait le changement de conformation du site, et le Fe^{+++} serait pris en charge par des polyphosphates et plus particulièrement le pyrophosphate (Konopka et Romslo, 1980; Cowart et al., 1983) avant d'être réduit par une oxydoréductase (Ulvik et Romslo, 1981; Thorstensen et Romslo, 1984).

C. Nature et localisation des ligands impliqués dans la fixation du métal

1 - Nature des ligands

Si tous les auteurs sont d'accord sur la participation des résidus d'histidine et de tyrosine et d'un ion bicarbonate, l'accord est loin d'être fait sur le nombre exact de chaque ligand.

La participation de la tyrosine fut suggérée initialement par des différences en pH-titration entre l'apo et la ferritransferrine (Warner et Weber, 1954 ; Aasa et al., 1963; Aasa et Aisen, 1968), confirmée par iodination des tyrosines (Komatsu et Feeney 1967) ainsi que par utilisation du tétranitrométhane (Line et al., 1967). L'analyse des spectres UV (Cannon et al., 1975; Woodworth et Schade, 1961 ; Tan et al., 1969 ; Lehrer, 1969) ou de fluorescence (Luk, 1971) des complexes métal-transferrine indique la participation de quatre résidus de tyrosine par molécule de transferrine, nombre confirmé par Phillips et Aisen (1972). Par contre la nitration donne un nombre plus élevé de résidus : 6 (Bezkorovainy et Grohlich, 1972) ou 7 (Williams, 1982).

En plus des tyrosines, deux résidus d'histidine sont impliqués dans chaque site de fixation du Fe⁺⁺⁺ et du Cu⁺⁺ (Aasa et al., 1963 ; Windle et al., 1963 ; Line et al., 1967). L'étude des spectres APE de la sérotransferrine et de l'ovotransferrine saturées en cuivre, fournit un résidu d'histidine sur chaque site (Aasa et al., 1968 ; Zweier et Aisen, 1977). Cependant Rogers et al., (1977) après modification chimique par le diéthyl-pyrocarbonate trouvent quatre résidus impliqués dans la sérotransferrine et concluent qu'il y en a deux par site . Par contre, Krysteva et al., (1975), en utilisant le même réactif ne détruisent qu'un seul site, pour lequel ils suggèrent la participation de trois résidus d'histidine dans le cas de la sérotransferrine humaine. Sur la base des spectres APE de la sérotransferrine saturée en Cu-63, Mazurier et al. (1977) ne retrouvent qu'un seul atome d'azote dans le site accessible et trois ou quatre sur le site non accessible au diéthyl-pyrocarbonate.

Des études de fluorescence ont montré que les propriétés spectrales du tryptophane étaient affectées par la fixation du métal (Tan et Woodworth, 1969 ; Lehrer, 1969 ; Tomimatsu et al., 1973). Les résultats suggèrent la présence d'un résidu de tryptophane à proximité du site cependant aucune liaison directe entre le métal et le tryptophane n'a encore été démontrée.

L'arginine a été proposée comme ligand de l'anion (Bates et Schlabach, 1973; Rogers et al., 1977), la modification chimique sélective de l'arginine entraînant la perte de la capacité de fixation du fer. La participation du groupement -NH de la lysine a aussi été évoquée dans la fixation de l'anion (Zweier, 1983).

Il reste un dernier ligand possible pour le fer, en effet des études en RMN, menées par Koenig et Schillinger (1969) ont montré qu'une molécule d'eau est située à 2A du métal et une autre à 5A.

Raymond et al., (1982) recalculant les valeurs données dans la littérature par les différences de spectre UV pour la tyrosine, ont montré que quel que soit le métal, il n'y a que quatre résidus de tyrosine directement impliqués et proposent deux résidus d'histidine, deux résidus de tyrosine, un ion OH et un ion HCO comme ligands du fer.

2 - Localisation des ligands du fer

De nombreux auteurs ont proposé une localisation des sites de fixation du fer, déduite des acides aminés, ligands probables du fer, conservés en position homologue dans les domaines N- et C-terminaux des trois transferrines déjà séquencées (Mac.Gillivray et al., 1983; Chasteen, 1983 b; Montreuil et al., 1985).

Après analyse des structures primaires et secondaires des trois transferrines, conservées en position homologue, Montreuil et al. (1985) ont construit la cage du fer et proposé les localisations suivantes pour les ligands : 3 paires de tyrosine (85-412, 95-426 et 188-517), 2 paires d'histidine (119-451, 249-585) et une paire d'arginine (254-590).

La figure 8 (p.28) montre la position de ces ligands sur le modèle inspiré de Williams (1982).

3 - Discussion

Une ou deux histidine ? Deux ou trois tyrosines ? une arginine ou une lysine liant le bicarbonate ? une molécule d'eau ? Nous constatons, d'après ce bref panorama, que l'accord est loin d'être réalisé sur la nature exacte des sites de fixation du fer et en particulier, sur le nombre exact de chaque ligand.

La nature et le nombre des ligands du fer, déduits des homologies de séquence, peut-il être exclusif ? Comment dans ces conditions, si les deux sites sont identiques dans les deux domaines, expliquer les différences de stabilité et de réactivité de chacun des sites ?

III. DIFFERENCES ENTRE LES DEUX SITES DE FIXATION DU FER

A. Mise en évidence d'une différence entre les deux sites

Jusqu'en 1967, la plupart des auteurs pensaient que les deux sites de fixation du métal étaient identiques. Fletcher et Huehns (1967, 1968), en posant en hypothèse la non-équivalence biologique des deux sites de la sérotransferrine, ont lancé toute une série de recherches pour relier cette hypothèse à une non-équivalence physico-chimique.

Princiotto et Zapolski (1975) puis Lestas (1976), montrent que la dissociation du métal de la sérotransferrine humaine est un processus biphasique, le premier fer part à pH 5,8 (site acido-labile et le second à pH 4,8 (site acido-stable). La sérotransferrine de Rat possède le même comportement mais le fer part du site acido-labile à pH 5,2 (Okada et al., 1978). Ce même phénomène a été constaté pour la lactotransferrine humaine, en présence d'ions phosphates et d'EDTA, le fer quitte le site acido-labile à pH 6 et le site acido-stable à pH 4 (Mazurier et Spik, 1980). Par contre, dans le cas de la sérotransferrine de Lapin, il n'a pas été possible à Princiotto et Zapolski (1978) de différencier, par protonation, les deux sites de fixation du fer.

Krysteva et al., (1975, 1976) suggèrent, grâce à des études par modification chimique au diéthyl-pyrocarbonate, et par différence de spectre UV en présence de perturbants, que l'un des sites serait situé à la surface de la protéine, alors que l'autre serait enfoui, et moins accessible aux réactifs.

L'étude des spectres RPE de la sérotransferrine saturée en cuivre (Aasa et Aisen, 1968; Mazurier et al., 1977; Zweier, 1978) ou au vanadium (Cannon et Chasteen, 1975; Harris, 1977; Chasteen

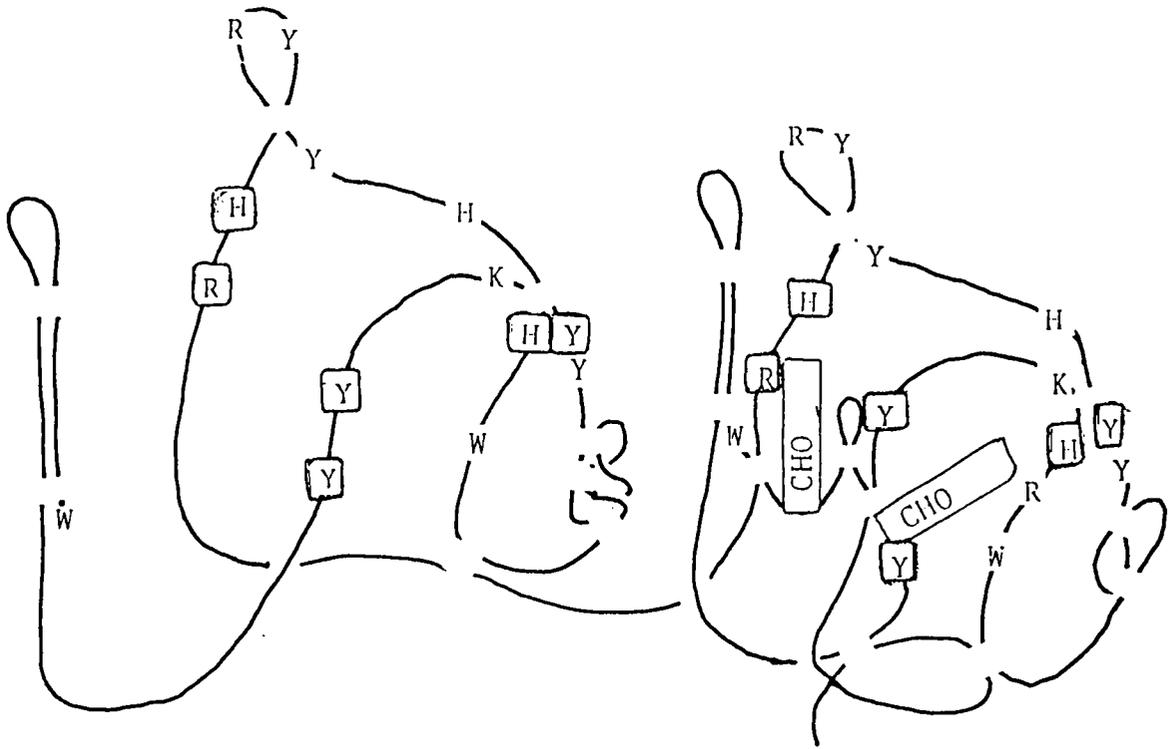


Figure 8 : Localisation des ligands susceptibles de fixer le fer dans la sérotransferrine humaine sur le modèle inspiré de Williams (1982)

Acides aminés communs aux moitiés N et C-terminales des trois transferrines ; Y = Tyr; H = His; R = Arg; K = Lys; W = Trp .

□ Ligands du fer et de l'amion proposés par Montreuil et al.(1985)

.. ponts disulfures

CHO localisation des glycannes

et al., 1977) montre qu'il existe deux signaux caractéristiques et donc un environnement différent pour chacun des sites.

B. Les différentes formes de saturation en fer de la sérotransferrine

Aisen et al. (1978) ont calculé les constantes d'association du fer pour la sérotransferrine humaine possédant un fer, soit sur le site N-terminal (anciennement appelé site A), soit sur le site C-terminal (Site B) (Tableau IV, p.30). Le fer possède plus d'affinité pour la sérotransferrine à pH 7,4, qu'à pH 6,3, et pour le site situé sur la partie C-terminale que sur la partie N-terminale. Frieden et Aisen (1980) ont proposé un schéma (Fig.9, p.30) pour expliquer les interconversions intra- ou inter-moléculaires entre les différentes formes de transferrine. Les constantes k'_N , k'_C , k'_N et k'_C dépendent de la température, du pH, de la force ionique de la concentration en anion susceptible de former un complexe ternaire. Les rapports k'_N/k'_C et k'_C/k'_N orientent préférentiellement la fixation ou le départ du fer de l'un des deux sites.

Il est possible de séparer les quatre formes de transferrine, soit par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée (Makey et Seal, 1976), soit par électrofocalisation (Van Eijk et al., 1978). Dans le sérum, la forme de saturation majeure est la forme FeN-Tf dont le fer est sur le site acido-labile (Leibman et Aisen, 1979; Williams et Moreton, 1980; Marx et al., 1982).

C. Influence des ions sur la forme de saturation de la sérotransferrine

Les études par équilibre de dialyse (Baldwin et De Sousa, 1981; Williams et Moreton, 1980; Williams et al., 1982) ont montré l'importance de la concentration en ions chlorures. Dans le sérum, la présence de chlorures favorise la fixation du fer sur le site N-terminal de la transferrine, tandis que l'élimination des sels entraîne la migration du fer ferrique du site N-terminal vers le site C-terminal. Ce phénomène pourrait être dû à un changement de conformation différent des deux sites.

Folatjar et Chasteen (1982) montrent que la fixation des chlorures affecte les spectres RPE des transferrines monoferriques, avec un changement plus important de la partie N-terminale, tandis que le perchlorate affecte uniquement le site C-terminal. Ils ont montré que la fixation de ces anions était réalisée par un groupement cationique de pKa élevé. Le perchlorate modifierait l'histidine, tandis que le chlorure affecterait non seulement l'histidine mais aussi la lysine et l'arginine (Chasteen et al., 1983).

Cette différence, dans le comportement des deux sites en présence de sels, est aussi observée dans l'élimination du fer de la transferrine par des chélateurs tels le citrate, le pyrophosphate, le nitrilotriacétate et l'EDTA (Baldwin et de Sousa, 1981; Williams et al., 1982 a). Des concentrations en NaCl variant de 0,1 à 1 M accélèrent le départ du fer du site C-terminal mais le retardent à partir du site N-terminal. La présence de sel stabiliserait le site N-terminal par rapport au site C-terminal

TABLEAU IV

Constantes d'association du fer
pour la sérotransferrine humaine

	Fe_N-Tf	$Tf-Fe_C$	Fe_2-Tf
Ka; pH 7,4	$2,4 \cdot 10^{19}$	$4,7 \cdot 10^{20}$	10^{40}
Ka; pH 6,3	$5 \cdot 10^{18}$	$3 \cdot 10^{19}$	10^{38}

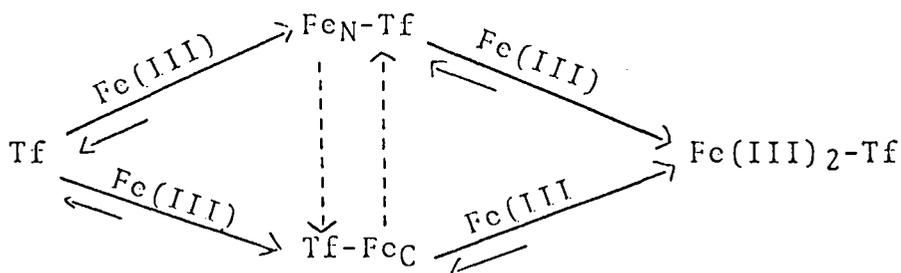


Figure 9 : Schéma illustrant la formation des formes connues de transferrine ferrique (Frieden et Aisen, 1980)

Tf : Apotransferrine

Fe_N-Tf : Transferrine monoferrique possédant un ion ferrique sur le site N terminal (acido-labile).

$Tf-Fe_C$: Transferrine monoferrique possédant un ion ferrique sur le site C terminal (acido-stable).

Fe_2-Tf : $Fe_N-Tf-Fe_C$: Transferrine diferrique possédant deux ions ferriques sur chacun des sites.

D. Différence de conformation entre les formes apo et saturée en fer des transferrines

1. Stabilité à la dénaturation

Les premières études ont montré que les apotransferrines et les ferritransferrines différaient dans leur solubilité dans l'alcool à 40 %, et aussi dans leur résistance à la protéolyse, aux alcalis, aux dénaturations par la chaleur et par l'urée, à l'iodination et enfin aux traitements par les agents réducteurs (Koechlin, 1952 ; Azari et Feeney, 1958; 1961; Glazer et Mac Kenzie, 1963; Spik et Montreuil, 1966). La stabilisation conférée par la fixation du fer, envers la dénaturation par l'urée et le chlorhydrate de guanidine a aussi été prouvée par Bezkorovainy et Grohlich (1967) et Krysteva et al. (1976).

2. Preuves physiques de la différence de conformation

Kornfeld (1969) a trouvé par gel filtration sur Séphadex G-100 que la ferritransferrine était retardée par rapport à l'apotransferrine. Ces résultats sont confirmés par Charlwood (1971).

Les études de sédimentation, de diffusion et de viscosité, ont montré que la sérotransferrine humaine possédait une forme plus sphérique quand elle était saturée en fer, et que le rapport des axes a/b de l'ellipsoïde de révolution passait ainsi de 3 à 2 (Rosseneu-Motreff et al., 1971. Ces résultats sont cependant controversés par les études de Bezkorovainy et Rafelson (1964) et de Bezkorovainy (1966) qui obtiennent des valeurs inverses. Selon ces derniers auteurs, la valeur d'hydratation h décroît avec la fixation du fer, tandis que pour les premiers, elle augmente de 0,6 à 0,7 g d'eau/g de protéine avec la saturation en fer.

3. Différence d'antigénicité entre les formes apo et saturée en fer de la sérotransferrine

Les expériences de Kourilsky et Burtin (1966; 1968) ont montré qu'un sérum de Lapin anti-sérotransferrine humaine réagissait différemment avec les formes apo et saturée en fer.

4. Preuves biologiques de la différence de conformation

Dès 1963, Jandl et Katz ont démontré que la sérotransferrine humaine saturée en fer se fixait avec une affinité relativement plus grande que la forme apo sur les réticulocytes. Aisen et coll. (1966) ont montré que la sérotransferrine diferrique était plus fortement attachée aux réticulocytes que celle saturée à 50 %.

Dautry-Varsat et Lodish (1984) ont montré que l'affinité de la sérotransferrine pour son récepteur variait, entre les formes apo et saturée, en fonction du pH. La sérotransferrine diferrique ne se fixe au récepteur qu'à un pH voisin de la neutralité, tandis qu'à ce pH l'apo sérotransferrine n'a aucune affinité pour son récepteur. Inversement à un pH inférieur à 5,5 c'est la forme apo qui possède le plus d'affinité pour le récepteur.

Cette différence d'affinité pour les cellules entre les formes apo et saturée de la sérotransferrine sera plus détaillée dans le chapitre réservé aux interactions sérotransferrine-cellules.

FONCTIONS BIOLOGIQUES DE LA SÉROTRANSFERRINE

I Rôle de la sérotransferrine dans le métabolisme du fer

La sérotransferrine joue un rôle clef dans le métabolisme du fer. Ce rôle est décrit plus en détails dans les revues générales de Lane(1976), Hershko(1977) et Aisen et Brown(1977).

1. Rôle dans le transport du fer

La sérotransferrine cède le fer prélevé, dans les sites d'absorption (les cellules muqueuses intestinales), dans les sites de réserve (le parenchyme hépatique) et dans les sites de catabolisme de l'hémoglobine (les cellules réticulo-endothéliales du foie, de la rate et de la moëlle osseuse), aux sites d'utilisation (essentiellement la moëlle osseuse) où le fer est réclamé en grande quantité pour la production d'hémoglobine lors du développement des cellules de la lignée érythropoïétique, mais aussi au placenta chez la femme enceinte, et à toutes les autres cellules de l'organisme qui ont besoin de fer.

Le cycle du fer est représenté dans la Fig.10(p.33). Le fer est surtout utilisé au niveau de la moëlle osseuse pour l'érythropoïèse. Le fer hémoglobinique représente 65 % du fer total chez l'Homme. La durée de vie des hématies est de 110 jours, les globules rouges sénescents sont alors phagocytés par les macrophages de la moëlle osseuse, du foie et de la rate, qui catabolisent l'hémoglobine et le fer libéré est, soit capé par la sérotransferrine et réutilisé immédiatement, soit stocké dans la ferritine des cellules du système réticulo-endothélial, soit stocké dans la ferritine du parenchyme hépatique (hépatocytes) par l'intermédiaire de la sérotransferrine.

Le foie constitue un organe important de réserve du fer (environ 1/3 des réserves totales de l'organisme). Le fer de réserve se répartit pour 2/3 dans la ferritine, sous forme d'oxyhydroxyde de fer [FeOOH] qui est soluble dans le cytosol, et pour 1/3 dans l'hémosidérine dans les sidérosomes. L'hémosidérine est une protéine insoluble qui contient plus de fer que la ferritine, mais son fer est plus faiblement mobilisable que celui de la ferritine (Hershko, 1977). En fait les sidérosomes ne seraient que des lysosomes à fer, où la ferritine est détruite, perd sa coquille protéique, et les noyaux de ferritine contenant le fer sous forme [FeOOH] constituent "l'hémosidérine amorphe" qui est insoluble (Wixom et al., 1980 ; Richter, 1983).

2. Rôle dans l'absorption intestinale du fer

Outre ce rôle de transport, la sérotransferrine possède un rôle de régulation qui dépend de son taux de saturation en fer. Le taux d'absorption intestinal du fer est augmenté si le taux de saturation de la sérotransferrine est faible et inversement. Nous avons vu précédemment que le cycle du fer fonctionne en circuit fermé, et n'admet normalement qu'une fuite quotidienne de 1 à 2 mg chez l'Homme. Cette fuite est compensée par l'absorption d'une quantité

équivalente à partir du fer alimentaire resté disponible après la digestion. Malgré la faible quantité de fer mise en jeu, l'absence d'une régulation de l'excrétion implique l'existence d'une régulation très importante de l'absorption. Cette absorption a lieu essentiellement dans la portion supérieure de l'intestin grêle, principalement au niveau du duodenum et du jejunum. Une mauvaise régulation entraîne des troubles graves comme l'hémocromatose idiopathique où l'absorption du fer est accrue. De nombreuses revues générales ont été consacrées à cette régulation (Forth et Rummel, 1973 ; Turnbull, 1974 ; Cattani, 1979 ; Refsum et al., 1980, 1984) mais elle est encore très mal connue.

L'absorption intestinale du fer fait surtout intervenir l'entérocyte (Linder et Munro, 1977), mais les macrophages villositaires joueraient également un rôle important dans la régulation (Cattani, 1979 ; Refsum et al., 1980). En effet, c'est dans le macrophage que se trouve le stock de fer le plus important de la villosité, et chez le sujet normal, le transfert ne porte que sur 25% de la quantité captée (Powell et al., 1970). Refsum et Schreiner (1984) ont proposé un schéma (Fig. 11, p. 35) qui résume les différentes voies du fer au niveau de la muqueuse intestinale.

Il existe une controverse, à l'heure actuelle, sur le type de transferrine impliquée dans la fixation du fer sur la bordure en brosse des entérocytes: soit la sérotransferrine (Huebers et al., 1974 ; 1983 b ; Kiyoko et Yoschinari, 1982 ; Purves et al., 1984 ; Refsum et Schreiner, 1984), soit la lactotransferrine (Cox et al., 1979 ; Yoshino et al., 1983 ; Mazurier et al., 1984). Cependant les résultats récents de Parmley et al., (1985) par l'utilisation des anticorps monoclonaux OKT9, infirmant l'existence de récepteurs de la sérotransferrine sur les microvillosités du duodenum, ainsi que ceux de Bezwoda et al. (1986), montrant l'incapacité de la sérotransferrine humaine à stimuler l'absorption intestinale du fer chez des sujets achlorhydriques, suggèrent que la sérotransferrine ne joue pas un rôle physiologique dans l'absorption du fer.

Les sels de fer, essentiellement les sels ferreux, jouent également un rôle important dans la régulation de l'absorption du fer en se fixant sur des sites de la membrane des villosités (Cox et O'Donnel, 1981 ; Marx et Aisen, 1981 ; Muir et al., 1983).

3. Rôle dans l'activité bactériostatique

La sérotransferrine possède également une fonction très importante, en complexant le fer, elle empêche la multiplication dans l'organisme des agents infectieux pour lesquels ce métal est un facteur indispensable. Cette activité bactériostatique a été mise en évidence, *in vitro*, dès 1946 par Schade et Caroline.

En fait dans l'organisme, le mécanisme serait plus complexe et ferait intervenir une autre transferrine: la lactotransferrine (Van Snik et al., 1977 ; Spik et Montreuil, 1983 ; Sawatski et al., 1983). Ce mécanisme est schématisé dans la Fig. 12, p. 36. Au contact de la bactérie, les leucocytes mononucléés secrètent un agent pyrogène qui active les leucocytes polynucléés en leur faisant synthétiser la lactotransferrine qui, relarguée dans le milieu, peut désaturer la sérotransferrine plasmatique dans les conditions de pH acide au voisinage des leucocytes activés. Elle emmène ensuite le fer dans les macrophages du système réticulo-endothélial où il est stocké dans la ferritine. Ce processus doit

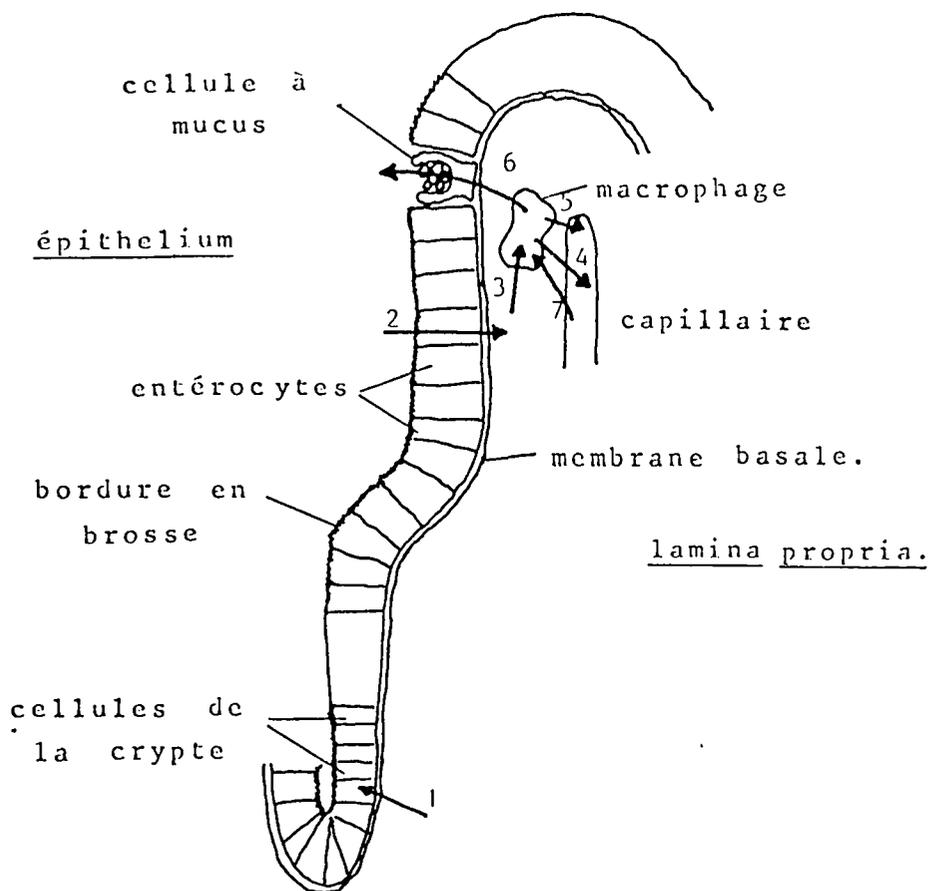


Figure 11 : Mécanismes de la régulation de l'absorption intestinale du fer proposé par Refsum et Schreiner en 1984

- 1) incorporation du fer endogène dans les cellules de la crypte
- 2) incorporation du fer et transport à travers l'entérocyte ;
- 3) incorporation du fer lié à la ferritine dans les macrophages
- 4) absorption rapide dans le sang (fer lié à la sérotransferrine)
- 5) absorption retardée dans le sang (fer lié à la sérotransferrine)
- 6) excrétion du fer nouvellement absorbé, en excès, à travers les cellules à mucus (fer lié à la ferritine)
- 7) excrétion du fer en excès de l'organisme via les macrophages puis les cellules à mucus.

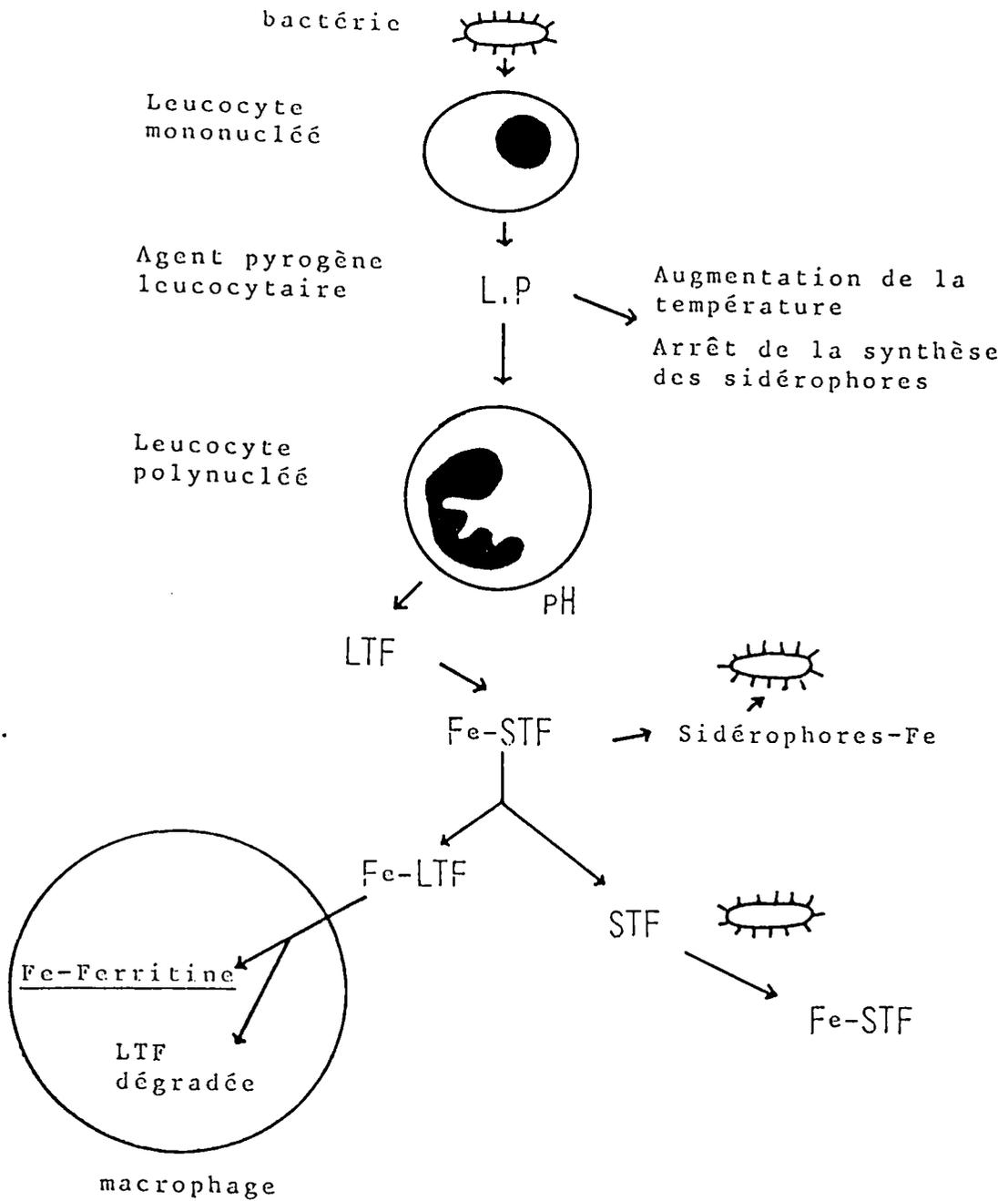


Figure 12 : Rôle des transferrines dans l'hyposidérémie pendant l'infection bactérienne (Spik et Montreuil, 1983)

être très rapide en raison de la demi-vie très brève de la lacto-transferrine dans le sang. La bactérie est à nouveau privée du fer, essentiel à sa croissance, par la sérotransferrine, bien qu'il y ait compétition entre celle-ci et les sidérophores bactériens qui sont capables de fixer fortement le fer à pH acide.

II. INCORPORATION CELLULAIRE DU FER DE LA SEROTRANSFERRINE

La sérotransferrine transporte le fer à travers tout l'organisme pour le répartir entre les différents tissus. Elle est donc capable de prélever et de céder le métal à plusieurs types de cellules, ce qui implique l'existence de récepteurs spécifiques de la transferrine, situés à la surface des cellules où s'effectue le transfert.

Il est couramment admis que le processus d'incorporation du fer peut être décomposé en quatre étapes :

- (1) Interaction de la sérotransferrine avec un récepteur membranaire spécifique
- (2) Internalisation du complexe récepteur-sérotransferrine
- (3) Libération du fer de la sérotransferrine
- (4) Détachement de l'apo-sérotransferrine de la cellule

Nous verrons que l'étape (2) est encore controversée.

A. LE RECEPTEUR MEMBRANAIRE DE LA SEROTRANSFERRINE

1. Historique de la mise en évidence d'un récepteur membranaire

L'incorporation du fer par les réticulocytes a été mis en évidence en 1949 par Walsh et al. (1949) qui ont montré que ces cellules étaient capables d'absorber le fer du milieu comme les cellules de la moëlle osseuse. Mais c'est Jandl et al. en 1959 puis en 1963 qui ont révélé la participation de la sérotransferrine dans ce processus de fixation du fer. Ils ont montré que la transferrine pouvait donner son fer aux réticulocytes et non aux érythrocytes matures et que ce n'était pas dû à un phénomène de simple diffusion mais à l'attachement spécifique de la transferrine à la surface du réticulocyte. En effet, ni la sérum albumine, ni les immunoglobines ne se fixent sur les réticulocytes, et, quand ceux-ci sont traités à la trypsine, ils sont incapables d'incorporer le fer de la transferrine. Ils ont ainsi conclu à l'existence d'un récepteur de la sérotransferrine à la surface du réticulocyte, ce récepteur étant spécifique de la sérotransferrine saturée.

Cette découverte a déclenché de nombreuses études pour isoler et caractériser le récepteur membranaire de la sérotransferrine. Les premiers essais d'isolement du récepteur datent de 1973, avec l'utilisation de détergents solubilisant les protéines membranaires. Garrett et al. (1973) ont montré que la sérotransferrine se fixait au surnageant de réticulocytes traités au détergent et ont isolé des complexes dont la masse moléculaire apparente variait de 350 kDa à 700 kDa suivant la nature du détergent employé.

Depuis cette date de nombreux auteurs ont isolé, par solubilisation des membranes de réticulocyte, des complexes dont la masse

moléculaire varie de 123 kDa à 700 kDa , ce qui donne pour le récepteur une masse variant de 30 kDa à 200 kDa. Cette grande hétérogénéité des résultats est due aux techniques utilisées pour isoler le complexe et pour en mesurer sa masse. La plupart des auteurs utilisent le tamisage moléculaire en présence de détergents, or ceux-ci se fixent sur les protéines et peuvent en augmenter considérablement le rayon de Stokes (Hu et Aisen, 1978) ou former des agrégats résultant de l'association de plusieurs récepteurs et de plusieurs transferrines (Light, 1977) , ceci expliquant les masses moléculaires élevées. D'un autre côté la rupture des cellules libère les enzymes protéolytiques contenues dans les lysosomes, et à cette époque, très peu d'auteurs utilisaient des inhibiteurs de protéases , ce qui expliquerait les faibles masses observées pour le récepteur, celui-ci aurait été dégradé par protéolyse au cours du fractionnement.

Le coup d'arrêt à ces études d'isolement, par des méthodes chromatographiques, du récepteur réticulo-cytaire de la sérotransferrine par solubilisation des membranes, a été donné par Enns et Sussman en 1981, qui ont montré de grandes similitudes entre les récepteurs de la sérotransferrine des réticulocytes et du placenta, chez l'Homme, et par Newman et al. (1982), qui ont montré l'identité du récepteur des normoblastes (précurseurs des érythrocytes) et du récepteur commun aux cellules en prolifération, par utilisation de l'anticorps monoclonal OKT 9, ainsi que par Frazier et al., en 1982, qui ont comparé le récepteur des réticulocytes humains et des cellules humaines nucléées en culture. Le récepteur de la sérotransferrine sur le réticulocyte humain serait donc le même que sur les cellules se divisant activement (placenta, cellules transformées, cellules en culture, etc.) que nous allons décrire dans le paragraphe suivant.

On sait maintenant qu'il existe des récepteurs de la sérotransferrine sur les réticulocytes (Jandl et Katz, 1963 ; Morgan, 1964 Baker et Morgan, 1969 a et b), sur les hépatocytes (Van Bockxmeer et al., 1975; Grohlich et al., 1977, 1979) et sur le tissu placental (Faulk et Galbraith, 1979 ; Wada et al., 1979 a; Galbraith et al., 1980 a, b; Loh et al., 1980) qui sont impliqués dans l'incorporation du fer.

2. Universalité du récepteur de la sérotransferrine

Hamilton et al. (1979), Wada et al. (1979 b) partant de l'observation que les cellules trophoblastique du placenta présentent des propriétés communes aux cellules néoplasiques (elles échappent au système immunitaire et présentent une croissance rapide), utilisent des anticorps dirigés, soit contre la sérotransferrine, soit contre le récepteur placentaire de la sérotransferrine humaine pour repérer ses récepteurs sur de nombreuses lignées cellulaires humaines. Ils démontrent ainsi l'universalité d'un seul récepteur de la sérotransferrine dans toutes les lignées à croissance rapide. Cependant les récepteurs du foie et du rein ne présentent pas de réactions immunologiques avec cet anticorps. Pour ces auteurs, le foie et le rein sont des tissus en état de repos et ne nécessitent pas autant de transfert du fer que les tissus placentaires ou que les cellules de la lignée érythropoïétique ou encore que les cellules transformées dont le "turn-over" est beaucoup plus rapide.

En 1981, deux groupes de chercheurs ont isolé chacun un anticorps monoclonal réagissant avec le récepteur de la sérotrans-

ferrine humaine, et précipitent le complexe récepteur-sérotransferrine. Il s'agit de Trowbridge et Domingo qui ont isolé l'anticorps B 3/25 dirigé contre la lignée cellulaire K 562 (cellules de leucémie érythroïde), et de Sutherland et al., qui ont isolé l'anticorps OKT9 dirigé contre les lymphocytes T. Ces deux groupes de chercheurs ont démontré que l'expression du récepteur de la sérotransferrine, reconnu par l'anticorps monoclonal, est fortement en corrélation avec la prolifération de cellules en culture, ce récepteur étant pleinement exprimé dans les cellules qui sont en prolifération active. L'utilisation de l'anticorps monoclonal OKT9 a permis à Newman et al., (1982) d'isoler le récepteur à partir d'une grande variété de types de cellules : le foie foetal, les normoblastes, les lymphocytes, les cellules leucémiques, les neuroblastomes, les mélanomes et les cellules du cancer du pancréas.

3. Spécificité de la fixation de la sérotransferrine sur le récepteur

Le récepteur est spécifique de la sérotransferrine, ni la lactotransferrine, ni l'ovotransferrine ne se fixent ni ne donnent le fer aux réticulocytes de mammifères (Princiotto et Zapolski, 1976; Cox et al., 1979 ; Van Bockmer et Morgan, 1982)

De nombreux auteurs ont utilisé la représentation de Scatchard des courbes de saturation pour estimer le nombre et l'affinité des récepteurs de la sérotransferrine sur un grand nombre de cellules. Une revue détaillée de ces valeurs a été réalisée par Brock (1985). La grande disparité constatée dans les paramètres de fixation provient essentiellement des conditions de travail : fixation non spécifique, utilisation de systèmes non homologues. Les valeurs de ces paramètres seront discutées dans la partie consacrée à nos résultats.

Il est à noter que tous les types de cellules en culture ont besoin de transferrine pour pousser de manière optimale, dans un milieu dépourvu en sérum (Hutchings et Stato, 1978; Barnes et Stato, 1980). De même la fixation d'un anticorps monoclonal antirécepteur inhibe la croissance des cellules tumorales humaines (Trowbridge et Omary, 1981). La sérotransferrine bovine se fixe spécifiquement sur les cellules humaines K 562 avec cependant, une affinité 2000 fois plus faible que la sérotransferrine humaine (Tsavaler et al. 1986) ce qui est important car la plupart des études d'interaction entre la sérotransferrine et son récepteur ont été réalisées à l'aide de cellules cultivées en présence de sérum de veau foetal.

4. Structure et conformation du récepteur de la sérotransferrine

L'utilisation des anticorps monodonaux OKT9 et B3/25 a permis l'isolement et l'étude structurale de ce récepteur chez l'Homme. Son schéma est donné dans la Fig.13, p.40 (Newman et al., 1982). Schneider et al. (1982) ont montré qu'il s'agissait d'une glycoprotéine de 180 kDa, constituée de deux sous-unités de 90 kDa identiques à celles déjà isolées par Wada et al. (1979) dont le pH est voisin de 5,2 et reliées entre elles par un pont disulfure. Chaque sous unité possède trois glycannes, deux de type oligomannosidique et un de type N-acétyl-lactosamique. Ces glycannes ne semblent pas avoir de rôle dans la reconnaissance des anticorps monoclonaux. La majeure partie des chaînes peptidiques se trouve à l'extérieur de la cellule et porte les sites de la sérotransferrine. Chaque molécule de récepteur peut fixer deux molécules

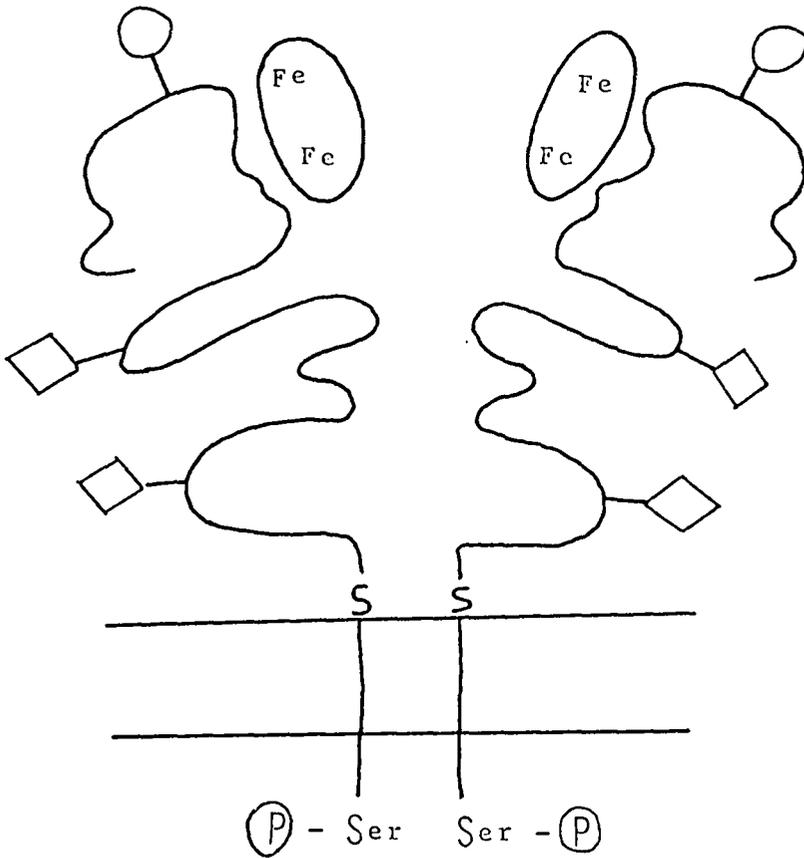


Figure 13 : Représentation schématique du récepteur de la sérotransferrine humaine selon Newman et al. (1982).

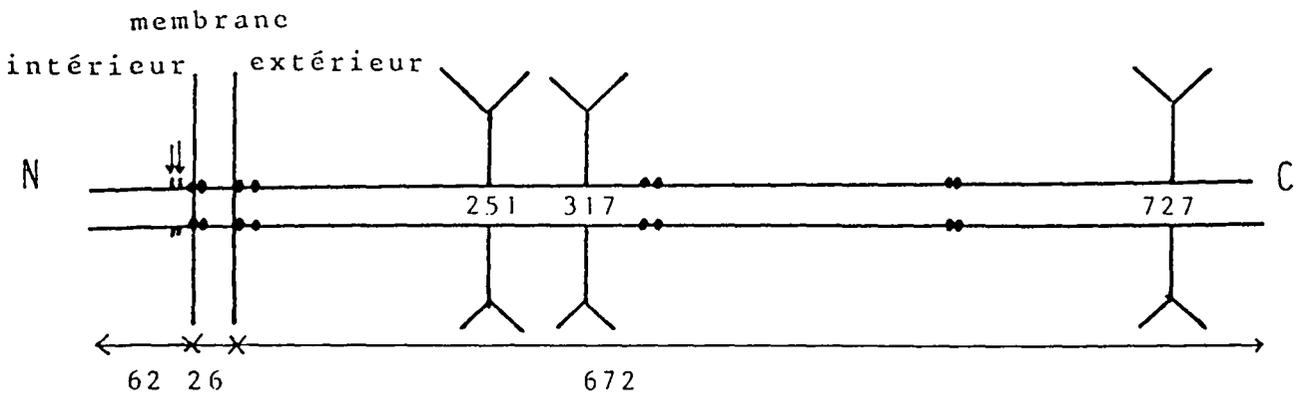


Figure 14 : Structure et orientation dans la membrane du récepteur de la sérotransferrine selon Schneider et al. (1984)

Position des résidus de cystéine

Position supposée des glycanes

Sites de glycosylation non glycosylés

de transferrine. Chaque chaîne porte un acide gras, l'acide palmitique (Omary et Trowbridge, 1981) qui permet l'ancrage du récepteur qui est transmembranaire et phosphorylé.

Le gène contrôlant la biosynthèse de ce récepteur a été situé sur le chromosome 3 par Enns *et al.* (1982) et Goodfellow *et al.* (1982). Schneider *et al.* (1983) ont réussi à synthétiser *in vitro* le récepteur à partir du RNA placentaire humain. La séquence peptidique déduite du mRNA par Schneider *et al.* (1984) et du cDNA par McClelland *et al.* (1984), est représentée dans la Fig. 15, p. 42. La structure et l'orientation du récepteur dans la membrane sont représentées dans la Fig. 14, p. 40. Chaque sous-unité est un polypeptide de 760 résidus d'acides aminés. La partie N-terminale, constituée de 62 résidus d'acides aminés est orientée vers le cytoplasme, contrairement à la plupart des autres protéines transmembranaires connues, mais comme la bande 3 des érythrocytes humains.

La partie transmembranaire est constituée de 26 résidus d'acides aminés très hydrophobes et possède un résidu de cystéine en position 65 qui pourrait être le site de fixation de l'acide gras, par une liaison thioester. La partie transmembranaire sert à la fois d'ancrage et de signal de translocation dans la membrane (Zerial *et al.*, 1987). La partie C-terminale est orientée vers l'extérieur et est constituée de 672 résidus d'acides aminés. La séquence intra-membranaire est entourée de deux résidus de cystéine en position 63 et 89 et d'un autre résidu à proximité en position 98. On ne sait pas lequel de ces résidus forme le pont disulfure inter chaîne, mais il semble probable que ce soit le résidu situé dans le cytoplasme en raison des conditions réductrices du milieu intra-cellulaire. Les autres cystéines sont groupées par deux en position 353, 363, 556 et 558 et doivent former des ponts disulfures intra-chaîne, car l'hydrolyse trypsique libère des fragments de 70kDa non reliés par un pont disulfure. Chaque molécule possède cinq séquences code Asn-X-Ser/Thr, dont trois seulement sont situées sur la partie C-terminale et qui sont sans doute les sites de fixation des trois glycanes: en position 251, 317 et 727.

B. LE RECEPTEUR DE LA SEROTRANSFERRINE ET L'ENTREE DU FER DANS LA CELLULE

La présence de récepteurs spécifiques et saturables de la sérotransferrine a été observée comme nous venons de le voir, à la surface de nombreuses cellules, mais le mécanisme par lequel le fer est enlevé de la transferrine et incorporé dans les cellules reste très controversé. Deux hypothèses ont été avancées: dans la première la transferrine ne rentre pas dans la cellule, alors que dans la deuxième la transferrine est endocytée par l'intermédiaire de son récepteur.

1. La transferrine ne rentre pas dans la cellule

Cette première hypothèse a été formulée, pour les réticulocytes, par Jandl *et al.* (1963), puis par Speyer et Fielding (1974) et enfin par Nunez et Glass (1985). Une fois fixée sur son récepteur à la surface de la cellule, la transferrine cède son fer à des composants membranaires, et retourne dans le milieu extracellulaire, tandis que le fer passe dans le cytoplasme où il est pris en charge par des transporteurs intracellulaires.

De tels composants membranaires renfermant du fer ont été isolés par de nombreuses autres équipes dans les réticulocytes (Van

der Heul et al., 1978; Sly et al., 1978; Glass et al., 1980) et dans les hépatocytes (Morley et al., 1985). Cette hypothèse semble devoir être renforcée par la mise en évidence de l'incorporation du fer par les réticulocytes, à partir de transferrine liée à des billes d'agarose qui ne peuvent rentrer dans la cellule (Loh et al., 1977).

2. Endocytose de la transferrine par l'intermédiaire de son récepteur.

La deuxième hypothèse impliquant une endocytose de la transferrine, est issue essentiellement au départ d'observations morphologiques (Morgan et Appleton, 1969 ; Hemmaphordh et Morgan, 1977 ; Sullivan et al., 1976) : Le complexe fer-transferrine est endocyté par l'intermédiaire de son récepteur membranaire, la transferrine relache son fer à l'intérieur de la cellule puis est excrétée sans dégradation.

Cette hypothèse a reçu un développement considérable ces dernières années avec l'utilisation des cellules en culture. Plusieurs revues générales récentes lui ont été consacrées (Octave et al., 1983, 1984; Dautry-Varsat et Lodish, 1984; Pastan et Willingham, 1985; Hanover et Dickson, 1985; Sussman et al., 1985). Nous allons passer en revue les mécanismes proposés par ces auteurs pour le cycle intracellulaire de la transferrine et le recyclage de son récepteur.

a. Hypothèse d'Octave et al.

A partir d'observations sur les fibroblastes embryonnaires de Rat, en culture (Octave et al., 1979, 1981, 1982 b), les érythroblastes de Rat (Octave et al., 1982 a) et les hépatocytes de Rat (Sibille et al., 1982, 1984), Octave et al. (1983, 1984) ont proposé un mécanisme unique pour l'internalisation de la transferrine dans les cellules de mammifère en culture (Fig. 16, p. 44). Ils ont montré par l'utilisation d'agents lysomotropiques, la méthylamine et la chloroquine, ou d'un agent bloquant l'endocytose, la colchicine, que la fixation de la transferrine sur la membrane n'est pas affectée, mais que l'accumulation du fer dans les lysosomes est considérablement diminuée.

Les récepteurs de la membrane plasmique agiraient uniquement en tant que sites spécifiques de la transferrine saturée en fer, mais ne seraient pas les sites de départ du fer de la transferrine. Le départ du fer se ferait, après internalisation de la transferrine et de son récepteur dans des compartiments intracellulaires où le pH est acide, la transferrine restant associée à son récepteur est ensuite recyclée.

b. Hypothèse de Dautry-Varsat et Lodish

Les études menées sur des cellules cancéreuses humaines en culture, par Ciechanover et al. (1983 a, b), Geuze et al. (1983) et Dautry-Varsat et al. (1983): les cellules Hep-G2 (cellules d'hépatome humain établies en lignée continue) ont permis d'approfondir l'hypothèse d'Octave et al., et d'expliquer le recyclage de la transferrine.

La transferrine possède une affinité différente pour son récepteur suivant qu'elle est sous forme apo ou saturée en fer, en fonction du pH: à pH 5.4, le pH des vésicules d'endocytose (Tycko

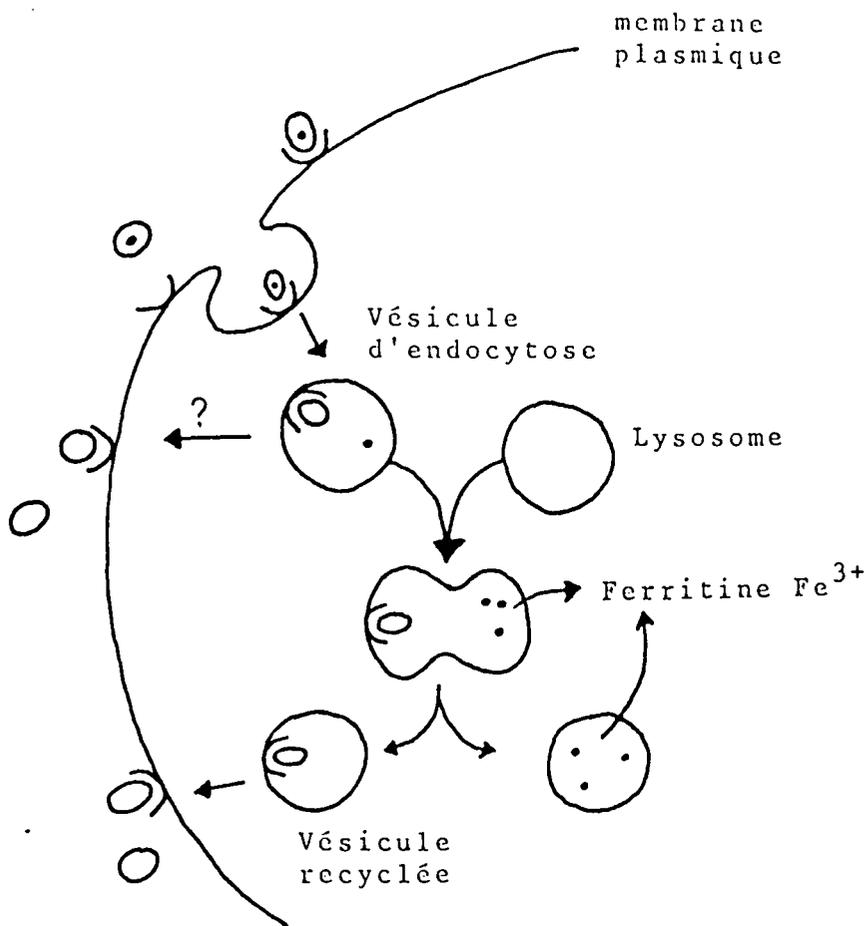


Figure 16 : Cycle intra-cellulaire de la transferrine dans les cellules de mammifères, en culture, selon Octave et al. (1983)

- ⤿ Récepteur de la transferrine
- ⊙ Transferrine saturée en fer
- Apotransferrine
- Fer

et Maxfield, 1982) la transferrine perd son fer, mais possède la même affinité pour le récepteur que la transferrine diférique à pH neutre, tandis qu'à pH 7,3, l'apotransferrine se fixe très peu sur son récepteur (5% de la fixation de la transferrine diférique). Cette hypothèse est confirmée par l'observation de la dissociation rapide à 4°C de l'apotransferrine fixée à pH 5,4 quand le pH est ramené à 7,3. Klausner et al. (1983) ont d'ailleurs abouti à des conclusions similaires en étudiant des précurseurs des érythrocytes, les cellules K 562 (cellules cancéreuses provenant d'érythroleucémie humaine).

L'ensemble de ces résultats ont amené Dautry-Varsat et Lodish (1984) à proposer un modèle pour le cycle intracellulaire de la transferrine pour toutes les cellules humaines en culture (Fig. 17 p. 46). La transferrine, fixée sur son récepteur, est endocytée dans un puits recouvert de clathrine ("coated pit"), la vésicule d'endocytose toujours recouverte de clathrine ("coated vesicle") s'enfonce dans le cytoplasme en perdant le revêtement de clathrine et se transforme en réceptosome (Willingham et Pastan, 1980) ou endosome (Wall et al., 1980), où le pH acide (inférieur à pH 5,5, Tycko et Maxfield, 1982) libère le fer. L'endosome se transforme alors en compartiment de dissociation, le CURL ("compartment of uncoupling ligand and receptor"): la partie tubulaire, contenant la transferrine toujours attachée à son récepteur, est recyclée vers la membrane plasmique, puis arrivée à la surface de la cellule, le pH neutre du milieu extra-cellulaire dissocie l'apotransferrine de son récepteur.

c. Hypothèse de Pastan et Willingham

Le mécanisme par lequel la transferrine est endocytée par son récepteur et recyclée a été étudié dans les cellules KB par Willingham et al. (1983), Hanover et al. (1984) et Hanover et Dickson (1985). La peroxydase couplée à la transferrine permet de localiser celle-ci en microscopie électronique ainsi que les différents organelles la contenant. Les différentes étapes de l'endocytose et de l'exocytose sont identiques à celles décrites par Dautry-Varsat et Lodish, à l'exception d'un passage par le trans-Golgi. La dissociation fer-transferrine se ferait dans le réceptosome (ou endosome) au voisinage du trans-Golgi correspondant aux CURL. La transferrine associée à son récepteur serait transférée dans les éléments tubulaires du trans-Golgi (et non dans les puits recouverts du Golgi), puis ensuite dans des vésicules de forme tubulaire, associées à des microtubules, et réinsérées dans la membrane plasmique à la surface de la cellule, où l'apotransferrine est relâchée dans le milieu en raison du pH neutre.

d. Existence de deux voies de recyclage du complexe transferrine-récepteur

La resialylation de la sérotransferrine par le foie, mise en évidence par Regoeczi et al. (1982) et retrouvée dans des vésicules d'endocytose recouvertes de clathrine (Fishman et Fine, 1987) ainsi que la resialylation du récepteur traité à la neuraminidase (Sniders et Rogers, 1985) confirme le passage par le trans-Golgi, en effet, la sialyl-transferase est située dans le trans-Golgi (Roth et al., 1985). Le temps nécessaire à la complète resialylation de la transferrine et du récepteur (1-2h) est beaucoup plus long que leur internalisation et leur recyclage (15 min) ce qui expliquerait l'existence d'une voie normale de recyclage courte (Golgi-indépendante) et d'une voie longue qui ferait intervenir

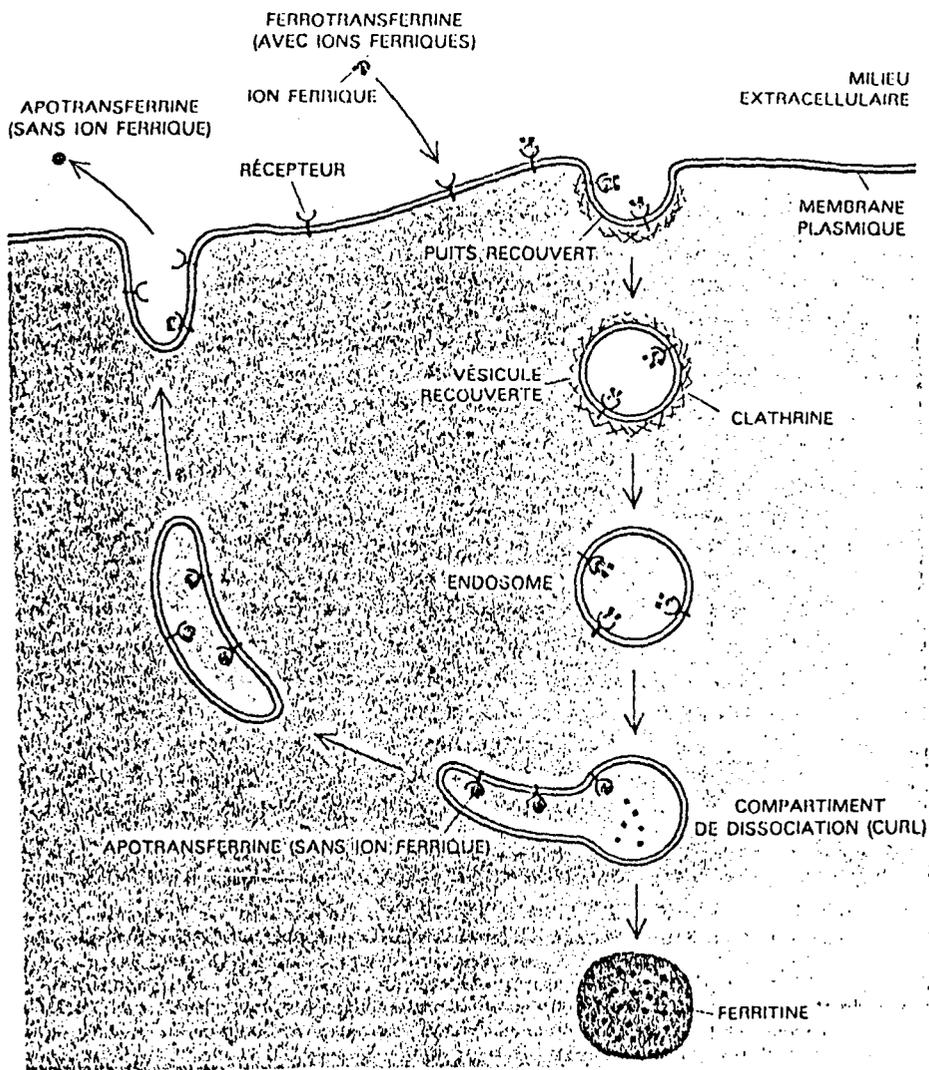


Figure 17 : Le cycle de la transferrine selon Dautry-Varsat et Lodish (1984)

le trans-Golgi . Au sujet de cette dernière voie , l'existence de deux types de vésicules d'exocytose est décrite par Fishman et Fine (1987) : une vésicule recouverte de clathrine renfermant la plupart des protéines membranaires recyclées et nouvellement synthétisées, et une vésicule de sécrétion non recouverte de clathrine renfermant plus de protéines solubles sécrétées que de protéines membranaires.

Les études de Stein et al.(1984), Stein et Sussman (1985,1986) et Sussman et al.(1985) sur les cellules K 562 traitées à la monensine font dire à ces auteurs qu'il existe deux voies de recyclage du complexe transferrine-récepteur: une voie monensine-sensible faisant intervenir le complexe de Golgi comme il est décrit dans l'hypothèse précédente et une voie monensine-résistante, appelée Golgi-indépendante. En présence de monensine les récepteurs de la voie Golgi-dépendante sont accumulés dans la région périnucléaire du Golgi, alors que les récepteurs de la voie Golgi-dépendante sont continuellement recyclés à la surface. De plus le récepteur est internalisé indépendamment de la présence du ligand.

e. Cas particulier de la transferrine dans l'endocytose via un récepteur et son recyclage

L'endocytose de la transferrine que nous venons de décrire présente un cas particulier par rapport aux autres systèmes d'endocytose par l'intermédiaire d'un récepteur . Ceci est schématisé dans la Fig.18,(p.48) qui représente les trois types principaux d'endocytose.

En effet, chez les mammifères, les ligands internalisés par l'intermédiaire d'un récepteur se trouvent généralement dans les lysosomes où ils sont dégradés (Goldstein et al.,1979 ; Pastan et Willingham,1981a;b) tandis que le récepteur est recyclé. C'est le cas du récepteur à mannose du macrophage, du récepteur des asialoglycoprotéines des hépatocytes, du récepteur des LDL ("Low density lipoproteins"), du récepteur de l' α 2-macroglobuline (qui fixe les protéases du sérum) pour ne citer que les plus connus.

Dans d'autres cas tel celui de l'EGF (Epidermal growth factor) le ligand mais aussi son récepteur se retrouvent dans les lysosomes où ils sont dégradés. A la différence de la transferrine que l'on retrouve dans les éléments tubulaires du trans-Golgi, les puits recouverts du Golgi seraient impliqués dans l'orientation des molécules vers les lysosomes (Pastan et Willingham,1983).

En moins de 5 minutes la sérotransferrine est retrouvée dans des structures tubulaires voisines du complexe de Golgi de pH 6,4 alors que l' α 2-macroglobuline est retrouvée dans des vésicules d'endocytose classiques de pH 5,4 (Yamashino et al.,1985). Le trans-Golgi serait ainsi la plaque tournante du recyclage : les ligands destinés à être dégradés après dissociation acide dans le réceptosome, et fusion de celui-ci avec les éléments tubulaires du Golgi (CURL) migreraient vers les puits recouverts du trans-Golgi, puis ces éléments fusionneraient avec les lysosomes. Dans le cas du récepteur de l'EGF, celui-ci prendrait le même chemin. Les récepteurs non destinés à être dégradés, resteraient dans les éléments tubulaires du Golgi, puis retourneraient vers la surface de la cellule par un processus identique à celui décrit pour la transferrine. Le recyclage de la transferrine s'expliquant uniquement par la forte affinité de l'apotransferrine pour le récepteur à pH acide.

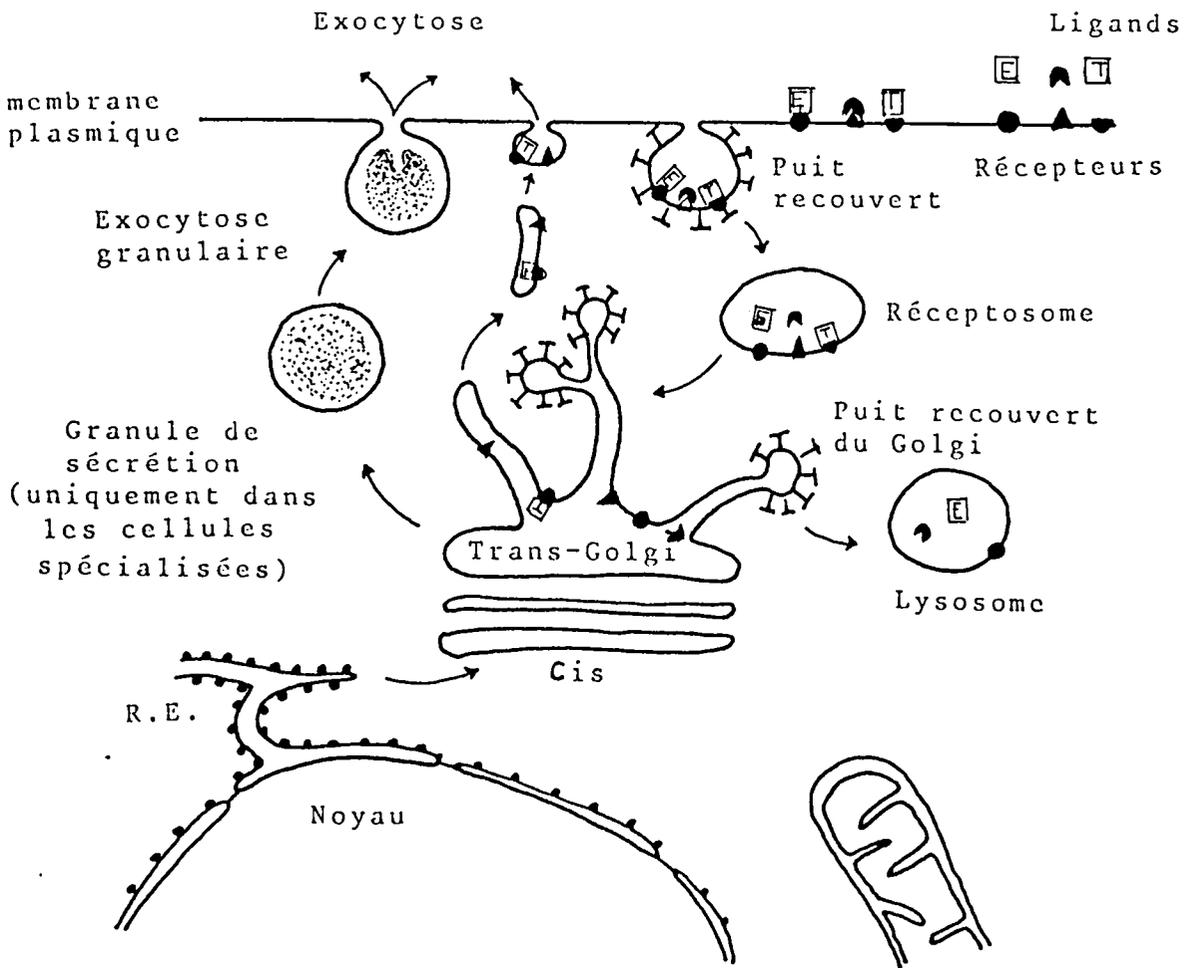


Figure 18 : Schéma résumant les différentes voies d'endocytose et d'exocytose dans les cellules en culture, d'après Pastan et Willingham (1985). Les ligands montrés en exemple sont (E) pour EGF; (T) pour transferrine; (\blacktriangle) pour $\alpha 2$ -macroglobuline. Les récepteurs respectifs de ces ligands sont représentés par (\bullet) pour le récepteur de l'EGF, (\blacktriangledown) pour le récepteur de la transferrine et (\blacklozenge) pour le récepteur de l' $\alpha 2$ -macroglobuline.

3. Transport intracellulaire du fer

Diverses hypothèses ont été formulées, impliquant le transport intracellulaire du fer conjugué à des transporteurs. Le fractionnement chromatographique ou électrophorétique du cytosol de nombreuses cellules, démontre l'existence de différentes substances contenant du fer non hémunique.

La plupart des auteurs trouvent le radiofer dans la ferritine et la transferrine. Nous venons de voir l'importance de la transferrine dans le transport intra-membranaire du fer mais la ferritine, longtemps suggérée comme le transporteur intracellulaire du fer (Speyer et Fielding, 1974; 1979) aurait plutôt un rôle dans le stockage que dans le transport du fer (Primosigh et Thomas, 1968 ; Borova et al., 1973; Ponka et al., 1980; 1982)

D'autres molécules contenant du fer ont aussi été isolées, possédant des masses moléculaires de quelques centaines à plusieurs milliers de daltons (Nunez et al., 1980; Ponka et al., 1980 ; 1982; Egyed, 1983). Ces composants constituent ce qu'on appelle communément une réserve intermédiaire du fer ("iron transit pool") sous forme de complexes du fer de faible masse moléculaire. C'est à cette réserve intra-cellulaire qu'aboutirait le fer de la transferrine mais aussi celui provenant de la libération du fer hémunique par l'hème-oxygénase microsomale, avant son incorporation dans la ferritine.

Le rôle de cette réserve intra-cellulaire du fer est cependant contesté, son existence pouvant être simplement dû à la pénétration par simple diffusion dans la cellule de chélates ferriques de faible masse moléculaire (Crichton, 1985). Selon Egyed (1983), il n'existe pas de modèle non ambigu pour le transport intra-cellulaire du fer.

Pourtant Romslo et al. (1982) ont proposé un mécanisme pour le transport intra-cellulaire du fer entre la transferrine et la mitochondrie. La sérotransferrine fixée sur son récepteur est endocytée, le fer ferrique, détaché de la transferrine par abaissement du pH, serait pris en charge par des polyphosphates de faible masse moléculaire, essentiellement le pyrophosphate (Konopka et Romslo, 1980 ; Cowart et al., 1983). Le fer ferrique, chélaté par le pyro-phosphate, serait ensuite essentiellement utilisé pour la synthèse de l'hémoglobine dans la mitochondrie. Après réduction par une FMN oxydoréductase mitochondriale (Vlvik et Romslo, 1981), le fer devenu ferreux serait incorporé dans l'hème par une ferro-chélatase (Konopka et Romslo, 1981). L'autre voie pour le complexe Fe(III)pyro-phosphate serait le stockage du fer dans la ferritine (Konopka et al., 1980) d'où il pourrait à nouveau être mobilisé en cas de besoin par la FMN oxydoréductase et incorporé à l'hème par le même mécanisme (Vlvik, 1981).

C. RELATION ENTRE L'EXPRESSION DU RECEPTEUR ET LA PROLIFERATION CELLULAIRE

L'utilisation par Bartek et al., (1983) d'une série d'anticorps monoclonaux dirigés contre la sérotransferrine humaine, a permis de montrer clairement sur plusieurs lignées cellulaires que la fixation de la sérotransferrine sur son récepteur était en relation directe avec la prolifération cellulaire. En effet l'anticorps monoclonal -14, qui inhibe le plus la fixation de la sérotransferrine sur son récepteur est aussi celui qui inhibe le plus

la prolifération cellulaire et l'incorporation du fer dans la cellule. Il est à noter que cet anticorps reconnaît un déterminant antigénique similaire dans les sérotransferrines de Lapin et de Porc.

Bien que toutes les cellules nucléées possèdent probablement des récepteurs de la sérotransferrine, la densité de ces récepteurs à la surface est considérablement augmentée quand les cellules deviennent malignes, quand elles sont en phase logarithmique de croissance ou sont induites à proliférer rapidement *in vitro*. Cette association entre la densité du récepteur et la croissance active a été constatée dans les fibroblastes (Octave *et al.* 1979), les cellules de la lignée lymphocytaire (Larrick et Cresswell, 1979) et les cellules leucémiques (Delia *et al.*, 1982). Si ces cellules leucémiques sont induites à se différencier et à diminuer leur prolifération, une forte décroissance du nombre de récepteurs de la sérotransferrine est constatée.

De même dans le cas des lymphocytes de Souris, seules les cellules stimulées par des agents mitogènes montrent des récepteurs de la sérotransferrine à la surface, mais les lymphocytes normaux non activés contiennent une certaine quantité de récepteurs intracellulaires non exposés, correspondant environ à 20 % du nombre total des cellules activées, ce qui implique une altération de la régulation de l'expression du récepteur de la sérotransferrine dans le processus de stimulation (Weiel et Hamilton, 1984).

Les cellules transformées sont des cibles sensibles aux cellules tueuses appelées N.K. (natural killer), (Herberman et Holden, 1978). Newman *et al.* (1982) ont montré qu'il existe une très grande corrélation entre l'expression du récepteur de la sérotransferrine sur un certain nombre de cellules transformées et la sensibilité aux cellules NK, alors que les cellules normales correspondantes qui ne possèdent que très peu ou pas de récepteur de la sérotransferrine sont insensibles à ces cellules tueuses. Il ont montré qu'il était possible d'inhiber la reconnaissance des cellules transformées par les cellules NK en utilisant le récepteur de la sérotransferrine purifié.

Les cellules NK auraient donc évolué de manière à empêcher les cancers cellulaires en reconnaissant une structure, le récepteur de la sérotransferrine, associée à la prolifération cellulaire. De nombreuses études sont actuellement en cours pour approfondir cette question d'un intérêt primordial dans la lutte contre le cancer de même que l'utilisation de drogues couplées à la sérotransferrine ou à un anticorps monoclonal anti-récepteur de la transferrine pour cibler les cellules cancéreuses (voir à cet effet la revue générale de Kogho *et al.*, (1985). Ces mêmes auteurs ont ouvert une voie dans le diagnostic du cancer en montrant qu'il était possible de doser les récepteurs de transferrine circulante par méthode radio immunologique en utilisant une technique sandwich entre deux anticorps monoclonaux différents OKT9 et B3/25. Le nombre de récepteurs est augmenté en cas de cancer et en fonction de la taille de la tumeur.

D. Régulation du nombre de récepteurs de la sérotransferrine

On sait depuis longtemps que les érythrocytes matures ne fixent plus la sérotransferrine et que l'incorporation du fer de la sérotransferrine dans les cellules de la lignée rouge diminue avec la

maturation de ces cellules . Le nombre de récepteurs sur les pré-curseurs des érythrocytes décroît en fonction de la maturation (Nunez et al., 1977; Van Bockxmeer et Morgan, 1979; Frazier et al., 1982; Iacopetta et al., 1982). Nous avons vu que dans les cellules non-érythroïdes , la possession de récepteurs de la sérotransferrine est associée à la transformation et à la division des cellules . La différenciation des cellules transformées a pour conséquence une diminution du nombre de récepteurs.

La disponibilité du fer pour les cellules peut être altérée par des changements dans le nombre de récepteurs de la transferrine sur la surface cellulaire. Ces changements peuvent être lents et sont dus à une modification de la synthèse du récepteur ou à une perte de récepteurs, ou plus rapides par un déplacement de la proportion du nombre de récepteurs entre la surface cellulaire et la réserve endogène. La Fig. 19, (p.52) tirée de la revue générale de Bomford et Munro (1985) fait un rapide tour d'horizon des facteurs affectant le nombre de récepteurs de transferrine disponibles à la surface de la cellule et affectant soit le recyclage du récepteur, soit sa synthèse.

La synthèse du mRNA et sa transcription en récepteur de transferrine semblent essentiellement régulés par la quantité de fer présente dans le milieu. Un excès de fer apporté, soit par des sels de fer du serum de veau foetal enrichi en fer (Rudolph et al., 1985), soit par de l'hème (Ward et al., 1984; Louache et al., 1984) font décroître le nombre total de récepteurs par cellule. A l'inverse une carence en fer, due soit à une culture en présence de serum de veau foetal déficient en fer (Rudolph et al., 1985), soit à l'addition de chélateurs du fer tels que la desferrioxamine (Mattia et al., 1984; Bridges et Cudkowicz, 1984) ou l'acide picolinique (Louache et al., 1984), soit à des inhibiteurs de synthèse comme l'hème (Ward et al., 1984), augmente le nombre total de récepteurs. Nous avons déjà vu que la transformation maligne des cellules était accompagnée de manière caractéristique par une dysrégulation de l'expression du récepteur consistant en l'augmentation accrue de sa synthèse. Neckers et al., (1985), ont montré une relation entre l'accessibilité des canaux à calcium et l'expression du récepteur de la transferrine : le blocage des canaux calcium inhibe la transcription et la synthèse du récepteur ainsi que la prolifération cellulaire.

Par opposition à ces changements lents de l'ordre de 24 h ou plus, il existe des variations rapides dans le nombre des récepteurs de surface, dues à une translocation des récepteurs entre la surface et un réservoir à l'intérieur de la cellule. Une diminution rapide et réversible du nombre de récepteurs de surface peut être provoquée par les esters de phorbols (May et al., 1984; Klausner et al., 1984; Kohno et al., 1986) qui sont des agents utilisés pour stimuler la différenciation des précurseurs cellulaires. Pendant la mitose, les récepteurs de transferrine disparaissent aussi de la surface cellulaire (Sager et al., 1984). Par opposition à l'action des esters de phorbol, l'abondance des récepteurs de surface peut être augmentée à partir du "pool" intra-cellulaire par addition dans le milieu de culture, d'un facteur de croissance l'EGF (epidermal growth factor) (Wiley et Kaplan, 1984), de calcium (Buys et al., 1984) ou d'insuline (Davis et al., 1986).

En conclusion, le nombre de récepteurs de surface disponibles pour la sérotransferrine, donc pour l'entrée du fer dans la cellule, peut varier, soit par une modification de la synthèse du récepteur, soit par échange entre les récepteurs de surface et le

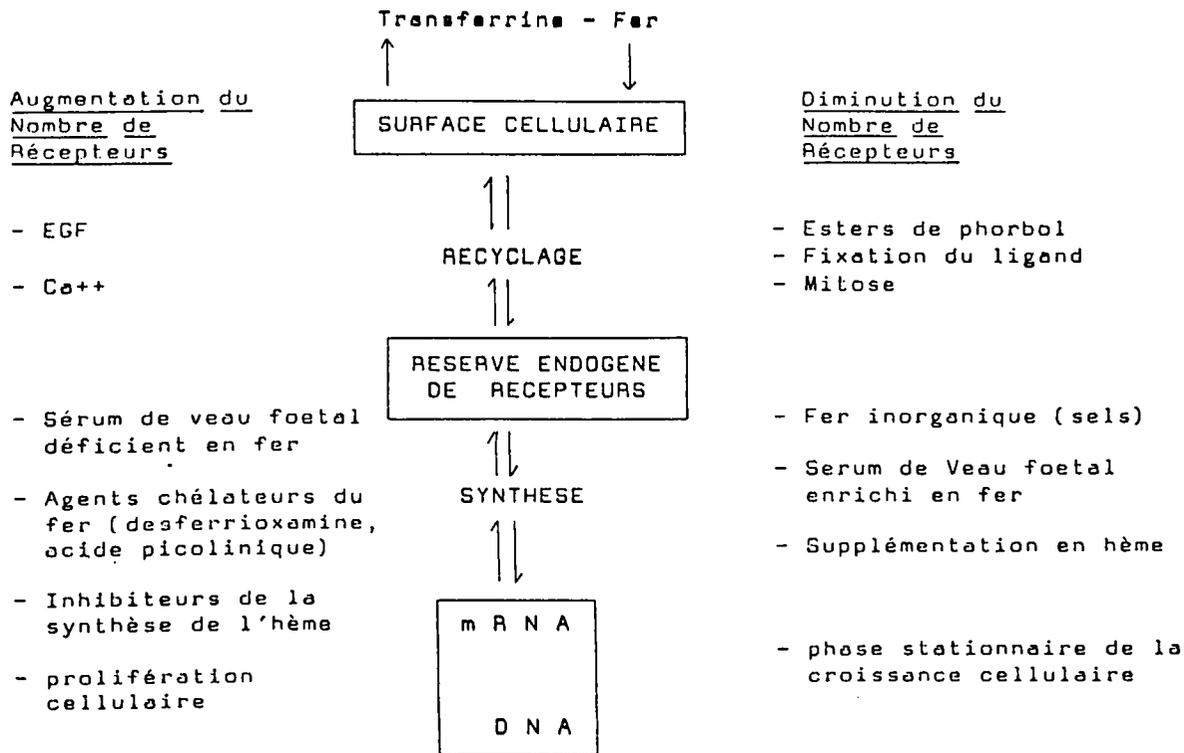


Figure 19 : Régulation du nombre de récepteurs de la sérotransferrine d'après Bomford et Munro (1985).

"pool" intra-cellulaire. Le premier type de modification, plus lent consiste plus spécifiquement en une régulation du nombre total de récepteurs en fonction de la quantité de fer. Les variations plus rapides sont plus souvent dues à des changements dans la différenciation cellulaire ou à un contrôle endogène du cycle cellulaire.

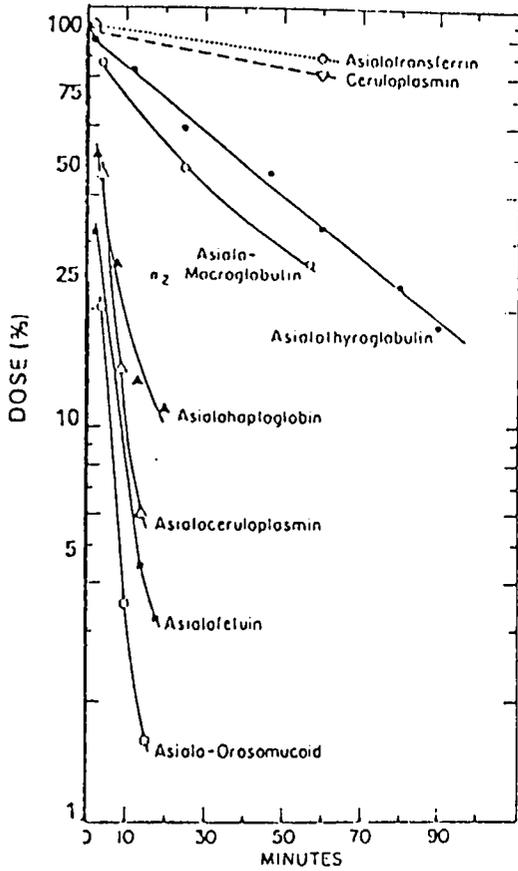
E. Cas particulier de l'interaction sérot transferrine-hépatocyte

C'est dans le foie que se trouve la plus importante réserve de fer de l'organisme, soit 30 % du métal stocké sous forme de ferritine ou d'hémosidérine. Ce fer est amené soit par les cellules non parenchymateuses, les cellules de Kupffer, macrophages qui capturent les érythrocytes sénescents, soit par les cellules parenchymateuses, les hépatocytes. Au niveau de l'hépatocyte, le fer est amené par l'intermédiaire de récepteurs, soit par l'hème-hémo-pexine (Smith et Morgan, 1979), soit par le système hémoglobine haptoglobine (Kino et al., 1980), soit par la sérot transferrine (Gardiner et Morgan, 1974; Van Bockxmeer et al., 1975; Grohlich et al., 1977; 1979), bien que selon Soda et Tavassoli (1984) et Tavassoli et al. (1986), ni les hépatocytes, ni les cellules de Kupffer ne possèdent de récepteurs de la sérot transferrine, mais seulement les cellules endothéliales du foie (et non celles du cordon ombilical) qui capteraient la sérot transferrine, la désialylerait et celle-ci serait captée par le récepteur à galactose des hépatocytes.

Comme toutes les glycoprotéines sériques, la sérot transferrine est synthétisée et catabolisée dans le foie. La perte de l'acide sialique entraîne généralement une rapide élimination des glycoprotéines plasmatiques de la circulation, le catabolisme de chaque glycoprotéine variant en fonction de leur affinité pour le récepteur hépatique (Morell et al., 1971). La sérot transferrine désialylée semble échapper à ce phénomène (Fig.20, p.54). En fait sur une période d'observation beaucoup plus longue, Regoeczi et al. (1974) ont montré que l'asialo-sérot transferrine humaine était éliminée du plasma plus rapidement que la forme sialylée.

Le récepteur des asialoglycoprotéines est une lectine à Gal/Gal NAc dont les propriétés sont décrites dans la revue générale d'Harford et Ashwell (1981) qui possède beaucoup plus d'affinité pour les structures glycaniques asialo-tétraantennées et triantennées que pour les structures asialo-biantennées (Lee et al., 1984). La sérot transferrine est partiellement désialylée dans le serum de cirrhotiques (Stibler et al., 1980; 1981; Regoeczi et al., 1984a) le taux de structures glycaniques triantennées de la sérot transferrine est augmenté dans ces serums et pourrait expliquer ainsi la sidérose hépatique par une incorporation accrue de sérot transferrine par le récepteur hépatique (Debruyne et al., 1983a;b; Regoeczi et al., 1984a). L'interaction des variants glycaniques de la sérot transferrine humaine avec les hépatocytes de Rat est détaillée dans la revue générale de Regoeczi (1984b).

L'interaction de la sérot transferrine avec les hépatocytes est un phénomène complexe, en raison de la présence de deux récepteurs différents à la surface de l'hépatocyte et de la synthèse de sérot transferrine endogène. (Regoeczi, 1986)



A

B

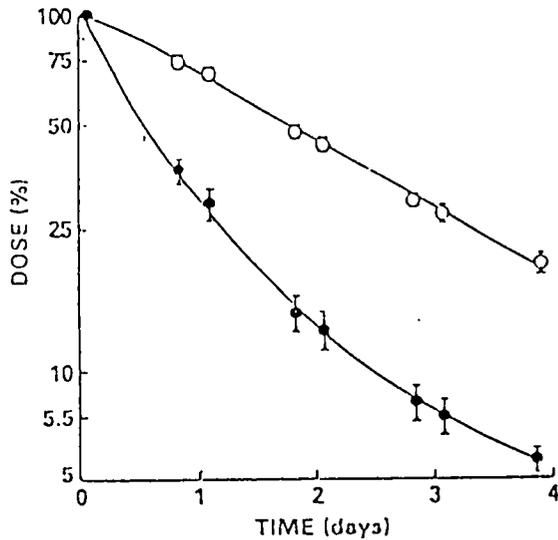


Figure 20: Temps de survie dans le sang, chez le Rat, de différentes glycoprotéines plasmatiques humaines.

(A) selon Morell *et al.*, 1971; (dose injectée = 65µg d'asialo-orosomucoide et 150µg d'asialo-transferrine, pour 100g de poids de corps)

(B) selon Regoeczi *et al.*, 1974; (dose injectée = 2µg de transferrine/100g de poids de corps); (O) sialo-transferrine humaine; (●) asialo-transferrine humaine.

CONCLUSIONS

Ainsi que nous avons pu le constater, la sérotransferrine est une glycoprotéine très étudiée en raison de son rôle prépondérant dans le métabolisme du fer.

La connaissance de la structure primaire, tant protéique que glucidique est maintenant complète pour la sérotransferrine humaine, mais nous possédons beaucoup moins de renseignements sur les sérotransferrines des autres espèces de mammifères. Les analogies de séquences entre les moitiés N et C-terminales, ainsi que les coupures protéolytiques ménagées ont permis de montrer qu'elles sont constituées de deux lobes indépendants de taille similaire, confirmé pour la sérotransferrine de Lapin par les analyses de diffraction des rayons X.

La sérotransferrine véhicule le métal jusqu'à des tissus qu'elle reconnaît par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. Une hétérogénéité physicochimique a été mise en évidence entre les deux sites de fixation du fer, mais l'hétérogénéité fonctionnelle suggérée par Fletcher et Huehns n'a pu être prouvée. Les réticulocytes ont été pendant les années 60 et 70 le seul modèle étudié pour comprendre les interactions entre la sérotransferrine et son récepteur, cependant les très nombreux résultats obtenus sont souvent contradictoires, en raison de l'utilisation de systèmes hétérologues et de conditions de fixation non spécifiques.

L'assimilation du récepteur de la sérotransferrine sur les réticulocytes à celui des cellules humaines nucléées en culture a permis, depuis le début des années 80, de faire d'énormes progrès dans la connaissance de sa structure, de son recyclage et de sa régulation.

Si la structure des glycanes des sérotransferrines est bien connue, on ne sait pratiquement rien sur leur rôle, et, il était tentant de penser que ces glycanes étaient le signal reconnu par le récepteur membranaire de la cellule. En effet la principale différence structurale des sérotransferrines semble porter sur le nombre de glycanes, et dans certains cas sur la structure de ces glycanes. C'est ce que nous avons cherché à démontrer dans le cas de la sérotransferrine en utilisant le modèle le plus communément étudié et le plus facilement isolable, le réticulocyte de Lapin. La plupart des études déjà réalisées sur les interactions sérotransferrine-réticulocytes l'ont été en système hétérologue utilisant la sérotransferrine humaine et les réticulocytes de Lapin.

Afin de travailler en système homologue, nous avons été amenés à isoler la sérotransferrine de Lapin, alors peu connue, à faire la structure de sa partie glucidique et à comparer ses principales propriétés à celles de la sérotransferrine humaine. Nous avons ensuite cherché à montrer que la différence d'affinité, trouvée entre les deux sérotransferrines pour les réticulocytes de Lapin, provenait d'une différence dans les sites de fixation du fer ou dans la structure de leur partie glucidique.

Enfin, toujours dans l'hypothèse des glycanes signaux de reconnaissance cellulaire, nous avons changé de modèle et utilisé la sérotransferrine humaine, connue pour posséder des variants glycaniques, et nous avons étudié l'influence de cette variation glycanique sur l'interaction avec les réticulocytes de Lapin.

L'étude des mécanismes de reconnaissance par les récepteurs membranaires étant aléatoire en système hétérologue, en raison d'une différence structurale possible des sérotransferrines, nous avons choisi ensuite un tissu humain, le placenta, afin d'utiliser toujours un système homologue et de rechercher la présence éventuelle d'un récepteur de nature lectinique pouvant expliquer l'augmentation des variants contenant des structures triantennées dans le serum des femmes enceintes.

TRAVAUX PERSONNELS

PURIFICATION DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN

Le sang de Lapin , recueilli en grande quantité, est partiellement hémolysé malgré la présence d'héparine en raison des conditions du prélèvement à l'abattoir et du temps de latence entre la collecte du sang et la centrifugation au laboratoire. Cette hémolyse partielle nous a amené à modifier les procédés de purification utilisés pour la sérotransferrine humaine (Roop et Putnam, 1967) et pour la sérotransferrine de lapin (Martinez -Medellin et Schulman, 1973)

I. DIFFERENTES ETAPES DE LA PURIFICATION DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN.

Le schéma de purification de la sérotransferrine de Lapin est résumé dans la Fig.21, p.58.

1-Précipitation du plasma

Après dialyse et lyophilisation du plasma, nous obtenons environ 50g de protéides par litre de sang (toutes les quantités données par la suite sont ramenées à 1 litre de sang de départ).

La précipitation au rivanol élimine essentiellement la sérum-albumine et une partie des globulines. Le surnageant I, dialysé et lyophilisé , correspond à 7,6g . La première précipitation au sulfate d'ammonium (55% de saturation) élimine essentiellement les immunoglobulines. Le surnageant II qui contient la sérotransferrine représente 3,6g. La deuxième précipitation au sulfate d'ammonium (70% de saturation) fournit 1,42g de précipité III enrichi en sérotransferrine.

2- Chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Séphadex

La chromatographie sur DEAE-Séphadex fournit quatre fractions (Fig.22-1, p.60) dénommées A, B, C et D. La fraction B (1,07g), correspondant à l'élution par le tampon renfermant du NaCl 0,1M, contient la majeure partie de la sérotransferrine.

L'un des principaux contaminants des préparations de sérotransferrine quand le sérum est hémolysé est l'hémopexine. Ce contaminant conduit à l'obtention de transferrines "brunes" (Gordon et Louis, 1963). Hatton et al. (1977) ont montré l'impossibilité d'éliminer l'hème-hémopexine des préparations de sérotransferrine bovine par simple chromatographie sur DEAE-Cellulose .

Cette contamination pourrait résulter du changement de pHi de l'hémopexine après fixation de l'hème (sérum hémolysé) déjà constaté chez l'homme (Plancke et al., 1978) et chez le Rat (Bernard et al., 1975). Chez le Rat, l'apo-hémopexine possède des variants dont le pHi varie entre 5,5 et 5,95 et l'hème-hémopexine entre 4,8 et 5,25. La sérotransferrine de Lapin saturée en fer possède un pHi de 5,1, et de 5,55 sous forme apo (résultats p.92).

Plasma (50g)

Rivanol

Précipité I
(éliminé)

Surnageant I (7,6g)

$(NH_4)_2SO_4$ 55%
de saturation

Précipité II
(éliminé)

Surnageant II (3,6g)

$(NH_4)_2SO_4$ 70%
de saturation

Précipité III

Surnageant III
(éliminé)

DEAE-Séphadex

(8,7 %)

B (74,7 %)

C (18,8 %)

D (5,6 %)

1,079
SP-Séphadex

BII a (0,05g)

BII b (0,65g)

Con A
Sépharose

SP-Séphadex

STF Lapin (0,58g)

I (20mg)

II

F.P.L.C.
(Mono-S)

I-0

I-1

I-2

I-3

I-4

I-5

I-6

(2mg)

Figure 21: Schéma de purification de la sérotransferrine de Lapin à partir du plasma dialysé et lyophilisé. (Les quantités en g sont ramenées à 1 l de sang).

Quand le sérum est hémolysé la chromatographie sur DEAE-Séphadex du sérum saturé en fer , permet d'éliminer l'apo-hémopexine tandis que l'hème-hémopexine est cofractionnée avec la ferri-séro transferrine . Une deuxième chromatographie à pH acide est alors nécessaire pour fractionner la sérotransferrine sous forme apo et ainsi éliminer l'hème-hémopexine.

3. Chromatographie d'échange d'ions sur SP-Séphadex

Le pic B obtenu après DEAE-Séphadex est chromatographié sur SP Séphadex à pH 5,0 et l'élution est réalisée par un gradient linéaire de pH croissant (Fig. 22-2, p.60). Seul le pic BII contient de la sérotransferrine. Ce pic présente un épaulement appelé BIIa (0,05g), la fraction BIIb (0,65g) correspond à la majeure partie du pic. La fraction BIIb est repurifiée dans les mêmes conditions sur une deuxième colonne de SP-séphadex. Un pic symétrique est obtenu et correspond à la sérotransferrine de lapin utilisée par la suite dans nos études.

La quantité de sérotransferrine de lapin obtenue après deux chromatographies sur SP-séphadex est de 0,58 g. Le taux moyen de sérotransferrine dans le plasma de lapin étant de 3,4g/l, soit environ 2g/l de sang, le rendement final de notre préparation est d'environ 30%.

Afin de purifier la fraction BIIa celle-ci a été soumise à une chromatographie d'affinité sur colonne de Con A-sépharose, puis à une chromatographie d'échange d'ions à haute performance.

4- Chromatographie d'affinité sur Con A-Sépharose.

La chromatographie sur Con A-sépharose de la fraction BIIa fournit une fraction non retenue I (40%) et une fraction éluée par l' α -méthyl-D-glucoside II (60 %). La fraction II correspond à une contamination du pic BIIa par le pic BIIb. La fraction I, non retenue, ne contient que 50% de sérotransferrine, (déterminé par dosage immunochimique)

5- Chromatographie d'échange d'ions haute performance.

Nous avons chromatographié la fraction non retenue sur Con A, sur une colonne Mono-S (groupement échangeur: Sulfo-propyle) à l'aide d'un appareil de F.P.L.C.(Fast Protein Liquid chromatography) dont la résolution est beaucoup plus fine que la chromatographie ordinaire sur SP-Séphadex.

Nous obtenons 7 fractions (Fig.22-3 p.60). La fraction I-0 correspond au pic d'injection, la fraction I1 est retardée, les fractions I-2, I-3, I-4 et I-5 sont éluées respectivement par 10 %, 20%, 30% et 40% de tampon B et la fraction I-6 est éluée par des concentrations supérieures à 50% du tampon B.

La fraction II-5, contenant uniquement de la sérotransferrine ne représente que 2mg pour 20mg de fraction I totale.

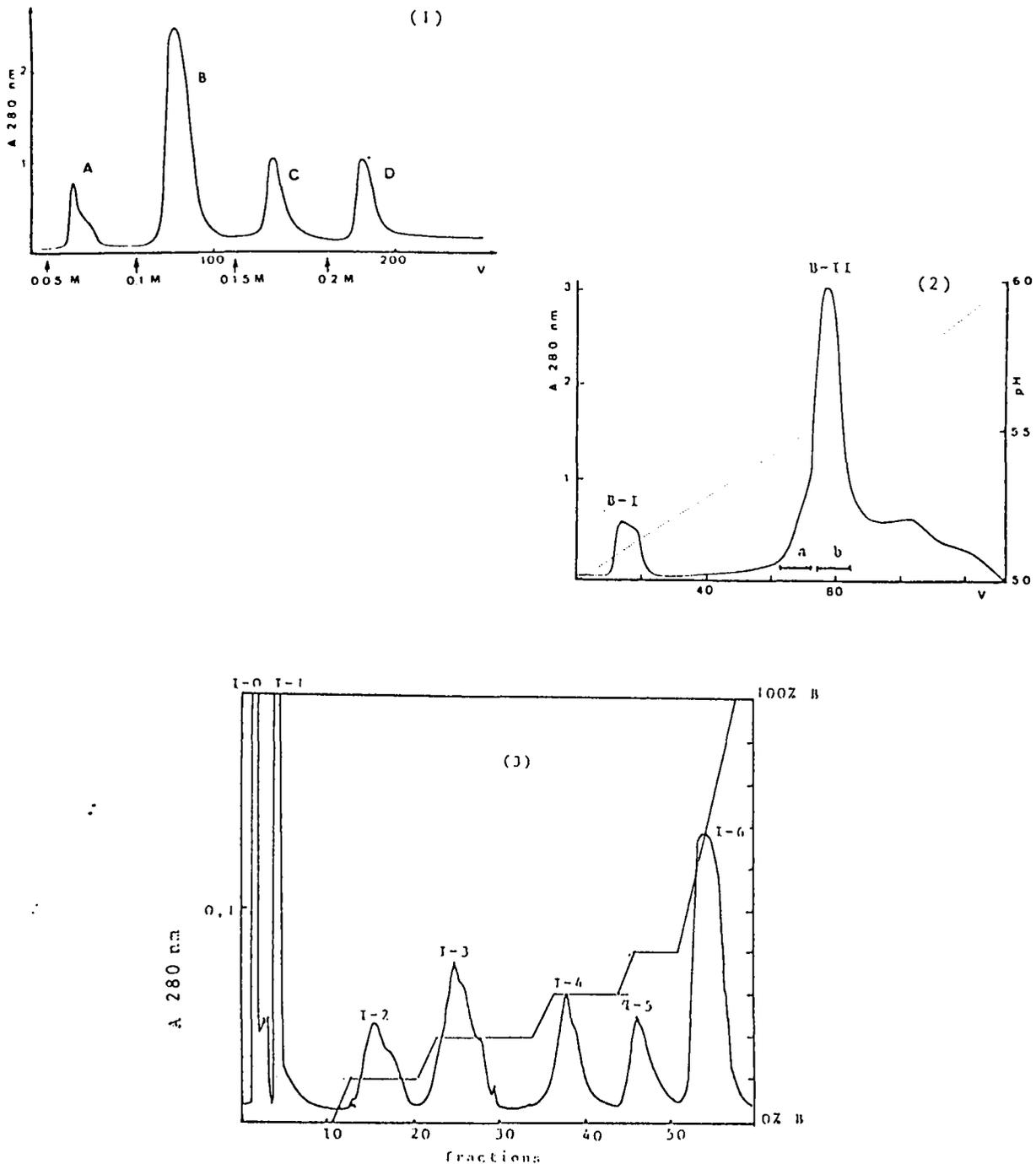


Figure 22 : Fractionnement de la sérotransferrine de Lapin par chromatographie d'échange d'ions

1- chromatographie d'échange d'ions sur colonne de DEAE-Séphadex A-50 (7,5 x 45 cm) du précipité 70 % de saturation en sulfate d'ammonium, par un gradient discontinu en NaCl de 0-0,2M dans le tampon Tris-HCl de pH 8,5.

2- chromatographie d'échange d'ions du pic B sur une colonne de SP-séphadex C-50 (2,5 x 35 cm) équilibrée en tampon citrate de sodium 0,02M et développée un gradient continu en citrate de sodium 0,02 de pH 5,0 à 6,0.

3 - chromatographie d'échange d'ions en FPLC (Mono-S) du pic BII b, en tampon acétate de sodium 50 mM, pH 4,5 (tampon A) ; l'éluion est réalisée par un gradient discontinu en tampon B tampon A contenant NaCl 0,5 M)

II - ANALYSE DES DIFFERENTES FRACTIONS OBTENUES AU COURS DE LA PURIFICATION

A. Electrophorèse en gel de polyacrylamide.

Les différentes fractions obtenues lors de la précipitation du plasma et des chromatographies d'échange d'ions ont été analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS.

L'électrophorèse de la Fig. 23-a p.62 montre l'enrichissement progressif en sérotransferrine (bande à environ 75kDa) lors de la précipitation du plasma (lignes 1-3). Un des contaminants majeurs est une bande de masse moléculaire supérieure à 60 kDa, retrouvée dans toutes les fractions éluées de DEAE-séphadex (lignes 4-7). La sérotransferrine est aussi présente dans toutes ces fractions, la fraction B étant la plus enrichie (85% de sérotransferrine). La révélation spécifique à l'o-dianisidine de l'électrophorégramme, réalisé sur acétate de cellulose, démontre que le contaminant majeur de la fraction B est une β 1-globuline, de nature héminique migrant comme la sérotransferrine : l'hémopexine déjà signalée comme principal contaminant des préparations de sérotransferrine. La fraction BIIb rechromatographiée sur SP-séphadex ne montre qu'une seule bande en gel de polyacrylamide (ligne 8).

La Fig.23-b (p.62) montre l'électrophorèse en gel de polyacrylamide des fractions obtenues en F.P.L.C. Toutes les fractions analysées, sauf la fraction I-5 contiennent de l'hémopexine. Les fractions plus acides, éluées plus rapidement contiennent plus d'hémopexine que les dernières fractions qui contiennent plus de sérotransferrine. La fraction I-5 ne contient que de la sérotransferrine.

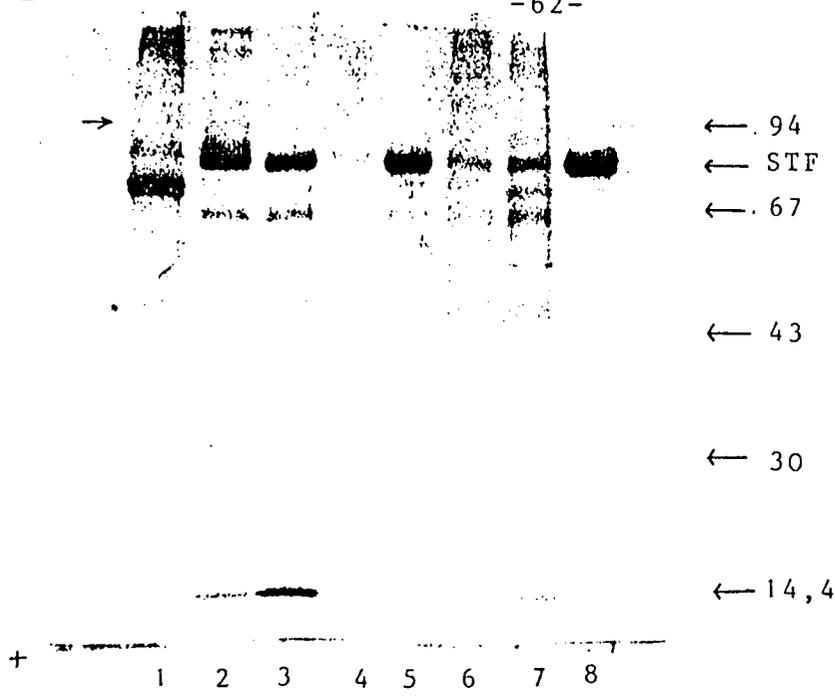
B. Analyse de la composition en glycanne des fractions isolées.

L'étude de la composition glycanne des différentes fractions obtenues lors de la purification a été réalisée par les méthodes colorimétriques et chromatographique classiques décrites dans l'appendice technique et par l'analyse des interactions avec une lectine, la con-A, au cours de l'immuno-affino-électrophorèse.

1- Composition centésimale et molaire en glucides

Les compositions centésimale et molaire en monosaccharides de différentes fractions sont données dans le tableau V, p.63. Nous constatons que la fraction B (obtenue par chromatographie sur DEAE-Séphadex) est environ deux fois plus riche en sucres que la fraction BIIb rechromatographiée sur SP-Séphadex. Les valeurs élevées en glucides de la fraction B sont très proches de celles obtenues par Hudson *et al.* (1973) et seraient en faveur de la présence de deux groupements glycanne, alors que les valeurs de la fraction BIIb sont en accord avec la présence d'un seul glycanne de type N-acétyl-lactosaminique biantenné.

Nous avons montré précédemment que la fraction B était essentiellement contaminée par l'hémopexine saturée en hème. Cette contamination peut expliquer à elle seule, la forte teneur en sucre de la fraction B. En effet, l'hémopexine de lapin est très riche en sucres, 21,5% (Hrkal et Muller-Eberhard, 1971) et particulièrement en N-acétyl-glucosamine et en acide N-acétyl-neuraminique. La fraction B ne contient que 85% de sérotransferrine (dosage immu-



(a)

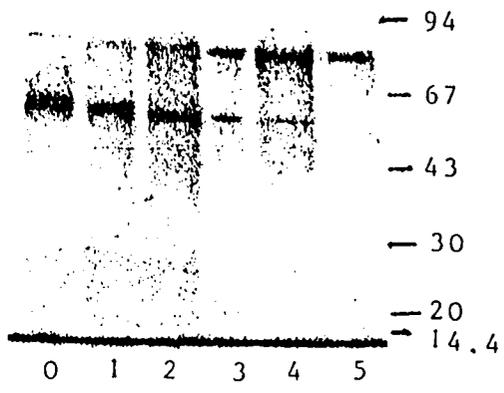


Figure 23 : Contrôles électrophorétiques du fractionnement de la sérotransferrine de Lapin.

(a) Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS 0,1 p100 et de β-mercaptoethanol des différentes fractions obtenues lors du fractionnement de la sérotransferrine de Lapin.

- 1 - sérum de Lapin
- 2 - Précipité I
- 3 - Précipité II
- 4 - Fraction A du fractionnement sur DEAE sephadex
- 5 - Fraction B
- 6 - Fraction C
- 7 - Fraction D
- 8 - Fraction BIIb rechromatographiée sur SP-Séphadex

(b) Electrophorèse en gel de polyacrylamide à 7,5 % en présence de SDS 0,1 % des fractions obtenues par FPLC.

TABLEAU V

COMPOSITION EN GLUCIDES DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN

	Fraction B (DEAE-Séphadex)	Fraction BIIb (2è SP-Séphadex)	Fraction IS (F.P.L.C)
<u>Composition Centésimale</u> (g/100g) (a)			
Oses neutres	2,02	1,22	1,34
Glucosamine	1,07	1,23	1,35
Acide sialique	1,57	0,82	0,65
Total	5,26	3,2	3,34
<u>Composition Molaire</u> (résidu/mole) (b)			
Galactose	3,7	2,11	2,73
Mannose	4,7	2,88	3,00
N-acetyl (C) glucosamine	5,5	4,03	4,70
Acide N-acetyl- neuraminique	3,8	1,92	1,63
Nombre total de Résidus	17,7	10,94	12,06

(a) La composition centésimale a été déterminée d'après les résultats de chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse

(b) En raison des faibles quantités méthanolysés, les rapports molaires ont été calculés en prenant pour base 3 résidus de mannose.

(c) La glucosamine non détachée par la méthanolyse a été systématiquement rajoutée.

nologique). Etant données les teneurs respectives en sucres de la sérotransferrine et de l'hémopexine une contamination de 10% environ de la préparation par l'hémopexine peut expliquer les 5% de sucres dosés dans cette fraction.

La composition en glucides de la fraction I-5, obtenue après chromatographie FPLC de la fraction non retenue sur Con-A du pic BIIa, montre une augmentation de près d'un résidu de galactose et de glucosamine par rapport à la fraction majeure BIIb. Cette composition serait en faveur de l'existence d'un variant glycanique possédant sans doute une antenne supplémentaire greffée sur l'un des deux mannoses, et expliquant ainsi son manque d'affinité pour la Con-A. La fraction I-5 ne contient que 1,6 résidus d'acide sialique. Les quatre fractions précédentes sont éluées à des molarités plus faibles en NaCl, et renferment toutes de la sérotransferrine, mais cette contamination par des taux différents d'hémopexine ne permet pas d'analyser correctement les résultats des dosages de sucres. Cette microhétérogénéité du variant de la sérotransferrine de Lapin pourrait être due, soit à une variation peptidique, soit plutôt à une micro hétérogénéité de la teneur en acide sialique, due aux longues étapes de purification.

2- Immuno-affino électrophorèse bidimensionnelle.

La présence de variant glycanique dans les fractions BIIa et BIIb a été analysée par immuno-affino électrophorèse en présence de Con-A, qui permet de séparer les glycoprotéines renfermant des glycannes biantennés, retardées, de celles contenant des glycannes triantennés, non retardées.

Les électrophorèses montrées dans la Fig.24 (p.65), révèlent que la fraction BIIa obtenue après la première SP-Séphadex est hétérogène en ce qui concerne la sérotransferrine : seulement 10% environ de la sérotransferrine est reconnue par la Con-A (Fig.24, d) alors que la sérotransferrine obtenue après deux chromatographies sur SP-Séphadex est reconnue à 100% (Fig.24,c). Quand le pic BIIa est chromatographié sur Con-A-Sépharose, la fraction non retenue (I) n'est pas reconnue (Fig.24,e) . Cette perte d'affinité pour la Con A peut s'expliquer comme dans le cas de la sérotransferrine humaine par l'existence d'une troisième antenne greffée sur un des mannoses. Cette troisième antenne sialylée expliquerait la diminution du pH_i de cette fraction éluee plus tôt sur SP-Séphadex. Selon cette hypothèse, la sérotransferrine de la fraction BIIb ne renfermerait qu'un glycanne de type biantenné et la sérotransferrine de la fraction BIIa un glycanne polyantenné, les 10% reconnus par la Con-A correspondant à une contamination par la fraction BIIb.

Afin d'évaluer la quantité de ce variant glycanique dans le sang, ce type d'électrophorèse a été réalisé sur du sérum frais de Lapin. Lorsque l'électrophorèse est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment (Fig.24,a,p.65), le pic non reconnu par la Con A est presque invisible, mais si la quantité d'anti-sérum monospécifique ajouté dans la deuxième dimension est divisée par deux (Fig.24,b,p.65), le pic non reconnu par la Con-A est très visible . Les proportions relatives des deux variants de la sérotransferrine de Lapin étant très différentes, il n'est pas possible d'obtenir une bonne relation entre les quantités d'antigènes et d'anticorps pour ces deux variants et, il est donc très difficile de les quantifier. En combinant les résultats des deux plaques d'électrophorèse, le taux du variant glycanique non

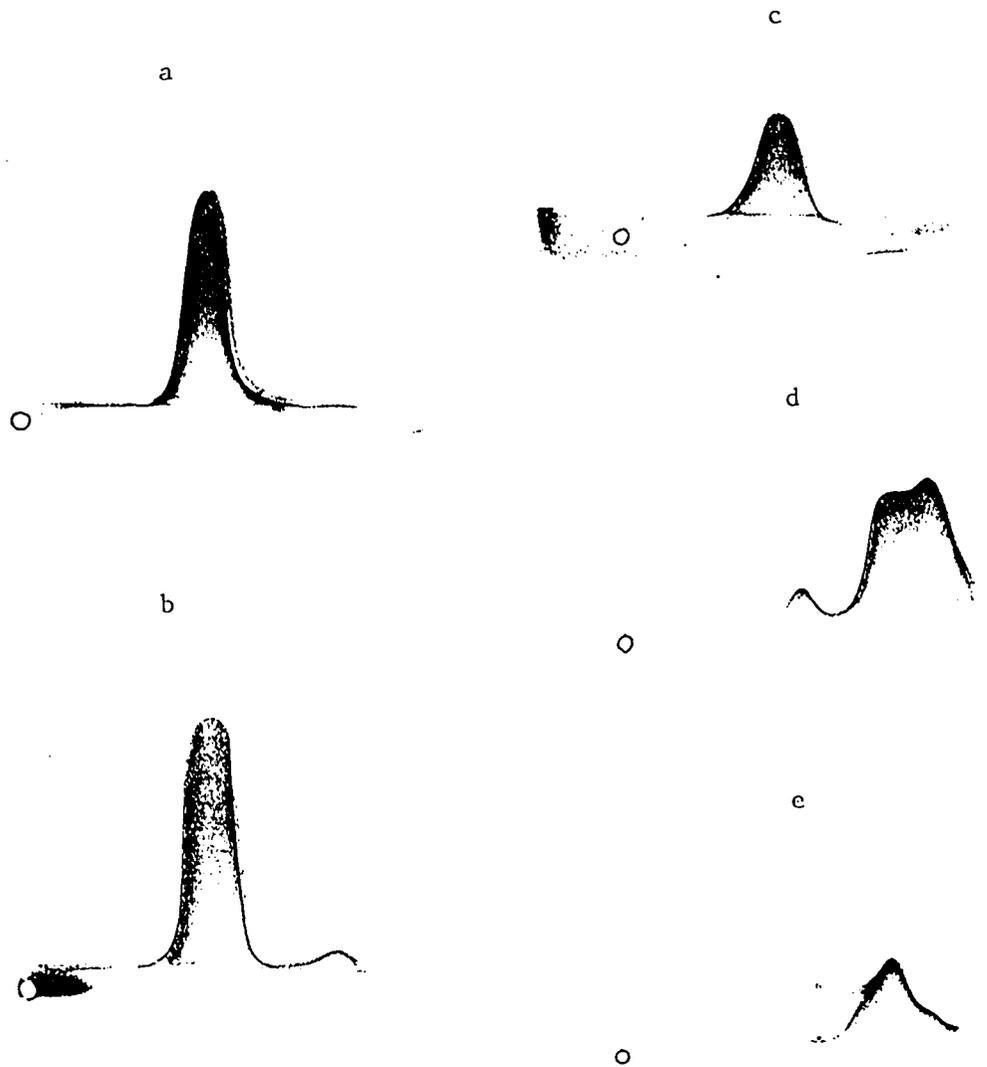


Figure 24 : Affino-immuno-électrophorèses bidimensionnelles en présence de Con A dans la première dimension :
a : Sérum de Lapin (quantité d'antisérum standart)
b : Sérum de Lapin (quantité d'antisérum divisée par 2)
c : fraction BIIb éluee de SP.Sephadex.
d : fraction BIIa éluee de SP séphadex.
e : fraction non retenue sur Con A Sépharose du pic BIIa.

reconnu par la Con A est de l'ordre de 3 à 5% environ.

III- CONCLUSION

La méthode de purification que nous avons utilisée permet d'obtenir une préparation de sérotransferrine de Lapin débarassée de son principal contaminant, l'hémopexine, ce qui est important pour nos études ultérieures sur le rôle de la fraction glycanique de la sérotransferrine, car l'hémopexine est très riche en sucres.

Outre l'élimination de l'hémopexine, la chromatographie sur SP-Séphadex conduit à l'obtention d'apo-sérotransferrine de lapin sans utilisation d'autres chélateurs que le citrate du tampon de chromatographie.

Au vu de la composition molaire en monosaccharides de la sérotransferrine de Lapin purifiée, nous pouvons affirmer que celle-ci contient un seul groupement glycanique, sans doute biantenné.

Nous avons mis en évidence l'existence d'un variant glycanique possédant un résidu de galactose et de glucosamine supplémentaire suggérant l'existence d'une troisième antenne. Ce variant est difficilement purifiable en raison de son pHi très voisin de celui des variants de l'hémopexine. Les quantités obtenues de ce variant pur ne nous ont pas permis d'en faire l'analyse ultérieure. La seule méthode permettant de le préparer quantitativement est la chromatographie d'affinité sur colonne d'anticorps, qui permettrait d'obtenir tous les variants, même les plus sialylés.

L'obtention de sérotransferrine de Lapin à l'état très purifié nous a permis d'entreprendre des recherches ultérieures portant :

1. sur la structure et la conformation de sa chaîne polypeptidique
2. sur ses propriétés de fixation du fer
3. sur la structure du ou des glycannes

Ceci dans le but de préciser l'origine des différences d'affinité entre la sérotransferrine humaine et celle de Lapin vis à vis des réticulocytes de lapin (Jandl et al. 1959 et Lane, 1972).

STRUCTURE ET CONFORMATION DE LA CHAÎNE
PEPTIDIQUE DE LA SÉROTRANSFERRINE DE LAPIN

Les préparations de sérotransferrine de lapin que nous avons obtenues ont été analysées de manière comparative à la sérotransferrine humaine, afin de préciser d'éventuelles différences de masse moléculaire, de composition en acides aminés, de séquences d'acides aminés de la partie N-terminale et au point d'attache des glycanes, de structure secondaire et de conformation de la chaîne peptidique.

I- STRUCTURE PRIMAIRE DE LA CHAÎNE POLYPEPTIDIQUE

A- Masse moléculaire.

La masse moléculaire de la sérotransferrine de Lapin déterminée par équilibre de sédimentation est de 75 ± 2 kDa. La masse moléculaire de la sérotransferrine humaine, déterminée dans les mêmes conditions est de $75,6 \pm 2$ kDa (Léger et al., 1977).

Par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol, les Rf des deux sérotransferrines sont identiques. Les masses moléculaires calculées d'après des témoins sont de 76 kDa pour les deux sérotransferrines.

En tenant compte de la valeur de 79,6 kDa, obtenue d'après la structure primaire de la sérotransferrine humaine, la comparaison des résultats obtenus sur les deux sérotransferrines par les deux techniques que nous avons utilisées, permet d'attribuer une masse moléculaire de l'ordre de 77 kDa pour la sérotransferrine de Lapin en sachant que celle-ci ne possède qu'un glycanne. Cette masse moléculaire est en accord avec celles citées dans la littérature, de 70 à 77 kDa (Baker et al., 1968; Greene et Feeney, 1968; Palmour et Sutton, 1971; Hudson et al., 1973).

B- Composition molaire en acides aminés

La composition molaire en acides aminés de la sérotransferrine de Lapin, donnée dans le tableau VI (p.68) en comparaison avec celle de la sérotransferrine humaine, ne fait pas apparaître de différences significatives.

C- Détermination des séquences peptidiques.

1 - Séquence N-terminale

Nous avons déterminé la séquence N-terminale de la sérotransferrine de Lapin en utilisant la dégradation récurrente d'Edman et, soit l'identification de P.T.H.-aminoacides libérés à chaque cycle par chromatographie sur couche mince, soit par analyse des acides aminés à l'autoanalyseur après régénération des PTH aminoacides. La séquence que nous avons déterminée est la suivante :

Val-(X)-Glu-Lys-Thr-Val.

Il n'a pas été possible d'identifier l'acide aminé en deuxième position par aucune des méthodes utilisées. Cet acide aminé ne semble pas être la proline comme dans la plupart des autres séro-

TABLEAU VI

Composition molaire en acides aminés de la sérotransferrine de Lapin (a). Comparaison avec la composition de la sérotransferrine humaine (b)

Acides aminés	Sérotransferrine de Lapin	Sérotransferrine humaine
Asx	74	85
Thr	27	30
Ser	44	41
Glx	68	59
Pro	36	32
Gly	48	50
Ala	54	57
Cys (c)	36	38
Val	46	46
Met	7	9
Ile	16	15
Leu	60	59
Tyr	27	25
Phe	25	28
Lys	55	58
His	18	19
Arg	27	26
Trp	10	8
Total	678	679

(a) Chaque détermination est déduite de l'analyse des résultats obtenus après 24,48 et 72 heures d'hydrolyse, pour une masse moléculaire de 77kDa

(b) D'après la structure primaire (Mc Gillivray et al., 1983)

(c) Déterminé sous forme de S-carboxyméthyl cystéine

transferrines. Par contre Heaphy et Williams (1978) identifient cet acide aminé à la thréonine, ce qui différencierait la sérotransferrine de Lapin des autres sérotransferrines.

Quoi qu'il en soit, il existe une très grande conservation de structure dans la partie N-terminale des sérotransferrines et la sérotransferrine de lapin ne fait pas d'exception à cette règle.

2- Séquence peptidique au niveau du point d'attache du glycanne

La séquence peptidique de la sérotransferrine de lapin au voisinage du point d'attache du glycanne a été déterminée après isolement des glycopeptides pronasiques et trypsiques, il s'agit de:

Asn (CHO)-Ser-Ser-Leu-(Asp,Ser,Glu,Pro,Gly,Ala,Val,Leu)-Lys.

Cette séquence serait une séquence de type B suivant la classification de Graham et Williams (1975) puisque ne possédant pas de résidu basique en deuxième position (Tableau II, p.7) Cette séquence ressemble beaucoup à celle de la sérotransferrine bovine.

II- CONFORMATION DE LA CHAÎNE POLYPEPTIQUE

A - Détermination de la structure secondaire de la protéine par dichroïsme circulaire

1. Analyse des spectres dichroïques entre 180 et 250 nm.

Le spectre obtenu pour la sérotransferrine de Lapin est similaire à celui de la sérotransferrine humaine (Fig.25-A ; p.70) et présente deux bandes négatives centrées à 208 et 222 nm (caractéristiques de l'hélicité α). Comme dans le cas de la sérotransferrine humaine, la bande centrée à 220 nm possède une ellipticité plus faible que la bande centrée à 208 nm, indiquant un faible taux d'hélicité (de l'ordre de 20%) par rapport aux structures β .

2. Analyse des spectres dichroïques entre 250 et 550 nm.

Les spectres des deux sérotransferrines dépourvues de fer sont très semblables (Fig.25-B, p.70) montrant peu de différences, au niveau des ponts disulfures (large bande négative à 276 nm), de la tyrosine et du tryptophane (bandes positives centrées à 283 et 291 nm). La saturation en fer induit une large bande négative centrée à 455 nm. (Fig. 25-C, p.70).

3. Discussion.

L'analyse des spectres dichroïques ne montre pas de différence détectable entre les structures secondaires des sérotransferrines d'Homme et de Lapin.

B - Isolement du domaine C-terminal par hydrolyse protéolytique ménagée

Nous avons réalisé des hydrolyses ménagées de la sérotransferrine de Lapin, dont la structure bilobée a été démontrée par Gorinski et al.(1979), afin d'isoler les deux domaines comme dans les autres transferrines. Cet isolement a pour but de localiser le glycanne et de préciser les rôles respectifs des domaines vis-à-vis de la reconnaissance par les réticulocytes de lapin.

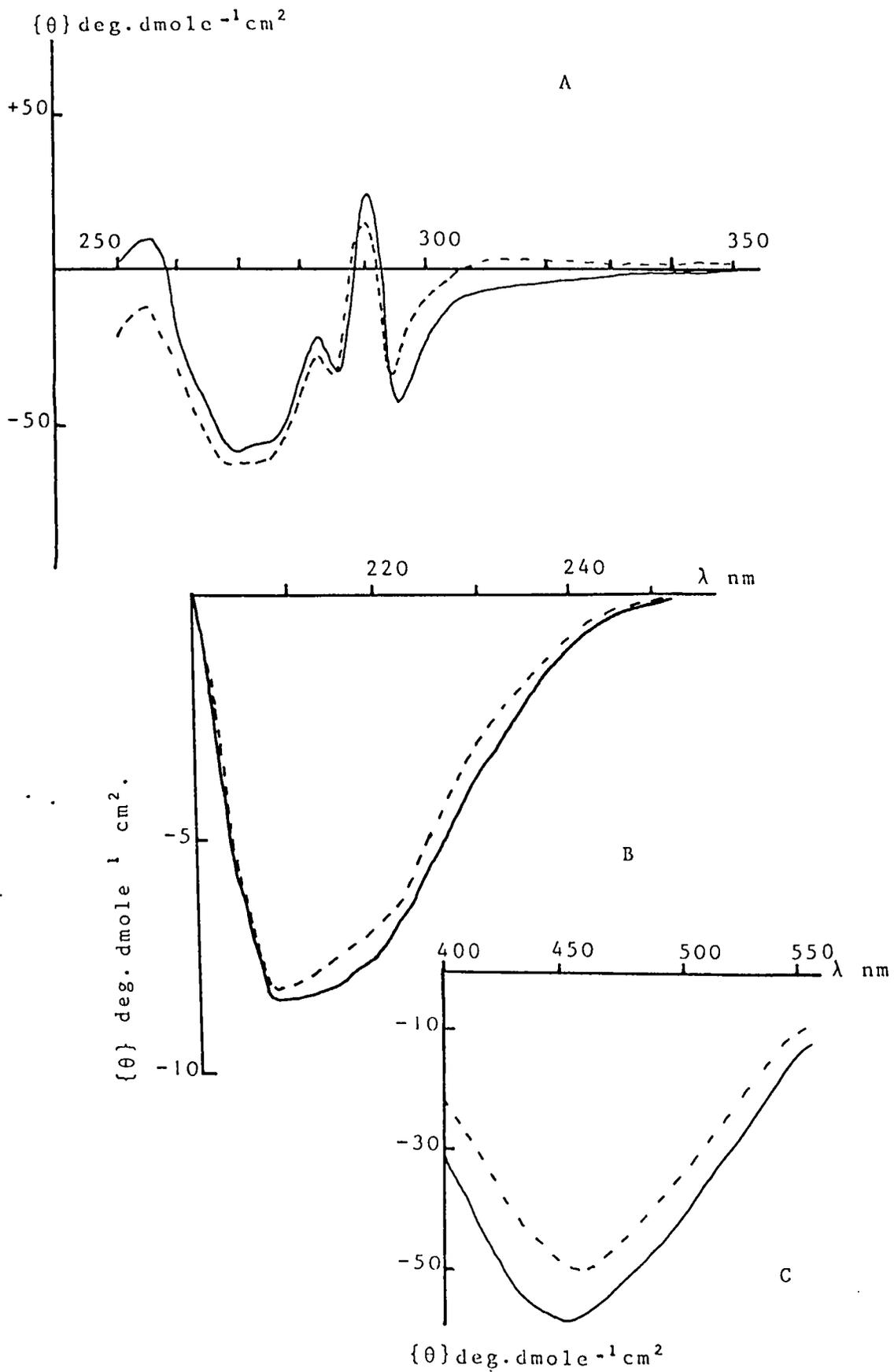


Figure 25 : Spectres dichroïques de la sérotransferrine humaine (ligne continue) et de la sérotransferrine de Lapin (ligne discontinue).

- (A) Spectres des aposérotransferrines dans l'U.V proche
- (B) Spectres des aposérotransferrines dans l'U.V lointain.
- (C) Spectres des ferri-sérotransferrines dans le visible.

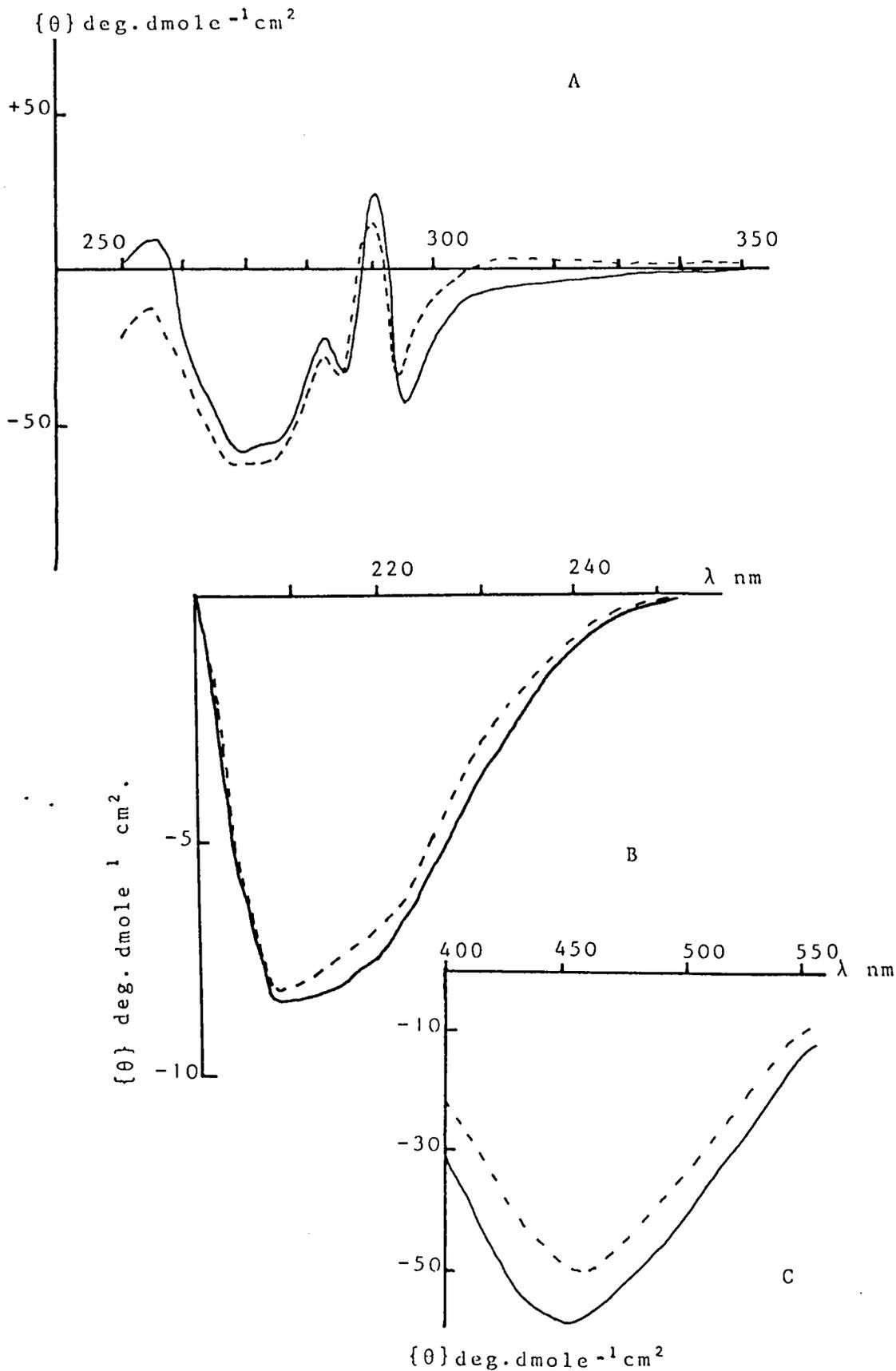


Figure 25 : Spectres dichroïques de la sérotransferrine humaine (ligne continue) et de la sérotransferrine de Lapin (ligne discontinue).

- (A) Spectres des aposérotransferrines dans l'U.V proche
- (B) Spectres des aposérotransferrines dans l'U.V lointain.
- (C) Spectres des ferrisérotransferrines dans le visible.

1. Protéolyse ménagée de la sérotransferrine de lapin

Un échantillon de sérotransferrine de Lapin, portant un seul ion ferrique sur le site C-terminal, est obtenu comme il est décrit p.95. Cet échantillon a été soumis à l'action d'un certain nombre d'enzymes protéolytiques pendant différents temps d'hydrolyse: trypsine, chymotrypsine, papaïne, clostripaïne, pepsine et protéase V-8. Seules la trypsine et la chymotrypsine, après 1 à 4h d'hydrolyse, nous ont fourni des fragments de masse moléculaire supérieure à 30 kDa.

2. Fractionnement des hydrolysats.

La chromatographie de tamisage moléculaire sur Ultrogel AcA-44 fournit 8 pics (Fig.26, p.72). L'analyse en gel de polyacrylamide des fractions nous a montré que seuls les quatre premiers pics possèdent des masses moléculaires supérieures à 10 kDa.

Après 4h d'hydrolyse tryptique, à partir de 150mg de sérotransferrine nous obtenons 21,2mg du pic 1 et 13,2mg du pic 2. Les proportions respectives de ces deux pics sont inversées dans l'hydrolyse chymotrypsique: 14,6mg pour le pic 1 et 20,2mg pour le pic 2. Les rendements de l'hydrolyse chymotrypsique étant supérieurs, en fragments de masse moléculaire importante, à ceux de l'hydrolyse tryptique, seule la première technique a été utilisée par la suite.

3. Propriétés électrophorétiques des fragments chymotrypsiques.

Les différents pics sont analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS. Le pic 1 renferme essentiellement un peu de sérotransferrine de Lapin intacte, un fragment majeur de 70 kDa et un autre mineur de 67 kDa. Le pic 2 est constitué d'un fragment mineur de 29 kDa, d'un fragment majeur de 31 kDa et de trace d'un fragment de 35 kDa.

Une cinétique d'hydrolyse par la chymotrypsine a été suivie par électrophorèse en gel de polyacrylamide. La Fig.27-A (p.73) montre que la sérotransferrine est rapidement dégradée, en moins d'une demie heure, en un fragment de 70 kDa. Les fragments de 30 à 40 kDa n'apparaissent que vers 1 h d'hydrolyse, avec un maximum vers 4h d'hydrolyse.

Les immuno-électrophorèses (Fig.27-B, p.73) montrent que l'hydrolyse protéolytique confère rapidement un caractère acide aux fragments libérés, le pic 2 étant plus acide que le pic 1. Ce comportement acide pourrait être dû à la libération d'un fragment possédant une séquence basique.

4. Purification des fragments chymotrypsiques

A la suite des résultats précédents, le fragment de 70 kDa a été purifié après 1 h d'hydrolyse, et le fragment de 31 kDa après 4h d'hydrolyse. Les étapes de la purification des fragments correspondant aux pics 1 et 2 sont rassemblées dans la Fig.28, (p.74).

Le pic 1 est tout d'abord rechromatographié sur Ultrogel AcA-44 et le pic majeur obtenu est purifié sur colonne de DEAE-trisacryl. Le premier pic de la chromatographie d'échange d'ions (I-a) correspond à la sérotransferrine non coupée et le deuxième pic (I-b) au fragment de 70 kDa.

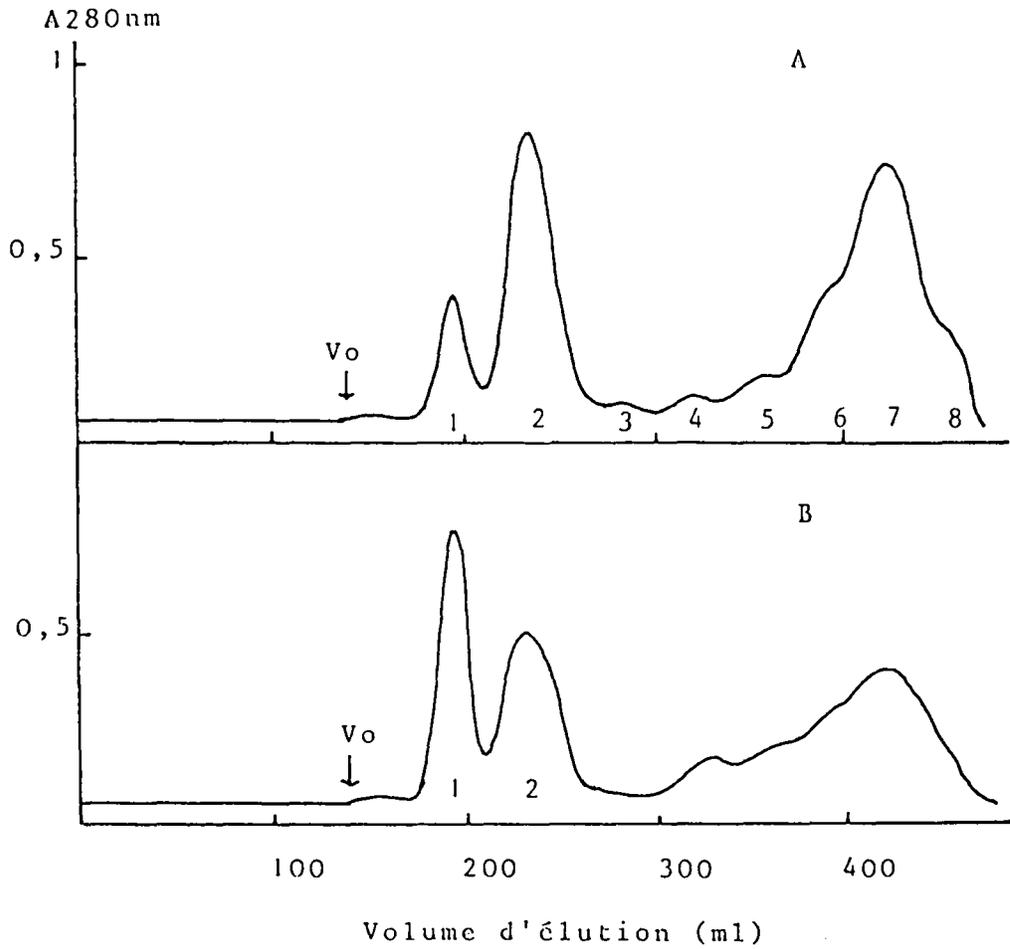
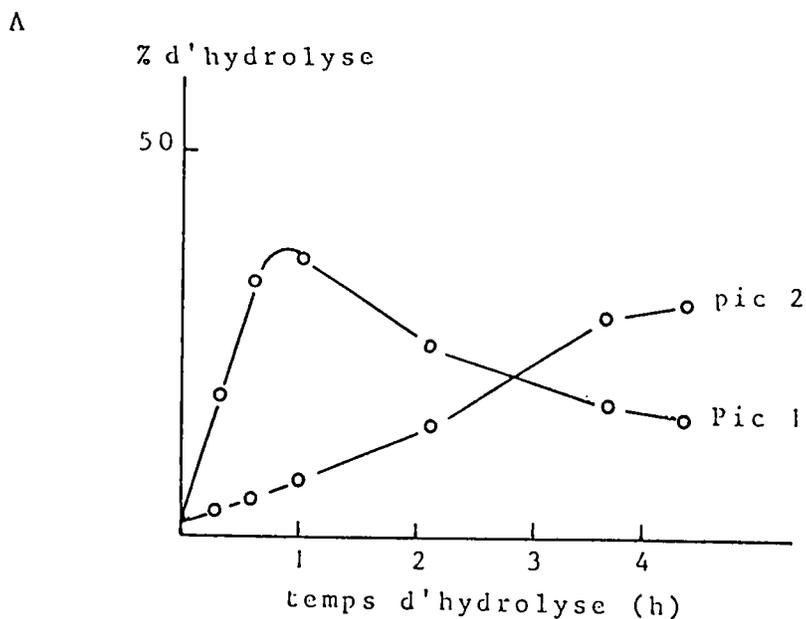


Figure 26 : Profils d'élution des hydrolysats chymotrypsiques (A) et trypsiniques (B) de la sérotransferrine de Lapin partiellement saturée en fer, sur colonne d'ultrogel AcA-44 (2,2 x 130 cm) temps d'hydrolyse = 4h).



B

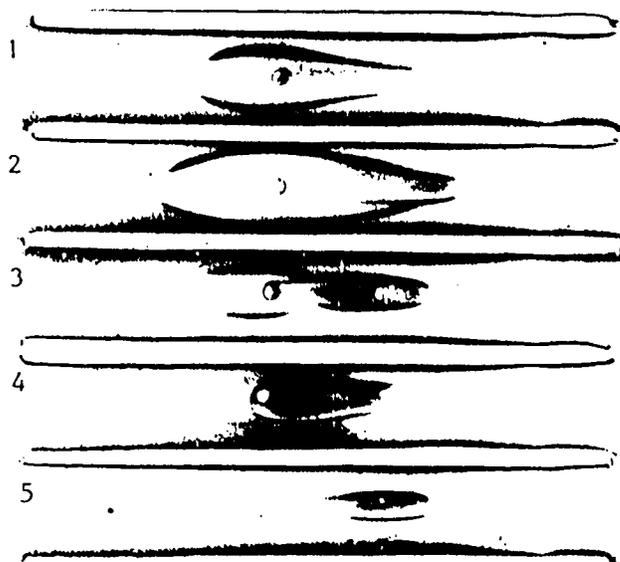


Figure 27 : Cinétique d'hydrolyse par la chymotrypsine.
A : pourcentage de récupération de pics 1 et 2 à différents temps d'hydrolyse.
B : Immunoélectrophorèses en présence de sérum de mouton anti-sérotransferrine de Lapin.(1):15' d'hydrolyse;(2):1hd'hydrolyse ; (3):4 h d'hydrolyse;(4):pic 1 purifié ;(5):pic 2 purifié.

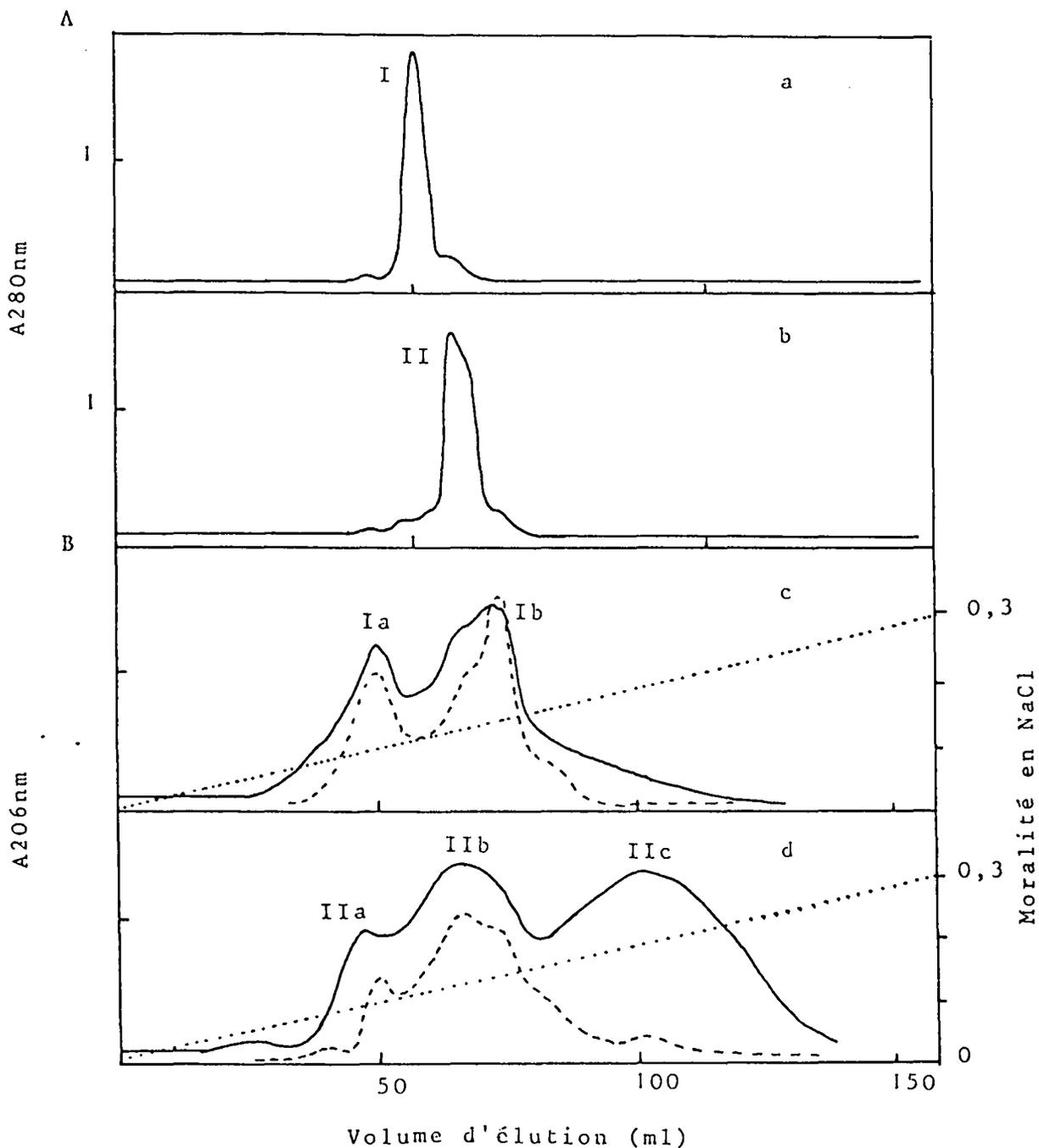


Figure 28 : Isolement des fragments obtenus après hydrolyse chymotrypsique de la sérotransferrine de Lapin monoferrique
 (A) Chromatographie sur Ultrogel AcA44 de : (a) pic 1 de l'hydrolysate 1 h ; (b) pic 2 de l'hydrolysate 4 h.
 (B) Chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-trisacryl de :
 (c) pic majeur I de A-a et (d) pic majeur II de A-b.
 L'élution est réalisée par un gradient continu de 0 à 0,3 M NaCl représenté en tirets. Les courbes en pointillé représentent la radioactivité du Fer 59

Le pic 2, rechromatographié sur Ultrogel AcA-44, fournit un pic majeur qui est fractionné sur colonne de DEAE-trisacryl. Sur les trois pics obtenus, seuls les pics II-a et II-b contiennent encore du fer radioactif (hydrolyse réalisée sur une sérotransferrine marquée au fer-59). Seul le pic II-b renfermant le fragment de 31 kDa a été analysé par la suite.

5. Propriétés physico-chimiques des fragments purifiés

Les principales propriétés physico-chimiques des fragments isolés après hydrolyse ménagée par la chymotrypsine sont rassemblées dans le tableau VII, p.76.

- Le fragment de 70 kDa est glycosylé, sa séquence N-terminale est différente de celle de la protéine native et il est saturé en fer.

- Le fragment de 31 kDa renferme un site de fixation du fer et il est glycosylé. Sa séquence N-terminale est différente de celle de la sérotransferrine native et du fragment de 70 kDa.

Une fois désaturés, les fragments se comportent de manière différente vis-à-vis de la fixation du fer. Seul le fragment de 70 kDa est encore capable de refixer le fer avec efficacité (80%), le fragment de 31 kDa ne refixe au maximum que 32% de sa capacité théorique.

6. Discussion.

L'hydrolyse ménagée par la chymotrypsine, de la sérotransferrine de Lapin partiellement saturée sur le site C-terminal, conduit à l'obtention d'un fragment de 70 kDa, sans doute par perte d'un peptide N-terminal de 76 kDa, présentant un point de coupure accessible à la chymotrypsine. Un autre fragment plus petit est obtenu avec de bons rendements, sa masse moléculaire est de 31 kDa, il possède encore un atome de fer et est glycosylé. Ce fragment peut être assimilé au deuxième lobe de la sérotransferrine de Lapin correspondant au domaine C-terminal.

Si nous comparons nos résultats à ceux obtenus par Heaphy et Williams (1982) sur la sérotransferrine de Lapin, nous constatons que les masses moléculaires des fragments qu'ils obtiennent sont différentes. Ces auteurs hydrolysent par la chymotrypsine une sérotransferrine traitée par la desferrioxamine (possédant le fer sur le site N-terminal) et isolent ainsi un fragment N-terminal de 36 kDa. L'hydrolyse d'une sérotransferrine saturée à 20% (essentiellement sur le site C-terminal) leur fournit un fragment de 39 kDa glycosylé.

Les résultats obtenus par Evans et Williams (1978) sur la sérotransferrine humaine avaient aussi montré que les glycanes étaient situés sur le lobe C-terminal. Les domaines isolés par ces auteurs à partir de sérotransferrine humaine saturée, soit sur le site N-terminal, soit sur le site C-terminal possèdent des masses moléculaires respectivement de 36 kDa et de 43 kDa.

Nos résultats se rapprochent de ceux de Brock et Arzabe (1976)

TABLEAU VII

Principales propriétés physico-chimiques
des fragments chymotrypsiques

Masses Moléculaires (kDa)	Sucres (g/100g)	Séquence N- terminale	Taux de fer (ion/mole)	Capacité de fixation du fer (%)
77	2,85	V-T-E-K-T-V	2	100
70	2,9	S-L (V)	1,87	80
30	6,à	S-G-K-V-G	0,83	32

(V) Val ; (T) Thr ; (E) Glu ; (K) Lys ; (S) Ser ; (G) Gly .

et de Brock et al. (1976) obtenus sur la sérotransferrine bovine diferrique. Ces auteurs clivent la molécule en deux fragments de 32 et 38,5 kDa (les masses moléculaires estimées par gel filtration sont respectivement de 29,4 et 38 kDa). Le fragment de 32 kDa de comportement plus acide en électrophorèse correspond au domaine C-terminal et le fragment de 38,5 kDa migrant moins rapidement correspond au domaine N-terminal. Le glycanne de la sérotransferrine bovine se trouve sur le lobe C-terminal (Brock et al., 1978).

III - CONCLUSIONS

Les résultats partiels que nous avons réunis montrent que la sérotransferrine de lapin ne diffère pas des autres sérotransférines, ni au niveau de la masse moléculaire, ni au niveau de la séquence N-terminale, ni au niveau de la composition en acides aminés.

Les études de dichroïsme circulaire ne font pas apparaître de différence détectable avec la sérotransferrine humaine.

L'hydrolyse ménagée de la sérotransferrine de lapin saturée sur le site C-terminal nous a permis d'isoler le lobe C-terminal possédant encore son fer et de localiser le glycanne sur ce lobe comme dans la sérotransferrine humaine et la sérotransferrine bovine.

La séquence peptidique au point d'attache du glycanne et les masses moléculaires des domaines isolés ainsi que leur comportement électrophorétique font apparaître plus d'homologies entre la sérotransferrine de lapin et la sérotransferrine bovine qu'avec la sérotransferrine humaine.

ETUDE DES SITES DE FIXATION DU FER
DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN

I - INTRODUCTION

Jandl et al. (1959) et Lane (1972) avaient montré que la sérotransferrine de lapin incorporait son fer aux réticulocytes de lapin deux fois plus vite que la sérotransferrine humaine. Les premières études de Jandl et Katz (1963) et de Aisen et al. (1966) avaient montré l'importance de l'état de saturation en fer de la sérotransferrine humaine vis-à-vis des réticulocytes. L'hypothèse de Fletcher et Huehns (1967, 1968) sur la non-équivalence biologique des deux sites de fixation du fer de la sérotransferrine a lancé toute une série de recherches pour relier cette hypothèse à une différence chimique entre les deux sites.

Les observations réalisées en système hétérologue sérotransferrine humaine-réticulocyte de Lapin ou homologue sérotransferrine de Lapin-réticulocyte de Lapin ont amené des résultats contradictoires. De nombreuses études semblaient confirmer l'hypothèse de Fletcher et Huehns en système hétérologue (Fletcher, et Suter 1969 ; Chernelch et Brown, 1970 ; Hahn, 1973 ; Zapolski et al., 1974 ; Harris et Aisen, 1975, a). Par contre cette hypothèse ne semblait pas vérifiée en système homologue (Morgan, 1974 ; Morgan et Kailis, 1974 ; Harris et Aisen, 1975, b ; Princiotto et Zapolski, 1978).

A l'époque où nous avons entrepris ces travaux, nous savions déjà qu'il était possible de différencier, par protonation, les deux sites de fixation du fer de la sérotransferrine humaine (Princiotto et Zapolski, 1975 ; 1976 b ; Lestas, 1976). L'un des sites est acido-stable et l'autre acido-labile. Une telle différence n'a pu être mise en évidence dans le cas de la sérotransferrine de Lapin (Princiotto et Zapolski, 1978). En outre Krysteva et al. (1975, 1976) avaient suggéré, par modification chimique, l'existence d'un site accessible aux réactifs et d'un site enfoui dans la sérotransferrine humaine.

Il nous est alors apparu intéressant d'étudier de manière comparative les sites de fixation du fer des deux sérotransférines d'Homme et de Lapin, afin de vérifier si l'origine de leur différence d'affinité pour les réticulocytes de lapin ne provenait pas d'une différence au niveau des sites de fixation du fer. C'est pourquoi nous avons entrepris :

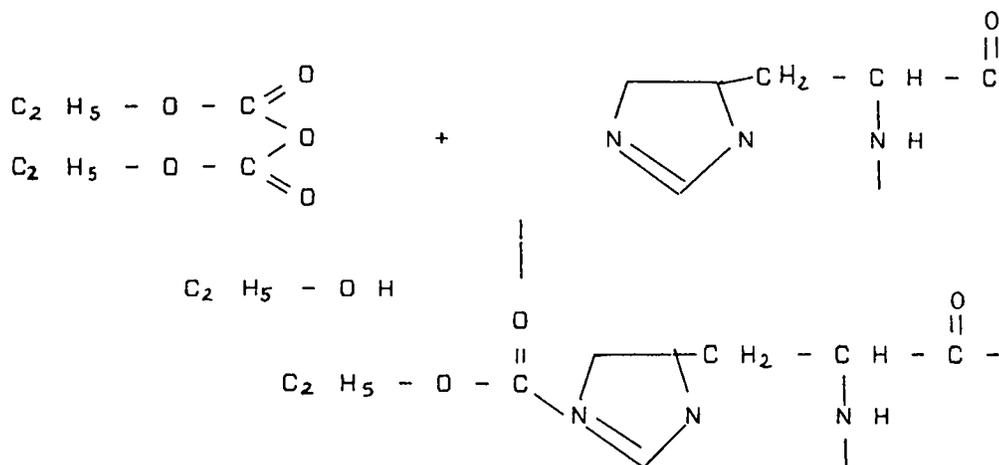
1-l'étude des sites de fixation du fer des deux sérotransférines par modification chimique en nous intéressant uniquement aux résidus d'Histidine.

2-l'étude de la stabilité des sites de fixation du fer vis-à-vis du pH, de la force ionique, de certains ions et de différents chélateurs du fer.

II - CARBETHOXYLATION DES RESIDUS D'HISTIDINE

A - Principe.

L'anhydride éthoxy-formique ou diéthyl-pyrocarbonate (D.E.P.) réagit spécifiquement sur les résidus d'histidine (Ovadi et al., 1962) à pH 6,1 en formant des résidus carbéthoxy-histidyls selon le schéma suivant :



Le coefficient d'extinction molaire à 240 nm ($\epsilon_{240\text{nm}}$) de la carbéthoxy-histidine est de $3.200 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à faible concentration en réactif.

B - Détermination des coefficients d'extinction molaire de la carbéthoxy-histidine.

La Fig.29 (p.80) montre la variation du coefficient d'extinction molaire de la N-acétyl-histidine en fonction de la concentration en diéthyl-pyrocarbonate. Nous constatons que la valeur de $3.200 \text{ l.mole}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ n'est valable que pour des concentrations en réactif de 1 à 2 mM. Cette valeur croît ensuite pour les concentrations plus élevées et atteint des valeurs 2,5 fois supérieures à 25 mM. Nous constatons parallèlement un déplacement de la longueur d'onde d'absorption maximale de 240 vers 230 nm pour les fortes concentrations en réactif. Cette augmentation avait déjà été constatée par Awaeva et Krasnova (1975) et par Loosemore et Pratt (1976), elle correspond à une N-N'-dicarbéthoxylation des résidus d'histidine.

Par la suite nous utiliserons cette valeur de 3.200 uniquement pour les concentrations en réactif de 1 à 2 mM et les différents coefficients de cette courbe pour les concentrations supérieures.

C- Cinétiques de carbéthoxylation des apo-transferrines

Puisque la quantification des résidus de mono carbéthoxy-histidine n'est possible qu'à faible molarité en D.E.P, nous avons réalisé les cinétiques à des concentrations en réactif de 2 mM. Le nombre total de résidus modifiés à cette concentration est déterminé au bout d'une heure, alors que la réaction est terminée, un plateau étant atteint après 45 minutes.

Les réactions pour les deux sérotransferrines sont biphasiques et peuvent être considérées comme la somme de deux réactions de pseudo ordre 1 (Fig.30, p.81). D'après les pentes de ces courbes on peut déduire les constantes de vitesse et le nombre de résidus modifiés dans les deux phases (Tableau VIII, p.81). Les constantes de vitesse de la phase rapide sont identiques pour les deux sérotransferrines ($k_1 = 0,24 \text{ min}^{-1}$) la deuxième phase étant 6 fois et 10 fois plus lente respectivement pour la sérotransferrine humaine et la sérotransferrine de Lapin.

Le nombre de résidus d'histidine réagissant rapidement est supérieur de 1 dans la sérotransferrine humaine (6,1) par rapport à la sérotransferrine de lapin (4,9).

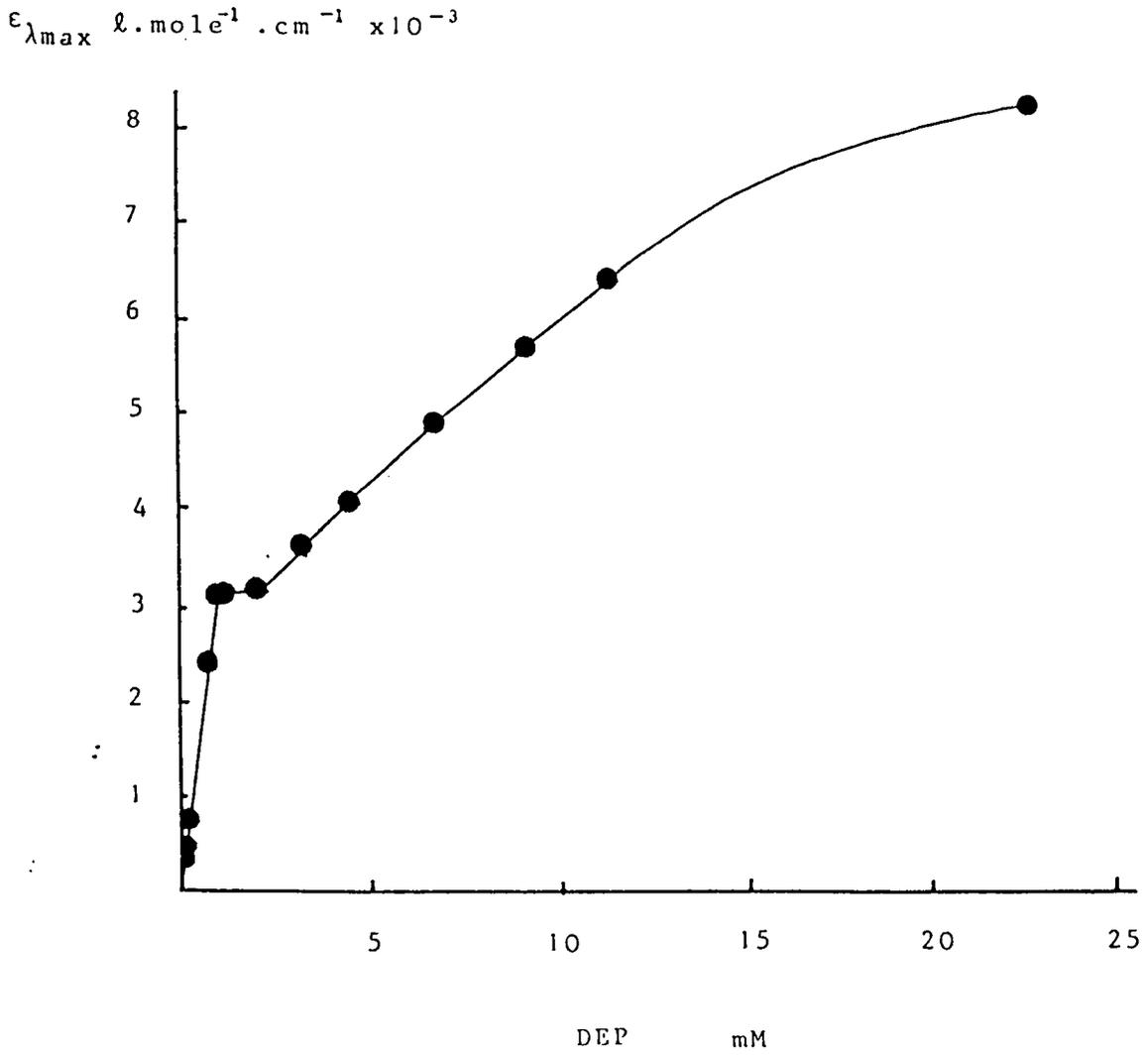


Figure 29 : Variation du coefficient d'extinction molaire de la N-acetyl-histidine carbéthoxylée (70,4 μ M) en fonction de la concentration en diéthyl-pyrocarbonate (DEP) , mesuré a la longueur d'onde d'absorption maximale (240nm)

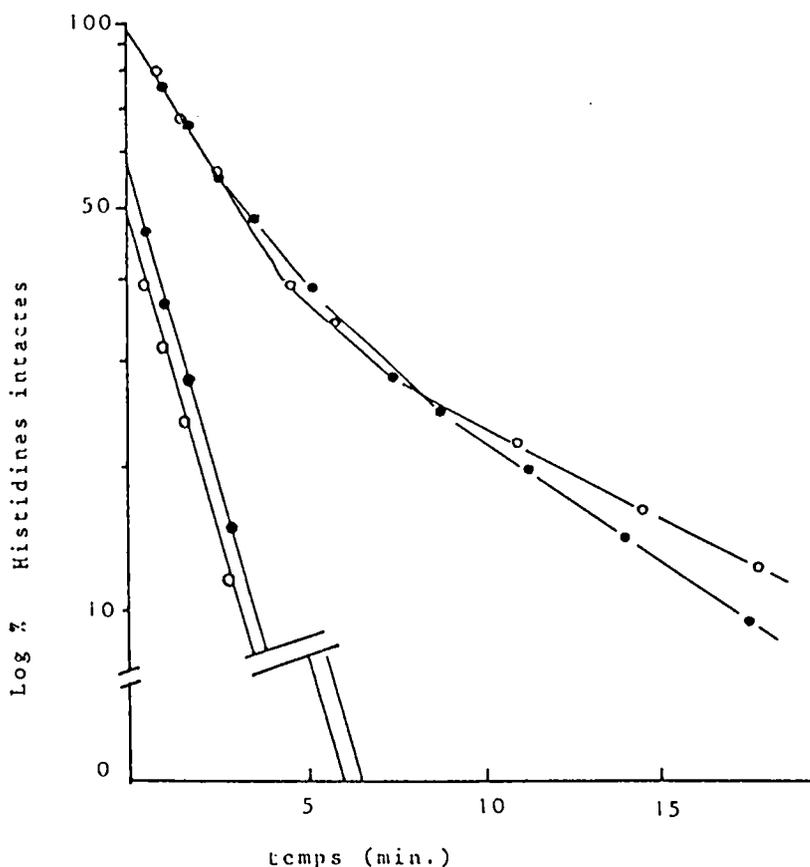


Figure 30 : Cinétique de carbéthoxylation des opo-sérotans à une concentration en diéthyl pyrocarbonate de 2mM. La courbe est exprimée en 10g du pourcentage de résidus d'histidine intactes. Le nombre total de résidus modifiés est déterminé au bout d'1 h. (O) sérotans humaine; (●) sérotans de Lapin. Les courbes en pointillé représentent la détermination de la vitesse de réaction de la phase rapide, après soustraction de la phase lente.

TABEAU VIII

CONSTANTES DE VITESSE ET NOMBRE DE RESIDUS D'HISTIDINE MODIFIES DANS LES 2 PHASES

Provenance des sérotans	k ₁ min	Histidines modifiées (phase 1)		k ₂ min	Histidines modifiées ou total		Histidines Totales res
		%(a)	res		%(b)	res	
Homme	0,24	50	6,1	0,040	64	12,2	19
Lapin	0,24	42	4,9	0,020	65	11,7	10

a) Le pourcentage de résidus carbéthoxylés dans la première phase est calculé en fonction du nombre total de résidus modifiés en 1h
 (b) Le poucentage total de résidus modifiés est calculé en fonction du nombre de résidus d'histidine de la molécule

Il n'est pas possible de modifier tous les résidus d'histidine à 2 mM en DEP : 12,2 sur 19 pour la sérotransferrine humaine et 11,7 sur 18 pour la sérotransferrine de lapin.

D - Capacité de fixation du fer des sérotransferrines carbéthoxylées en milieu non dénaturant.

Pour obtenir une modification complète des résidus d'histidine il est nécessaire d'augmenter la concentration en réactif. Nous avons donc étudié l'action du DEP à des concentrations variant de 0 à 25 mM et ensuite mesuré la capacité résiduelle de fixation du fer des sérotransferrines modifiées, en essayant de quantifier le nombre de résidus impliqués dans les sites de fixation du fer.

1. Quantification du nombre de résidus d'histidine modifiés.

Nous avons vu qu'aux fortes molarités en DEP, les résidus d'histidine étaient N-N'-dicarbéthoxylés, augmentant la valeur du coefficient d'extinction molaire.

La Fig.31-a (p.83) montre le nombre apparent de résidus (calculé avec $3.200 \text{ l.mole}^{-1} .\text{cm}^{-1}$). Il apparaît que dans la zone comprise entre 8 et 25 mM, l'augmentation est proportionnelle à la concentration du réactif et n'atteint jamais un plateau. L'application directe des différents coefficients, déterminés d'après la Fig.29 (p.80) nous amène à des résultats ininterprétables. Ceci peut s'expliquer par la différence de réactivité des deux populations d'histidine : celle réagissant rapidement et pouvant ainsi être facilement dicarbéthoxylée par un excès de réactif, et celle réagissant beaucoup plus lentement et ayant ainsi peu de chance d'être disubstituée.

Nous avons donc utilisé les différents coefficients uniquement pour les résidus réagissant rapidement: 4,9 pour la sérotransferrine de lapin et 6,1 pour la sérotransferrine humaine. Cette méthode de calcul nous conduit à un nombre corrigé de résidus d'histidine modifiés qui est représenté dans la Fig.31-b (p.83). Dans ces conditions, nous constatons que tous les résidus ne sont pas modifiés, même à une concentration en réactif supérieure à 20 mM. Le nombre total de résidus modifiés, après correction est identique dans les deux sérotransferrines : 14 résidus.

2. Capacité résiduelle de fixation du fer des sérotransferrines modifiées.

La capacité résiduelle de fixation du fer est déterminée par mesure du pourcentage de fer-59 fixé aux protéines après élimination de l'excès de réactif. Dans la Fig.32-a (p.85) cette capacité de fixation du fer est exprimée en fonction de la concentration en réactif et se résume en trois étapes similaires pour les deux sérotransferrines :

- une perte séquentielle de 50% de la capacité de fixation du fer pour des concentrations en réactif de 0 à 11 mM.
- un plateau à 50% de fixation du fer entre 11 et 18 mM.
- une légère perte pour les concentrations supérieures à 18 mM: 40% de resaturation de la sérotransferrine humaine et 30% pour la sérotransferrine de Lapin à 25 mM en DEP.

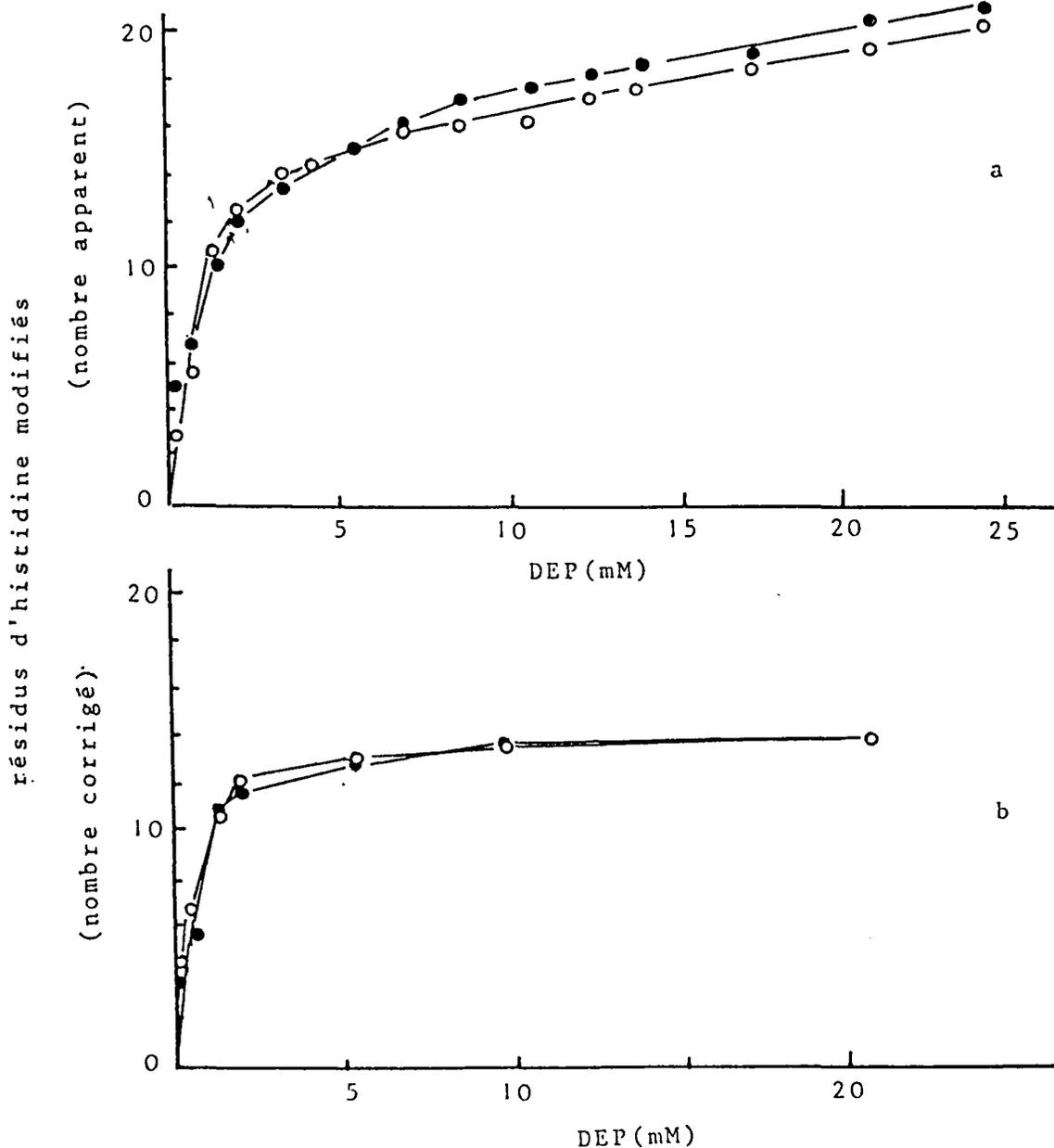


Figure 31 : Quantification du nombre de résidus d'histidine modifiés par le diéthyl-pyrocarbonate (5) sérotransferrine humaine ; sérotransferrine de Lapin
(a) nombre apparent de résidus modifiés, calculé en utilisant $240 = 3200 \text{ l.mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
(b) nombre corrigé de résidus modifiés,

Un des sites de fixation du fer semble donc être facilement détruit par modification des histidines pour des concentrations inférieures à 10 mM en réactif. Il est impossible de détruire le deuxième site, même à des concentrations de 25 mM. Il est possible d'expliquer cette réactivité par la localisation, à proximité de la surface de molécule, du site accessible au réactif, le deuxième site, beaucoup plus enfoui à l'intérieur de la molécule, n'est pas accessible au réactif dans les conditions utilisées.

En examinant la Fig.32-b (p.85) il apparaît que la modification des 12 premiers résidus d'histidine n'induit que très peu de perte de fixation du fer dans les deux sérotransferrines (100 à 92%). La perte de 50% de capacité de fixation du fer est brutale entre 12 et 14 résidus d'histidine modifiés, suggérant la participation essentielle de deux résidus d'histidine réagissant lentement, et qui ne sont donc pas localisés directement à la surface de la molécule, mais qui sont encore accessibles au réactif.

3. Spécificité de la modification.

Les différences de spectres réalisées à forte concentration en DEP font apparaître une bande négative centrée à 279 nm, attribuée à une O-alkylation des résidus de tyrosine (Simpson *et al.*, 1963). En utilisant un ϵ -278 nm de $1.310 \text{ l.mole}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour la O-carbétoxy-tyrosine (Burstein *et al.*, 1974) il est possible de calculer le nombre de résidus de tyrosine modifiés :

- à 11mM en DEP, 0,5 résidus de tyrosine sont modifiés dans la sérotransferrine de Lapin, et 1,5 résidus chez l'homme
- à 20 mM, 6,5 résidus sont modifiés dans la sérotransferrine de Lapin et 9,1 chez l'homme.

A forte concentration en réactif, la carbétoxylation n'est plus spécifique des seuls résidus d'histidine, les résidus de tyrosine sont modifiés, mais aussi les résidus de tryptophane comme le suggère une légère bande négative à 292 nm.

Quoi qu'il en soit, à la concentration de 11 mM, nécessaire à la destruction du site accessible, la modification des résidus de tyrosine est mineure, et n'affecte pas la quantification des résidus d'histidine impliqués dans le site, bien qu'on ne puisse infirmer la participation de ces résidus de tyrosine modifiés dans le site.

4. Régénération des résidus d'histidine modifiés

La régénération des sérotransferrines modifiées a été réalisée par traitement à l'hydroxylamine 0,8M, des échantillons modifiés à une concentration en DEP induisant une perte de 50% de la capacité de fixation du fer: 20% des résidus d'histidine modifiés sont régénérés, et la restauration de la capacité de fixation du fer n'est pas totale (80% pour la sérotransferrine de Lapin et 85% pour la sérotransferrine humaine)

Cette faible régénération des résidus d'histidine, à cette concentration en DEP (10 mM) peut s'expliquer par le grand nombre de résidus dicarbéthoxylés.

E - Capacité de fixation du fer des sérotransferrines carbéthoxylées en présence d'urée.

Il est impossible de modifier plus de 14 résidus d'histidine et de détruire plus d'un site de fixation du fer en absence d'agent

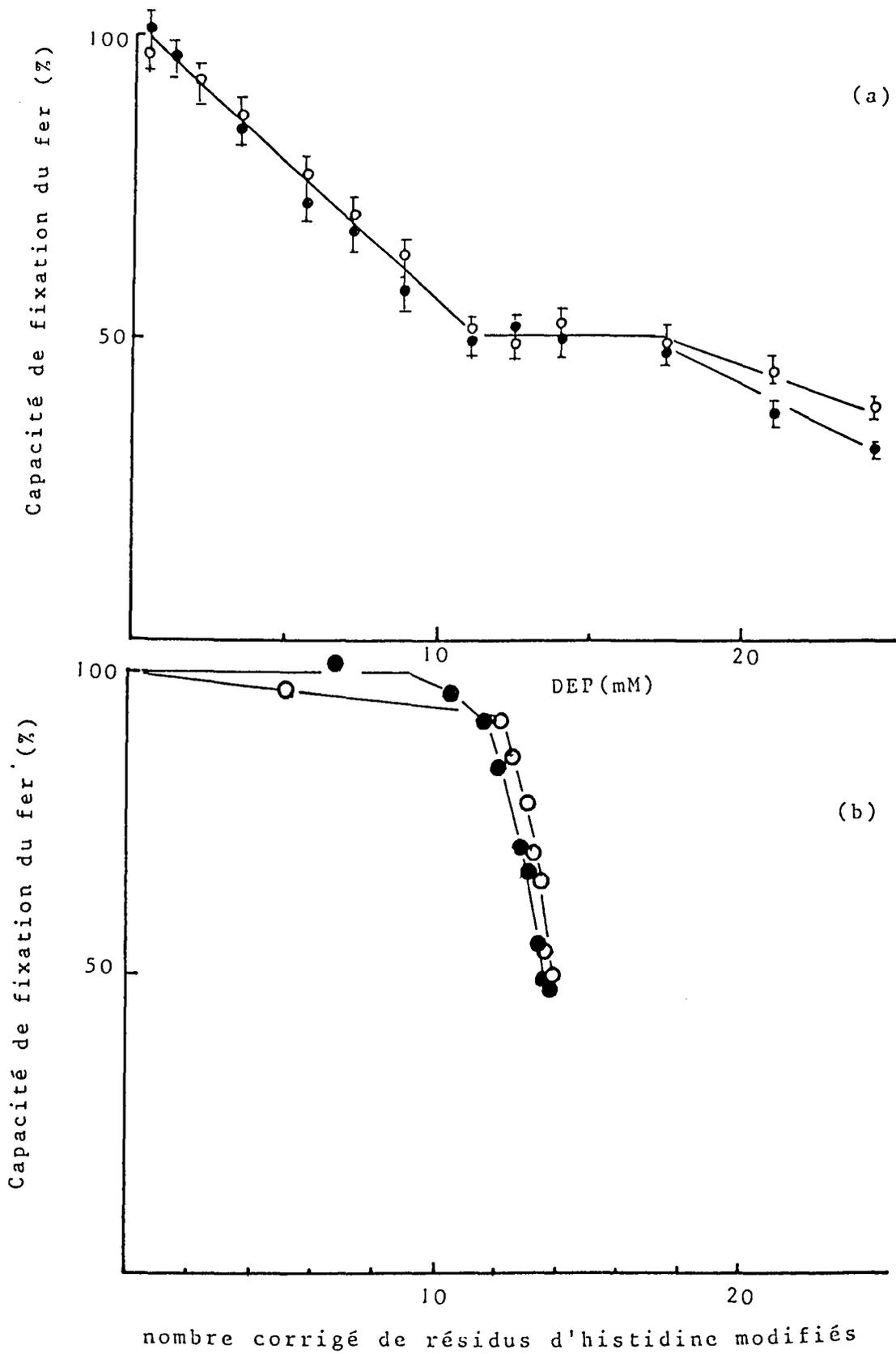


Figure 32 : Capacité résiduelle de fixation du fer des sérotransferrines humaine (O) et de Lapin (●) modifiées par le diéthyl pyrocarbonate en fonction (a) de la concentration en réactif, et (b) du nombre corrigé de résidus d'histidine modifiées.

dénaturent. Afin de rendre les résidus d'histidine du deuxième site accessibles au réactif, nous avons réalisé la carbéthoxylation des deux aprototransferrines en présence de concentrations croissantes en urée.

1. Quantification du nombre de résidus d'histidine modifiés en présence d'urée.

Nous avons tout d'abord vérifié que la présence d'urée, même à forte concentration, ne modifiait pas la réactivité des résidus d'histidine vis-à-vis du diéthyl-pyrocarbonate. Les différences de spectres (Fig.33, p.87) d'aprototransferrine en présence d'urée 6M montrent deux points isobestiques, à 267 nm et 225 nm pour des concentrations en DEP de 0 à 3,5mM. Pour les concentrations supérieures le deuxième point isobestique disparaît, et l'absorption maximale se déplace vers les faibles longueurs d'onde. Ceci est dû à la N-N'-dicarbéthoxylation des résidus d'histidine qui sont tous devenus accessibles, en raison du dépliement de la chaîne polypeptidique. Dans ces conditions tous les résidus d'histidine réagissent à la même vitesse, et nous pouvons appliquer les coefficients d'extinction tirés de la Fig.29 (p.80).

Les résultats sont rassemblés dans le tableau IX (p.88), et montrent que le nombre de résidus d'histidine réagissant rapidement est beaucoup plus dépendant de la concentration en urée que le nombre total de résidus. A partir de 6M en urée, tous les résidus d'histidine des deux sérototransferrines sont modifiés à une concentration en DEP de 3,5 mM et se comportent comme réagissant rapidement. A forte concentration en DEP, 20 mM, le nombre total de résidus d'histidine ayant réagi ne varie pas pour des concentrations en urée de 0 à 3M. C'est pourquoi la capacité résiduelle de fixation du fer des sérototransferrines a été déterminée après carbéthoxylation en présence d'urée à des concentrations variant entre 3 et 8M.

2. Capacité résiduelle de fixation du fer des apototransferrines modifiées en présence d'urée.

Nous avons tout d'abord vérifié que la dénaturation par l'urée ne modifiait pas la capacité de fixation du fer des témoins sérototransferrines après élimination de l'urée. Jusqu'à 4M en urée, la resaturation en fer est de 100%, puis elle baisse graduellement jusqu'à 80%, en urée 8M. La renaturation de la chaîne peptidique est donc suffisante pour reconstituer presque totalement la conformation des sites de fixation du métal. Le 100% de fixation du fer a été déterminé sur un témoin traité uniquement par l'urée.

La Fig.34 (p.89), montre la relation entre la capacité résiduelle de fixation du fer des sérototransferrines carbéthoxylées et le nombre de résidus d'histidine modifiés. A 8M en urée, la perte de capacité de fixation du fer est en relation linéaire avec le nombre de résidus modifiés, montrant ainsi que tous les résidus sont accessibles et réagissent sensiblement à la même vitesse. La destruction complète des deux sites est atteinte quand 18 résidus sont modifiés dans la sérototransferrine de Lapin et 19 dans la sérototransferrine humaine.

Par contre à 4M en urée, la perte de capacité de fixation du fer se fait en deux phases. La première correspond à la destruction du premier site (site accessible) et à la carbéthoxylation de 14 résidus d'histidine dans la sérototransferrine de Lapin et de 16 ré-

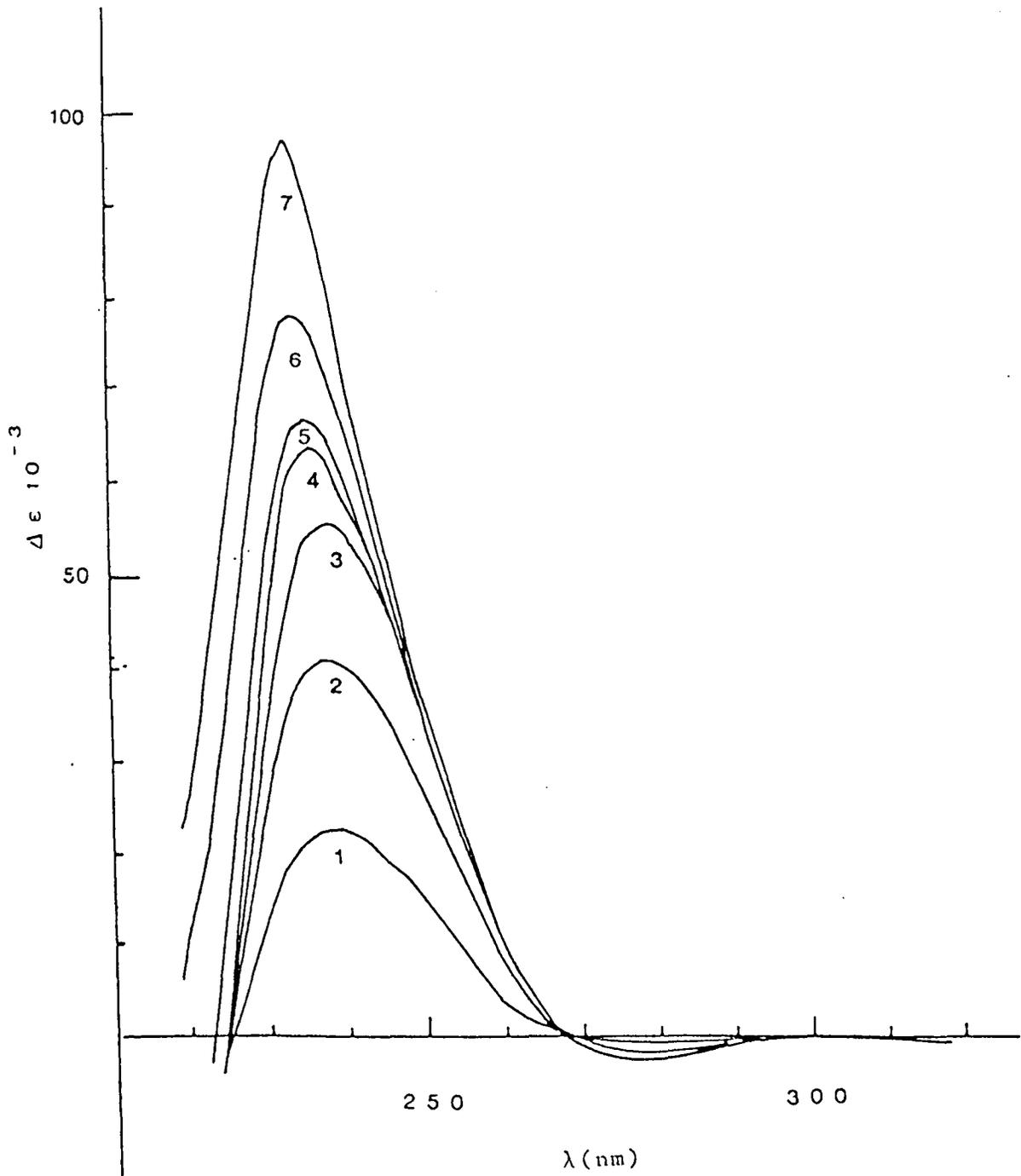


Figure 33 : différence de spectres de la sérotransferrine humaine en présence d'urée 6M à différentes concentrations en DEP :
1 ; 0,75mM ; 2 ; 2,5mM ; 3 ; 2,5mM ; 4 : 3,5mM ; 5 : 5mM ;
6 : 10mM ; 7 : 20mM.

TABLEAU IX

Nombre de résidus d'histidine réagissant avec le diéthyl-pyrocarbonate (DEP) dans les sérotransferrines dénaturées par différentes concentrations en urée.

Concentration en DEP	Molarité en Urée				
	0	3	4	6	8
<u>DEP 3,5 mM : résidus réagissant rapidement (a)</u>					
STF humaine	7,2	12,3	13,4	19	19
STF Lapin	6,7	10	13	18	18
<u>DEP 20 mM: résidus réagissant au total (b)</u>					
STF humaine	14	14,5	18,2	19	19
STF Lapin	14	13	16	18	18

(a) En présence d'urée la chaîne peptidique est dépliée, tous les résidus exposés sont supposés réagir à la même vitesse, et sont considérés comme résidus réagissant rapidement à une concentration de 3,5mM en réactif, le nombre exact de résidus est calculé en utilisant le coefficient d'absorption moléculaire à 240 nm = $3.600 \text{ l.mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ d'après la figure 29 p. 80

(b) Le nombre total de résidus ayant réagi avec le DEP est calculé en tenant compte du nombre de résidus ayant réagi rapidement, qui sont considérés comme étant N,N'-dicarbétoylés à une concentration de 20mM en DEP.

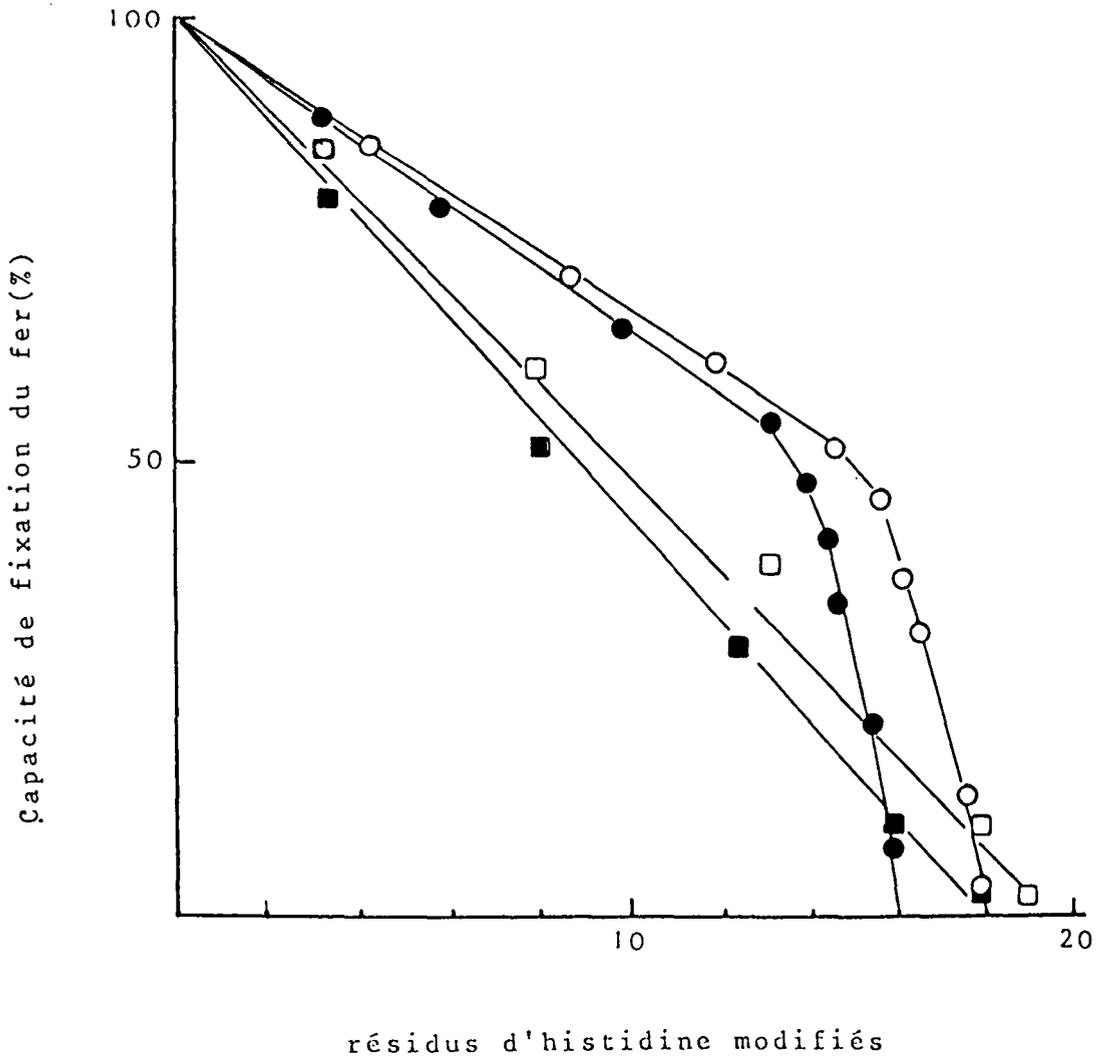


Figure 34 : Capacité de fixation du fer des aposérotransferrines humaine (symboles vides) et de Lapin (symboles pleins) modifiées par le diethyl pyrocarbonate après traitement par de l'urée 4M (○,●) et 8M (□,■). La capacité résiduelle de fixation du fer est exprimée en fonction du nombre de résidus d'histidine modifiés

sidus dans la sérotransferrine humaine. La destruction du deuxième site, (site enfoui) correspond à la modification de deux résidus d'histidine supplémentaires dans les deux sérotransferrines, soit 16 résidus pour la sérotransferrine de lapin et 18 pour la sérotransferrine humaine.

III-DIFFERENCE DE STABILITE DES DEUX SITES DE FIXATION DU FER EN FONCTION DU PH, DE LA FORCE IONIQUE ET DES CHELATEURS

La différence de réactivité chimique entre les deux sites, que nous venons de constater dans la sérotransferrine de lapin devrait aussi se manifester vis-à-vis de la protonation comme dans la sérotransferrine humaine (Princiotta et Zapolski, 1975; Lestas, 1976) et de Rat (Okada et al., 1978). C'est pourquoi nous avons étudié, d'une part la saturation en fer de la sérotransferrine de Lapin en présence de différents chélateurs et, d'autre part la dissociation du complexe en fonction du pH et de certains ions.

A - Saturation en fer

1. Détermination de la capacité totale de fixation du fer de la sérotransferrine de Lapin.

Nous avons représenté dans la Fig.35-A(p.91), la courbe de saturation en fer de la sérotransferrine de Lapin, en fonction du volume de citrate ferrique ajouté. D'après les résultats obtenus, la capacité totale de fixation du fer est de 1,42%. La quantité de fer fixée à saturation, déterminée par dosage colorimétrique à la sulfobathophénanthroline, après élimination du fer en excès donne un résultat similaire, de 1,37%. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature pour la sérotransferrine de Lapin qui fixe 2 ions ferriques à saturation, comme la sérotransferrine humaine.

2. Influence du pH sur la saturation en fer des sérotransferrines.

La saturation en fer des sérotransferrines a été réalisée en présence de tampon citrate 30 mM, bicarbonate 15 mM à des pH variant de 5,5 à 8,6, pendant un temps minimum de 15h. Les courbes de saturation (Fig.35-B,p.91) montrent une allure similaire pour les deux sérotransferrines. La sérotransferrine de Lapin semble cependant fixer le fer dans une gamme de pH plus étroite : de 6,4 à 7,35, que la sérotransferrine humaine : de 6,2 à 7,8.

3. Fixation sélective du fer sur les sites N- et C-terminaux de la sérotransferrine de lapin.

Nous avons appliqué les techniques déjà décrites pour la sérotransferrine humaine (Evans et Williams, 1978; Aisen et al., 1978). La saturation partielle de la sérotransferrine humaine conduisant à une fixation préférentielle du fer sur le site C-terminal quand le donneur de fer est le FeIII-NTA, et sur le site N-terminal quand le donneur est FeCl ou FeIII-citrate.

La Fig. 36,(p.93) montre les profils d'électrofocalisation obtenus avec la sérotransferrine de lapin saturée à 30% ou 60%, soit en présence de citrate ferrique à pH 8,2, soit en présence de Fe-NTA à pH 7,5. Quel que soit le chélate ferrique utilisé comme don-

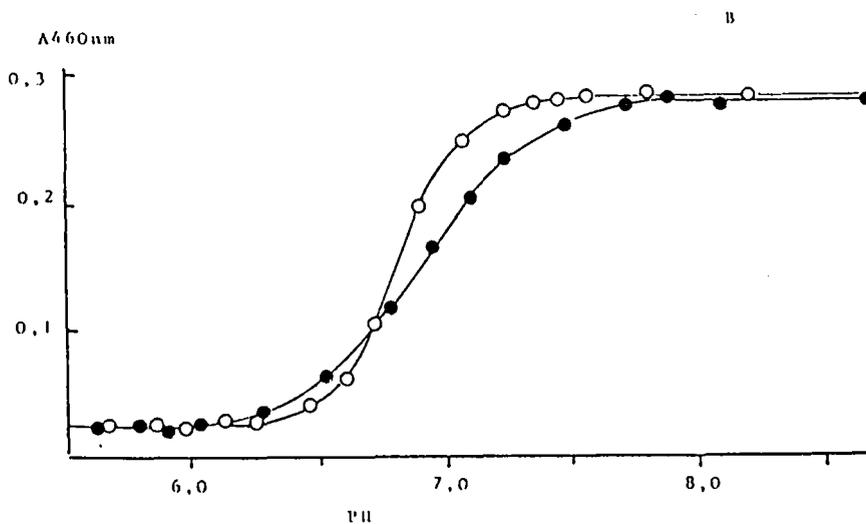
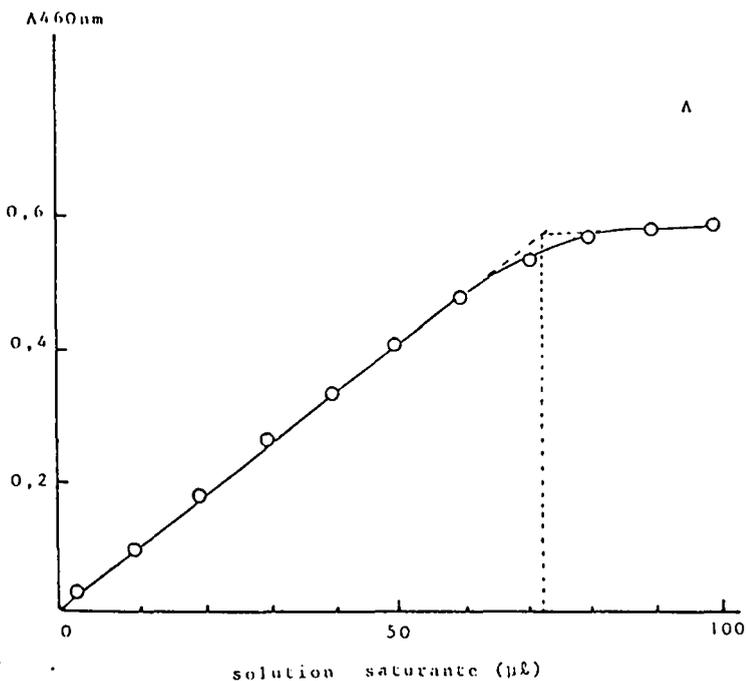


Figure 35 : Saturation en fer des sérotransferrines

A : Courbe de saturation en fer de la sérotransferrine de Lapin (2 ml de solution à 10mg/ml dans le tampon citrate bicarbonate 0,1M, pH 8,6) par la solution d'Azari et Baugh (1967) contenant 3,84µg de fer/10µl.

B : Courbes de saturation en fer des sérotransferrines d'Homme (●) et de Lapin (○) à 5mg/ml en fonction du pH dans un tampon citrate-acide citrique 0,03 M, bicarbonate 0,015M (15 h de saturation).

neur de fer , il est impossible de fixer sélectivement dans ces conditions, le fer sur l'un des deux sites de la sérotransferrine de Lapin. En présence de citrate ferrique le fer se répartit de manière identique sur les deux sites, alors que dans la sérotransferrine humaine le fer se fixe 3,5 à 5 fois plus sur le site N-terminal que sur le site C-terminal. En présence de Fe-NTA , nous trouvons très peu de différences, avec toutefois une légère occupation préférentielle du site C-terminal par rapport au site N-terminal, dans un rapport de 1,3:1 à 1,5:1.

Les pH_i , déterminés par électrofocalisation pour la sérotransferrine de Lapin sont respectivement : 5,55 pour l'aosérotransferrine, 5,35 pour l'espèce monoferrique saturée sur le site N-terminal et 5,1 pour la sérotransferrine diferrique.

L'accessibilité des deux sites de fixation du fer de la sérotransferrine de Lapin vis-à-vis des différents donneurs de fer étant beaucoup moins marquée que celle de la sérotransferrine humaine , il n'a pas été possible , par cette technique de préparer sélectivement les deux espèces monoferriques de la sérotransferrine de Lapin.

B - Désaturation en fer des sérotransferrines

1. Influence du pH et des chélateurs du fer.

Les expériences d'élimination séquentielle du fer des transferrines saturées en fer ont été réalisées par protonation , à force ionique inférieure à 0,1. Les courbes de dissociation du fer en fonction du pH sont montrées dans la Fig. 37 (p.94).

En présence de cacodylate , les résultats déjà décrits pour la sérotransferrine humaine (Lestas, 1976) sont retrouvés (Fig.37-A): élimination du fer de site acido-labile entre pH 6,4 et 5,7, puis du site acido-stable entre pH 5,7 et 5,0. Dans les mêmes conditions, la sérotransferrine de Lapin ne montre aucune différence de stabilité entre les deux sites de fixation du fer , l'élimination du métal se faisant de manière continue entre pH 5,9 et pH 5,0. Ce résultat ne permet pas de caractériser la présence d'un site acido-labile dans la sérotransferrine de Lapin.

L'addition d'ions phosphates fragilise la liaison du fer. La courbe de dissociation du fer de la sérotransferrine humaine est toujours biphasique mais le pH de demi-dissociation est augmenté à 6,1. La destruction du site acido-stable se fait entre pH 6,1 et 5,3. Comme dans le cas précédent, il n'est pas possible de mettre en évidence une différence de stabilité des deux sites de la sérotransferrine de Lapin, la destruction étant continue entre pH 6,75 et pH 5,5. Par exemple à pH 5,9, seul le site acido-labile de la sérotransferrine humaine est détruit, alors que plus de 75% de désaturation sont constatés pour la sérotransferrine de Lapin.

L'utilisation d'un chélateur fort du fer, le citrate, fait disparaître l'allure biphasique de la courbe de désaturation de la sérotransferrine humaine, le site acido-stable devient accessible au chélateur à des pH plus élevés. L'élimination du fer est continue entre pH 7,6 et 6,1. La sérotransferrine de Lapin, légèrement plus résistante montre une courbe monophasique entre pH 7,1 et 6,2.

Les expériences ainsi réalisées retrouvent bien l'existence d'un site acido-labile et d'un site acido-stable dans la sérotrans-

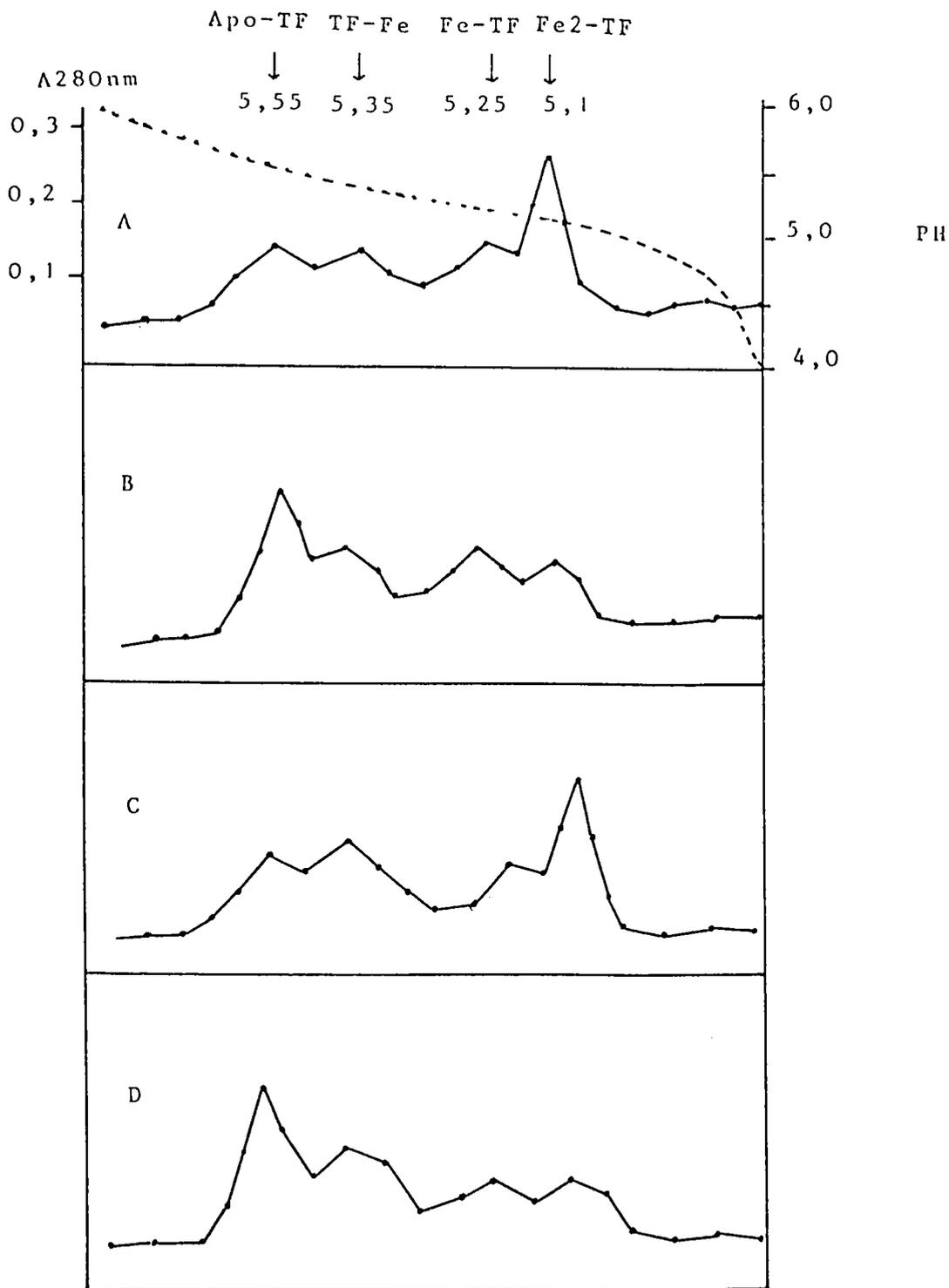


Figure 36 : Profils d'électrofocalisation sur gel Ultradox en présence d'ampholines LKB (gradient de pH 4,0 à 7,0) de sérotransferrine de Lapin partiellement saturée à 30 % en fer (B et D) et à 60 % en fer (A et C), en présence de Fe III-citrate (A et B) et de Fe III-NTA (C et D). Après l'électrofocalisation le gel est coupé en bandes de 1 cm et élué par de l'eau distillée, le repérage est effectué par lecture de l'absorbance à 280 nm et le pH de chaque fraction est mesuré. (La courbe en pointillé de la Fig. A représente le gradient de pH).

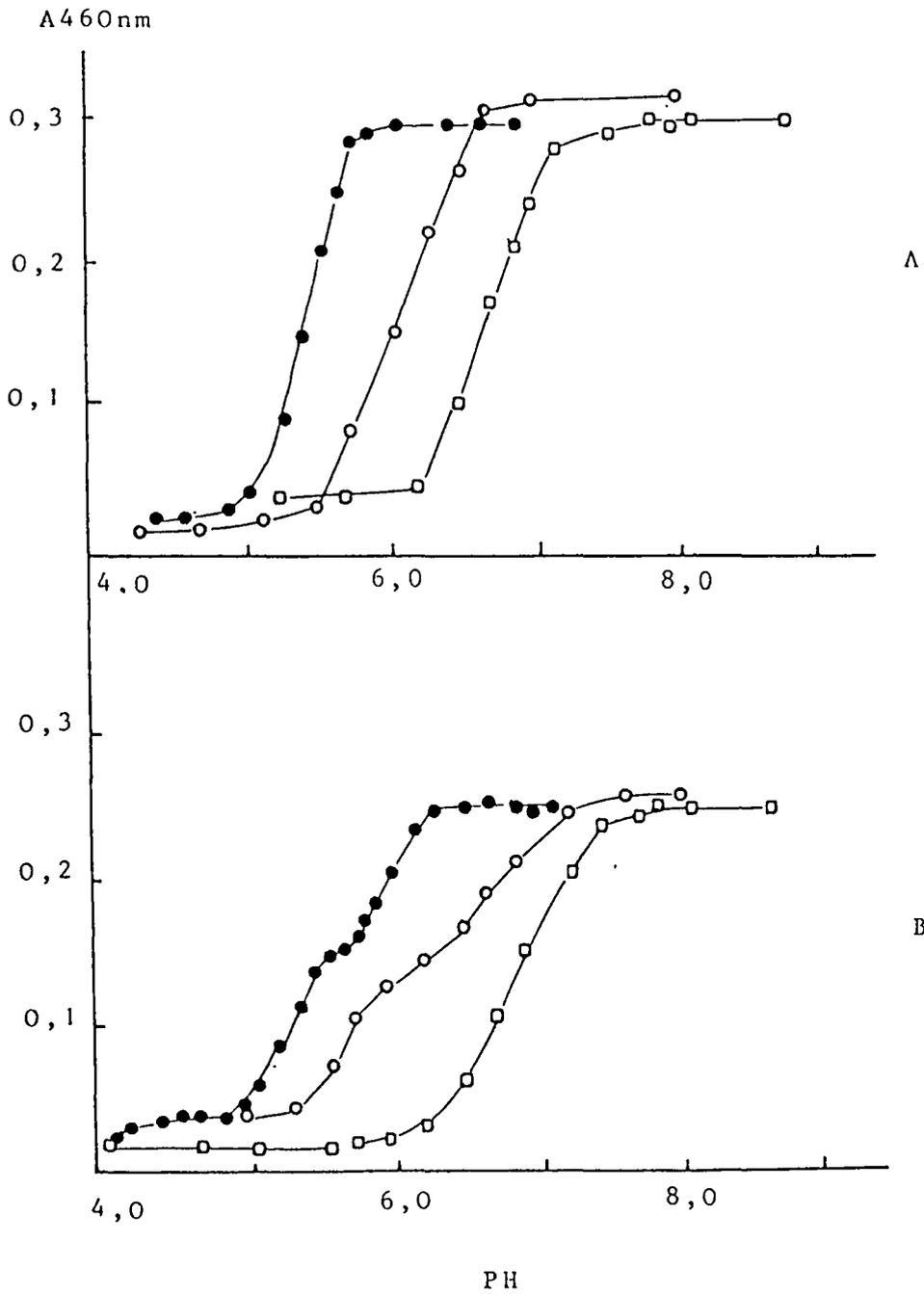


Figure 37 : Désaturation des sérotransferrines de Lapin (A) et humaine (B) en fonction du pH et de la nature des ions.
(o) Tampon citrate-acide citrique de force ionique 0,08.
(o) Tampon phosphate-acetate de force ionique 0,05.
(•) Tampon cacodylate-acide cacodylique de force ionique 0,08.

ferrine humaine, mais ne permettent pas de mettre en évidence l'existence d'une telle différence dans la sérotransferrine de Lapin. Dans tous les tampons utilisés, les deux sites de la sérotransferrine de Lapin se comportent comme le site acido-stable de la sérotransferrine humaine.

2. Cinétiques de désaturation de la sérotransferrine de Lapin à différents pH, en présence de phosphate et d'EDTA.

N'ayant pas réussi à mettre en évidence une différence de stabilité, en milieu acide, des deux sites de fixation du fer de la sérotransferrine de Lapin, nous avons regardé l'accessibilité du métal aux chélateurs tels que les ions phosphates et l'EDTA à des pH variant entre 7,1 et 8,05.

Les cinétiques de désaturation en fonction du pH (Fig.38,p.96) montrent une élimination progressive du fer en fonction du temps, quand le pH baisse de 8,05 à 7,1 pendant deux jours de désaturation. Une stabilisation du taux de fer restant fixé sur la protéine est constatée pour des temps allant jusqu'à 5 jours. Les résultats montrent que les deux sites de fixation du fer de la sérotransferrine de Lapin sont relativement accessibles aux chélateurs du fer et qu'il est possible de la désaturer totalement en 24h à pH 7,1 dans un tel système tampon.

Un taux constant de fer de 53% est retrouvé sur la sérotransferrine de Lapin au bout de deux jours de désaturation en tampon phosphate 30 mM, Tris-HCl 15 mM, EDTA 2,5 mM à un pH final de 7,85. Après élimination du fer en excès, l'analyse de cet échantillon par électrofocalisation en présence d'ampholines montre que la majeure partie de la sérotransferrine de Lapin est monoferrique et que le fer est situé sur le domaine C-terminal. Le site accessible aux chélateurs serait donc le site situé sur le domaine N-terminal de la sérotransferrine de Lapin.

IV - DISCUSSION.

Les résultats que nous avons obtenus peuvent être reliés à la structure des lobes N-et C-terminaux des transferrines. Il est connu que toutes les classes de transferrine possèdent une grande conservation de la position des ponts disulfures, le lobe C-terminal en contenant plus aurait une conformation plus compacte. Dans le cas de la sérotransferrine humaine, le lobe C-terminal est encore plus compact (Fig.2,p. 9) avec 11 ponts disulfures, contre 8 dans le lobe N-terminal. Les résidus d'histidine inaccessibles au réactif en milieu non dénaturant seraient localisés dans le lobe C-terminal, et les résidus accessibles dans le lobe N-terminal, l'exposition du site enfoui étant réalisée en présence de concentrations élevées en urée. Par analogie avec la sérotransferrine humaine, la sérotransferrine de Lapin, qui se comporte de manière identique posséderait aussi un site accessible sur le lobe N-terminal et un site enfoui situé sur le lobe C-terminal.

Nous avons trouvé deux résidus d'histidine essentiels dans chaque site de fixation du fer pour les deux sérotransferrines. Ces résultats sont en accord avec le nombre de résidus d'histidine communément admis comme participant à la fixation du fer (cf.généralités p.26,27).

Nous avons mis en évidence une différence majeure entre les

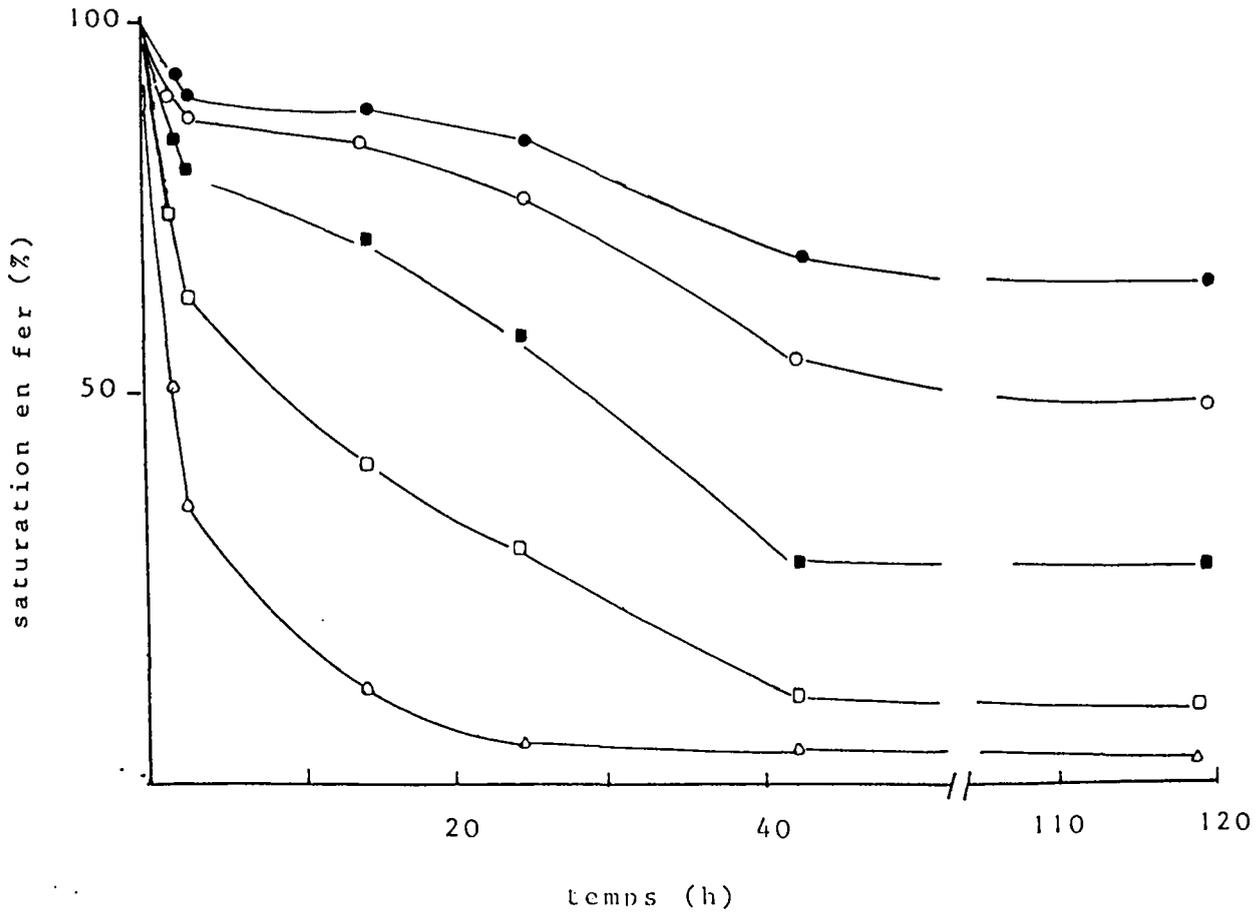


Figure 38 : Désaturation en fer de la sérotransferrine de Lapin en fonction du temps en présence d'ions phosphates et d'EDTA à différents pH: (●) pH 8,05; (○) pH 7,85; (■) pH 7,6; (□) pH 7,35; (△) pH 7,1. Les différents tampons sont obtenus par mélange de 1,2 ml de tampon Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 50mM à pH 6,8, 0,3 ml de Tris-HCl 0,1M à pH 8,6, 0,1 ml d'EDTA 0,05M et 0,4 ml de sérotransferrine de Lapin dans l'eau (concentration finale de la sérotransferrine: 5mg/ml).

deux sérotransferrines, au niveau de la stabilité des deux sites de fixation du fer vis-à-vis de la protonation. La sérotransferrine humaine possède un site acido-labile totalement détruit à pH 5,7 en absence de chélateurs, à pH 6,0 en présence de phosphate 10 mM et à pH 6,9 en présence de citrate 25 mM, le site acido-stable est détruit à des pH inférieurs. Dans le cas de la sérotransferrine de Lapin une telle différence de stabilité n'a pu être mise en évidence, les deux sites se comportant comme le site acido-stable de la sérotransferrine humaine.

L'utilisation simultanée d'ions phosphate et d'EDTA nous a permis de préparer quantitativement une sérotransferrine de Lapin monoferrique sur le site C-terminal, stable à pH 7,8 avec le temps, ce qui nous a permis de réaliser des protéolyses ménagées et d'isoler ce lobe saturé en fer.

STRUCTURE ET ROLE DU GLYCANNE DANS LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET IMMUNOLOGIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN

Afin de préciser si les différences de spécificité entre la sérotransferrine humaine et de Lapin, constatées lors de l'interaction avec les réticulocytes de Lapin, provenaient de la partie glycanne, nous avons entrepris d'une part l'étude complète de la structure de la partie glycanne de la sérotransferrine de Lapin et d'autre part nous avons effectué sa déglycosylation complète.

I- ETUDE DE LA STRUCTURE DU GLYCANNE DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN

L'étude de la structure du glycanne a été réalisée sur la fraction BIIb obtenue après purification de la sérotransferrine selon le schéma de fractionnement décrit dans la Fig. 21, p.58. Après hydrolyse pronasique, les glycopeptides dont la composition en glucides a été précisée, ont été perméthylés et analysés en Résonance magnétique nucléaire (R.M.N) à 360 Mhz.

A - Hydrolyse pronasique .

L'hydrolyse pronasique a été réalisée selon le protocole décrit dans l'appendice technique (p.8). A chaque étape de l'hydrolyse des contrôles ont été effectués, par dosage des oses neutres, pour détecter une perte éventuelle de glycanne lors du fractionnement. 90%, 88% et 82% des sucres initiaux sont récupérés après la première, la deuxième et la troisième hydrolyse. Après précipitation à l'ATCA nous retrouvons 76% des sucres initiaux et après passage sur résines échangeuses d'ions, il reste 62,5% des sucres initiaux.

B - Fractionnement de l 'hydrolysate pronasique.

La fraction glycopeptidique totale récupérée après chromatographie sur Séphadex G-25 est soumise à une électrophorèse préparative sur papier à pH 2,4. La migration est réalisée de la cathode vers l'anode, ce qui permet d'éliminer les peptides qui souillent la fraction glycopeptidique. Les glycopeptides possédant de l'acide sialique sont faiblement ionisés à ce pH, et migrent surtout grâce à l'électrorhéophorèse et se séparent les uns des autres en fonction de leur nombre de résidus d'acide sialique. Deux fractions GP-I et GP-II ont ainsi été séparées et isolées.

A partir de 5g de sérotransferrine de Lapin, 90mg de fraction glycopeptidique totale ont été obtenus (soit environ 60%). 11 mg de glycopeptide GP-I et 43,5mg de glycopeptide Gp-II ont été isolés par électrophorèse préparative, soit respectivement 20 et 80 % Le rendement final est de 36% . En raison des contrôles effectués à chaque étape il semble peu probable qu'il y ait eu perte d'un groupement glycanne.

C - Analyse des deux fractions glycopeptidiques.

1- Composition en acides aminés.

La composition en acides aminés des deux glycopeptides, donnée

dans le Tableau X, p.100, révèle une identité totale entre ces deux fractions.

2- Composition en glucides.

Les compositions molaires en glucides des deux fractions sont rassemblées dans le Tableau X, p.100. Ces résultats obtenus montrent que le glycopeptide majeur GP-II ne diffère du GP-I que par la présence d'un résidu supplémentaire d'acide sialique.

3- Perméthylation des glycopeptides.

Les résultats des analyses chromatographiques des éthers méthyliques obtenus après perméthylation et acétylation des glycopeptides GP-I et GP-II sont rassemblés dans le Tableau XI, p.101. Ces résultats montrent l'identité des glycopeptides GP-I et GP-II, la seule différence étant l'existence d'un résidu de perméthyl-galactose dans le glycopeptide GP-I, démontrant la présence d'un résidu de galactose en position terminale non réductrice.

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

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

L'existence uniquement de 3,6 di-O-méthyl-glucosamine montre que tous les résidus sont substitués en 1 et en 4.

L'ensemble de ces résultats montre que la seule différence entre les deux glycopeptides GP-I et GP-II est l'absence d'un résidu d'acide N-acétyl neuraminique en position externe sur un résidu de galactose, et nous permet déjà de prévoir une structure glycanique biantennée de type lactosaminique identique à celle déjà trouvée dans la sérotransferrine humaine.

4- Etude des spectres de RMN du proton à 360Hz.

Le glycopeptide GP-II a été désialylé par action de la neuraminidase (*Clostridium perfringens*). L'asialo-glycopeptide a été isolé par électrophorèse préparative à pH 2,4, avec une migration de l'anode vers la cathode.

Les valeurs des déplacements chimiques des protons du glycopeptide GP-I et du glycopeptide GP-II sialylé et asialylé, comparées avec les valeurs obtenues pour les glycopeptides de la sérotransferrine humaine (Dorland *et al.* 1977) sont données dans le Tableau XII, p.102. L'étude des déplacements chimiques des pics caractéristiques du glycopeptide GP-II désialylé et asialylé, confirme l'existence d'un glycanne biantenné possédant un noyau du type mannotrioside-di-N-acétyl neuraminyl-(α 2,6)-N-acétyllactosaminique. Les valeurs des déplacements chimiques des protons des glycopeptides sialylés et asialylés des deux sérotransferrines sont identiques permettant d'affirmer l'identité de la structure du glycanne biantenné de la sérotransferrine de Lapin à celle du glycanne biantenné de la sérotransferrine humaine.

TABLEAU X

Compositions molaires en monosaccharides et en acides aminés des glycopeptides pronasiques isolés de la sérotransferrine de Lapin

Glycopeptides	GP - I	GP - II
Pourcentage de récupération	20 %	80 %
<u>Composition molaire en monosaccharides (a)</u> (rés./mole)		
Gal	2,13 (2,0)	2,04 (2,1)
Man	3,20 (3,0)	2,90 (3,0)
Glc NAc	3,95 (3,7)	4,00 (4,2)
Neu Ac	1,17 (1,1)	2,11 (2,2)
<u>Composition molaire en acides aminés (b)</u> (rés./mole)		
Asx	1	1
Ser	0,96	1,11
Acide aminé N-terminal	Asn	Asn

(a) les chiffres entre parenthèses représentent les rapports molaires calculés en prenant trois résidus de mannose comme référence.

(b) les rapports molaires sont calculés en prenant un résidu d'acide aspartique comme référence.

TABLEAU XI

Composition molaire des éthers méthyliques obtenus après permétylation des glycopeptides pronosiques GP - I et GP - II

<u>Monosaccharides</u> <u>méthylés</u> (*)	GP - I	GP - II
2,3,4,6 tetra-O-méthyl galactoside	1	0,12
2,3,4 tri-O-méthyl galactoside	1,13	1,76
3,4,6 tri-O-méthyl mannoside	1,70	1,85
2,4 di-O-méthyl mannoside	1	1
2 acétamido-3,6 di-o-méthyl glucoside	3,69	3,72

(*) Les calculs ont été effectués en prenant un résidu de 2,4-di O-méthyl mannoside comme référence.

TABLEAU XII

Déplacements chimiques des protons des glycopeptides GPI et GPII analysés en RMN du proton à 360 MHz . Comparaison avec les valeurs obtenues pour les glycopeptides biantennés de la sérotransferrine humaine .

	Sérotransferrine de Lapin				Sérotransferrine humaine	
	GP-Ia	GP-Ib	GP-II bisialo	GP-II asialo	bisialo glycanne	Asialo glycanne
<u>H = 1</u>						
GlcNAc 1	5,073	5,073	5,072	5,070	5,073	5,072
GlcNAc 2	4,620	4,620	4,622	4,617	4,598	4,616
Man 3	4,769	4,769	4,775	4,765	4,770	4,770
Man 4	5,138	5,120	5,134	5,121	5,133	5,119
Man 4'	4,928	4,944	4,946	4,929	4,946	4,926
GlcNAc 5	4,599	4,577	4,600	4,581	4,598	4,581
GlcNAc 5'	4,577	4,599	4,600	4,581	4,598	4,581
Gal 6	4,445	4,471	4,445	4,471	4,447	4,470
Gal 6'	4,471	4,445	4,445	4,471	4,447	4,470
<u>H = 2</u>						
Man 3	4,251	4,251	4,254	4,248	4,254	4,244
Man 4	4,192	4,192	4,195	4,191	4,196	4,188
Man 4'	4,112	4,112	4,114	4,110	4,115	4,107
<u>H = 3</u>						
Neu Ac(H eq.)	1,716	1,716	1,715	-	1,721	-
Neu Ac(H ax.)	2,670	2,670	2,671	-	2,671	-
<u>H (N-acétyl)</u>						
GlcNAc 1	2,005	2,005	2,007	2,009	2,013	2,013
GlcNAc 2	2,078	2,078	2,080	2,078	2,079	2,076
GlcNAc 5	2,030	2,048	2,030	2,050	2,030	2,047
GlcNAc 5'	2,048	2,030	2,030	2,047	2,030	2,047
Neu Ac	2,068	2,068	2,067	-	2,068	-

Nous pouvons constater d'autre part que le glycopeptide GP-I est en fait un mélange, dans un rapport 1:1, de deux monosialyl-glycopeptides isomères (GP-Ia et GP-Ib), le premier possédant un résidu d'acide sialique sur la branche supérieure, et le deuxième sur la branche inférieure.

En effet la présence d'acide sialique branché en position (α 2,6) sur le galactose, produit une augmentation significative des valeurs des déplacements chimiques des protons des Man 4 et 4', des GlcNAc 5 et 5' et des Gal 6 et 6', comme on peut le constater sur le Tableau XII, p.102.

Ces deux monosialyl glycopeptides sont dans un rapport 1:1, ce qui semblerait prouver que leur présence est due à une désialylation chimique lors de la préparation des glycopeptides, et notamment le passage en milieu acide lors de la précipitation à l'ATCA et le fractionnement sur résines échangeuses d'ions fortes, plutôt qu'à une hétérogénéité physiologique du taux d'acide sialique de la sérotransferrine de Lapin.

Les structures glycaniques complètes des glycopeptides pronasiques de la sérotransferrine de Lapin sont données dans la Fig.39, p.104.

II- DEGLYCOSYLATION ENZYMATIQUE DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN.

Afin d'apporter la preuve directe de la participation éventuelle de la partie glucidique de la sérotransferrine dans son activité biologique, nous avons libéré le glycane de la chaîne protéique à l'aide d'une endo β D-N acétyl glucosaminidase isolée de *Basidiomyces sporotricum* (Bouquelet et al., 1980). Après purification de l'aglycosérotransferrine nous avons comparé ses principales propriétés physicochimiques et immunologiques à celles de la sérotransferrine native.

A - Préparation de la sérotransferrine déglycosylée.

La déglycosylation de l'asialosérotransferrine de lapin a été réalisée selon le protocole décrit dans l'appendice technique p. 10. La protéine déglycosylée a été purifiée par passage sur colonne de Con A-Sépharose.

B- Comportement chromatographique et électrophorétique de la sérotransferrine déglycosylée.

La Fig.40 A (p.105) représente le profil d'éluion de la colonne de Con A-sépharose. A l'exception d'un pic mineur (I) au volume mort et d'un autre (III) élué par l' α -méthyl glucoside, plus de 90% de la quantité injectée, venant de l'hydrolyse par l'endo-glycosidase de la sérotransferrine de lapin, est récupérée en un pic (II) symétrique et non retardé.

Après concentration par dialyse sous vide et dessalage sur Séphadex G-25 équilibré dans l'eau, le pic II est soumis à différentes électrophorèses pour vérifier son homogénéité.

Il n'y a pas de bandes mineures (révélant une protéolyse) détectables par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et le pic II possède une masse moléculaire

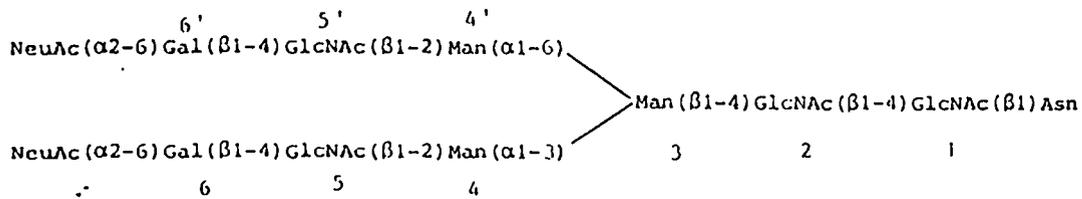
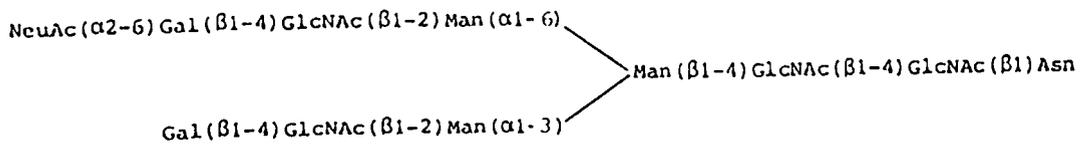
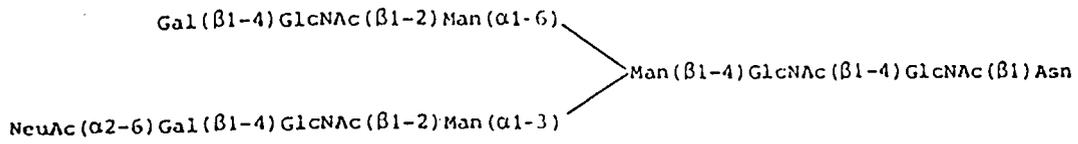


Figure 39 : Structure primaire des glycopeptides isolés de la STF de lapin.

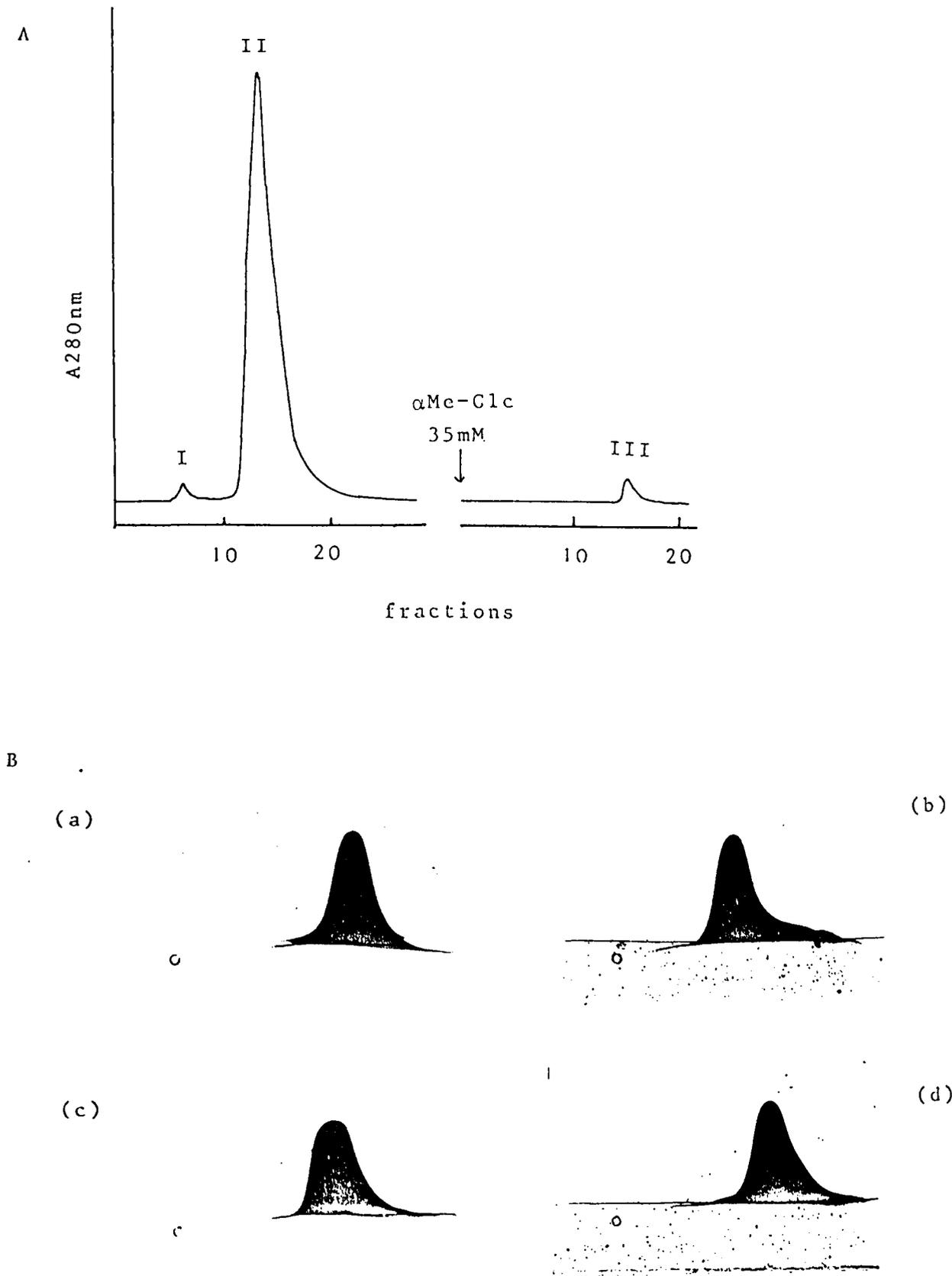


Figure 40 : Interaction de la sérotransferrine déglycosylée avec la Con A.

A : Profil d'éluion de la colonne de Con A - Sépharose (1,6 x 25 cm) de sérotransferrine déglycosylée (20 ml/h, 2 ml/tube)

B : Affino immuno électrophorèses de sérotransferrine de Lapin native (a,b) et deglycosylée (c et d) en présence (b,d) on en absence de Con A (a,c) dans la 1er dimension

très peu différente de la sérotransferrine native.

Les affino-immuno-électrophorèses bidimensionnelles de la Fig. 40-B, (p.105) révèlent bien une similitude de comportement du pic II avec la chromatographie sur colonne de Con A-Sépharose. La sérotransferrine native est retardée en présence de Con A dans la première dimension alors que le pic II ne l'est pas, et présente la même migration en présence et en absence de Con A. Le pic II possède une mobilité correspondant à celle de l'asialotransferrine.

C- Compositions en acides aminés et en sucres de la sérotransferrine déglycosylée.

Les compositions en acides aminés de la sérotransferrine de Lapin native et déglycosylée ne présentent aucune différence (valeurs non montrées), confirmant l'absence d'activité protéasique contaminant l'endoglycosidase.

L'analyse des sucres révèle que le pic II renferme moins de 5% de la composition totale en sucres de la sérotransferrine native. Seulement 0,8 résidus de N-acétyl- β -D-glucosamine restent attachés à la partie protéique, ce qui correspond au résultat attendu compte tenu du mode d'action de cette endoglycosidase qui coupe entre les deux glucosamines voisines du point d'attache.

D- Caractéristiques spectrales et dénaturation thermique

Les spectres de dichroïsme circulaire réalisés dans l'UV lointain (200-250nm) et dans l'UV proche (250-350nm) à différentes températures sont montrés dans la Fig.41 p.107. Ces spectres ne révèlent pas de différences significatives entre la sérotransferrine native et déglycosylée à température ambiante.

La sérotransferrine native ne présente pas de dénaturation dramatique avec l'augmentation de température jusqu'à 80°C, elle semble donc très stable. La forme déglycosylée est un peu moins stable, le changement d'ellipticité se produit à partir de 65°C en UV lointain et 30°C en U.V proche.

Il est à noter que la forme déglycosylée est très sensible à la lyophilisation. Sa solubilité diminue considérablement après lyophilisation pour être pratiquement nulle après conservation à 4°C plus d'un mois. Toutes les manipulations doivent se faire en milieu liquide, la conservation s'effectuant par congélation.

E- Résistance à la protéolyse de la sérotransferrine déglycosylée.

Le taux de protéolyse par la trypsine de la sérotransferrine de Lapin déglycosylée est mesuré, par titration des groupements aminés libérés, par le trinitrobenzène sulfonate (appendice technique, p.10). La comparaison avec la sérotransferrine de Lapin native (Fig.42, p.108) montre que l'élimination du glycanne n'altère pas profondément le comportement de la sérotransferrine de Lapin vis-à-vis des protéases. Des résultats similaires ont été obtenus avec la chymotrypsine.

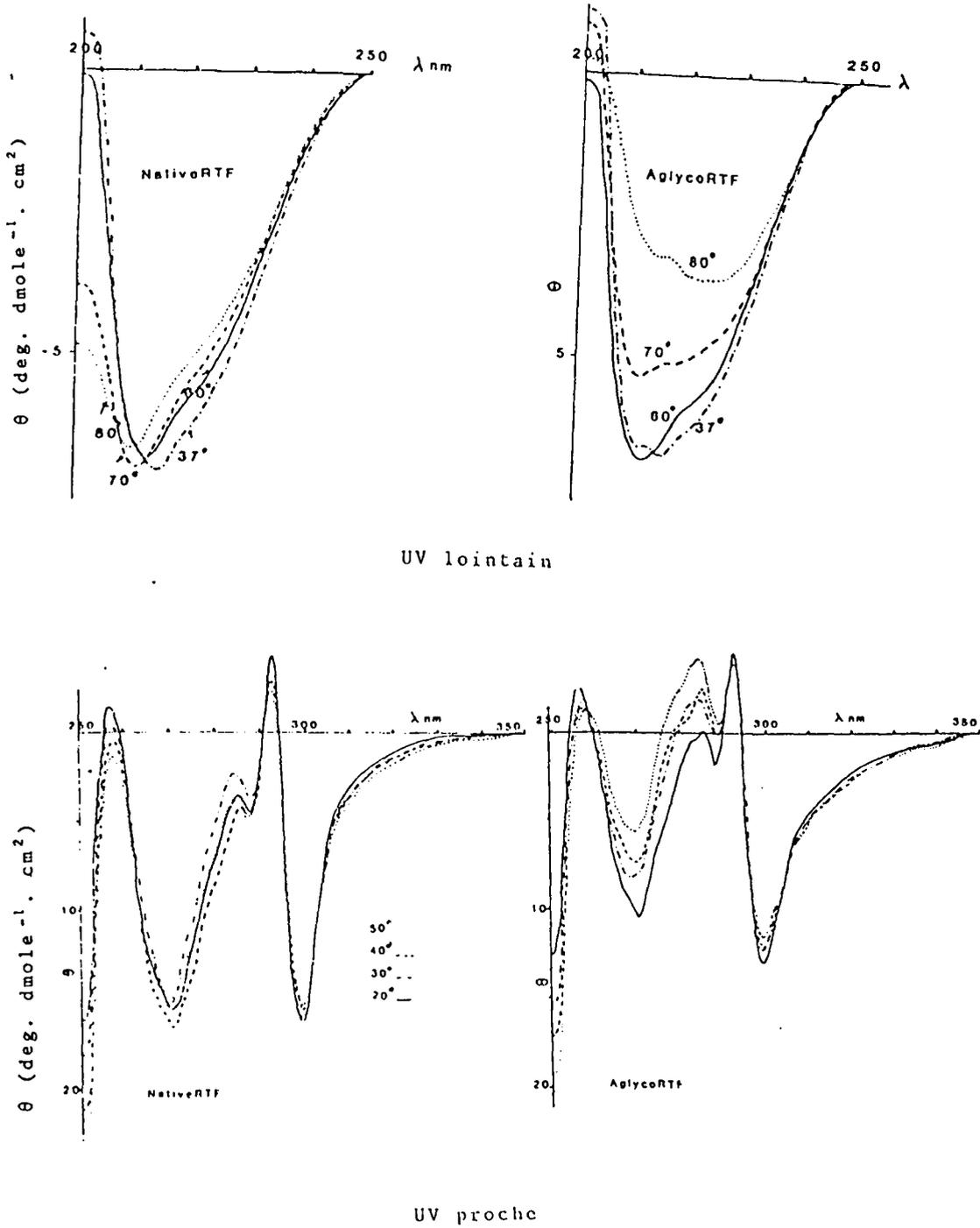


Figure 41 : Spectres dichroïques de la sérotransferrine de Lapin (RTF) native et déglycosylée en fonction de la température. A - UV lointain ; B - UV proche

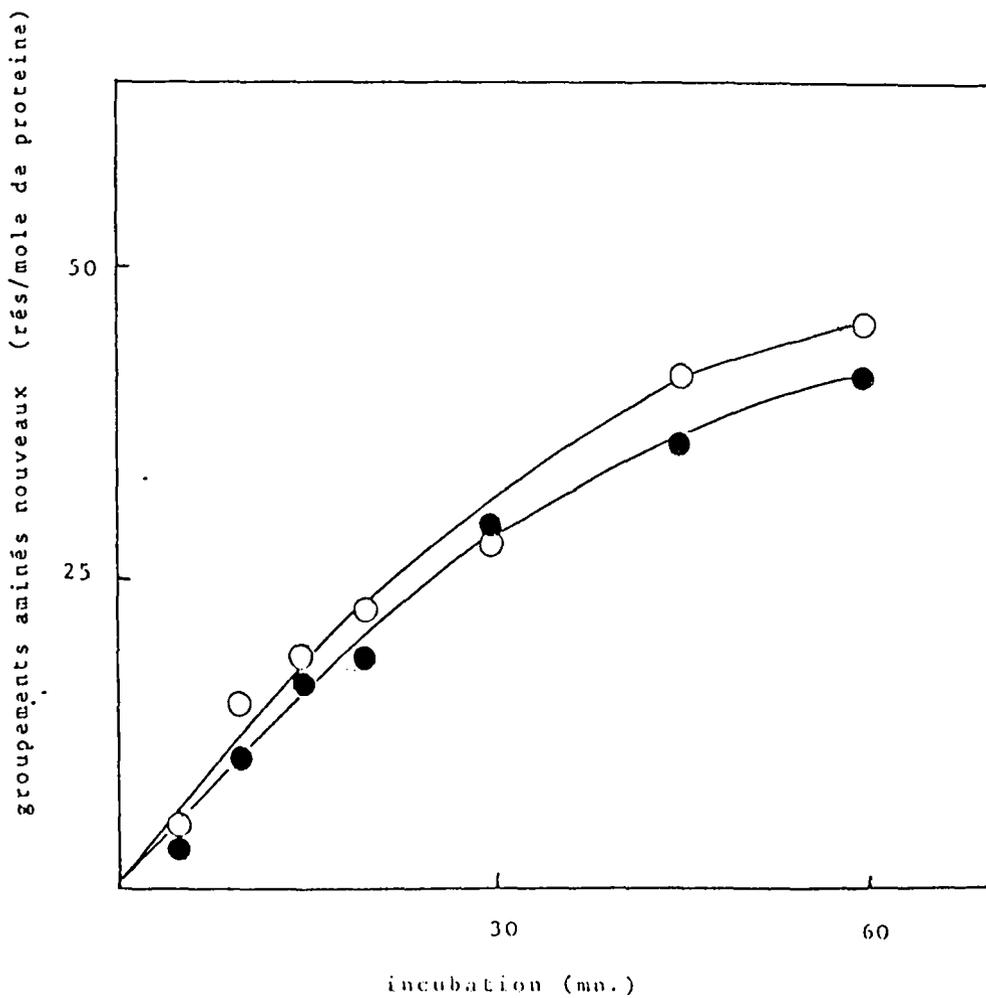


Figure 42 : Taux de protéolyse par la trypsine de la sérotransferrine de Lapin native (●) et déglycosylée (○).

F- Immunoréactivité de la sérotransferrine déglycosylée

L'immunoréactivité de la sérotransferrine de Lapin déglycosylée est analysée par des essais de fixation, sur des anticorps immobilisés, de sérotransferrine de Lapin native marquée à I-125 en présence de concentrations croissantes, soit de sérotransferrine native, soit de sérotransferrine de Lapin déglycosylée toutes deux non marquées.

Les résultats montrés dans la Fig.43, p.110, ne présentent pas de différences marquées dans la fixation des sérotransférines vis-à-vis des anticorps immobilisés, à l'exception d'une concentration inhibitrice un peu plus faible pour la forme déglycosylée. La concentration minimale pour inhiber 50% de la fixation d'une solution 8,6 nM d'antigène marqué est de: 27 nM pour la forme déglycosylée et de 37 nM pour la glycoprotéine native.

II- CONCLUSIONS.

Nous avons démontré dans ce chapitre, que la sérotransferrine de Lapin ne possède qu'un seul groupement glycanique, comme l'avait laissé supposer les résultats préliminaires de Baker et al.(1968) et de Palmour et Sutton (1971), en trouvant deux résidus d'acide sialique par mole de glycoprotéine, et les résultats de Hatton et al. (1974) en trouvant deux fois moins de glucides que pour la sérotransferrine humaine.

La présence de deux groupements glycaniques par molécule de sérotransferrine de Lapin, évoquée par Hudson et al.(1973) et confirmée par Strickland et Hudson (1978) et Strickland et al.(1979) est uniquement basée sur les rapports molaires en monosaccharides déterminés par Hudson et al.(1973), et s'explique aisément par une contamination de leur préparation par l'hème-hémopexine.

Nous avons déterminé la structure du glycanne unique de la sérotransferrine de Lapin, elle est identique en tout point à celle du glycanne biantenné de la sérotransferrine humaine. Cette structure a d'ailleurs été confirmée par Strickland et al.(1979).

Le glycopeptide monosialylé, isolé par hydrolyse pronasique, provient sans doute d'une désialylation partielle du glycanne, lors du traitement acide de l'hydrolysate par l'ATCA, et le passage sur résine forte échangeuse de cations. En effet, nous ne retrouvons pas de glycopeptides monosialylés par hydrolyse trypsique, (résultats non décrits) et l'étude des spectres RMN, montre que l'acide sialique est absent aussi bien sur la branche supérieure que sur la branche inférieure.

La déglycosylation enzymatique par l'utilisation d'une endo N-acétyl- β -D-glucosaminidase permet d'obtenir quantitativement (90%) une sérotransferrine de Lapin totalement déglycosylée à l'exception du résidu de glucosamine du point d'attache. Les étapes de purification sont suffisamment rapides pour obtenir un produit soluble (à condition d'éviter la lyophilisation) présentant des propriétés biochimiques et biophysiques similaires à celles de la glycoprotéine native.

Les faibles différences dans l'immunoréactivité après élimination du glycanne pourraient s'expliquer par l'absence de déterminant antigénique au niveau de la partie protéique masquée par le glycanne. Il aurait peut-être fallu immuniser un mouton par la

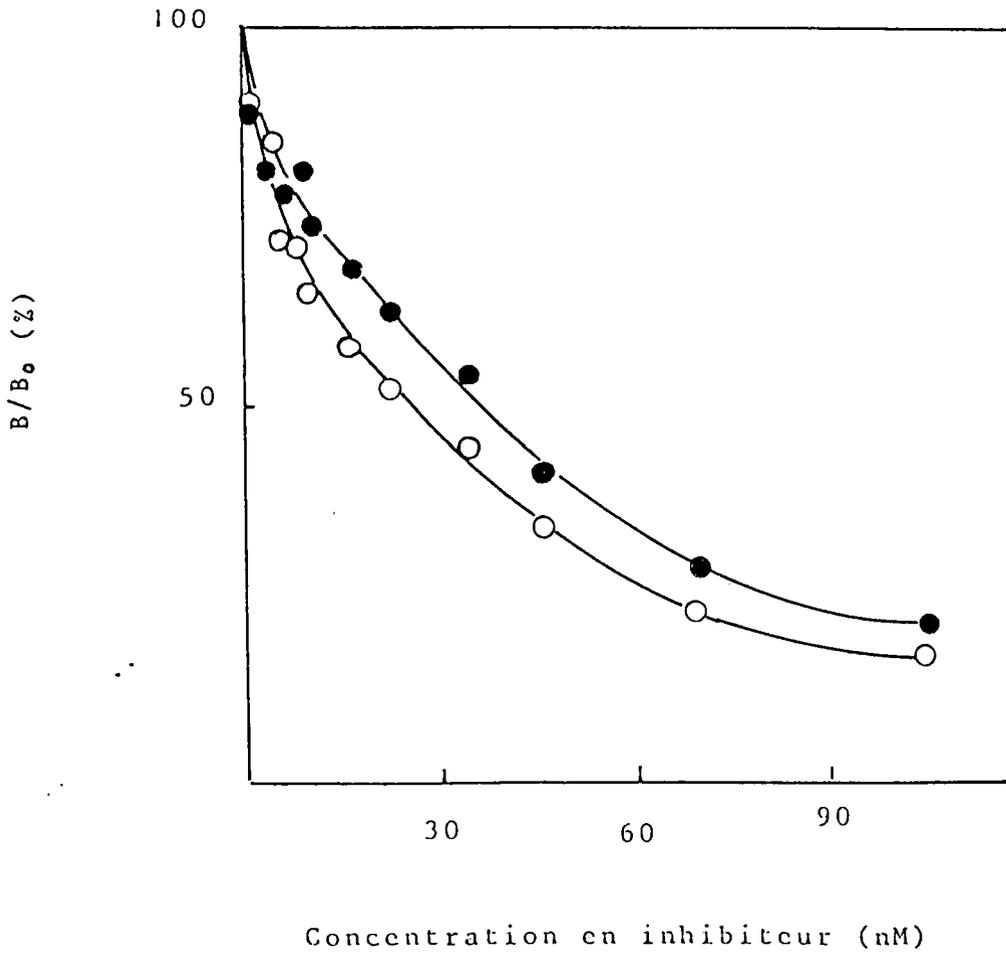


Figure 43 : Inhibition compétitive de la fixation de la sérotransferrine de Lapin native (marquée à l'iode - 125) sur des anticorps adsorbés par la sérotransferrine de Lapin native (●) et déglycosylée (○).
(B_0 = quantité fixée dans le témoin sans inhibiteur ;
 B = quantité fixée pour chaque concentration en inhibiteur).

sérotransferrine déglycosylée, et ainsi provoquer l'apparition de déterminant supplémentaire, pour voir une différence par cette technique.

De même, un seul glycanne biantenné n'est pas suffisant pour protéger efficacement la partie protéique de la sérotransferrine de Lapin de la protéolyse, malgré la surface masquée par le glycanne, quand il possède la conformation en oiseau, à moins que la technique utilisée pour suivre la protéolyse ne soit pas assez sensible pour détecter des différences minimales.

Quoi qu'il en soit cette technique permet d'obtenir une sérotransferrine de Lapin déglycosylée, toujours capable de fixer le fer à 100%, et qui va nous permettre de confirmer ou d'infirmer la participation du glycanne dans l'activité biologique de la sérotransferrine, en particulier dans le transfert du fer aux réticulocytes que nous présentons dans la partie suivante.

INTERACTIONS DES SEROTRANSFERRINES HUMAINE
ET DE LAPIN AVEC LES RETICULOCYTES DE LAPIN

Après l'étude comparée des caractéristiques de la protéine des sites de fixation du fer et des glycanes de la sérotransferrine humaine et de Lapin, nous avons étudié les interactions de ces deux transferrines avec les récepteurs des réticulocytes de Lapin

I. Fixation des sérotransferrines humaine et de Lapin non modifiées et transfert du fer aux réticulocytes de Lapin

A. Cinétique d'incorporation du fer

Les cinétiques d'incorporation du fer par les réticulocytes de Lapin montrent que, dans les conditions de concentration utilisées l'incorporation du fer de la sérotransferrine de Lapin est rapide et linéaire pendant 20 min, puis ralentit et présente un plateau à partir d'une heure. Dans les mêmes conditions, l'incorporation du fer de la sérotransferrine humaine est beaucoup plus lente et le plateau n'est atteint que pour des temps supérieurs à 100 min. Après 20 min, l'incorporation du fer de la sérotransferrine humaine ne représente que 55 % de celui de la sérotransferrine de Lapin, après 30 min 62 %, après 60 min 75 % et après 80 min 80 % (Fig. 44, p.113).

B. Paramètres de la fixation des sérotransferrines sur les réticulocytes de Lapin: constante d'association, nombre de sites récepteurs par cellule

A 4°C l'endocytose est bloquée et le nombre de sites récepteurs mesuré correspond aux récepteurs situés à la surface de la cellule, tandis qu'à 37°C, il y a un recyclage permanent des récepteurs et le nombre de sites mesuré à l'équilibre de fixation au bout d'une heure correspond au nombre de sites totaux.

A 4°C les deux sérotransferrines se fixent sur les réticulocytes de Lapin en fonction de la concentration en transferrine de manière saturable et complète en moins d'une heure. L'analyse de la représentation de Scatchard (1959) montrée dans la Fig.45 p.114, déduite des courbes de saturation, indique que la différence entre les sérotransferrines humaine et de Lapin n'est pas due à la constante apparente d'association, respectivement $K_a = 2,04 \times 10^7 \text{ l.M}^{-1}$ ($\pm 0,3 \times 10^7$, moyenne de 6 expériences) et $K_a = 2,61 \times 10^7 \text{ l.M}^{-1}$ ($\pm 0,3 \times 10^7$, moyenne de 6 expériences), mais dans le nombre de sites récepteurs de surface par cellule. Ce nombre de sites est 3,5 fois plus faible en système hétérologue en utilisant la sérotransferrine humaine soit 16.000 ± 2.500 qu'en système homologue, 54.000 ± 6.000 .

L'analyse de cette représentation montre aussi qu'il n'existe qu'une seule classe de sites de haute affinité. A 37°C, la fixation des deux sérotransferrines est rapide (courbes non représentées) et les constantes d'association ne sont pas modifiées, le nombre total de récepteurs est augmenté d'un facteur 2,5: 37.000 pour la transferrine humaine et 130.000 pour la transferrine de Lapin.

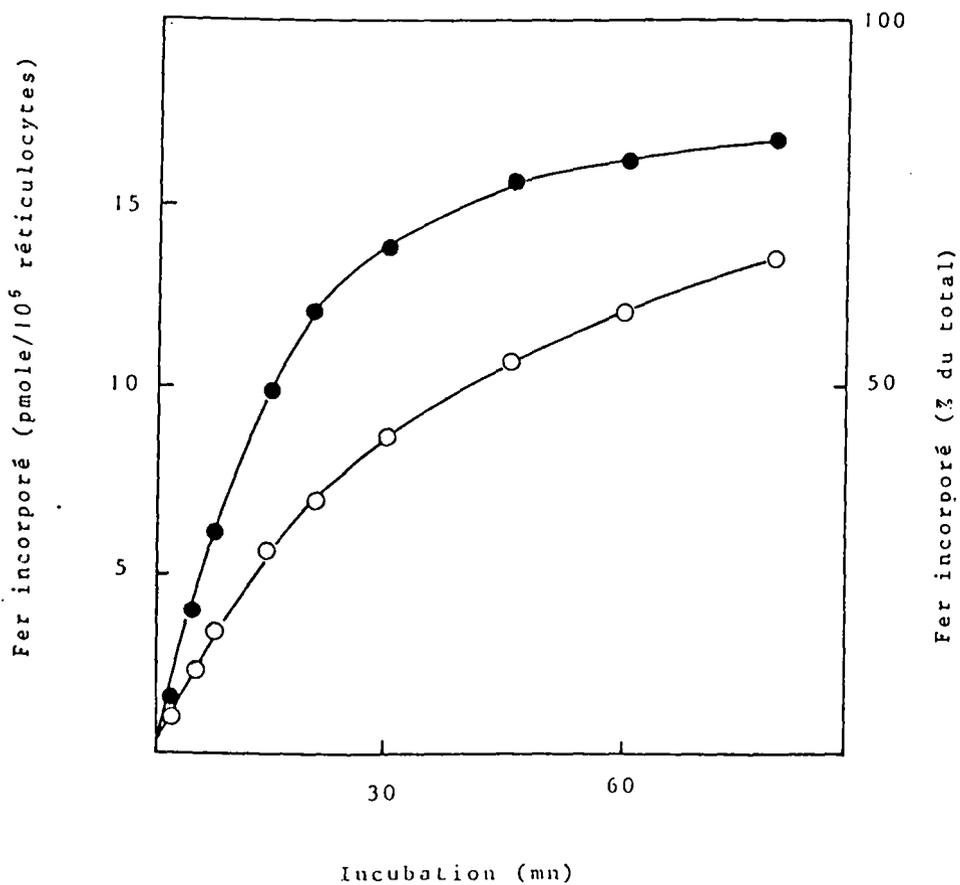


Figure 44 : Cinétique d'incorporation du fer des sérotransferrines humaine (○) et de Lapin (●) marquées au Fer-59, (1,8mM) par les réticulocytes de Lapin (2×10^8 réticulocytes/ml) à 37°C.

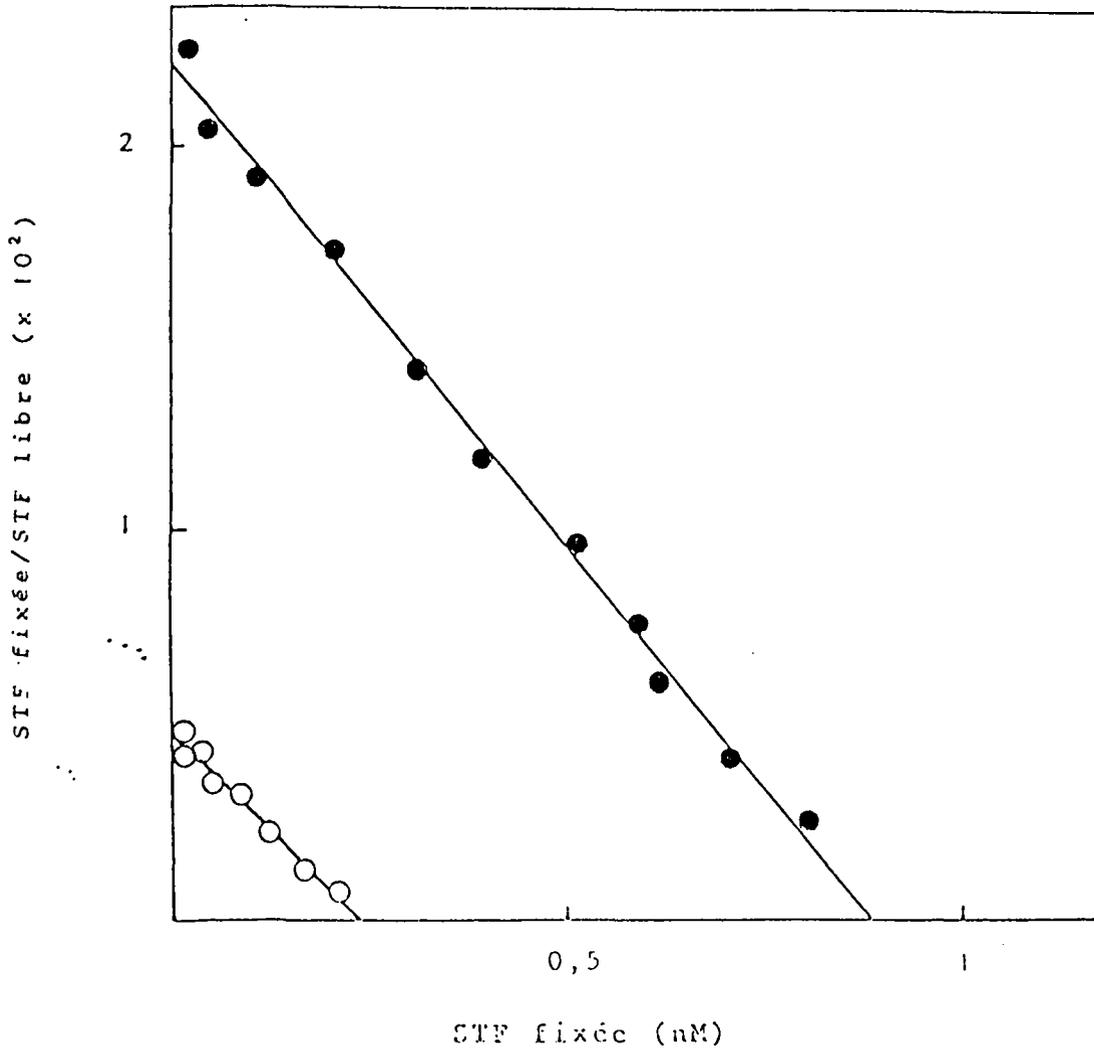


Figure 45 : Représentation de Scatchard (1959) de la fixation, à 4°C, des sérotransferrines humaine (O) et de Lapin (●) saturées en fer, et marquées à l'iode-125, à des concentrations finales variant 5nM à 5mM, sur des réticulocytes de Lapin pendant 1 h. (5.10⁶ réticulocytes/ml). STF=sérotransferrine

C. Discussion

La grande disparité dans le nombre de récepteurs entre les systèmes homologue et hétérologue avec les réticulocytes de Lapin avait déjà été suggérée par Lane (1972) qui trouvait deux fois moins de fixation pour la sérotransferrine humaine. De même Baker et Morgan (1969) trouvaient 5 à 600.000 sites dans le système homologue et Kornfeld (1968) 30.000 dans le système hétérologue.

Les valeurs que nous trouvons pour le système réticulocyte de Lapin-sérotransferrine de Lapin sont en accord avec les valeurs les plus récentes de la littérature, résumées dans la revue générale de Brock (1985) de l'ordre 100.000 à 150.000 sites totaux et une constante d'association de l'ordre de 10^7 M^{-1} . Les valeurs de K_a , de l'ordre de 10^6 M^{-1} citées par Kornfeld (1969) et Baker et Morgan (1969) étant caractéristiques d'une fixation non spécifique, ou de sites de faible affinité.

La différence de vitesse d'incorporation du fer des deux sérotransferrines par les réticulocytes de Lapin, déjà citée Jandl et Katz (1963), semble donc être due, non à une différence d'affinité des réticulocytes, mais à un nombre de sites récepteurs beaucoup plus faible pour la sérotransferrine humaine que pour la sérotransferrine de Lapin.

La principale différence que nous avons trouvée entre les deux sérotransferrines consistant dans le nombre de glycanes, nous pouvions donc penser que la reconnaissance du récepteur se faisait par la partie glycanique ou au voisinage du point d'attache du glycanne, la présence du deuxième glycanne de la sérotransferrine pouvant masquer la partie reconnue par le récepteur.

II. Influence du degré de saturation en fer sur le transfert du fer aux réticulocytes de Lapin

L'hypothèse de Fletcher et Huehns sur l'hétérogénéité fonctionnelle des deux sites de fixation du fer des sérotransferrines étant très controversée (voir les généralités) nous avons étudié les vitesses d'incorporation du fer par les réticulocytes de Lapin des sérotransferrines possédant un seul atome de fer sur le site C-terminal préparées, soit par désaturation en présence de chélateur soit par modification des résidus d'histidine du site N-terminal par le diéthyl-pyrocabonate.

Nous avons utilisé des sérotransferrines marquées au Fer-59 et saturées à 100 % dans les conditions normales, des sérotransferrines marquées au Fer-59 et désaturées à 50 % selon les conditions décrites p.82 et des sérotransferrines modifiées par le diéthyl-pyrocabonate 12 mM de manière à détruire le site N-terminal et resaturées à 50 % par du Fer-59. (p.95).

Les résultats sont exposés dans la Fig.46 p.116. Nous retrouvons la différence de vitesse d'incorporation entre les deux sérotransferrines. Pour chaque sérotransferrine il n'est pas possible de différencier de manière significative l'incorporation du fer entre les formes monoferriques et diferriques non traitées par le diéthyl-pyrocabonate.

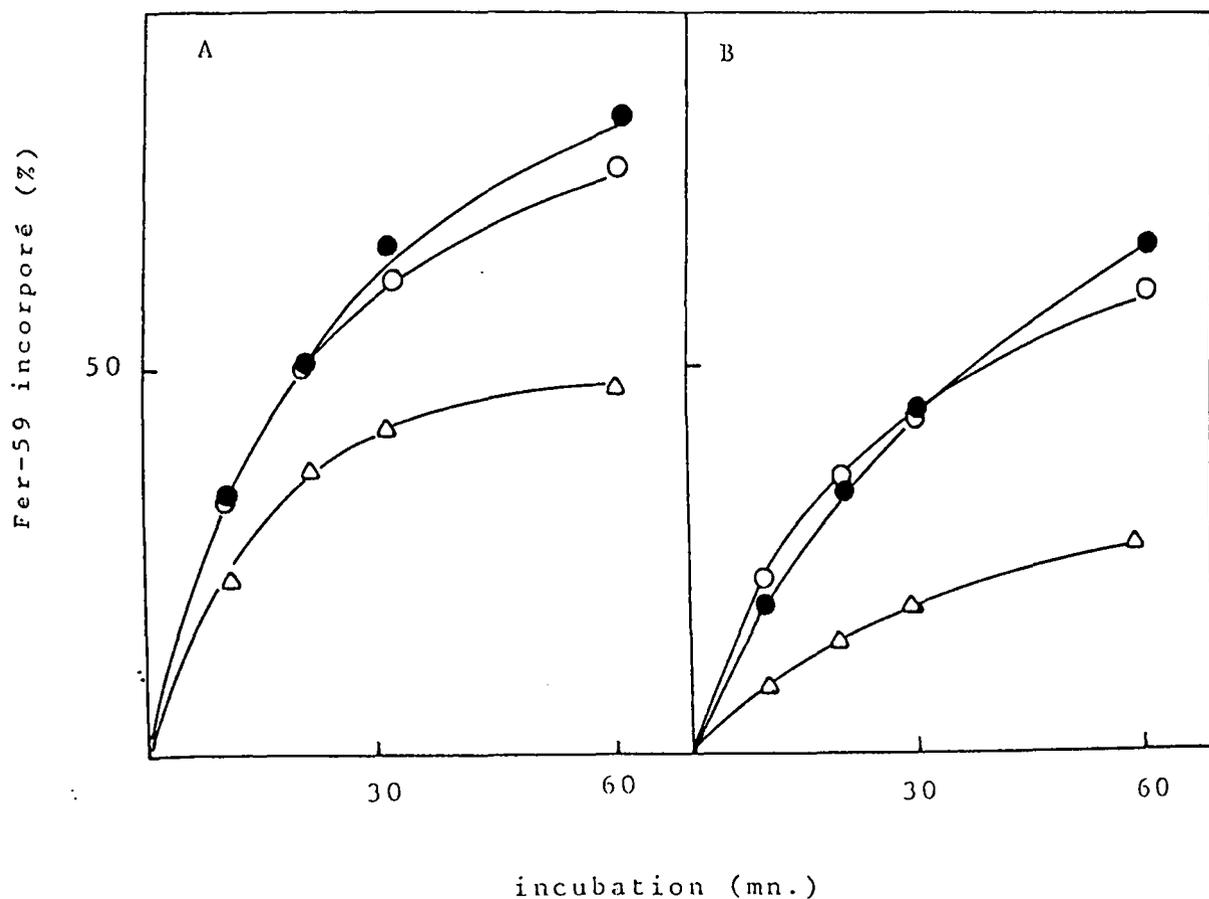


Figure 46 : Cinétique d'incorporation, par les réticulocytes de Lapin, du fer des sérotransferrines d'Homme (B) et de Lapin (A) saturées à 100 % (●), désaturées à 50 % (○), et modifiées par le diéthyl pyrocarbonate 12mM puis resaturées à 50 % (△)

Par contre, les formes traitées par le diéthyl-pyrocarbonate 12 mM et resaturées à 50 % incorporent deux fois moins leur fer que les formes non modifiées.

III. Influence des modifications de la chaîne peptidique sur l'incorporation du fer par les réticulocytes.

1. Modification des résidus d'histidine

La diminution de moitié de l'incorporation du fer des transferrines modifiées par le diéthyl-pyrocarbonate, pouvant être due à une modification de la conformation de la protéine nous avons refait la cinétique d'incorporation du fer à l'aide de sérotransferrine de Lapin saturée à 100 % en fer puis traitée par le diéthyl-pyrocarbonate 20 mM pendant des temps variant de 1 à 50 min.

Les résultats, rassemblés dans la Fig.47 p.118, montrent que l'inhibition de l'incorporation du fer par les réticulocytes est fonction du nombre de résidus d'histidine modifiés. Dès le quatrième résidu d'histidine modifié nous constatons une inhibition de 50 %, cette inhibition est presque totale pour 13 résidus d'histidine modifiés.

Ces résultats tendent à prouver que la diminution de 50 % de l'incorporation du fer, n'est pas due à la destruction du site N-terminal mais plutôt à la modification de résidus d'histidine qui entraînent une modification de la conformation de la protéine et diminue l'interaction de la sérotransferrine avec son récepteur

2. Incorporation du fer par les fragments obtenus après hydrolyse chymotrypsique ménagée

Nous venons de voir que la modification des résidus d'histidine, bien que détruisant le site N-terminal, ne permettait pas de préciser la fonction du site C-terminal de fixation du fer. Nous avons donc réalisé des cinétiques d'incorporation du fer par les fragments obtenus après hydrolyse chymotrypsique de sérotransferrine de Lapin monoferrique marquée au Fer-59 et isolés selon les conditions décrites p.71

La Fig. 48, p.119 montre que le domaine C-terminal de 31kDa incorpore mal son fer aux réticulocytes, le fragment de 70kDa ayant perdu sa partie N-terminale mais possédant encore les deux domaines n'incorpore que la moitié du fer par rapport à la sérotransferrine native. Ces résultats tendent à prouver que l'intégrité de la molécule de transferrine entière est indispensable à l'interaction avec le réticulocyte.

IV. Influence de la partie glycanique de la sérotransferrine de Lapin dans l'interaction avec les réticulocytes

A. Inhibition du transfert du fer aux réticulocytes par des glycopeptides et des oligosaccharides

Si la reconnaissance de la sérotransferrine par son récepteur se fait par un mécanisme similaire à celui des lectines, le transfert du fer de la sérotransferrine dans le réticulocyte pourrait

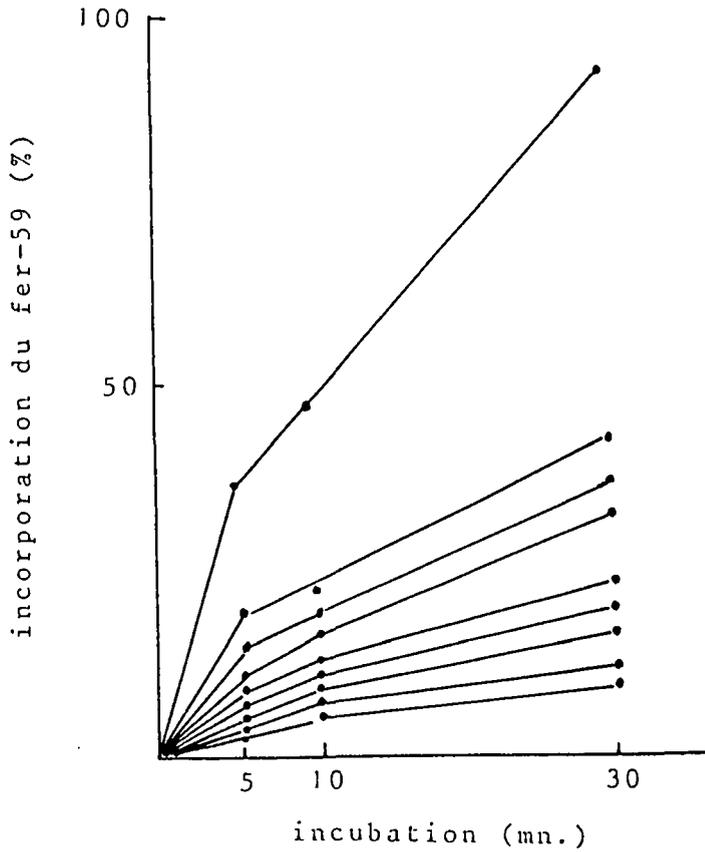


Figure 47-A : Cinétique d'Incorporation du fer 59 par les réticulocytes de Lapin (exprimée en % de la radioactivité incubée en fonction du temps d'incubation) à partir de sérotransferrine de Lapin saturée à 100 % en fer puis carbéthoxylée par du DEP 20mM pendant des temps variant de : (1) témoin, (2) 1' ; (3) 2' ; (4) 3' (5) 5' ; (6) 7,5' ; (7) 10' ; (8) 20' ; (9) 50'

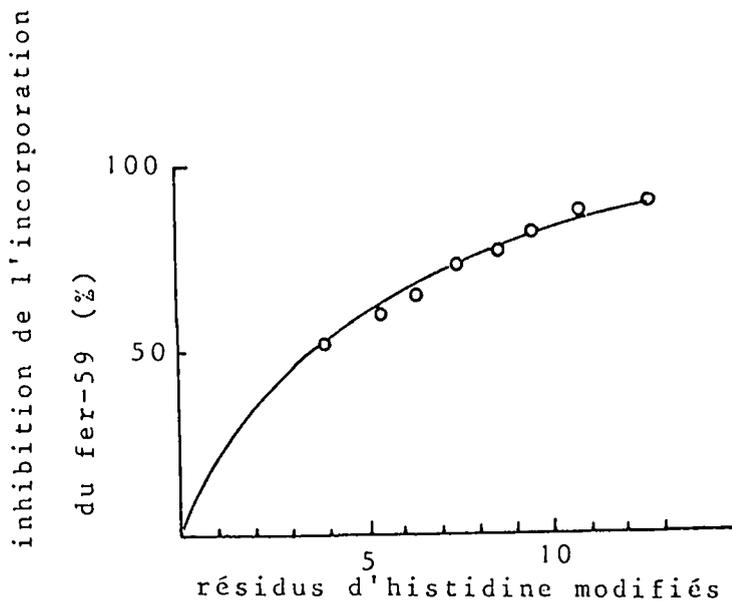


Figure 47-B : Inhibition de l'incorporation du Fer 59 par les réticulocytes de Lapin en fonction du nombre de résidus histidines carbéthoxylés

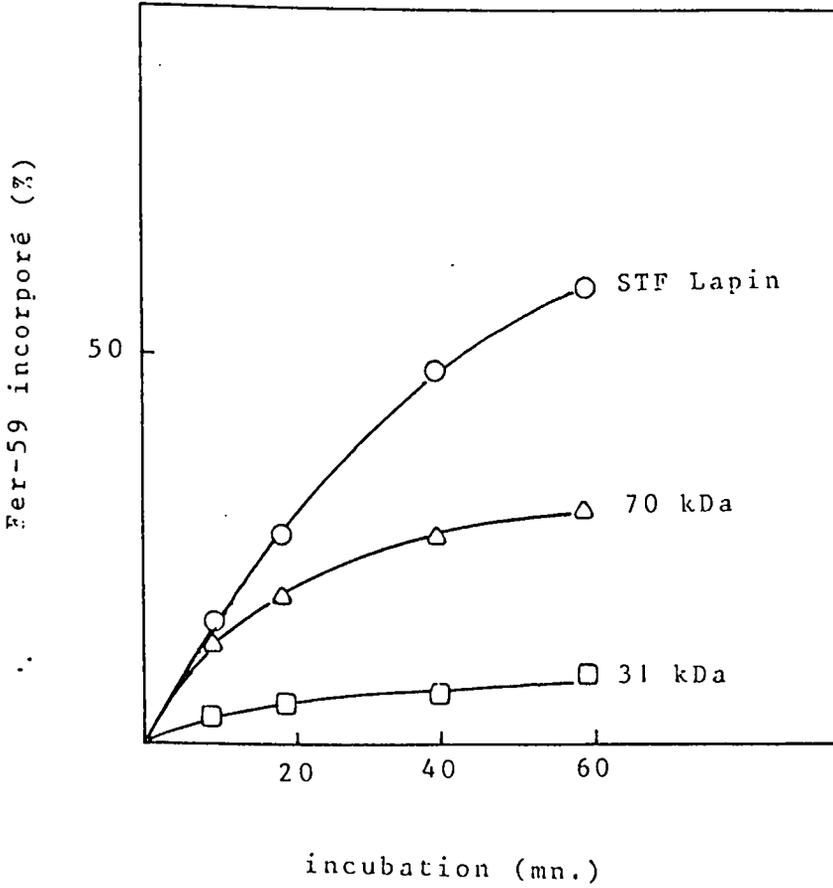


Figure 48 : Cinétique d'incorporation du fer par les réticulocytes de Lapin, de la sérotransferrine et des fragments de 70kD et 31kD obtenus par hydrolyse chymotrypsique.

avoir lieu grâce à un mécanisme d'interaction spécifique, la cellule reconnaîtrait une séquence particulière ou un monosaccharide précis dans le glycanne de la sérotransferrine.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons tenté d'inhiber le transfert du fer aux réticulocytes par l'emploi à différentes concentrations, de toute une panoplie de glycopeptides, d'oligosaccharides et de monosaccharides représentant tout ou partie du glycanne de la sérotransferrine, ainsi que des glycopeptides de structures différentes.

Les courbes d'inhibition de l'incorporation du fer de la sérotransferrine de Lapin par les cellules en présence de concentrations croissantes en glycopeptides ou oligosaccharides sont données dans la Fig.49 p.121. Les résultats sont exprimés en taux d'incorporation du fer dans les cellules par rapport à un témoin sans inhibiteur. Seules les courbes les plus significatives sont représentées. Le tableau XIII p.122 rassemble les structures des inhibiteurs utilisés et les concentrations nécessaires à l'obtention de 50 % de l'inhibition de l'incorporation du fer ([I]50).

1. Utilisation des inhibiteurs natifs

Tous les oligosaccharides et glycopeptides ont été repurifiés par chromatographie sur Biogel P-2, les dérivés sialylés sont neutralisés par la soude avant incubation avec les cellules.

Nous constatons que les monosaccharides et les oligosaccharides non sialylés nécessitent des concentrations très élevées pour obtenir 50 % d'inhibition, respectivement 100 et 65mM.

Les dérivés sialylés inhibent sensiblement tous à des concentrations voisines, 2,5 à 3,5 mM, quelle que soit leur structure, y compris le glycopeptide isolé de l'ovomucoïde, qui ne possède pas d'acide sialique. Morgan et al. (1967) et Kornfeld (1968) ayant constaté que l'asialo-transferrine donnait son fer aux réticulocytes avec la même efficacité que la transferrine native, nous avons repris ces expériences et confirmé ce résultat. L'acide sialique ne semble donc pas être impliqué de manière essentielle dans le mécanisme.

Les concentrations en inhibiteurs utilisées étant relativement importantes, par exemple pour les glycopeptides environ 20 mg par ml d'incubat à 10 mM, nous aurions pu observer non pas une inhibition spécifique, mais un phénomène artéfactuel dû à la présence de contaminants copurifiés avec les sialo-glycopeptides ou les sialo-oligosaccharides.

2. Utilisation des dérivés sialylés neutralisés par la soude puis rechromatographiés sur Biogel P-2

Nous avons neutralisé par la soude le glycopeptide sialylé de la sérotransferrine de Lapin, ainsi que les oligosaccharides sialylés I et II, afin de détruire les liaisons ioniques éventuelles de l'acide sialique avec des ions ou des composés provenant des tampons de chromatographie ou d'électrophorèse sur papier pendant l'isolement. Nous avons ensuite rechromatographié ces produits neutralisés sur Biogel P2.

Nous constatons que les concentrations, nécessaires à l'inhi-

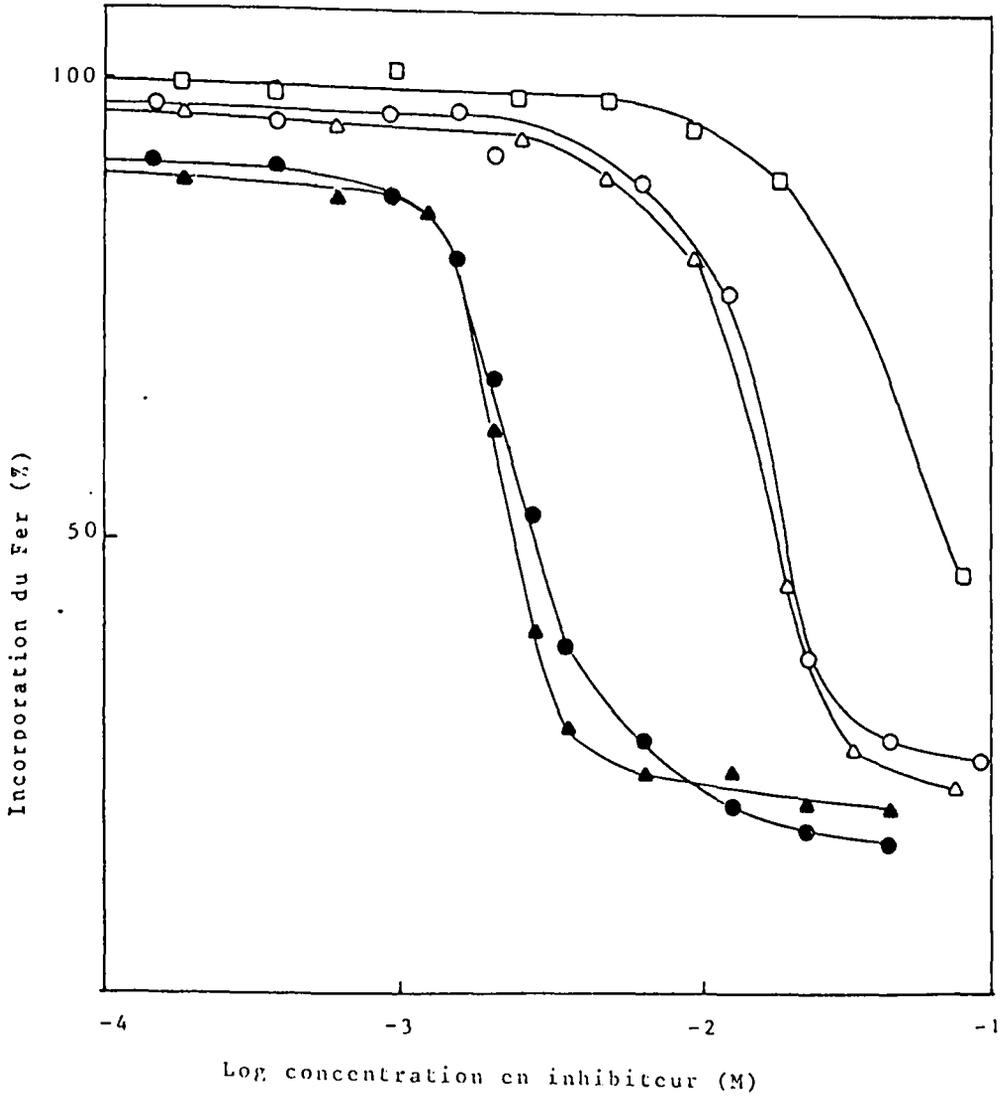


Figure 49 : Inhibition de l'incorporation du fer, de la sérotransferrine de Lapin marquée au Fer-59, aux réticulocytes de Lapin en présence de : sialoglycopeptide de la sérotransferrine (O) ; oligosaccharide I (◊) ; trisaccharide II (◊) . Les symboles pleins représentent les produits natifs et les symboles ouverts, les produits neutralisés par la soude, puis dessalés.

bition de 50 % de l'incorporation du fer, sont environ 7 fois plus importantes qu'avant la repurification, passant de 2,5-3,5 à 17-22 mM. Ces nouvelles valeurs sont à rapprocher de celle observée pour l'asialoglycopeptide de la sérotransferrine de Lapin, 15 mM.

Nous avons vérifié, dans les expériences avec les glycopeptides isolés de la sérotransferrine de Lapin, en utilisant la sérotransferrine doublement marquée, que la radioactivité I-125 associée aux cellules reste constante quelle que soit la concentration en inhibiteur. Ceci tend à prouver que l'inhibition du transfert du fer n'est pas due à une diminution de la fixation de la sérotransferrine sur le récepteur.

3. Discussion

Il semble donc bien que les inhibitions importantes observées à des concentrations de l'ordre de 2,5 à 3,5mM pour les sialyl dérivés soient dues à la présence de contaminants copurifiés avec les produits sous forme de liaison ionique avec l'acide sialique, soit la pyridine des tampons de chromatographie et d'électrophorèse sur papier soit d'autres sels.

Quoi qu'il en soit il reste une inhibition de 50 % pour des concentrations de l'ordre de 15 à 20 mM. Ces concentrations sont élevées, et représentent 4 à 5.000 molaire excès par rapport à la transferrine du milieu, mais sont du même ordre de grandeur que celui observé dans des études de spécificité de reconnaissance de glucides par des récepteurs cellulaires. Par exemple, Kawasaki et al. (1978) ont caractérisé la spécificité d'un récepteur à mannose en employant des inhibiteurs de tailles différentes à des concentrations similaires aux nôtres, d'autres auteurs allant jusqu'à 10 molaire excès.

Nos expériences d'inhibition du transfert du fer ne permettent pas de conclure à la participation directe et exclusive du glycanne de la sérotransferrine de Lapin dans l'interaction avec les réticulocytes de Lapin. Le glycanne ne semble pas intervenir dans le mécanisme de reconnaissance du récepteur, mais plutôt dans le processus de transfert du métal. A moins que les sialo-dérivés, utilisés à concentration élevée agissent comme chélateurs du fer de la sérotransferrine et empêchent le processus de transfert normal. Un seul moyen restait pour répondre à la question du rôle du glycanne dans l'interaction: l'éliminer par des méthodes douces sans modifier l'intégrité de la partie protéique.

B. Interaction de la sérotransferrine de Lapin déglycosylée avec les réticulocytes de Lapin

Nous avons décrit à la p.103 la préparation de la sérotransferrine de Lapin déglycosylée par une endo β -D-N-acétyl glucosaminidase. Utilisant cette transferrine déglycosylée nous avons réalisé les expériences comparatives de fixation et d'incorporation du fer aux réticulocytes de Lapin.

1. Paramètres de la fixation des sérotransférines de Lapin, native et déglycosylée aux réticulocytes de Lapin

La représentation de Scatchard des courbes de fixation à 4°C est représentée dans la Fig.50 p.124. Il n'y a pas de différence

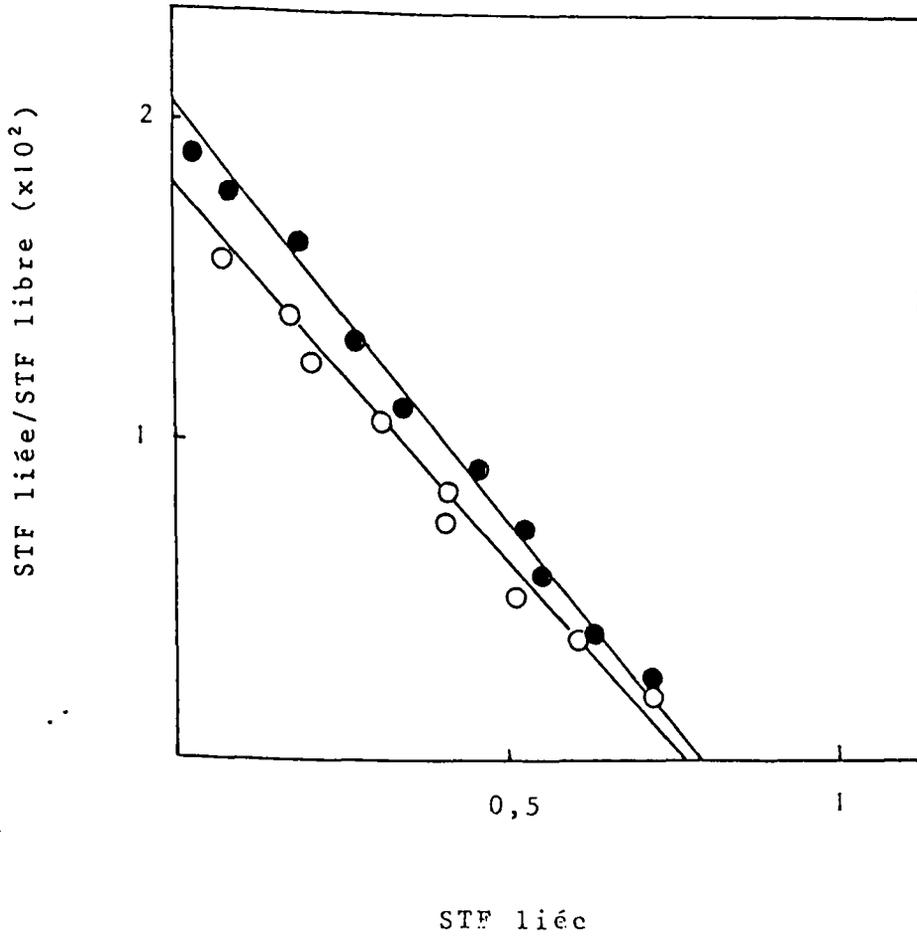


Figure 50 : Représentation de Scatchard des courbes de fixation à 4°C aux réticulocytes de Lapin de la sérotransferrine de Lapin native (●) et déglycosylée (○)

significative entre la forme native et déglycosylée, ni dans la constante apparente d'association K_a , respectivement $2,6 \times 10^7 M^{-1}$ et $2,4 \times 10^7 M^{-1}$, ni dans le nombre de récepteurs exprimés à la surface des réticulocytes: 54.000 et 52.000 respectivement. Aucune différence supplémentaire n'est constatée à 37°C entre les deux formes de la sérotransferrine.

Ces résultats démontrent clairement que la reconnaissance de la sérotransferrine par le récepteur membranaire du réticulocyte ne se fait pas par l'intermédiaire de la partie glycanique de la transferrine.

2. Incorporation du fer de la sérotransferrine déglycosylée, par les réticulocytes de Lapin

Les cinétiques d'incorporation du fer représentées dans la Fig 51 p. 126, montrent que la forme déglycosylée est capable de transférer son fer à la même vitesse que la forme native, sans différence significative. Après hémolyse des cellules lavées, le fer radioactif est essentiellement retrouvé dans le pic d'hémoglobine après tamisage moléculaire sur Ultrogel AcA-44.

Ces résultats suggèrent que le glycanne n'est impliqué ni dans le mécanisme d'internalisation, ni dans le départ intracellulaire du fer de la sérotransferrine.

V -INFLUENCE DE LA PARTIE GLYCANNIQUE DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE DANS L'INTERACTION AVEC LES RETICULOCYTES DE LAPIN

Nous avons démontré dans le paragraphe précédent que la partie glycanique de la sérotransferrine de Lapin n'avait aucun rôle dans le mécanisme de reconnaissance par le récepteur des réticulocytes. Cependant la sérotransferrine humaine possédant un deuxième glycanne se fixe beaucoup moins bien. Nous avons observé l'influence de la structure bi ou triantennée des glycanes de la sérotransferrine sur les paramètres de la fixation aux réticulocytes de Lapin, les résultats sont représentés dans la Fig.52 (p.128).

1. Paramètres de la fixation sur les réticulocytes

Les paramètres, déduits des courbes de fixation à 4°C, représentant les constantes d'association et le nombre de sites accessibles à la surface des réticulocytes de Lapin sont rassemblés dans le tableau XIV, p.127. Nous constatons que les trois variants se fixent sur le même nombre de sites de haute affinité: 17.000 - 20.000, mais que l'affinité pour ces sites décroît d'un facteur 2 quand le nombre de structures triantennées augmente. Il est à remarquer que le variant de type I (Tf-I), contenant deux glycanes biantennés présente une constante d'association très proche de celle de la sérotransferrine de Lapin $2,65 \cdot 10^7 M^{-1}$ qui ne possède qu'un seul glycanne biantenné.

2. Incorporation du fer par les réticulocytes

La Fig.52-B (p.128) montre que les trois variants glycaniques de la sérotransferrine humaine incorporent leur fer aux réticulocytes de Lapin de manière strictement identique.

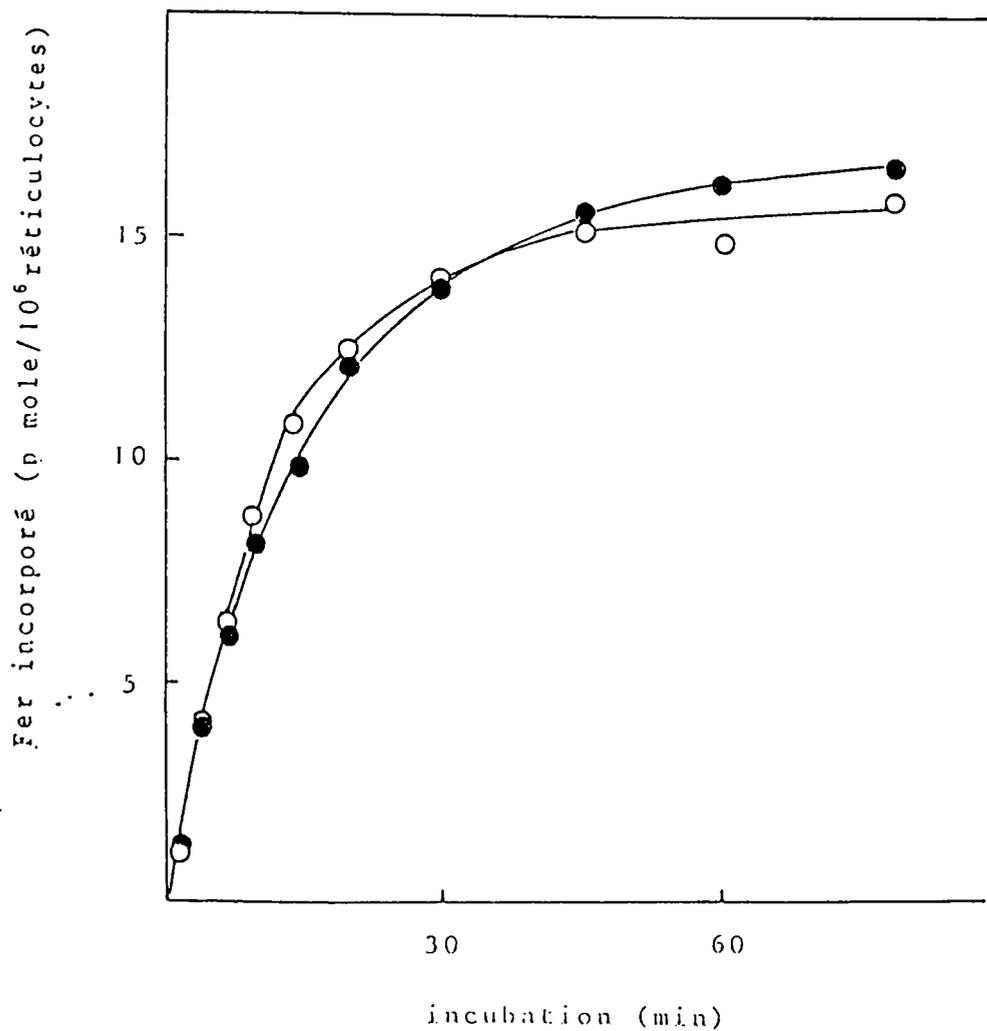


Figure 51 : Cinétique d'incorporation du fer de la sérotransferrine de Lapin native (●) et déglycosylée (○), marquées au fer-59, par les réticulocytes de Lapin, à 37°C

TABLEAU XIV

Paramètres de la fixation des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine sur les réticulocytes de Lapin (4°C)

type de sérotransferrine	n	Ka (l x M ⁻¹)	sites/cellule
<u>Sérotransferrine</u>			
<u>Homme</u>			
Variant I	2	0,76.10 ⁷	17.500
Variant II	4	1,4 .10 ⁷	18.900
Variant III	4	2,65.10 ⁷	19.000
non fractionnée	6	2,04.10 ⁷	19.000

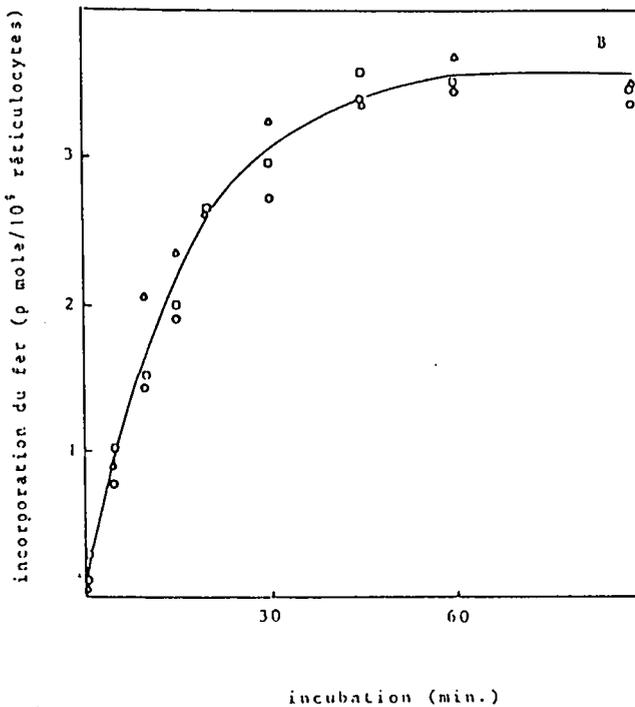
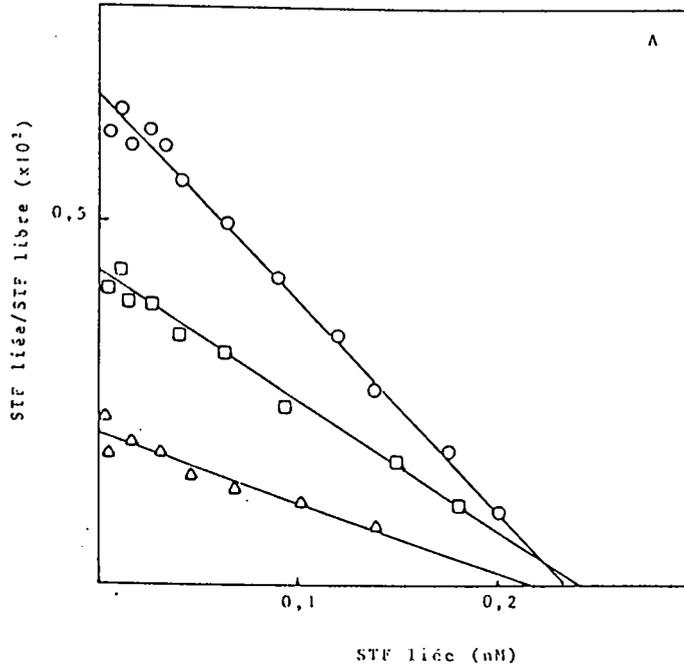


Figure 52 : Interaction des variants glycosylés de la séro-transferrine humaine avec les réticulocytes de Lapin.
A - Représentation de Scatchard de la fixation, à 4°C, des variants de type I (Δ) ; de type II (\square) et de type III (\circ). Les cellules ($5 \cdot 10^6$ réticulocytes) sont incubées 1 h à 4°C avec les différents variants marqués à l'iode-125 à des concentrations variant entre 5nM et 5uM
B - Cinétiques d'incorporation du fer, des variants glycosylés marqués au fer-59 par les réticulocytes de Lapin à 37°C. Les cellules ($2 \cdot 10^8$ réticulocytes/ml) sont incubées pendant différents temps à 37°C avec 0,6uM de (Δ) type I ; (\square) type II et (\circ) type III.

3. Discussion

Ces résultats confirment que la partie glycanique de la sérotransferrine n'est pas impliquée directement dans la fixation de la glycoprotéine sur son récepteur, ni dans le mécanisme du transfert du fer à l'intérieur des réticulocytes.

VI. CONCLUSION ET DISCUSSION

Nous avons démontré que la différence d'incorporation du fer, par les réticulocytes de Lapin, des sérotransferrines humaine et de Lapin pouvait s'expliquer par une fixation de la sérotransferrine humaine sur un plus petit nombre de sites récepteurs.

Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de différence d'incorporation du fer entre les formes mono et diférique de la sérotransferrine par les réticulocytes de Lapin, ne trouvant pas les résultats de Princiotta et Zepolski (1976 a) en système hétérologue sérotransferrine humaine-réticulocytes de Lapin. De nombreux auteurs par la suite, n'ont pu mettre en évidence de différence entre la capacité des deux sites de la transferrine à donner le fer aux réticulocytes en système homologue chez l'Homme et le Lapin (Harris et Aisen, 1975 b ; Harris, 1977) ou hétérologue sérotransferrine bovine-réticulocytes de Lapin (Esparza et Brock, 1980).

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences fonctionnelles, vis à vis des réticulocytes entre les deux sites de fixation du fer des deux sérotransferrines, bien que nous ayons trouvé une différence de comportement à la protonation. Ce résultat est en désaccord avec l'hypothèse de Fletcher et Huehns (1967, 1968). Par contre nous avons montré que l'intégralité de la chaîne peptidique était indispensable à l'interaction avec le récepteur.

La faible capacité du fragment monoférique C-terminal de 31 kDa à céder son fer aux réticulocytes comparativement au fragment de 70 kDa est retrouvée par de nombreux auteurs en utilisant des fragments monofériques de sérotransferrine bovine (Brock et al., 1978; Esparza et Brock, 1980) ou d'ovotransferrine (Brown-Masson et Woodworth, 1984). Il semblerait que ce phénomène ne soit pas dû à la coupure de la partie se fixant au récepteur mais plutôt à la présence nécessaire des deux domaines de la protéine (Brock, 1985).

L'utilisation de sérotransferrine monoférique sur le site C-terminal et possédant le site N-terminal bloqué n'a pu donner de résultat concluant en raison même de la nature du blocage, la diminution de l'incorporation du fer étant proportionnelle au nombre de résidus d'histidines modifiées. Ces résultats confirment l'importance de la partie protéique dans l'interaction avec le récepteur.

Enfin, nous avons apporté la preuve directe de la non participation de la partie glycanique de la sérotransferrine dans la reconnaissance par le récepteur des réticulocytes, par la déglycosylation totale à l'exception d'un résidu de N-acétylglucosamine de la sérotransferrine de Lapin.

Kornfeld en 1968 avait déjà suggéré la non participation de la partie glycanique de la sérotransferrine dans le transfert du fer aux réticulocytes. Cependant, il s'agissait d'un système hétérologue sérotransferrine humaine-réticulocytes de Lapin, et la concentration en glycopeptide inhibiteur utilisée ne dépassait pas 140 molaire excès. Nous avons vu qu'une inhibition était constatée dans nos travaux à des concentrations 10 fois supérieures. Kornfeld avait poussé plus loin la démonstration, en traitant par un mélange d'exoglycosidases de Fève Jack la sérotransferrine humaine, il éliminait 47 % des sucres totaux et montrait que l'incorporation du fer aux réticulocytes se faisait encore. Dans une autre expérience, l'élimination de 30 % des sucres diminuait de 30 % l'incorporation du fer radioactif dans l'hème. Ces premiers résultats n'étaient pas suffisamment démonstratifs pour éliminer totalement la participation de la partie glycanique de la sérotransferrine dans l'interaction avec les réticulocytes.

Ainsi, nous arrivons à la conclusion que la différence de comportement des deux sérotransferrines pour le récepteur ne peut s'expliquer que, soit par des différences dans les séquences primaires peptidiques, qui entraînent des différences de conformation de la partie protéique reconnaissant le récepteur, soit à la présence du deuxième glycanne dans la sérotransferrine, qui par son encombrement stérique, et sa mobilité, masquerait dans certains cas la partie reconnue par le récepteur. Cette deuxième hypothèse est étayée par les différences d'affinités constatées avec les variants glycaniques de la sérotransferrine humaine, le variant possédant deux glycannes triantennés possède environ 4 fois moins d'affinité pour les récepteurs que celui qui possède deux glycannes triantennés.

Si nous n'avons pas pu résoudre le problème de la différence d'affinité pour les sérotransferrines des deux espèces animales la preuve est faite de l'importance de l'utilisation d'un système homologue pour des travaux portant sur les interactions des protéines avec leur récepteur.

CONCLUSIONS GENERALES

CONCLUSIONS GENERALES

Dans notre étude sur les relations structure-fonction biologique de la sérotransferrine, nous avons été amenés à isoler la sérotransferrine de Lapin afin de travailler en système homologue avec les cellules cibles que nous avons choisies : les réticulocytes de Lapin.

Afin d'expliquer l'affinité différente de ces cellules pour la sérotransferrine humaine et la sérotransferrine de Lapin nous avons entrepris l'étude de la structure et de la conformation de la partie peptidique, de la partie glycanique et des sites de fixation du fer de la sérotransferrine de Lapin. Nous avons comparé les résultats obtenus avec ceux de la littérature pour la sérotransferrine humaine.

Dans le but de définir le rôle de la partie glucidique, de la partie protéique et des sites de fixation du fer dans l'activité biologique, nous avons étudié l'interaction de chacun des produits que nous avons isolé avec les réticulocytes de Lapin.

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

1- La méthode de purification que nous avons utilisée nous a permis d'isoler la sérotransferrine de Lapin débarrassée de son principal contaminant : l'hémopexine. La sérotransferrine ainsi préparée est dépourvue de fer sans utilisation d'autre chélateur que le citrate du tampon de chromatographie.

2- Les résultats partiels que nous avons obtenus sur la partie protéique montrent que la sérotransferrine de Lapin ne diffère pas des autres sérotransferrines : ni au niveau de la masse moléculaire, ni au niveau de la séquence N-terminale, ni au niveau de la composition en acides aminés.

Les études de dichroïsme circulaire ne font pas apparaître de différences avec la sérotransferrine humaine.

L'hydrolyse ménagée de la sérotransferrine de Lapin saturée sur le site C-terminal nous a permis d'isoler le lobe C-terminal et de localiser le glycanne sur ce lobe, comme dans la sérotransferrine humaine et la sérotransferrine de Boeuf.

La séquence peptidique au point d'attache du glycanne, les masses moléculaires des domaines isolés, ainsi que leur comportement électrophorétique font apparaître plus d'homologies avec la sérotransferrine bovine qu'avec la sérotransferrine humaine.

3- Les études des sites de fixation du fer, par modification chimique des histidines, nous ont montré que la sérotransferrine humaine et la sérotransferrine de Lapin possèdent un site accessible au réactif: le site N-terminal. Le site enfoui (C-terminal) est accessible uniquement après dénaturation par l'urée. Dans les deux sérotransferrines deux résidus d'histidine sont essentiels dans chaque site de fixation du fer, ce qui est en accord avec le nombre d'histidines communément admis dans la fixation du fer.

La sérotransferrine de Lapin se comporte différemment de la sérotransferrine humaine vis à vis de la protonation : il n'a pas été possible de mettre en évidence un site acido-labile et un site acido-stable comme dans la sérotransferrine humaine. Les deux sites de la sérotransferrine de Lapin se comportent comme le site acido stable de la sérotransferrine humaine.

L'utilisation simultanée d'ions phosphates et d'EDTA nous a permis de préparer à pH 7,8 une sérotransferrine de Lapin monoferrique sur le site C-terminal, stable à ce pH.

4- L'étude de la partie glucidique nous a montré que la principale différence entre les deux sérotransferrines réside dans le nombre de glycanes : un chez le Lapin contre deux chez l'Homme. La structure du glycanne est identique à celle des glycanes bi-antennés de la sérotransferrine humaine.

Nous avons mis en évidence l'existence d'un variant glycanique de la sérotransferrine de Lapin dont le comportement vis à vis de la Con A et dont les compositions en monosaccharides et en dérivés méthylés font penser à l'existence d'un variant triantenné comme dans la sérotransferrine humaine. De tels variants n'ont pas encore été déterminés dans les autres sérotransferrines, à l'exception de la sérotransferrine de Poule où il a été soupçonné (Coddeville, 1987).

5- La déglycosylation enzymatique de la sérotransferrine de Lapin par une endo β -D-glucosaminidase nous a permis d'isoler quantitativement (>90%) la sérotransferrine totalement dépourvue de sucres à l'exception du résidu de glucosamine du point d'attache.

L'étude comparée des principales propriétés biochimiques de la sérotransferrine de Lapin déglycosylée et la sérotransferrine native montre peu de différences. La présence d'un seul glycanne ne semble pas être suffisante pour protéger efficacement la partie protéique de la protéolyse, ni pour induire des différences détectables dans l'immunoréactivité.

Les seules différences que nous avons détectées sont une sensibilité plus importante à la thermodénaturation et surtout à la lyophilisation de la forme déglycosylée.

6- Nous avons démontré sans ambiguïté que le glycanne de la sérotransferrine n'intervient pas dans la reconnaissance par le récepteur du réticulocyte, ni dans l'incorporation du fer, en utilisant la sérotransferrine de Lapin déglycosylée.

Les inhibitions que nous avons constatées en utilisant des glycopeptides et des oligosaccharides semblent essentiellement dues aux fortes concentrations utilisées et à la présence d'acide sialique qui pourrait avoir un rôle de chélateur du fer.

7- Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de différences fonctionnelles entre les deux sites de fixation du fer de la sérotransferrine de Lapin vis à vis des réticulocytes de Lapin infirmant ainsi l'hypothèse de Fletcher et Huehns (1967) comme de nombreux autres auteurs.

8- La faible capacité du fragment monoferrique de 31 kDa à donner son fer aux réticulocytes par rapport à la sérotransferrine de Lapin intacte ou au fragment diferrique de 70 kDa montre l'importance de l'intégralité de la partie protéique et la présence nécessaire des deux domaines.

L'importance de la partie protéique est confirmée par l'utilisation de la sérotransferrine de Lapin saturée en fer et traitée par le diéthyl-pyrocarbonate. L'inhibition de l'incorporation du fer est proportionnelle au nombre de résidus d'histidine modifiés

9- La différence d'incorporation du fer des sérotransferrines d'Homme et de Lapin par les réticulocytes de Lapin provient d'un nombre de sites récepteurs trois fois plus faible pour la sérotransferrine humaine, l'affinité étant identique.

La différence de comportement des deux sérotransferrines pour le récepteur ne peut s'expliquer que, soit par des différences dans la séquence peptidique qui entraînent une modification de la partie protéique, soit par la présence d'un deuxième glycanne dans la sérotransferrine humaine qui par son encombrement stérique masquerait partiellement la partie reconnue par le récepteur.

Cette deuxième hypothèse est étayée par les différences d'affinité constatées avec les variants glycaniques de la sérotransferrine humaine: plus le taux de structures triantennées augmente et plus l'affinité pour le récepteur du réticulocyte diminue.

10- Les résultats précédents montrent l'importance de l'utilisation d'un système homologue protéine-cellule de la même espèce. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au placenta humain pour rechercher la présence éventuelle d'un récepteur de nature lectinique pouvant expliquer l'incorporation accrue du fer par le fœtus au cours de la gestation. En effet nous avons constaté que l'augmentation du taux de la sérotransferrine plasmatique pendant la grossesse est liée essentiellement à l'augmentation du taux des variants Tf-I et Tf-II, possédant des glycanes triantennés.

Nous avons donc étudié l'interaction des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine avec les membranes de la bordure en brosse du syncytium trophoblastique humain.

Nous avons montré que la sérotransferrine endogène est couplée au récepteur, par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de détergents non découplant suivie d'une immunorévélation. Les différents variants déplacent la sérotransferrine endogène et se fixent sur un seul type de récepteur, excluant ainsi l'existence d'un autre récepteur de nature lectinique.

La différence d'affinité du récepteur pour les différents variants, déjà constatée avec les réticulocytes, est retrouvée dans le placenta: une diminution d'un facteur 2 en relation avec le nombre de glycanes triantennés. Nous avons aussi retrouvé cette même différence sur d'autres types de cellules: les hépatocytes de Rat et des cellules en culture provenant d'un hépatome humain, les cellules Hep-G2 (expériences non décrites dans ce mémoire). Dans tous les cas le nombre de sites par cellule est voisin, seule l'affinité change.

Après l'analyse de ces résultats, on peut penser que la diminution d'affinité est en relation avec l'encombrement stérique des glycanes triantennés par rapport à celui des glycanes biantennés, soit en raison du masquage partiel de la partie reconnaissant le récepteur, soit par induction de légères modifications de conformation.

La question reste entière de la signification biologique de l'existence de tels variants de la sérotransferrine humaine et de l'augmentation de leur taux dans le plasma pendant la grossesse ou dans certaines affections du foie.

L'augmentation très importante du taux de structures triantennées et même tétraantennées dans les cellules cancéreuses en culture, que nous étudions en ce moment, pourrait suggérer que la présence de ces variants ne serait due qu'à des modifications de la régulation de la glycosylation.

C'est ce que nous allons essayer de voir en étudiant de manière comparée la sérotransferrine sécrétée par les cellules Hep-G2 (hépatome humain) et des hépatocytes humains en culture provenant de donneurs sains ainsi que l'influence de certaines hormones et de certains facteurs de croissance.

BIBLIOGRAPHIE

- AASA, R. et AISEN, P. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 2399-2404 (22, 26, 27)
- AASA, R., MALMSTRÖM, B.G., SALTMAN, P., et VÄNNGÅRD, T. (1963) *Biochim. Biophys. Acta*, 75, 203-222 (26)
- ABOLA, J.E., WOOD, M.K., CHWEH, A., ABRAHAM, D. et PULSINELLI, D.A. (1982) dans "The Biochemistry and Physiology of Iron", SALTMAN, P. and HEGENAUER, J. (eds), Elsevier, North Holland, pp. 27-34. (11)
- AISEN, P., AASA, R., MALMSTROM, B.C. et VANNGARD, T. (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 2484-2490 (25)
- AISEN, P., AASA, R. et REDFIELD, A.G. (1969), *J. Biol. Chem.*, 244, p. 4628. (22)
- AISEN, P. et BROWN, E.B. (1977), *Semin. Hematol.*, 14, 31-53, (32)
- AISEN, P. et LEIBMAN, A. (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, 257, 314-323, (22)
- AISEN, P., LEIBMAN, A. et REICH, H.A. (1966), *J. Biol. Chem.*, 241, 1666, (31, 78)
- AISEN, P., LEIBMAN, A. et ZWEIER, J. (1978), *J. Biol. Chem.*, 253, 1930-1937, (29, 90)
- AISEN, P. et LISTOWSKY, I. (1980), *Ann. Rev. Biochem.*, 49, 357-393 (1, 3)
- AL HILAL, P., BAKER, E., CARLISLE, C.H., GORINSKI, B., HORSBURG, R.L. LINDLEY, P.F., MOSS, D.S., SCHNEIDER, H., et STIMPSON, R., (1976), *J. Mol. Biol.*, 108, 255-257, (11)
- ASHTON, G.G. (1958) *Nature*, 182, 370, (10)
- AVAEVA, S.M. et KRASNOVA, V.I. (1975), *Bioorg. Khim. U.R.S.S.*, 1, 1600-1605, (79)
- AZARI, P.R. et FEENEY, R.E. (1958), *J. Biol. Chem.*, 232, 293-302, (31)
- AZARI, P.R. et FEENEY, R.E. (1961), *Arch. Biochem. Biophys.*, 92, 44 (31)
- BAKER, E. et MORGAN, E.H. (1969a), *Biochemistry*, 8, 1133-1140. (38)
- BAKER, E. et MORGAN, E.H. (1969b), *Biochemistry*, 8, 2954-2958. (38)
- BAKER, E., SHAW, D.C. et MORGAN, E.H. (1968), *Biochemistry*, 7, 1371-1378, (67, 108)
- BALDWIN, D.A. et DE SOUSA, M.R. (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 99, p1101, (29)

- BARKAN, G. (1927), *Physiol.Chem.*, 171, 194-221, (1)
- BARNES, S. et STATO, G. (1980) *Cell*, 22, 649-655, (39)
- BARTEK, (1983), (50)
- BATES, G.W. (1982), dans "Biochemistry and Physiology of Iron", Saltman, P. et Hegenauer, J. (Eds), Elsevier, Amsterdam, pp.3-18, (23,24)
- BATES, G.W., BILLUPS, C. et SALTMAN, P. (1967a), *J.Biol.Chem.*, 242, 2810-2815, (25)
- BATES, G.W., BILLUPS, C. et SALTMAN, P. (1967b), *J.Biol.Chem.*, 242, 2816-2821, (25)
- BATES, G.W. et SCHLABACH, M.R. (1973), *J.Biol.Chem.*, 248, 3228-3233, (22,26)
- BAYARD, B. et KERCKAERT, J.P. (1980), *Biochem.Biophys.ResCommun.* 95, 777-784, (18)
- BAYARD, B. et KERCKAERT, J.P. (1981), *Eur.J.Biochem.*, 113, 405-414 (18)
- BERNARD, N., LOMBART, C. et JAYLE, M.F. (1975), *Biochimie*, 57, 551-557, (57)
- BEZKOROVAINY, A. (1966), *Biochim.Biophys.Acta*, 127, 535 (31)
- BEZKOROVAINY, A. et GROHLICH, D. (1967), *Biochim.Biophys.Acta*, 147, 497, (31)
- BEZKOROVAINY, A. et RAFELSON, M.E. (1964), *Arch.Biochem.Biophys.*, 107, 302, (31)
- BEZWODA, W.R., Mac PHAIL, A.P., BOTHWELL, T.H., BAYNES, R.D., DERMAN, D.P. et TORRANCE, D. (1968), *Br.J.Haematol.*, 63, 749-752, (34)
- BOBAK, P., STRATIL, A. et VALENTA, M. (1984), *Comp.Biochem.Physiol.*, 79-B, 113-117, (5)
- BOCK, K., ARNAP, J. et LÖNNGREN, J (1982), *Eur.J.Biochem.*, 129, 171-178 (16)
- BOMFORD, A.B. et MUNRO, H.N. (1985) *Hepatology*, 5, 870-875, (51,52)
- BONNET, M., KHALIC, F. et GUIBAUD, S. (1978), *Comptes rendus du 4è Colloque de Biologie Prospective*, Paris, Masson (Ed), pp 667-672, (4)
- BOOTH, A.G. et WILSON, M.J. (1981), *Biochem.J.*, 196, 355-362, (130,138)
- BOROVA, J., PONKA, P. et NEUWIRT, J. (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, 320, 143-156, (49)
- BOUQUELET, S., STRECKER, G., MONTREUIL, J. et SPIK, G. (1980), *Biochimie*, 62, 43-49 (103)
- BRIGDES, K.R. et CUDKOWICZ, A. (1984), *J.Biol.Chem*, 259, 12970-12977, (51)
- BRISSE, J.R. et CARVER, J.P. (1983), *Biochemistry*, 22, 1362-1368, (16)

- BROCK, (1985), (3,39)
- BROCK, J.H. et ARZABE, F.R. (1976a), FEBS letters, 69, 63-66, (13,75)
- BROCK, J.H., ARZABE, F., LAMPREAVE, F. et PINEIRO, A. (1976b), Biochim. Biophys. Acta, 446, 214-225, (13,77,128)
- BROCK, J.H., ARZABE, F., RICHARDSON, N. et DEVERSON, E. (1978), Biochem. J., 171, 73-78, (77)
- BROWN, P.J. et JOHNSON, P.M. (1981), Placenta, 2, 1-10, (135)
- BROWN-MASSON, A. et WOODWORTH, R.C. (1984), J. Biol. Chem., 259, 1866-1873, (128)
- BURSTEIN, Y., WALSH, K.A. et NEURATH, H. (1974) Biochemistry, 13, 205-210
- BUYS, S.S., KEOGH, E.A. et KAPLAN, J. (1984), Cell, 38, 569-576, (53)
- CANNON, J.L. et CHASTEEN, N.D. (1975), Biochemistry, 14, 4573-4577, (27)
- CASTNER, J., NEWELL, G.S., MOLTON, W.C. et SLICHTER, C.P. (1960), J. Chem. Phys., 32, 668, (23)
- CATTAN, D. (1979), Gastroenterol. Clin. Biol., 3, 59-66, (34)
- CHARET, P. (1975), C.R. Acad. Sci., 280-D, 2049-2052, (5)
- CHARLWOOD, P.A. (1971), Biochem. J., 125, 1019, (31)
- CHASTEEN, N.D. (1977), coordination Chemistry Reviews, 22, 1-36, (23)
- CHASTEEN, N.D. (1983a), dans "Iron binding proteins without cofactors or sulfur clusters", Theil, E.C. et al., (Eds), Elsevier, Amsterdam, pp 201-233, (3)
- CHASTEEN, N.D. (1983b), Trends Biochem. Sci., 8, 272-275, (26)
- CHASTEEN, N.D., THOMPSON, C.P. et RINES, J.P. (1983), dans "Structure and function of iron storage and transport proteins", Urushizaki, I., Aisen, P., Listowsky, I. et Drysdale, J.W. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp 241-246, (29)
- CHASTEEN, N.D., WHITE, L.K. et CAMPBELL, R.F. (1977), Biochemistry, 16, 363-368, (29)
- CHERNELSH, M. et BROWN, E.B. (1970), Nature, 226, 356, (78)
- CHUNG, M.C.M. et Mc KENZIE, H.A. (1985), Comp. Biochem. Physiol., 80B, 287-297, (10)
- CIECHANOVER, A., SCHWARTZ, A.L., DAUTRY-VARSAT, A. et LODISH, H.F. (1983a) J. Biol. Chem., 258, 9681-9689, (43)
- CIECHANOVER, A., SCHWARTZ, A.L. et LODISH, H.F. (1983b), Cell, 32, 267-275, (43)
- CODDEVILLE, B. (1987), Thèse Université Lille, (14,19)
- CONTRACTOR, S.F. et EATON, B.M. (1986), Cell. Bioch. Funct. 4, 69-74, (130)

- COWART, R.E., LOH, T., READ, H., SWOPE, S., CHASTEEN, N.D. et BATES, G.W. (1983) in : Urushizaki, I., Aisen, P., Listowsky, I et Drysdale, J.W. (Eds) "Structure and function of iron storage and transport proteins". Elsevier Science publisher, pp. 253-256, (25,49)
- COX, T.M. et O'DONNELL, M.W. (1981) *Biochem. J.*, 194, 753-759, (34)
- COX, T.M., MAZURIER, J., SPIK, G., MONTREUIL, J. et PETERS, T.J. (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, 588, 120-128, (34,39)
- CRICHTON, R.R. (1985) dans "Proteins of iron storage and transport", Spik, G., Montreuil, J., Crichton, R.R., Mazurier, J. (Eds), Elsevier, Amsterdam, pp.99-110, (49)
- CUSTER, G., BALCERZAK, S. et RINEHART, J. (1982), *Am. J. Haematol.*, 13, 23-26 (4)
- DAUTRY-VARSAT, A., CIECHANOVER, A. et LODISH, H. (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2258-2262, (43)
- DAUTRY-VARSAT, A. et LODISH, H. (1984), *Pour la Science*, 81, 78-85 (31,43,45,46)
- DAVIS, R.J., CORVERA, S. et CZECH, M.P. (1986) *J. Biol. Chem.*, 261, 8708-8711, (53)
- DAVOUST, J., MICHEL, V., SPIK, G., MONTREUIL, J., et DEVAUX, P.F., (1981) *FEBS Lett.*, 125, 271-276
- DEBRUYNE, V. (1983), Thèse Doctorat 3è cycle, Lille, (18)
- DEBRUYNE, V., COLOMBEL, J.F., CORTOT, A., MONTREUIL, S. et SPIK, G. (1983) *Proceedings of the VIIth International Symposium on Glycoconjugates*; Chester A., Heinegard D., Lundblad A. and Svensson S. (Eds) Lund, Suede., p.171 (18)
- DEBRUYNE, V., MONTREUIL, J. et SPIK, G. (1984) *Prot. Biol. Fluids*, 31th Colloquium, Pergamon Press, pp.63-68, (18)
- DEISENHOFER, J. (1981), *Biochemistry*, 20, 2361-2370, (16)
- DELIA, D., GREAVES, M.F., NEWMAN, R.A., SUTHERLAND, D.R., MINOWADA, J., KUNG, P. et GOLDSTEIN, G. (1982) *Int. J. Cancer*, 29, 23-31, (50)
- DORLAND, L., HAVERKAMP, J., SCHUT, B.L., VLIEGENTHART, B.L., SPIK, G., STRECKER, G., FOURNET, B. et MONTREUIL, J. (1977) *FEBS Lett.*, 22 15-20, (14,99)
- DOUY, A. et GALLOT, B. (1980a), *Biopolymers*, 19, 493, (16)
- DOUY, A., GERVAIS, M. et GALLOT, B. (1980b), *Macrom. Chem.*, 181, 1199, (16)
- EGYED, A. (1983), *Brit. J. Haematol.*, 53, 217-225, (49)
- ELLEMAN, T.C. et WILLIAMS, J. (1970), *Biochem. J.*, 116, 515-535, (8)
- ENNS, C.A., SHINDELMAN, J.E., TONIK, S.E. et SUSSMAN, H.H. (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78, 4222-4225, (137,138)

- ENNS, C.A., SUOMALAINEN, H.A., GEBHARDT, J.E., SHRODER, J. et SUSSMAN, H.H. (1982), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 3241-3245, (41)
- ENNS, C.A. et SUSSMAN, H.H. (1981) J. Biol. Chem., 256, 12620-12623, (38)
- EBPARZA, I. et BROCK, J.H. (1980), Biochim. Biophys. Acta, 622, 297-307, (13, 128)
- EVANS, R.W. et WILLIAMS, J. (1978), Biochem. J., 173, 543-552, (13, 90)
- FAULK, W.P. et GALBRAITH, G.M.P. (1979, Proc. R. Soc. Lond. B. 204, 83-97, (38)
- FISHMAN, J.B. et FINE, R.E. (1987) Cell, 42, 157-164 (45, 47)
- FLETCHER, J. (1969), Clin. Sci., 37, 273-297, (78)
- FLETCHER, J. et HUEHNS, E.R. (1967) Nature, 215, 584-586, (27, 78, 128)
- FLETCHER, J. et HUEHNS, E.R. (1968), Nature 218, 1211-1214, (27)
- FLETCHER, J. et SUTER, P.E.N. (1969), Clin. Sci. 36, 209-220, (130, 137)
- FOLATJAR, D.A. et CHASTEEN, N.D. (1982), J. Am. Chem. Soc., 104, 5775-5780, (29)
- FORTH, W. et RUMMEL, W. (1973, Physiol. Rev., 53/3, 746-753, (34)
- FRAENKEL-CONRAT, H. et FEENEY, R.E. (1950), Arch. Biochem., 29, 101 (22)
- FRAZIER, J.L., CASKEY, J.H., YOFFE, M. et SELIGMAN, P.A. (1982), J. Clin. Invest., 69, 853-855, (38, 51)
- FRIEDEN, E. et AISEN, P. (1980), Trends in Biochemical Sciences-Janvier p XI, (29)
- FRIEDEN, E. et OSAKI, S. (1974), Adv. Exptl. Med. Biol., 48, 235-266, (1)
- GALBRAITH, G.M.P., GALBRAITH, R.M. et FAULK, W.P. (1980a), Placenta, 1, 33, (38)
- GALBRAITH, G.M.P., GALBRAITH, R.M., TEMPLE, A. et FAULK, W.P. (1980b), Blood, 55, 240, (38)
- GARDINER, M.E. et MORGAN, E.H. (1974), Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 52, 723-736, (53)
- GARRET, N.E., GARRET, R.J.B. et ARCHDEACON, J.W. (1973), Biochem. Biophys. Res. Comm., 52, 466-474, (37)
- GEUZE, H.J., SLOT, J.W., STROUS, G.J.A.M., LODISH, H.F. et SCHWARTZ, A.L. (1983), Cell, 32, 277-287, (43)
- GITLIN, D., KUMATE, J., URRUSTI, J. et MORALES, C. (1964), Clin. Investig. 43, 1938-1951, (130)
- GLASNAK, V. et JAROLIMORA, (1980) Zivocisna vyroba, 25, 461-468, (10)
- GLASS, J., NUNEZ, M.T. et ROBINSON, S.H. (1980), Biochim. Biophys. Acta, 598, 293-304, (43)

- GLAZER, A.N. et MAC KANZIE, H.A. (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, 71, 109, (31)
- GOLDSTEIN, J.L., ANDERSON, R.G.W. et BROWN, M.S. (1979), *Nature*, 279, 679-685, (47)
- GOODFELLOW, P.N., BANTING, G., SUTHERLAND, R., GREAVES, M., SALOMON, E. et POVEY, S. (1982), *Somatic Cell Genet.*, 8, 197-206, (41)
- GORDON, A.H. et LOUIS, L.N. (1963), *Biochem. J.*, 88, 409-414, (57)
- GORINSKY, B., HORSBURGH, C., LINDLEY, P.F., MOSS, D.S., PARKAR, M. et WATSON, J.L. (1979), *Nature*, 281, 157-158, (11,69)
- GRAHAM, I. et WILLIAMS, J. (1975), *Biochem. J.*, 145, 263-279, (7,10)
- GREENE, F.C. et FEENEY, R.F. (1968), *Biochemistry*, 7, 1366, (67)
- GROHLICH, D., MORLEY, C.G.D., BEZKOROVAINY, A. et HERZBERG, G.R. (1979) *Int. J. Biochem.*, 10, 803-807, (38,53)
- GRÖHLICH, D., MORLYE, C.G., MILLER, R.J. et BEZKOROVAINY, A. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 76, 682-690, (38,53)
- HAHN, D. (1973), *Eur. J. Biochem.*, 34, 311-316, (78)
- HAMILTON, T.A., WADA, H.G. et SUSSMAN, H.H. (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76, 6406-6410, (38,137)
- HANOVER, J.A. et DICKSON, R.B. (1985), in: "Endocytosis" (Pastan I., and Willingham M.C., Eds.) Plenum Press, New York and London, 131-161, (43,45)
- HANOVER, J.A., WILLINGHAM, M.C. et PASTAN, I. (1984), *Cell*, 39, 283-293, (45)
- HARFORD, J. et ASHWELL, G. (1981) dans "The Glycoconjugates", Horowitz (Ed.), Academic Press, New York, IV, 27-55., (53)
- HARRIS, D.C. (1977), *Biochemistry*, 16, 560-564, (27,128)
- HARRIS, D.C. et AISEN, P. (1975a), *Biochemistry*, 14, 262-268, (78)
- HARRIS, D.C. et AISEN, P. (1975b), *Nature*, 257, 821, (78,128)
- HATTON, M.W.C., MÄRZ, L., BERRY, L.R., DEBANNE, R.T. et REGOECZI, E. (1979) *Biochem. J.*, 181, 633-638, (18)
- HATTON, M.W.C., REGOECZI, E. et WONG, K.L. (1974), *Can. J. Biochem.*, 52, 845-853, (14,108)
- HATTON, M.W.C., REGOECZI, E., WONG, K.L. et KRAAY, G.J. (1977), *Biochem. Genet.*, 15, 621-639, (10,19,57)
- HAURANI, F.I., MEYER, A. et O'BRIEN, R. (1973), *J. Of. Ret. Soc.*, 14, 309-316, (4)
- HEAPHY, S. et WILLIAMS, J. (1982), *Biochem. J.*, 205, 611-617, (13, 69,75)
- HEMMAPLARDH, D. et MORGAN, E.H. (1977), *Br. J. Haematol.*, 36, 85-96, (43)

- HERBERMAN, R.B. et HOLDEN, H.T. (1978), in "Advances in Cancer Research", (Klein, G. and Weinhouse, S. Eds), Academic Press New York, pp.305-377, (50)
- HERBETH, B., HENNY, J. et SIEST, G. (1983), *Ann. Biol. Clin.*, 41, 23-32, (4)
- HERSHKO, (1977), *Haematology*, 10, 105-148, (32)
- HOLMBERG, C.G. et LAURELL, C.B. (1947) *Acta Chem.Scand.*, 1, 964, (22)
- HAKAL, Z. et MULLER-EBERHARD, V. (1971) *Biochemistry*, 10, 1746-1750, (61)
- HU, H.Y.Y. et AISEN, P. (1978), *J. Supramol. Struct.*, 8, 349-360, (38)
- HUDSON, B.G., OHNO, M., BROCKWAY, W.J. et CASTELLINO, F.S. (1973), *Biochemistry*, 12, 1047-1053, (61, 67, 108)
- HUEBERS, H.A., HUEBERS, E. et CRICHTON, R.R. (1974) *FEBS Lett.* 44, 302, (34)
- HUEBERS, H.A., HUEBERS, E., CSIBA, E., RUMMEL, W. et FINCH, C.A. (1983b) *Blood*, 61, 283-290, (34)
- HUEBERS, H.A., HUEBERS, E., FINCH, C.A. et MARTIN, A.W. (1982), *J. Comp. Physiol.*, 148, 101-109, (1)
- HUEBERS, H.A., HUEBERS, E., RUMMEL, W. et CRICHTON, R., (1976), *Eur. J. Biochem.*, 66, 447-455, (19)
- HUTCHINGS, S.E. et SATO, G.H. (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 901-904, (39)
- IACOPELTA, B.J., MORGAN, E.H. et YEOH, G.C.T. (1982), *Biochim. Biophys. Acta.*, 687, 204-210, (51)
- JANDL, J.H., INMAN, J.K., SIMMONS, R.L. et ALLEN, D.W. (1959), *J. Clin. Invest.*, 38, 161-185, (37, 66, 78)
- JANDL, J.H. et KATZ, J.H. (1963), *J. Clin. Invest.*, 42, 314-326, (31, 37, 38, 41, 78, 114)
- JARRIT, P.M. et CHARLWOOD, P.A. (1976). *Biochim. Biophys. Acta*, 453, 319-321, (22)
- JEPPSON, J.O. (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, 140, 477 (5)
- JOHANSSON, B. (1960), *Acta, Chem. Scand.*, 14, 510-512, (1)
- KAWASAKI, T., ETOH, R. et YAMASHINA, I. (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 81, 1018
- KERCKAERT, J.P. et BAYARD, B. (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 105, 1023-1030, (18)
- KEUNG, W.W., AZARI, P. et PHILLIPS, J.L. (1982), *J. Biol. Chem.*, 257, 1177-1183, (13)

- KIND, K., TSUNOO, H., HIGA, Y., TAKAMI, M., HAMAGUCHI, H. et NAKAJIMA, H. (1980), J. Biol. Chem., 255, 9616-9620, (53)
- KIYOKO, I. et YOSHINARI, I. (1982), in : "The Biochemistry and physiology of Iron", Saltman P. et Hegenaner J. (Eds), Elsevier North Holland publisher, pp 215-217, (34)
- KLAUSNER, R.D., ASHWELL, G., VAN RENSWOUDE, J., HARFORD, J.B. et BRIDGES, K.A., (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 2263-2266, (45)
- KLAUSNER, R.D., HARFORD, J. et VAN RENSWOUDE, J., (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3005-3109, (51)
- KOECHLIN, B.A. (1952), J. Am. Chem. Soc., 74, 2649, (31)
- KOENIG, S. et SCHILLINGER, W. (1969), J. Biol. Chem., 244, 3283, (26)
- KOHGO, Y., NIITSU, Y., NISHISATO, T., URUSCHIZAKI, Y., KONDO, H., FUKUSHIMA, M., TSUSHIMA, N. et URUSHIZAKI, I. (1985), dans "Proteins of Iron storage and Transport", Spik, G., Montreuil, J., Crichton, R.R. et Mazurier, J. (Eds), Elsevier, Amsterdam, pp 155-169, (50)
- KOHNO, H., TAKETANI, S. et TOKUNAGA, R. (1986), Cell Struct. Funct. 11, 181-190, (51)
- KOMATSU, S.K. et FEENEY, R.E., (1967), Biochemistry, 6, 1136, (26)
- KONOPKA, K., MARESCHAL, J.C. et CRICHTON, R.R., (1980), Biochem. Biophys. Res. Commun., 96, 1408-1413, (49)
- KONOPKA, K. et ROMSLO, I., (1980) Eur. J. Biochem., 107, 433-439, (25-49)
- KONOPKA, K. et ROMSLO, I., (1981), Eur. J. Biochem., 117, 239-244, (49)
- KORNFELD, S. (1968), Biochemistry, 7, 945-954, (119, 129)
- KORNFELD, S. (1969), Biochim. Biophys. Acta, 194, 25-33, (31, 114)
- KOURILSKY, F.M. et BURTIN, P. (1966), in "Protides of the biological Fluids", Peters H. (Ed) Amsterdam, Elsevier, 14, p 103, (31)
- KRYSTEVA, M.A., MAZURIER, J. et SPIK, G. (1976), Biochim. Biophys. Acta, 453, 484-493, (27, 31, 78)
- KRYSTEVA, M.A., MAZURIER, J., SPIK, G. et MONTREUIL, J., (1975), FEBS Lett., 56, 337-340, (26, 27, 78)
- LANE, R.S. (1972), Brit. J. Haematol., 22, 309-317, (66, 78, 114)
- LANE, R.S. (1976) in "Structure and Function of plasma proteins", Allison A.C. (Ed), 2, pp 53-78, (32)
- LARRICK, J.W. et CRESSWELL, P., (1979), Biochim. Biophys. Acta, 583, 483-490, (50)
- LAURELL, C.B. et INGELMAN, B., (1947), Acta. Chem. Scand., I, 770, (1, 22)
- LECLERCQ, Y., (1987), FEBS Lett., sous presse (19)

- LEE, Y.C., TOWNSEND, R.R., HARDY, M.R., LÖNNGREN, J. et BOCK, K., (1984) in "Biochemical and Biophysical Studies of proteins and Nucleic Acids" (Lo, T.B., Lin, T.Y. et Li, C.H., Eds.), Elsevier, New-york, pp 349-360, (53)
- LEGER, D., VERBERT, A., LOUCHEUX, M.H. et SPIK, G. (1977), Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 17, (5-A) 737-747, (67)
- LEHRER, S.S., (1969), J. Biol. Chem., 244, 3613-3617, (26)
- LEIBMAN, A. et AISEN, P., (1979), Blood, 53, 1058-1065, (29)
- LESTAS, A., (1976), Brit. J. Haematol., 32, 341-350, (27, 78, 90, 92)
- LEVIN, M.J., TUILL, D., UZAN, G. et al., (1984), Biochem. Biophys. Res. Commun., 122, 212-217, (4)
- LIEBER, C.S., (1980), Gastroenterology, 79, 373-390, (4)
- LIGHT, N.D., (1978), Biochem. Biophys. Res. Commun., 81, 261-267, (38)
- LINE, W.F., GRÖHLICH, D. et BEZKOROVAINY, A. (1967) Biochemistry, 6, 3393, (26)
- LINEBACK-ZINS, J. et BREW, K. (1980) J. Biol. Chem., 255, 708-713, (13)
- LOH, T.T., HIGUCHI, D.A., BOCKXMEER, F.M., SMITH, C.H. et BROWN, E.B. (1980), J. Clin. Invest., 65, 1182, (38, 137, 138)
- LOH, T.T., YEUNG, Y.G. et YEUNG, D., (1977), Biochim. Biophys. Acta, 471, 118-124, (43)
- LOOSEMORE, M.J. et PRATT, R.F. (1976), FEBS Lett., 72, 155-158, (79)
- LOUACHE, F., TESTA, U., PELICCI, P., THOMOPOULOS, P., TITEUX, M. et ROCHANT, U., (1984), J. Biol. Chem., 259, 11576-11582, (51)
- LUK, C.K., (1971), Biochemistry, 10, 2838-2844, (22)
- Mc ARDLE, H.J., DOUGLAS, A.J. et MORGAN, E.H. (1985), J. Cell. Physiol. 122, 405-409, (137)
- Mc CLELLAND, A., KÜHN, L.C. et RUDDLE, F.H. (1984), Cell, 39, 267-274, (41)
- Mc GILLIVRAY, R.T.A. et BREW, K. (1975) Science, 190, 1306-1307, (8)
- Mc GILLIVRAY, R.T.A., MENDEZ, E. et BREW, K., (1977) in " Proteins of iron metabolism" (Brown, E.B. Aisen, P. Fielding, J., and Crichton, R.R., eds.), Grune and Stratton, New-York, pp 133-142, (8)
- Mc GILLIVRAY, R.T.A., MENDEZ, P., SHEWALE, S.G., SINHA, S.K., LINEBACK-ZINS, J. et BREW, K. (1983), J. Biol. Chem., 258, 3543-3553, (5, 8, 10, 26)
- Mc 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, (5)
- MAKEY, D.G. et SEAL, U.S., (1976), Biochim. Biophys. Acta, 453 250-256, (29)

- MARTEL, P., KIM, S.M. et POWELL, B., (1980), *Biophys. J. Biophysical Society*, 31, 371-38, (11)
- MARTIN, A.W., HUEBERS, E. et WEBB, J.M., (1983), in "structure and function of Iron storage and transport proteins", (Urushizaki I, Aisen, P., Listowsky, I. et Drysdale, J.W. (Eds.), Elsevier Biomedical, New-York, pp.259-260, (1)
- MARTINEZ-MEDELLIN, J. et SCHULMAN, H.M. (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, 264, 272-284, (57)
- MARX, J.M. et AISEN, P., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, 649, 297-304, (34)
- MARX, J.J.M, KLEIN-GEBBINK, J.A.G., NISHISATO, T. et AISEN, P. (1982) *Brit. J. Haematol.*, 52, 105-110, (29)
- MÄRZ, L., HATTON, M.W.C., BERRY, L.R. et REGOECZI, E., (1982), *Can. J. Biochem.*, 60, 624-630, (14)
- MATTIA, E, RAO, K., SHAPIRO, D.S., et al. (1984) 259, 2689-2692, (51)
- MAY, W.S., JACOBS, S. et CUATREASAS, P. (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 2016-2020, (51)
- MAZURIER, J., AUBERT, J.P., LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H., SPIK, G., (1976), *FEBS Lett.*, 6, 238-242, (11)
- MAZURIER, J., LHOSTE, J.M., SPIK, G. et MONTREUIL, J., (1977), *FEBS Lett.*, 81, 371-375, (26,27)
- MAZURIER, J. et SPIK, G., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, 629, 399-408, (27)
- MAZURIER, J. SPIK, G. et MONTREUIL, J., (1984), Abstracts of the Iron Club Meeting, 10-13 Juillet, France, (34)
- MEARES, C.F. et LEDBETTER, J.E. (1977), *Biochemistry*, 16, 5178-5180, (22)
- MEYER, B. (1983), *Proc. 7th, Intern. Symp. on Glycoconjugates*. Chester, A. et al. (Eds), Rhams, Lund, p 126, (16)
- MICHEL, V., (1981) Thèse Doctorat 3 ème cycle, Lille
- MONTREUIL, J. (1975), *Pure and Appl. Chem.*, 42, 431-477, (14,17)
- MONTREUIL, J. (1980a), *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 37, 157-223, (16,17)
- MONTREUIL, J. (1980b), *Proc. 9th Aharon Katzir-Katchalsky Conference on carbohydrate-Protein Interactions*, Kibbutz Kiryat Anarim, pp 3-4, (16,17)
- MONTREUIL, J. (1982), in " *Comprehensive Biochemistry*" Neuberger A. et Van Deenen L.L.M. (Eds), Elsevier Amsterdam, 19B/II. pp 1-188. (16,17)
- MONTREUIL, J. (1983), *Biochem. Soc. Trans.*, 11, 134-136, (16,17,18)
- MONTREUIL, J. (1984a), *Pure and Appl. Chem.*, 56, 859-877, (16,17,18)

- MONTREUIL, J. (1984b), in "INSERM-CNRS Colloquium/on"the role of Carbohydrate in cellular recognition", Aussois, pp 16-18, (16,17,18)
- MONTREUIL, J., FOURNET, B., SPIK, G. STRECKER, G., (1978), C.R. Acad. Sci. Paris, 287D, 827-840, (16,17)
- MONTREUIL, J., MAZURIER, J., LEGRAND, D., SPIK, G. (1985) dans "Proteins of Iron storage and Transport" SPIK, G., MONTREUIL, J., CRICHTON, R.A. et MAZURIER, J. (Eds), Elsevier, Amsterdam, pp.25-38, (3,26)
- MONTREUIL, J. et MULLET, S. (1960), C.R. hebdomadaire des séances Acad. Sci., 250, 176-178, (1)
- MONTREUIL, J. SPIK, G., (1975) dans "Proteins of Iron storage and transport in Biochemistry and medicine", Crichton, R.A. (Ed.) pp 27-38, (14)
- MONTREUIL, J., TONNELAT, J. et MULLET, S. (1960), Biochim. Biophys. Acta., 45, 413-421, (1)
- MOORE, C.V. et BROWN, E.B. (1967), dans : "Métabolisme du fer", Documenta Geigy-Acta-Clinica., p.13, (1)
- MORELL, A.G., GREGORIADIS, G., SCHEINBER, J.H., HICKMAN, J. et ASHWELL, G. (1971), J. Biol. Chem., 246, 1461-1467, (4,53)
- MORGAN, E.H. (1964), British J. Haematol., 10, 442-452, (38)
- MORGAN, E.H. (1974) in "Iron in Biochemistry and Médecine" (Jacobs, A. and Worwood, M., eds.) pp 29-71, Academic Press, N.Y. (78,130)
- MORGAN, E.H., (1981), Molec. Aspects Med., 4, 1-123, (3,4)
- MORGAN, E.H. et APPLETON, T.C. (1969), Nature, 223, 1371-1372, (43)
- MORGAN, E.H., MARSAGLIA, G., GIBLETT, E.R. et FINCH, C.A. (1967), J. Lab. Clin., 69, 370, (119)
- MORLEY, C.G.D., SOLBERG, L. et BEZKOROVAINY, A. (1985) in: "Proteins of Iron storage and transport" (Spik, G., Montreuil, J., Crichton, R.A., and Mazurier, J., Eds) Elsevier, Amsterdam, pp.175-178, (43)
- MUIR, W.A., HOPFER, U. et KING, M. (1984) J. Biol. Chem., 259, 4896-4903, (34)
- NAGY, B. et LEHRER, S.S. (1972), Arch. Biochem. Biophys., 148, 27-36 (11)
- NALPAS, B., BOIGNE, J.M., ZAFRANI, E.S., ZIMMERMAN, R. et BERTHELOT, P. (1980) Gastroenterol. Clin. Biol., 4, 646-654, (4)
- NEWMAN, R., SCHNEIDER, C., SUTHERLAND, R., WODINELICH, L. et GREAVES, M. (1982), Trends Biochem. Sci. 7, 3494-3498, (38,39,40,50)
- NUNEZ, M.T., COLE, E.S. et GLASS, J. (1980) Blood, 55, 1051-1055, (49)
- NUNEZ, M.T. et GLASS, J. (1985), J. Biol. Chem., 258, 9676-9680, (41)
- NUNEZ, M.T., GLASS, J., FISCHER, S., LAVIDOR, L.M., LENK, E.M. et ROBINSON, S.H., (1977), Br. J. Haematol., 36, 519-529, (51)

- OCTAVE, J.N., SCHNEIDER, Y.J., CRICHTON, R.R. et TROUET, A. (1981), *Eur. J. Biochem.*, 115, 611-618, (43)
- OCTAVE, J.N., SCHNEIDER, Y.J., CRICHTON, R.R., et TROUET, A. (1982a), *FEBS Lett.*, 137, 119-123, (43)
- OCTAVE, J.N., SCHNEIDER, Y.J., CRICHTON, R.R., et TROUET, A. (1984), in "Protides of the Biological Fluids", XXXI annual colloquium, Bruxelles, 2-5 Mai. 1983, (43)
- OCTAVE, J.N., SCHNEIDER, Y.S., HOFFMAN, P., TROUET, A. et CRICHTON, R.R., (1979), *FEBS Lett.*, 108, 127-130, (43, 50)
- OCTAVE, J.N., SCHNEIDER, Y.J., HOFFMANN, P., TROUET, A. et CRICHTON, R.R., (1982b), *Eur. J. Biochem.*, 123, 235-240, (43)
- OCTAVE, J.N., SCHNEIDER, Y.J., SIBILLE, J.C., CRICHTON, R.R. et TROUET, A. (1983a), in "Protein of Iron storage and Transport" VI th international conference, Juillet 11.14. Sapporo, Japon. (43)
- OCTAVE, J.N., SCHNEIDER, Y.S., TROUET, A. et CRICHTON, R.R. (1983b), *Trends Biochem. Sci.*, 8, 217-219, (43)
- OGBIMI, A.O., JOHNSON, P.M., BROWN, P.J. et FOX, H. (1979), *J. Reprod. Immunol.*, 1, 127-140, (137)
- O'HARA, P., YEH, S.M., MEARES, C.F., BERSOHN, R. (1981), *Biochemistry*, 20, 4704-4708, (22)
- OKADA, S., ROSMANN, M.D. et BROWN, E.B., (1978), *Biochim. Biophys. Acta.* 543, 72-81, (27, 90)
- OMARY, B. et TROWBRIDGE, I.S., (1981), *J. Biol. Chem.*, 256, pp 4715-4718, (41)
- OSBORNE, T.B.J. (1899), *J. Am. Chem. Soc.*, 21, 477, (1)
- OVADI, J., LIBOV, S. et ELODI, P. (1967), *Acta. Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, 2, 455-458, (78)
- PALMOUR, R.M. et SUTTON, H.E. (1971), *Biochemistry*, 10, 4026-4032, (67, 108)
- PARMLEY, R.T., BARTON, J.C. CONRAD, M.E., (1985), *Brit. J. Haematol.*, 60, 81-89, (34)
- PASTAN, I. et WILLINGHAM, M.C. (1981a), *Science*, 214, 504-509, (47)
- PASTAN, I. et WILLINGHAM, M.C. (1981b), *Ann. Rev. Physiol.* 43, 239-250, (47)
- PASTAN, I. et WILLINGHAM, M.C. (1983), *Trends Biochem. Sci.* 8, 250-254, (47)
- PASTAN, I. et WILLINGHAM, M.C. (1985), in: "Endocytosis", (Pastan I. et Willingham M.C., Eds), Plenum Press, New York and London, pp.1-44, (43, 48)
- PHILLIPS, M.E. et THORBECKE, G.J. (1966), *Int. Arch. Allergy*, 29, 553 (4)

- PLANCKE, Y. (1978), DAUTREVAUX, M. et BIZERTE, G. (1978), *Biochimie*, 60, 171-175, (57)
- PONKA, P., BOROVA, J. et NEUWIART, J. (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, 639, 527-535 (49)
- PONKA, P., WILCZYNSKA, A. et SCHULMAN, H.M. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, 720, 96-105 (49)
- PRIMOSIGH, J.V. et THOMAS, E.D. (1968) *J. Clin. Invest.*, 47, 1473-1482 (49)
- PRINCIOTTO, J.V. et ZAPOLSKI, E.J. (1975), *Nature*, 255, 87-88, (78, 90)
- PRINCIOTTO, E.J. et ZAPOLSKI, J.V. (1976a) *Biochim. Biophys. Acta*, 421, 80-86, (39)
- PRINCIOTTO, J.V. et ZAPOLSKI, E.J. (1976b) *Biochim. Biophys. Acta*, 428, 766-771 (27, 78)
- PRINCIOTTO, J.V. et ZAPOLSKI, E.J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, 539, 81-87 (27, 78)
- PURVES, L.R., JOHNSON, G. et JACOBS, P. (1984) in: "Protides of the biological Fluids" Peeter, A. (Ed.), 31, pp 103-106 (34)
- RAYMOND, K.D., CHUNG, T.D.V., PECORARO, V.L. et CARRANO, C.J. (1982) in Saltman P. et Hegenauer J. (Eds). "The Biochemistry and physiology of Iron", Proceedings of the Vth international conference on proteins of Iron storage and transport San Diego (1981) Elsevier Science Publisher, Amsterdam, pp 649-662 (26)
- REFSUM, S.B. et SCHREINER, B. (1980), *Scand. J. Gastroent.*, 15, 1013-1020 (34)
- REFSUM, S.B. et SCHREINER, B.B.I. (1984) *Scand. J. Gastroenterol.*, 19, 867-874 (34, 35)
- REGOECZI, E. (1984b) in "Recent Research on Vertebrate lectins" Olden K. et Parent J.B. (Eds), Van Nostrand Reinhold Co. (55)
- REGOECZI, E., CHINDEMI, P.A. et DEBANNE, M.T. (1984a) *Alcoholism. Clin. Exp. res.*, 8, 287-292 (53-55)
- REGOECZI, E., CHINDEMI, P.A., DEBANNE, M.T. et CHARLWOOD, P.A. (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 79, 2226-2230 (45)
- REGOECZI, E. et HATTON, M.W.C. (1980) *J. Am. Physiol. Soc.*, R306-R310 (4)
- REGOECZI, E., HATTON, M.W.C. et WONG, K.L. (1974), *Can. J. Biochem.*, 52, 155-161 (53, 54)
- RICHTER, G.W. (1983) in "Structure and Function of iron Storage and transport proteins", Urushizaki et al. (Eds.) (32)
- ROGERS, T.B., GOLD, R.A. et FEENEY, R.E. (1977) *Biochemistry*, 16, 2299-2305 (25, 26)

- ROMSLO, I., KONOPKA, K., HUSBY, P. et ULVIK, R.J. (1982) in: Saltman, P. et Hegenaner J. (Eds) "The Biochemistry and Physiology of iron", Elsevier, North Holland, Publisher, Amsterdam, pp.315-316 (49)
- ROOP, W.E. et PUTNAM, F.W. (1967), J. Biol. Chem., 242, 2507-2513, (57)
- ROSSENEU-MORTREFF, M.Y., SOETEWY, F., LAMOTTE, R. et PEETERS, H. (1971) Biopolymers, 10 1039 (11,31)
- ROTH, J., TAATJES, D.J., LUCOCQ, J.M., WEINSTEIN, J. et PAULSON, J.C. (1985) Cell. 43, 287-295 (47)
- RUDOLPH, N.S., OHLSSON-WILHELM, B.M., LEARY, J.F. et al. (1985), J. Cell. Physio, 122 441-450 (51)
- RYMER, J.C. (1981), Path. Biol., 29/5, pp 301-304 (33)
- SAGER, P.R., BROWN, P.A. et BERLIN, R.D. (1984), Cell, 39, 275-282 (53)
- SAWATZKI, G., HOFFMAN, F. et KUBANEK, B. (1983) in "Structure and function of iron storage and transport proteins", Urashizaki et al. (Eds), Elsevier Publisher, pp 435-439 (34)
- SCHADE, A.L. et CAROLINE, L. (1944), Science, 100, 14-15 (1)
- SCHADE, A.L. et CAROLINE, L. (1946), Science, 104, 340-341 (1,34)
- SCHADE, A.L., REINHART, R.W. et LEVY, H. (1949), Arch. Biochem. 20, 170 (23)
- SCHLABATES, M.R. et BATES, G.W. (1975) J. Biol. Chem., 250, 2182-2188 (25)
- SCHNEIDER, G., ASSER, V., SUTHERLAND, D.R. et GREAVES, M.F. (1983) FEBS lett., 158, 259-264 (41)
- SCHNEIDER, C., OWEN, M.J., BANVILLE, D. et WILLIAMS, J.G. (1984), Nature, 211, 675-678 (40,41,42)
- SCHULTZE, H.E., SCHMIDTBERGER, R. et HAUPT, H. (1958) Biochem. Z., 329, 490 (14)
- SELIGMAN, P.A., SCHLEICHER, R.B. et ALLEN, R.H. (1979), J. Biol. Chem., 254, 9943-9946, (130)
- SIBILLE, J.C., OCTAVE, J.N., SCHNEIDER, Y.J., CRICHTON, R.R. et TROUET, A. (1984) in "Protides of the Biological Fluids", Peeter H. (Ed.), 31, pp 99-102 (43)
- SIBILLE, J.C., OCTAVE, J.N., SCHNEIDER, Y.J., TROUET, A. et CRICHTON, R.R. (1982) FEBS lett., 150, 365-369 (43)
- SIMPSON, R.T., RIORDAN, J.F. et VALLEE, B.L. (1963), Biochemistry, 2, 616 ()
- SKINNER, M.K., COSAND, W.L. et GRISWOLD, M.D. (1984) Biochem. J., 218, 313-320 (4)
- SLY, D.A., GROHLICH, D. et BEZKOROVAINY, A. (1978) in "Cell surface carbohydrate chemistry" (Harmon, R.E., ed.), Acad. Press, New-York, 640, 255-268 (43)

- SMITH, A. et MORGAN, W.T. (1979), *Biochem. J.*, 102, 47-54 (53)
- SMITHIES, O. (1957), *Nature*, 180, 1482-1483 (10)
- SNIDERS, M.D. et ROGERS, O.C. (1985) *J. Cell. Biol.*, 100, 826-834 (47)
- SODA, R. et TAVASSOLI, M. (1984), *Blood*, 63 270-276 (53)
- SORELL, M.F., NAUSS, J.M., DONOHUE, T. et TUMA, D.J. (1983), *Gastroenterology*, 84, 580-586, (4)
- SPEYER, B.E. et FIELDING, J. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, 332, 192-200 (41, 49)
- SPEYER, B. et FIELDING, J. (1979) *Brit. J. Haematol.*, 42, 255-267 (49)
- SPIK, G. (1982) in "The Biochemistry and Physiology of iron" (Saltman, P. and Hegenauer, J., eds.) pp 49-56, Elsevier North Holland (18, 19)
- SPIK, G., BAYARD, B., FOURNET, B., STRECKER, G., BOUQUELET, S., et MONTREUIL, J. (1975) *FEBS. Lett.*, 50, 296-299 (14)
- SPIK, G., DEBRUYNE, V. et MONTREUIL, J. (1982) in "Falk symposium n°34 on Structural carbohydrate in the liver", BASEL, p 42 (18)
- SPIK, G., DEBRUYNE, V., MONTREUIL, J., VAN HALBEEK, H. et VLIEGENTHART, J.F.G. (1985) *FEBS Lett.* 183, 65-69 (14, 18)
- SPIK, G., FOURNET, B., VANDERSYPPE, R., STRECKER, G., BOUQUELET, S., CHARET P., et MONTREUIL, J. (1974a), *Arch. Intern. Physiol. Biochem.*, 82, 791 (14, 18)
- SPIK, G., MONSIGNY, M. et MONTREUIL, J. (1965), *C.R. Acad. Sci.* 60, 4282 (14)
- SPIK, G. et MONTREUIL, J. (1966), *C.R. Soc. Biol.*, 160, 94 (31)
- SPIK, G. et MONTREUIL, J. (1983) *Bull. Europ. Physiopath. resp.*, 19, 123-130 (34)
- SPIK, G., VANDERSYPPE, R., FOURNET, B., BAYARD, B., CHARET, P., BOUQUELET, S., STRECKER, G. et MONTREUIL, J. (1974b) in "Actes du colloque International n°221 du CNRS, Villeneuve d'Ascq, 20-27 Juin 1973, CNRS Ed., (1974), 1, p 483-500 (14)
- STEIN, B.S., BENSCH, K.G. et SUSSMAN, H.H. (1984) *J. Biol. Chem.*, 259, 14762-14772 (47)
- STEIN, B. et SUSSMAN, H.H. (1985) in "Proteins of iron storage and transport" (Spik, G., Montreuil, J., Crichton, R.R. and Mazurier, J., Eds.), Elsevier-Sciences Publishers (47)
- STEIN, B.S. et SUSSMAN, H.H. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 10319-10331 (47)
- STIBLER, H. et BORG, S. (1981) *Alcoholism. Clin. Exp. Res.*, 50 545-549 (53)
- STIBLER, H., SYDOW, O. et BORG, S. (1980), *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 13 suppl I, 47-51 (53)

- STRATIL, A., TOMASEK, V., BOBAK, P. et GLASNAK, V. (1984), Anim. Blood. Grps. Biochem. Genet., 15, 89-101 (19)
- STRICKLAND, D.K., HAMILTON, J.W. et HUDSON, B.G. (1979) Biochemistry, 18, 2549-2554, (108)
- STRICKLAND, D.K. et HUDSON, B.G. (1978) Biochemistry, 17, 3411-3418, (108)
- SULLIVAN, A.L., GRASSO, J.A. et WEINTRAUB, L.R. (1976) Blood, 47, 133-144 (43)
- SURGENOR, D.M., KOEHLIN, B.A. et STRONG, L.E. (1949) J.Clin.Inv., 28 73 (22)
- SUSSMAN, H.H., STEIN, B.S. et TSAVALER, L. (1985) dans "Proteins of iron storage and transport" (Spik, G., Montreuil, J., Crichton, R.R., and Mazurier, J. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp 143-153 (43,47)
- SUTHERLAND, R., DELIA, D., SCHNEIDER, C., NEWMAN, R., KEMSHEAD, J. et GREAVES, M. (1981), Proc.Natl.Acad.Sci.US, 78, 4515-4519 (39)
- SUTTON, M.B. et BREW, K. (1974) Biochem. J., 139, 163 (5)
- TAN, A.T. et WOODWORTH, R.C. (1969) Biochemistry, 819, 3711-3716 (22)
- TAN, A.T. et WOODWORTH, R.C. (1970), J. Polymer. Sci., Part C, pp 599-606 (26)
- TAVASSOLI, M., KISHIMOTO, T., SODA, R., KATAOKA, M. et HARJES, K. (1986) Exp.Cell Res., 165, 369-379 (53)
- TEPPO, A.M. et MAURY, C.P.J. (1983), Clin.Chim.Acta, 129, 279-286 (4)
- TEUWISSEN, B., MASSON, P.L., OSINSKI, P. et HEREMANS, J.F. (1972), Eur. J.Biochem., 31, 239-245 (22)
- THORSTENSEN, K. et ROMSLO, I. (1984) in: Peeter, H. (Ed.), "Protides of the biological Fluids" 31, pp 87-90 (25)
- TOMIMATSU, Y., KINT, S. et SCHERER, J.R. (1973) Biochem.Biophys.Res. Commun., 54, 1067 (26)
- TOMIMATSU, Y. et VICKERY, L.E. (1972), Biochim. Biophys. Acta., 285, 72-83 (11)
- TROWBRIDGE, I.S. et DOMINGO, D.L. (1981), Nature, 294, 171-173 (39)
- TROWBRIDGE, I.S. et O'MARY, M.B. (1981) Proc.Natl.Acad.Sci.US 78, 3039-3043 (39)
- TSAVALER, L., STEIN, B.S. et SUSSMAN, H.H. (1986), J. Cell. Physiol., 128, 1-8 (39)
- TSUNOO, H. et SUSSMAN, H.H. (1983) J.Biol.Chem., 258, 4118-4122, (135)
- TURNBULL, A. (1974) in "Iron in Biochemistry and Medicine" Jacobs A. et Worwood (Ed.), Acad. Press. London, pp 370-404 (34)
- TYCKO, B. et MAXFIELD, F.R. (1982), Cell, 28, 643-651 (45)
- ULVIK, R.J. (1981), FEBS. Lett., 132, 281-284 (49)

- ULVIK, R.J. et ROMSLO, I. (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, 635, 457-469 (25,49)
- UZAN, G., FRAIN, M., PARK, I., BESMOND, C., MAESSEN, G., TREPAT, J.S., ZAKIN, M.M. et KAHN, A. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 119, 273-281 (5)
- VAHLQUIST, A., RASK, L., PETERSON, P.A. et BERG, T. (1975), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 35, p 569 (4)
- VAN BOCKXMEER, F., HEMMAPLARDH, D. et MORGAN, E.H. (1975), "Proteins of Iron storage and transport in Biochemistry and Médecine", Crichton, R.R. (Ed) North Holland Amsterdam. p 111-119 (38,53)
- VAN BOCKXMEER, F.M. et MORGAN, E.H. (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, 584, 76-83 (51)
- VAN DER HEUL, C., KROOS, M.J. et VAN EIJK, H.G. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, 511, 430-441 (43)
- VAN EIJK, H.G., DIJK, J.P., VAN NOORT, W.L., LEIJNSE, P. et MONFOORT, C.H. (1978), *Scand. J. Haematol.*, 9, 267-270 (29)
- VAN SNICK, J.L., MARROWETZ, B. et MASSON, P.L. (1977), *J. Exp. Med.*, 146, 817-827 (34)
- VENTURA, M., BASTOS-ARAGAO, J. et IKEMOTO, H. (1973) *An. Acad. Brasil. Liène*, 43, 450-452 (11)
- WADA, H.G., HASS, P.E. et SUSSMAN, H.H. (1979a), *J. Biol. Chem.* 254, 12629-12635 (38,39,130,137)
- WADA, H.G., HASS, P. et SUSSMAN, H.H. (1979b) *J. Supramol. Struct.*, 10, 287-305 (38)
- WALL, D.A., WILSON, G. et HUBBARD, A. (1980), *Cell*, 21, 79-93 (45)
- WALSH, R.J., THOMAS, E.D., CHOW, S.K., FLUNARTY, R.G. et FINCH, A. (1949), *Science*, 110, 396-398 (37)
- WANG, A.C., SUTTON, H.E. et RIGGS, A. (1966), *Am. J. Human. Genet.*, 18, 454-458 (10)
- WARD, J.H., JORDAN, I., KUSHNER, J.P. et al. (1984), *J. Biol. Chem.*, 259, 13235-13240 (51)
- WARD, J.H., KUSHNER, J.P. et KAPLAN, P. (1982), *Biochem. J.*, 208, 19-26 (51)
- WARIN, Y., BAERT, F., FOURET, R., STRECKER, G., SPIK, G., FOURNET, B. et MONTREUIL, J. (1979), *Carbohydr. Res.*, 76, 11-22 (16)
- WARNER, R.C. et WEBER, I. (1953), *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 5094-5101 (23,26)
- WEBB, P.D., EVANS, P.W., MOLLOY, C.M. et JOHNSON, P.M. (1985), *Amer. J. Immunol. Microb.*, 8, 113-119, (135)
- WEIEL, J.E. et HAMILTON, T.A. (1984), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 119, 598-602 (50)

- WILLIAMS, J. (1974), *Biochem. J.*, 141, 745-752 (11)
- WILLIAMS, J. (1975), *Biochem. J.*, 149, 237-244 (13)
- WILLIAMS, J., CHASTIEEN, N.D. et MORETON, K. (1982a), *Biochem. J.*, 201, p 527 (29)
- WILLIAMS, J., ELLEMAN, T.C., KINGSTON, J.B., WILKINS, A.G. et KUHN, K.A. (1982b), *Eur. J. Biochem.*, 122, 297-303 (8,9)
- WILLIAMS, J. et MORETON, K. (1980), *Biochem. J.*, 185, 483 (29)
- WILLINGHAM, M.C., HANOVER, J.A., DICKSON, R.B. et PASTAN, I. (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 175-179 (45)
- WILLINGHAM, M.C. et PASTAN, I. (1980), *Cell*, 21, 67-77 (45)
- WINDLE, J.J., WIERSEMA, A.K., CLARK, J.R. et FEENEY, R.E. (1963), *Biochemistry*, 216, 1341-1346 (22)
- WIXOM, R.L., PRUTKIN, L. et MUNRO, H.N. (1980), *Intern. Rev. Exp. Pathol.*, 22, 193 (32)
- WONG, K.L., DEBANNE, M.T., HATTON, M.W.C. et REGOECZI, E. (1978), *Int. J. Peptide Protein. Res.*, 12, 27-37 (18)
- YAMASHIRO, D.J., TYCKO, B., FLUSS, S.R. et MAXFIELD, F.R. (1984), *Cell*, 37, 789-800 (47)
- YANG, F., LUM, J.B., Mc GILL, J.R., MOORE, C.M., NAYLOR, S.L., VAN BRAGT, P.U., BALDWIN, W.D. BOWMAN, B.H. (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 2752-2756 (5)
- YOUNG, S.P., BOMFORD, A. et WILLIAMS, R. (1983), *J. Biol. Chem.*, 258, 4972-4976 (19)
- ZAPOLSKI, E.J., GANZ, R. et PRINCIOTTO, J.V. (1974) *Am. J. Physiol.*, 226, 334-339, (78)
- ZERIAL, M., HUYLEBROECK, D. et GARLOFF, H. (1987) *Cell*, 48, 147-155 (41)
- ZWEIR, J.L. (1978), *J. Biol. Chem.*, 253, 7616-7621 (22,27)
- ZWEIR, J.L. (1983), *J. Biol. Chem.*, 258, 13759-13760 (26)
- ZWEIER, J.L. et AISEN, P. (1977), *J. Biol. Chem.*, 252, 6090-6096 (26)

APPENDICE TECHNIQUE

I. PREPARATION DES TRANSFERRINES

A- PREPARATION DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN

1- Prélèvement du sang et obtention du plasma.

30 litres de sang de Lapin sont recueillis, dans un abattoir local, directement dans le sérum physiologique, à raison de 10.000 unités par litre de sang. Le sang hépariné est immédiatement centrifugé à 1.500 g dans une centrifugeuse Beckman (type J21) et le plasma est récupéré par aspiration sous vide, puis dialysé 4 jours contre de l'eau désionisée et lyophilisé.

2- Précipitation au rivanol.

A 500g de plasma lyophilisé, dissout dans 7,5l de sérum physiologique, sont ajoutés 22,5 l de tampon Tris-Hcl (Tris, hydroxyméthyl amino méthane, sous forme chlorhydrate) 5mM, pH 8,8, et 50ml d'une solution de chlorure ferrique (2,32 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ / l de citrate de sodium 0,1 M, bicarbonate de sodium 0,1M, pH 8,6) pour saturer en fer la sérotransferrine et ainsi la stabiliser pendant les étapes du fractionnement.

A cette solution sont ajoutés, goutte à goutte, 30 l d'une solution de rivanol (lactate de 6,9 diamino-2-éthoxy-acridine) à 0,6 p.100 (p/v) dans le tampon Tris précédent. L'addition est effectuée pendant la nuit sous agitation mécanique. Après centrifugation à 8.000 g, 20 min. le surnageant est additionné de chlorure de sodium de manière à obtenir une concentration finale de 5 % La solution est laissée reposer une nuit, et le précipité de rivanol est éliminé par centrifugation et filtration sur papier. Le filtrat est dialysé contre de l'eau désionisée et lyophilisé.

3. Précipitations au sulfate d'ammonium.

La fraction rivanolique lyophilisée est ensuite dissoute dans l'eau distillée froide à raison de 20 g/l, et le sulfate d'ammonium est ajouté, sans agitation, jusqu'à une concentration finale équivalente à 55 % de saturation (soit 33 g à ajouter à 100 ml de solution). Cette solution est laissée sous agitation pendant une nuit, puis le précipité est éliminé par centrifugation (5.000g, 20 minutes). Le volume du surnageant est mesuré, et le sulfate d'ammonium est à nouveau ajouté, sous agitation, jusqu'à une concentration finale équivalente à 70 % de saturation (soit 11 g supplémentaires de sulfate d'ammonium pour 100ml de solution). Après un repos d'une nuit le précipité est récupéré par centrifugation, redissout dans l'eau distillée et dialysé 4 jours contre de l'eau désionisée puis lyophilisé.

4. Chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Séphadex

8g du précipité 70 % 100 de saturation en sulfate d'ammonium sont dissouts dans 150ml de tampon Tris-Hcl 50 mM, pH 8,5 et déposés sur une colonne de DEAE-Séphadex A-50 (7,5x45 cm) équilibrée

dans le même tampon. L'élution est réalisée par un gradient discontinu en chlorure de sodium de 0 à 0,2 M dans le même tampon. Le débit de la colonne est de 100 ml/h et la taille des fractions collectées est de 8 ml. Le développement de la chromatographie est suivi par mesure de l'absorbance à 280 nm. Chaque fraction est dialysée contre de l'eau désionisée et lyophilisée.

5. Chromatographie d'échange d'ions sur SP-Séphadex.

La fraction renfermant la sérotransferrine de Lapin est dissoute dans le tampon citrate de sodium 20 mM, pH 5,0, à raison de 1g/100 ml de tampon, et déposée sur une colonne de SP-Séphadex C-50 (sulfo propyle) (3,8 x 17 cm) équilibrée dans le même tampon.

Le développement de la chromatographie est suivi par enregistrement de l'absorbance à 280 nm. Après lavage de la colonne par le tampon de départ jusqu'à ce que l'absorbance soit revenue à la ligne de base, l'élution est réalisée par un gradient continu de pH 5 à 6 dans le tampon citrate de sodium 20 mM (0,5l de chaque).

Les fractions renfermant de la sérotransferrine de Lapin sont ajustées à pH 5 par de l'acide citrique 1M et rechromatographiées sur SP-Séphadex dans les mêmes conditions. Chaque fraction est ensuite dialysée contre de l'eau désionisée et lyophilisée.

6. Chromatographie d'affinité sur Con A-Sépharose.

Les fractions issues de la chromatographie sur SP-Séphadex peuvent subir une ultime étape de purification sur ConA-Sépharose (Concanavalline A, Pharmacia Fine Chemicals).

100 mg de sérotransferrine de Lapin purifiée sont déposés dans 2,5ml de tampon Tris-HCl 10mM, NaCl 1M, CaCl₂ 1mM, MnCl₂ 1mM et MgCl₂ 1mM, de pH 7,2, sur une colonne de Con A-Sépharose (1,6x60 cm) équilibrée dans le même tampon. Le développement de la chromatographie est suivie par enregistrement de l'absorbance à 280 nm, et après élution du pic éventuellement non retenu, les produits fixés sont élués par le même tampon renfermant de l' α D-méthylglucoside 50 mM.

7. Chromatographie d'échanges d'ions F.P.L.C.

Les fractions non retenues sur la colonne de Con A sont repurifiées en F.P.L.C. ("Fast Protein Liquid Chromatography") sur une colonne Mono-S (Pharmacia) dont le groupement échangeur de cations est un groupement sulfo-propyle. La F.P.L.C. est une variante de la chromatographie liquide à hautes performances, adaptée au fractionnement rapide de protéines à faible pression (<10 bars).

20 mg de la fraction non retenue sur Con A sont injectés sur une colonne Mono-S (HR 5x5) à un débit de 1ml/min. dans un tampon A (acétate de sodium 50 mM, pH 4,5). Après un lavage de 5 min. la colonne est éluée par un gradient discontinu en tampon B (acétate de sodium 50 mM, NaCl 0,5 M, pH 4,5) réalisé par mélange de A et de B (10%, 20%, 30%, 40% et 100% de B).

B PREPARATION DES VARIANTS GLYCANNIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE.

La sérotransferrine humaine provient de la firme Behringwerke (Marburg, R.F.A) et est fractionnée sur Con A-Sépharose.

4g de sérotransferrine humaine sont saturés en fer selon le protocole décrit p. 4 , puis dialysés contre le tampon A (acétate de sodium 5mM, NaCl 1M, MgCl₂ 1mM, MnCl₂ 1mM, CaCl₂ 1mM, pH 6,9) et déposés sur une colonne de Con A-Sépharose (3,5x60 cm) équilibrée dans le tampon A. L'éluion est d'abord réalisée par le tampon d'équilibrage à un débit de 40 ml/h (10ml/ fraction) jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm soit revenue à la ligne de base, puis la fraction retenue est éluée par le tampon A supplémenté en α -méthyl-D-glucoside 15 mM. Après dialyse contre de l'eau désionisée et lyophilisation chaque fraction est analysée par électrophorèse d'immuno-affinité bidimensionnelle en présence de Con A (p.16) et rechromatographiée sur Con A-Sépharose si nécessaire.

II - ETUDE DES SITES DE FIXATION DU FER DES SEROTRANSFERRINES.

A - Saturation en fer.

1. Préparation des chélates ferriques.

Le citrate ferrique est préparé dans un rapport fer/citrate de 1 : 14, afin d'obtenir essentiellement du Fe III-dicitrate, selon la méthode d'Azari et Baugh (1967):

260 mg de FeCl₃(6H₂O) sont dissouts dans 100 ml de tampon citrate de sodium 0,1M, bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 8,2. La quantité de fer présente dans cette solution est déterminée par dosage colorimétrique à la sulfobathophenanthroline et varie de 0,37 à 0,42 mg/ml. suivant les préparations.

Le complexe Fe III-NTA (nitrilotriacétate) est préparé dans un rapport 1:3 de la manière suivante :

- solution A = solution d'acide nitrilotriacétique dans l'eau distillée, amenée à pH 7,5 par la soude 0,1M et ajustée à la concentration finale de 0,67 mg/ml.

- solution B = FeCl₃(6H₂O) à 7mg/ml dans l'eau distillée.

- solution C = complexe FeIII-NTA obtenu en mélangeant extemporanément 3 V de A et 2 V de B . Dans ces conditions la quantité de fer présente dans cette solution, déterminée par dosage colorimétrique, varie de 0,41 à 0,45 mg/ml suivant les préparations.

2. Détermination de la capacité totale de fixation du fer des sérotransferrines.

250 mg d'aosérotransferrine sont dissouts dans 25ml de tampon citrate-bicarbonate de sodium 01M, pH 8,2 et répartis par fraction de 2ml dans des tubes à hémolyse. Des quantités croissantes , par 10 μ l, de la solution d'Azari sont ajoutées à chaque tube . Après homogénéisation, la mesure des absorbances à 460 nm est effectuée, après une nuit à l'obscurité, contre un blanc contenant les mêmes quantités de solution d'Azari. La courbe A-460 nm en fonction du volume de citrate ferrique permet de déterminer la quantité de fer fixée par les sérotransferrines à saturation.

La quantité de fer fixée est également déterminée, après élimination du fer non fixé par passage sur une résine BIORAD AG 1x4 (200 x 400 mesh), par dosage colorimétrique du fer.

3. Saturation en fer des sérotransferrines en fonction du pH.

A 1,2 ml de différentes solutions de tampon citrate 0,05 M, de pH variant de 2,7 à 7,5 (préparées à l'aide de pourcentages différents de citrate trisodique et d'acide citrique), sont ajoutés 0,3 ml d'une solution de bicarbonate de sodium 0,1M, puis 0,5 ml d'une solution d'aposérotransferrine à 20 mg/ml dans l'eau.

Après mélange et repos d'une nuit à température ambiante, 80 µl d'une solution de citrate ferrique à 0,384 mg/ml sont ajoutés, les tubes sont mélangés et laissés, pour fixation du fer, de 24 à 72h à température ambiante et à l'obscurité. Les pH et les absorbances à 460 nm de chaque solution sont alors mesurés.

4. Saturation des sérotransferrines.

a. Par le citrate ferrique.

A une solution d'aposérotransferrine à 10mg/ml dans un tampon citrate 0,1M, bicarbonate 0,1M, pH 8,2, est ajoutée la solution de citrate ferrique à raison de 1,6 µg de fer/mg de sérotransferrine (soit environ 42 µl de la solution à 0,384 mg/ml pour 1 ml de solution de transferrine). Cette quantité correspond environ à 110% de la quantité maximale théorique. Les solutions sont laissées une nuit à température ambiante puis le fer en excès est éliminé par passage sur une colonne AG 1x4 à raison de 1ml de résine pour 10 mg de transferrine, équilibrée en bicarbonate 0,05M.

Les solutions partiellement saturées en fer à 30% et 60% sont préparées de manière identique dans un tampon citrate-bicarbonate de sodium 0,05M de pH 8,2, avec des quantités de citrate ferrique correspondant à 30 et 60% de la quantité maximale théorique.

b. Par le complexe FeIII-NTA.

A une solution d'aposérotransferrine à 10mg/ml dans un tampon Tris-HCl 0,1M, bicarbonate de sodium 0,05 M de pH 7,5 est ajoutée la solution de complexe FeIII-NTA, en quantité équivalente à 110% de saturation en fer, soit 37 µl d'une solution à 0,43 mg/ml pour un ml de solution de transferrine.

La solution est laissée une nuit à température ambiante puis le fer en excès est éliminé de la même manière que précédemment, par chromatographie sur résine AG 1x4 équilibrée dans le même tampon.

Les solutions partiellement saturées en fer sont préparées de la même manière, à l'exception de la quantité de fer ajoutée, soit 30%, soit 60% de la capacité théorique.

B - Désaturation en fer des sérotransferrines.

1. En fonction du pH et des chélateurs.

Les désaturations en fer ont été réalisées en mélangeant 0,4 ml de solution à 25mg/ml dans l'eau distillée, de sérotransferrine saturée en fer, à 1,6 ml de différents tampons de désaturation, soit citrate-bicarbonate, soit phosphate-acétate, soit cacodylate, de pH final variant de 4,0 à 8,8.

- Les tampons citrate-bicarbonate utilisés sont des tampons citrate de sodium acide-citrique 0,03M, bicarbonate de sodium 0,15M, de force ionique 0,08, obtenus avec différents pourcentages de citrate et d'acide citrique, les pH de ces tampons varient de 3,9 à 8,6, et après addition de transferrine et 72h de désaturation, de 4,7 à 8,8.

- Les tampons phosphate-acétate utilisés sont obtenus par mélange de 1 volume de tampon phosphate 25 mM de pH 7,0 et de 1 volume de différents tampons acide acétique-soude de force ionique 0,05 obtenus par différents pourcentages d'acide acétique et de soude. La force ionique de ces tampons est 0,05, et leurs pH varient de 3,9 à 6,9 avant addition de sérotransferrine et de 4,4 à 7,45 après addition de la protéine et 72h de désaturation.

- Les tampons cacodylates utilisés sont obtenus par mélange de cacodylate de sodium 0,2M, HCl 0,2M et d'eau de manière à obtenir des tampons 0,1M en cacodylate, de force ionique constante 0,08 et de pH variant de 4,8 à 7,35 sans addition de sérotransferrine, à des valeurs comprises entre 4,98 et 7,22 après addition de sérotransferrine et 72h de désaturation.

Après des temps variant de 24h à 72h les solutions de sérotransferrine dans les différents tampons de désaturation sont analysées pour mesure du pH et l'absorbance à 460 nm.

2. Cinétiques de désaturation en fer, en fonction du temps, du pH et de la nature des ions.

Les différents tampons de désaturation, à force ionique constante sont obtenus par mélange de :

- 1,2 ml de tampon phosphate de force ionique 0,1, et de pH variant de 5,8 à 8,0, réalisé à partir de KH_2PO_4 0,05 M et de Na_2HPO_4 0,05M.

- 0,3 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M de pH 8,6

- 0,1 ml d'une solution de sel disodique d'EDTA 0,05 M permettant ainsi de réaliser une gamme de pH variant de 6,85 à 8,55.

Après addition de 0,4 ml d'une solution d'aposérotransferrine à 20 mg/ml dans l'eau distillée, les solutions sont laissées au repos pendant des temps variant de 0 à 120h. Les pH et les absorbances à 460nm de ces solutions sont analysées en fonction du temps.

C - Carbéthoxylation des résidus histidine.

La sérotransferrine humaine provient de la firme Beringwerke. Elle renferme moins de 2% de sa capacité totale de fixation, et sera utilisée comme apo transferrine.

La sérotransferrine de Lapin, préparée comme il est décrit p. 2 est aussi considérée sous forme apo, la quantité de fer présente dans cette préparation étant inférieure à 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéine et non dosable.

1. Action du diéthyl-pyrocarbonate.

a) Sur la N-acétyl histidine.

Une solution de N-acétyl-histidine à 14 $\mu\text{g/ml}$ (70,4 μM) dans le tampon phosphate de sodium 0,1M, KCL 0,05M de pH 6,1 est répartie en fraction de 3ml.

Le diéthyl-pyrocarbonate (DEP) liquide de densité 1,12 est ajouté de manière à obtenir des concentrations finales en réactif variant de 0 à 23mM. Pour les faibles quantités de réactif, celui-ci est préalablement dilué dans l'éthanol pour ne pas diminuer la précision du prélèvement.

Après 50 minutes de réaction à température ambiante, les différentes fractions sont analysées en différence de spectre UV, entre 320 et 230 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre CARY 219. Les cuves utilisées sont en quartz, à double compartiment de trajet optique 0,432 cm. Dans la cuve échantillon les solutions de N-acétyl histidine et de DEP à différentes concentrations sont réparties dans les deux compartiments, alors que dans la cuve témoin, une solution de N-acétyl histidine à 28 $\mu\text{g/ml}$ et une solution de DEP renfermant des quantités de réactifs équivalents à l'échantillon sont réparties dans des compartiments différents.

La carbéthoxylation est quantifiée par la variation de ϵ -240nm.

b) Sur les aposérotransferrines.

Le protocole utilisé est sensiblement le même : Les solutions d'aposérotransferrines sont de 0,8 mg/ml dans le tampon de pH 6,1 (10 μM), la quantité étant calculée en utilisant l'absorbance de solutions à 280 nm : $A = 1,1 \text{ l.g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour la sérotransferrine humaine et $A = 1,08 \text{ l.g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour la sérotransferrine de Lapin. Les concentrations finales en DEP varient de 0 à 25 mM, et les quantités d'éthanol pour les faibles concentrations ne dépassent jamais 1% (v/v) dans la solutions protéique.

Les solutions sont laissées 50 min. à température ambiante, et une fraction aliquote est prélevée pour l'analyse en différence de spectre, le reste est dessalé sur une colonne de Séphadex-G25 (PD-10, Pharmacia) équilibrée dans le tampon de saturation en fer, (citrate de sodium 0,1M, bicarbonate de sodium 0,1M de pH 8,2).

Pour la détermination des constantes de vitesse, à faible molarité en réactif, la cinétique de réaction est suivie pendant 1h à 240 nm au spectrophotomètre, après mélange au temps 0, dans la cuve à double compartiment échantillon d'une solution d'apo-sérotransferrine et d'une solution de DEP de manière à obtenir une concentration finale de 2mM en réactif, et 10 μM en transferrine.

La carbéthoxylation des aposérotransferrines en milieu dénaturant est conduite selon le même protocole, à l'exception d'addition d'urée dans le tampon de pH 6,1 de manière à obtenir des concentrations variant de 0 à 8M, les solutions étant laissées 1h à température ambiante avant l'addition du DEP.

2. Régénération des résidus d'histidine carbéthoxylés

Les solutions de transferrines modifiées en absence d'agent dénaturant ou en présence d'urée, sont dessalées sur des colonnes

de Séphadex G-25 (PD 10) équilibrées dans le tampon phosphate, KCl de pH 6,1. La déacylation des transferrines modifiées est réalisée par addition d'hydroxylamine 4M dans le même tampon de manière à obtenir une concentration finale de 0,8 M en hydroxylamine.

Après incubation pendant 15h à température ambiante, les solutions traitées à l'hydroxylamine sont déssalées sur colonne de Séphadex G25 (PD 10), stabilisées dans le tampon de saturation en fer (citrate de sodium 0,1M, bicarbonate de sodium 0,1M de pH 8,2)

3. Capacité de fixation du fer des transferrines modifiées.

La capacité de fixation du fer des transferrines carbéthoxylées ou déacylées est déterminée dans le tampon de saturation de pH 8,2, par addition de $FeCl_3$ à 0,4 mg de fer/ml dans le même tampon, et renfermant 8 μ g de fer/ml (mélange de fer-59 et fer-57, dans un rapport 10:90, préparé comme il est décrit p.17.

Les quantités de fer ajoutées correspondent à 110% de la saturation théorique, soit environ 1,6 μ g de fer/ml de transferrine.

Les solutions sont laissées 3h à température ambiante puis l'excès de fer est éliminé par chromatographie d'échange d'ions sur 0,5ml de résine Dowex 1x4 (200-400 mesh; forme Cl⁻), résine qui possède la propriété de fixer avec une très grande affinité le fer chélaté par le citrate, et non le fer fixé sur les transferrines.

La radioactivité des transferrines marquées au fer-59 est mesurée et les résultats sont exprimés en pourcentage de fer radioactif, fixé à la protéine, par rapport aux témoins non modifiés ayant subi les mêmes étapes. La quantité exacte de transferrine est mesurée avant l'addition de fer, en utilisant les absorbances spécifiques des apotransferrines.

III- HYDROLYSES PROTEASIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN

A-Protéolyse ménagée de la sérotransferrine de lapin: isolement des domaines.

1. Préparation de la sérotransferrine

150 mg de sérotransferrine de Lapin diférique sont partiellement désaturés, pendant 48h dans 7,5ml de tampon phosphate-Tris-EDTA à pH7,8 selon le protocole décrit p. 5. La solution de sérotransferrine de Lapin ainsi préparée est déssalée sur une colonne de Séphadex G-25 (2,1x15 cm) équilibrée dans un tampon Tris HCl 0,05M, $CaCl_2$ 0,02M, pH 7,8.

2. Hydrolyse ménagée par la trypsine et la chymotrypsine

Une quantité de trypsine (SIGMA, 2 x cristallisée) ou de α -chymotrypsine (MILES Laboratories), activée pendant 30 min. dans l'acétate de calcium 0,1M, et correspondant à 3% (p/p) de la quantité de sérotransferrine, est alors ajoutée. La solution est incubée sous agitation à 37°C, pendant des temps variant de 1 à 8h. L'hydrolyse est arrêtée par abaissement du pH à 4,5 par de l'acide acétique.

3. Fractionnement des hydrolysats

L'hydrolysats trypsique ou chymotrypsique est chromatographié sur une colonne d'Ultrogel AcA-44 (2,1x120 cm) équilibrée en bicarbonate d'ammonium 20 mM, à un débit de 12 ml/h (fractions de 3ml). Les fractions correspondant à chaque pic, détecté en UV à 280 nm, sont rassemblées, dialysées et lyophilisées.

Les différents pics obtenus sont purifiés soit par une deuxième chromatographie de tamisage moléculaire, soit par une chromatographie d'échange d'ions sur une colonne de DEAE-Trisacryl (1,6 x25cm) équilibrée dans un tampon Tris-HCl 0,1M, NaCl 1M, MnCl 1mM, MgCl 1mM, CaCl 1mM, pH7,2. L'élution est réalisée par le même tampon supplémenté en α -méthyl-D-glucoside 40mM.

B- Protéolyse totale de la sérotransferrine de lapin - Isolement des glycopeptides.

1- Hydrolyse protéasique

a) Hydrolyse pronasique.

L'hydrolyse pronasique et la préparation de la fraction glycopeptidique ont été réalisées selon le procédé de Yamashina et Makino (1962) modifié par Monsigny et al. (1968).

A 500 ml d'une solution à 1p100 d'aposérotransferrine de lapin dans un tampon (Tris-HCl 10mM, acétate de calcium 10mM, de pH 7,8, sont ajoutés 100mg de Pronase P.

L'hydrolyse est effectuée à 37°C sous agitation, pendant 48 h. Le pH est maintenu constant par l'addition de soude 0,15M à l'aide d'un titrateur automatique (pH-stat TTIC Radiometer).

L'hydrolysats est ensuite ajusté à pH 4,5 par l'acide acétique, puis concentré à 10ml à l'aide d'un évaporateur rotatif et précipité par 9 volumes d'éthanol froid par volume d'hydrolysats, et laissé une nuit à 4°C.

Le précipité recueilli par centrifugation est redissout dans 250ml de tampon d'hydrolyse et soumis à une nouvelle hydrolyse pronasique dans les mêmes conditions.

Un troisième cycle d'hydrolyse pronasique est réalisé, le précipité éthanolique obtenu à la fin du troisième cycle représente la "fraction glycopeptidique totale".

b- Hydrolyse trypsique.

L'hydrolyse trypsique a été réalisée sur la sérotransferrine de Lapin après rupture des ponts disulfures et blocage des cystéines sous forme de S-carboxyméthylée.

1,5g d'aposérotransferrine réduite et alkylée, selon le procédé de Crestfield et al. (1963) sont remis en suspension dans 75ml de bicarbonate d'ammonium 0,1M à pH 8,2.

L'hydrolyse est réalisée à 37°C, par addition de 30 mg de trypsine (Worthington), à pH maintenu constant par de la soude 0,1M. Une deuxième addition de 30mg de trypsine est réalisée après 4h d'incubation, et l'hydrolyse est arrêtée au bout de 8h par abais-

sement du pH à 5- par de l'acide acétique glacial. L'hydrolysate est ensuite concentré à 5ml à l'aide d'un évaporateur rotatif.

2. Fractionnement des hydrolysats proteasiques totaux

a) Fractionnement des hydrolysats pronasiques.

La fraction glycopeptidique totale est redissoute dans 45ml d'eau distillée et la solution obtenue est additionnée d'un volume égal d'acide trichloroacétique (ATCA) à 10% et maintenue pendant une nuit à 4°C.

Le précipité formé est éliminé par centrifugation, et la solution surnageante est purifiée par passage successif sur colonnes (2x35cm) d'échangeur de cations (Dowex 50x8; 50-100 mesh; forme H⁺), puis d'échangeur d'anions (Dowex 1x8; 50-100 mesh; forme HCOO⁻), stabilisées dans l'eau distillée.

L'effluent neutre est concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif puis injecté sur une colonne de Séphadex-G25 (2x100 cm), stabilisée dans l'eau distillée.

Le repérage dans l'effluent fractions enrichies en glycopeptides est effectué par la méthode au phénol-sulfurique de Dubois et al. (1956).

b) Fractionnement des hydrolysats tryptiques.

L'hydrolysate tryptique (5ml) est chromatographié sur une colonne de Séphadex G-50 (2,7x80), stabilisée dans l'eau distillée. Le repérage des fractions enrichies en glycopeptides est réalisé par la méthode au phénol-sulfurique.

3. Purification des glycopeptides par électrophorèse.

a) Electrophorèse à basse tension.

Les fractions enrichies en glycopeptides, sont soumises à une électrophorèse préparative "en toit", sur papier Whatman n°3, à raison de 1mg de fraction par cm de dépôt.

Les électrophorèses sont réalisées à pH 2,4 en acide acétique 0,1M, pendant 15heures sous une tension de 10V/cm.

Après séchage du papier les peptides sont repérés par révélation au réactif à la ninhydrine-Cadmiun, et les glycopeptides par révélation au réactif à l'acide périodique-benzidine, (Montgomery et Wu, 1963). Les bandes contenant les glycopeptides sont éluées par de l'eau distillée contenant 0,1% d'acide formique et les éluats sont lyophilisés.

b) Electrophorèse à Haute tension.

Les fractions glycopeptidiques provenant de l'électrophorèse à basse tension peuvent être soumises à une électrophorèse à haute tension sur papier Whatman n°1. L'électrophorèse est réalisée en tampon pyridine/eau/acide acétique (25/225/1) de pH 6,5, pendant 75 minutes à 100 V/cm. Le repérage et l'éluotion des glycopeptides sont réalisés comme précédemment

C) Dessalage sur Bio-Gel-P2.

Les éluats lyophilisés sont repris par le minimum d'eau distillée et chromatographiés sur une colonne de Bio-Gel-P2 (1,1x50cm) équilibrée dans l'eau distillée, et les fractions positives à la révélation à l'orcinol sont filtrées sur filtre d'acétate de cellulose 0,45µm (Millipore) puis lyophilisées.

4. Cinétique d'hydrolyse par la trypsine = dosages des groupements aminés libérés

La cinétique d'hydrolyse par la trypsine de la sérotransferrine de Lapin native et déglycosylée a été suivie par dosage des groupements aminés, nouvellement libérés par la coupure protéolytique, par la méthode de Habeeb (1966).

Les sérotransferrines à 10mg/ml dans du bicarbonate de sodium à 4 %, pH 8,5 sont incubées à 37°C en présence de 100mg de trypsine.

Des fractions aliquotes de 50ml sont prélevées entre 0 et 60mn, complétées par 0,95 ml d'eau, 1 ml de bicarbonate à 4 %, 1ml de TNBS (trinitro benzène sulfonate) à 0,1% et laissées 2h dans un bain-marie à 40°C.

Dans chaque tube, 1ml de SDS à 10 % et 0,5 ml d'HCl 1 M sont ajoutés, la solution est homogénéisée doucement et le nombre de groupements aminés libres est déterminé à 342 nm, en utilisant le coefficient d'extinction molaire: $\epsilon = 1.10 \text{ l.M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Le blanc est constitué de la sérotransferrine sans trypsine.

IV- HYDROLYSE DE SEROTRANSFERRINES PAR LES GLYCOSIDASES.

A- Désialylation des sérotransferrines.

La désialylation complète de la sérotransferrine de Lapin est obtenue en recyclant, 24h à 37°C, une solution contenant au maximum 90mg d'aposérotransferrine dans 2ml d'un tampon citrate de sodium 0,1M, pH 5,1, sur une colonne de neuraminidase immobilisée sur agarose (1,6x2cm) provenant de la firme SIGMA.

L'acide N-acétyl neuraminique est séparé de la sérotransferrine de Lapin désialylée par dessalage sur Séphadex G25 équilibré dans un tampon phosphate-citrate de sodium 0,1M, pH 5,0 (pour l'hydrolyse par l'endoglycosidase).

Dans le cas de la sérotransferrine humaine, ou des variants glycaniques, 40mg sont au maximum déposés sur la même colonne, et les asialotransferrines sont purifiées par dessalage sur G25 dans le tampon utilisé pour les incubations avec les cellules.

B- Déglycosylation de la sérotransferrine de lapin.

1. Hydrolyse par l'endo-N-Acétyle-β-D-glucosaminidase

L'enzyme isolée de Basidionyces sporotricum, nous a été fournie par le groupe du professeur S. BOUQUELET.

L'élimination du glycanne désialylé de la sérotransferrine de Lapin, par l'endoglycosidase, est réalisée en recyclant 48h à température ambiante, 1ml de l'éluat de la colonne de neuraminidase

renfermant 15mg d'asialo sérotransferrine , sur une colonne (2,8x 2,5cm) d'endo-N-Acétyle- β -D-glucosaminidase immobilisée sur Sépharose 4B.

La colonne d'endoglycosidase (1,1 mU) est équilibrée dans le tampon phosphate-citrate de sodium 0,1M de pH5,0.

2. Purification de la sérotransferrine de Lapin déglycosylée.

L'effluent de la colonne d'endoglycosaminidase est concentré à 1ml par dialyse sous vide à 4°C (immersible CX-30, MILLIPORE) et appliqué sur une colonne (1,6x25cm) de Con A-Sépharose équilibrée en tampon Tris-HCl 10mM, NaCl 1M et renfermant CaCl₂ 1mM, MgCl₂ 1mM et MnCl₂ 1mM. La colonne est lavée par le tampon de départ jusqu'à ce que l'absorbance à 280nm soit revenue à la ligne de base, puis éluée par le même tampon supplémenté en α -méthyle-D-glucoside 50mM.

V - ANALYSES DE LA PARTIE PROTEIQUE DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN.

A- Ultracentrifugation analytique.

Les masses moléculaires de la sérotransferrine de Lapin, et des domaines isolés de la sérotransferrine de Lapin, ont été déterminées, par équilibre de sédimentation, dans une ultracentrifugeuse analytique BECKMAN (modèle E) équipée du système optique interférentiel de Rayleigh, en utilisant la méthode d'Yphantis (1964) modifiée par Chervenka (1970).

Les ultracentrifugations ont été réalisées à 20°C dans une cellule à double secteur, à une vitesse de 17.000 rpm. Les photographies sont prises après un temps d'équilibre supérieur à 12h. Les équilibres de sédimentation ont été réalisés à plusieurs concentrations, variant de 0,3 à 0,85 mg/ml, dans un tampon Tris-HCl 0,1M, pH7,5.

B- Détermination des séquences peptidiques.

1. Composition molaire en acides aminés.

Les compositions molaires en acides aminés ont été déterminées à l'aide d'un autoanalyseur BECKMAN Multichrom, après hydrolyse acide de la sérotransferrine de Lapin. L'hydrolyse est réalisée en tubes scellés sous vide, par HCl 5,6M bidistillé, pendant des temps variant de 24 à 72h dans une étuve à 105°C.

Le dosage de la cystéine a été déterminé sous forme S-carboxyméthyle cystéine. La réduction des ponts disulfures de la sérotransferrine est effectuée en milieu chlorhydrate de guanidine 6M selon le procédé de Crestfield et al. (1963) et l'alkylation de la cystéine est ensuite réalisée par l'iodoacetamide recristallisé.

2. Détermination des acides aminés N- et C-terminaux

La nature des acides aminés en position N-terminale de la sérotransferrine de Lapin, des domaines isolés et des glycopeptides a été déterminée par dansylation. La dansylation est effectuée selon le protocole décrit par Hartley (1970) et l'identification des acides aminés dansylés, par chromatographie sur couche mince.

renfermant 15mg d'asialo sérotransferrine , sur une colonne (2,8x 2,5cm) d'endo-N-Acétyle-β-D-glucosaminidase immobilisée sur Sépharose 4B.

La colonne d'endoglycosidase (1,1 mU) est équilibrée dans le tampon phosphate-citrate de sodium 0,1M de pH5,0.

2. Purification de la sérotransferrine de Lapin déglycosylée.

L'effluent de la colonne d'endoglycosaminidase est concentré à 1ml par dialyse sous vide à 4°C (immersible CX-30, MILLIPORE) et appliqué sur une colonne (1,6x25cm) de Con A-Sépharose équilibrée en tampon Tris-HCl 10mM, NaCl 1M et renfermant CaCl₂ 1mM, MgCl₂ 1mM et MnCl₂ 1mM. La colonne est lavée par le tampon de départ jusqu'à ce que l'absorbance à 280nm soit revenue à la ligne de base, puis éluée par le même tampon supplémenté en α-méthyle-D-glucoside 50mM.

V - ANALYSES DE LA PARTIE PROTEIQUE DE LA SEROTRANSFERRINE DE LAPIN.

A- Ultracentrifugation analytique.

Les masses moléculaires de la sérotransferrine de Lapin, et des domaines isolés de la sérotransferrine de Lapin, ont été déterminées, par équilibre de sédimentation, dans une ultracentrifugeuse analytique BECKMAN (modèle E) équipée du système optique interférentiel de Rayleigh, en utilisant la méthode d'Yphantis (1964) modifiée par Chervenka (1970).

Les ultracentrifugations ont été réalisées à 20°C dans une cellule à double secteur, à une vitesse de 17.000 rpm. Les photographies sont prises après un temps d'équilibre supérieur à 12h. Les équilibres de sédimentation ont été réalisés à plusieurs concentrations, variant de 0,3 à 0,85 mg/ml, dans un tampon Tris-HCl 0,1M, pH7,5.

B- Détermination des séquences peptidiques.

1. Composition molaire en acides aminés.

Les compositions molaires en acides aminés ont été déterminées à l'aide d'un autoanalyseur BECKMAN Multichrom, après hydrolyse acide de la sérotransferrine de Lapin. L'hydrolyse est réalisée en tubes scellés sous vide, par HCl 5,6M bidistillé , pendant des temps variant de 24 à 72h dans une étuve à 105°C.

Le dosage de la cystéine a été déterminé sous forme S-carboxyméthyl cystéine. La réduction des ponts disulfures de la sérotransferrine est effectuée en milieu chlorhydrate de guanidine 6M selon le procédé de Crestfield et al. (1963) et l'alkylation de la cystéine est ensuite réalisée par l'iodoacetamide recristallisé.

2. Détermination des acides aminés N- et C-terminaux

La nature des acides aminés en position N-terminale de la sérotransferrine de Lapin, des domaines isolés et des glycopeptides a été déterminée par dansylation. La dansylation est effectuée selon le protocole décrit par Hartley (1970) et l'identification des acides aminés dansylés, par chromatographie sur couche mince.

La nature des acides aminés en position C-terminale des glycopeptides tryptiques a été réalisée par dansylation après une cinétique d'action de la carboxypeptidase A (E.C. 3.4.2.1).

3. Détermination des séquences peptidiques.

Les séquences peptidiques N-terminales ont été réalisées par dégradation récurrente (Edman et Begg, 1967) couplée à l'identification des PTH-aminoacides (phényl-thiohydantoïnes) selon le protocole décrit par Han (1970).

C- Analyse par dichroïsme circulaire.

Les analyses en dichroïsme circulaire ont été réalisées à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, avec la collaboration de J.P. Aubert sous la direction de Mme M.H. Loucheux (Directeur de Recherche, CNRS).

Les sérotransferrines avec ou sans fer sont analysées à l'aide d'un dichrographe JOBIN et YVON (R.J. MARK III), à des concentrations de 0.1 p100 dans NaF 0,214 M. La concentration en protéine est déterminée par utilisation des coefficients d'extinction spécifiques à 280nm.

Le trajet optique des cuves est de 0,1mm lors des mesures en U.V. et de 5mm dans le visible.

III. ANALYSES DE LA PARTIE GLUCIDIQUE DES SEROTRANSFERRINES

A- Détermination des compositions centésimales et molaires en monosaccharides.

1. Composition centésimale.

Les oses neutres ont été dosés par les méthodes colorimétriques à l'orcinol-sulfurique de Tillmans et Philippi (1929) modifiée par Rimington (1940) et à l'anthrone-sulfurique de Dreywood (1946), modifiée par Shields et Burnett (1960).

Les osamines ont été dosées par la méthode colorimétrique d'Elson Morgan (1933), modifiée par Belcher et coll. (1954) après hydrolyse acide par HCl 4M à 100°C pendant 4h.

Les acides sialiques sont dosés par la méthode colorimétrique à la diphenylamine de Niazzi et State (1948), modifiée par Werner et Odin (1952).

Les protocoles expérimentaux sont décrits dans la revue générale de Montreuil et Spik (1963).

2. Composition molaire.

Les rapports molaires en monosaccharides ont été déterminés après méthanolyse en présence de méthanol chlorhydrique (0,5M HCl) et analyse des méthyl-glycosides trifluoro-acétylés par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode de Zanetta et al. (1972)

B- Méthylation des glycopeptides.

Les glycopeptides ont été perméthylés par la méthode de Hakomori (1964), modifiée par Sanford et Conrad (1966) puis méthanolysés

(1ml de méthanol chlorhydrique 0,5M à 80°C, 24h).

Les dérivés méthylés sont ensuite identifiés selon Fournet et al. (1974), après péréacétylation (pyridine/anhydride acétique -1:1, 45 min. à 105°C), par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de carbowax 6000 à 3% sur chromosorb W. L'éluion est réalisée en gradient de température de 130°C à 200°C à raison de 2°C/min., à un débit de 20 ml/min.

C- Analyse en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique du proton ont été réalisés sur des solutions renfermant 5 à 10 mM de glycopeptides stabilisés dans D₂O (par échange répété dans D₂O et lyophilisation), à l'aide d'un spectromètre BRUKER HX-360 par l'équipe du Professeur Vliegthart (Utrecht).

Les déplacements chimiques des protons sont donnés par rapport au 2,2-diméthyl-2-silipentane-5-sulphonate de sodium (indirectement par rapport à l'acétone dans D₂O: $\delta = 2,225$ p.p.m.).

L'interprétation des spectres a été rendue possible grâce à l'étalonnage préalable des déplacements chimiques des protons à l'aide de glycopeptides et d'oligosaccharides de structures connues, sialylés ou désialylés, et qui sont rassemblés dans la revue générale de Montreuil et Vliegthart (1978).

VI- ANALYSES ELECTROPHORETIQUES ET IMMUNOLOGIQUES.

A- Electrophorèses.

1. Electrophorèses sur acétate de cellulose.

A chaque étape du fractionnement de la sérotransferrine de Lapin et des fragments obtenus par hydrolyse chymotrypsique ménagée, les fractions sont analysées par électrophorèse sur acétate de cellulose (cellogel) dans le tampon de Laurell (1957) sous une tension de 120 V pendant 90 min.

2. Electrophorèses en gel de polyacrylamide.

a) Electrophorèses en gel de polyacrylamide en S.D.S.

Les différentes étapes du fractionnement de la sérotransferrine de Lapin et des fragments obtenus après l'hydrolyse ménagée ont été analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 7,5% ou à 11% en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS) à 0,1%, selon la méthode de Davis (1964), modifiée par Kerckaert (1978).

b) Electrophorèses en gradient de gel de polyacrylamide en présence de Triton X-100 et de DOC.

Les électrophorèses de protéines membranaires sont réalisées dans un appareil d'électrophorèse verticale en plaques (1,5 x 140 x 180 mm) de marque Biorad, dans le système tampon préconisé par Laemli (1970). Le SDS a été remplacé par un mélange de Triton X-100 et de déoxycholate de sodium (DOC) dans un rapport 3 : 1.

Le gel de séparation est constitué d'un gradient en acrylamide de 4 à 15% dans un tampon Tris, gly de pH 8,6. Le gel de concentration est à 4% en acrylamide dans un tampon Tris, gly de pH 8,6.

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

Les échantillons pour l'électrophorèse sont préparés dans les conditions suivantes: Les membranes plasmiques culotées (50 à 100 μ g de protéines membranaires), non traitées ou préincubées par des agents chaotropiques ou par différentes sérotransferrines, sont solubilisées dans 100 μ l de tampon Tris-Hcl 10mM, pH8,0, 0,75% Triton X-100, 0,25% DOC et 20% saccharose. Les échantillons sont incubés à 37°C pendant 30 min et centrifugés 2 min à 100.000 g dans une centrifugeuse Beckman Airfuge. Les témoins de haute masse moléculaire et les témoins sérotransferrines sont solubilisés dans les mêmes conditions. Approximativement 20 à 40 μ g de protéines membranaires et 5 μ g de témoins sont déposés.

Une pré-électrophorèse est réalisée à 70 V jusqu'à ce que le témoin de migration (bleu de bromophénol) atteigne le gel de séparation. L'électrophorèse est ensuite réalisée à 150 V pendant une nuit.

Les gels sont ensuite transférés par électrophorèse sur nitrocellulose ou colorés par le Noir Amido.

3. Electrotransfert sur nitro-cellulose (Western blotting).

Les échantillons séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de détergents sont transférés par électrophorèse (cellule de transfert Biorad), pendant 3h à 150 mA, sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher et Schultze) de la taille du gel, selon la technique décrite par Towbin et al. (1979)

Les membranes de nitrocellulose sont ensuite révélées par coloration au Noir Amido par détection de l'activité peroxydasique liée aux anticorps.

4. Electrofocalisation en présence d'ampholines.

Les sérotransferrines partiellement saturées en fer, après élimination du fer en excès sont analysées par électrofocalisation en présence d'ampholines, sur gel Ultrodex à l'aide de l'appareil d'électrophorèse LKB 2117 Multiphor, selon la notice d'application LKB n°198, avec quelques modifications mineures.

A la place de Séphadex G-75, nous utilisons l'Ultrodex (gel mieux granulé). 4g de gel Ultrodex en poudre sont mis en suspension dans 100ml de solutions d'ampholines à 20g/l obtenues par mélange d'ampholines de pH 4,0-6,0 et de pH 5,0-7,0, de manière à obtenir un gradient de pH de 4,0 à 7,0.

Les dépôts ne sont pas réalisés par mélange de l'échantillon et du gel, mais par dépôt de 250 μ l de la solution d'échantillon sur une bande de papier W3 de 0,5 x 3 cm, à 3cm de la cathode. Dans ces conditions, il est possible de faire l'électrophorèse de 4 échantillons en même temps.

Avant application des échantillons, une pré-électrophorèse de 1h est réalisée pour préformer le gradient de pH, à 500 V et 50 mA comme conditions de départ. Puis après dépôt des échantillons, l'électrofocalisation est réalisée à puissance constante de 25W, pendant 2h30 jusqu'à ce que les bandes roses de transferrines

soient fines et stabilisées. La tension en fin d'électrophorèse atteint 1200 V. Le gel est ensuite découpé en bandes de 1 cm à l'aide de l'appareil spécial fournit par LKB, puis les portions de gels correspondant à chaque échantillons sont introduites dans des petites colonnes (LKB, 2117-502) et les protéines sont éluées par 3ml d'eau distillée. Le pH et la densité optique à 280nm de chaque fraction sont analysés.

B- Analyses immunologiques.

1. Obtention des immun sérums.

a) Immun sérums commerciaux.

L'immunsérum de chèvre anti-protéides sériques de Lapin provient de la firme CAPPEL.

b) Obtention du sérum de Mouton anti-sérotransferrine de Lapin.

Le sérum de Mouton contenant les anticorps dirigés contre la sérotransferrine de Lapin est préparé par injection intramusculaire à un mouton, de 2ml de sérotransferrine de Lapin purifiée (1 à 2mg/ml dans le sérum physiologique) en présence d'adjuvant de Freund. Les injections sont répétées 4 fois à une semaine d'intervalle. L'animal est laissé au repos pendant un mois puis le cycle est répété. Après un nouveau mois d'attente le sang est prélevé par ponction à la veine jugulaire et l'antisérum est testé par immunodiffusion radiale (Mancini et al., 1965) et son titre est calculé selon la méthode de Becker (1969).

c) Obtention du sérum de Lapin anti-sérotransferrine humaine.

Les immun sérums sont obtenus selon le même protocole par injections répétées de sérotransferrine humaine à des Lapins (Fauve de Bourgogne). Le sang est prélevé à la veine interne de l'oreille et testé de la même manière que précédemment.

d) Purification de la fraction IgG des immun sérums.

La fraction IgG de l'immunsérum est purifiée par dessalage sur une colonne de GF-05 (IBF) équilibrée dans un tampon Tris 20mM, NaCl 35mM, pH8 couplée à une colonne de DEAE-Trisacryl (IBF) équilibrée dans le même tampon selon la méthode préconisée par IBF. La fraction IgG correspond à la première fraction non retenue.

2. Fixation compétitive de la sérotransferrine de Lapin native et deglycosylée sur les anticorps immobilisés.

Des flacons en polypropylène de 5ml sont mis à incuber une nuit à 37°C avec 1ml de fraction IgG anti-sérotransferrine de Lapin, diluée 1:2.000 en Tampon Tris-HCl 20mM, NaCl 1M, pH 7,8 (TBS). Après lavage par 3 x 3 ml de TBS froid, les flacons contenant les IgG adsorbées sont bloqués (pour occuper les sites du polypropylène libres) pendant 2h à 37°C par 1ml de tampon supplémenté en sérum albumine bovine (SAB) à 1%, puis lavés par du TBS froid.

La sérotransferrine de Lapin native, marquée à l'Iode-125 (300

cpm/ng) est incubée à raison de 20ng en présence de 1ml d'une solution renfermant soit la sérotransferrine de Lapin native non marquée, soit la sérotransferrine déglycosylée non marquée, à des concentrations variant de 20 à 300 ng/ml en présence de SAB 1% dans le TBS.

Après 2h d'incubation à 37°C, les flacons sont lavés par 3 x 3 ml de tampon froid et la radioactivité fixée est comptée. Toutes les déterminations sont réalisées en triple. Le 100% de fixation est déterminé à l'aide de flacons sans transferrine non marquée. La fixation non spécifique est déterminée à l'aide de flacons non incubés avec les IgG mais uniquement avec la SAB.

3. Immunoélectrophorèses.

a) Immunoélectrophorèse sur gélose.

Les immunoélectrophorèses sur gélose ont été réalisées selon la méthode de Grabar et Williams (1955) modifiée par Scheidegger (1955) sous une tension de 30 V pendant 90 min. La diffusion est réalisée pendant 24 à 48h contre l'antisérum.

d) Affino-immuno-électrophorèses bidimensionnelles.

Les affino-immuno-électrophorèses ont été réalisées sur gel d'agarose à 1% en présence de concanavaleine A (Con A) dans la première dimension selon les méthodes décrites par Nicoll et al. (1981) et Solier et al. (1980).

Les échantillons contenant de 2 à 10µg de sérotransferrine humaine ou de Lapin sont soumis à l'électrophorèse en absence ou en présence de 1,3 mg de Con A par ml de gel sous une tension de 10V/cm pendant 3h. La deuxième dimension est réalisée pendant une nuit sous une tension de 2V/cm dans un gel d'agarose contenant de 5 à 15µl d'immunsérum spécifique par ml de gel, en présence d' α -méthyl glucoside mM.

4. "Immuno blotting": Révélation immunologique des bandes de nitro-cellulose

Les bandes de nitro-cellulose provenant de l'électrotransfert sont incubées pendant 3h à 4°C avec un antisérum de lapin, anti sérotransferrine humaine (titre 1,7 mg/ml) dilué au 1 : 5000 dans le tampon Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,1M (TBS) supplémenté en lait écrémé en poudre (5% p/V) à pH 7,8.

Les bandes de nitro-cellulose sont ensuite lavées 10 min successivement par du TBS, du Tween 20 à 0,05% (p/V) dans le TBS puis par du TBS. Après lavage les bandes de nitro cellulose sont incubées une nuit à 4°C par des IgG anti-IgG de Lapin, couplés à la peroxydase de radis noir (HRP-IgG) et dilués au 1:5000 dans le TBS contenant 5% de lait en poudre. Après la même procédure de lavage, l'activité peroxydasique liée à la nitro cellulose est révélée.

C- Révélation spécifique de l'activité peroxydasique

1. Réactif à l'o.dianisidine.

La visualisation de l'activité peroxydasique des hémoprotéines est réalisée sur les bandes d'acétate de cellulose par révélation

à l'aide du réactif à l'o.dianisidine dont la composition est la suivante :

- 100mg d'o.dianisidine (3,3'-diméthoxy-benzidine) pour 70ml d'éthanol.
- 10 ml de tampon acétate de sodium 0,1M, pH 7,4.
- 18 ml d'eau distillée.
- 3 ml d'eau oxygénée à 30% (p/p)

Les bandes d'acétate de cellulose sont immergées dans le réactif jusqu'à l'apparition de bandes brun-rougeâtre correspondant aux hémoprotéines (détection de 1 à 5µg d'hémoprotéines).

2. Réactif à la diamino-benzidine.

La composition du réactif à la diamino-benzidine est la suivante:

- 40mg de diamino-benzidine (Merck) pour 100ml de tampon Tris 20mM, NaCl 0,1M, pH 7,8
- 1 ml d'eau oxygénée à 30% (p/p).

L'eau oxygénée est ajoutée juste avant la révélation dans le réactif, à l'obscurité. Puis les bandes de nitro-cellulose incubées avec les IgG marquées à la peroxydase, sont immergées, dans le réactif jusqu'à apparition de bandes brunes, lavées extensivement par l'eau et conservées à l'abri de la lumière. Cette méthode permet de détecter jusqu'à 5ng d'antigène (ici sérotransferrine).

VII INCUBATION DES SEROTRANSFERRINES RADIOACTIVES AVEC LES CELLULES ET LES MEMBRANES PLASMIQUES

A. Marquage radioactif des sérotransferrines

1. Marquage au fer-59

Le marquage des sérotransferrines d'Homme et de Lapin est réalisé par saturation des apotransferrines par un mélange de fer 59 (3 à 20 m Ci/mg ; 1m Ci/ml ; Radiochemical Center, Amersham) et de fer-56 ($\text{FeCl}_3, 6 \text{H}_2\text{O}$) dans un rapport 1 : 20 (p/p).

La solution saturante contenant le fer radioactif est préparée de la manière suivante :

- 20µl de fer-59 dans HClO, 1M (soit 20µCi)
- 100µl de solution de fer-56 contenant 40µg de fer-56 pour 100µl de tampon citrate-bicarbonate de sodium 0,1M, pH 8,2
- 20µl de citrate de sodium-soude, pH10 (pour neutraliser l'HCl de la solution radioactive).

Il faut ajouter 5µl de cette solution radioactive (soit 1,5µg de fer) à 100µl d'une solution de sérotransferrine humaine ou de Lapin (à 10mg/ml dans le tampon citrate-bicarbonate de sodium 0,1M, pH 8,2). Le mélange est laissé 3 h à température ambiante, puis le fer en excès est éliminé par chromatographie sur une

colonne de Dowex 1 x 4 (200 - 400 mesh).

La solution de protéine saturée en fer est alors équilibrée dans le tampon d'incubation utilisé pour les cellules, par passage sur une colonne de Séphadex G-25 (PD-10, Pharmacia) équilibrée dans le même tampon. La radioactivité spécifique, ainsi que le degré de saturation en fer sont déterminés par mesure des absorbances à 280nm et à 460nm, et par le comptage d'une fraction aliquote au compteur gamma (Multigamma, LKB).

2. Marquage à l'iode - 125

Le marquage radioactif à l'iode-125 des sérotransferrines est réalisé par la méthode à l'iodogène selon les conditions préconisées par Fraker et Speck (1978) et Salacinski et al. (1981). La quantité d'iode fixée est calculée pour ne pas dépasser un atome d'iode par mole de transferrine.

La solution d'iode radioactive est préparée de la manière suivante : 1 μ l de solution d'I-125 (NaI, sans entraîneur; 5mCi/50 μ l; Radiochemical Center, Amersham) est mélangé à 4 μ l d'une solution de NaI froid 20mM dans un tampon phosphate 50mM, pH 7,4.

L'iodogène, en solution à 1mg/ml de chloroforme est adsorbé sur des tubes à hémolyse en verre, à raison de 100 μ l par tube, par évaporation du chloroforme sous courant d'azote.

La solution de sérotransferrine, 100 μ l (10mg/ml dans le tampon phosphate 50mM, pH 7,4) est ajoutée sous agitation douce au tube contenant l'iodogène adsorbé. Puis la solution d'iode contenant le mélange d'iode-125 et d'iode-127 est ajoutée, à raison de 1 à 5 μ Ci suivant l'intensité du marquage désirée.

La solution est laissée sous agitation dans la glace pendant 10 min, puis l'iode en excès est dessalé sur une colonne de Séphadex G-25 (PD-10) équilibrée dans le tampon utilisé pour les incubations avec les cellules.

La radioactivité spécifique est déterminée après mesure de la concentration en protéine (absorbance spécifique à 280nm) et comptage de la radioactivité d'une fraction aliquote dans un compteur multigamma (LKB).

B. Préparation du matériel biologique

1. Préparation des réticulocytes de Lapin

Une réticulocytose est induite chez des lapins adultes (race : Nouvelle-Zélande) par quatre saignées répétées de 15ml de sang/kg de poids, à deux jours d'intervalle.

L'incision est réalisée à la veine marginale de l'oreille. Le dernier jour, le sang enrichi en réticulocytes est recueilli dans des tubes à centrifuger héparinés (10 U/ml de sang) et les cellules sont lavées trois fois (800 g, 7min) par du milieu de Hanks et Wallace (1949) dont la composition est la suivante : NaCl, 8g/l ; KCl, 0,4g/l ; CaCl₂, 0,14g/l ; MgSO₄(7H₂O), 0,2g/l ; Na₂HPO₄(12H₂O), 0,12g/l ; KH₂PO₄(H₂O), 0,6g/l ; NaHCO₃, 0,35g/l ; Glucose, 1g/l, pH 7,35. Au cours des deux premiers lavages, la mince couche blanchâtre (essentiellement des leucocytes et des lymphocytes) qui se forme à la surface du culot de cellules rouges, est

éliminée par aspiration.

Le taux de réticulocytes est déterminé par comptage des cellules au microscope optique, après coloration de la chromatine au bleu de Unna. Le taux de réticulocytes, dans ces conditions est de l'ordre de 20 à 30 % des cellules rouges totales. Le taux normal, chez les lapins non anémiés, est d'environ 0,5 à 2 %. Il est possible d'augmenter ce taux selon la méthode de Murphy (1973) par centrifugation à 15 000g, 1 h à 4°C (rotor JA-20, centrifugeuse Beckman J-21) :

La partie supérieure du culot (10 % du volume total) est très enrichie en réticulocytes et représente un taux de réticulocytes de plus de 50 %. Le culot de cellules rouges est alors remis en suspension dans le milieu d'incubation pour obtenir la concentration désirée en réticulocytes, et les cellules sont utilisées immédiatement pour les incubations avec les sérotransferrines marquées.

2. Préparation des membranes plasmiques de la bordure en brosse du syncytium trophoblastique humain

Les placentas sont obtenus à la Maternité Roger Salengro de Lille (Directeur: Pr Delcour).

Ils sont prélevés juste après l'accouchement à terme, et placés immédiatement dans du milieu froid de Hanks et Wallace (p. 18) et utilisés pour la préparation des membranes microvillosités moins de 30 min après l'accouchement.

Les microvillosités du syncytium trophoblastique sont isolées du placenta par la méthode de Smith et al. (1974) modifiée par Booth et al. (1980). Spl d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Aprotinine, trasylol, PMSF, DTT et Mg Cl₂ chacun à la concentration de 200mM sont ajoutés par ml de suspension après homogénéisation dans le tampon Tris-HCl, pH 7,1, mannitol, 2mM, et une autre fois au culot final qui est resuspendu dans le milieu de Hanks et Wallace, complété à 10mM en mannitol. La concentration finale en protéines membranaires est ajustée à 2mg/ml après dosage des protéines par la méthode de Lowry (1951) modifiée pour les protéines membranaires par Peterson et al. (1977).

La pureté des préparations de membranes de la bordure en brosse est contrôlée par le dosage de deux enzymes marqueurs des microvillosités : la phosphatase alcaline (Beaufay et al., 1974) et la 5' nucléotidase (Aronson et Touster, 1974).

Les suspensions de microvillosités du syncytium trophoblastique sont alors utilisées pour les expériences de fixation de la sérotransferrine humaine en moins de 4 h, ou stockées par fractions aliquotes de 0,4ml à - 70°C jusqu'à 1 mois.

C. Incubation des sérotransferrines avec les réticulocytes de Lapin

1. Incorporation du fer par les réticulocytes de Lapin

a - Cinétiques d'incorporation du fer

Le culot de cellules rouges, enrichi en réticulocytes est res-

suspendu dans du milieu de Hanks supplémenté par de la sérum albumine bovine 1 % (p/v) pour donner une concentration finale de 4×10^8 réticulocytes/ml. Cette suspension est incubée à 37°C avec les différentes sérotransferrines marquées au fer-59 à la concentration finale de 1,8 μ M (140 μ g/ml). Les différentes préparations de sérotransferrine sont obtenues de la manière décrite dans l'appendice technique :

- sérotransferrine de Lapin native (p. 1)
- sérotransferrine humaine totale (p. 2)
- sérotransferrine de Lapin monoferrique (p. 5)
- sérotransferrine de Lapin modifiée par le diéthyl-pyrocarbonate (p. 6)
- fragments isolés après hydrolyse chymotrypsique ménagée (p. 7)
- sérotransferrine de Lapin déglycosylée (p. 11).

Les cinétiques d'incorporation du fer des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine, sont conduites de la même manière avec une concentration finale en réticulocytes de Lapin de 2×10^8 et une concentration finale en sérotransferrine humaine de 0,6 μ M (50 μ g/ml).

Des fractions aliquotées de 100 μ l de l'incubation sont prélevées à des temps variants de 0 à 90 min, refroidies dans la glace, et lavées trois fois à 4°C (1500g, 3 min par 3ml de PBS froid (tampon phosphate 10mM, NaCl 0,145M, pH 7,4). Le culot cellules rouges est alors compté dans un compteur multigamma (LKB).

b. Inhibition de l'incorporation du fer

Les expériences d'inhibition de l'incorporation du fer de la sérotransferrine de Lapin par les réticulocytes, ont été réalisées en présence des glycopeptides et oligosaccharides suivants :

- asialo et sialo-glycopeptide de la sérotransferrine de Lapin,
- glycopeptide sialylé de la lactotransferrine humaine,
- glycopeptide β de l'ovomucoïde,
- trisaccharides I et II et oligosaccharides I et II.

Les glycopeptides de la sérotransferrine de Lapin ont été isolés selon le protocole décrit dans l'appendice technique (p. 9). Les glycopeptides de la lactotransferrine et de l'ovomucoïde ont été obtenus après hydrolyse pronasique et fournis par le Pr Spik. Les différents trisaccharides et oligosaccharides ont été isolés et fournis par le Dr Strecker, à partir d'urines de patients présentant des défauts d'enzymes intervenant dans le métabolisme des glycanes.

Les incubations sont conduites de la manière suivante :

- 50 μ l de culot de cellules rouges (5×10^8 réticulocytes) sont répartis dans une série de tubes à hémolyse en polystyrène et 50 μ l de milieu de Hanks et Wallace sont ajoutés aux cellules.

- Des solutions mères de glycopeptides et d'oligosaccharides sont préparées dans le même tampon à des concentrations variant de 1,2mM à 1,2 M. Les oligosaccharides et glycopeptides sialylés sont neutralisés par la soude avant ou après dessalage sur une colonne de Biogel P-2.

- 10 μ l de chaque solution d'inhibiteurs sont ajoutés à la suspension cellulaire et préincubés 10min à 37°C. Puis 10 μ l de sérotransferrine de Lapin (40 μ g marquée au fer-59) sont ajoutés à la

solution précédente (concentration finale $4\mu\text{M}$) et l'incubation est menée pendant 10 min à 37°C , puis arrêtée par dilution avec 3 ml de PBS à 4°C . Les tubes sont alors lavés 3 fois par du PBS froid et le culot de cellules est compté dans le compteur gamma.

Le 100% de radioactivité est déterminé par comptage de tubes contenant la même quantité de sérotransferrine, et dans les quels les inhibiteurs ont été remplacés par du milieu de Hanks.

Les résultats sont exprimés en fonction de la concentration minimale en glycopeptide ou oligosaccharide, nécessaire à l'inhibition de 50 % de l'incorporation totale du fer : [I]-50. Tous les tubes sont réalisés en triple.

2. Expériences de fixation des sérotransférines marquées à l'iode-125 sur les réticulocytes

Les expériences de fixation de la sérotransferrine de Lapin et des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine sur les réticulocytes de Lapin sont conduites de la manière suivante :

- la suspension riche en réticulocytes (5×10^6 réticulocytes/ml) est incubée pendant 1h à 4°C dans le milieu de Hanks, supplémenté en sérum albumine bovine (1%, p/v), en présence de concentrations croissantes en sérotransferrine marquée à l'iode-125. Les concentrations finales en transferrine varient de 5nM à $5\mu\text{M}$.

- une fraction aliquote du surnageant est prélevée pour déterminer la concentration en transferrine libre à l'équilibre. Les cellules sont ensuite lavées trois fois par du PBS à 4°C (1.500g , 3 min) et le surnageant est éliminé par aspiration. Le culot de cellules est ensuite transféré dans un tube à hémolyse neuf par trois fois $50\mu\text{l}$ de tampon. Le comptage de ces tubes constitue la fixation totale. Chaque concentration est réalisée en triple.

La fixation non spécifique est déterminée, pour chaque concentration, en présence de 100 molaire excès de la sérotransferrine étudiée. La fixation spécifique est calculée par soustraction de la fixation non spécifique à la fixation totale.

D - Incubation des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine avec les membranes du placenta.

1. Conditions d'incubation

Les incubations sont réalisées dans des tubes de 0.25 ml , en polycarbonate. Le mélange d'incubation est constitué de :

- $50\ \mu\text{l}$ de la suspension de membranes de la bordure en brosse du placenta humain (1 mg/ml) dans le milieu de Hanks, supplémenté en mannitol 10 mM , et préparée comme il est décrit p.19.

- $100\ \mu\text{l}$ de chaque variant glycanique de la sérotransferrine humaine ($10\ \mu\text{g/ml}$), marqué à l'iode-125 ou non marqué, dans le même milieu, supplémenté en sérum albumine humaine (*).

(*) Le sérum albumine humaine est préalablement débarrassée des traces de sérotransferrine contaminante, par passage sur une colonne de SP-Séphadex dans un tampon citrate de sodium 20 mM de pH 4,8 (la transferrine reste fixée sur la colonne; voir p.2)

solution précédente (concentration finale $4\mu\text{M}$) et l'incubation est menée pendant 10 min à 37°C , puis arrêtée par dilution avec 3 ml de PBS à 4°C . Les tubes sont alors lavés 3 fois par du PBS froid et le culot de cellules est compté dans le compteur gamma.

Le 100% de radioactivité est déterminé par comptage de tubes contenant la même quantité de sérotransferrine, et dans les quels les inhibiteurs ont été remplacés par du milieu de Hanks.

Les résultats sont exprimés en fonction de la concentration minimale en glycopeptide ou oligosaccharide, nécessaire à l'inhibition de 50 % de l'incorporation totale du fer : [I]-50. Tous les tubes sont réalisés en triple.

2. Expériences de fixation des sérotransférines marquées à l'iode-125 sur les réticulocytes

Les expériences de fixation de la sérotransferrine de Lapin et des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine sur les réticulocytes de Lapin sont conduites de la manière suivante :

- la suspension riche en réticulocytes (5×10^6 réticulocytes/ml) est incubée pendant 1h à 4°C dans le milieu de Hanks, supplémenté en sérum albumine bovine (1%, p/v), en présence de concentrations croissantes en sérotransferrine marquée à l'iode-125. Les concentrations finales en transferrine varient de 5nM à $5\mu\text{M}$.

- une fraction aliquote du surnageant est prélevée pour déterminer la concentration en transferrine libre à l'équilibre. les cellules sont ensuite lavées trois fois par du PBS à 4°C (1.500g, 3 min) et le surnageant est éliminé par aspiration. Le culot de cellules est ensuite transféré dans un tube à hémolyse neuf par trois fois $50\mu\text{l}$ de tampon. Le comptage de ces tubes constitue la fixation totale. Chaque concentration est réalisée en triple.

La fixation non spécifique est déterminée, pour chaque concentration, en présence de 100 molaire excès de la sérotransferrine étudiée. La fixation spécifique est calculée par soustraction de la fixation non spécifique à la fixation totale.

D - Incubation des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine avec les membranes du placenta.

1 . Conditions d'incubation .

Les incubations sont réalisées dans des tubes de 0.25 ml, en polycarbonate. Le mélange d'incubation est constitué de :

- 50 μl de la suspension de membranes de la bordure en brosse du placenta humain (1 mg/ml) dans le milieu de Hanks, supplémenté en mannitol 10 mM, et préparée comme il est décrit p.19.

- 100 μl de chaque variant glycanique de la sérotransferrine humaine (10 $\mu\text{g/ml}$), marqué à l'iode-125 ou non marqué, dans le même milieu, supplémenté en sérum albumine humaine(*).

(*)Le sérum albumine humaine est préalablement débarrassée des traces de sérotransferrine contaminante, par passage sur une colonne de SP-Séphadex dans un tampon citrate de sodium 20 mM de pH 4,8 (la transferrine reste fixée sur la colonne; voir p.2)

Le mélange d'incubation est alors incubé 30 min dans la glace et centrifugé 3 min à 110.000g dans une centrifugeuse Beckman Airfuge. Le culot de membranes est lavé deux fois par 150 μ l de milieu glacé, puis transféré par 3 x 50 μ l de milieu dans des tubes neufs.

2 . Détermination des paramètres de la fixation

La constante apparente d'association K_a et le nombre de sites récepteurs par μ g de protéines membranaire sont déterminés, en incubant différentes quantités de variants sérotransferriniques marqués à l'iode-125 (80-2.500 ng) dans les conditions définies au § 1. Chaque concentration est réalisée en triple.

Une fraction aliquote du premier surnageant est prélevée pour déterminer la quantité de transferrine libre à l'équilibre. Après lavage par 2 x 150 μ l de milieu, la radioactivité résiduelle est comptée et constitue la fixation totale.

La fixation non spécifique est déterminée en présence de 100 molaire excès de chaque variant glycanique non marqué. La fixation spécifique est calculée par soustraction de la fixation non spécifique à la fixation totale.

BIBLIOGRAPHIE DE L'APPENDICE TECHNIQUE

- ARONSON, N.N. et TOUSTER, O. (1974) *Meth. Enzymol.*, 31, (19)
- AZARI, D. et BAUGH, R.F. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.*, 118, 138-144 (3)
- BEAUFAY, H., AMAR-COSTESECC, A., FEYTMANS, E., THINES-SEMPoux, D., WIBO, M. ROSSI, M. et BERTHET, J. (1974) *J. Cell Biol.*, 161, 188-200, (19)
- BECKER, W. (1969), *Immunochemistry*, 6, 539-546 (15)
- BELCHER, R., NUTTEN, A.J. et SAMBROOK, C.M. (1954) *Analyst.*, 79, 201 (12)
- BOOTH, A.G., OLANIYAN, R.O., VANDERPUYE, O.A. (1980) *Placenta*, 1, 327-336 (19)
- CHERVENKA, C.H. (1970), *Anal. Biochem.* 34, 24-29 (11)
- CRESTFIELD, A.M., MOORE, S. et STEIN, W.H. (1963), *J. Biol. Chem.*, 238, 522 (8, 11)
- DAVIS, B. (1964), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 404-427 (13)
- DREYWOOD, R. (1946), *Ind. Eng. Chem. Anal.*, 18, 499 (12)
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. et SMITH, F. (1956), *Anal. Chem.*, 28, 350 (9)
- EDMAN, P. et BEGG, G. (1967), *Eur. J. Biochem.* 80-91 (12)
- ELSON, L.A. et MORGAN, W.T.J. (1933), *Biochem. J.*, 27, 1824 (12)
- FRAKER, D.J. et SPECK, J.C. (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 849-857 (17)
- FOURNET, B., LEROY, Y. et MONTREUIL, J. (1974), *Actes colloq. Int. n°221, CNRS Glucoconjugués, CNRS ed., PARIS* (13)
- GRABAR, P. et WILLIAMS, J. (1975), *Biochem. J.*, 145, 263-279 (16)
- HABEEB, A.F.S.A. (1966), *Anal. Biochem.* 14, 328-336 (10)
- HAKOMORI, S.I. (1964), *J. Biochem.*, 55, 205-208 (12)
- HAN, K. (1970), *Thèse Biologie Humaine, 1970, Lille* (12)
- HANKS, J.H. et WALLAGE, R.E. (1949), *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 21, 196 (18)
- HARTLEY, R. (1970), *Biochem. J.* 119, 805-822 (11)
- KERKAERT, J.P. (1978), *Anal. Biochem.* 84, 354-360 (13)
- LAEMMLI, U.K. (1970), *Nature*, 227, 680-685 (13)
- LAURELL, A.B. (1957), *Vox Sanguinis*, 2, 312 (13)
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J. et FARR, A.L. (1951), *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (19)
- MANCINI, G., CARBONARA, A.O. et HEREMANS, J.F. (1965), *Immunochemistry*, 2, 235 (15)