

50376
1992
284

62218

50376
1992
284

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE
EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

par



PIERRE MARIE JACQUINOT



**ETUDE DES MODIFICATIONS DE LA GLYCOSYLATION DE LA
TRANSFERRINE SECRETEE PAR DES CELLULES
D'HEPATOCARCINOME HUMAIN EN CULTURE ET PAR DES
HEPATOCYTES D'EMBRYON DE POULET EN CULTURE PRIMAIRE**

présentée le 10 novembre 1992 devant la Commission d'Examen

Président	: A. Verbert	Examineurs	: R. Cacan
Rapporteurs	: F. Delers		: J. Montreuil
	: G. Rebel		: G. Spik

A Madame le Professeur G. Spik,

Je vous remercie sincèrement pour m'avoir dirigé tout au long de cette thèse en me prodiguant vos précieux conseils.

A Monsieur le Professeur Emérite J. Montreuil,

Je vous remercie très vivement pour la confiance que vous m'avez accordée en me permettant d'achever mon DEA et de mener à bien cette thèse dans votre Laboratoire. Je suis très honoré de votre présence parmi les membres du jury en tant qu'examineur et je vous en remercie.

A Monsieur le Docteur F. Delers,

A Monsieur le Docteur G. Rebel,

Vous avez accepté de me faire l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse, je vous en remercie vivement. Vous avez permis par vos critiques, de valoriser plus encore ce travail, soyez en sincèrement remercié.

A Monsieur le Professeur A. Verbert,

Je vous remercie d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse en présidant celle-ci.

A Monsieur le Professeur R. Cacan,

Je vous remercie d'avoir accepté de participer en tant qu'examineur, au jury de cette thèse.

A Didier Léger,

Je tiens aujourd'hui à te remercier pour tes nombreux conseils, pour toutes les discussions qui ont jalonné ce travail, pour l'aide que tu m'as apportée dans le choix et l'élaboration des différentes techniques utilisées dans cette thèse. Je n'oublierais pas le chemin parcouru ensemble. Un très grand merci Didier.

A Bernadette Coddeville,

Lors de mon DEA, tu m'as encadré efficacement, tu fus par ton travail, tes compétences et ton sérieux un exemple capital dans ma formation de Chercheur. Tu as par la suite été un modèle de disponibilité malgré des journées toujours laborieuses. Un très grand merci Bernadette.

Finalement, j'aimerais remercier **Joe Celen** pour la réalisation des photographies et la reproduction de ce travail.

Je remercie très vivement et très sincèrement l'ensemble du Laboratoire de Chimie Biologique. Je suis très honoré par le temps que vous avez pris pour répondre à mes nombreuses questions et par la gentillesse que vous m'avez accordée.

Puisqu'enfin, j'apporte les dernières retouches à ce manuscrit, il est temps de dédier cette thèse.

Bien sur, ceux qui liront ce document n'y verront qu'une somme de résultats qui sont le fruit des travaux accomplis pendant quatre années. J'ai pourtant inscrit dans chaque page, en plus des mots, un peu des weekends, un peu des soirées, un peu des vacances que j'ai volés ... à ceux qui attendaient.

A mes Parents,

A Dorothée,

A Benjamin.

Ce travail a été réalisé sous la direction du Professeur Geneviève Spik dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille (Unité mixte du CNRS n°111 : Relation Structure-Fonctions des constituants membranaires; Directeur : Professeur A. Verbert). Il a bénéficié d'une Allocation de Recherche du Ministère de la Recherche et de la Technologie à qui nous adressons nos plus vifs remerciements.

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>GENERALITES</u>	
INTRODUCTION	4
DONNEES GENERALES SUR LA STRUCTURE ET LA BIOSYNTHESE DES N-GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES	6
A - STRUCTURE DES N-GLYCANNES	6
B - BIOSYNTHESE DES N-GLYCANNES	7
I - ASSEMBLAGE ET TRANSFERT DE L'OLIGOSACCHARIDYL- PYROPHOSPHODOLICHOL SUR LA PROTEINE	7
1 - <u>Assemblage de l'oligosaccharidyl-pyrophosphodolichol</u>	7
2 - <u>Conditions expérimentales du transfert de l'oligosaccharidyl-pyrophosphodolichol sur la protéine</u>	7
II - MATURATION DES GLYCANNES	10
1 - <u>Réactions enzymatiques</u>	10
2 - <u>Régulation</u>	12
ETUDE DE LA MODIFICATION DE LA GLYCOSYLATION DES N-GLYCOSYLPROTEINES	16
A - ETUDE DE LA MODIFICATION DE LA GLYCOSYLATION DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES	17
I - VARIATIONS STRUCTURALES DES GLYCANNES PENDANT LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET LA DIFFERENCIATION	17
II - VARIATIONS STRUCTURALES DES GLYCANNES LIEES A LA CANCERISATION	17
B - ETUDE DE LA MODIFICATION DE LA GLYCOSYLATION DES GLYCOPROTEINES DE LIQUIDES BIOLOGIQUES	18
I - VARIATIONS STRUCTURALES DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES DE LA PHASE AIGUE DE L'INFLAMMATION	19

1 - <u>Observations lors de cas pathologiques et de variations physiologiques</u>	20
a) Modifications glycaniques de l'α1-acide glycoprotéine	20
b) L'α1-foetoprotéine	23
c) Conclusion	24
2 - <u>Etudes in vitro : action des cytokines</u>	25
II - MODIFICATION DE LA GLYCOSYLATION DES GLYCOPROTEINES SYNTHETISEES ET SECRETEES PAR DES CELLULES CANCEREUSES	29
III - INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE DES CELLULES SUR LA GLYCOSYLATION DES GLYCOPROTEINES	31
IV - INFLUENCE DES HORMONES ET DE L'ACIDE RETINOIQUE	33
1 - <u>Hormones thyroïdiennes et hormones régulant leur sécrétion</u>	34
2 - <u>Action des glucocorticoïdes</u>	34
3 - <u>Influence de l'acide rétinolique</u>	35
4 - <u>Influence d'autres facteurs</u>	35
C - CONCLUSION	36
ETUDE DE LA MODIFICATION DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES DE LA TRANSFERRINE	37
A - GENERALITES SUR LES TRANSFERRINES	38
I - BIOSYNTHESE DE LA TRANSFERRINE	38
II - STRUCTURE POLYPEPTIDIQUE DE LA TRANSFERRINE	40
B - VARIATIONS DE LA GLYCOSYLATION DE LA SEROTRANSFERRINE	41
I - VARIATION DE LA GLYCOSYLATION SELON L'ESPECE	41
1 - <u>Structure des glycanes de la sérotransferrine humaine</u>	44
2 - <u>Les variants glycaniques de la sérotransferrine humaine</u>	46
3 - <u>Structure des glycanes de la sérotransferrine de Poule</u>	48
4 - <u>Structure des glycanes des autres sérotransferrines</u>	48
II - VARIATION DE LA GLYCOSYLATION SELON LE LIEU DE SYNTHESE	49

III - VARIATION DE LA GLYCOSYLATION DUE AU POLYMORPHISME GENETIQUE DE LA PROTEINE	51
IV - VARIATION DE LA GLYCOSYLATION LORS DE LA GROSSESSE	52
V - VARIATION DE LA GLYCOSYLATION DANS CERTAINS CAS PATHOLOGIQUES	54
1 - <u>Alcoolisme</u>	54
2 - <u>Transferrine du sérum de sujets atteints d'hépatocarcinome</u>	56
3 - <u>Syndrôme de déficience en glycanne de glycoprotéines</u>	56
VI - VARIATION DE LA GLYCOSYLATION DE LA TRANSFERRINE SYNTHETISEE PAR DES CELLULES EN CULTURE	57
1 - <u>Transferrine sécrétée par des hépatocytes humains en co-culture</u>	57
2 - <u>Transferrine sécrétée par des cellules cancéreuses en culture</u>	57
a) Cellules d'hépatocarcinome	57
b) Cellules cancéreuses d'ovaire	58
VII - CONCLUSION	60

TRAVAUX PERSONNELS

ETUDE DE FACTEURS MODIFIANT LA GLYCOSYLATION DE LA TRANSFERRINE HUMAINE SYNTHETISEE ET SECRETEE PAR LES CELLULES HEPG2	63
A - L'IMMUNOTRANSFERT : UNE METHODE POUR LA DETECTION DE VARIANTS GLYCANNIQUES SEPARES PAR AFFINOELECTROPHORESE	64
I - DESCRIPTION DE L'IMMUNOTRANSFERT	65
II - APPLICATION DE L'IMMUNOTRANSFERT A LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE	67
III - DISCUSSION	67
VI - CONCLUSION	69
B - MODIFICATON DE LA GLYCOSYLATION DE LA TRANSFERRINE SELON LES CONDITIONS DE CULTURE	70

I - EFFETS DU SERUM DE VEAU FOETAL	70
II - INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE	76
III - VARIATION DE LA CONCENTRATION EN FER ET EN GLUCOSE DU RPMI 1640	81
IV - INFLUENCE DE LA DUREE DE CONGELATION DES CELLULES	89
V - CONCLUSION	94
C - INFLUENCE DU PROCESSUS INFLAMMATOIRE	96
I - INTERLEUKINE 6	96
II - GLUCOCORTICOIDES	104
III - CONCLUSION	112
D - CONCLUSION	114
ETUDE DE LA MODIFICATION DES GLYCANNES DE LA TRANSFERRINE SECRETÉE PAR LES HEPATOCYTES D'EMBRYON DE POULET	116
A - ETUDE DES GLYCANNES DES TRANSFERRINES EMBRYONNAIRES DE POULET	117
I - ISOLEMENTS DES DIFFERENTES TRANSFERRINES	117
1 - <u>Transferrine du sérum de Poulet</u>	118
2 - <u>Transferrine du sérum d'embryon</u>	118
3 - <u>Transferrine sécrétée dans le milieu de culture par les hépatocytes d'embryon</u>	122
II - DOSAGE DES TRANSFERRINES	125
1 - <u>Dosage des transferrines sériques</u>	125
2 - <u>Dosage de la transferrine sécrétée dans le milieu de culture des hépatocytes d'embryon</u>	127
III - MISE EN EVIDENCE DE LA MICROHETEROGENEITE DES GLYCANNES DES DIFFERENTES TRANSFERRINES DE POULET	128
1 - <u>Composition molaire en monosaccharides des différentes transferrines</u>	128

2 - <u>Séparation des glycovariants par électrophorèse en gel de polyacrylamide sans agents dénaturants</u>	128
IV - ETUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES DES DIFFERENTES TRANSFERRINES	131
1 - <u>Libération des glycanes par hydrazinolyse</u>	131
2 - <u>Analyse des oligosaccharide-alditols par résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton à 400 MHz</u>	132
3 - <u>Etude lectinique des glycanes des transferrines</u>	140
V - DISCUSSION ET CONCLUSION	142
B - ETUDE DE L'INFLUENCE DE FACTEURS SUR LA GLYCOSYLATION DE LA TRANSFERRINE SYNTHETISEE PAR LES HEPATOCYTES EMBRYONNAIRES DE POULET	146
I - METHODE DE LA MISE EN EVIDENCE DE LA MODIFICATION DE LA GLYCOSYLATION	146
1 - <u>Affino-immunoélectrophorèse</u>	146
2 - <u>Autre technique</u>	147
II - ETUDE DE L'INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE	148
III - ADDITION DE DIFFERENTS FACTEURS DANS LE MILIEU DE CULTURE	149
IV - DISCUSSION ET CONCLUSION	152
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	154
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	161
<u>APPENDICE TECHNIQUE</u>	200

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

AAT	: alpha-1-antitrypsine
AFP	: alpha-foetoprotéine
AE	: affinoélectrophorèse
AGP	: alpha-1-acide glycoprotéine
AIE	: affino-immunoélectrophorèse
Asn	: asparagine
CDG	: carbohydrate deficient glycoprotein
CDT	: carbohydrate deficient transferrin
Cp	: céruléoplasmine
Con A	: concanavaleine A
DMEM	: Dulbecco modified Eagle's medium
Fuc	; fucose
Gal	: galactose
Glc	: glucose
GlcNAc	: N-acétylglucosamine
IL-1	: interleukine 1
IL-6	: interleukine 6
IT	: immunotransfert
kDa	: kilodalton
LCA	: <u>Lens culinaris</u> agglutinin
Man	: mannose
NeuAc	: N-acétylneuraminique
PPA	: protéine de la phase aiguë
RER	: réticulum endoplasmique rugueux
Ser	: sérine
TBS	: tampon Tris (composition p. 200)
Tf	: transferrine
TfA	: transferrine de sérum adulte
TfE	: transferrine de sérum d'embryon
TfHE	: transferrine synthétisée par les hépatocytes embryonnaires en culture
Thr	: thréonine
TGF	: transforming growth factor
TNF	: tumor necrosis factor
TRF	: thyrotropin-releasing-factor
TSH	: hormone thyroïdienne

INTRODUCTION

Depuis de nombreuses années, les chercheurs ont décrit l'altération de la structure glycanique des glycoprotéines dans des cas pathologiques ou dans des conditions physiologiques particulières. Certains y ont associé une valeur clinique de diagnostic et de pronostics, démontrant la spécificité de la modification de la glycosylation d'une glycoprotéine ou d'un ensemble de glycoprotéines, lors d'un état pathologique donné.

Au delà de ces observations, la recherche des facteurs influençant directement ou indirectement le processus de la biosynthèse des glycanes a débuté plus récemment.

Au Laboratoire, la démonstration, dès 1983, par SPIK et al., puis en 1984 par DEBRUYNE et al., de la modification du taux des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine lors d'atteintes hépatiques a ouvert la voie à l'étude des modifications de la glycosylation de la transferrine. CAMPION en 1987, observe des modifications de la structure glycanique de la transferrine humaine synthétisée par des hépatocytes en co-culture. En 1989, CAMPION et al., décrivent la profonde altération de la glycosylation de la transferrine synthétisée par des cellules d'hépatocarcinome humain (cellules HepG2) en culture.

Suite à ces différentes observations sur la modification de la glycosylation de la transferrine humaine, nous avons voulu définir des facteurs qui altèrent la glycosylation de cette molécule.

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer l'influence du sérum de veau foetal et de différents milieux de culture sur la glycosylation de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2. Nous avons ensuite évalué l'impact des cytokines et des

glucocorticoïdes sur la glycosylation de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2. En effet, ces facteurs "miment" in vitro les effets du processus inflammatoire sur les hépatocytes, en modifiant la glycosylation des protéines de la phase aiguë de l'inflammation (MACKIEWICZ et al., 1987a, 1989c, 1989d; POS et al., 1988, 1989), mais jusqu'à présent rien n'avait été fait sur la glycosylation des protéines qui ne sont pas des protéines de la phase aiguë de l'inflammation.

Dans la seconde partie de nos travaux, nous avons voulu poursuivre notre étude avec des cellules non transformées, capables de vivre dans un milieu minimum bien défini, sans sérum de veau foetal et capables dans ce contexte de synthétiser et de sécréter la transferrine en quantité suffisante. Des résultats préliminaires ont montré que les hépatocytes embryonnaires de Poulet à 16 jours d'incubation répondaient à nos exigences. En effet, ces cellules hépatiques se maintiennent en culture primaire pendant 72 à 96 heures dans un milieu minimum sans addition de sérum. De plus, ces cellules sont relativement faciles à purifier, l'embryon peut-être obtenu en couveuse au Laboratoire à partir d'oeufs embryonnés, dont l'approvisionnement n'est pas limité. En outre, une des protéines majoritairement sécrétée par cet hépatocyte dans ces conditions de culture s'avère être la transferrine.

Afin d'exclure tout changement de la glycosylation due à la mise en culture des cellules dans un milieu minimum, nous avons dans un premier temps, comparé la structure des glycanes de la transferrine sécrétée par les cellules in vitro et celle synthétisée in vivo par un embryon au même stade d'incubation.

Le système étant parfaitement défini, nous avons alors envisagé

l'étude des modifications de la glycosylation de la transferrine en fonction de l'addition de facteurs dans le milieu de culture.

Les résultats que nous avons obtenus ont fait l'objet des communications et de la publication suivantes:

COMMUNICATIONS

Léger, D., Jacquinot, P.M., Montreuil, J. and Spik, G.

Differences in glycosylation between transferrin synthesized by hepatocytes in culture and serum transferrin in chick embryo.

- 11th International Symposium on Glycoconjugates. Toronto, Ontario, Canada, June/30-July/5, 1991

- Joint Meeting of the Nederlandse Vereniging voor de Bestudering van Glykokonjugate der Gesellschaft für Biologische Chemie. Villeneuve d'Ascq, France, 26-27 septembre 1991.

PUBLICATION

Jacquinot, P.M., Léger, D., Wieruszkeski, J.M., Montreuil, J. and Spik, G. Differences in glycosylation between transferrin synthesized by hepatocytes in culture and serum transferrin in chick embryo. FEBS Lett., En préparation.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les glycoprotéines sont des glycoconjugués constitués d'une partie protéique associée à une copule glucidique ou glycanne. D'une façon générale, les glycoprotéines sont classées en fonction de la nature de la liaison covalente glycanne - protéine et sont réparties en deux groupes principaux :

* Les O-glycosylprotéines dont le glycanne est lié par une liaison O-glycosidique à la chaîne peptidique.

* Les N-glycosylprotéines dont le glycanne est lié par une liaison N-glycosidique à un résidu asparagine (Asn) de la chaîne peptidique.

La transferrine, que nous avons choisi comme modèle d'étude est une N-glycosylprotéine. Nous limiterons donc le contenu de ces Généralités aux N-glycosylprotéines.

Dans un premier temps, nous décrirons brièvement les différentes structures des N-glycannes avant d'aborder leur biosynthèse. Nous montrerons ainsi la complexité des nombreuses réactions enzymatiques impliquées dans la formation des N-glycannes et de ce fait les différents points susceptibles d'être modifiés au cours de la glycosylation.

Dans un deuxième temps, nous donnerons plusieurs exemples de modifications de la glycosylation de N-glycosylprotéines dans des cas pathologiques et des conditions physiologiques particulières. Nous

terminerons cette deuxième partie en étudiant différents facteurs responsables de l'altération du processus de la biosynthèse des glycannes.

Puis finalement, nous nous attarderons sur les différentes variations et altérations de la glycosylation de la transferrine après avoir présenté cette molécule.

GENERALITES

DONNEES GENERALES SUR LA STRUCTURE ET LA BIOSYNTHESE DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES

Nous nous proposons dans ce chapitre après une rapide présentation de la structure des N-glycannes (pour une information plus précise, voir les revues de SPIRO, 1973; MONTREUIL, 1975, 1980, 1982; KORNFELD et KORNFELD, 1980 et KOBATA, 1984), de développer les généralités sur la biosynthèse des glycannes des N-glycoprotéines, afin de souligner les différentes possibilités de régulation de la glycosylation.

A - STRUCTURE DES N-GLYCANNES

A l'exception du chaînon glucose-asparagine mis en évidence dans la glycoprotéine majeure de l'enveloppe d'une archéobactérie halophile (WIELAND et al., 1980), la seule liaison du type N-glycosidique dans les glycoprotéines implique, la N-acétylglucosamine et l'asparagine conduisant à la formation d'une glycosylamine.

Les motifs glycaniques de ces N-glycosylprotéines sont construits autour d'une même structure pentasaccharidique: le mannotriosido-diacétyl-chitobiose, lié à un résidu asparagine de la protéine.

Cette structure est désignée sous le terme de "noyau" ou "inner core" et, est représentée dans la figure 1 page 8.

C'est à partir de ce noyau pentasaccharidique que sont obtenues toutes les structures glycaniques, par addition de monosaccharides divers qui peuvent être le mannose, la N-acétylglucosamine, le

galactose, le fucose, les acides neuraminiques (N-acétyl-, N,O-diacétyl-N-glycolyl-), le glucose et la N-acétylgalactosamine. On distingue trois types de glycannes, liés N-glycosidiquement (MONTREUIL, 1982, 1984; KORNFELD et KORNFELD, 1985) :

- * Les glycannes de type oligomannosidique.
- * Les glycannes de type N-acétyllactosaminique (Fig. 2 p. 8).
- * Les glycannes de type mixte.

B - BIOSYNTHESE DES N-GLYCANNES.

La N-glycosylation des protéines débute dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) par la synthèse d'un intermédiaire lipidique, le dolichol-pyrophospho-oligosaccharide. L'oligosaccharide sera ensuite transféré en une seule étape sur la protéine naissante.

La seconde étape consiste en la mise en place des diverses structures antennées, ce qui conduit à l'apparition d'une microhétérogénéité des N-glycosylprotéines. Nous développerons plus en détail cette seconde étape (pour plus d'informations voir SNIDER, 1984; KORNFELD et KORNFELD, 1985; SCHACHTER, 1986).

I - ASSEMBLAGE ET TRANSFERT DE L'OLIGOSACCHARIDYL-PYROPHOSPHO-DOLICHOL SUR LA PROTEINE.

1 - Assemblage de l'oligosaccharidyl-pyrophospho-dolichol.

L'oligosaccharide est assemblé au niveau de la membrane du RER sur un dérivé lipidique porteur : le phosphodolichol. L'oligosaccharidyl-

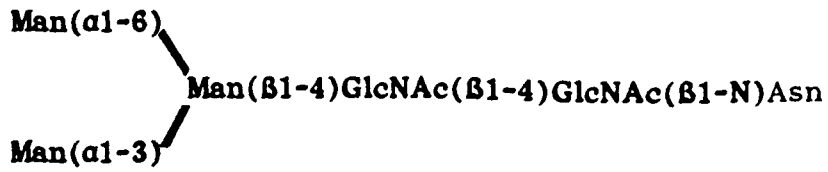


Figure 1 : "Noyau" pentasaccharidique des N-glycosylprotéines

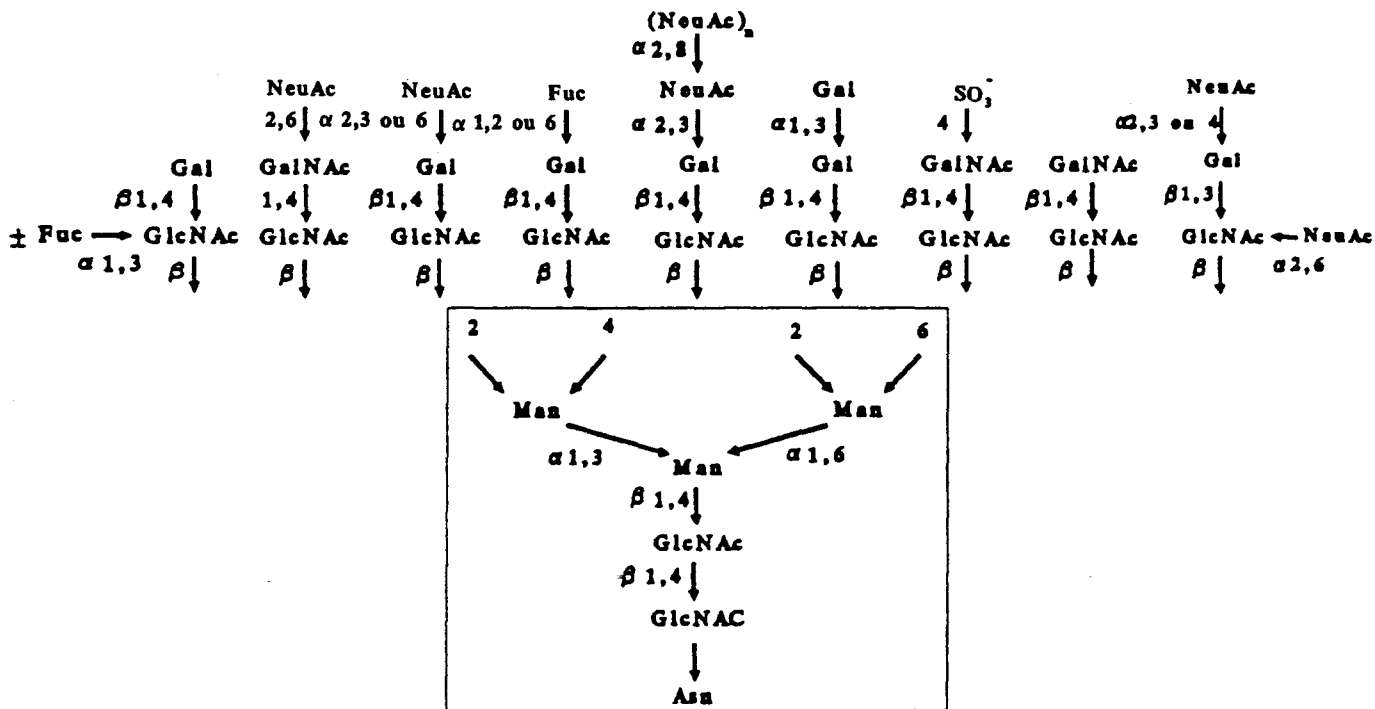


Figure 2 : Variations des antennes des glycanes de type N-acétyllactosaminique (adapté de KORNFIELD et KORNFIELD, 1985).

2

pyrophospho-dolichol se forme par des additions successives de monosaccharides, les donneurs de sucres se présentant sous forme de glycosyl-nucléotides ou sous forme de glycosyl-phosphodolichol pour les 4 derniers résidus de mannose et pour les 3 résidus de glucose.

2 - Conditions expérimentales du transfert de l'oligosaccharidylpyrophospho-dolichol sur la protéine

L'oligosaccharide précurseur $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ est transféré de l'intermédiaire lipidique sur un résidu asparaginyll de la protéine naissante pendant la traversée de la membrane du RER, par une oligosaccharidyl-transférase.

Plusieurs études (TURCO et al., 1977; SPIRO et al., 1979; STANELONI et al., 1980; LEHLE et al., 1984) ont montré que les résidus de glucose de l'intermédiaire lipidique facilitaient le transfert in vivo de l'oligosaccharide sur le polypeptide naissant, mais leur présence n'est absolument pas nécessaire. HOFACK et al., (1981) ont proposé que la glucosylation protégeait l'intermédiaire lipidique de la dégradation par une pyrophosphatase spécifique.

Il est actuellement établi que la N-glycosylation ne peut avoir lieu que si le résidu asparagine accepteur est situé dans une séquence tripeptidique code: Asn-X-Ser (Thr), appelée "sequon" (MARSHALL et NEUBERGER, 1970), située elle même dans un coude β de la protéine (AUBERT et al. , 1976), bien que cette dernière exigence ne semble pas être toujours confirmée.

Ce transfert apparaît donc, comme un phénomène co-traductionnel et se déroule dans la lumière du RER (voir les revues de HANOVER et LENNARZ 1981; MONTREUIL, 1982).

II - MATURATION DES GLYCANNES

1 - Réactions enzymatiques.

Les différentes enzymes, glycosidases et glycosyltransférases intervenant dans le processus de la maturation sont des protéines membranaires du RER et des trois compartiments (cis, media et trans) de l'appareil de Golgi. De nombreuses questions restent posées concernant l'organisation de la machinerie enzymatique, ainsi que le mode de contrôle cellulaire de l'expression des séquences glycaniques spécifiques.

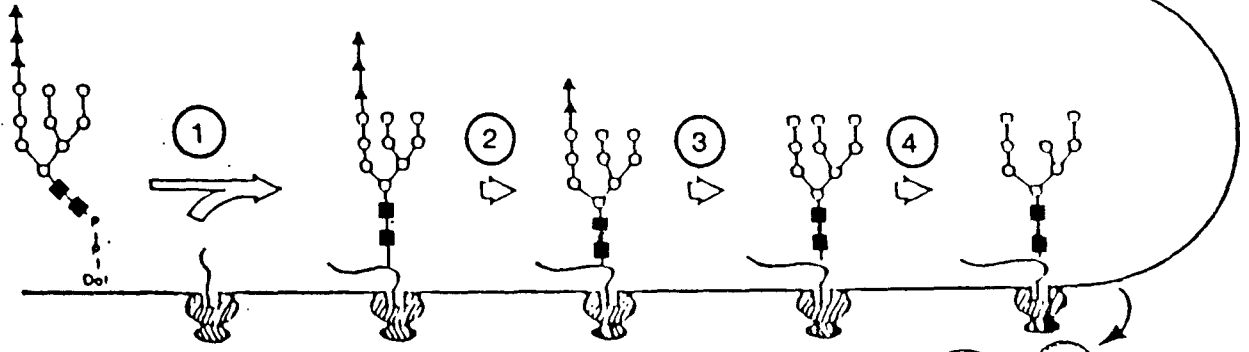
Le processus de la maturation (Fig. 3 p. 11) débute par l'élimination des résidus glucosyl terminaux (réactions 2 et 3) par des glucosidases I et II spécifiques (HETTKAMPS et al., 1984; REITMAN et al., 1982). Puis intervient une α -mannosidase (réaction 4), qui permet l'élimination d'au moins un résidu mannosyl lié en α -1,2 (BISCHOFF et KORNFELD, 1983). Les glucosidases I et II ainsi que l' α -mannosidase sont des enzymes du RER.

Les oligosaccharides déglucosylés et partiellement démannosylés feraient alors partie intégrante d'un signal de reconnaissance pour le récepteur déclenchant le transport de la protéine du RER vers le Golgi (LODISH et KONG, 1984).

Hormis les protéines qui vont résider de façon permanente dans les membranes du RER, les nouvelles glycoprotéines vont être transportées vers les saccules du cis-Golgi. Des vésicules bourgeonnent à la surface du RER, migrent dans le cytoplasme pour venir finalement fusionner avec les membranes golgiennes (JAMIESON et PALADE, 1968).

L'action d'une (α -1,2) mannosidase (Golgi mannosidase I) sur les glycoprotéines non lysosomiques, permet la formation de

RER



GOLGI

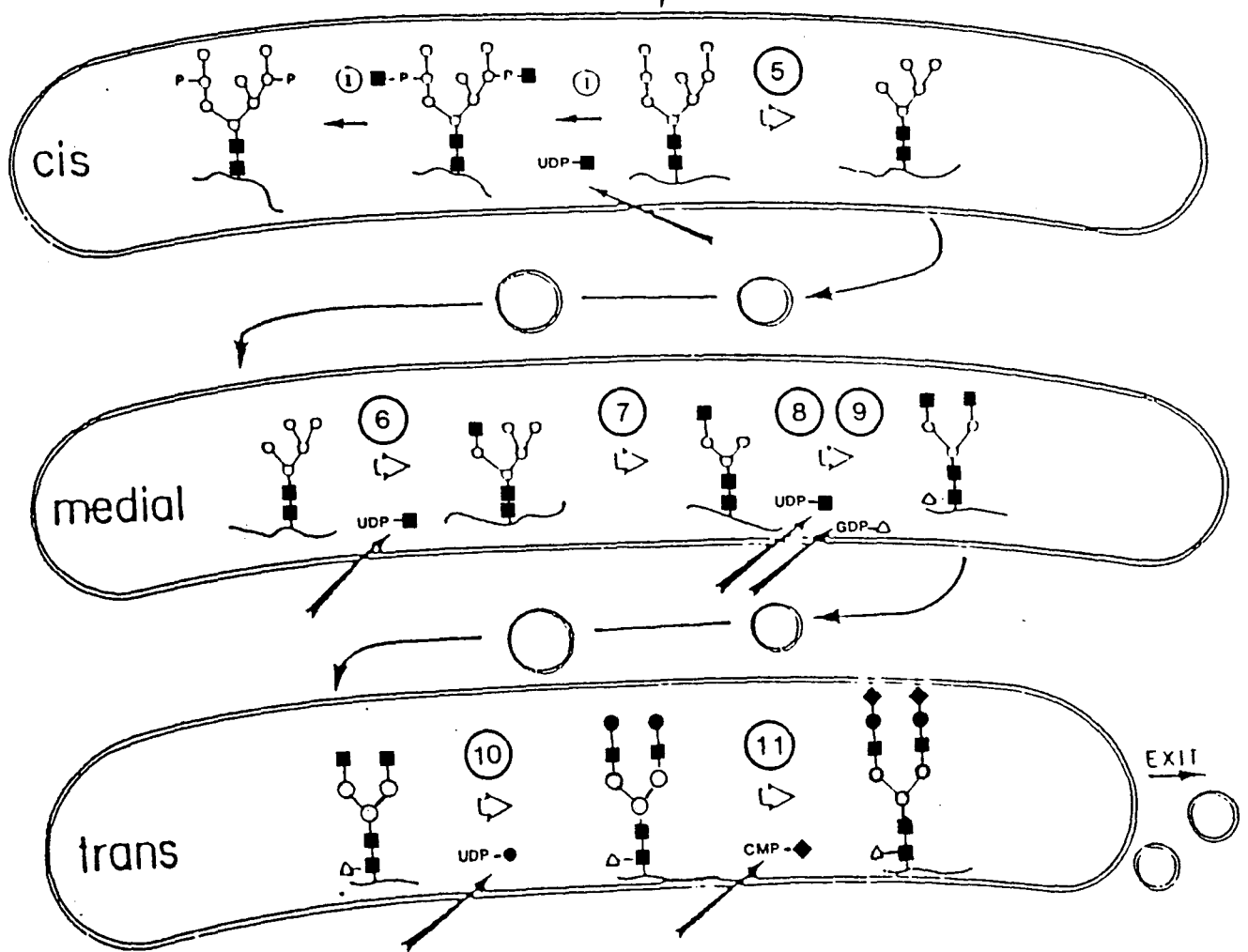


Figure 3 : Maturation du glycanne dans le Golgi. (Les numéros correspondent à des réactions décrites dans le texte.)

Symboles : ■ : GlcNAc ○ : Man
● : Gal △ : Fuc
◆ : NeuAc

D'après KORNFIELD et KORNFIELD, 1985.

Man₅GlcNAc₂-protéines (réaction 5). Cet élagage des résidus mannosyl se déroule à la fois dans le cis et le media Golgi (ROTHMAN et al. 1984a; 1984b).

La structure ainsi obtenue est modifiée par l'addition d'une N-acétylglucosamine (STANLEY et al., 1975) par l'intermédiaire d'une N-acétylglucosaminyltransférase I (réaction 6), suivi de l'élimination de deux résidus de mannose (HARPAZ et SCHACHTER, 1980) par action d'une α -mannosidase II (réaction 7 et 7') qui dépend strictement de la présence du résidu de N-acétylglucosamine. A ce stade, une fucosyltransférase, elle même dépendante du résidu de N-acétylglucosamine, peut transférer un résidu de fucose (réaction 9) sur la N-acétylglucosamine du point d'attache (JABBAL et SCHACHTER, 1971; WILSON et al., 1976). Une N-acétylglucosaminyltransférase II (NARASIMHAN et al., 1977) branche alors un deuxième résidu de N-acétylglucosamine (réaction 8).

Les dernières étapes de la maturation s'effectuent dans le trans Golgi, elles consistent en :

* L'addition de résidus galactosyl (réaction 10) par une β 1-4-galactosyltransférase (KHATRA et al., 1974; SCHACHTER et ROSEMAN, 1980).

* L'addition de résidus fucosyl et sialyl terminaux (réaction 11).

Le schéma de biosynthèse des N-glycosylprotéines montre l'apparition des structures oligomannosidiques et N-acétyllactosaminiques biantennées. Les structures de type mixte sont formées à partir de la réaction 6, en omettant l'action de la N-acétylglucosaminyltransférase II.

A partir de la réaction 8, l'action de différentes N-acétylglucosaminyltransférases permet l'apparition de glycannes polyantennés.

La figure 4 page 14 montre l'ensemble des réactions d'élongation impliquées dans la biosynthèse des N-glycannes, sans toutefois faire intervenir les N-acétylglucosaminyltransférases V, VI, et VII (Fig. 5 p. 15). Ce schéma souligne les nombreux points de compétition des différentes enzymes pour un même substrat, véritables carrefours de la glycosylation.

2 - Régulation

L'assemblage d'une structure oligosaccharidique complexe ne se fait pas au hasard. A une protéine donnée, correspondra une structure glycanique spécifique qui pourra être différente selon le type cellulaire. Cette unicité de la structure glycanique s'accompagne néanmoins de variations qui donnent naissance à la microhétérogénéité des glycoprotéines.

Le support polypeptidique joue un rôle régulateur de la glycosylation (SCHACHTER, 1986). En effet, la composition en acides aminés du polypeptide influence directement le nombre de sites de glycosylation. De plus, au cours de la biosynthèse des glycannes, la conformation de la chaîne protéique, les interactions entre le glycanne et la protéine, vont influencer l'action des glycosyltransférases en limitant l'accès de celles-ci au substrat.

Sur un même site de glycosylation il peut y avoir des variations qui conduisent au phénomène de la microhétérogénéité glycanique. Cette microhétérogénéité est liée au potentiel enzymatique de la cellule (SCHACHTER, 1986; RADEMACHER, 1988; PAULSON et al., 1989), à l'activité relative des enzymes (dépendant du pH, de la présence d'ions spécifiques) et enfin au temps de passage des substrats dans chaque cisterne golgienne.

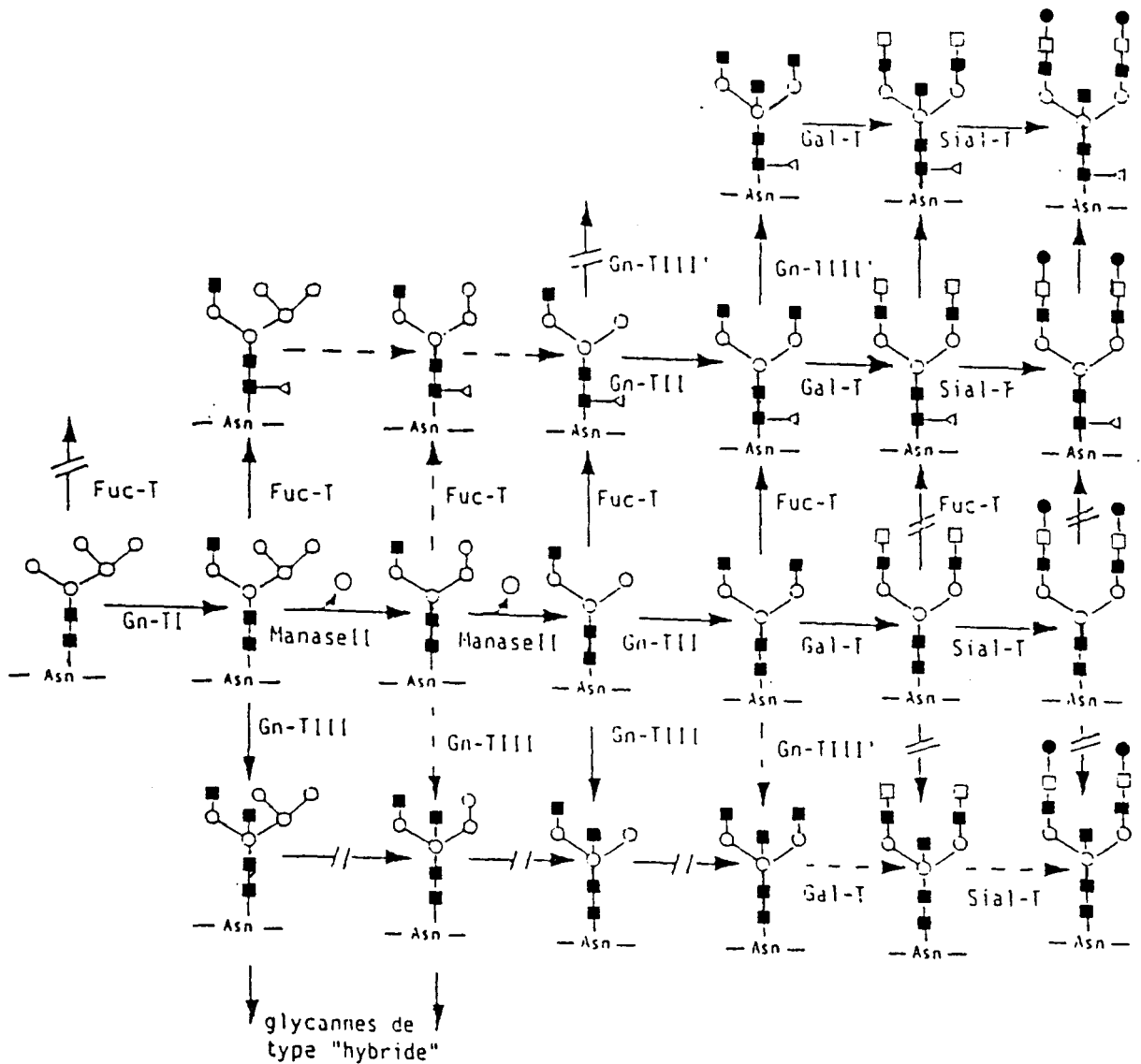


Figure 4 : Réactions d'élongation impliquées dans la biosynthèse des glycannes de type N-acétyllactosaminique biantennés.

Symbole : ■: GlcNAc ○: Man
 □: Gal △: Fuc
 ●: NeuAc

Gn-T : N-acétylglucosaminyltransférase, Sial-T : Sialyltransférase
 Gal-T : Galactosyltransférase, Fuc-T : Fucosyltransférase, Manase II :
 Mannosidase II

Les flèches pleines correspondent à des réactions observées *in vitro*, les flèches en pointillées à des réactions hypothétiques, les flèches barrées à des réactions impossibles (d'après SCHACHTER et ROSEMAN, 1980).

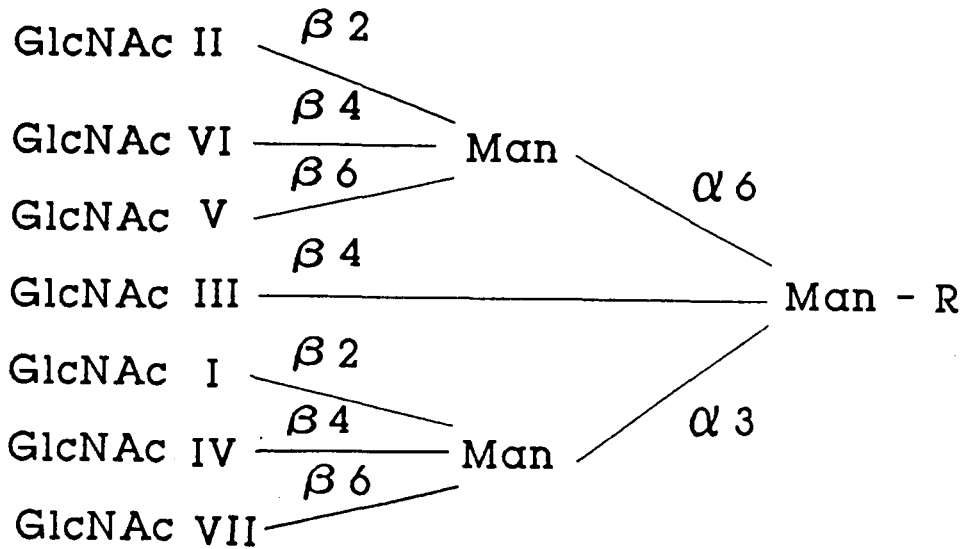


Figure 5 : Structure d'un glycanne hypothétique montrant toutes les possibilités d'antennarisation par les résidus N-acétylglucosamine (GlcNAc). Les résidus GlcNAc ont été numérotés arbitrairement et correspondent aux différentes N-acétylglucosaminyltransférases SCHACHTER, (1986).

Les différentes possibilités de contrôle de la glycosylation par la cellule sont nombreuses. La modification de la glycosylation sera donc probablement le fait d'une variation de la régulation d'un ou de plusieurs des nombreux points de contrôle.

ETUDE DE LA MODIFICATION DE LA GLYCOSYLATION DES N-GLYCOPROTEINES

Des modifications de la glycosylation des N-glycoprotéines ont été décrites dans le cas de glycoprotéines sécrétées par la cellule et dans le cas de glycoprotéines membranaires. La modification structurale des glycanes des glycoprotéines membranaires a fait l'objet de nombreuses études (voir les revues générales de DEBRAY, 1979; SMETS et VAN BEEK, 1984; HAKOMORI, 1984; FENDERSON et al., 1990) du fait du rôle primordial des glycanes dans l'adhésion des cellules, et dans les interactions avec l'environnement cellulaire.

Nous allons brièvement évoquer les principales modifications des structures des glycoprotéines membranaires et nous développerons ensuite, plus en détail les modifications des glycanes des glycoprotéines sécrétées, qui nous permettent d'effectuer une meilleure étude comparative avec notre modèle d'étude : la transferrine à laquelle nous consacrerons un chapitre particulier.

A - ETUDE DE LA MODIFICATION DE LA GLYCOSYLATION DES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES

I - VARIATIONS STRUCTURALES DES GLYCANNES PENDANT LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET LA DIFFERENCIATION

Depuis quelques années, l'emploi d'anticorps monoclonaux spécifiques de séquences glycaniques a permis de déceler des différences d'antigénicité des glycoprotéines et des glycolipides de la surface cellulaire, pendant l'embryogenèse, (KAPADIA et al., 1981; FENDERSON et al., 1990), et la différenciation (CHEN et al., 1989). Des auteurs ont démontré en particulier, que des antigènes glycaniques de la surface des cellules cancéreuses étaient présents sur des cellules embryonnaires et au cours de la différenciation cellulaire. Ces antigènes communs sont connus sous le terme d'antigènes oncofoetaux (HOLMES et al., 1987; HAKOMORI, 1984; FEIZI, 1981, 1985; FEIZI et CHILDS, 1987). Au cours du développement, l'expression de ces antigènes est temporaire, spécifique d'un stade du développement et d'un groupe cellulaire. Au stade adulte, leur expression est strictement limitée à quelques lignées cellulaires, elle peut apparaître anormalement suite à une activation génique liée au phénomène de la cancérisation.

II - VARIATIONS STRUCTURALES DES GLYCANNES LIEES A LA CANCERISATION

La cancérisation cellulaire et la diffusion métastatique sont le plus souvent accompagnées de profondes altérations structurales des glycanes des glycoprotéines et des glycolipides (HAKOMORI 1984; 1985; SMETS et al., 1984). Les changements les plus communs qui ont

été observés sont :

- l'expression d'antigènes glycaniques du stade embryonnaire,
- l'aberrante expression de déterminants de groupes sanguins (XUAN et al., 1985; SAKAMOTO et al., 1986),
- l'incomplète maturation des glycanes liés N-glycosidiquement (HUNT et al., 1985),
- l'augmentation de la sialylation (OGATA et al., 1976; YOGESWARREN et al., 1981; LE MARER et al., 1992),
- la modification du taux de glycanes poly-N-acétyllactosaminiques (YAMAMOTO et al., 1984).
- l'augmentation du taux de branchement du noyau pentasaccharidique des N-glycanes (TAKASAKI et al., 1980; YAMASHITA et al., 1984; DEBRAY et al., 1986; PIERCE et al., 1986; DENIS et al., 1987; MONTREUIL et al., 1983), et une augmentation de la fucosylation (BUCK et al., 1974; VAN BEEK et al., 1975).

B - ETUDE DE LA MODIFICATION DE LA GLYCOSYLATION DES GLYCOPROTEINES DES LIQUIDES BIOLOGIQUES

Certaines glycoprotéines possèdent une microhétérogénéité liée à leur copule glucidique. Différentes structures glycaniques peuvent être synthétisées par une même cellule pour une protéine donnée. Il en résulte des variants glycaniques de la molécule, ou glycovariants. La modification de la glycosylation de ces glycoprotéines se traduit le plus souvent par une variation de la proportion des glycovariants. Pour mettre en évidence la variation de la microhétérogénéité glycanique des glycoprotéines solubles, la plupart des auteurs utilisent la même méthode semi-quantitative, l'affino-immunoélectrophorèse bidimensionnelle en présence de Concanavaleine A (Con A).

Nous étudierons dans ce chapitre, la variation de la glycosylation des protéines plasmatiques lors du processus inflammatoire, lors de cas pathologiques, puis in vitro, sous l'action des cytokines.

La transformation des cellules modifie la biosynthèse des glycannes des glycoprotéines membranaires comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, mais également des glycoprotéines sécrétées par ces cellules. Nous étudierons cette transformation dans la deuxième partie de ce chapitre.

Nous démontrerons dans la troisième partie, l'importance de la mise en culture des cellules sur la glycosylation des glycoprotéines et nous finirons par la mise en évidence de l'impact de divers facteurs sur la glycosylation des glycoprotéines des liquides biologiques.

I - VARIATIONS STRUCTURALES DES GLYCANNES DES GLYCOPROTEINES DE LA PHASE AIGUE DE L'INFLAMMATION

L'inflammation est une réaction de l'organisme face à une agression. La réaction inflammatoire commence quelques heures après le stimulus et entraîne une série d'événements caractéristiques ayant pour but le contrôle de l'homéostasie.

La concentration de certaines protéines plasmatiques subit d'importants changements. Ces protéines particulières sont appelées protéines de la phase aiguë (PPA), ou "acute phase proteins (APP)", (PEPYS et BALTZ, 1983; KOJ, 1984; GORDON et KOJ, 1987; GAULDIE et al., 1985; KUSHNER et MACKIEWICZ, 1987). Les PPA ont fait l'objet de nombreuses études in vivo, car la mesure de leur concentration plasmatique permet un diagnostic plus précis de la maladie. Plus récemment, des études in vitro ont permis de mieux cerner les médiateurs responsables de l'augmentation de la synthèse des PPA.

Les propriétés physicochimiques et les capacités fonctionnelles des PPA sont très variées . Certaines de ces PPA sont glycosylées, et pour celles-ci, en plus des changements quantitatifs apparaissent des altérations qualitatives se manifestant par une modification de leur glycosylation.

Nous nous proposons dans ce chapitre de dresser une liste non exhaustive, des modifications de la glycosylation des PPA dans différents cas pathologiques ou physiologiques, puis d'étudier l'impact des cytokines et des glucocorticoïdes sur la variation de la glycosylation des PPA.

1 - Observations lors de cas pathologiques et de variations physiologiques

Les PPA les plus étudiées sont l' α 1-acide glycoprotéine (AGP) ou orosomucoïde et l' α -foetoprotéine (AFP). L'étude de leur microhétérogénéité a été faite principalement dans le but d'augmenter la spécificité d'un diagnostic, de suivre l'évolution d'une maladie et de prévenir une éventuelle rechute.

a) **Modifications glycaniques de l' α 1-acide glycoprotéine**

La structure des glycannes de l'AGP isolée du sérum humain est maintenant bien connue (FOURNET et al., 1978; SCHMID et al., 1979). La copule glucidique représente environ 42 % de la molécule. Elle est composée de glycannes de type N-acétyllactosaminique bi-,tri- et tétra-antennés. La plupart de ces glycannes sont complètement sialylés, par contre, ils sont peu fucosylés.

BIERHUIZEN et al., (1988), ont défini la composition des cinq glycanes des 3 variants séparés par la Con A. La forme non réactive à la Con A possède des structures tri- et tétraantennés, le variant faiblement réactif à la Con A possède une structure biantennée et quatre tri- ou tétra-antennées, et enfin la forme fortement réactive à la Con A possède deux glycanes biantennés et trois tri- ou tétraantennés.

i - Diminution des structures réactives à la Con A

WELLS et al., (1981), RAYNES, (1982), montrent en étudiant la variation glycanique de l'AGP de sérums de femmes enceintes et de patients cancéreux traités par un oestrogène, une baisse des variants réagissant avec la Con A. Des études post partum révèlent que ces altérations persistent plusieurs semaines après que le taux d'hormones sexuelles soit redevenu normal. La demi-vie de l'AGP étant d'environ cinq jours, les auteurs concluent que l'oestrogène n'affecte pas directement la glycosylation de l'AGP.

L'AGP du sérum de patients atteints de diverses maladies du foie (cirrhose, fibrose, hépatite chronique) présente une diminution de la sialylation de sa fraction glycanique (SERBOURCE-GOGUEL et al., 1983). Poussant plus loin leurs investigations, les auteurs démontrent que la modification de la glycosylation se traduit par une diminution de la réactivité de l'AGP vis à vis de la Con A. D'autre part, plus les désordres hépatiques sont nombreux, plus cette diminution est importante (SERBOURCE-GOGUEL SETA et al., 1986).

Dans le cas d'arthrite rhumatoïde ou de spondylarthrite ankylosante (MACKIEWICZ et al., 1987c, 1989a), et lors d'infections chroniques post-opératoires (SETA et al., 1989), une diminution de la

réactivité à la Con A de l'AGP est mise en évidence.

Enfin, chez les patients brûlés, l'AGP présente une baisse des variants glycaniques fortement retenus par la Con A (VAN DIJK et al., 1991).

ii - Augmentation des structures réactives à la Con A

NICOLLET et al., (1981), ont montré une augmentation de la réactivité des variants de l'AGP avec la Con A dans les sérums de patients présentant des états inflammatoires aigus. RAYNES, (1982) fait une observation similaire avec des sérums de patients atteints de pancréatite aiguë et étend son observation à d'autres PPA.

Dans le cas de cancers testiculaires, HANSEN et al., (1986), montrent une augmentation de la réactivité de l'AGP avec la Con A. On retrouve cette augmentation pour des maladies tels que le lupus érythémateux et l'arthrite rhumatoïde (MACKIEWICZ et al., 1987b, 1987c; PAWLOWSKY et al., 1989), ainsi que dans le cas d'infections aiguës post-opératoires (SETA et al., 1989).

iii - Conclusion

Connaissant les structures glycaniques de l'AGP, nous pouvons dégager deux types de modification glycanique de l'AGP en fonction de l'affinité vis à vis de la Con A. Le premier type est caractérisé par une diminution du taux relatif de biantennés en faveur d'une augmentation des oligosaccharides plus complexes (non retenus par la Con A). Ce type se retrouve chez les patients présentant des états inflammatoires chroniques. Le deuxième type de modification glycanique de l'AGP se caractérise par une augmentation du taux relatif de biantennés (retenus

par la Con A). Ce type se rencontre chez les patients présentant des états inflammatoires aigus.

BIOU et al., (1987), démontrent un troisième type de modification chez des patients atteints de cirrhoses hépatiques. Ils observent une augmentation de la fucosylation et notamment de la fucosylation en (α 1-3) sur les antennes externes des oligosaccharides tétraantennés.

Toutefois, TREUHEIT et HALSALL (1991) mettent en doute la pratique de l'évaluation de la proportion des variants glycaniques de l'AGP en utilisant la Con A pour le diagnostic de maladies du foie. En effet, ces auteurs démontrent que certaines maladies du foie entraînent des déficits totaux ou partiels de certains sites de glycosylation de l'AGP en glycannes biantennés, alors que globalement le taux de glycannes biantennés de la molécule reste stable.

b) **L'alpha-foetoprotéine**

L' α -foetoprotéine (AFP) est une glycoprotéine du sérum foetal qui possède un glycanne de type N-acétyllactosaminique et qui présente une microhétérogénéité importante vis-à-vis des lectines (YOSHIMA et al., 1980; YAMASHITA et al., 1983b). Elle est présente chez l'adulte en très faible quantité, mais elle peut être réexprimée lors de cancers du foie (SELL et BECKER, 1978).

En utilisant la chromatographie d'affinité avec la Con A comme ligand, DAMBUYANT et al., (1978); RUOSLATHI et al., (1978), démontrent une variation du taux des différents variants de l'alpha-foetoprotéine (AFP) du sérum de patients présentant des cancers du foie.

En 1979, KERCKAERT et al., montrent avec l'affino-immuno-

électrophorèse qu'une autre lectine, la Lens culinaris agglutinin (LCA) permet l'étude de la microhétérogénéité. Sur la base de ce résultat MACKIEWICZ et BREBOROWICZ, (1980), étudient le comportement de l'AFP vis-à-vis de la Con A et de la LCA. Ils mettent en évidence l'altération de la glycosylation de l'AFP synthétisée par des organes foetaux humains. Par ce genre d'étude BREBOROWICZ et al., (1981), montrent que la glycosylation de l'AFP diffère selon que les patients étudiés présentent des désordres hépatiques bénins, ou des hépatomes. Dans les cas de cancérisation du foie, le taux de fucosylation de l'AFP augmente et serait spécifique du développement d'un hépatocarcinome (AOYAGI et al., 1988). BREBOROWICZ et MACKIEWICZ (1989), en s'appuyant sur de nombreuses études affirment qu'une baisse de la réactivité vis-à-vis de la Con A associée à une augmentation de la réactivité vis-à-vis de la LCA est caractéristique d'une AFP sécrétée par des cellules cancéreuses. L'origine néoplasique de l'AFP peut être démontrée pour 65 % des patients quand l'étude se fait avec la Con A et pour 92 % quand elle est réalisée avec la LCA.

MACKIEWICZ et al., (1984), observe qu'au cours de la gestation, la glycosylation de l'AFP du liquide amniotique de femmes enceintes se modifie. Il y a augmentation des variants retenus par la Con A et des variants non retenus par la LCA. Les auteurs mettent en évidence une augmentation des variants fortement retenus par la LCA dans le cas de malformations congénitales du fœtus.

c) **Conclusion**

La plupart des observations de ce chapitre démontrent l'utilité en clinique de l'analyse de la microhétérogénéité glycanique de certaines PPA. Ces analyses apportent plus de précision sur la pathologie ou sur

les variations physiologiques qu'une simple mesure de la concentration des PPA.

Les mécanismes régulant le changement de la glycosylation des PPA restent inconnus. RAYNES (1982), suggère que la microhétérogénéité des PPA serait dû à l'accroissement soudain de la synthèse des PPA pendant la phase d'inflammation aiguë, s'accompagnant d'une faible induction des glycosyltransférases terminales. Ceci expliquerait l'augmentation en glycannes biantennés, mais le phénomène se retrouve dans le cas de cancers testiculaires où le stimulus n'est pas de nature aiguë (HANSEN 1986).

On peut supposer que le devenir extracellulaire des PPA soit différent dans les cas pathologiques ou physiologiques particuliers. La modification des glycannes pourrait donc intervenir dans la clairance des PPA par des récepteurs de cellules cibles spécifiques au PPA lors du phénomène de l'inflammation.

Si, la plupart des auteurs cités précédemment n'expliquent pas les mécanismes susceptibles de réguler la glycosylation, ils sont nombreux à suggérer qu'ils sont différents de ceux régulant la synthèse protéique.

2 - Etudes in vitro : action des cytokines

Des observations lors de cas pathologiques ont démontré que le processus de l'inflammation entraînait des altérations de la copule glucidique des PPA. Pour connaître la nature des facteurs responsables de ces altérations, des études in vitro ont été réalisées.

Les facteurs responsables de la modification de la synthèse et de la sécrétion des PPA ont été identifiés comme étant des médiateurs appartenant à la famille des cytokines, peptides véhiculant des signaux

entre les cellules et plus spécialement entre les cellules du système immunitaire (RAMADORI et al., 1985; PERLMUTTER et al., 1986; BAUMANN et al., 1986; FULLER et al., 1985; DARLINGTON et al., 1986; GANAPATHI et KUSHNER, 1988; RICHARDS et al., 1991). L'interleukine 1 (IL-1) initialement "leukocyte endogenous mediator" (LEM) et le "Tumor Necrosis Factor" (TNF) sécrétés par les macrophages activés, stimulent l'expression d'un nombre limité de PPA (RAMADORI et al., 1985; LE et MORTENSEN, 1984; PERLMUTTER et al., 1986). Le "Transforming Growth Factor" : TGF est une cytokine synthétisée par les monocytes et par les lymphocytes T activés lors de l'inflammation (KEHRL et al., 1986). L'interleukine 6 (IL-6) apparaît être le régulateur majeur de l'expression des PPA (GAULDIE et al., 1987; CASTELL et al., 1989; BAUMANN et al., 1989; HEINRICH et al., 1990). Au cours des dernières années, l'IL-6 fut isolée et désignée par différents noms : BSTF2 : "B-Cell Stimulatory Factor", IFN β 2 : Interféron β 2 et HSF : "Hepatocyte Stimulating Factor" (voir les revues générales de WONG et CLARK, 1988; KISHIMOTO et HIRANO, 1988; HEINRICH et al., 1990).

La régulation de l'expression des PPA par les cytokines est dépendante des glucocorticoïdes qui ont une action permissive ou synergique (KOJ et al., 1984; BAUMANN, 1989).

L'action des différents facteurs responsables de la régulation de l'expression des PPA (cytokines et glucocorticoïdes, l'action de ces derniers sera étudiée p. 34) fut étudiée sur la glycosylation des PPA.

En utilisant des lignées cellulaires d'hépatocarcinomes humains : les cellules Hep3B et les cellules HepG2, MACKIEWICZ et al., (1987a, 1989d) démontrent l'importance des cytokines dans la modification de l' α 1 antitrypsine (AAT), de l'AFP et de la céruléoplasmine (Cp). Ces

auteurs utilisent des milieux conditionnés (par des monocytes activés, ou par des cellules cancéreuses) contenant des cytokines. L'addition d'IL-1 ou de "Tumor necrosis factor" (TNF), aboutit à une modification de la synthèse protéique, mais à aucun changement dans la glycosylation. Par contre, quand les milieux de culture sont supplémentés avec les milieux conditionnés, les cellules reproduisent les deux types d'altération de la glycosylation des PPA pendant les différents stades de l'inflammation. En effet, une augmentation des structures biantennées par rapport aux polyantennées pour les PPA sécrétées par les cellules Hep3B a été observée, alors qu'une augmentation des structures polyantennées par rapport aux biantennées a été observée pour les PPA sécrétées par les cellules HepG2 (baisse des variants réagissant avec la Con A).

MACKIEWICZ et al., (1989b, 1989c) poursuivent leur études avec ces deux lignées cellulaires en utilisant de l'IL-6, et démontrent son rôle dans la modification de la glycosylation décrite précédemment avec l'AAT, l'AFP, et la Cp. L'action de l'IL-6 serait amplifiée par celle de l'IL-1.

D'autres systèmes cellulaires ont été étudiés pour démontrer l'action des cytokines sur la modification de la glycosylation. Utilisant la culture primaire d'hépatocytes humains, POS et al., (1989) démontrent également l'action de l'IL-6, mais aussi celle de l'IL-1 dans la modification de la glycosylation des PPA. La présence probable de fibroblastes et de cellules de Küpffer avec les hépatocytes pourrait expliquer l'action de l'IL-1. En effet, en présence d'IL-1, ces cellules synthétisent et sécrètent l'IL-6. MACKIEWICZ et al. (1991), utilisent des hépatocytes de souris transgéniques possédant le gène codant pour l'AGP de Rat. Ces auteurs démontrent l'action des cytokines sur la modification de la glycosylation de l'AGP synthétisée par ces cellules en

additionnant dans le milieu de culture l'IL-1, l'IL-6 et la dexaméthasone. En effet, ils observent une augmentation des variants de l'AGP interagissant avec la Con A.

Le TGF β 1 influence également la glycosylation de l'AAT synthétisée par les cellules HepG2 et Hep3B en augmentant le taux de variants interagissant avec la Con A (MACKIEWICZ et KUSHNER, 1990). L'action du TGF β 1 sur la glycosylation de l'AAT synthétisée par les cellules Hep3B est analogue à celle de l'IL-6. D'autre part, l'IL-6 et le TGF β 1 agissent en synergie. Par contre, le TGF β 1 agit de façon contraire à celle de l'IL-6 sur les cellules HepG2 et a un effet inhibiteur sur l'action de l'IL-6. Ces expériences démontrent la spécificité de réponse de la cellule et la complexité des interactions des différentes cytokines en présence, lors de l'inflammation.

Ces résultats suggèrent que les changements dans la structure des glycanes des PPA observés in vitro résultent principalement de l'action des cytokines et notamment de l'IL-6 sur les hépatocytes, et que les deux types de modification, baisse ou augmentation des variants glycaniques réagissant à la Con A, sont probablement régulés par des mécanismes intracellulaires différents.

La modification glycanique des PPA pourrait être due à l'augmentation de l'expression d'un des variants glycaniques. La démonstration que les cytokines modifient bien le processus de la maturation des glycanes tout en modifiant l'expression génique des PPA a été apportée par VAN DIJK et al., (1991). Les changements de glycosylation induits par les milieux conditionnés et par l'IL-6 résultent probablement d'une modification génique des différentes enzymes intervenant dans la glycosylation (WOLOSKI et al., 1985a; 1986; JAMIESON et al., 1987).

En mettant, en parallèle, l'augmentation de synthèse protéique et la modification glycanique, les auteurs cités précédemment, établissent clairement que ces deux processus ne sont pas liés.

II - MODIFICATION DE LA GLYCOSYLATION DES GLYCOPROTEINES SYNTHETISEES ET SECRETEES PAR DES CELLULES CANCEREUSES

La culture de nombreuses lignées cellulaires transformées a permis l'étude des modifications du métabolisme directement liées à la transformation cellulaire. Beaucoup de ces lignées cellulaires ont conservé, en partie, les fonctions des cellules "normales", et notamment pour les hépatocytes, leur faculté de sécréter de nombreuses glycoprotéines.

L' α 1-antitrypsine (AAT) synthétisée et sécrétée par des cellules d'hépatocarcinome (PLC/PRF/5) possède une affinité réduite vis-à-vis de la Con A traduisant une augmentation des structures polyantennées au détriment des structures biantennées. De plus, la sialylation terminale de l'AAT se trouve réduite (CARLSON et al., 1984). Ces différentes modifications de la structure glycanique se retrouvent pour l'AGP, et l' α 1-antichymotrypsine sécrétées par différentes lignées d'hépatocarcinomes, HepG2 et Hep3B (ALM et ERIKSON, 1985).

La transformation des cellules BHK 21/C13 par le virus du sarcome de Hamster induit de profondes modifications de la structure des glycanes de la fibronectine sécrétée dans le milieu de culture. En effet, le rapport de la somme des glycanes tri- et tétraantennés (Con A non réactifs), sur les glycanes biantennés (Con A réactifs) passe de 0,73 à 2,46, tandis que le taux de sialylation s'accroît en raison de l'augmentation de la proportion des glycanes di-, tri-, et tétrasialylés (DELANNOY et al., 1985).

Une simplification de la structure des oligosaccharides de la choriogonadotropine humaine (hCG) est observée dans le cas de patients présentant un choriocarcinome. Il y a synthèse de structures monoantennées, mais aussi de structures triantennées, toutes deux, n'existant pas dans l'hCG "normale". En outre, aucune structure n'est sialylée, et le taux des formes fucosylées est doublé (MIZUOCHI et al., 1983).

L'augmentation de la fucosylation est également observée dans le cas de l'AFP du sérum de patients atteints d'hépatocarcinome. Cette augmentation serait un marqueur de l'origine néoplasique de l'AFP (AOYAGI et al., 1988; BREBOROWICZ et MACKIEWICZ, 1989).

Dans le cas de la sécrétion ectopique de l' α -amylase par des tumeurs d'ovaire et de poumon, la copule glucidique de la forme sécrétée diffère de celle de la forme membranaire. La structure glycanique de la forme membranaire se trouve modifiée par augmentation de l'antennarisation, et par augmentation de la fucosylation. Par contre, l' α -amylase sécrétée possède des glycannes dont la biosynthèse peut être considérée comme incomplète, par comparaison, avec la forme normale. Les résidus de fucose des antennes sont totalement absents dans la glycoenzyme sécrétée (YAMASHITA et al., 1981).

La structure glycanique de la gamma-glutamyltransférase (gamma-GTF) synthétisée par des cellules d'hépatome de Rat, révèle l'expression de la N-acétylglucosaminyltransférase III. En effet, YAMASHITA et al., (1983a), démontrent la présence d'une GlcNAc intercalaire alors que la structure glycanique de la gamma-GTF synthétisée par les hépatocytes normaux de Rat n'en possède pas.

Des études comparatives des structures glycaniques de la thyroglobuline humaine provenant de tissus normaux et cancéreux

révèlent de grandes différences dans la structure des glycanes (YAMAMOTO et al., 1984). La transformation des cellules s'accompagne d'une modification de la structure des glycanes N-acétyllactosaminiques : phosphorylation, diminution du taux d'acide sialique, augmentation de la masse par répétition du disaccharide Gal-GlcNAc et une fucosylation périphérique.

Les principales modifications, observées au niveau membranaire des cellules cancéreuses, se retrouvent au niveau des glycoprotéines sécrétées, notamment, la polyantennarisation et l'augmentation de la fucosylation. L'incomplète maturation des glycanes semble être la cause de la sécrétion ectopique, ce qui semblerait prouver le rôle des glycanes dans la sécrétion de certaines glycoprotéines.

III - INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE DES CELLULES SUR LA GLYCOSYLATION DES GLYCOPROTEINES

Les conditions de culture des cellules influencent considérablement l'activité des glycosyltransférases et la définition de leur paramètres est l'une des préoccupations de l'industrie des glycoprotéines recombinantes (voir revue générale de CUMMING, 1991). L'isolement des cellules de leur contexte physiologique annule ou tend à annuler en fonction du temps de culture, les différents contrôles spécifiques du type cellulaire qui régulent le métabolisme des cellules in vivo. La biosynthèse des glycanes des protéines ne fait pas exception à cet effet comme le démontrent les quelques exemples suivants.

Les cellules de follicules thyroïdiens de Porc mises en culture dans un milieu sans sérum synthétisent et sécrètent une glycoprotéine précurseur des hormones thyroïdiennes : la thyroglobuline. La comparaison des glycanes de la thyroglobuline synthétisée in vitro et

été détectée. De plus, des nouvelles structures N-acétyllactosaminiques tri- et tétraantennées ont été identifiées, ainsi que la présence de GlcNAc intercalaire (RONIN et al., 1986)

La mise en culture d'hépatocytes de souris transgéniques (possédant le gène codant pour l'AGP de Rat) entraîne une modification de la structure glycanique de l'AGP. En effet, la glycosylation de l'AGP plasmatique des souris transgéniques se définit par la présence principale de variants glycaniques fortement retenus par la Con A. Par contre, l'AGP synthétisée et sécrétée par les hépatocytes en culture présente principalement des variants glycaniques non retenus par la Con A (MACKIEWICZ et al., 1991).

Le métabolisme des cellules en culture dépend également de la composition du milieu de culture. Différents auteurs ont démontré l'influence de certains composants du milieu sur la glycosylation des protéines (revue générale de GOOCHEE et MONICA, 1990).

La concentration du sérum de veau foetal dans le milieu de culture de cellules de carcinome murin (PYSC) a une influence sur la glycosylation d'une glycoprotéine soluble (EBM) dans le milieu de culture. MEGAW et JOHNSON (1979) observent une diminution du taux de monosaccharides des glycanes de l'EBM quand la concentration de sérum de veau foetal dans le milieu de culture passe de 1 à 10 %, alors que le taux de synthèse de la glycoprotéine EBM reste stable. Ces auteurs étudient également l'influence de la nature du tampon du milieu de culture. Ils observent une stimulation de la glycosylation de la glycoprotéine EBM avec l'HEPES par rapport au bicarbonate de sodium. En 1975, DANIEL et WOLF avaient également montré l'impact de l'HEPES sur la biosynthèse des glycanes en mettant en évidence une baisse de l'incorporation des résidus de fucose des glycoprotéines membranaires et une diminution de l'incorporation des résidus de N-acétylglucosamine des

glycoprotéines sécrétées.

L'absence de glucose dans le milieu de culture entraîne deux altérations distinctes de la glycosylation des protéines : (1) le transfert de précurseurs oligosaccharidiques tronqués sur le polypeptide et (2) l'absence de glycosylation de sites du polypeptide normalement glycosylés (ELBEIN, 1987). Ces altérations sont inhibées par l'addition de mannose, mais ne le sont pas après addition de fructose, de pyruvate ou de glutamine (STARK et HEATH, 1979; TURCO, 1980).

L'altération des oligosaccharides liés N-glycosidiquement aux protéines est également dépendante de la densité cellulaire des cellules en culture (SASAK et al., 1982).

IV - INFLUENCE DES HORMONES ET DE L'ACIDE RETINOIQUE

1 - Hormones thyroïdiennes et hormones régulant leur sécrétion

Le "thyrotropin-releasing factor" (TRF) est un tripeptide sécrété par l'hypothalamus qui augmente la sécrétion de l'hormone thyroïdienne (TSH) par le lobe antérieur de l'hypophyse. La TSH augmente la sécrétion des hormones thyroïdiennes : thyroxine et triiodothyronine.

L'augmentation de l'activité spécifique de la TSH serait le résultat de l'altération de la glycosylation de la TSH par le TRH (MENEZES-FERREIRA et al., 1986; GESUNDHEIT et al., 1987).

Les cellules de follicule thyroïdien de Porc mises en culture dans un milieu sans sérum synthétisent et sécrètent un polypeptide précurseur des hormones thyroïdiennes : la thyroglobuline. L'addition de la TSH entraîne une augmentation de la sialylation de la thyroglobuline (RONIN et al., 1986). D'autres auteurs ont démontré une

augmentation de l'activité des glycosyltransférases par la TSH in vivo (SPIRO ,1980) et in vitro (EGGO et BURROW, 1982; FRANC et al., 1984). Enfin la triiodothyronine modifierait la glycosylation de l' α -lactalbumine synthétisée par des cellules de glandes mammaires de Souris (ZISKA et al., 1988).

2 - Action des glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes ont une influence sur la synthèse des protéines et notamment des protéines de la phase aiguë de l'inflammation in vivo (BAUMANN et al., 1983; KULKARANI et al., 1985) et in vitro (BAUMANN et HELD, 1981; GROSS et al., 1984).

POS et al., (1988), ont démontré la responsabilité de la dexaméthasone sur la modification de la glycosylation des glycoprotéines synthétisées par des hépatocytes de Rat in vivo et in vitro. Cette modification se traduit par une augmentation des variants glycaniques fortement retenus par la Con A.

DELERS et ENGLER, (1986) démontrent la modification de la proportion des différents variants glycaniques de l'haptoglobine synthétisée par des hépatocytes embryonnaires de Poulet en culture primaire incubés avec du cortisol.

D'autre part, la dexaméthasone augmente l'activité de la β -galactoside α 2-6 sialyltransférase des hépatocytes de Rat (VAN DIJK et al., 1986) et des cellules d'hépatome (FAZA) (HARDER et al., 1990). WANG et al. (1989, 1990), montrent que l'augmentation de l'activité est liée à l'augmentation de l'expression de cette enzyme par l'hépatocyte.

De nombreuses études in vitro ont démontré le rôle des hormones sur la régulation de la glycosylation des glycoprotéines.

3 - Influence de l'acide rétinoïque

L'addition de rétinol ou d'acide rétinoïque dans le milieu de culture des cellules entraîne différents effets qui dépendent du type cellulaire (WOLF, 1984), en particulier, une altération de la biosynthèse des glycanes des protéines.

Les chondrocytes d'embryon de Poulet en culture, exposés à l'acide rétinoïque synthétisent une fibronectine dont la proportion de glycanes de type oligomannosidique diminue au dépend des glycanes de type N-acétyllactosaminique (BERNARD et al., 1984).

L'acide rétinoïque peut induire la différenciation de nombreuses cellules normales, mais aussi de cellules cancéreuses, indiquant que ce composé agit au niveau du noyau. Différents auteurs ont démontré l'augmentation de l'activité de glycosyltransférases (LOTAN et al., 1988; CUMMINGS et MATTOX, 1988) pouvant être la conséquence du changement de l'expression génique liée à la différenciation. CHAN et WOLF (1987) décrivent un autre mode d'altération de la glycosylation par l'acide rétinoïque qui est lié à la baisse du transfert de l'oligosaccharide $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$ du dolichol à la protéine.

4 - Influence d'autres facteurs

D'autres facteurs connus pour induire la différenciation de certaines cellules, ont également une action sur la glycosylation. Les effets de ces facteurs : DMSO (LIU et al., 1983), phorbol esters : PMA (MOSKAL et al., 1987) et TPA (DURHAM et al., 1983) varient selon le type cellulaire étudié, ce qui est probablement dû à la spécificité cellulaire de la machinerie enzymatique responsable de la biosynthèse des glycanes.

C - CONCLUSION

L'utilisation de la Con A, parfois de la LCA permet de déterminer la proportion des glycovariants des PPA. Lors de cas pathologiques ou physiologiques, une augmentation ou une diminution des glycovariants interagissant avec la Con A est observée. La variation de la glycosylation de certaines PPA est spécifique d'un cas pathologique particulier, elle permet alors de confirmer ou de préciser un diagnostic. De plus, des études in vitro, ont permis de démontrer que le type de modification de la glycosylation dépendait de la nature de la spécificité de certaines lignées cellulaires.

La variation de la glycosylation de glycoprotéines sécrétées par les cellules cancéreuses, se traduit généralement par une complexité des structures glycaniques (polyantennarisation, fucosylation, augmentation de la sialylation), il en est de même pour les glycanes des glycoprotéines membranaires de ces cellules.

Certaines études ont démontré que la mise en culture était une cause des changements très importants de la structure des glycanes. La mise en culture est néanmoins primordiale pour étudier l'impact de différents facteurs sur la glycosylation des protéines sécrétées dans le milieu de culture. Les études in vitro, ont notamment permis de démontrer le rôle, dans la modification de la glycosylation des protéines, des cytokines et des glucocorticoïdes lors du processus inflammatoire, d'hormones et de facteurs de différenciation comme l'acide rétinoïque.

Notre modèle d'étude étant la sérotransferrine, nous aborderons dans le chapitre suivant l'étude des variations de la glycosylation de cette glycoprotéine. Nous mettrons en évidence, outre les modifications de la glycosylation dans des cas physiologiques et pathologiques, des variations liées à la spécificité de l'espèce animale et à celle des tissus impliqués dans la biosynthèse des transferrines.

ETUDE DE LA MODIFICATION DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES DE LA TRANSFERRINE

La sérotransferrine étant notre modèle pour étudier des facteurs susceptibles de modifier la glycosylation, nous nous proposons dans le début de ce chapitre de présenter d'une manière succincte cette molécule. Puis nous étudierons la variation de la glycosylation de la sérotransferrine.

Les transferrines sont un ensemble de glycoprotéines possédant des propriétés physico-chimiques communes (masse moléculaire voisine de 80 kDa), et dont le rôle est de transporter le fer chez les vertébrés (AISEN et LISTOWSKY, 1980) et chez certains invertébrés (HUEBERS et al., 1982; MARTIN et al., 1983). Elles assurent la répartition du fer entre les formes actives comme l'hémoglobine, la myoglobine et les cytochromes et les formes de stockage comme la ferritine et l'hémosidérine.

Cette famille comprend :

- L'ovotransferrine (ou conalbumine) présente dans les sécrétions de l'oviducte des oiseaux et des reptiles, elle fut isolée par SCHADE et CAROLINE en 1944 du blanc d'oeuf de poule. Chez la poule, il a été démontré que la chaîne polypeptidique est la même que celle de la sérotransferrine mais avec des glycanes différents. L'ovotransferrine constituerait donc un glycovariant de la sérotransferrine.

- La transferrine, une β -globuline isolée du plasma par SCHADE et CAROLINE, en 1946 et par LAURELL en 1947. Elle est également

présente dans les milieux extra-vasculaires et dans différents liquides biologiques comme le liquide cébrospinal, le lait, le liquide séminal et le liquide amniotique. Elle a également été caractérisée dans les neurones des Oiseaux et des Mammifères (facteur myotrophique).

- La lactotransferrine (ou lactoferrine) est présente dans le lait des Mammifères, dans les liquides de sécrétion (larmes, salive, suc pancréatique), dans les mucus (bronchique et intestinal) et dans les leucocytes. Elle fut découverte et isolée du lait de Femme par MONTREUIL et MULLET, MONTREUIL et al., en 1960 et par JOHANSSON la même année.

- La mélanotransferrine (ou P97), identifiée à la surface des cellules de mélanomes humains par WOODBURY et al., BROWN et al., et DIPPOLD et al., en 1980.

- Les protéines fixant le fer mises en évidence dans l'hémolymphe de certains Invertébrés (Crustacés, Urocordés).

Dans la suite de ce chapitre, nous allons décrire uniquement les transferrines.

A - GENERALITES SUR LES TRANSFERRINES

I - BIOSYNTHESE DE LA TRANSFERRINE

Le foie, et plus particulièrement l'hépatocyte est le principal site de synthèse de la transferrine. D'autres cellules produisent de la transferrine comme celles de la rate (PHILLIPS et THORBECKE, 1966),

le macrophage péritonéal (HAURANI et al., 1973; CUSTER et al., 1982), les cellules de Sertoli des testicules (SKINNER et GRISWOLD, 1980; 1984; STALLARD et al., 1990), la glande mammaire (MORGAN, 1981), les lymphocytes T (LUM et al., 1986), et le cerveau (LEVIN et al., 1984; TSUTSUMI et al., 1989).

Pendant l'embryogenèse la transferrine est synthétisée par de nombreuses cellules embryonnaires et extra-embryonnaires. Durant les premiers stades embryonnaires, la vésicule vitelline assure la majeure partie de la synthèse, puis celle-ci décroît pour augmenter dans le foie foetal (GITLIN et KITZES, 1967; GITLIN et PERICELLI, 1970; RENFREE et MAC LAREN, 1974; YEOH et al., 1974; 1979). Des ARN messagers de la transferrine ont été détectés dans les fibres musculaires, le rein et la rate d'embryon de rat (LEVIN et al., 1984; IDZERDA et al., 1986). Les oligodendrocytes synthétisent et stockent la transferrine (BLOCH et al., 1985; FESTOFF et al., 1989), il en est de même pour les cellules nerveuses embryonnaires de la moelle épinière (STAMATOS et al., 1983).

La transferrine synthétisée par le rein, les muscles et la rate diminue progressivement après la naissance, tandis qu'au niveau du cerveau la synthèse augmente.

Les hépatocytes isolés continuent de sécréter des protéines plasmatiques dont la transferrine. Généralement, le taux de synthèse diminue plus ou moins rapidement après plusieurs jours de culture. La composition du milieu et la nature du support peuvent influencer fortement le taux de synthèse protéique (GUILLOUZO et al., 1986).

Les cellules cancéreuses d'ovaires humains non productrices de transferrine, synthétisent cette glycoprotéine dans des conditions particulières (milieu minimum sans sérum, durée de culture longue), (OHKAWA et al., 1990). Ces cellules synthétiseraient leur propre

facteur de croissance. En effet, la transferrine est nécessaire à la prolifération des cellules in vitro (BARNES et SATO, 1980; SHAPIRO et WAGNER, 1989).

II - STRUCTURE POLYPEPTIDIQUE DE LA TRANSFERRINE

Les différentes transferrines caractérisées dans le sérum de nombreuses espèces animales ont été très peu étudiées. Seules sont parfois connues leur masse moléculaire, leur mobilité électrophorétique, leur capacité de fixation du fer ou leur composition en acides aminés. Par contre, la séquence primaire de la sérotransferrine humaine a été réalisée par Mac GILLIVRAY et al., en 1982 et 1983, confirmée par des études de séquences de cDNA du foie humain codant pour la sérotransferrine humaine (UZAN et al., 1984; YANG et al., 1984). Le taux d'hélicité α (faible, inférieur à 20 %), ainsi que le taux de structure plissée β ont été déterminés (NAGY et LEHRER, 1972; TOMIMATSU et VICKERY, 1972; VENTURA et al., 1973; MAZURIER et al., 1976). La chaîne polypeptidique de la sérotransferrine humaine se scinde en deux régions compactes, de tailles sensiblement voisines qui possèdent chacune un site de fixation du fer. Les ponts disulfure, au nombre de 19, jouent un rôle important dans la conformation de la protéine.

Dès 1975, Mac GILLIVRAY et BREW ont remarqué une grande homologie interne dans la séquence peptidique de la sérotransferrine, et ont mis en évidence la présence de deux lobes possédant chacun un site de fixation du fer. A l'examen de la structure primaire de la sérotransferrine humaine, Mac GILLIVRAY et al., (1977) conclurent à l'hypothèse d'une quadruplication d'un gène ancestral qu'appuyèrent des analyses statistiques informatisées (JELTSH et CHAMBON, 1982). La

détermination de la structure tridimensionnelle de la lactotransferrine humaine (ANDERSON et al., 1987) et de la sérotransferrine de Lapin (BAILEY et al., 1988) ont permis de confirmer l'aspect bilobé de la molécule (Fig. 6 p. 42). Les deux lobes sont reliés entre eux par une hélice contenant dix résidus d'acides aminés. Chaque lobe est divisé en deux domaines de taille égale, ayant des structures secondaires identiques.

Les nombreuses homologies de séquences primaires existantes pour toutes les transferrines argumentent le fait que leurs structures tridimensionnelles doivent être sensiblement similaires.

B - VARIATIONS DE LA GLYCOSYLATION DE LA SÉROTRANSFERRINE

I - VARIATION DE LA GLYCOSYLATION SELON L'ESPECE

La spécificité de la N-glycosylation selon l'espèce est maintenant bien établie (KOBATA, 1984; RADEMACHER et al., 1988). Les transferrines n'échappent pas à cette règle comme en témoignent les études comparées des structures glycaniques des transferrines de différentes espèces animales entreprises au Laboratoire (voir à cet effet : CODDEVILLE, 1986; SPIK et al., 1988; CODDEVILLE et al., 1989; SPIK et al., 1991. En outre, comme dans la plupart des glycoprotéines, les glycannes des sérotransferrines présentent une microhétérogénéité (Tableau I, p. 43) dont l'origine et la signification biologique ne sont pas connues.

Nous nous limiterons dans ce chapitre à l'étude détaillée de la structure des glycannes de la sérotransferrine humaine et de Poule dont nous allons dans nos travaux personnels, étudier la variation de la

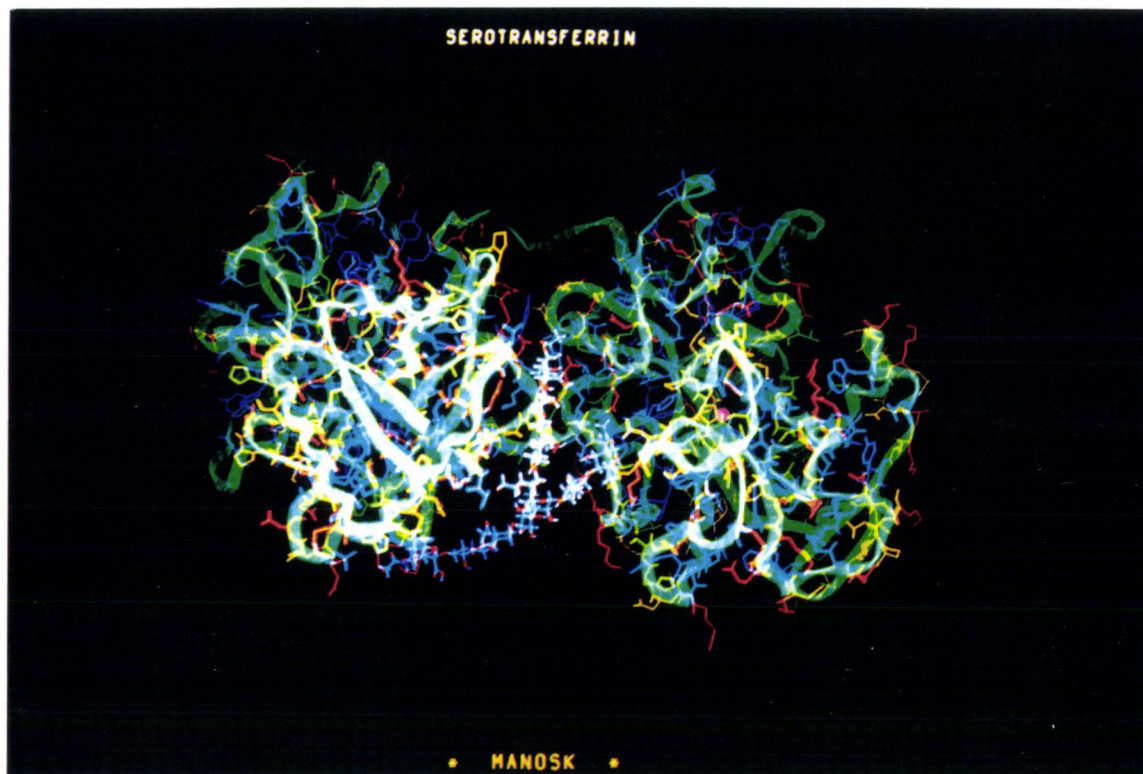
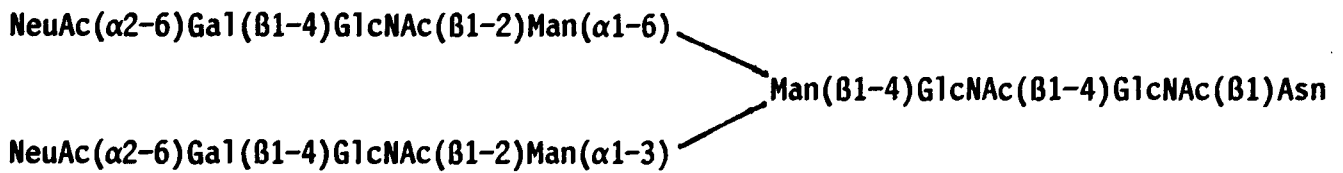


Figure 6 : Modélisation moléculaire de la sérotransferrine de Lapin réalisée d'après les données cristallographiques de BAILEY et al., (1988).

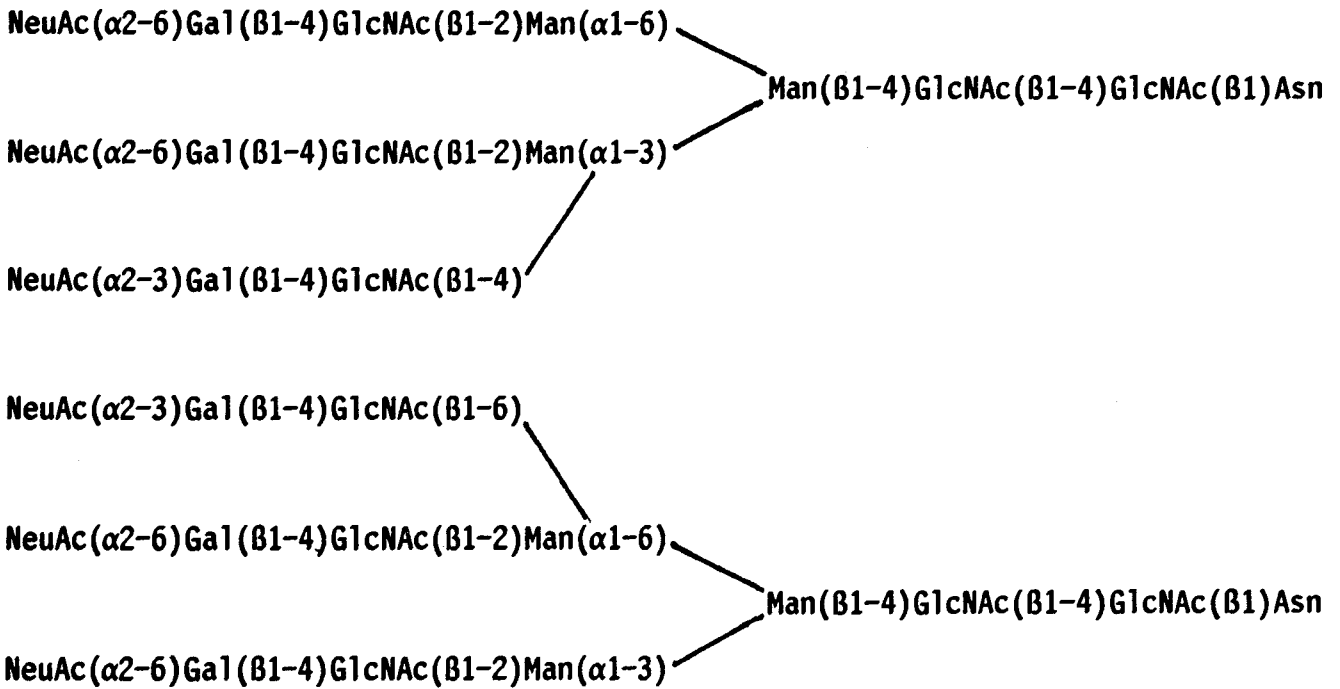
TABLEAU I : Caractéristiques des glycanes des sérotransferrines de différentes espèces animales (SPIK *et al.*, 1988).

Origine	% en sucres	Nombre de glycanes	Structure glycanique	Fucosylation en (α 1-6)
Homme	5,80	2	bi + tri	
Vache	2,90	1	bi	
Poule	2,85	1	bi + tri	+
Cheval	2,85-5,20	1-2	bi	
Marsupiaux*	2,90	1	bi	
Souris	2,90	1	bi	+
Lapin	3,00	1	bi	
Rat	2,90	1	bi	+
Mouton	2,22	1	bi	

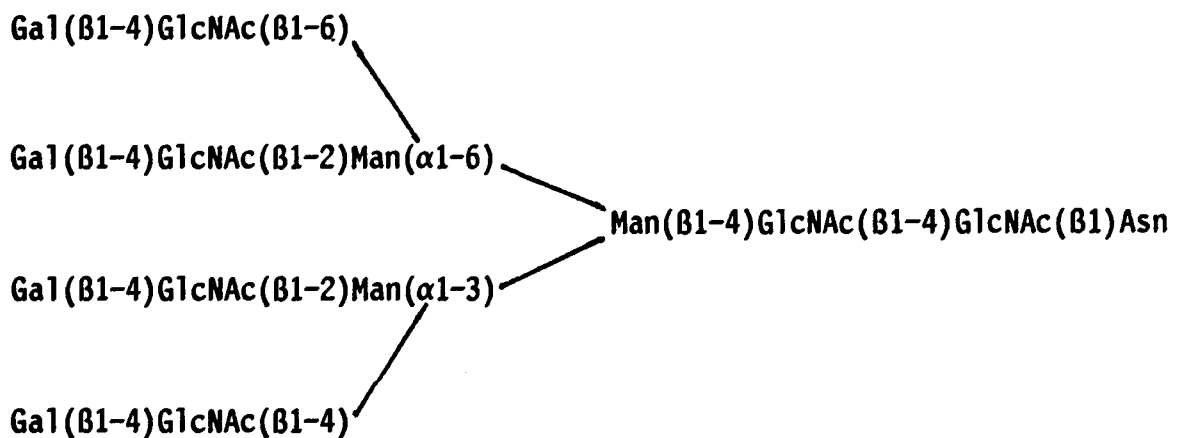
* : Kangourou, Opossum, Wallaby



A



B



C

Figure 7 : Structure des glycanes de la sérotransferrine humaine. D'après SPIK et al., (1973; 1974; 1975; 1982; 1985), DORLAND et al., (1977), MÄRZ et al., (1982).

glycosylation. Puis nous citerons les principales variations de la glycosylation des autres sérotransferrines.

1 - Structure des glycanes de la sérotransferrine humaine

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

La structure des glycanes de la sérotransferrine comme celles d'autres transferrines, a été essentiellement déterminée au Laboratoire. Les glycanes sont de type N-acétyllactosaminique et sont soit biantennés, soit triantennés.

a) **Structure du glycanne biantenné**

La séquence primaire a été entreprise par MONTREUIL et al., dès 1962. La structure du glycanne biantenné a été définitivement établie par SPIK et al., (1974a; 1974b; 1975) par des méthodes chimiques puis confirmée par l'analyse des spectres de résonance magnétique nucléaire à 360 MHz par DORLAND et al., en 1977 (Fig. 7A p. 45).

b) **Structure du glycanne triantenné**

Sur la base des résultats de méthylation, la présence de deux types de glycanes triantennés, différant par la nature du branchement de la troisième antenne sur un des résidus mannose, a été suggéré par

MONTREUIL et SPIK, (1974), et par KRUSIUS et FINE, (1981).

La structure complète des glycanes triantennés a été réalisée au Laboratoire par DEBRUYNE et al., (1984) par des méthodes chimiques et confirmée par analyse de résonance magnétique nucléaire à 500 MHz par SPIK et al., (1985) (Fig. 7B p. 45).

c) Structure du glycanne tétraantenné

La présence d'un glycanne de structure tétraantennée a été envisagée (MÄRZ et al., 1982; VAN EIJK et al., 1983; SPIK et al., 1985) (Fig. 7C p. 45).

2 - Les variants glycaniques de la sérotransferrine humaine

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

En 1975, MONTREUIL et SPIK concluent que le glycanne triantenné, quand il existe, est toujours lié au résidu d'asparagine du deuxième site de glycosylation (Asn 611). Cependant, HATTON et al., (1979) montrent que les glycanes triantennés peuvent être liés sur l'un ou l'autre des deux résidus d'asparagine. D'après BAYARD et KERCKAERT, (1980; 1981) et KERCKAERT et BAYARD, (1982), la sérotransferrine humaine ne pourrait porter que deux glycanes biantennés ou deux glycanes triantennés sur une même chaîne polypeptidique.

Néanmoins, WONG et al., (1978), SPIK, (1982) et DEBRUYNE et al. (1984) ont isolés trois variants de la sérotransferrine humaine (Fig. 8 p. 47), en fonction de leur affinité pour la Con A :

- Le variant I, non retenu par la Con A, représente 1,5 % de la sérotransferrine totale et renferme deux glycanes biantennés par molécule.

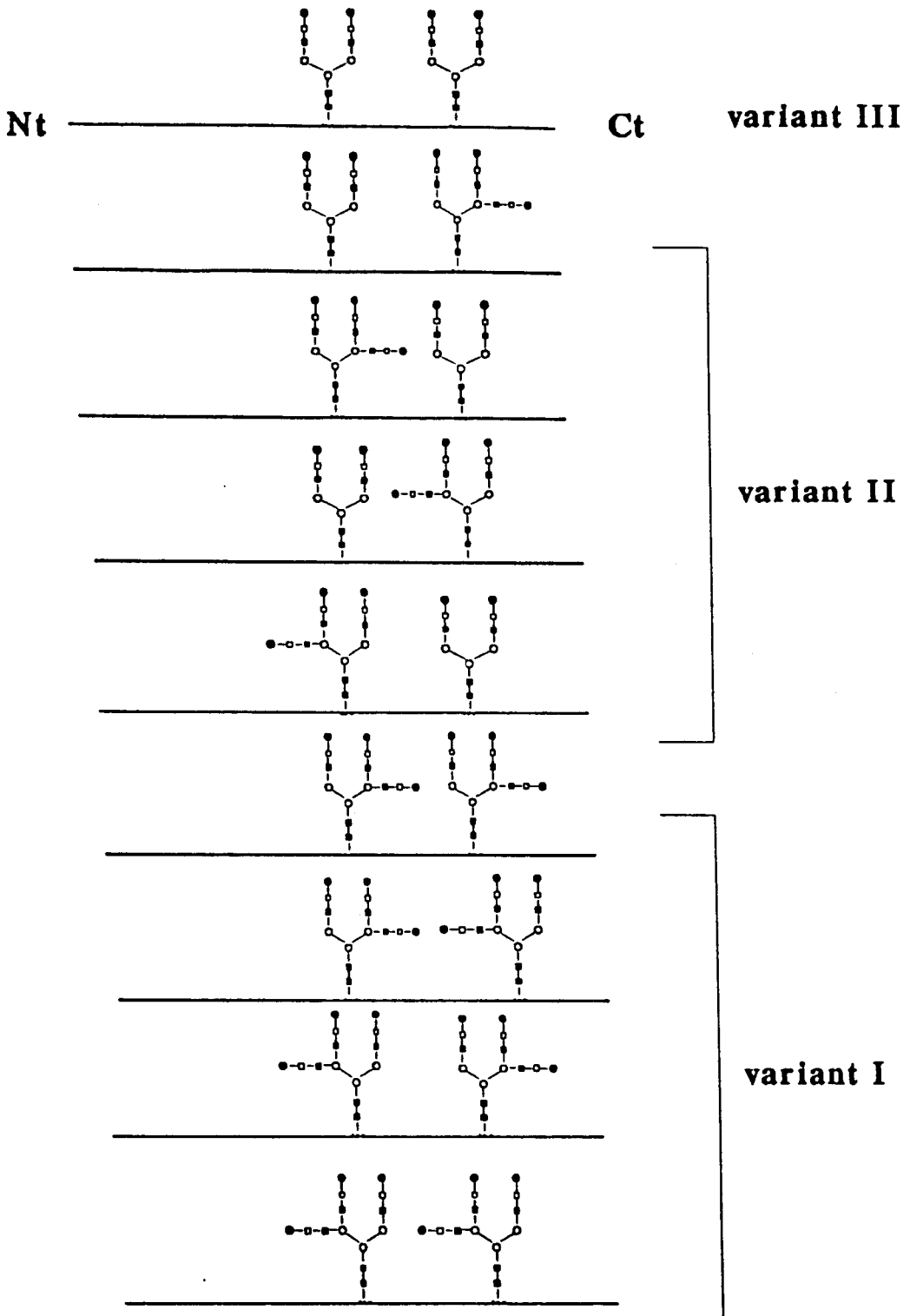
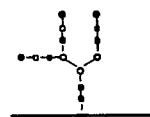
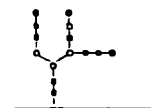


Figure : Représentation schématique des différents variants glycaniques de la sérotransferrine. Glycane triantenné ayant la branche supplémentaire en :

(β 1-6) sur le mannose (α 1-6):



(β 1-4) sur le mannose (α 1-3):



- Le variant II, retardé par la Con A, représente 23 % du total et renferme un glycanne biantenné et un glycanne triantenné par molécule.

- Le variant III, retenu par la Con A, représente 75,5 % du total et renferme deux glycannes biantennés par molécule.

Il semble donc bien qu'il existe trois variants glycaniques de la sérotransferrine humaine. La présence d'un glycanne tétraantenné, envisagée par différents auteurs, suggère l'existence d'un quatrième variant de la sérotransferrine humaine normale.

3 - Structure des glycanes de la sérotransferrine de Poule

Des études préliminaires sur la structure du glycanne montrent que la sérotransferrine de Poule ne possède qu'un seul glycanne par molécule (CODDEVILLE, 1986). Le glycanne est de type N-acétyllactosaminique et posséderait une hétérogénéité. En effet, la structure du glycanne serait biantennée pour 79 % de la molécule et triantennée pour 21 %. Le glycanne triantenné serait trisialylé tandis que pour le glycanne biantenné, plusieurs structures seraient possibles, asialo, mono ou bisialylées. Les structures asialo et monosialylées seraient partiellement fucosylées en (α 1-6) sur la GlcNAc du point d'attache.

4 - Structure des glycanes des autres sérotransferrines

Toutes les structures glycaniques des transferrines étudiées sont liées N-glycosidiquement à la protéine et sont toutes de type N-acétyllactosaminique. De plus, toutes les structures sont biantennées sauf chez l'Homme où des structures triantennées sont présentes en faible quantité et chez la Poule où il existerait des structures triantennées.

Les glycanes des sérotransferrines sont généralement non fucosylés.

Néanmoins des traces de résidus fucose ont été détectées chez l'Homme, 20 à 30 % de la sérotransferrine est fucosylée chez le Rat (REGOECZI et al., 1987; SPIK et al., 1991), 100 % chez le Porc (GRAHAM et WILLIAM, 1975) et chez la Souris pour la "serotransferrin-like" isolée du lait (LECLERCQ et al., 1987).

Le nombre, le type de liaison et la nature des résidus d'acide sialique diffèrent selon l'espèce. Chez le Rat, l'acide sialique peut-être lié en (α 2-6), mais également en (α 2-3) sur les résidus galactose terminaux et en (α 2-6) sur les résidus N-acétylglucosamine des antennes (REGOECZI et al., 1987; SPIK et al., 1991). Chez la Poule, le nombre de résidus acide sialique varie de 0 à 3 par glycanne (CODDEVILLE, 1986), alors que chez le Lapin la variation est plus restreinte : de 1 à 2 (LEGER et al., 1978). Chez le Cheval, en plus des résidus d'acide N-acétylneuraminique, il existe des résidus d'acide 4-O-acétyl-N-acétyl-neuraminique (CODDEVILLE, 1989).

De plus, la conformation des glycanes diffère selon la localisation de ceux-ci sur la protéine, celle-ci dépendant des interactions glycanes-protéines et glycanes-glycanes (MONTREUIL, 1984). La sérotransferrine de Lapin ne possède qu'un glycanne (LEGER et al., 1978) situé entre les deux lobes de la chaîne peptidique. Le glycanne est figé en une conformation en T qui contribue vraisemblablement à maintenir la protéine dans une conformation biologiquement active (MAZURIER et al., 1991). Par contre, pour la sérotransferrine humaine qui possède deux glycanes, deux séquences codes ont été observées sur le domaine C-terminal (Mac GILLIVRAY et al., 1983).

II - VARIATION DE LA GLYCOSYLATION SELON LE LIEU DE SYNTHÈSE

L'ovotransferrine et la sérotransferrine de Poule synthétisées respectivement dans l'oviducte et dans le foie ont la même séquence primaire (WILLIAMS, 1962; GAFNI et STEINBERG, 1974; THIBODEAU et al., 1978; WILLIAMS et al., 1982). Les gènes codant pour ces deux glycoprotéines sont les mêmes (LEE et al., 1980; JELTSCH et CHAMBON, 1982), mais régulés différemment (LEE et al., 1978). Par contre, la copule glucidique de ces molécules est différente, l'ovotransferrine et la sérotransferrine peuvent donc être considérées comme deux glycovariants.

L'ovotransferrine de Poule ne renferme qu'un seul glycanne (SPIK et al., 1979). Les premiers travaux sur les glycopeptides d'ovotransferrine ont été effectués par WILLIAMS en 1968 et GRAHAM et WILLIAMS en 1975. Mais la structure glycannique n'a été établie qu'en 1979 par SPIK et al. et confirmée en résonance magnétique nucléaire à 360 MHz par DORLAND et al. la même année. Le glycanne de l'ovotransferrine est de type N-acétyllactosaminique triantenné, dépourvu de résidus galactose et N-acétylneuraminique. De plus, il renferme un résidu N-acétylglucosamine intercalaire comme d'autres glycoprotéines synthétisées par l'oviducte (NARASIMHAM, 1982).

Des études préliminaires sur la structure glycannique de la sérotransferrine de Poule ont été réalisées par CODDEVILLE (1986). Le glycanne de la sérotransferrine est plus hétérogène, il n'y a pas de résidu N-acétylglucosamine intercalaire et la maturation du glycanne est plus complète (présence de résidus galactose et N-acétylneuraminique).

L'ovotransferrine et la sérotransferrine de Poule sont deux glycovariants synthétisés par des cellules différentes. La variation de la régulation des glycosyltransférases peut expliquer l'existence de ces

glycovariants. Néanmoins, il est probable qu'en plus de la régulation des glycosyltransférases, les cellules possèdent un équipement enzymatique spécifique.

III - VARIATION DE LA GLYCOSYLATION DUE AU POLYMORPHISME GENETIQUE DE LA PROTEINE

La présence de variants génétiques a été observée dans les sérotransferrines de nombreux animaux domestiques. Mais la connaissance de la séquence peptidique ou/et la connaissance de la structure des glycannes s'avèrent nécessaire pour affirmer l'origine protéique de l'hétérogénéité des variants.

Après désialylation des variants glycaniques des sérotransferrines de Boeuf et de Cheval, l'hétérogénéité observée en gel de polyacrylamide est conservée (MAEDA et al., 1980). Il est donc probable que, si l'acide sialique joue un rôle dans l'hétérogénéité des sérotransferrines de Boeuf et de Cheval, la chaîne polypeptidique intervient également.

Le glycanne de la sérotransferrine de Boeuf est de type biantenné avec un résidu d'acide sialique (CODDEVILLE, 1986). Si, selon MAEDA et al., (1980) l'hétérogénéité de la sérotransferrine de Boeuf est bien due à la chaîne polypeptidique, il n'y a apparemment pas de conséquences sur la glycosylation de celle-ci.

Dix variants génétiques de la sérotransferrine de Cheval ont été caractérisés (GLASNAK et JAROLIMOVA, 1980). Deux variants appelés D et R ont été isolés et étudiés par CHUNG et Mac KENZIE (1985). Ils ont démontré que la différence du nombre de résidus d'acide sialique (2 pour D et 4 pour R) ne suffisait pas à expliquer les différences importantes de la mobilité électrophorétique de ces variants.

De fait, l'étude des cartes peptidiques trypsiques et chymotrypsiques de ces deux composés montrent une différence d'un peptide dans chaque carte peptidique (CHUNG et Mac KENZIE, 1985).

L'hétérogénéité de deux autres variants, A et B a été étudiée par STRATIL et al., (1984). Ils ont montré une différence du nombre des glycanes, deux pour A et un seul pour B. Mais les auteurs démontrent également une hétérogénéité de la séquence peptidique, 29 acides aminés supplémentaires pour le variant A. Cependant, selon les auteurs, ces différences ne seraient pas suffisantes pour en déduire un rôle de la chaîne polypeptidique dans la glycosylation.

La structure des glycanes de la sérotransferrine de Cheval a été réalisée par CODDEVILLE, (1986); CODDEVILLE et al., (1989). Tous les glycanes présentent une structure biantennée disialylée, les différences se situant au niveau du nombre de glycanne et de la nature de l'acide sialique (N-acétylneuraminique et 4-O-acétyl-N-acétylneuraminique). Si l'hétérogénéité du support polypeptidique peut avoir une influence sur le nombre de glycanne, il semble peu probable que celle-ci puisse influencer la nature de l'acide sialique terminal.

IV - VARIATION DE LA GLYCOSYLATION LORS DE LA GROSSESSE

La répartition des trois variants glycaniques de la sérotransferrine a été étudiée dans le sérum de femmes enceintes par LEGER et al., (1989) (Tableau II, p. 53). Ces auteurs constatent une augmentation du taux des variants Tf-I et Tf-II en fin de grossesse.

Parallèlement, la fixation spécifique de chacun des variants de la sérotransferrine sur les membranes de syncytiotrophoblaste du placenta humain a été étudiée. Les valeurs de constante d'affinité apparente (k_a) sont décroissantes avec l'augmentation du nombre de glycanes de type triantenné sur la molécule de sérotransferrine.

TABLEAU II : Proportion relative des variants I, II, et III de la sérotransferrine dans certains cas pathologiques et pendant la grossesse, calculée d'après la surface des pics de précipitation obtenus par électrophorèse d'immunoaffinité.

Référence	Origine du sérum	Nombre d'échantillons	% de la sérotransferrine totale			Protéines totales(*)
			Variant I	Variant II	Variant III	
SPIK <u>et al.</u> (1983)	Normal	25	0	12 ± 3	88 ± 4	249 ± 82
	Cirrhose	12	4 ± 2	27 ± 7	69 ± 7	149 ± 82
	Hépatite virale	15	4 ± 3	24 ± 4	72 ± 7	241 ± 12
LEGER <u>et al.</u> (1989)	Grossesse					
	0 - 3 mois	7	1,7 ± 0,9	19,4 ± 2,8	79 ± 2,8	276 ± 4
	3 - 6 mois	12	3,4 ± 1,6	24,6 ± 2,1	72,4 ± 3,5	389 ± 6
	6 - 9 mois	15	6,1 ± 1,3	26,5 ± 2,3	67,6 ± 2,5	441 ± 6

* : en mg/100ml

Enfin, ces auteurs excluent la présence d'un récepteur de nature lectinique reconnaissant les résidus d'acide N-acétylneuraminique terminaux des glycanes de type triantenné. La signification biologique de l'augmentation des variants Tf-I et Tf-II reste donc inconnue.

V - VARIATION DE LA GLYCOSYLATION DANS CERTAINS CAS PATHOLOGIQUES

1 - Alcoolisme

Par affino-immunoelectrophorèse, SPIK et al., (1983) et DEBRUYNE et al., (1984) ont montré que les proportions relatives de chacun des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine sont modifiées dans certains cas pathologiques. Dans le sérum de sujets atteints de cirrhose alcoolique ou d'hépatite virale, le pourcentage des variants I (Tf-I: non retenus par la Con A) et des variants II (Tf-II: faiblement retenus par la Con A) par rapport à la sérotransferrine totale est augmenté alors que le pourcentage du variant III diminue (Tableau II p. 53). HEEGAARD et al., (1989) confirment l'augmentation des glycanes triantennés de la sérotransferrine de patients alcooliques. Ils adoptent un nouveau mode de calcul de la proportion des différents variants en associant à l'affino-immunoelectrophorèse un analyseur d'image.

De plus, selon STIBLER et BORG, (1981), le taux d'acides sialiques de la sérotransferrine de patients consommant de grande quantité d'éthanol (60 g/jour), est diminué de deux résidus d'acides sialiques par molécule de sérotransferrine. Cette anomalie est réversible après deux semaines d'abstinence. SPIK et al., (1982); REGOECZI et al., (1984) et DEKKER et al., (1985) suggèrent que l'incorporation du fer de la sérotransferrine partiellement sialylée est plus active au

niveau du foie du fait de la présence du récepteur de la sérotransferrine et du récepteur lectinique à galactose. L'augmentation du taux du variant I, qui a plus d'affinité pour le récepteur à galactose, pourrait donc expliquer la surcharge en fer hépatique observée chez les patients cirrhotiques.

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

Poussant plus loin leurs investigations, STIBLER et BORG, (1986a) montrent que la déficience en acide sialique de la sérotransferrine de patients alcooliques représente un phénomène plus complexe affectant les structures glycaniques de la sérotransferrine : la déficience en saccharides affecte également les résidus de galactose et ceux de N-acétylglucosamine qui constituent, avec l'acide sialique le trisaccharide terminal de la sérotransferrine.

Cependant, cette forme de transferrine déficiente en sucre (CDT : Carbohydrate Deficient Transferrin) existe dans le sérum d'individus ne consommant pas ou peu d'éthanol (moins de 40 g/jour, 150 individus testés). Pour les individus consommant plus de 60 g d'éthanol par jour, le taux de CDT est significativement augmenté (100 individus testés), (STIBLER et al., 1987).

Chez les patients ayant une consommation moyenne d'alcool, les maladies du foie ne sont pas associées à un taux de CDT élevé. Cette observation se vérifie quelque soit la sévérité de la maladie (STIBLER et al., 1987). Des études de BEHRENS et al. (1988b) donnent des résultats similaires à ceux de STIBLER, de plus ces auteurs utilisent le taux de CDT comme marqueur d'absorption chronique d'alcool. En comparant ce taux de CDT à d'autres marqueurs de consommation

d'alcool abusive, BEHRENS et al., (1988a); SCHELLENBERG et al., (1989), montrent la spécificité de la mesure du taux de CDT pour discriminer les alcooliques, des consommateurs modérés. La notion de marqueur est également attribuée à l'évaluation du variant de pI 5,7 dans le liquide cébrospinal. Ce glycovariant de la transferrine séparée par isofocalisation est celui qui possède le moins d'acide sialique. PETREN, (1987) montre que ce variant augmente dans le cas de disfonctionnement du foie.

2 - Transferrine du sérum de sujets atteints d'hépatocarcinome

YAMASHITA et al., (1989) étudient les glycanes de la sérotransferrine de sujets atteints d'hépatocarcinome. En regroupant les résultats des études d'affinité des glycanes vis à vis de différentes lectines, ils démontrent une altération de la glycosylation se traduisant par une augmentation de l'antennarisation, une fucosylation et un faible taux de N-acétylglucosamine intercalaire.

3 - Syndrôme de déficience en glycanes de glycoprotéines

En 1980, JAEKEN décrit un "nouveau" syndrôme : le "Carbohydrate-Deficient Glycoprotein" syndrome, (CDG syndrome). La maladie affecte principalement le système nerveux central et périphérique avec des retards psychomoteurs, et d'autres manifestations incluant un vieillissement prématuré des patients adultes (pour plus d'informations, voir JAEKEN et al., 1991).

La principale caractéristique biochimique de ce syndrôme est la présence de glycoprotéines sécrétées comportant une copule glucidique incomplète. La sérotransferrine présente une déficience très prononcée

aussi bien qualitativement que quantitativement. La moitié du taux de sérotransferrine a apparemment perdu 2 à 4 de ces trisaccharides terminaux, acide sialique, galactose et N-acétylglucosamine, alors que le noyau des glycanes apparaît intact. La sérotransferrine anormale est également présente dans le foie. Cette altération est une marque spécifique du syndrome qui peut être diagnostiqué qualitativement par électrophorèse en gradient de pH de la sérotransferrine, ou quantitativement par dosage du CDT (STIBLER et al., 1991).

VI - VARIATION DE LA GLYCOSYLATION DES GLYCOPROTEINES SYNTHETISEES PAR LES CELLULES EN CULTURE

1 - Transferrine sécrétée par des hépatocytes humains en co-culture

CAMPION, (1987) étudie la variation de la répartition des variants glycaniques des hépatocytes humains en co-culture avec des cellules épithéliales de foie humain, en fonction du temps de culture. L'auteur met en évidence des modifications du taux des variants Tf-I, Tf-II, et Tf-III, qui vont dans le sens d'une baisse de la réactivité pour la Con A. La présence des cellules épithéliales pouvant sécréter des facteurs susceptibles d'influencer la glycosylation de la transferrine par les hépatocytes, de même, la présence d'hydrocortisone dans le milieu de culture, ainsi que la mise en culture des hépatocytes peuvent expliquer la modification de la glycosylation.

2 - Transferrine sécrétée par des cellules cancéreuses en culture

a) Cellules d'hépatocarcinome

Les cellules HepG2 sont des cellules d'hépatocarcinome établies en lignées continues. Elles ont conservé en partie les propriétés biologiques et synthétiques des cellules parenchymateuses de foie normal, particulièrement la synthèse de la majorité des protéines plasmatiques (KNOWLES et al., 1980). La transferrine sécrétée dans le milieu de culture des cellules HepG2 a été isolée par CAMPION et al., (1989). Les auteurs ont fractionné à partir de la transferrine isolée cinq fractions par chromatographie d'échange d'ions, et démontré l'hétérogénéité glycanique de ces différentes fractions.

Les glycannes de la fraction majeure, représentant environ 48 % du total, ont pu être isolés et étudiés en RMN du proton. Cette fraction renferme des glycannes de type N-acétyllactosaminique qui peuvent être tri-, tétra-, ou pentaantennés. Ces glycannes possèdent deux résidus fucose liés en (α 1-3) sur les résidus de N-acétylglucosamine des antennes et sont partiellement sialylés indifféremment en (α 1-3) et/en (α 2-6) sur les résidus de galactose terminaux (Fig. 9 p. 59).

b) Cellules cancéreuses d'ovaire

Les cellules cancéreuses d'ovaire humain en culture (non productrices de transferrine) synthétisent, dans des conditions particulières (milieu minimum sans sérum en présence d'insuline), la transferrine. L'affinité des glycannes de cette transferrine a été étudiée avec la Con A et la LCA. Les auteurs observent une réactivité différente pour ces deux lectines par rapport à la transferrine du sérum humain. Cette différence se traduit par une augmentation du variant faiblement réactif à la Con A et du variant non retenu par

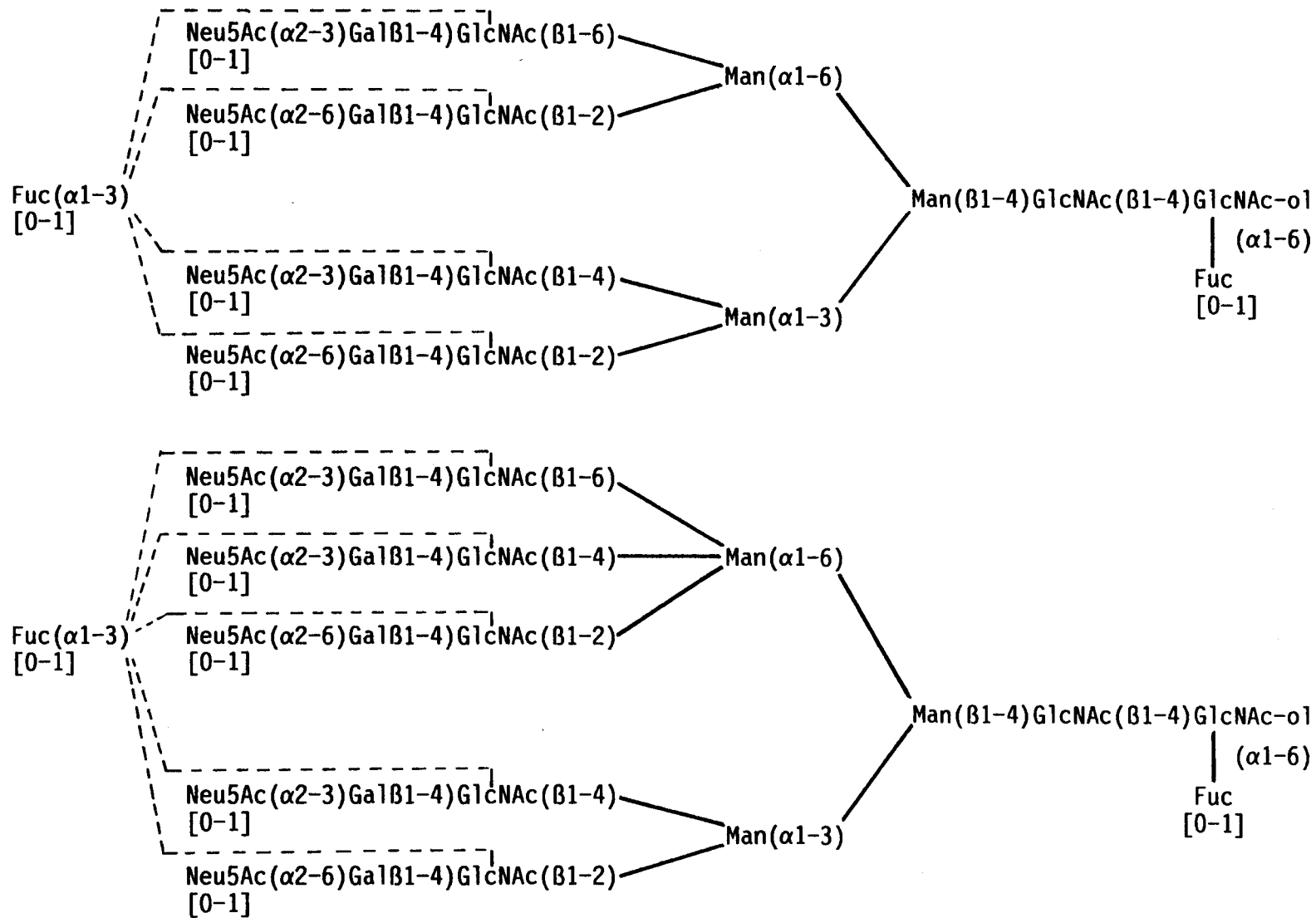


Figure 9 : Propositions de structures des glycanes tétraantennés et pentaantennés fucosylés de la fraction majeure de la transferrine isolée des milieux de culture des cellules HepG2 (CAMPION *et al.*, 1989).

la Con A. De plus, un variant fortement retenu par la LCA est mis en évidence traduisant une fucosylation en $\alpha(1-6)$ sur la GlcNAc du point d'attache (OHKAWA et al., 1990).

VII - CONCLUSION

Le nombre et la structure des glycanes des sérotransferrines diffèrent selon l'espèce et le type cellulaire responsable de la synthèse. Cette variation des structures glycaniques selon l'espèce, pourrait rendre possible le fait que les glycanes soient considérés comme des marqueurs de l'évolution (SPIK et al., 1988).

De nombreuses études ont montré des variations de la glycosylation de la sérotransferrine humaine lors de cas pathologiques et physiologiques qui se traduisent par une augmentation du taux des variants n'interagissant pas avec la Con A. De plus, un glycovariant déficient en sucre (CDT) a été mis en évidence dans les sérums de patients consommant de l'alcool et la mesure de ce taux a été utilisé comme marqueur d'absorption chronique d'alcool.

La glycosylation de la transferrine synthétisée et sécrétée par des cellules cancéreuses in vitro, et en culture (cellules HepG2) est modifiée de façon similaire dans les deux cas et se caractérise principalement par une polyantennarisation et une fucosylation.

CONCLUSION

La variation de la glycosylation des glycoprotéines dépend du support polypeptidique et de l'expression de la capacité de glycosylation de la cellule ayant synthétisée le polypeptide.

La capacité de glycosylation peut varier selon l'espèce et dans l'espèce (polymorphisme génétique). Dans un organisme particulier, elle varie en fonction du type de cellule et en fonction du développement. De plus, dans certains cas pathologiques et physiologiques, des facteurs particuliers peuvent être responsables d'une variation de la glycosylation par modification de l'expression génique tant au niveau du support polypeptidique de l'oligosaccharide qu'au niveau de l'expression du complexe enzymatique impliqué dans le processus de la glycosylation. L'altération des structures glycaniques des glycoprotéines synthétisées par les cellules cancéreuses serait due à l'absence partielle de régulation liée à la transformation se traduisant par l'expression anormale ou par la surexpression de certains gènes.

Les variations de la glycosylation des glycoprotéines en fonction de l'espèce ont été moins étudiées, mais les études sur les transferrines permettraient de considérer les glycannes comme marqueurs de l'évolution.

Le système in vitro a permis de mettre en évidence l'impact des médiateurs comme les hormones et les cytokines sur la glycosylation des protéines, notamment dans le processus de l'inflammation. Il est probable qu'in vivo l'inflammation soit régulée par un ensemble de facteurs interagissant. La régulation de la glycosylation des PPA est vraisemblablement la résultante de l'action combinée des cytokines et des glucocorticoïdes. La culture cellulaire a également permis de démontrer

l'importance de l'environnement de la cellule sur la biosynthèse des glycanes. Cette réceptivité n'est d'ailleurs pas étonnante quand on connaît la multitude de réactions enzymatiques nécessaire à la formation d'un glycanne.

Les études utilisant des systèmes cellulaires en culture ont permis de démontrer l'action de nombreux facteurs sur la modification de la glycosylation des glycoprotéines. Néanmoins, nous avons vu précédemment l'importance de la mise en culture et de la composition du milieu de culture. Les observations au Laboratoire sur la modification de la glycosylation de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2 ont été faite avec un milieu de culture supplémenté en sérum de veau foetal. De ce fait, il nous a paru important de vérifier l'action du sérum de veau foetal sur les modifications des structures glycaniques observées. Différentes études ont démontré l'influence des cytokines et des glucocorticoïdes sur la variation de la glycosylation des PPA sécrétées par les cellules HepG2 en culture. Nous avons, en utilisant les cellules HepG2 appréhendé l'influence de ces facteurs sur la glycosylation de la transferrine qui n'est pas une PPA, certains auteurs d'ailleurs, du fait de la diminution de la synthèse de la transferrine lors de l'inflammation la considère comme une PPA négative.

D'autre part, pour évaluer l'impact de différents facteurs sur la glycosylation des sérotransferrines, nous avons recherché un autre modèle cellulaire capable de synthétiser et de sécréter la transferrine dans un milieu minimum et défini. Un tel milieu de culture permettrait d'éviter toute interaction des facteurs ajoutés dans le milieu avec des éléments inconnus. Pour cela, nous avons choisi les hépatocytes embryonnaires de Poulet à 16 jours d'incubation qui se maintiennent en culture primaire dans un milieu minimum et sans sérum.

TRAVAUX

PERSONNELS

ETUDE DE FACTEURS MODIFIANT LA GLYCOSYLATION DE LA TRANSFERRINE HUMAINE SYNTHETISEE ET SECRETEE PAR LES CELLULES HEPG2

CAMPION et al. (1989), ont démontré la profonde modification de la structure des glycanes de la transferrine synthétisée et sécrétée par une lignée d'hépatocarcinome humain, les cellules HepG2 mises en culture. Une question restait posée, celle de l'impact de la mise en culture des cellules sur une telle modification des glycanes. Fallait-il seulement attribuer à la transformation de la cellule l'altération de la glycosylation de la transferrine ? De plus, le sérum de veau foetal ajouté dans le milieu de culture des cellules HepG2 est une source d'hormones spécifiques et de facteurs de croissance (SATO, 1975) susceptibles de modifier la glycosylation de la transferrine. Dans ce chapitre, nous étudierons l'importance de l'environnement cellulaire que constitue le milieu de culture sur la glycosylation de la transferrine.

Nous avons vu dans les Généralités (p. 26) que les cytokines et les glucocorticoïdes "miment" en partie le processus de l'inflammation au niveau de l'hépatocyte, notamment l'augmentation de la synthèse et la modification de la glycosylation des protéines de la phase aiguë de l'inflammation (MACKIEWICZ et al., 1987a, 1989c, 1989d; POS et al., 1988, 1989). Nous étudierons l'action de ces facteurs sur la glycosylation de la transferrine.

Mais, avant de présenter nos résultats, nous allons décrire la technique que nous utiliserons pour séparer les glycovariants de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2, que nous avons testée sur la sérotransferrine humaine.

A - L'IMMUNOTRANSFERT : UNE METHODE POUR LA DETECTION DE VARIANTS GLYCANNIQUES SEPARES PAR AFFINOELECTROPHORESE

L'affino-immunoélectrophorèse bidimensionnelle (AIE) a été largement utilisée dans l'étude de la microhétérogénéité glycanique de nombreuses glycoprotéines, notamment des protéines de la phase aiguë de l'inflammation et de la sérotransferrine. Cette méthode permet de séparer les trois glycovariants de la sérotransferrine humaine (voir le chapitre Généralités p. 47) et de quantifier leur proportion. Cependant, l'AIE présente le désavantage d'être limitée par le seuil de sensibilité de la réaction d'immunoprécipitation. L'application de cette méthode à des échantillons renfermant de très faible concentration d'antigène implique une concentration des solutions, étape qui peut entraîner une perte et une dénaturation de l'échantillon. Cette étape, augmente en outre considérablement la viscosité des échantillons, ce qui perturbe l'électrophorèse.

Nous avons donc adopté une technique plus sensible pour visualiser la séparation des variants glycaniques par affinoélectrophorèse (AE) : l'immunotransfert (IT) décrit par TAKETA et al., (1985). Lors de l'affinoélectrophorèse, nous utiliserons pour la séparation des glycovariants, la lectine concanavaline A (Con A). Cette lectine possède une forte affinité pour le noyau trimannosidique des glycannes de type N-acétyllactosaminique biantenné, substitué en β ,1-2 par deux résidus de N-acétylglucosamine (DEBRAY et al., 1981; BREWER et al., 1985; CARVER et al., 1985). Toutes substitutions de ce noyau trimannosidique par une troisième antenne (KRUSIUS et al., 1976; BAENZIGER et FIETE, 1979) ou un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire (BISWAS et al., 1986) inhibe l'affinité de la Con A.

Par contre, la fucosylation de la N-acétylglucosamine du point d'attache d'un glycopeptide de type N-acétyllactosaminique biantenné ne modifie pas l'affinité de la Con A (DEBRAY et al., 1981). La Con A permet donc de séparer les glycoprotéines portant des glycanes biantennés (retenus), de celles portant des polyantennés (non retenus). Pour des molécules possédant plusieurs glycanes, on aura selon le pourcentage de biantennés une affinité variable de la molécule pour la Con A qui se traduira par un retard dans la migration électrophorétique par rapport aux molécules non retenues.

La mesure de la proportion des glycovariants de la transferrine sécrétée par les cellules HepG2 permettra de mettre en évidence une modification de la glycosylation et de donner des renseignements sur la nature de cette modification.

I - DESCRIPTION DE L'IMMUNOTRANSFERT

Les glycovariants séparés par affinoélectrophorèse en gel d'agarose en présence de Con A sont transférés par capillarité sur une membrane de nitrocellulose tapissée par des anticorps spécifiques (pour les détails techniques voir l'Appendice technique p. 222). Ce système permet d'optimiser le transfert de molécules spécifiques présentes dans un mélange, et d'éviter les interférences dues à la Con A et aux autres protéines du mélange lors du transfert. Le transfert sur nitrocellulose permet une révélation immunoenzymatique très sensible (Fig. 10A p. 66).

Après le développement de l'activité enzymatique (peroxydase couplée aux anticorps), l'intensité de la coloration des bandes est évaluée par un densitomètre sous forme de pics (Fig. 10B p. 66)

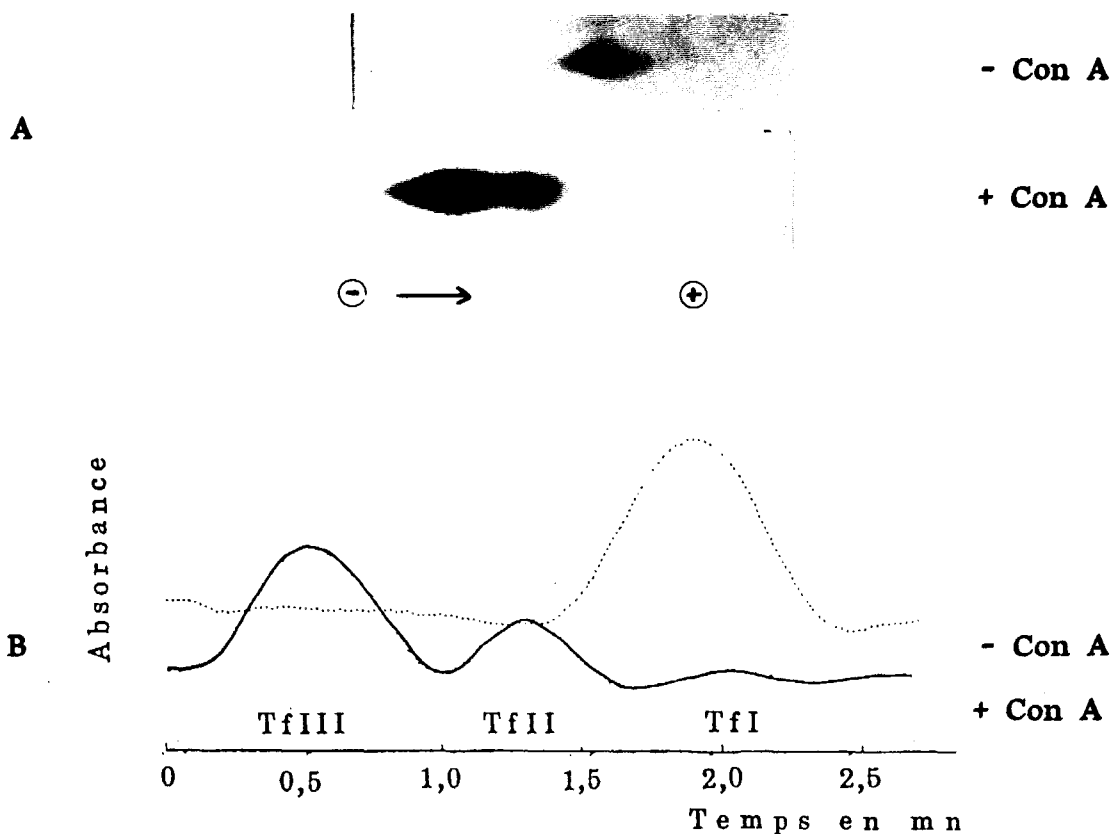


Figure 10 : A : Révélation immunoenzymatique de la sérotransferrine après immunotransfert sur membrane de nitrocellulose et affinoélectrophorèse avec Con A et sans Con A.

B : Analyse densitométrique de l'immunotransfert après révélation immunoenzymatique.

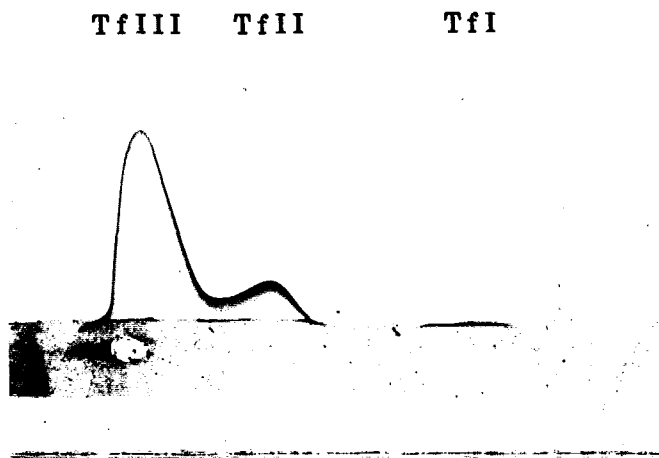


Figure 11 : Affino-immunoélectrophorèse bidimensionnelle en présence de Con A, de la sérotransferrine humaine après coloration à l'Amidoschwarz des pics de précipitation.

dont la surface peut-être calculée par intégration à l'aide d'un programme informatique.

II - APPLICATION DE L'IMMUNOTRANSFERT A LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE

La fiabilité de l'immunotransfert est évaluée après affino-électrophorèse de la sérotransferrine humaine.

Le sérum humain est dilué afin de déposer environ 20 ng de sérotransferrine dans le gel d'agarose, l'affinoélectrophorèse a lieu en présence de Con A. L'immunotransfert est effectué sur une membrane de nitrocellulose tapissée par des anticorps anti-transferrine humaine. Après révélation immunoenzymatique des glycovariants de la sérotransferrine, leur proportion est évaluée au densitomètre. Les résultats obtenus pour la sérotransferrine d'un sérum humain normal sont : glycovariant non retenu par la Con A : Tf-I: $5,0 \pm 1,6$; glycovariant retardé par la Con A : Tf-II: $21,4 \pm 3,3$; glycovariant retenu par la Con A : Tf-III: $73,6 \pm 3,4$ (Tableau III, p. 68). Les résultats obtenus avec un échantillon de sérotransferrine humaine pure (Behring) sont les suivants : Tf-I : $4,9 \pm 3,7$; Tf-II : $18,4 \pm 4,6$; Tf-III : $76,7 \pm 4,0$ (Tableau III p. 68).

III - DISCUSSION

Les proportions des glycovariants Tf-I, Tf-II, Tf-III de la sérotransferrine du sérum humain et de la sérotransferrine humaine purifiée, évaluée par AE en présence de Con A suivie d'un IT sont tout à fait comparables.

TABLEAU III : Proportions relatives des variants glycaniques de la sérotransferrine humaine selon les deux techniques.

Technique	Référence	% de la sérotransferrine totale			Rapport III/II
		Variant I	Variant II	Variant III	
AIE (a)	DEBRUYNE <u>et al.</u> , 1984	traces	18,6 ± 2,2	81,3 ± 2,2	4,4 ± 0,4
AIE (a)	LEGER <u>et al.</u> , 1989	0,4 ± 0,9	19,2 ± 3,1	80,4 ± 2,5	4,2 ± 0,7
AE et IT (a)		5,0 ± 1,6	21,4 ± 3,3	73,6 ± 3,4	4,1 ± 0,7
AE et IT (b)		4,9 ± 3,7	18,4 ± 4,6	76,7 ± 4,0	3,4 ± 0,5

a : Dosages effectués sur le sérum

b : Dosages effectués sur la transferrine isolée (Behring)

AIE : Affino-immunoélectrophorèse.

AE et IT : Affinoélectrophorèse et immunotransfert.

Dans les deux techniques l'affinoélectrophorèse est faite en présence de Con A.

Le Tableau III page 68 montre les résultats obtenus par l'affino-immunoelectrophorèse (AIE) et par l'affinoelectrophorèse (AE) suivie de l'immunotransfert (IT). Les rapports entre les glycovariants Tf-III et Tf-II sont comparables, mais la différence majeure se situe au niveau de l'évaluation du glycovariant Tf-I. En fait, dans la deuxième dimension de l'AIE, le variant I étant en très faible concentration, il ne peut donner un pic de précipitation mais seulement une ligne de précipitation très difficilement évaluable (Fig.11 p. 66). Il y a dans cette deuxième dimension un compromis à respecter entre les concentrations respectives en anticorps et en antigène responsables des pics de précipitation. De ce fait, si les pics des variants II et III sont parfaitement formés, la quantité d'anticorps dans le gel d'agarose est beaucoup trop forte pour permettre au variant I de "décoller" dans le gel de seconde dimension.

VI - CONCLUSION

Le gain de sensibilité apporté par l'immunotransfert associé à une révélation immunoenzymatique permet d'utiliser des échantillons en très faible concentration. Ainsi la migration électrophorétique est améliorée en évitant une concentration excessive en protéines (ce qui augmente la viscosité des solutions) et en sels (qui implique un dessalage). L'absence ou la réduction de toutes les manipulations antérieures à l'affinoelectrophorèse permet de minimiser les risques de perte ou de modification de la molécule étudiée.

L'AE suivi de l'IT tout en étant une méthode plus sensible, amène une amélioration dans la précision de la quantification des variants de faible concentration. La limite de cette méthode est liée à

la révélation de l'activité enzymatique et à la limite de sensibilité du densitomètre. Nous avons pu détecter avec cette méthode environ 5 % du glycovariant Tf-I, soit pour un dépôt de 20 ng, environ 1 ng de ce variant, cette quantité peut être considérée comme la limite de détection. Il est tout à fait possible d'augmenter la sensibilité de cette méthode en augmentant le nombre de molécules de peroxydase conjuguées aux anticorps servant à la révélation immunoenzymatique, ou de changer le système de révélation en le remplaçant par le système biotine-avidine.

B - MODIFICATION DE GLYCOSYLATION DE LA TRANSFERRINE SELON LES CONDITIONS DE CULTURE

Les cellules HepG2 sont cultivées en lignées continues dans le milieu de Eagle modifié par Dulbecco (Dulbecco modified Eagle's medium: DMEM) contenant 10 % de sérum de veau foetal.

Pour estimer l'impact du sérum de veau foetal sur la glycosylation de la transferrine, nous avons cultivé les cellules HepG2 avec et sans sérum.

I - EFFETS DU SERUM DE VEAU FOETAL

1 - Matériels et méthodes

Les cellules HepG2 sont cultivées à la concentration initiale de $0,5 \cdot 10^6$ cellules dans une boîte de culture de 25 cm^2 selon le protocole décrit p. 205. Les cellules utilisées dans cette expérience sont au 10^{ème} passage. La confluence des cellules est obtenue au bout de 4 à 5 jours de culture. Le milieu est alors renouvelé toutes les 24 h pendant

4 jours par du milieu frais contenant ou non 10 % de sérum de veau foetal (Gibco). Le taux de transferrine dans le milieu de culture est alors estimé par dosage radio-immunologique (RIA) utilisant la sérotransferrine humaine marquée à l'iode 125 comme antigène compétitif (pour plus de précision, se référer à l'Appendice technique p. 220).

Pour étudier la fraction glycanique de la transferrine sécrétée dans le milieu de culture, nous avons effectué une affinoélectrophorèse (AE) du milieu de culture, en présence de Con A suivie d'un immunotransfert (IT) (Appendice technique p. 223).

2 - Résultats

a) **Dosage de la transferrine**

Le taux de synthèse de la transferrine a été calculé en pourcentage, en prenant comme pourcentage de référence le taux de transferrine sécrétée dans le DMEM additionné de 10 % de sérum de veau foetal après 24 h de culture soit : $4,4 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}/10^6$ cellules. Les résultats obtenus, rassemblés dans la Fig. 12 p. 72, montrent que la synthèse de la transferrine sécrétée dans le DMEM additionné de 10 % de sérum de veau foetal présente après 72 h de culture une valeur maximale de $7,5 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}/10^6$ cellules et de $6,4 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}/10^6$ cellules dans le DMEM sans sérum de veau foetal. Néanmoins, nous pouvons constater qu'en absence de sérum, la synthèse est globalement moins importante ($2,8 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}/10^6$ cellules à 24 h), et qu'elle augmente seulement 48 h après la mise en culture.

Synthèse

en %

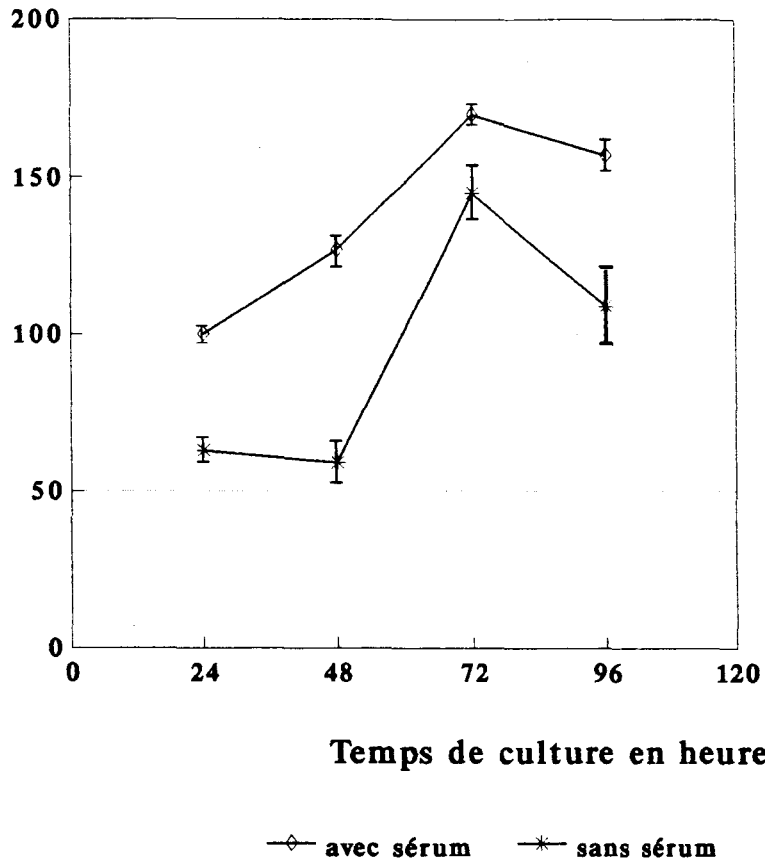


Figure 12 : Synthèse de la transferrine (RIA) par les cellules HepG2 incubées dans le DMEM avec ou sans sérum de veau foetal (10%), en fonction du temps de culture.

La synthèse est exprimée en % par rapport à la synthèse dans le DMEM 24 h avec sérum de veau foetal. Les résultats représentent la moyenne d'un dosage, dans une boîte de culture, fait en triple exemplaires.

b) Séparation des glycovariants de la transferrine

L'analyse densitométrique de l'immunotransfert (Fig. 14 p. 74), après révélation immunoenzymatique (Fig. 13 p. 74) de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2 dans le DMEM avec ou sans 10 % de sérum de veau foetal nous a permis de calculer la proportion des différents glycovariants (Tableau IV, p. 75). A la confluence des cellules, $26,9 \% \pm 2,7$ des variants de la transferrine interagissent avec la Con A. Le profil électrophorétique est très large, et présente une nette migration vers l'anode (Fig. 14 p. 74) pour la fraction majeure non retenue par la Con A. Du fait de la mauvaise individualisation des variants, nous les avons classés en deux catégories, les variants interagissant (retenus et retardés), et les variants n'interagissant pas avec la Con A (non retenus).

Après la confluence des cellules, en présence ou en absence de sérum de veau foetal, les cellules HepG2 synthétisent et sécrètent une transferrine dont l'affinité pour la Con A reste constante de 24 à 96 h de culture. Les faibles différences observées ne sont pas significatives.

En conclusion, nous pouvons donc dire que dans les conditions utilisées, la glycosylation de la transferrine sécrétée par les cellules HepG2 ne semble pas modifiée.

3 - Discussion

Les résultats obtenus avec la transferrine synthétisée par les cellules HepG2 au 10^{ème} passage jusqu'à leur confluence sont en contradiction avec ceux de CAMPION et al., (1989) qui ne trouvent pas de variants interagissant avec la Con A, dans les mêmes conditions de culture avec le même milieu: DMEM plus 10 % de sérum de veau foetal.

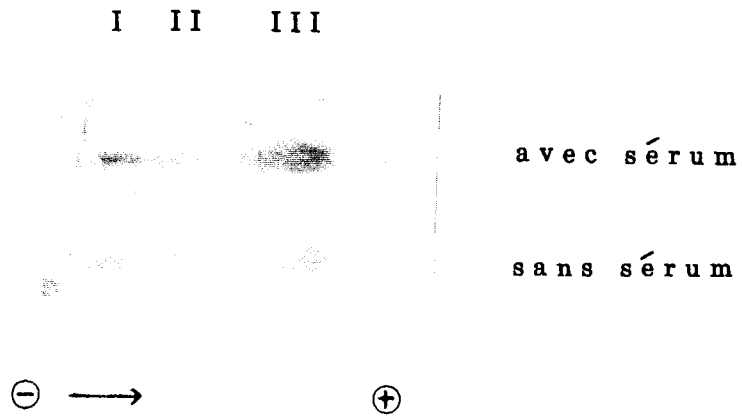


Figure 13 : Révélation immunoenzymatique, après AE en présence de Con A suivie d'un IT, de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2, après 48 h d'incubation dans le DMEM avec ou sans sérum de veau foetal (10 %), (I: variants retenus, II: variants retardés, III: variants non retenus).

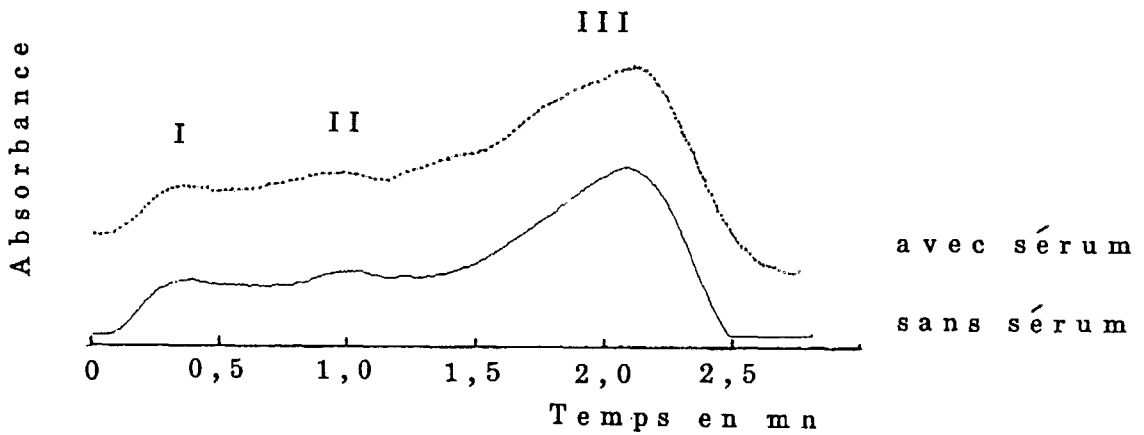


Figure 14 : Analyse densitométrique, après révélation immunoenzymatique, des glycovariants de la transferrine synthétisés par les cellules HepG2 dans le DMEM avec ou sans sérum de veau foetal (10 %) à 48 heures d'incubation, (signification de I, II, III: voir Fig. 13).

TABLEAU IV : Proportion relative des glycovariants de la transferrine sécrétée par les cellules HepG2 dans le DMEM avec ou sans sérum de veau foetal en fonction du temps.

Incubation en heures	Variants interagissant avec la Con A		Variants non retenus par la Con A	
	+ sérum	- sérum	+ sérum	- sérum
Confluence	26,9 ± 2,7	nd	73,1 ± 2,7	nd
24	26,6 ± 2,6	30,2 ± 3,6	73,4 ± 2,6	69,8 ± 3,6
48	28,7 ± 1,9	29,4 ± 5,0	71,3 ± 1,9	70,6 ± 5,0
72	31,0 ± 3,6	32,2 ± 0,5	69,0 ± 3,6	67,7 ± 0,5
96	31,8 ± 0,9	34*	68,2 ± 0,9	66*

Les cellules sontensemencées dans le DMEM plus 10 % de sérum de veau foetal. Après 4 à 5 jours les cellules atteignent la confluence, le milieu est alors changé et remplacé par du DMEM avec ou sans sérum.

La proportion des glycovariants est exprimée en % et constitue la moyenne des résultats d'un dosage, en triple exemplaires, dans une boîte de culture, sauf pour * obtenus avec un seul échantillon de milieu.

CAMPION et al., (1989) ont utilisé l'AIE en présence de Con A dans la première dimension, alors que nous avons utilisé l'AE en présence de Con A suivie de l'IT pour évaluer la proportion des glycovariants de la transferrine sécrétée par les cellules HepG2. Mais 26,9 % \pm 2,7 de glycovariants interagissant avec la Con A auraient du être parfaitement visibles par l'AIE. De plus, une AIE réalisée antérieurement à notre expérience (05.90, Tableau VII p. 91) a révélé 31 % de variants glycaniques interagissant avec la Con A. On peut donc conclure que la glycosylation de la transferrine sécrétée par les cellules HepG2 s'est modifiée au cours du temps comme nous le préciserons à la page 91.

Nous n'avons pas mis en évidence, après 96 h de culture, de modification de la glycosylation de la transferrine due à l'absence de sérum de veau foetal dans le milieu de culture. MEGAW et JOHNSON, (1979) ont démontré après 15 jours de culture une baisse importante de la glycosylation d'une protéine soluble dans le milieu de culture de cellules cancéreuses murines lorsque le pourcentage en sérum de veau foetal dans le milieu variait de 1 à 10. Il semble donc, que l'influence du sérum soit effective après un temps de culture assez long.

II - INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE

Le choix du milieu de culture dépend du type cellulaire. La composition du milieu est déterminante pour la survie, la division cellulaire et la synthèse protéique.

Nous avons estimé l'impact sur la glycosylation de la transferrine de deux milieux de culture minimum utilisés pour les cellules HepG2 : le DMEM et le RPMI 1640 (dont la composition se trouve à la fin de l'Appendice technique).

1 - Matériels et méthodes

Les cellules HepG2 au 12^{ème} passage sontensemencées dans le DMEM additionné de 10 % de sérum de veau foetal. Après confluence, les cellules sont lavées et mises à incuber dans le DMEM et dans le RPMI 1640, avec et sans sérum de veau foetal (10 %) pendant 48 heures.

Un dosage du taux de transferrine dans le milieu de culture est alors effectué par la méthode du RIA. La proportion des glycovariants de la transferrine du milieu est appréciée après une AE du milieu de culture, en présence de Con A suivie d'un IT.

2 - Résultats

a) **Dosage de la transferrine**

En présence de 10 % de sérum de veau foetal la synthèse de la transferrine par les cellules HepG2 incubées dans le RPMI 1640 est de : $2,05 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}/10^6$ cellules et dans le DMEM de : $1,85 \pm 0,10 \mu\text{g/ml}/10^6$ cellules par 24 heures. Nous pouvons constater que ces 2 valeurs sont semblables. En absence de sérum de veau foetal, la synthèse de la transferrine par les cellules HepG2 diminue dans des proportions semblables pour les deux milieux, RPMI 1640 : $1,20 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}/10^6$ cellules, DMEM: $1,05 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}/10^6$ cellules par 24 heures.

b) **Séparation des glycovariants de la transferrine**

Le tableau V page 78 montre la proportion des glycovariants de la transferrine séparés par la Con A. Le taux des glycovariants interagissant avec la Con A est environ deux fois plus important pour

TABLEAU V : Proportions des variants glycaniques de la transferrine sécrétés par les cellules HepG2 dans le DMEM et dans le RPMI 1640 avec ou sans sérum de veau foetal (10 %) à 48 heures d'incubation.

Milieu de culture	Variants interagissant avec la Con A	Variants non retenus par la Con A
DMEM +S	29,6 ± 2,0	70,4 ± 2,0
DMEM -S	30,5 ± 2,1	69,5 ± 2,1
RPMI +S	13,8 ± 0,8	86,2 ± 0,8
RPMI -S	12,7 ± 1,6	87,3 ± 1,6

Après confluence des cellules, le milieu est remplacé par le DMEM et le RPMI 1640 avec ou sans sérum de veau foetal. La proportion des glycovariants est exprimée en % du total et représente la moyenne des résultats d'un dosage, d'une boîte de culture, fait en triple exemplaires.

la transferrine sécrétée par les cellules incubées dans le DMEM que pour celles incubées dans le RPMI 1640. Ce résultat suggère qu'il y a moins de glycanes de type biantenné dans la transferrine sécrétée dans le RPMI 1640 et que le phénomène de multiantennarisation est plus important pour la transferrine sécrétée par les cellules incubées dans le DMEM. Aucune modification n'est observée entre les milieux avec et sans sérum. Cette expérience confirme les résultats obtenus lors de l'étude précédente sur l'influence du sérum de veau foetal.

3 - Discussion

Le dosage de la transferrine dans les milieux avec et sans 10 % de sérum de veau foetal montre l'importance de l'addition du sérum dans le milieu de culture des cellules HepG2 pour la synthèse de la transferrine.

Nous avons démontré une différence entre la glycosylation de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2 incubées dans le RPMI 1640 et la transferrine synthétisée par les cellules HepG2 incubées dans le DMEM. Cette différence de glycosylation ne semble pas en relation avec une baisse de synthèse d'un des glycovariants. Cette différence de glycosylation de la transferrine synthétisée par des cellules placées dans deux milieux en présence de 10 % de sérum de veau foetal est surprenante. En effet, on pouvait s'attendre à un "gommage" des différences de la composition des milieux par la présence de 10 % de sérum de veau foetal.

Nous avons comparé la composition des milieux de culture (voir à la fin de l'Appendice technique) pour tenter d'expliquer l'origine de la modification de la glycosylation. Nous pouvons noter en particulier que certains acides aminés sont absents du DMEM et qu'il n'y a pas de fer

ni de pyruvate de sodium dans le RPMI 1640. Les autres composants sont communs aux deux milieux, mais à des concentrations différentes, notamment le glucose est 2,25 fois plus concentré dans le DMEM que dans le RPMI 1640.

Deux composants ont retenu plus particulièrement notre attention : le fer et le glucose.

En effet, une modification de la concentration en fer peut modifier la synthèse de la transferrine (DESVERGNE et al., 1987), ainsi que celle du récepteur de la transferrine (LOUACHE et al., 1984; WARD et al., 1984; RUDOLPH et al., 1985).

D'autre part, le glucose est une source d'énergie pour la cellule. L'absence de glucose dans le milieu de culture entraîne une diminution de la masse des glycoprotéines sécrétées et la formation d'oligosaccharides tronqués liés au dolichol (TURCO, 1980; GERSHAM et ROBBINS, 1981). La réduction de la masse serait due non seulement au transfert d'oligosaccharides tronqués, mais aussi à la baisse de glycosylation des protéines (BAUMANN et JAHREIS, 1983). Quand la quantité de glucose est limitée, la cellule restreint la glycosylation des protéines en devenant incapable de glycosyler les dérivés lipidiques mannosylés (TURCO, 1980). La réduction du taux de glucose entraîne une perte d'énergie et une réduction du taux de substrats qui peuvent influencer la synthèse des oligosaccharides (DATEMA et SCHWARZ, 1981).

Cependant, certains auteurs ont démontré que l'apport de pyruvate, de fructose ou de glutamine ne supprimait pas la modification de la glycosylation (STARK et HEATH, 1979; TURCO, 1980). De plus, il a été établi que le glucose joue un rôle dans la différenciation des cellules. En effet, dans un milieu de culture dépourvu de glucose les cellules de carcinome du colon (cellules

HT29) se différencient en entérocytes (PINTO et al., 1982; ZWEIBAUM et al., 1985).

Une absence de glycosylation d'une partie de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2 pourrait expliquer l'augmentation du taux de variants non retenus par la Con A.

III - VARIATION DE LA CONCENTRATION EN FER ET EN GLUCOSE DU RPMI 1640

Nous avons observé précédemment que les cellules HepG2 synthétisaient une transferrine dont la glycosylation était différente selon le milieu d'incubation DMEM ou RPMI 1640. La concentration en fer et en glucose étant une des différences importantes entre ces deux milieux (composition p. 227), nous avons donc supplémenté le RPMI 1640 en fer et/ou en glucose afin d'obtenir les mêmes concentrations que dans le DMEM.

1 - Matériels et méthodes

Pour appréhender l'influence de la variation de la concentration du fer et du glucose, nous avons effectué les cultures cellulaires en boîte de culture de 24 puits de 2 cm² (Appendice technique p. 205).

Les cellules HepG2 au 10^{ème} passage sontensemencées dans le DMEM plus 10 % de sérum de veau foetal. A confluence, les cellules sont lavées deux fois avec le DMEM ou le RPMI 1640 selon le milieu dans lequel elles seront incubées. On ajoute dans le RPMI 1640, le D-glucose à la concentration de 13,9 mM, ou le Fe(NO₃)₃·9H₂O à raison de 0,1 ng/ml, ou les deux en même temps aux concentrations déjà citées.

Après 48 h d'incubation, le dosage de la transferrine du milieu de culture est effectué par RIA. La proportion des glycovariants est

évaluée par AE des différents milieux, en présence de Con A suivies d'IT.

2 - Résultats

a) **Dosage de la transferrine**

Le taux de transferrine des différents milieux de culture est calculé en pourcentage par rapport au taux de transferrine dans le RPMI 1640 (milieu témoin): $1,5 \mu\text{g/ml}/10^6$ cellules (Fig. 15 p. 83). La synthèse de la transferrine semble moins importante dans le DMEM (83 %) que dans le RPMI 1640 (100 %). Dans les deux milieux, la synthèse est diminuée par rapport à l'expérience précédente (p. 78) qui avait été réalisée dans des boîtes de 25 cm^2 . Pour les différents milieux RPMI 1640 supplémentés en fer, ou en glucose, ou en fer et en glucose, la synthèse de transferrine respectivement de 83 %, 79 %, et 85 % a été trouvée comparable à celle obtenue en présence de DMEM.

Précédemment, nous avons trouvé une différence de synthèse de la transferrine entre les cellules HepG2 incubées dans le DMEM et dans le RPMI 1640 équivalente (respectivement, 87,5 % et 100 %), bien que cette différence soit peu significative.

b) **Séparation des glycovariants de la transferrine**

L'analyse densitométrique après révélation immunoenzymatique des glycovariants de la transferrine synthétisés par les cellules HepG2 incubées dans le RPMI 1640 supplémenté en glucose (Fig. 16 p. 84) nous permet de constater l'augmentation du taux de glycovariants non retenus par la Con A. Après le calcul de la surface des pics (Tableau VI p. 85, Fig. 17 p. 86) on peut chiffrer cette hausse à environ 47 %

Synthèse en %

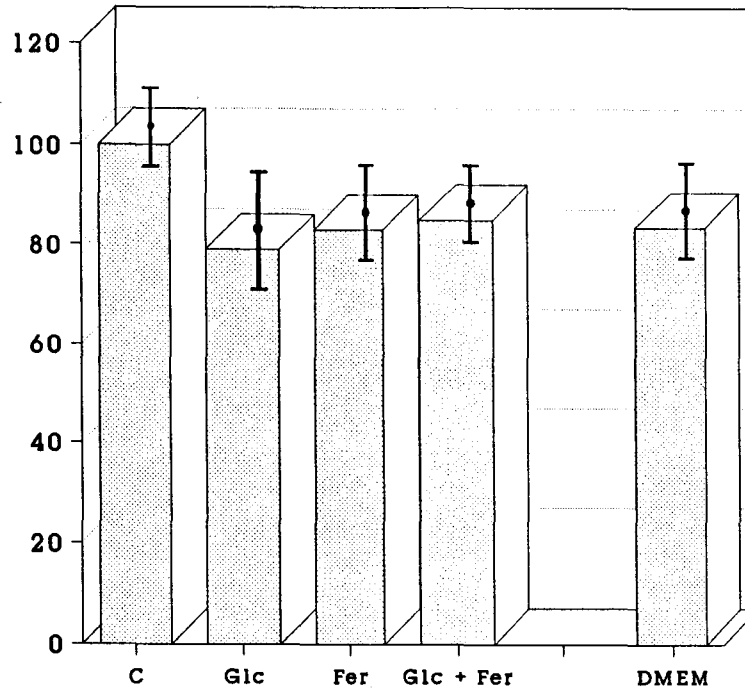


Figure 15 : Dosage de la transferrine (RIA) sécrétée dans le milieu de culture, par les cellules HepG2 pendant 48 h.

A confluence les cellules sont incubées dans le RPMI 1640 (contrôle : C) auquel on ajoute les différents facteurs aux concentrations suivantes :

- Glc : D-glucose 13,9 mM
- Fer : $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0,1 ng/ml
- Glc + Fer : D-glucose 13,9 mM + $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0,1 ng/ml

La synthèse est exprimée en % par rapport au RPMI 1640 (milieu contrôle) et représente la moyenne des résultats d'un dosage, dans une boîte de culture, fait en triple exemplaires.

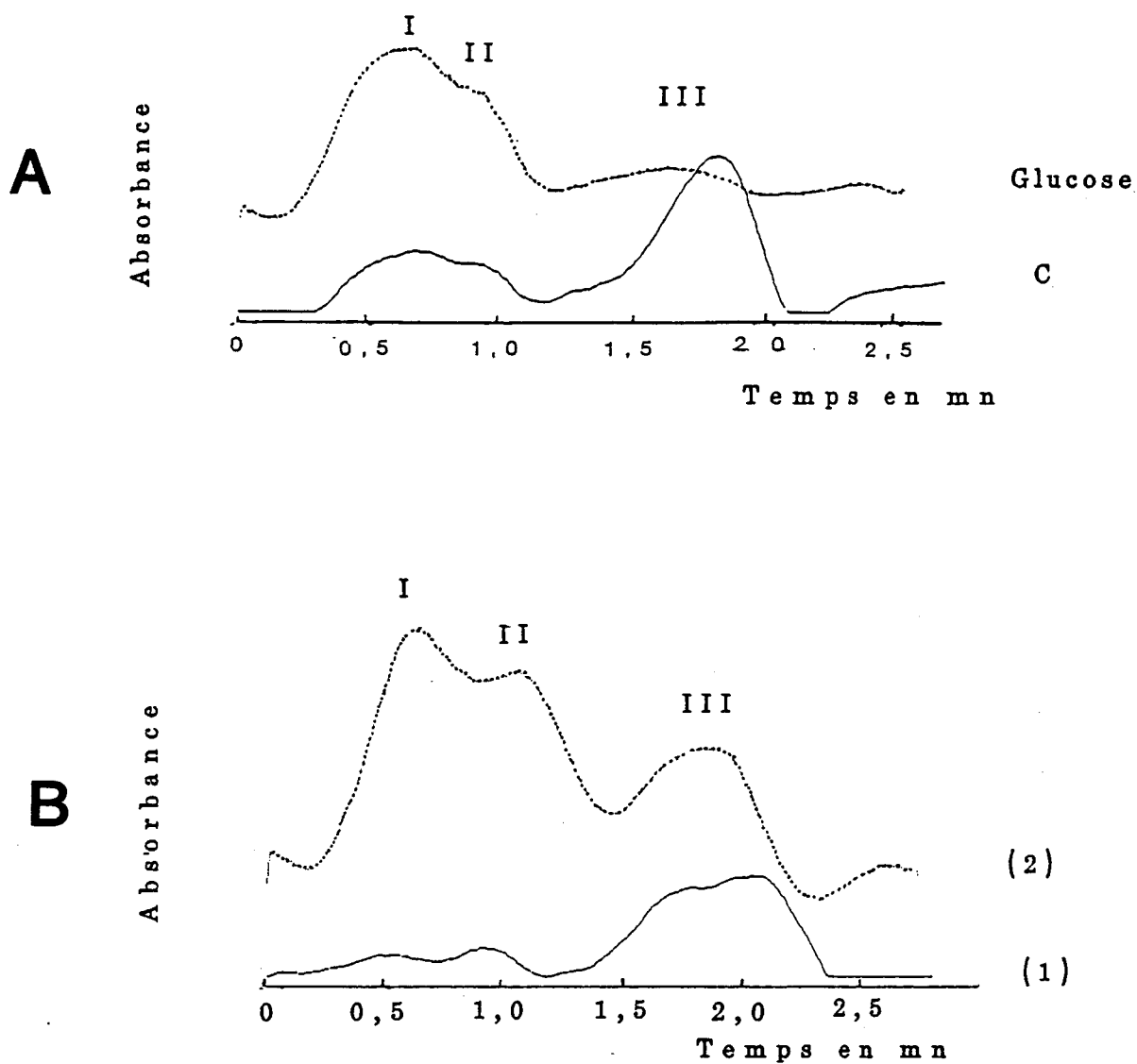


Figure 16 : Analyse densitométrique, après révélation immunoenzymatique, des glycovariants de la transferrine synthétisés par les cellules HepG2 incubées dans les différents milieux suivants :

A : RPMI 1640 supplémenté avec le glucose

B : RPMI 1640 - Expérience (1) du 11.90

- Expérience (2) du 03.91

* : Glc : D-glucose 13,9 mM

C : Milieu contrôle (RPMI 1640)

TABLEAU VI : Réactivité pour la Con A des variants glycaniques de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2 incubées dans les différents milieux.

Milieux	Retenus Con A	Retardés Con A	Non retenus Con A
RPMI 1640	57,8	24,3	17,8
DMEM	61,7	23,5	14,8
Glc *	24,7	10,3	65,0
Fe *	61,5	18,8	19,7
Glc + Fe *	51,5	26,9	21,1

* : Glc : RPMI 1640 + D-glucose 13,9 mM

Fe : RPMI 1640 + $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0,1 ng/ml

Glc + Fer : RPMI 1640 + D-glucose 13,9 mM + $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0,1 ng/ml

Les cellules à confluence sont incubées dans le RPMI 1640 auquel sont ajoutés les différents facteurs.

La proportion des glycovariants est exprimée en % et représente la moyenne des résultats de deux dosages dans deux puits d'une même boîte de culture.

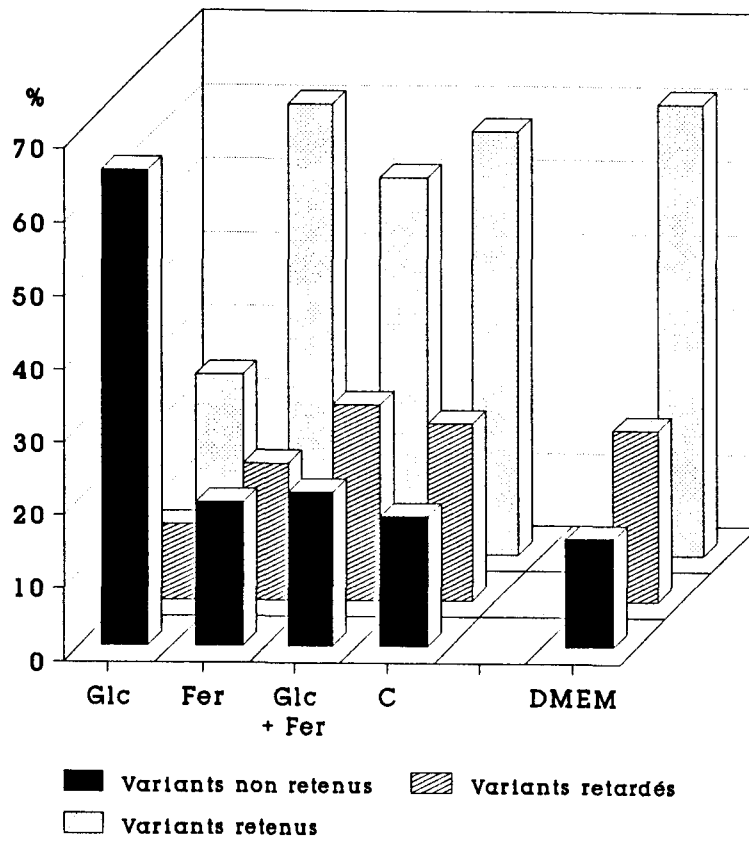


Figure 17 : Réactivité pour la Con A des glycovariants de la transferrine synthétisés par les cellules HepG2.

A confluence, les cellules sont incubées dans le RPMI 1640 (C) auquel on ajoute les différents facteurs à la concentration suivante :

- Glc : D-glucose 13,9 mM
- Fer : $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0,1 ng/ml
- Glc + Fer : D-glucose 13,9 mM + $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0,1 ng/ml

par rapport à la transferrine synthétisée dans le RPMI 1640 (milieu contrôle) et une baisse des variants retenus par la Con A à environ 33 % et des variants retardés d'environ 17 %. Ce résultat suggère une augmentation des structures glycaniques polyantennées de la transferrine. L'addition de fer et l'addition simultanée de fer et de glucose au RPMI 1640 n'ont pas d'influence significative sur la glycosylation de la transferrine.

De plus, l'incubation des cellules HepG2 dans le DMEM et dans le RPMI 1640, nous montrent que les proportions des variants glycaniques de la transferrine sont modifiées par rapport à l'expérience précédente (chap. B.II p. 76). En effet, l'augmentation des variants interagissant avec la Con A est tout à fait remarquable. Précédemment, la proportion des variants interagissant avec la Con A étaient de $30,5 \pm 2,1$ pour le DMEM et de $12,7 \pm 1,6$ pour le RPMI 1640 (Tableau V p. 78), cette proportion passe respectivement à 85,1 et 82,1 pour le DMEM et pour le RPMI 1640.

D'autre part, la différence de glycosylation de la transferrine observée entre la transferrine synthétisée par les cellules HepG2 incubées dans le DMEM et la transferrine synthétisée par les cellules incubées dans le RPMI 1640 n'existe plus. La répartition des variants glycaniques de la transferrine sécrétés dans ces deux milieux est sensiblement la même dans cette expérience.

3 - Discussion

L'addition de glucose à la concentration de 13,9 mM dans le RPMI 1640 entraîne une importante altération de la répartition des glycovariants de la transferrine. En effet, on observe une augmentation

des glycovariants non retenus par la Con A et une baisse des glycovariants interagissant avec la Con A, notamment des variants retenus, il semble que la proportion des glycanes biantennés soit diminuée en faveur des polyantennés.

La concentration en glucose du RPMI 1640 est moins importante que celle du DMEM (composition des milieux p. 227), de plus, le RPMI 1640 est dépourvu de pyruvate de sodium. Pourtant, la glycosylation de la transferrine sécrétée dans les deux milieux semble être la même, c'est donc que le manque d'apport énergétique n'est pas un facteur limitant de la biosynthèse des glycanes de la transferrine dans notre système cellulaire. La synthèse de la transferrine n'est d'ailleurs pas affectée par le déficit en glucose. Le glucose ajouté dans le RPMI 1640 semblerait donc intervenir autrement que par un simple apport d'énergie supplémentaire, il pourrait constituer une source d'hexoses à partir duquel les glycosyl-nucléotides seraient synthétisés.

L'addition de fer ne semble pas influencer la biosynthèse des glycanes de la transferrine. La présence du fer dans le RPMI 1640 entraîne l'inhibition de la modification due au glucose. Cette observation souligne la complexité de l'étude de facteurs additionnés au milieu de culture sur la régulation du métabolisme des cellules en général.

L'addition du fer et/ou du glucose au RPMI 1640 a été réalisée pour connaître l'impact de ces facteurs sur la différence de glycosylation observée précédemment (chap. B.II p. 76) entre la transferrine synthétisée par les cellules HepG2 incubées dans le RPMI 1640 et celle synthétisée par les cellules HepG2 incubées dans le DMEM. Dans cette expérience, cette différence n'existant plus, nous ne pouvons conclure quant à l'action du fer et/ou du glucose dans cette différence de glycosylation.

IV - INFLUENCE DE LA DUREE DE LA CONGELATION DES CELLULES

Nous allons dans ce chapitre, non pas faire une étude systématique, mais faire une récapitulation des données existantes sur la glycosylation de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2, pour poser le problème de l'importance de la durée de la congélation et des étapes de congélation/décongélation des cellules.

1 - Matériels et méthodes

Les cellules HepG2 ont été introduites au Laboratoire en avril 1984 à leur 2^{ème} passage. Elles ont été multipliées lors d'un troisième passage pour constituer un stock de cellules plus important. Ce stock a été réparti dans des ampoules scellées conservées dans l'azote liquide.

Les cellules sont congelées dans le milieu de culture plus 10 % de sérum de veau foetal et 10 % de diméthyl sulfoxyde (DMSO). Pour réaliser la congélation des cellules, celles-ci sont placées dans une ampoule scellée et placée dans la vapeur d'azote liquide. Le refroidissement ainsi obtenu est de 1°C par min. Pour la décongélation des cellules, l'ampoule est introduite dans un bain-marie à 37 °C jusqu'à la fonte complète du milieu de congélation.

Après décongélation, les cellules sont réparties dans des boîtes de culture en présence de 10 % de sérum de veau foetal et placées en incubateur à 37° C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Le milieu est changé régulièrement 2 à 3 fois par jour pendant 3 jours pour diminuer la teneur en DMSO.

Les cellules se multiplient et atteignent la confluence après 4 à 5 jours de culture. Elles sont alors décollées, comptées etensemencées dans de nouvelles boîtes de culture. Le nombre de passage est

d'environ 14 avant de redécongeler une nouvelle ampoule.

Pour réaliser notre étude, le déroulement de la culture s'est effectué comme suit :

Au 5^{ème} passage, une partie des cellules est congelée, la culture cellulaire est poursuivie avec le reste des cellules. L'étude de l'influence du sérum de veau foetal sur la glycosylation de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2 a été réalisée au 10^{ème} passage (chap. B.I p. 70). Les études de l'influence du milieu de culture sur la glycosylation de la transferrine ont été réalisées au 12^{ème} passage (chap. B.II p. 76), la culture a été stoppée au 14^{ème} passage. Les cellules HepG2 congelées précédemment au 5^{ème} passage sont alors décongelées pour continuer les études suivantes. Les études de l'influence du glucose et/ou du fer (chap. B.III p. 81), de l'IL-6 (chap. C.I p. 96) sur la glycosylation de la transferrine ont été faites au 10^{ème} passage, celles sur l'influence des glucocorticoïdes (chap. C.II p. 104) au 12^{ème} passage.

Dans toutes nos études, les cellules sontensemencées dans des boîtes de culture avec le DMEM et 10 % de sérum de veau foetal jusqu'à la confluence.

2 - Résultats

Les différents résultats sur la glycosylation de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2 obtenus au Laboratoire sont récapitulés dans le Tableau VII page 91. Les études décrites par CAMPION et al., (1989) réalisées au Laboratoire entre 1985 et 1988, sur la transferrine sécrétée par les cellules HepG2 ensemencées dans le DMEM additionné de 10 % de sérum de veau foetal jusqu'à leur confluence, n'avaient pas permis de déceler de variants glycaniques de la transferrine reconnus par la Con A. Dès le début de notre étude,

TABLEAU VII : Récapitulation des différents résultats sur la glycosylation de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2.

Techniques	Nombre de passages	Date	Milieu de culture	Variants interagissant avec la Con A		Variants non retenus
				Variants retenus	Variants retardés	
AIE	nd	1985	DMEM + S ϕ	0	0	100
	nd	05.90	DMEM + S ϕ			69,0
AE + IT	10	11.90	DMEM + S ϕ			73,1
	10	11.90	DMEM + S			71,3
			DMEM - S			70,6
	12	11 90	DMEM + S			70,4
			DMEM - S			73,1
			RPMI + S			86,6
			RPMI - S			87,3
	10	03.91	DMEM - S	61,7	23,5	14,8
			RPMI - S	57,8	24,3	17,8
	12	04.91	RPMI - S	54,2	23,8	21,9

ϕ : Les résultats ont été obtenus avec la transferrine synthétisée par les cellules HepG2 jusqu'à leur confluence (4 à 5 jours).

Les autres résultats ont été obtenus avec la transferrine synthétisée par les cellules HepG2 après confluence, et incubées dans les différents milieux pendant 48 h.

en 1990, dans les mêmes conditions expérimentales, nous avons observé "l'apparition" de 31 % de variants glycaniques interagissant avec la Con A. De plus, des études effectuées après la confluence des cellules nous ont permis d'observer des pourcentages équivalents (26,9) avec la transferrine synthétisée par les cellules HepG2 incubées dans le DMEM avec et sans 10 % de sérum de veau foetal pendant 48 h. Par contre, dans ces conditions expérimentales les cellules HepG2 incubées dans le RPMI 1640 synthétisent une transferrine comportant 13,8 % de variants glycaniques interagissant avec la Con A et 86,2 % non retenus. L'addition de 10 % de sérum de veau foetal ne modifie pas ces pourcentages.

Au début de l'année 1991, les cellules HepG2 après confluence incubées pendant 48 h dans le DMEM sans sérum de veau foetal synthétisent une transferrine comportant 61,7 % de variants glycaniques retenus, 23,5 % retardés et 14,8 % non retenus par la Con A. Par ailleurs, la répartition des variants glycaniques vis à vis de la Con A est cette fois plus proche de celle de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2 incubées dans le RPMI 1640 sans sérum de veau foetal.

3 - Discussion

Nous avons constaté premièrement qu'au cours des travaux réalisés entre 1985 et 1988 par CAMPION et ceux que nous avons réalisés à partir de 1990, la glycosylation de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2 incubées dans le DMEM plus 10 % de sérum de veau foetal avait changé. Cette modification de la glycosylation se caractérise par la mise en évidence de glycovariants interagissant avec la Con A, avec une augmentation de ces glycovariants en 1991, ce qui traduit une augmentation des glycannes biantennés. Les cellules HepG2 lors de leur

décongélation sont à leur 4^{ème} passage et proviennent du même stock initial que les cellules utilisées par CAMPION et al., (1989). La différence se situe au niveau du temps de congélation. En effet, les cellules que nous avons utilisées ont été congelées 2 à 3 ans de plus que celles utilisées par CAMPION et al.. D'autre part, nous ne connaissons pas le nombre de passage des cellules HepG2 au moment où CAMPION et al. ont obtenu leur résultat.

Le deuxième fait le plus marquant est la brusque altération de la proportion des glycovariants interagissant avec la Con A qui passe de 12,7 % à 82,1 % pour la transferrine synthétisée par les cellules HepG2 incubées dans le RPMI 1640 sans sérum et de 26,9 % à 85,2 % pour la transferrine synthétisée par les cellules HepG2 incubées dans le DMEM sans sérum. Dans ce cas les expériences ont été faites à des nombres de passage très proches. La seule différence entre les cellules, consiste en une étape de congélation/décongélation, si on exclue les différences liées à la manipulation des cellules lors de chaque passage.

A chaque passage, les nombreuses multiplications cellulaires peuvent entraîner des variations de l'expression génique. De plus, le DMSO ajouté dans le milieu de congélation des cellules est un facteur de différenciation cellulaire, qui induit des modifications de la glycosylation (LIU et al., 1983). Le DMSO ajouté au milieu de culture des cellules HepG2 augmente la synthèse des PPA de façon analogue à l'IL-6 (IWASA et al., 1988). Le DMSO pourrait donc avoir un effet sur les cellules HepG2 et notamment sur la biosynthèse des glycanes. D'autre part, la congélation des cellules a pour conséquence une désorganisation, ou une cassure des membranes plasmiques. L'addition de produits tels que le DMSO ou le glycérol a un effet protecteur des membranes, mais on ne connaît pas exactement l'efficacité de ces produits lors des processus de congélation.

L'organisation des membranes du réticulum rugueux et de l'appareil de Golgi est capitale dans la biosynthèse des oligosaccharides. On ne peut donc pas exclure une part de responsabilité des processus de congélation/décongélation et de la présence du DMSO dans la modification de la glycosylation des protéines.

V - CONCLUSION

Sur une période allant jusqu'à 96 h de culture, nous n'avons pas mis en évidence de différence dans la proportion des glycovariants de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2 en absence de sérum de veau foetal. Par contre, nous avons démontré l'importance de la composition du milieu de culture sur la glycosylation de la transferrine en utilisant deux milieux différents : le RPMI 1640 et le DMEM, ainsi qu'avec l'addition de fer et de glucose dans le RPMI 1640.

Le glucose semblerait augmenter le taux de polyantennarisation des glycanes de la transferrine. Cet élément pourrait permettre l'augmentation de la biosynthèse de glycosyls nucléotides utilisables par les glycosyltransférases.

Ces résultats sont néanmoins à mettre en parallèle avec le type de cellule utilisée. Les cellules HepG2, sont en effet, des cellules transformées et de ce fait défectueuses au niveau du contrôle de leur métabolisme. Elles sont probablement plus sensibles que les cellules "normales" aux différents changements de leur environnement. De plus l'expression génique de ces cellules est perturbée et évolue avec le temps. OHKAWA et al., (1990), mettent en évidence cette évolution génique en démontrant la synthèse de transferrine par des cellules ovariennes humaines cancéreuses (lignée non productrice de transferrine) cultivées dans un milieu minimum sans sérum.

Nous avons démontré l'évolution dans le temps de la glycosylation de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2. Les derniers pourcentages des glycovariants sont très proches de ceux trouvés par la même technique (AE et IT) dans le cas de sérotransferrine de sujets sains (chap. A.II, Tableau III p. 68).

La mise en culture, elle-même a une influence sur la glycosylation de la transferrine. A chaque passage, les cellules ne sont plus les mêmes. Les différents stress qu'elles subissent lors du décollement de leur substrat, de l'isolement vis à vis des autres cellules, des cycles congélation-décongélation, du stade de division au moment de la congélation, de la durée de congélation, sont autant de facteurs dont on ignore l'importance réelle. L'observation du fait que certaines cellules après décongélation ne se multiplient que très faiblement ou pas du tout est une illustration de l'impact de ces différents événements. L'environnement de la cellule est essentiel. Les propriétés physicochimiques du milieu environnant (pH, osmolarité) de celui-ci, les propriétés biologiques (présence d'hormones, de facteurs de croissance) sont des facteurs auxquels la cellule est susceptible de "répondre" en modifiant son métabolisme. La réponse de la cellule dépendra des différents stimuli, de sa capacité à les percevoir (présence de récepteurs) et de sa capacité fonctionnelle. Comment la cellule "interprète" t-elle les différents événements cités précédemment et quelle est l'influence de la congélation-décongélation sur la capacité fonctionnelle des cellules ?

En conclusion, il semble donc qu'il y ait une modification dans le temps, de la glycosylation de la transferrine sécrétée par les cellules HepG2, montrant un retour à une glycosylation de type "normale". Il semblerait que la durée de congélation des cellules et que le processus de congélation/décongélation aient une importance dans

cette modification.

Nos résultats sur l'importance de la composition du milieu de culture démontrent la nécessité de décrire attentivement les conditions de culture des cellules avant de tirer toute conclusion concernant la synthèse des glycoprotéines.

C - INFLUENCE DU PROCESSUS INFLAMMATOIRE

Comme nous l'avons vu dans les Généralités (p. 25), les modifications de la glycosylation des protéines de la phase aiguë de l'inflammation pendant le processus inflammatoire paraissent essentiellement liées aux cytokines, notamment à l'interleukine 6 (IL-6), et aux glucocorticoïdes. Nous allons donc dans ce chapitre étudier l'influence de l'IL-6, de l'hydrocortisone et de la dexaméthasone sur la glycosylation de la transferrine synthétisée et sécrétée par les cellules HepG2, bien que la transferrine ne soit pas une protéine du processus inflammatoire.

I - INTERLEUKINE 6

MACKIEWICZ et al., (1989d), ont démontré l'influence des cytokines, et notamment de l'IL-6, (1989c), sur la glycosylation des PPA. Pour évaluer l'impact de l'IL-6 sur la glycosylation de la transferrine sécrétée par les cellules HepG2, nous avons ajouté dans le milieu des quantités croissantes d'IL-6 de 10 à 200 U/ml. La transferrine dont la synthèse diminue dans les cas d'inflammation (KUSHNER et MACKIEWICZ, 1987), est considérée par certains auteurs comme une PPA négative. Nous avons aussi étudié dans les mêmes conditions le devenir d'une PPA positive, l' α 1-antitrypsine (AAT). La modification de

la glycosylation et l'augmentation de synthèse de l'AAT par les cellules HepG2 en réponse à l'IL-6 a été décrite par MACKIEWICZ et al., (1989c). Cette PPA nous servira de témoin positif de l'action de l'IL 6 sur les cellules HepG2.

1 - Matériels et méthodes

Les cellules HepG2 sont ensemencées dans des boîtes de 24 puits de 2 cm² et sont cultivées dans le DMEM plus 10 % de sérum de veau foetal, elles sont alors à leur 10^{ème} passage. Après confluence des cellules, le milieu est remplacé par le RPMI 1640 dans lequel on ajoute des quantités croissantes d'IL-6. Nous avons changé le type de milieu pour nous rapprocher des conditions expérimentales des travaux de MACKIEWICZ et al., (1989d), le choix des différentes concentrations, ainsi que le type d'IL-6 (IL-6 recombinante d'Escherichia coli, Sigma) a été également fait dans ce sens.

Après 48 heures d' incubation, la synthèse de la transferrine est évaluée par RIA, et celle de l'AAT par immunoelectrophorèse selon la méthode de Laurell (Appendice technique p. 221). Les milieux sont soumis à une AE en présence de Con A suivie d'un IT afin d'évaluer la proportion des variants des deux glycoprotéines.

2 - Résultats

a) **Dosage de la transferrine et de l' α 1-antitrypsine**

Les taux de synthèse de la transferrine et de l' α 1-antitrypsine synthétisées par les cellules HepG2 incubées dans le RPMI 1640 supplémenté en IL-6 sont rassemblés dans la Fig. 18 p. 98. Le taux de la synthèse de la transferrine ne semble pas être modifié de façon

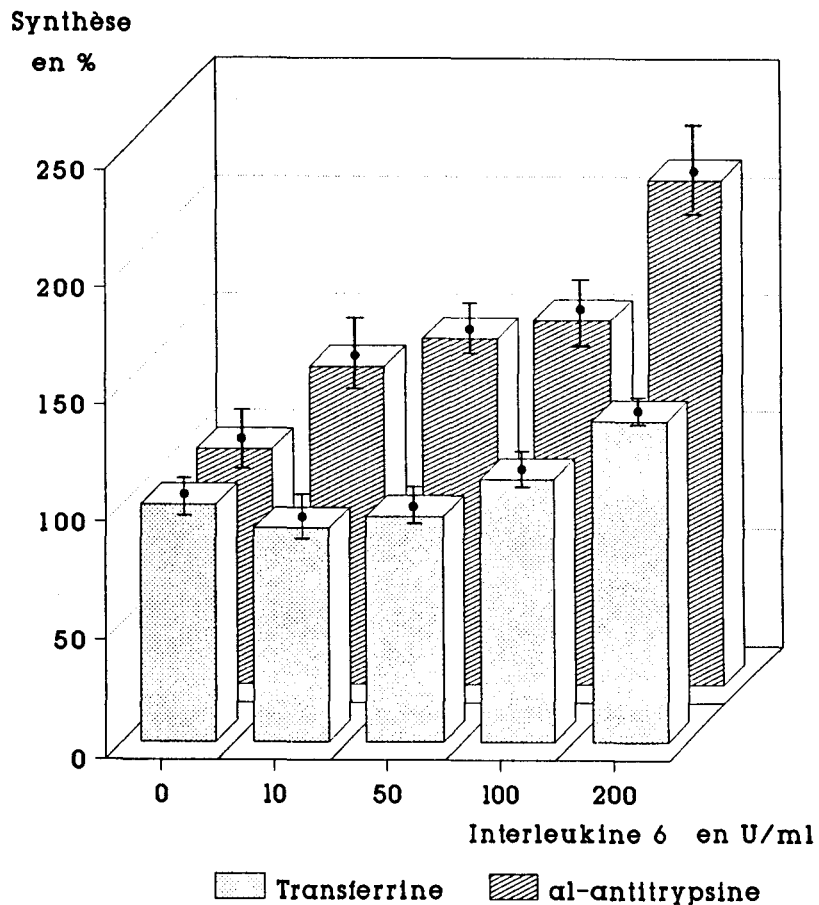


Figure 18 : Dosage de la transferrine (Tf) et de l' α 1-antitrypsine (AAT) synthétisées par les cellules HepG2 incubées dans le RPMI 1640 supplémenté en IL-6 pendant 48 h.

Après 48 h d'incubation, la transferrine est dosée par RIA, l' α 1-antitrypsine par immunoélectrophorèse. La synthèse est exprimée en % par rapport au taux de synthèse dans le milieu RPMI 1640 et représente la moyenne des résultats d'un dosage, dans une boîte de culture, fait en triple exemplaires.



significative pour des concentrations d' IL-6 jusqu'à 100 U/ml. Pour 200 U/ml la synthèse de la transferrine est faiblement stimulée : $136,3 \% \pm 3,0$ par rapport au contrôle sans IL-6 (100 %).

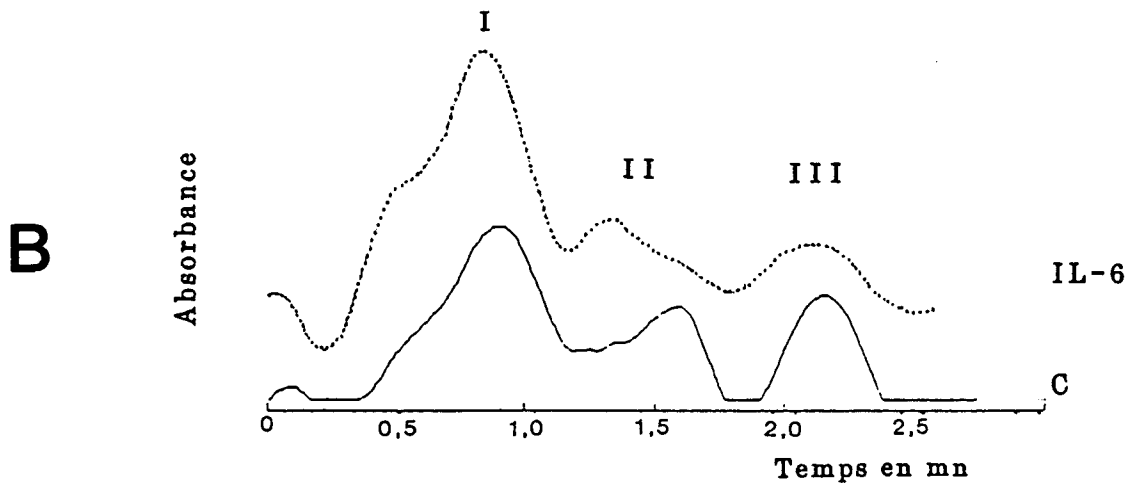
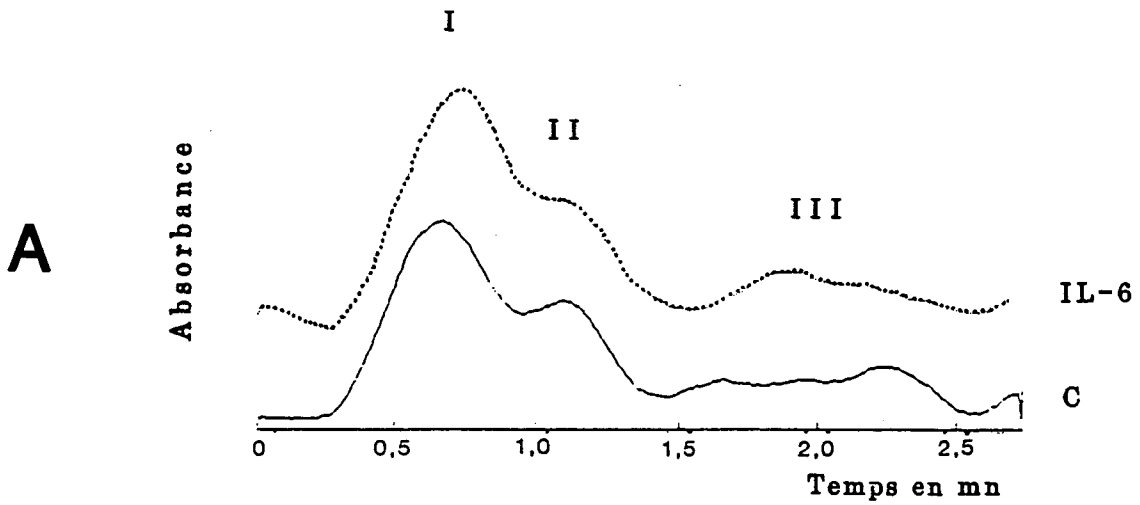
Par contre, la synthèse de l' α 1-antitrypsine par les cellules HepG2 est multipliée par 2 pour une concentration d'IL-6 de 200 U/ml dans le milieu de culture. Pour une concentration de 10 U/ml d'IL-6, l'augmentation de synthèse est déjà d'environ 1,4.

b) Séparation des glycovariants de la transferrine et de l' α 1-antitrypsine

La Fig. 19 p. 100 montre l'analyse densitométrique après révélation immunoenzymatique des glycovariants de la transferrine et de l' α 1-antitrypsine synthétisés par les cellules HepG2 incubées dans le RPMI 1640 supplémenté en IL-6. L'intégration de la surface des pics permet de déterminer le pourcentage des glycovariants, ces résultats figurent dans le tableau VIII page 101 et sont analysés d'une manière comparative dans la Fig. 20 p. 102.

Parallèlement à l'augmentation de la concentration d'IL-6 dans le milieu de culture, la proportion des variants glycaniques de la transferrine retenus par la Con A augmente légèrement, + 9 % pour une concentration d'IL-6 de 100 et de 200 U/ml, et à l'inverse la proportion des variants non retenus par la lectine diminue de la même manière, tandis que les variants retardés par la Con A conservent leur taux initial.

Par contre, pour une concentration d'IL-6 de 200 U/ml, on observe une augmentation d'environ 23 % des variants retenus par la Con A de l'AAT synthétisée par les cellules HepG2. La proportion des autres variants retardés ou non retenus est également modifiée.



* : IL-6 : Interleukine 6 à 200 U/ml

Figure 19 : Analyse densitométrique, après révélation immunoenzymatique, des glycovariants de la transferrine (Tf) : A, et de l' α 1-antitrypsine (AAT) : B, synthétisés par les cellules HepG2 incubées dans le RPMI 1640 (C) supplémenté avec l'IL-6, (I: variants retenus, II: variants retardés, III: variants non retenus).

TABLEAU VIII : Réactivité pour la Con A des variants glycaniques de la transferrines (Tf) et de l' α 1-antitrypsine (AAT) sécrétées par les cellules HepG2 en réponse à l'IL-6.

IL-6	Variants I		Variants II		Variants III	
	Retenus Con A		Retardés Con A		Non retenus Con A	
	Tf	AAT	Tf	AAT	Tf	AAT
Contrôle *	54,2	49,5	23,8	25,2	21,9	25,3
10 U/ml	53,0	49,6	24,1	23,1	22,9	27,2
50 U/ml	52,0	43,5	22,5	23,8	25,5	32,6
100 U/ml	62,2	47,0	23,1	23,7	14,7	29,2
200 U/ml	63,3	72,4	21,7	15,4	15,0	12,2

* : Les cellules à confluence sont incubées dans le RPMI 1640 qui constitue le milieu contrôle, auquel on ajoute les différentes concentrations d' IL-6.

La synthèse est exprimée en % par rapport au RPMI 1640 (milieu contrôle) et représente la moyenne des résultats d'un dosage, dans une boîte de culture, fait en triple exemplaires.

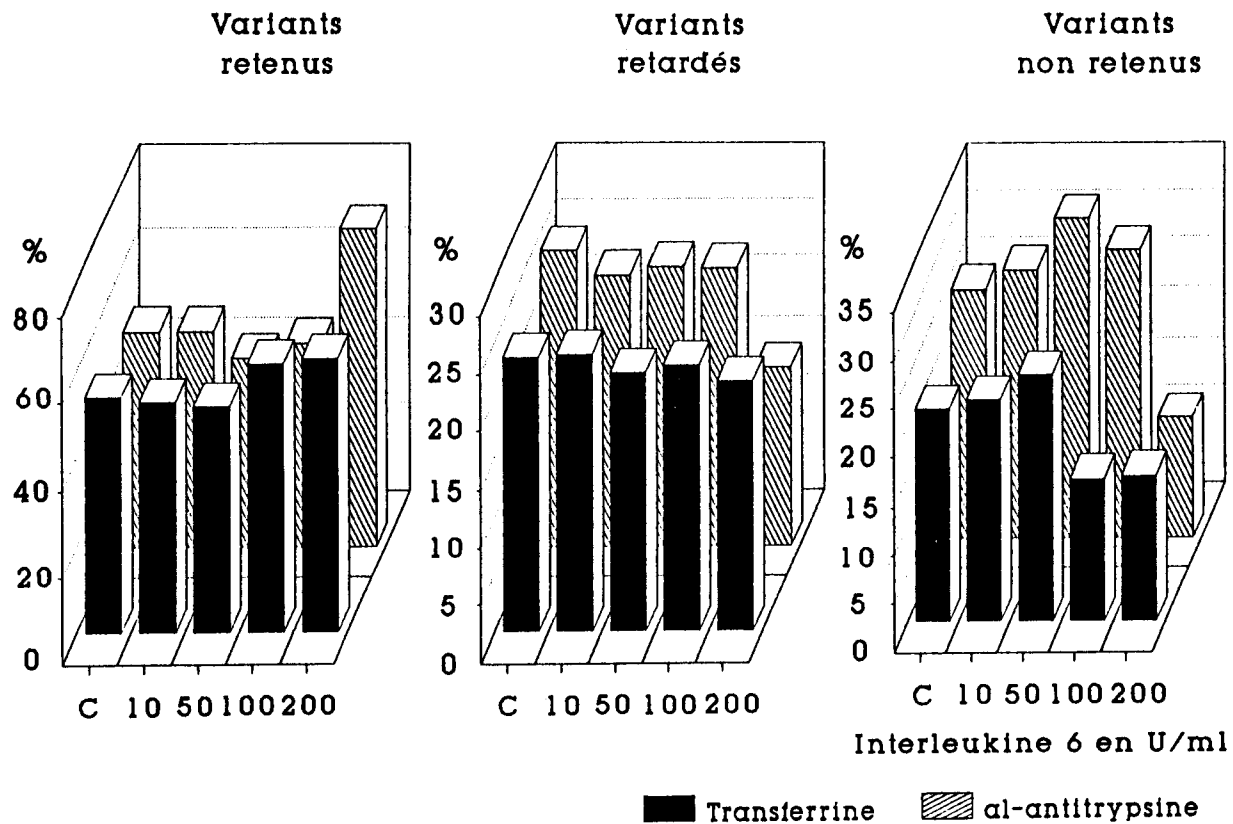


Figure 20 : Réactivité pour la Con A des variants glycaniques de la transferrine et de l' α 1-antitrypsine sécrétées par les cellules HepG2 en réponse à l'IL-6.

Les cellules à confluence sont incubées dans le RPMI 1640 qui constitue le milieu contrôle (C) auquel on ajoute les différentes concentrations d'IL-6.

3 - Discussion

L'IL-6 semble avoir une influence mineure sur la glycosylation et sur la synthèse de la transferrine sécrétée par les cellules HepG2.

L'IL-6 ne semble pas modifier considérablement la glycosylation de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2 aux doses utilisées par MACKIEWICZ et al., (1989d) pour la modification des PPA positives. Par contre, la glycosylation de l'AAT est fortement modifiée pour une concentration en IL-6 de 200 U/ml. L'AAT du sérum possède 3 glycanes de type N-acétyllactosaminique par molécule et il existe 3 glycovariants principaux de l'AAT. Le glycovariant I fortement retenu par la Con A, possède 3 glycanes biantennés, le glycovariant II faiblement retenu par la Con A, possède 2 glycanes biantennés et un triantenné, et enfin le glycovariant III non retenu par la Con A, possède 3 glycanes triantennés (VAUGHAN et al., 1982). On peut donc supposer que l'IL-6 entraîne une augmentation de la synthèse de glycanes biantennés de l'AAT sécrétée par les cellules HepG2. Il est à remarquer que nos résultats concernant l'influence de l'IL-6 sur la glycosylation de l'AAT (PPA positive) ne confirment pas ceux de MACKIEWICZ et al., (1989d). En effet, si nous constatons bien une influence de l'IL-6 sur la glycosylation de l'AAT, c'est une augmentation des variants retenus par la Con A, alors que MACKIEWICZ et al., ont décrit une baisse des variants retenus par la Con A dans le cas de l'AAT, de la céruléoplasmine et de l' α -foetoprotéine. Par contre, ces auteurs ont décrit une augmentation des variants retenus par la Con A pour ces 3 PPA sécrétées par les cellules Hep3B issues d'une autre lignée cellulaire d'hépatocarcinome.

L'IL-6 à la concentration de 100 U/ml ne semble pas perturber la synthèse de la transferrine par les cellules HepG2, alors qu'à la même

concentration elle inhibe à 50 % la synthèse de transferrine par des hépatocytes humains en culture primaire (CASTELL et al., 1988; 1989). La synthèse de la transferrine par les cellules HepG2 est également inhibée par l'IL-1 et le TNF (PERLMUTTER et al., 1986).

Le taux d'augmentation de la synthèse de l'AAT qui est multiplié par 2, est comparable à celui trouvé par MACKIEWICZ et al., (1989d) pour les cellules HepG2 ainsi que pour les cellules Hep3B.

II - GLUCOCORTICOIDES

Les glucocorticoïdes interviennent également pendant le processus de l'inflammation. POS et al. (1988), ont démontré leur influence sur la glycosylation des PPA. De plus, CAMPION, (1987) en observant des variations de la proportion des glycovariants de la transferrine synthétisés par des hépatocytes humains en co-culture (en présence de fibroblastes) en fonction du temps, ont posé la question de l'influence des fibroblastes mais aussi de l'hydrocortisone ajouté dans le milieu sans sérum.

Nous avons déterminé l'impact de l'hydrocortisone (qui représente 95 % de la sécrétion corticosurrénalienne humaine) et de la dexaméthasone (glucocorticoïde synthétique) sur la glycosylation de la transferrine qui n'est pas une PPA. D'autre part, nous avons étudié l'effet de ces glucocorticoïdes sur l'action des cytokines.

1 - Matériels et méthodes

Pour vérifier l'influence des glucocorticoïdes, les cellules HepG2 sontensemencées dans des boîtes de 24 puits de 2 cm² et sont cultivées dans le DMEM additionné de 10 % de sérum de veau foetal, elles sont

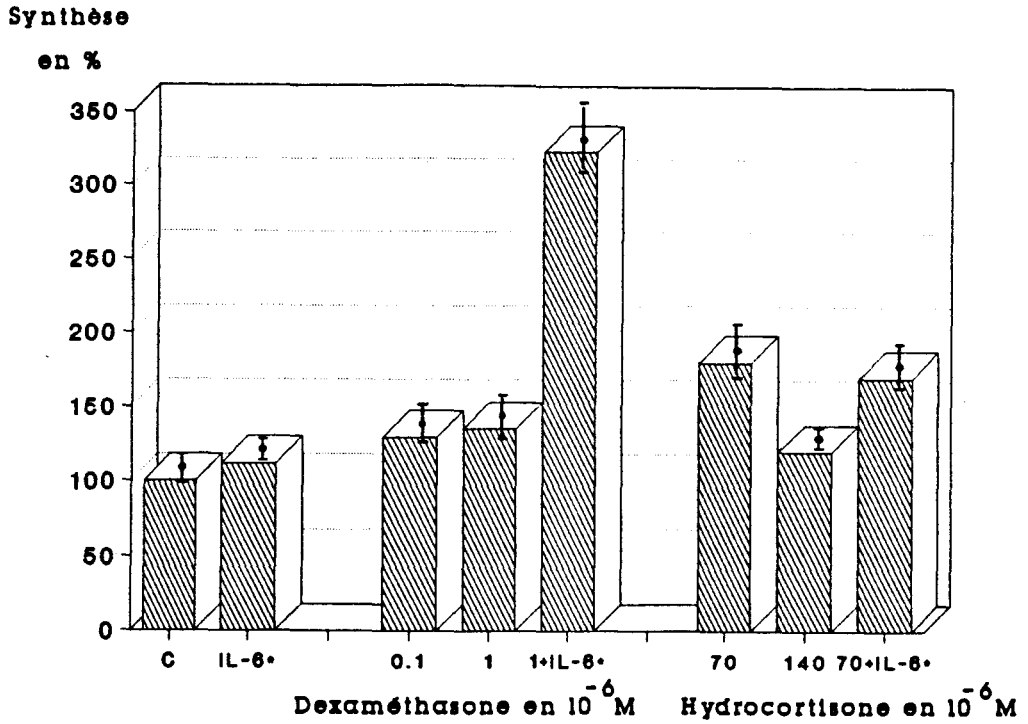
alors au 12^{ème} passage. Après confluence, les cellules HepG2 sont lavées et incubées dans le milieu RPMI 1640 sans sérum auquel on ajoute les différents glucocorticoïdes à la concentration suivante : hydrocortisone (Sigma): 70 et 140 x 10⁻⁶ M, dexaméthasone (Sigma): 0,1 et 1 x 10⁻⁶ M. Nous avons également testé l'influence des glucocorticoïdes sur l'action de l'IL-6 en ajoutant au RPMI 1640, ces deux facteurs à la concentration suivante : hydrocortisone 70 x 10⁻⁶ M plus IL-6 100 U/ml, et dexaméthasone 1 x 10⁻⁶ M plus IL-6 100 U/ml. Après 48 heures de culture, nous avons dosé le taux de transferrine du milieu par RIA et estimé la proportion des différents variants glycaniques de la transferrine par une AE des milieux de culture, en présence de Con A, suivie d'un IT.

2 - Résultats

a) **Dosage de la transferrine**

La transferrine est synthétisée dans le RPMI 1640 à la concentration de 1,3 µg/ml/10⁶ cellules (Fig. 21 p. 106), elle est très faiblement stimulée par la dexaméthasone à 0,1 ou à 1 x 10⁻⁶M (+ 35 %). La stimulation est semblable à celle des hépatocytes en culture primaire (CASTELL et al., 1988). La stimulation est plus importante pour l'hydrocortisone (+ 80 %), notamment à la concentration de 70 x 10⁻⁶M plutôt qu'à celle de 140 x 10⁻⁶M (+ 20 %), où la synthèse est comparable à celle induite par la dexaméthasone.

Par contre, l'addition d'IL-6 à la dexaméthasone dans le milieu augmente très fortement la synthèse de la transferrine (+ 223 %), soit 2,4 fois plus que le taux de synthèse induit par l'IL-6 ou par le dexaméthasone. La combinaison de l' IL-6 avec l'hydrocortisone ne stimule pas la synthèse de la transferrine, le taux de synthèse obtenu



* : IL-6 : Interleukine 6 : 100 U/ml

Figure 21 : Dosage de la transferrine (RIA) synthétisée par les cellules HepG2 incubées dans le RPMI supplémenté avec les glucocorticoïdes avec et sans IL-6.

La synthèse est exprimée en % par rapport au taux de synthèse dans le RPMI 1640 et représente la moyenne des résultats d'un dosage, dans une boîte de culture, fait en triple exemplaires.

est sensiblement le même que sans IL-6, mais la concentration utilisée n'est peut-être pas optimale.

b) Séparation des glycovariants de la transferrine

L'analyse densitométrique, après révélation immunoenzymatique (Fig. 22 p. 108) a permis de calculer la proportion des glycovariants de la transferrine synthétisés par les cellules HepG2 dans les différents milieux (Tableau IX p. 109, Fig. 23 p. 110). Les deux glucocorticoïdes utilisés induisent une modification importante de la proportion des variants glycaniques de la transferrine.

En présence de dexaméthasone cette modification se traduit par une baisse de moitié des glycovariants retenus par la Con A, et cela à une concentration de $0,1 \times 10^{-6}$ et à 10^{-6} M de dexaméthasone, avec parallèlement une augmentation d'un facteur 2 des glycovariants non retenus par la Con A (respectivement pour les deux concentrations 43,8 % et 44,5 %). En présence d'hydrocortisone le type de modification est semblable. En effet, le pourcentage des variants retenus par la Con A pour une concentration d'hydrocortisone de 70×10^{-6} M est de 34,1 et pour une concentration d'hydrocortisone de 140×10^{-6} M il est de 36,3. Le pourcentage des variants non retenus par la Con A est respectivement pour les deux concentrations de 41,6 % et 38,6 %. Le taux des variants retardés dans les milieux renfermant la dexaméthasone et l'hydrocortisone est équivalent à celui trouvé dans le milieu contrôle.

La combinaison des glucocorticoïdes avec l'IL-6 donne un profil d'altération de la glycosylation semblable à celui provoqué par l'IL-6. L'IL-6 semble donc inhiber totalement l'action des glucocorticoïdes sur la glycosylation de la transferrine.

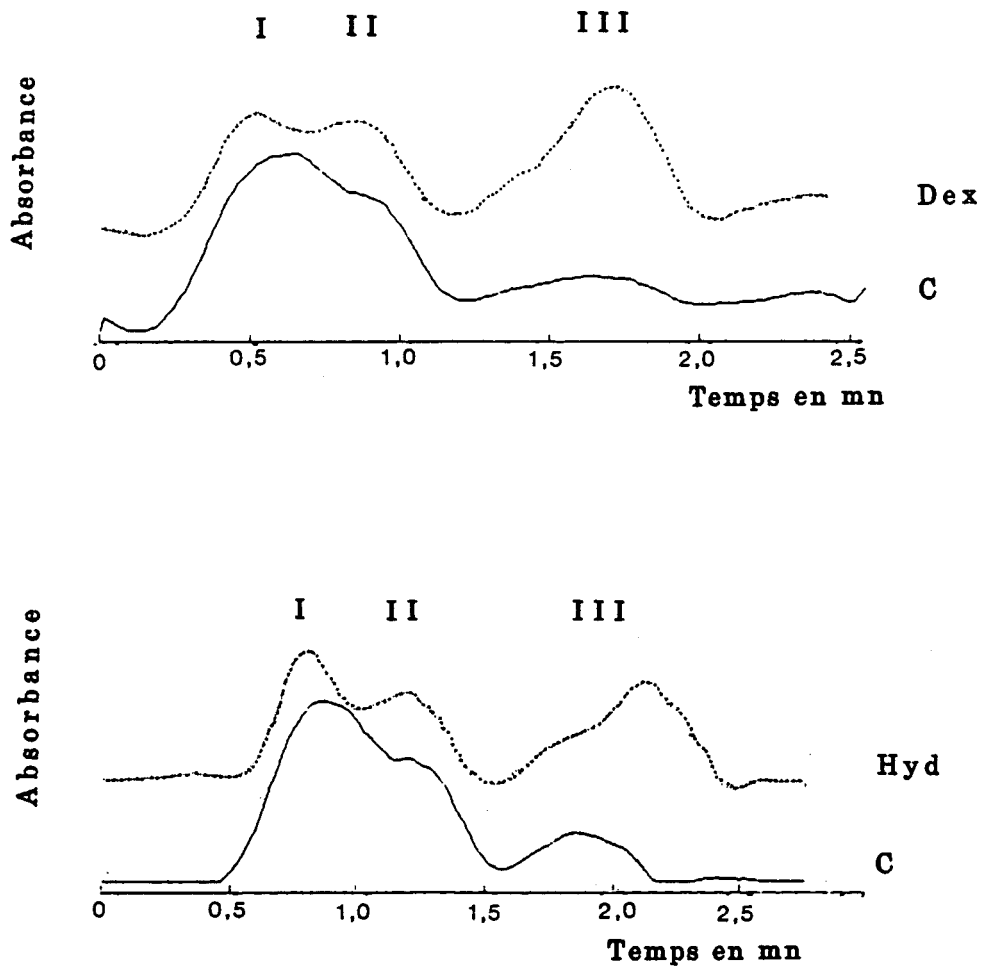


Figure 22 : Analyse densitométrique, après révélation immunoenzymatique, des glycovariants de la transferrine synthétisés par les cellules HepG2 incubées dans le RPMI 1640 (C) supplémenté avec les glucocorticoïdes, (I: Variants retenus, II: variants retardés, III: variants non retenus).

* : Dex : Dexaméthasone $0,1 \times 10^{-6}$ M

Hyd : Hydrocortisone $0,7 \times 10^{-6}$ M

TABLEAU IX : Réactivité pour la Con A des variants glycaniques de la transferrine sécrétée par les cellules HepG2 en réponse aux glucocorticoïdes.

Affinité des variants glycaniques pour la Con A			
Facteurs ajoutés	Variants I	Variants II	Variants III
	Retenus	Retardés	Non retenus
Contrôle	53,5	25,2	21,3
IL-6 100 U/ml ^Φ	62,2	23,1	14,7
Dex 0,1x10 ⁻⁶ M	28,1	28,1	43,8
Dex 1x10 ⁻⁶ M	28,8	26,6	44,5
Dex 1x10 ⁻⁶ M + IL-6*	61,3	25,7	13,0
Hyd 70x10 ⁻⁶ M	34,1	24,3	41,6
Hyd 140x10 ⁻⁶ M	36,3	25,1	38,6
Hyd 70x10 ⁻⁶ M + IL-6*	62,0	23,9	14,1

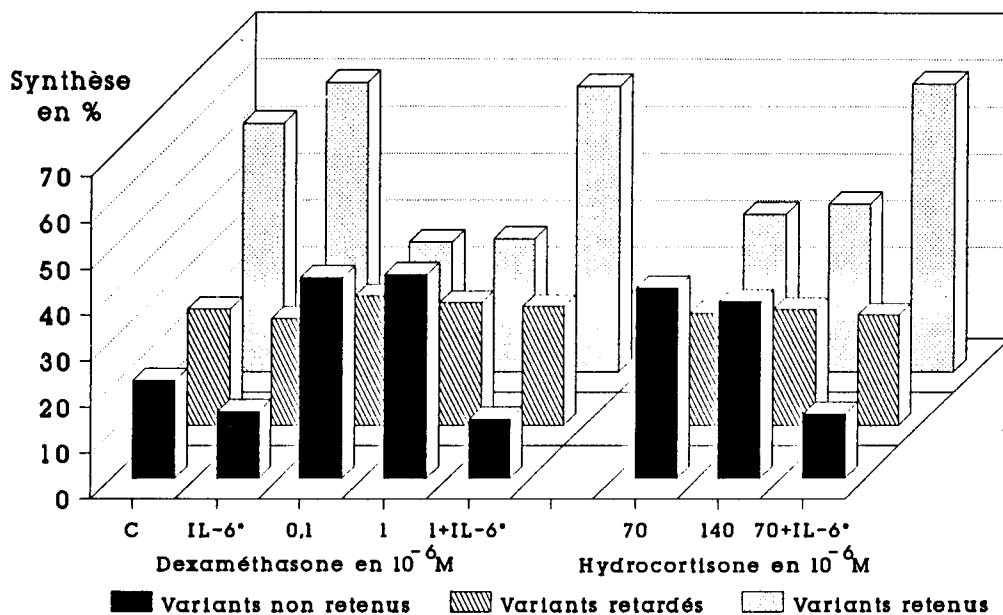
Φ : Valeurs de l'expérience précédente.

* : IL-6 100 U/ml

Dex : Dexaméthasone, Hyd : Hydrocortisone

Après la confluence, les cellules sont incubées dans le RPMI 1640 (contrôle), auquel on ajoute les différents facteurs.

La proportion des glycovariants est exprimée en % et représente la moyenne de deux dosages réalisés dans deux puits différents d'une même boîte de culture.



* : IL-6 : Interleukine 6 à 100 U/ml

Figure 23 : Réactivité pour la Con A des glycovariants de la transferrine synthétisés par les cellules HepG2 en réponse aux glucocorticoïdes avec ou sans IL-6.

Après la confluence, les cellules sont incubées dans le RPMI 1640 (contrôle : C) auquel on ajoute les différents facteurs.

3 - Discussion

Contrairement à l'effet de l'IL-6, l'addition de glucocorticoïdes dans le milieu de culture des cellules HepG2 entraîne d'importantes modifications de la synthèse et de la glycosylation de la transferrine. Cette modification se traduit par une augmentation de la proportion des glycovariants non retenus par la Con A qui peut aller jusqu'à un doublement dans le cas de la dexaméthasone. Ces résultats rejoignent ceux précédemment obtenus au Laboratoire par CAMPION et LEGER (résultats non publiés) sur la glycosylation de la transferrine synthétisée par des hépatocytes humains en culture primaire en présence de dexaméthasone.

Les glucocorticoïdes ne sont pas capables seuls d'induire l'augmentation de la synthèse de toutes les PPA, mais ils participent à la régulation de certains gènes exprimés par les hépatocytes (BAUER et al., 1986), ils agissent en synergie avec les cytokines dans la régulation de la synthèse des PPA (KOJ et al., 1984; BAUMANN et al., 1987). Cette même synergie semble s'exprimer dans le cas de la transferrine, dont la synthèse par les cellules HepG2 est multipliée par 3 en réponse au dexaméthasone et à l'IL-6. Cette observation va à l'encontre de la baisse de synthèse de la sérotransferrine humaine observée in vivo lors du processus de l'inflammation (KUSHNER et MACKIEWICZ, 1987), mais nous sommes probablement assez éloigné des conditions physiologiques. In vitro, les glucocorticoïdes et les cytokines semblent être les facteurs principaux responsables de la régulation de la synthèse des PPA. In vivo, l'IL-6 sécrétée par les monocytes activés, stimule indirectement la synthèse des glucocorticoïdes qui inhibent en retour la synthèse d'IL-6 au niveau des monocytes (WOLOSKI et al., 1985b) et augmentent l'effet de l'IL-6 au niveau des hépatocytes avec

notamment une stimulation de la synthèse des mRNA des récepteurs à l'IL-6 (BAUER et al., 1986).

L'utilisation simultanée de l'IL-6 et des glucocorticoïdes donnent des résultats différents sur la glycosylation de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2. Si l'addition d'IL-6 à la dexaméthasone semble activer considérablement la synthèse de la transferrine, il inhibe en même temps l'action du corticoïde sur la glycosylation de la transferrine. L'IL 6 semble contrôler l'effet des glucocorticoïdes en orientant leur action, probablement au niveau de l'expression du récepteur de l'IL-6 (CONTENT et al., 1988) au dépend de l'augmentation de l'expression de glycosyltransférases. En effet, la dexaméthasone augmente l'activité de la β -galactoside α -2,6 sialyltransférase des hépatocytes de Rat (VAN DIJK et al., 1986) et des cellules d'hépatome FAZA (HARDER et al., 1990). Cette amplification de l'activité serait due à l'augmentation de l'expression de cette enzyme par l'hépatocyte (WANG et al., 1989; 1990), mais aussi par les fibroblastes (VANDAMME et al., 1992).

La transferrine synthétisée par les cellules HepG2 possède des structures glycaniques tri-, tétra-, et pentaantennées (CAMPION et al., 1989). Il est probable que l'augmentation de la proportion des glycovariants non retenus par la Con A soit le résultat d'une augmentation de l'expression des N-acétylglucosaminyltransférases V, VI et VII responsables de l'initiation des troisièmes, quatrièmes et cinquièmes antennes.

III - CONCLUSION

L'IL-6 est le régulateur principal du processus inflammatoire in vitro, responsable de la modification de la synthèse et de la

glycosylation des protéines de la phase aiguë de l'inflammation (PPA). Nous avons étudié l'influence de l'IL-6 sur la glycosylation de la transferrine et de l' α 1-antitrypsine (AAT) synthétisées par les cellules HepG2. La transferrine dont la synthèse diminue au cours de l'inflammation est considérée par certains auteurs comme une PPA négative, alors que l'AAT est une PPA positive.

Nous avons démontré que l'IL-6 induisait une altération importante de la glycosylation de l'AAT et un doublement de la synthèse. Pour la transferrine, la modification de la glycosylation est faible, ainsi que l'augmentation de la synthèse. Dans les deux cas, la modification de la glycosylation se fait par diminution des glycovariants non retenus par la Con A. Cette faible augmentation ne fait pas de la transferrine une PPA négative dans ce cas, ce qui prouve qu'il faut redéfinir ces termes dans chaque lignée hépatocytaire, comme c'est le cas dans chaque espèce animale.

Les glucocorticoïdes ont lors du processus inflammatoire un rôle permissif ou synergique sur l'action des cytokines. Nous avons étudié l'influence de l'hydrocortisone et de la dexaméthasone sur la glycosylation de la transferrine, ainsi que sur l'action des glucocorticoïdes et de l'IL-6 vis à vis de la glycosylation de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2.

Nous avons démontré que l'addition simultanée de l'hydrocortisone ou de la dexaméthasone avec l'IL-6 ne changeait rien à la modification de la glycosylation de la transferrine due à l'interleukine. Il n'y aurait donc aucun effet synergique, mais simplement permissif. Par contre, la synthèse de la transferrine est fortement augmentée en réponse à l'IL-6 et à la dexaméthasone. L'effet des glucocorticoïdes serait donc synergique pour la synthèse de la transferrine.

Les glucocorticoïdes utilisés sans l'IL-6 induisent une importante modification de la glycosylation de la transferrine. L'altération de la glycosylation est d'une part plus importante que celle induite par l'IL-6 et, d'autre part, contrairement à l'IL-6, les glucocorticoïdes entraînent une augmentation des glycovariants non retenus par la Con A. Il existerait donc un contrôle de l'IL-6 qui abolirait l'action des glucocorticoïdes, ces derniers ayant un effet permissif sur l'action de l'IL-6.

Le contrôle du processus inflammatoire sur l'hépatocyte apparaît complexe et se définirait comme la résultante des actions inhibitrices, permissives, et synergiques des facteurs en présence, probablement des cytokines et des glucocorticoïdes.

D - CONCLUSION

La transformation cellulaire est, sans aucun doute, la cause première de la glycosylation aberrante de la transferrine et d'autres glycoprotéines synthétisées par les cellules d'hépatocarcinomes humains (ALM et ERIKSON , 1985; CARLSON et al., 1984). Les structures glycaniques polyantennées de la transferrine synthétisées par les cellules HepG2 en culture (CAMPION et al., 1989) ont été également mis en évidence au niveau de la transferrine sérique de patients atteints d'hépatocarcinome (YAMASHITA et al., 1989).

Néanmoins, nous avons démontré l'importance de la mise en culture et plus particulièrement l'importance de la composition du milieu sur la glycosylation de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2.

Nous avons également mis en évidence le caractère évolutif de la glycosylation de la transferrine sécrétée par les cellules HepG2, ainsi que la différence de modification de la glycosylation de l'AAT sécrétée par deux lignées de cellules HepG2. Le nombre de repiquages, les stress liés à la mise en culture (congélation-décongélation, isolement), sont des facteurs susceptibles d'intervenir dans l'altération des capacités fonctionnelles des cellules. Ce caractère évolutif de la cellule doit nous mettre en garde sur les comparaisons hâtives d'expériences faites sur des lignées cellulaires portant le même nom, mais dont l'identité métabolique est très problématique.

L'IL 6 est le principal facteur responsable de l'augmentation de la synthèse des PPA (HEINRICH et al., 1990), et de la modification de leur glycosylation (MACKIEWICZ et al., 1989d). L'IL 6 n'a pas d'effet significatif sur la glycosylation de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2. Les glucocorticoïdes, hydrocortisone et dexaméthasone qui agissent en synergie avec l'IL 6 (BAUMANN et al., 1987), ne changent pas la structure des glycanes de la transferrine quand ils sont utilisés avec l'IL 6. Par contre, quand ces glucocorticoïdes sont utilisés sans l'IL 6, ils possèdent un effet modificateur sur la glycosylation de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2. Il y a donc probablement un contrôle de l'action des glucocorticoïdes par l'IL6.

ETUDE DE LA MODIFICATION DES GLYCANNES DE LA TRANSFERRINE SECRETEES PAR LES HEPATOCYTES D'EMBRYON DE POULET

Nous avons vu, dans le chapitre précédent que la glycosylation de la transferrine synthétisée par les cellules d'hépatocarcinome humain en culture était modifiée. Afin de déterminer la part des modifications structurales dues à la transformation maligne des cellules, à la mise en culture des cellules et celles provoquées par l'addition de différents facteurs dans le milieu cellulaire, nous avons cherché un modèle cellulaire non transformé qui se cultive dans un milieu minimal et nous avons étudié l'impact du milieu de culture et des facteurs hormonaux sur la glycosylation de la transferrine synthétisée par ces cellules.

Les hépatocytes humains normaux sont difficiles à obtenir, ils se cultivent dans un milieu renfermant du sérum de veau foetal, ou/et des hormones et des facteurs de croissance. Ils n'ont donc pas pu être utilisés.

Par contre, les hépatocytes embryonnaires de Poulet à 16 jours d'incubation, peuvent être maintenus en culture primaire dans un milieu minimum, sans addition de sérum ou d'hormones (GRIENINGER et al., 1978; HERTZBERG et al., 1981). Dans un tel milieu, les cellules conservent la faculté de synthétiser des protéines plasmatiques (LIANG et GRIENINGER, 1981). De ce fait, elles ont été utilisées pour évaluer d'une part l'impact de l'insuline (GRIENINGER et GRANICK, 1975), et celui de sérums d'origine différentes (PLANT et al., 1981; GRIENINGER et al., 1984), sur le taux de synthèse des protéines et d'autre part, l'impact du cortisol sur la modification de la glycosylation de l'haptoglobine (DELERS et ENGLER, 1986).

Avec ce modèle, nous avons la possibilité d'étudier l'influence du milieu de culture et de la mise en culture des cellules sur la

glycosylation de la transferrine en comparant la glycosylation de la sérotransferrine synthétisée par l'embryon et celle de la transferrine synthétisée par les hépatocytes embryonnaires en culture. En outre, nous avons la possibilité de comparer les structures glycaniques de la transferrine du sérum de l'embryon avec celle du sérum de Poulet adulte.

Dans ce chapitre, nous allons donc décrire dans un premier temps, la détermination de la structure des glycanes de la transferrine du sérum de Poulet adulte (TfA), de la transferrine d'embryon de Poulet (TfE) et de la transferrine synthétisée par les hépatocytes en culture (TfHE). Dans un deuxième temps, nous allons préciser l'effet de la modification du milieu de culture et de l'addition de facteurs hormonaux sur la glycosylation de la transferrine.

A - ETUDE DES GLYCANNES DES TRANSFERRINES EMBRYONNAIRES DE POULET

Les transferrines du sérum d'embryon de Poulet, du sérum de Poulet adulte et du milieu de culture des hépatocytes d'embryon de Poulet ont été isolées par chromatographie d'immunoaffinité et la structure de leurs glycanes a été mise en évidence par l'application des techniques chimiques, de l'utilisation des lectines et de la RMN du proton.

I - ISOLEMENT DES DIFFERENTES TRANSFERRINES

L'isolement des différentes transferrines de Poulet a été réalisé par chromatographie d'affinité sur colonne d'IgG anti-transferrine de Poulet (voir Appendice technique p. 208).

1 - Transferrine du sérum adulte

Dans un premier temps nous avons utilisé des anticorps anti ovotransferrine de Poule préparés au Laboratoire. En effet, les séquences peptidiques de l'ovotransferrine et de la sérotransferrine sont identiques (WILLIAMS, 1962; THIBODEAU et al., 1978).

Le sérum de Poulet a été déposé sur une colonne d'immunoglobulines de lapin anti-ovotransferrine de Poule couplées au Sépharose 4 B (technique de couplage p. 206 de l'Appendice technique). La sérotransferrine de Poulet pure à environ 90 % a été ainsi obtenue. La purification a été totalement obtenue par une chromatographie d'échanges d'ions en système FPLC avec une colonne mono Q HR 10/10 (voir Appendice technique p. 210). Cette technique nous a permis non seulement de séparer la sérotransferrine de Poulet adulte, des contaminants, mais aussi de la fractionner en 4 variants, (Fig. 24 p. 119) le variant 0 : 1 %, le variant 1 : 22 %, le variant 2 : 75 %, et le variant 3 : 2 %. Après déssalage et concentration (Appendice technique p. 209) les différents variants ont été rechromatographiés sur la colonne mono Q HR 10/10 afin d'accroître la pureté de ces préparations. Ainsi, à partir de 24 mg de sérotransferrine de Poulet, 180 μ g de variant 0, 4,8 mg de variant 1, 16,5 mg de variant 2, et 350 μ g de variant 3 ont été obtenus. Le variant 2 majoritaire a été utilisé pour obtenir chez le lapin des anticorps anti-sérotransferrine (Appendice technique p. 219).

2 - Transferrine du sérum d'embryon

a) **Isolement**

Pour obtenir une quantité importante de sérum d'embryon à 16 jours d'incubation, nous avons effectué une perfusion intracardiaque

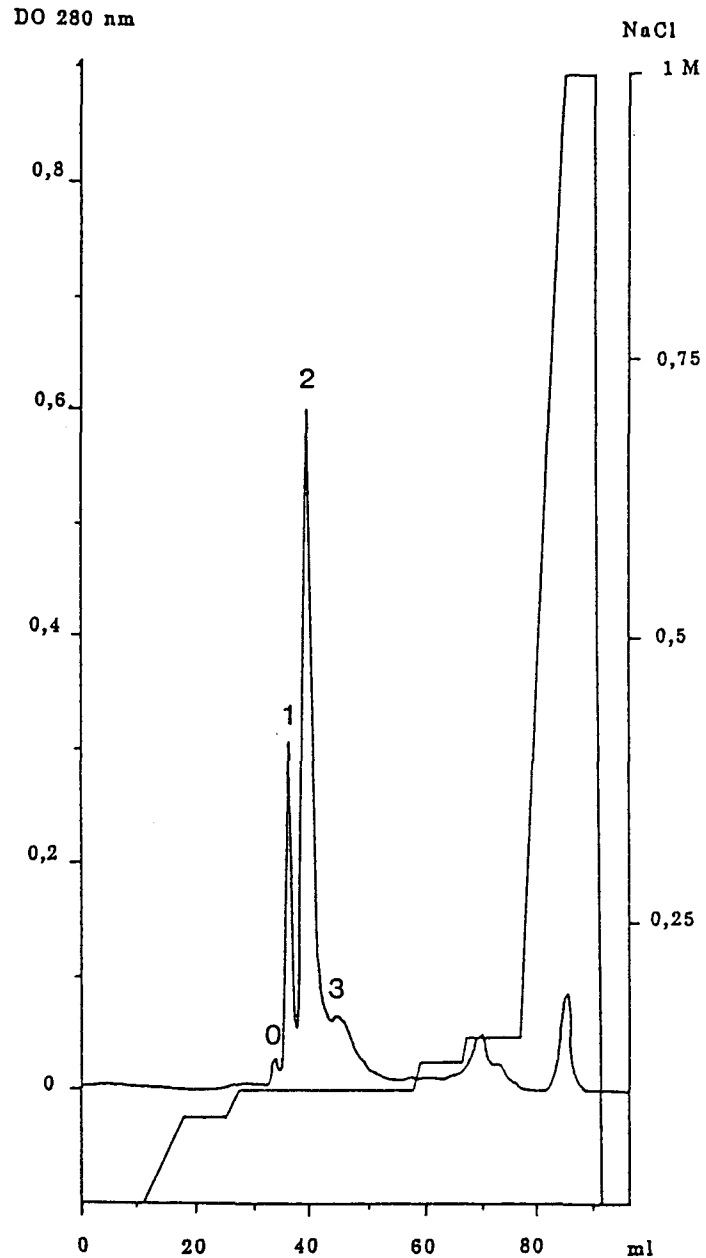


Figure 24 : Fractionnement en FPLC sur colonne mono Q HR-10/10 de la sérotransferrine de Poulet adulte isolée par chromatographie d'immunoaffinité.

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

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

Débit : 3 ml/mn

avec une solution de NaCl à 0,9 % . L'embryon, les membres sectionnés a été préalablement placé dans une boîte de Pétri où on récupère le sang dilué avec la solution saline. La perte de sang est importante, elle a lieu au moment du prélèvement de l'embryon de l'oeuf, car le système sanguin extra-embryonnaire est bien développé, et au cours des deux lavages de l'embryon dans le NaCl 0,9 % . Les lavages évitent toute contamination par le reste du blanc d'oeuf qui contient probablement encore de l'ovotransferrine. L'avantage de ce protocole est la rapidité et la facilité de sa réalisation (pour plus de détail, voir l'appendice technique p. 209).

La solution saline obtenue est centrifugée à 200 g pendant 3 mn pour éliminer les globules rouges et les impuretés avant d'être déposée sur la colonne d'IgG de lapin anti-sérotransferrine. Une trentaine d'embryons ont été traités pour obtenir 12 mg de sérotransferrine embryonnaire.

b) Fractionnement

11 mg de sérotransferrine embryonnaire isolée par chromatographie d'affinité ont été fractionnés par chromatographie d'échanges d'ions en système FPLC avec une colonne mono Q HR 10/10 en utilisant le même gradient d'élution (voir Appendice technique p. 210) que pour le fractionnement de la sérotransferrine de Poulet.

La sérotransferrine embryonnaire a été fractionnée en 3 variants (Fig. 25 p. 121). Néanmoins comme nous ne sommes pas parvenus à séparer correctement les deux premiers variants, nous avons réuni les deux premiers variants, ils constituent le pic I. Le troisième variant (pic II) s'élue difficilement de la colonne comme le témoigne la partie descendante du pic correspondante et cela même lorsque l'on augmente

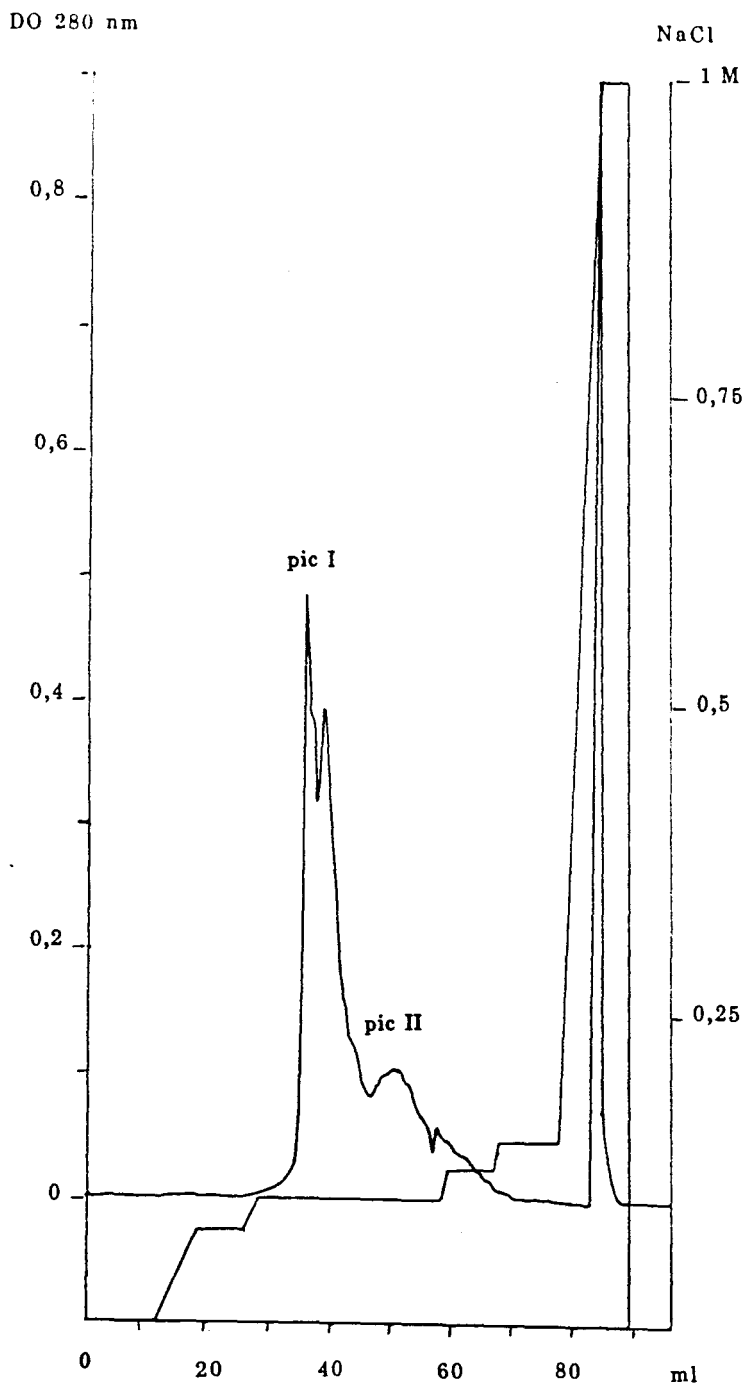


Figure 25 : Fractionnement en FPLC sur colonne mono Q HR-10/10 de la sérotransferrine d'embryon de Poulet isolée par chromatographie d'immunoaffinité.

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

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

Débit : 3 ml/mn

la concentration de NaCl. Le pic I représente 76 % et le pic II 24 %. Après dessalage et concentration (voir Appendice technique p. 209) les quantités récupérées ont été de 8 mg pour le pic I et de 2 mg pour le pic II.

3 - Transferrine sécrétée dans le milieu de culture des hépatocytes d'embryon

Les hépatocytes d'embryon sont isolés et ensemencés dans des boîtes multipuits à raison de 3,5 à 4 x 10⁶ cellules par ml de milieu et par puits de 30 mm de diamètre (Appendice technique p. 204). Le milieu utilisé est celui de Williams (composition à la fin de l'Appendice technique), il est changé toutes les 24 heures pendant 3 jours.

Le milieu de culture étant dépourvu de sérum, il est relativement peu chargé en protéines, nous avons donc fractionné la transferrine synthétisée par les hépatocytes foetaux en déposant directement le milieu sur la colonne d'échanges d'ions sans utiliser la chromatographie d'immunoaffinité.

Les milieux de 24, 48 et 72 heures sont récupérés, centrifugés pour éliminer les cellules décollées, et mis à dialyser à 4 °C dans le tampon Tris 10 mM pH 8,6. Le milieu est alors en partie concentré et déposé sur une colonne mono Q HR 10/10 en système FPLC (Fig. 26 p. 123). Le contenu des différents pics obtenus est soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide (10-15 %) sans dénaturants et, est transféré sur membrane de nitrocellulose. Une révélation avec les anticorps anti-sérotransferrine de Poulet montre que la transferrine synthétisée par les hépatocytes en culture primaire comprend deux variants (Fig. 27 p. 124), le variant 1 représenté par le pic 1 (70 %), et le variant 2 représenté par le pic 2 (30 %). 600 ml de milieu sont

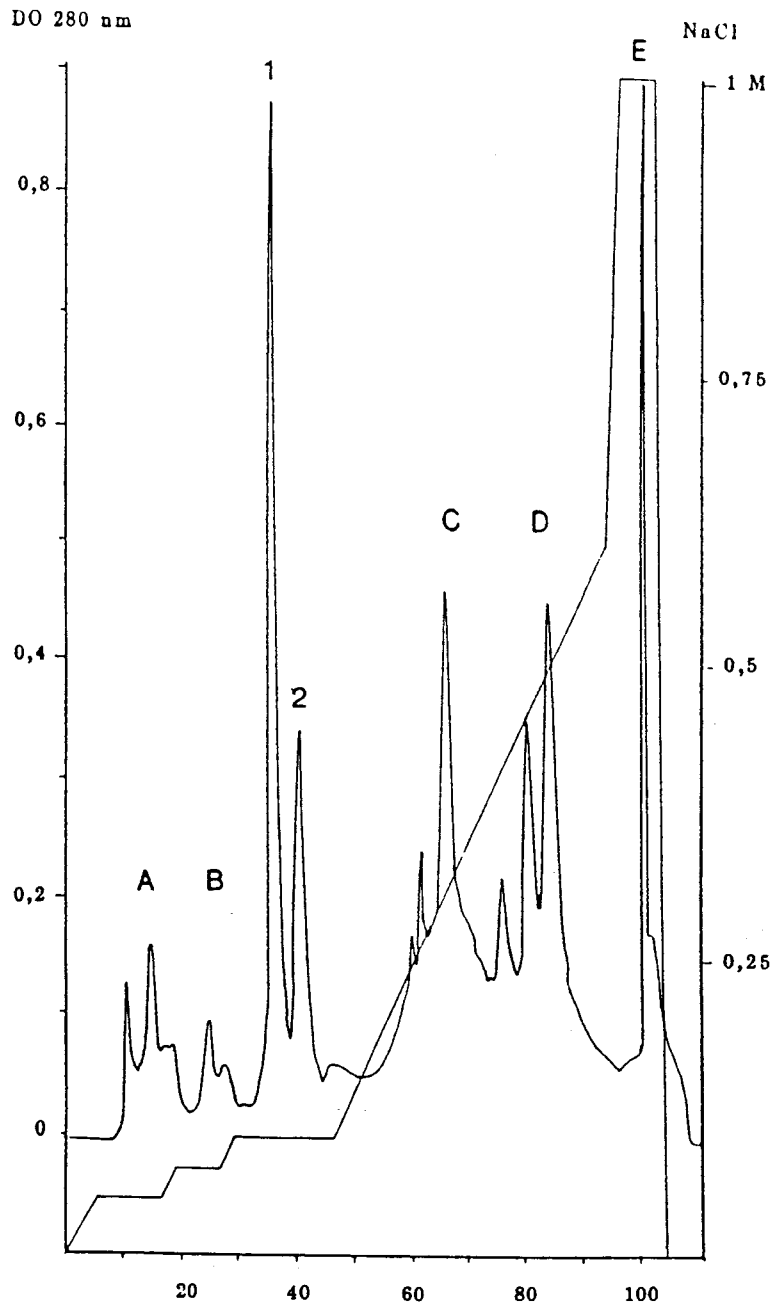


Figure 26 : Fractionnement du milieu de culture des hépatocytes embryonnaires de Poulet en FPLC sur colonne mono Q HR-10/10.

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

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

Débit : 3 ml/min

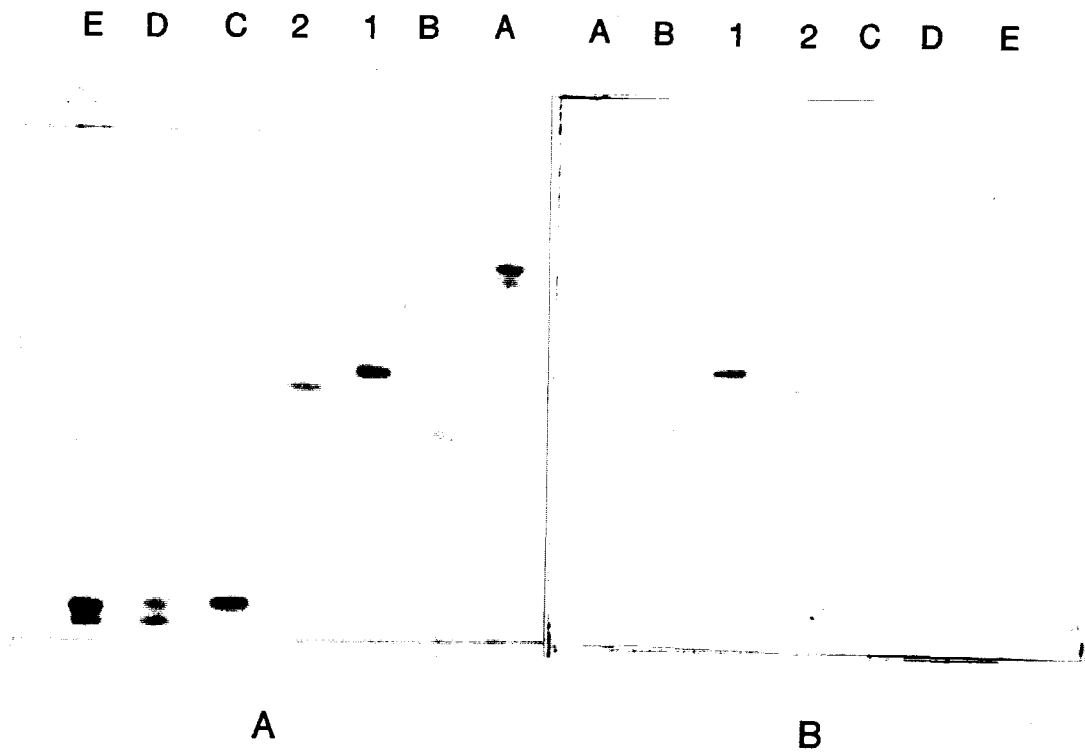


Figure 27 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide en gradient 10-15 % sans dénaturants, des différents pics obtenus après chromatographie d'échange d'ions du milieu de culture des hépatocytes embryonnaires.

- _ A : Révélation du gel par le bleu de Coomassie.
- _ B : Révélation immunologique sur membrane de nitrocellulose, après transfert des protéines par des anticorps anti-sérotransferrine de Poulet.

chromatographiés sur une colonne mono Q HR 10/10 pour obtenir après refractionnement des variants isolés 11,5 mg de variant 1 et 5 mg de variant 2.

II - DOSAGE DES TRANSFERRINES DE POULET

1 - Dosage des transferrines sériques

Disposant d'anticorps anti-sérotransferrine de Poulet, nous avons pu effectuer un dosage radio-immunologique (RIA) (voir Appendice technique p. 220) de la sérotransferrine de Poulet adulte et de la sérotransferrine embryonnaire. Le variant 2 de la sérotransferrine de Poulet adulte marqué à l'iode 125 sert d'antigène compétitif.

Après ponction cardiaque, le sang d'embryon de Poulet à 16 jours d'incubation est conservé à 4°C jusqu'à formation d'un caillot. Le sérum est alors récupéré pour le dosage de la sérotransferrine embryonnaire.

La concentration en transferrine du sérum d'un embryon à 16 jours d'incubation est de $350 \pm 5 \mu\text{g/ml}$, elle est environ 5 fois moins élevée que celle d'un adulte: $1890 \pm 100 \mu\text{g/ml}$ (Tableau X p. 126). Toutefois si chez l'adulte, le foie est l'organe où s'effectue la plus grande partie de la synthèse de la transferrine sérique, chez l'embryon la vésicule vitelline représente dans les premiers stades embryonnaires un organe de synthèse protéique important. Dès les premiers stades embryonnaires, la transferrine est nécessaire à la différenciation et à la multiplication des cellules (BARNES et SATO, 1980; II et al., 1982; EKBLÖM et al., 1983; EKBLÖM et THESLEFF, 1985) et l'organogenèse du foie se terminant au quatrième jour, c'est la vésicule vitelline qui assure la synthèse de la transferrine lors des premiers stades embryonnaires.

TABLEAU X : Concentrations des transferrines sériques de Poulet et de la transferrine du milieu de culture synthétisée par les hépatocytes foetaux en culture primaire.

Transferrine	Tf	TfE	TfHE		
	en µg/ml		en µg/ml/10 ⁶ cellules		
Origine	Sérum	Sérum	Milieu de culture		
			24h	48h	72h
	1890 ± 100	350 ± 5	7,8 ± 0,8	11,7 ± 0,8	7,5 ± 0,5

Tf : Sérotransferrine de Poulet.

TfE : Sérotransferrine d'embryon de Poulet à 16 jours d'incubation.

TfHE : Transferrine synthétisée par les hépatocytes foetaux de Poulet, à 16 jours d'incubation, en culture primaire.

Au fur et à mesure de l'évolution de l'embryon, la synthèse de la transferrine se fait par les hépatocytes, avec parallèlement une baisse de cette synthèse par la vésicule vitelline. Au stade 16 jours d'incubation, nous n'avons pas de données concernant la synthèse de la transferrine par la vésicule vitelline. De plus, la transferrine synthétisée avant le stade 16 jours par la vésicule vitelline et par le foie peut-être encore présente dans le sérum de l'embryon car la clairance de la transferrine est assez lente.

Il est donc probable que, dans le sang de l'embryon à 16 jours d'incubation, la transferrine ne soit pas uniquement d'origine hépatique. Cette transferrine pourra de ce fait être hétérogène car synthétisée par des cellules différentes (les cellules de la vésicule vitelline et les cellules parenchymateuses ont néanmoins toutes deux une origine endodermique), et à un stade embryonnaire donné.

2 - Dosage de la transferrine sécrétée dans le milieu de culture des hépatocytes d'embryon de Poulet

Nous avons dosé la transferrine synthétisée par les hépatocytes foetaux à 24, 48, et 72 heures de culture par dosage radio-immunologique (RIA) en utilisant le variant 2 de la sérotransferrine de Poulet marqué à l'iode 125 comme antigène compétitif (Tableau X p. 126).

Le maximum de synthèse se situe à 48 heures de culture. Les hépatocytes ne se multiplient pas dans un milieu minimum (PLANT et al., 1981), Après avoir adhéré au substrat, les cellules ont repris la synthèse des protéines dont celle de la transferrine qui atteint son maximum pendant le deuxième jour pour décliner ensuite. Après 72 heures de culture, il n'est pas rare que la plupart des cellules se décolent et meurent.

III - MISE EN EVIDENCE DE LA MICROHETEROGENEITE DES DIFFERENTES TRANSFERRINES DE POULET

1 - Composition molaire en monosaccharides des différentes transferrines

Les compositions molaires en monosaccharides des glycanes des différentes transferrines isolées par chromatographie d'immunoaffinité sont déterminées par chromatographie en phase gazeuse. Les 3 glycoprotéines subissent une méthanolyse suivie d'une triméthylsilylation. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XI page 129.

On observe une différence de glycosylation entre la transferrine embryonnaire et celle synthétisée par les hépatocytes foetaux en culture avec notamment pour la sérotransferrine embryonnaire l'absence de résidus fucose, une très faible proportion d'acide sialique (0,23), une faible quantité de résidus galactose (0,85) et la présence de 5 résidus de N-acétylglucosamine (GlcNAc) ce qui laisse supposer l'existence d'une troisième antenne ou l'existence d'une GlcNAc intercalaire.

Les rapports molaires de la sérotransferrine de Poulet et de la transferrine synthétisée par les hépatocytes foetaux diffèrent essentiellement par un taux de fucosylation plus important.

2 - Séparation des glycovariants par électrophorèse en gel de polyacrylamide sans agents dénaturants

Les différentes transferrines de Poulet sont soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide en gradient 10-15 % sans agents dénaturants (Appendice technique p. 217) (Fig. 28 p. 130).

TABLEAU XI : Détermination des rapports molaires en monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse des différentes transferrines de Poulet.

Monosaccharides	Fuc	Gal	Man	GlcNAc	Neu5Ac
			*		
Transferrines					
Tf	0,16	2,04	3,00	4,03	1,75
TfE	/	0,85	3,00	5,04	0,23
TfHE	0,85	2,00	3,00	3,90	1,23

* : Les rapports molaires sont calculés sur la base de 3 résidus mannoses.

Tf : Transferrine du sérum de Poulet.

TfE : Transferrine du sérum d'embryon de Poulet à 16 jours d'incubation.

TfHE : Transferrine synthétisée par les hépatocytes foetaux, à 16 jours d'incubation, en culture primaire.

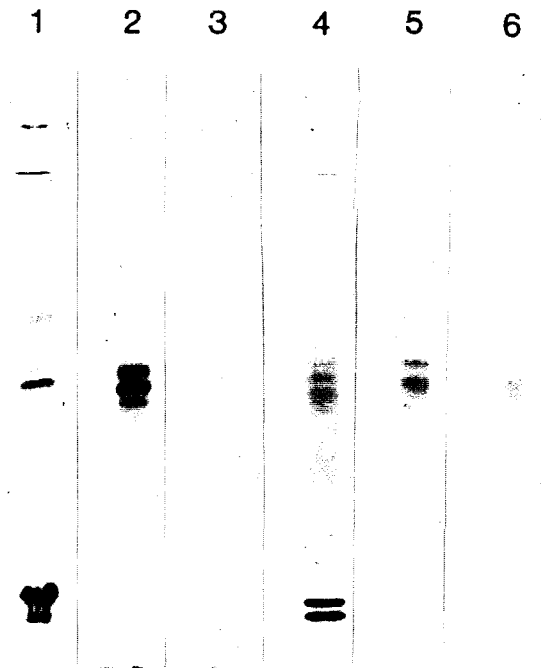


Figure 28 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide des différentes transferrines de Poulet en gradient 10-15 % sans agents dénaturants. Révélation au bleu de Coomassie.

1 : Sérums de Poulet

2 : Sérotransferrine de Poulet

3 : Milieu de culture des hépatocytes embryonnaires de Poulet

4 : Sérums d'embryon de Poulet

5 : Pic I de la sérotransferrine d'embryon de Poulet

6 : Pic II de la sérotransferrine d'embryon de Poulet

Les variants 1 de la sérotransferrine de Poulet et de la transferrine synthétisée par les hépatocytes foetaux migrent au même endroit, il en est de même pour les variants 2 des transferrines précédemment citées. Ces différentes transferrines possèderaient donc la même charge électronégative. Il y a en plus chez le Poulet, deux autres variants qui existent en très faibles proportions (variants 0, et 3).

Les comportements électrophorétiques de la sérotransferrine embryonnaire et de la transferrine synthétisée par les hépatocytes foetaux en culture sont très différents. La sérotransferrine embryonnaire présente 3 variants d'intensité apparemment similaire. La bande supérieure (celle qui migre le moins) migrerait comme le variant 0 de la sérotransferrine de Poulet, les deux autres bandes qui ont la même migration que les variants 1 et 2 de la sérotransferrine de Poulet ou que les variants 1 et 2 de la transferrine synthétisés par les hépatocytes foetaux.

L'ombrage au niveau des bandes de la sérotransferrine embryonnaire traduit une certaine insolubilité de cette glycoprotéine que nous avons remarqué lors de centrifugations par la présence d'un culot. L'élution difficile du pic II en chromatographie d'échanges d'ions pourrait être la conséquence de cette insolubilité.

IV - ETUDE DE LA STRUCTURE DES GLYCANNES DES DIFFERENTES TRANSFERRINES

1 - Libération des glycanes par hydrazinolyse

L'hydrazinolyse, selon la méthode de READING et al., (1978), est décrite page 215 de l'appendice technique. 4,5 mg du variant 1, et 5 mg du variant 2 de la sérotransferrine de Poulet sont hydrazinolysés.

Le rendement global de la réaction en tenant compte des différents déssalages qui occasionnent une perte de produits, est estimé à environ 50 %. Ainsi environ 65 μg d'oligosaccharides alditols du variant 1 et environ 70 μg du variant 2 seront récupérés. Les variants 0 et 3 en trop faible quantité pour procéder à une libération des glycanes, ont été réservés pour une étude de l'interaction glycoprotéine-lectine (voir p. 140).

8 mg du pic I de la sérotransferrine embryonnaire sont hydrazinolysés, et environ 120 μg d'oligosaccharides alditols sont obtenus.

Enfin, 11 mg du variant 1 et 4,5 mg du variant 2 de la transferrine synthétisée par les hépatocytes foetaux sont également hydrazinolysés, permettant d'obtenir respectivement 180 μg et 67 μg d'oligosaccharides alditols.

2 - Analyse des oligosaccharide-alditols par résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton à 400 MHz

a) **Transferrine de Poulet**

L'interprétation des spectres RMN du proton à 400 MHz (Fig. 29 p. 133) permet d'établir les structures glycaniques des variants 1 et 2. Il s'agit de glycanes de type N-acétyllactosaminique biantennés (Fig. 30 p. 134) comme le montrent les déplacements chimiques des protons H-2 des mannoses 3, 4 et 4' (respectivement : 4,255, 4,193 et 4,117 ppm).

Le glycanne du variant 1 est sialylé, en effet, les valeurs de 1,716 ppm (H-3ax) et de 2,669 ppm (H-3eq) nous le témoignent. L'acide N-acétylneuraminique est lié en α -2,6 sur le galactose 6 qui résonnent à 4,445 ppm, tandis que le galactose 6' n'est pas substitué, comme le

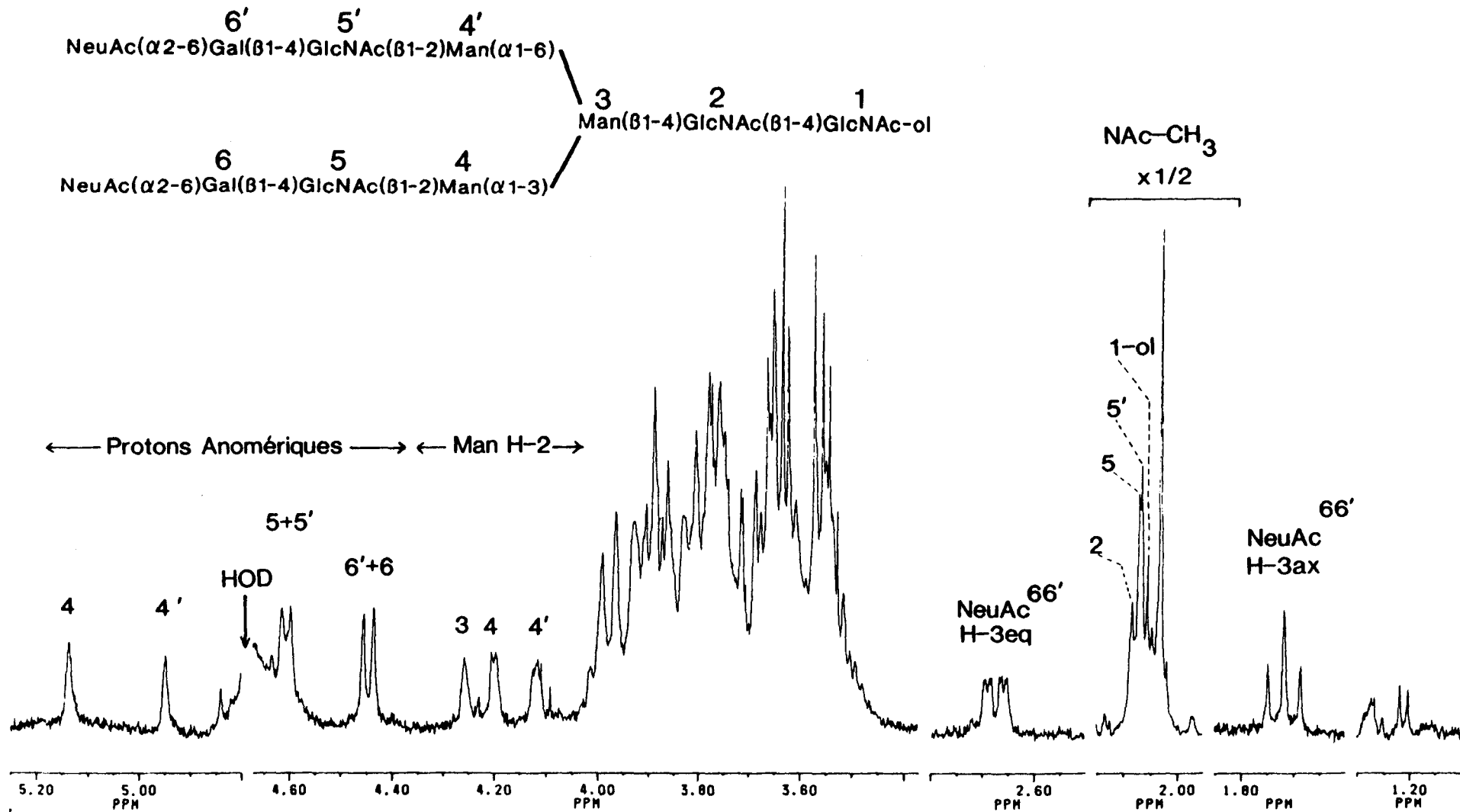
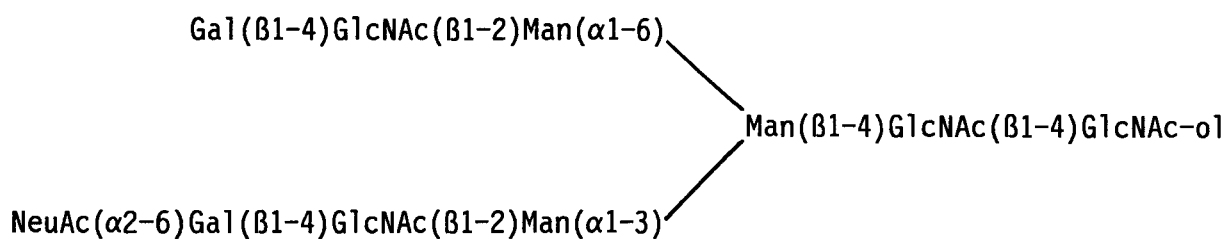


Figure 29 : Spectre de résonance magnétique nucléaire à 400 MHz des oligosaccharides-alditols du variant 2 de la sérotransferrine de Poulet adulte.

TfA1: 22 %



TfA2: 75 %

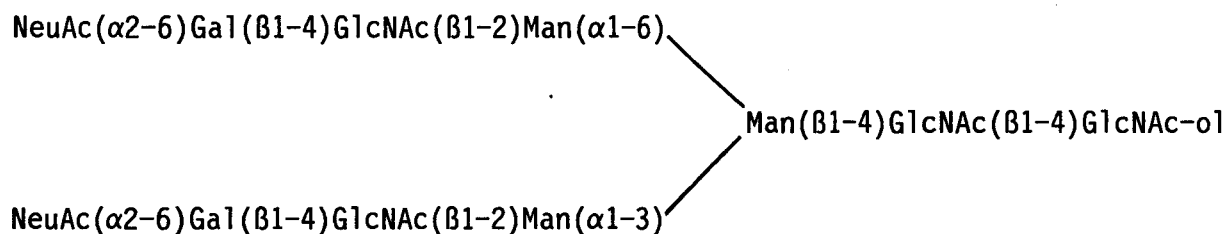


Figure 30 : Structures glycaniques des variants 1 (TfA1) et 2 (TfA2) de la sérotransferrine de Poulet adulte déterminées par RMN du proton à 400 MHz

montrent les déplacements chimiques des résonances du proton H-1 du mannose 4' (4,928 ppm), du proton H-1 de la N-acétylglucosamine 5' (4,581 ppm) et du CH₃ de l'acétamido de la N-acétylglucosamine 5' (2,047). Le variant 1 est donc monosialylé.

Le variant 2 présente un spectre RMN du proton à 400 MHz analogue à celui du variant 1. Il montre toutefois des déplacements chimiques différents pour le proton H-2 du galactose 6' (4,446 ppm), du proton H-1 du mannose 4' (4,948 ppm), du proton H-1 de la N-acétylglucosamine 5' (2,065 ppm), ce qui témoignent d'une substitution en α -2,6 du galactose 6' par un acide N-acétylneuraminique. Le variant 2 est donc bisialylé.

b) Transferrine du sérum d'embryon

L'analyse du spectre RMN du proton à 400 MHz (Fig. 31 p. 136) des variants du pic I ne permet pas d'établir la structure complète du glycanne de ces variants. Cependant, nous pouvons confirmer l'absence de résidus fucose, et d'acide sialique. On a également la présence d'un résidu N-acétylglucosamine en position intercalaire comme le témoigne le pic de résonance du proton H-1 de la N-acétylglucosamine 9 (4,464 ppm). Avec les différents renseignements obtenus par l'analyse du spectre RMN et la composition en monosaccharides, nous pouvons suggérer la structure glycanne hypothétique qui est représentée dans la figure 32 p. 137.

c) Transferrine synthétisée par les hépatocytes embryonnaires en culture

L'analyse du spectre RMN du proton à 400 MHz du variant 1 démontre la présence d'une structure biantennée de type

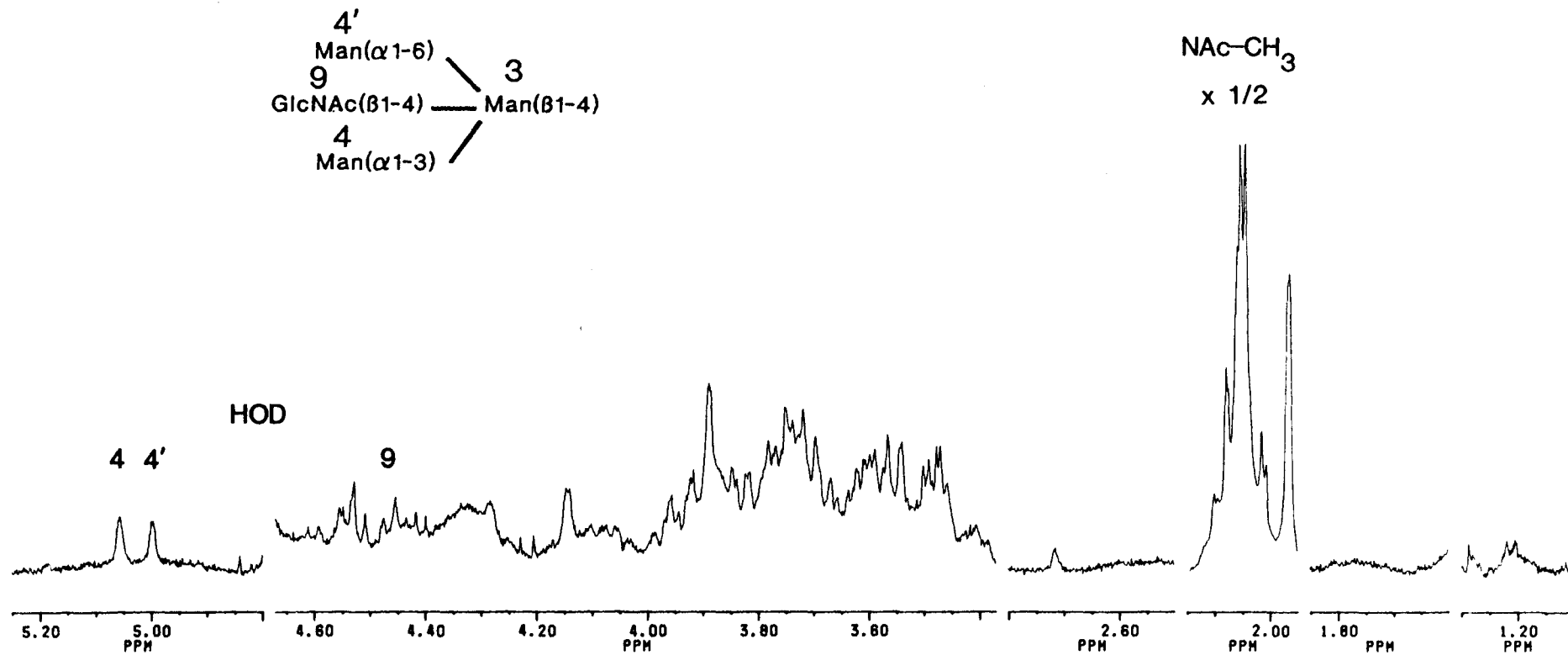


Figure 31 : Spectre de résonance magnétique nucléaire à 400 MHz des oligosaccharides alditols du pic I de la sérotransferrine d'embryon de Poulet à 16 jours d'incubation.

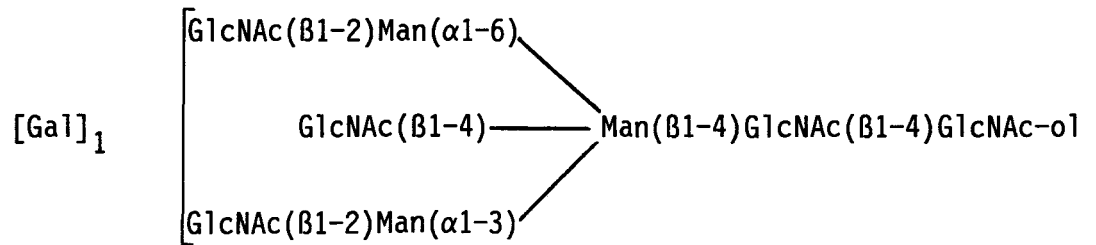
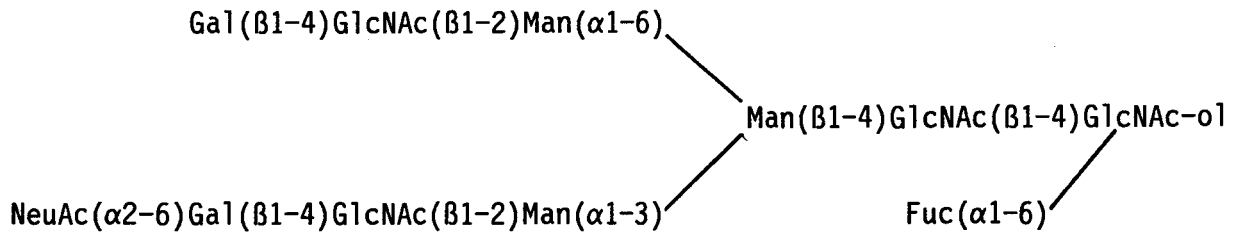


Figure 32 : Structure glycanique possible des variants du pic I de la sérotransferrine embryonnaire.

TfHE1: 70 %



TfHE2: 30 %

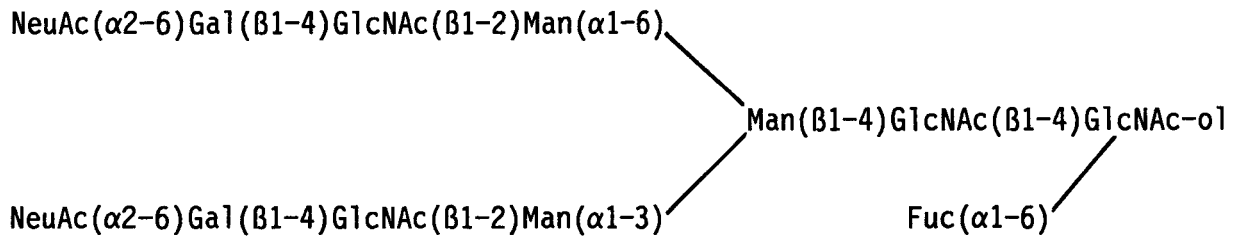


Figure 33 : Structures glycaniques déterminées par RMN du proton à 400 MHz des variants 1 et 2, de la transferrine synthétisée par les hépatocytes embryonnaires.

N-acétyllactosaminique. En effet, les déplacements chimiques des protons H-2 des mannoses 3, 4 et 4' (respectivement 4,256 ppm, 4,196 ppm, et 4,112 ppm) sont en faveur de ce type de structure. De plus, les valeurs de 1,716 ppm (H-3ax) et de 2,670 ppm (H-3éq) nous montre que le variant 1 est sialylé. L'acide N-acétylneuraminique est lié en α -2,6 sur le galactose 6 qui résonnent à 4,443 ppm, tandis que le galactose 6' n'est pas substitué, comme le témoignent les déplacements chimiques des résonance du proton H-2 du galactose 6' (4,472 ppm), du proton H-1 du mannose 4' (4,928 ppm), du proton H-1 de la N-acétylglucosamine 5' (4,582 ppm) et du CH₃ de l'acétamido de la N-acétylglucosamine 5' (2,048 ppm). Par ailleurs, la présence de protons anomériques résonants à 4,895 ppm, ainsi qu'un groupement méthyl résonant à 1,224 ppm sont représentatifs de l'existence d'un résidu de fucose. Le déplacement chimique du CH₃ de l'acétamido de la N-acétylglucosamine 2 (2,084 ppm) montre l'influence de l'attachement du fucose à la glucosamine du point d'attache. Il existe également un pic de résonance plus important à 2,076 ppm du CH₃ de l'acétamido de la N-acétylglucosamine 2 qui montre que la fucosylation du glycanne n'est pas totale (20 %).

L'interprétation du spectre du variant 2 (Fig. 34 p. 139) de la transferrine synthétisée par les hépatocytes foetaux en culture montre une grande analogie avec celui du variant 1 avec en plus une substitution du galactose 6' par un résidu d'acide N-acétylneuraminique comme le témoigne la résonance du proton H-1 du galactose 6': 4,445 ppm. Le glycanne du variant 2 est donc de type N-acétyllactosaminique bisialylé et partiellement fucosylé.

Les structures glycaniques des variants 1 et 2 déterminées par l'interprétation des spectres RMN du proton à 400 MHz sont représentées dans la figure 33 page 137.

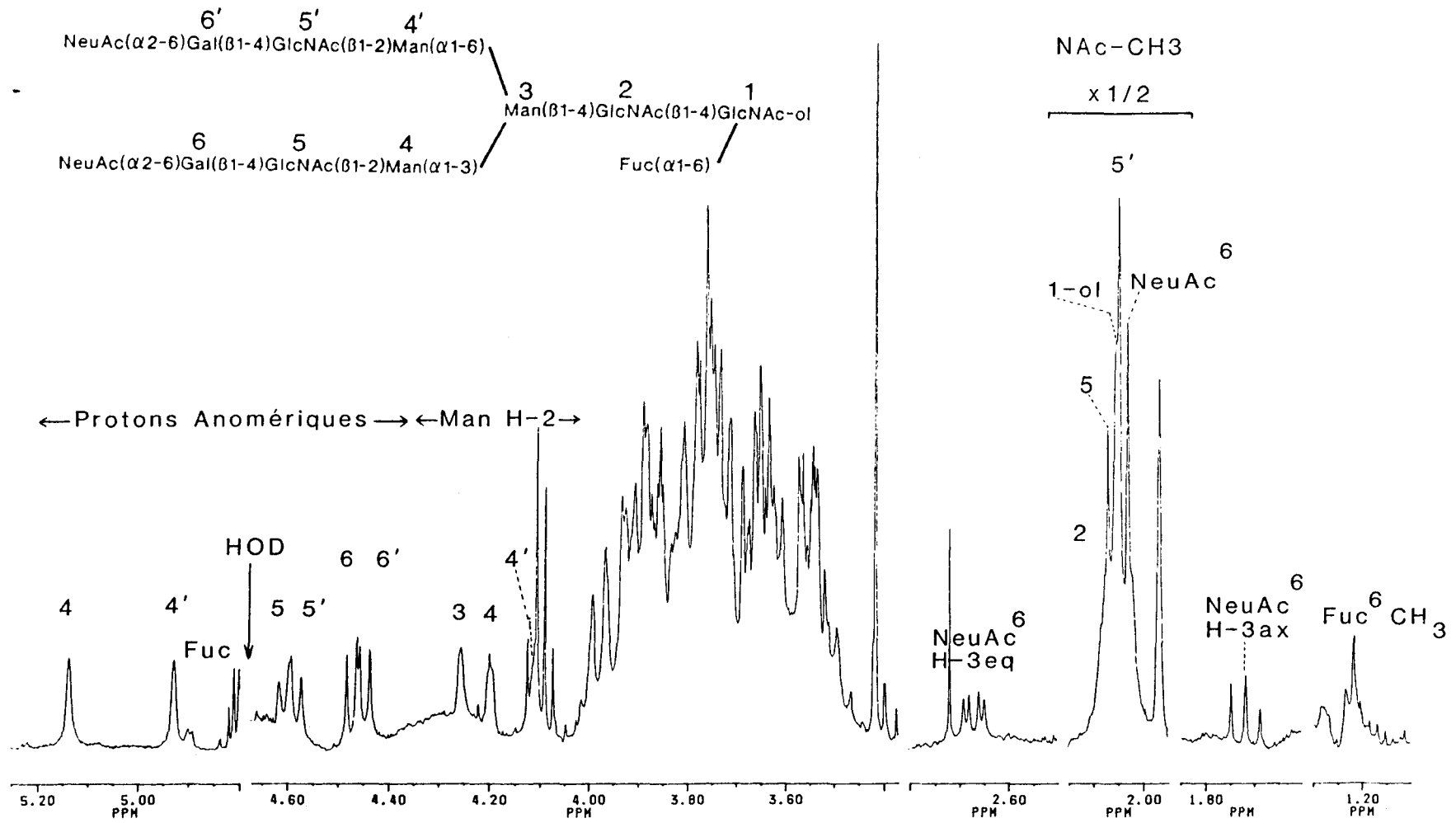


Figure 34 : Spectre de résonance magnétique à 400 MHz des oligosaccharides alditols du variant 2 de la transferrine synthétisé par les hépatocytes foetaux en culture.

3 - Etude lectinique des glycanes des transferrines

Afin d'obtenir des renseignements complémentaires sur la structure des glycanes des variants du pic I et II de la sérotransferrine embryonnaire et des variants 0 et 3 de la sérotransferrine de Poulet, nous avons étudié l'affinité de leurs glycanes vis-à-vis de différentes lectines.

Les différentes transferrines sont fractionnées par électrophorèse en gel de polyacrylamide sans dénaturants, et transferrées sur une membrane de nitrocellulose qui est incubée avec différentes lectines (voir Appendice technique p. 224).

Les résultats donnés dans le tableau XI page 141 confirment les structures déjà définies par RMN du proton à 400 MHz. Le variant 0 de la sérotransferrine de Poulet est reconnu par la Con A. Il n'est pas reconnu par la lectine de Sambucus nigra (SNA), montrant ainsi une absence d'acide sialique branché en α -2,6, (SHIBUYA et al., 1987). Par contre, ce variant présente une affinité pour la lectine de Datura stramonium (DSA), qui reconnaît les résidus galactose liés en β -1,4 sur un résidu de GlcNAc, (CROWLEY et al., 1984). D'après les résultats obtenus il est possible de supposer que le glycanne du variant 0 possède une structure de type N-acétyllactosaminique biantennée et asialylée.

Le variant 3 de la sérotransferrine de Poulet est reconnu par la Con A et par la lectine de Sambucus nigra, mais n'est pas reconnu par la lectine de Datura stramonium. Sa migration électrophorétique en gel d'acrylamide sans dénaturants est différente de celle du variant 2, il posséderait donc une charge négative plus importante, qui pourrait être due soit à un résidu d'acide sialique, soit à une sulfatation ou une phosphorylation. Le variant 3 n'est pas reconnu par la lectine de

TABLEAU XI : Etude de l'affinité des différentes transferrines de Poulet avec différentes lectines

Lectines	Tf				TfHE		TfE		OTf
	0	1	2	3	1	2	I	II	
Con A	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SNA	-	+	+	+	+	+	-	-	-
MAA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DSA	+	-	-	-	-	-	+	+	+

Les transferrines de Poulet sont transférées sur membrane de nitrocellulose après électrophorèse sans SDS en gel d'acrylamide (10-15 %). Puis la nitrocellulose est incubée avec les différentes lectines : Con A (Concanavaline A), SNA (Sambucus nigra agglutinin), MAA (Maackia amurensis agglutinin), et DSA (Datura stramonium agglutinin).

Tf : Sérotransferrine de Poulet

TfHE : Transferrine synthétisée par les hépatocytes foetaux en culture.

TfE : Sérotransferrine embryonnaire

OTf : Ovotransferrine de Poule (Sigma)

Maackia amurensis (MAA), indiquant qu'il ne possède pas de résidus d'acide sialique liés en α -2,3 sur un résidu galactose, (WANG et CUMMINGS, 1988). L'ensemble des résultats obtenus sont en faveur d'une structure de type N-acétyllactosaminique biantennée au moins disialylée.

Le pic I et le pic II de la sérotransferrine embryonnaire ne sont pas reconnus par la Con A, la présence d'une N-acétylglucosamine intercalaire comme l'a montré le spectre RMN du proton à 400 MHz du pic I pourrait expliquer l'absence de la reconnaissance. Ni la lectine de Sambucus nigra, ni la lectine de Maackia amurensis ne reconnaissent les variants de la sérotransferrine embryonnaire, il n'y aurait donc pas de résidus d'acide sialique liés en α -2,6, ou en α -2,3. Une méthanolyse effectuée sur le variant du pic II montre la présence de 0,2 résidu galactose; 5,8 résidus de N-acétylglucosamine pour 3 résidus de mannose. Cette analyse confirme l'absence de résidus d'acide sialique et suggère une structure oligosaccharidique tétraantennée ou triantennée avec un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire. Le faible taux de galactose au niveau du pic II suggère que les résidus galactose trouvés par méthanolyse dans la sérotransferrine embryonnaire (0,8) soient présents essentiellement sur le ou les variants du pic I.

V - DISCUSSION ET CONCLUSION

Les structures glycaniques des variants 1 et 2 de la sérotransferrine de Poulet, que nous avons définies par analyse des oligosaccharide-alditols correspondant en RMN du proton à 400 MHz, correspondent à celles décrites par CODDEVILLE, (1986), mais les proportions des variants trouvés sont différents de ceux précédemment décrits. De plus, ces auteurs décrivent 21 % de structures triantennées que nous n'avons pas trouvées. La méthode de purification utilisée par

CODDEVILLE peut expliquer l'origine des variants triantennés. En effet, après précipitation au rivanol et au sulfate d'ammonium du sérum de Poulet, la sérotransferrine a été purifiée par chromatographie d'échange d'ions sur colonne DEAE-Sephadex. Or, LEGER, (1987) qui a purifié la sérotransferrine de Lapin, a souligné la difficulté de se débarrasser de l'hémopexine et a montré que la présence de glycanes triantennés dans la fraction contenant la sérotransferrine était due à des traces d'hémopexine.

Nos résultats sont en accord avec II et al., (1982), qui fractionnent la sérotransferrine de Poulet adulte en deux variants monosialylés et disialylés.

Une méthode d'isolement plus rapide et plus fine, la chromatographie d'immunoaffinité nous a permis d'isoler deux autres variants très minoritaires. La structure glycanique du variant 0 serait de type biantenné non sialylé, celle du variant 3 serait de type biantenné possédant au moins 2 résidus d'acide sialique.

Pour la sérotransferrine embryonnaire, nous possédons plusieurs renseignements qui nous permettent de suggérer plusieurs structures glycaniques. Les variants du pic I auraient une structure de type biantenné avec un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire, et un résidu de galactose. Le variant du pic II aurait une structure glycanique de type tétraantenné dont les antennes n'auraient que des résidus de N-acétylglucosamine ou une structure triantennée avec un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire. II et al., (1982), ont isolé une transferrine à partir d'un extrait total d'embryon de Poulet à 12 jours d'incubation et ont fractionné cette transferrine en trois variants glycaniques, i: structure asialylée, ii : structure monosialylée, et iii : structure disialylée dans les proportions suivantes 27: 53: 20.

Il est probable qu'au stade 12 jours, la glycosylation de la transferrine sérique soit différente de celle isolée au stade 16 jours. De plus, l'origine de la transferrine isolée d'un extrait embryonnaire total est très hétérogène. En effet, en plus de la synthèse par le foie et la vésicule vitelline qui doit être plus importante à 12 jours qu'à 16 jours d'incubation, d'autres lieux de synthèse et de stockage ont été mis en évidence. Les oligodendrocytes synthétisent et stockent la transferrine (BLOCH et al., 1985), il en est de même pour les cellules nerveuses embryonnaires de la moelle épinière (STAMATOS et al., 1983), et pour les fibres musculaires embryonnaires où l'expression du gène de la transferrine a été démontrée (LEVIN et al., 1984). Il est probable que la synthèse de la transferrine par ces cellules embryonnaires ne soit pas négligeable étant donné le besoin en fer pour la différenciation (EKBLUM et THESLEFF, 1985) et la multiplication de ces cellules (BARNES et SATO, 1980). De plus, le jaune d'oeuf contiendrait une certaine quantité de transferrine synthétisée par le foie de la Poule (WILLIAM et al., 1962) et l'embryon prélevé de l'oeuf pour constituer l'extrait embryonnaire, possède dans son intestin moyen une fraction du jaune de l'oeuf. En effet, le jaune de l'oeuf, qui constitue une réserve alimentaire pour l'embryon, pénètre dans l'intestin moyen relié à la vésicule vitelline par le cordon vitellin.

Néanmoins, on peut affirmer que la transferrine synthétisée par les hépatocytes embryonnaires en culture primaire possède une glycosylation différente de celle du sérum au même stade, même si l'origine de la transferrine sérique n'est pas à 100 % hépatique.

La modification de l'environnement, le stress de l'isolement et la mise en culture ont sur la cellule des effets encore mal connus. RONIN et al., (1986), ont décrit une altération de la glycosylation de la thyroglobuline synthétisée par des cellules de follicule thyroïdien

cultivées dans un milieu sans sérum. Ce changement de glycosylation se traduit par une diminution des glycanes de type oligomannosidique, N-acétyllactosaminique biantenné et une augmentation des structures triantennées existantes. Mais aussi par l'apparition de structures tétraantennées. Il apparaît donc évident que l'isolement des cellules de leur environnement in vivo et une mise en culture de ces cellules entraînent une modification de la glycosylation de certaines glycoprotéines.

CONCLUSION

L'étude de la structure glycanique des différentes transferrines, sérotransferrine de Poulet, sérotransferrine embryonnaire et transferrine synthétisée par les hépatocytes foetaux en culture, nous a permis de démontrer le rôle de la culture cellulaire sur la modification de la glycosylation de la transferrine synthétisée par les hépatocytes embryonnaires. Cette modification se traduit par une activation de l' α -2,6 sialyltransférase, de l' α -1,6 fucosyltransférase et de la β -1,4 galactosyltransférase. Les facteurs responsables de cette altération peuvent être l'absence ou la présence d'un composant du milieu, mais également l'isolement des cellules qui rompt pendant un temps toutes les communications intercellulaires. De plus, pendant la culture, la cellule est déconnectée de l'environnement hormonal particulier à l'embryogenèse.

La régulation de la glycosylation diffère entre le stade embryonnaire et le stade adulte comme nous l'avons démontré avec la structure des glycanes de la sérotransferrine embryonnaire et celle de la sérotransferrine de Poulet. L'embryogenèse est caractérisée par une

diminution de la sialylation, de la galactosylation et une activation de la N-acétylglucosaminyltransférase III. En outre, il est fort probable que la glycosylation de la transferrine varie cours des différents stades embryonnaires.

B - ETUDE DE L'INFLUENCE DE FACTEURS SUR LA GLYCOSYLATION DE LA TRANSFERRINE SYNTHETISEE PAR LES HEPATOCYTES EMBRYONNAIRES DE POULET

Notre système in vitro étant parfaitement défini, nous pouvons étudier l'influence de milieux de culture ainsi que celle de différentes hormones ajoutées dans le milieu de culture, sur la glycosylation de la transferrine synthétisée par les hépatocytes embryonnaires en culture primaire.

I - METHODE DE MISE EN EVIDENCE DE LA MODIFICATION DE LA GLYCOSYLATION

1 - Affino-immunoelectrophorèse (AIE)

L'AIE en présence de lectine est une méthode semi-quantitative qui permet d'évaluer la proportion des variants glycaniques soumis à une électrophorèse en gel d'agarose et séparés selon l'affinité pour la lectine.

La Con A permet de séparer les 3 variants glycaniques de la sérotransferrine humaine. Par contre, la Con A ne permet pas la séparation des 2 variants glycaniques de la transferrine synthétisée

par les hépatocytes embryonnaires de Poulet, puisque les structures glycaniques de ces variants qui ont été déterminées précédemment (Fig. 33 p. 137) sont reconnues par cette lectine et restent au trait de départ. L'évaluation de la variation de la proportion de ces deux variants est donc difficile à réaliser. De plus, l'AIE n'est efficace que si les variants glycaniques possèdent une mobilité électrophorétique assez grande pour qu'en présence de lectine, le variant retenu (ne migrant pas) se distingue du variant non retenu (migrant). Le pH du tampon d'électrophorèse est de 8,6, ce qui permet une ionisation négative de la plupart des protéines plasmatiques. Dans ce tampon, la transferrine synthétisée par les hépatocytes foetaux en culture migre très peu en électrophorèse en gel d'agarose, donc en présence d'une lectine, un variant retenu ne se distinguerait pas ou très peu d'un variant non retenu et ne permettrait pas une évaluation correcte. La hausse du pH pour augmenter l'ionisation de la molécule devient incompatible avec le pH d'activité de la Con A. La prolongation du temps d'électrophorèse entraîne un assèchement du gel d'agarose par évaporation excessive du tampon.

Nous avons donc cherché une autre méthode permettant une meilleure approche de la mise en évidence de la modification de la glycosylation de la transferrine synthétisée par les hépatocytes foetaux en culture.

2 - Autre technique

Pour mettre en évidence la variation de la glycosylation, nous avons modifié le mode de séparation des variants glycaniques de la transferrine et utilisé l'électrophorèse en gel d'acrylamide sans dénaturants. Cette méthode permet la séparation des deux variants

sialylés de la transferrine synthétisée par les hépatocytes embryonnaires selon leur taux de sialylation. Le transfert sur membrane de nitrocellulose permet une révélation par des anticorps spécifiques. La proportion des deux variants pourra être évaluée et il sera possible de détecter un éventuel variant ayant un comportement électrophorétique différent. La révélation en parallèle par la Con A permettra d'évaluer la modification de la glycosylation (voir Appendice technique p. 224).

II - ETUDE DE L'INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE

Nous avons vu lors de l'étude des cellules HepG2, l'importance de la composition du milieu de culture sur la glycosylation de la transferrine. Nous avons donc incubé les hépatocytes embryonnaires de Poulet dans différents milieux : DMEM, RPMI 1640 et le milieu de William.

1 - Matériels et méthodes

Les hépatocytes d'embryon sont isolés et ensemencés dans des boîtes multipuits à raison de 3,5 à 4 x 10⁶ cellules par ml de milieu et par puits de 30 mm de diamètre (Appendice technique p. 204). 24 heures après l'ensemencement des cellules dans le milieu de William, les hépatocytes ont parfaitement adhérents, ils sont alors lavés avec les différents milieux dans lesquels les cellules vont être incubées. Après 24 heures d'incubation, les milieux sont prélevés et centrifugés afin d'éliminer les cellules décollées. Après dosage de la transferrine par RIA (Appendice technique p. 220), les milieux sont dilués dans le tampon échantillon et environ 100 ng de transferrine sont déposés en

gel de polyacrylamide (10 %) sans dénaturant (voir Appendice technique p. 218). Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (voir Appendice technique p. 218). La transferrine est alors révélée par les anticorps anti-transferrine de Poulet et par la Con A (voir Appendice technique p. 224).

2 - Résultats

La transferrine synthétisée par les hépatocytes embryonnaires incubés dans les différents milieux se sépare, après électrophorèse en gel de polyacrylamide, en deux variants, révélés, après transfert sur membrane de nitrocellulose par les anticorps anti-sérotransferrine de Poulet et par la Con A. Aucune différence n'est observée dans la migration de ces deux variants par rapport à la transferrine synthétisée par les cellules incubées dans le milieu de William. Nous ne constatons pas de différence entre l'intensité de révélation des variants étudiés et ceux correspondant à la transferrine témoin.

III - ADDITION DE DIFFERENTS FACTEURS DANS LE MILIEU DE CULTURE

Les différents facteurs susceptibles de modifier le processus de la glycosylation que nous avons choisis sont : le sérum de veau foetal, l'éthanol, l'acide rétinoïque, l'hydrocortisone, la dexaméthasone et le 17 β -oestradiol.

1 - Matériels et méthodes

Les hépatocytes embryonnaires sont préparés de la même manière que dans le paragraphe précédent (p. 122). 24 h après

l'ensemencement dans les boîtes multipuits avec le milieu de William, le milieu est changé pour être remplacé par le milieu de William supplémenté avec les différents facteurs étudiés. Ces différents facteurs ont été ajoutés dans le milieu de culture de William (contrôle) aux concentrations finales indiquées dans le tableau ci-après.

Facteurs	Concentrations finales dans le milieu			
Sérum de veau foetal	1	5	10	en %
Ethanol	0,5	1	5	"
Acide rétinolique	1	0,5	0,1	en $10^{-6}M$
Hydrocortisone	200	100	50	"
Dexaméthasone	10	5	1	"
17 β -oestradiol	200	100	50	"

Après 24 heures d'incubation, le milieu est récupéré, centrifugé, concentré et on effectue le même protocole que précédemment (paragraphe II p. 148).

La transferrine synthétisée par les hépatocytes incubés dans le milieu de William (contrôle) est séparée en deux variants révélés par les anticorps anti-sérotransferrine de Poulet et reconnus par la Con A. Les transferrines synthétisées par les hépatocytes embryonnaires incubés dans les milieux supplémentés en différents facteurs ne présentent pas de différence de migration électrophorétique avec la transferrine témoin. Les révélations par les anticorps anti-sérotransferrine de Poulet et par la Con A ne présentent pas de différence avec le témoin (Fig. 35 p. 151).

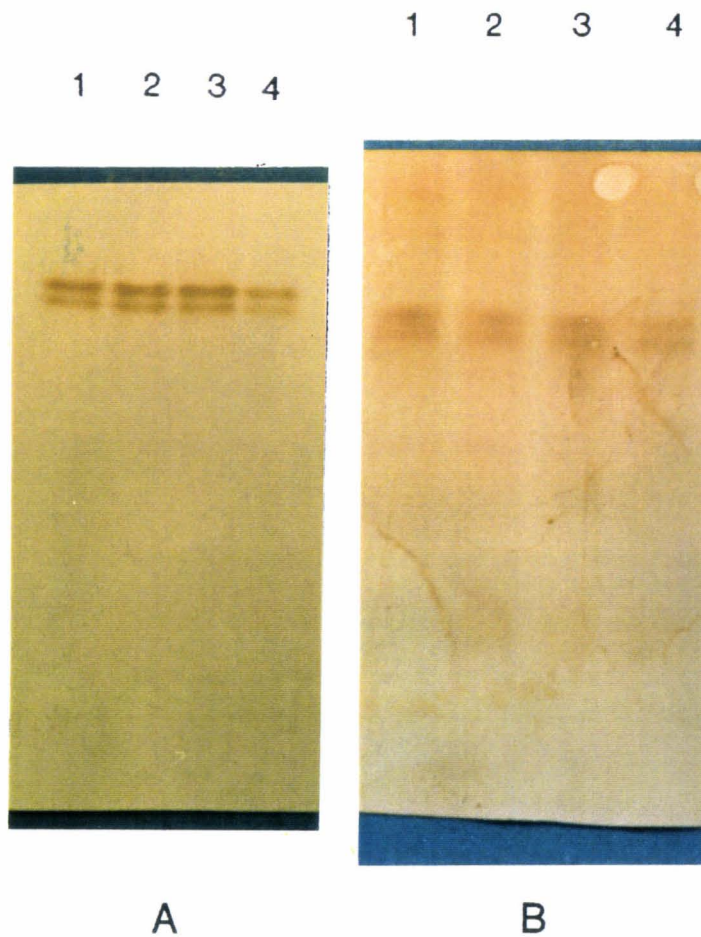


Figure 35 : - A : Révélation par les anticorps anti-sérotransferrine de Poulet des milieux de culture supplémentés avec les différents facteurs après transfert sur membrane de nitrocellulose.

- B : Révélation par la Con A

1 : Milieu témoin (William)

2 : Hydrocortisone à $100 \times 10^{-6}M$

3 : Dexaméthasone à $5 \times 10^{-6}M$

4 : 17β oestradiol à $100 \times 10^{-6}M$

IV - DISCUSSION ET CONCLUSION

Nous n'avons pas mis en évidence de modification de la glycosylation de la transferrine synthétisée par les hépatocytes embryonnaires incubés dans les différents milieux, ainsi que dans le milieu de William supplémenté par les différents facteurs étudiés.

La méthode utilisée est performante pour la séparation de molécules chargées négativement. Les résidus d'acide sialique étant les principaux monosaccharides présentant une charge négative, la séparation des variants dépend donc de leur taux de sialylation (si on ne tient pas compte d'une possible sulfatation ou d'une phosphorylation). Nous pouvons donc supposer que les structures glycaniques de la transferrine synthétisée par les hépatocytes embryonnaires et sécrétées dans le milieu de culture sont de type mono et disialylées comme celles des variants de la transferrine témoin, dont les structures ont été déterminées (Fig. 33 p. 137). Donc aucune asialylation ni polysialylation du glycanne de la transferrine n'ont été mises en évidence. Le seuil de détection d'un nouveau variant glycanique séparé par électrophorèse est lié à la sensibilité de la révélation immunoenzymatique qui est de l'ordre de 5 ng. Pour un dépôt de 100 ng, la sensibilité correspond donc à 5 %. La technique que nous avons employée pour la mise en évidence de la modification de la glycosylation possède néanmoins des limites. En effet, l'évaluation de la variation du taux des deux variants glycaniques de la transferrine synthétisée par les hépatocytes embryonnaires en culture est liée à l'évaluation, par l'observateur, de l'intensité des bandes après révélation immunoenzymatique. De plus les modifications glycaniques qui n'entraînent pas de modifications de la migration électrophorétique des variants peuvent être confondues avec une modification de la

synthèse du taux des deux variants initiaux.

Si les hépatocytes embryonnaires de Poulet à 16 jours d'incubation semblent être un bon modèle pour étudier l'impact de certains facteurs sur la glycosylation des glycoprotéines, le choix de la transferrine synthétisée par ces cellules ne permet pas de mettre en évidence une modification de la glycosylation. En effet, la transferrine synthétisée par les hépatocytes embryonnaires possède un seul glycanne dont la structure est de type N-acétyllactosaminique biantenné avec une hétérogénéité initiale très faible (2 variants glycaniques, mono et disialylés). Il est probable que l'unicité et la "simplicité" de cette structure diminuent les possibilités d'une modification du processus de glycosylation.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS GENERALES

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont permis de confirmer l'intervention des glycanes dans l'activité des protéines. En particulier, il a été démontré que la glycosylation pouvait modifier la fonction biologique, la biodistribution, la clearance, l'immunogénicité, les propriétés physicochimiques et la résistance aux protéases des protéines. La plupart des glycoprotéines sont produites et existent non pas sous la forme d'une seule entité structurale, mais sous la forme d'une série de glycovariants. Ces glycovariants diffèrent par leur fraction glycanique, mais aussi par leur localisation tissulaire, leur proportion et leurs propriétés biologiques. Il apparaît donc important de connaître les facteurs qui en modifiant in vivo et in vitro, le processus de la biosynthèse des glycanes entraînent une modification de la structure et des propriétés fonctionnelles des glycoprotéines.

Les travaux que nous avons entrepris pour tenter de définir la nature de facteurs influençant la glycosylation des protéines ont porté sur la transferrine, dont l'altération de la glycosylation avait déjà été décrite au Laboratoire. Deux modèles cellulaires ont été utilisés : les cellules d'hépatocarcinome humain (cellules HepG2) et les hépatocytes d'embryon de Poulet à 16 jours d'incubation.

Dans la première partie de nos travaux, nous avons étudié la modification de la glycosylation de la transferrine sécrétée par les cellules HepG2 en culture. Les conclusions que nous pouvons tirer de ces travaux sont les suivantes :

1 - Méthode d'étude

Nous avons utilisé pour la mesure de la proportion des différents variants glycaniques de la transferrine, une technique plus sensible que l'affino-immunoelectrophorese bidimensionnelle et permettant une meilleure évaluation des variants glycaniques en faible concentration. Cette technique consiste en une affinoelectrophorese en presence de Con A, suivie d'un immuntransfert. Cette methode appliquee a la serotransferrine humaine de serums normaux nous a permis, apres separation des variants glycaniques par la Con A, d'evaluer les proportions suivantes : variant non retenu par la Con A : 4,9 % \pm 3,7 (Tf-I), variant retardé par la Con A : 18,4 % \pm 4,6 (Tf-II), variant non-retenu par la Con A : 76,4 % \pm 4,0 (Tf-III), de la serotransferrine humaine.

2 - Influence du milieu de culture

L'incubation des cellules HepG2 dans le DMEM sans serum de veau foetal (10 %) pendant 96 h n'entraîne aucune modification dans la repartition vis à vis de la Con A, des variants glycaniques de la transferrine. La profonde modification structurale des glycanes de la transferrine secretee par les cellules HepG2 demontree par CAMPION et al., (1989) ne semble donc pas être une consequence de la presence du serum de veau foetal dans le milieu de culture.

Par contre, nous avons mis en évidence une différence de glycosylation de la transferrine synthetisee par les cellules HepG2 incubees dans deux milieux differents : le RPMI 1640 et dans le DMEM. Dans le RPMI 1640, la proportion des variants interagissant avec la Con A est de 29,6 %, elle est de 13,8 % dans le DMEM, la proportion des variants non retenus par la Con A est de 70,4 % dans le RPMI 1640, elle est de 86,2 % dans le DMEM.

L'étude de la composition de ces milieux, nous a amené à suspecter le rôle du glucose et/ou du fer dans l'altération de la glycosylation de la transferrine.

Nous avons démontré l'importance du glucose dans la glycosylation de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2. Le taux des variants glycaniques retenus par la Con A passe de 57,8 à 24,7 % et celui des variants glycaniques retardés de 24,3 à 10,3 %. Le glucose semble donc augmenter la polyantennarisation des glycanes de la transferrine. Par contre, l'addition de fer ou de fer et de glucose dans le RPMI 1640 n'entraînent pas de modification de la glycosylation de la transferrine. Parallèlement à cette expérience, nous avons observé une modification de la glycosylation de la transferrine dans le milieu témoin. Cette modification apparaît après un cycle de congélation/décongélation des cellules, ce qui nous a amené à considérer l'importance de ce phénomène physique sur la glycosylation de la transferrine (voir paragraphe 3).

3 - Influence de la durée de congélation des cellules

Dès le début de notre étude, la répartition vis à vis de la Con A, des variants glycaniques de la transferrine sécrétée par les cellules HepG2, était de 26,9 % pour les variants interagissant avec la Con A et de 73,1 % pour les variants non retenus par la Con A. Cette répartition était différente de celle observée par CAMPION et al., (1989) qui ont décrit 100 % de variants non retenus par la Con A dans les mêmes conditions de culture. Les cellules, que nous avons utilisées, ainsi que celles de CAMPION et al., proviennent du lot initial introduit au Laboratoire en 1984. La différence réside dans la durée de congélation. En effet, "nos" cellules ont été congelées environ trois années de plus que celles de CAMPION et al.,. Par ailleurs, après avoir effectué un

nouveau cycle de congélation et décongélation de cellules provenant du lot initial, nous avons observé une nouvelle augmentation des variants glycaniques interagissant avec la Con A, évalués à 72,1 %. Il semble donc, que la durée de la congélation et les cycles de congélation/décongélation influent sur le processus de la biosynthèse des glycanes de la transferrine synthétisée par les cellules HepG2 en augmentant la proportion des glycanes reconnus par la Con A.

4 - Influence du processus inflammatoire

In vitro, les glucocorticoïdes et les cytokines, notamment l'interleukine 6 sont les principaux effecteurs du processus inflammatoire sur l'hépatocyte. Nous avons étudié l'influence de ces éléments sur la glycosylation de la transferrine sécrétée par les cellules HepG2. L'interleukine 6 à la concentration de 200 U/ml modifie la glycosylation de l' α 1-antitrypsine en augmentant les variants glycaniques retenus par la Con A, mais semble modifier très faiblement la glycosylation de la transferrine. Par contre, les glucocorticoïdes : hydrocortisone et principalement la dexaméthasone à la concentration de 0,1 ou 1×10^{-6} M augmentent la proportion des variants non retenus par la Con A. On aurait donc une augmentation des glycanes polyantennés.

L'addition simultanée d'interleukine 6 et de glucocorticoïdes dans le milieu de culture annule l'effet des glucocorticoïdes sur la glycosylation de la transferrine et amplifie l'augmentation de synthèse de la transferrine par un facteur de 3,2, alors que l'interleukine 6 ou la dexaméthasone ajoutées séparément dans le milieu induisent une augmentation limitée à un facteur de 1,3. Il existe donc une interaction entre l'interleukine 6 et les glucocorticoïdes, synergie pour la synthèse

de la transferrine et inhibition pour la modification de la glycosylation de la transferrine.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons étudié la modification de la glycosylation de la transferrine sécrétée par les hépatocytes embryonnaires de Poulet. Les conclusions que nous pouvons tirer de ces travaux sont les suivantes :

1 - Les hépatocytes embryonnaires de Poulet incubés dans un milieu minimum (William's) sans sérum de veau foetal synthétisent et sécrètent la transferrine à une concentration maximale de $11,7 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}/10^{-6}$ cellules à 48 heures d'incubation. La transferrine est la protéine majoritairement sécrétée par les hépatocytes embryonnaires dans les conditions de culture décrites.

2 - Nous avons comparé la structure glycanique des transferrines du sérum de Poulet, du sérum de l'embryon et de la transferrine sécrétée par les hépatocytes embryonnaires en culture. Cette étude nous a permis de confirmer en partie les résultats de CODDEVILLE (1987) sur la structure de la sérotransferrine de Poulet. En effet, nous avons mis en évidence des structures glycaniques N-acétyllactosaminiques biantennées monosialylées (variant 1 : 22 %) et disialylées (variant 2 : 75 %) déterminées par résonance magnétique du proton à 400 MHz. La structure glycanique de deux autres variants glycaniques minoritaires ont été étudiées avec différentes lectines qui nous ont permis d'établir une structure glycanique hypothétique de type N-acétyllactosaminique biantenné asialylé (variant 0 : 1 %) et au moins disialylé (variant 3 : 2 %), ce dernier semble posséder une charge négative plus importante que le variant 2 qui migre moins loin en électrophorèse sans dénaturant.

Nous avons démontré la différence de glycosylation entre la sérotransferrine embryonnaire et la transferrine sécrétée par les hépatocytes embryonnaires en culture au même stade d'incubation. La sérotransferrine embryonnaire possède un glycanne de type N-acétyllactosaminique avec un résidu de N-acétylglucosamine intercalaire. La transferrine sécrétée par les cellules en culture possède un glycanne de type N-acétyllactosaminique monosialylé (variant 1 : 70 %) et disialylé (variant 2 : 30 %) dont la structure a été déterminée par résonance magnétique nucléaire du proton à 400 MHz. En outre, ces glycanes seraient partiellement fucosylés (20 %). Ces structures sont présentes chez la sérotransferrine de Poulet mais dans des proportions inverses et non fucosylées.

Nous avons démontré d'une part que la glycosylation de la transferrine embryonnaire différait de celle du Poulet et d'autre part que la mise en culture des hépatocytes embryonnaires entraînait une modification de la glycosylation de la transferrine se traduisant par une activation de l' α -2,6 sialyltransférase, de l' α -1,6 fucosyltransférase et de la β -1,4 galactosyltransférase.

L'étude de l'influence de différents facteurs, sérum de veau foetal, éthanol, acide rétinoïque, hydrocortisone, dexaméthasone et β oestradiol sur la glycosylation de la transferrine sécrétée par les hépatocytes embryonnaires ne nous a pas permis de mettre en évidence une modification de la glycosylation de la transferrine. En présence de ces facteurs, les hépatocytes sécrètent une transferrine dont la glycosylation est comparable à celle de la transferrine sécrétée dans le milieu témoin. Aucun variant asialylé ou polysialylé (plus que disialylé) n'a été observé. D'autre part, les proportions entre les deux variants

glycanniques semblent constantes, nous précisons néanmoins que cette observation est visuelle, qu'elle n'a pas été quantifiée et que cette étude a été limitée à l'affinité des variants glycanniques vis à vis de la Con A.

L'étude des conditions de culture des cellules et des facteurs extracellulaires qui influencent le processus de la glycosylation commence à se développer mais les mécanismes par lesquels de tels facteurs agissent sont encore mal connus. Plusieurs mécanismes potentiels pour expliquer de tels effets peuvent être proposés : (1) baisse de l'énergie disponible pour la cellule, (2) perturbation de l'environnement du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, (3) perturbation du trafic vésiculaire et (4) modulation de l'activité des glycosidases et des glycosyltransférases. L'action de nombreuses hormones sur la biosynthèse des glycanes porte probablement sur le contrôle du taux de transcription des ARN messagers et de leur stabilité. En effet, cette hypothèse a été confirmée par des expériences démontrant une augmentation des ARN messagers de glycosyltransférases, correspondant à l'augmentation du taux intracellulaire de ces enzymes, en réponse à une stimulation par la dexaméthasone ou par l'acide rétinoïque.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- AISEN, P. and LISTOWSKY, I. (1980) Iron transport and storage proteins. Annu. Rev. Biochem., **49**, 357-393
- ALDERTON, G., WARD, W.H. and FEVOLD, H.L. (1946) Identification of the bacteria-inhibiting, iron-binding protein of egg white as conalbumin. Arch. Biochem. Biophys., **11**, 9-13
- ALM, R. and ERIKSON, S. (1985) Biosynthesis of abnormally glycosylated hepatoma secretory proteins in cell culture. FEBS Lett., **190**, 157-160
- ANDERSON, B.F., BAKER, H.H., DODSON, E.J., NORRIS, G.E., RUMBALL, S.V., WATERS, J.M. and BAKER, E.N. (1987) Structure of human lactoferrin at 3.2-Å resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 1769-1773
- AOYAGI, Y., SUZUKI, Y., ISEMURA, M., SEKINE, C., IGARASHI, K. and ICHIDA, F. (1988) The fucosylation of alpha-fetoprotein and its usefulness in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. Cancer, **61**, 769-774
- ASHWELL, G. and HARDFORD, J. (1982) Carbohydrate-specific receptors of the liver. Ann. Rev. Biochem., **51**, 531-554
- AUBERT, J.P., BISERTE, G. and LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. (1976) Carbohydrate-peptide linkage in glycoproteins. Arch. Biochem. Biophys., **175**, 410-418
- BAENZINGER, J.U. and FIETE, D. (1979) Structural determinants of concanavalin A specificity for oligosaccharides. J. Biol. Chem., **254**, 2400-2407
- BAILEY, S., EVANS, R.W., GARRATT, R.C., GORINSKY, B., HASNAIN, S., HORSBURGH, C., JHOTI, H., LINDLEY, P.F., MYDIN,

A., SARRA, R. and WATSON, J.L. (1988) Molecular structure of serum transferrin at 3.3-Å resolution. Biochemistry, **27**, 5804-5812

BARNES, D. and SATO, G. (1980) Methods for growth cultured cells in serum-free medium. Anal. Biochem., **102**, 255-270

BAUER, J., TRAN-THI, T.A., NORTHOFF, H. (1986) The acute phase induction of α 2-macroglobulin in rat hepatocyte primary cultures : action of a hepatocyte-stimulating factor, triodo thyronine and dexamethasone. Eur. J. Cell. Biol., **40**, 96-93

BAUMANN, H. (1989) Hepatic acute phase reaction in vivo and in vitro. In Vitro. Cell. Dev. Biol., **25**, 115-125

BAUMANN, H., FIRESTONE, G.L, BURGESS, T.L., GROSS, K.W., YAMAMOTO, K.R. and HELD, W.A. (1983) Dexamethasone regulation of α 1-acid glycoprotein and other acute-phase reactants in rat liver and hepatoma cells. J. Biol. Chem., **258**, 563-570

BAUMANN, H. and HELD, W.A. (1981) Biosynthesis and hormone-regulation expression of secretory glycoproteins in rat liver and hepatoma cells. Effect of glucocorticoids and inflammation. J. Biol. Chem., **256**, 10145-10155

BAUMANN, H., HILL, R.E., SAUDER, D.N. AND JAHREIS, G.P. (1986) Regulation of major acute phase plasma hepatocyte-stimulating factors of human squamous carcinoma cells. J. Cell. Biol., **102**, 370-383

BAUMANN, H. and JAHREIS, G.P. (1983) Glucose starvation leads in rat hepatoma cells to partially N-glycosylated glycoproteins including α 1-acid glycoproteins. J. Biol. Chem., **258**, 3942-3949

BAUMANN, H., RICHARDS, C. and GAULDIE, J. (1987) Interaction among hepatocyte-stimulating factors, interleukin-1, and glucocorticoids for regulation of acute phase plasma proteins in human hepatoma (HepG2) cells. J. Immunol., **139**, 4122-4128

BAUMANN, H., WON, K.A. and JAHREIS, G.P. (1989) Human hepatocyte-stimulating factor-III and interleukin-6 are structurally and immunologically distinct but regulate the production of the same acute phase plasma proteins. J. Biol. Chem., **264**, 8046-8051

BAYARD, B. and KERCKAERT, J.P. (1980) Evidence for the uniformity of the carbohydrate chains in individual glycoprotein molecular variants. Biochem. Biophys. Res. Commun., **95**, 777-784

BAYARD, B. and KERCKAERT, J.P. (1981) Uniformity of carbohydrate chains within molecular variants of Rat α_1 -fetoprotein with distinct affinity for Concanavalin A. Eur. J. Biochem., **113**, 405-414

BEHRENS, U.J., WORNER, T.M., BRALY, L.F., SCHAFFNER, F. and LIEBER, C. S. (1988a). Carbohydrate-deficient transferrin, a marker for chronic alcohol consumption in different ethnic populations. Alcohol. Clin. Exp. Res., **12**, 427-432

BEHRENS, U.J., WORNER, T.M. and LIEBER, C.S. (1988b) Changes in carbohydrate-deficient transferrin levels after alcohol withdrawal. Alcohol. Clin. Exp. Res., **12**, 539-544

BERGER, E.G., BUDECKE, E., KAMERLING, J.P. and KOBATA, A. (1982) Structure, biosynthesis and functions of glycoproteins glycans. Experimentia, **38**, 1129-1162

BERNARD, B.A., DE LUCA, L.M., HASSELL, J.R., YAMADA, K.M. and HOLDEN, K. (1984) Retinoic acid alters the proportion of high mannose to complex type of oligosaccharides on fibronectin secreted by cultured chondrocytes. J. Biol. Chem., **259**, 5310-5315

BIERHUITZEN, M., DE WIT, M., GOVERS, C., FERWERDA, W., KOELMAN, C., POS, O. and VAN DIJK, W. (1988) Glycosylation of three molecular forms of human α_1 -acid glycoprotein having different interactions with concanavalin. Variation in the occurrence of di-, tri-, and tetraantennary glycans and degree of sialylation. Eur. J. Biochem., **175**, 387-394

BIOU, D., KONAN, D., FEGER, J., AGNERAY, J., LEROY, Y., CARDON, P., FOURNET, B. and DURAND, G. (1987) Alteration in the carbohydrate moiety of alpha-1-acid glycoprotein purified from human cirrhotic ascitic fluid. Biochim. Biophys. Acta., **131**, 308-312

BISCHOFF, J. and KORNFELD, R. (1983) Evidence for an α -mannosidase in endoplasmic reticulum of rat liver. J. Biol. Chem., **258**, 7907-7910

BISWAS, M., SEKHARUDU, Y.C. and RAO, S.R. (1986) Complex carbohydrates : Conformation studies on some oligosaccharides related to N-glycosylproteins which interact with concanavalin A. Int. J. Biol. Macromol., **8**, 1-8

BLOCH, B., POPOVICI, T., LEVIN, M.J., TUIL, D. and KAHN, A. (1985) Transferrin gene expression visualized in oligodendrocytes of the rat brain using in situ hybridization and immunohistochemistry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 6706-6710

BRADSHAW, J.P, HATTON, J. and WHITE, D.A. (1985) The hormonal control of protein N-glycosylation in the developing rabbit mammary gland and its effect upon transferrin synthesis and secretion. Biochim. Biophys. Acta., **847**, 344-351

BREBOROWICZ, J. AND MACKIEWICZ, A. (1989) Affinity for diagnosis of cancer and inflammatory conditions. Electrophoresis, **10**, 568-573

BREBOROWICZ, J., MACKIEWICZ, A. and BREBOROWICZ, D. (1981) Microheterogeneity of alphetoprotein in patient serum as demonstrated by lectin affino-electrophoresis. Scand. J. Immunol., **14**, 15-20

BREWER, F., BHATTACHARYYA, L., BROWN, R.D., III and KOENIG, S.H. (1985) Interactions of concanavalin A with a trimannosyl oligosaccharide fragment of complex and high mannose type glycopeptides. Biochem. Biophys. Res. Commun., **127**, 1066-1071

BROWN, J.P., WRIGHT, P.W., HART, C.E., HELLSTROM, K.E. and HELLSTROM, I. (1980) Proteins antigens of normal and malignant human

cells identified by immunoprecipitation with monoclonal antibodies. J. Biol. Chem., **255**, 4980-4983

BROCKHAUSEN, I. and CARVER, J.P. and SCHACHTER, H. (1988) Control of glycoprotein synthesis. The use of oligosaccharides substrates and HPLC to study the sequential pathway for N-acetylglucosaminyltransferases I, II, II, IV, V and VI in the biosynthesis of highly branched N-glycans by hen oviduct membranes. Biochem. Cell. Biol., **66**, 1134-1151

BUCK, C.A., FUHRER, J.P., SOSLAU, G. and WARREN, L. (1974) Membrane glycopeptides from subcellular fractions of control and virus-transformed cells. J. Biol. Chem., **249**, 1541-1550

CAMPION, B. (1987) Mise en évidence d'une polyantennarisation des glycannes de la transferrine humaine dans le sérum de femmes enceintes et dans les milieux de culture des hépatocytes. Etude de l'interaction des variants glycaniques avec les récepteurs membranaires placentaires et hépatocytaires. Thèse d'Université, Lille.

CAMPION, B., LEGER, D., WIERUSZESKI, J.M., MONTREUIL, J. and SPIK, G. (1989). Presence of fucosylated triantennary, tetraantennary and pentaantennary glycans in transferrin synthesized by the human hepatocarcinoma cell line. Eur. J. Biochem., **184**, 405-413

CARLSON, J., ERIKSSON, S., ALM, R. and KJELLSTRÖM, T. (1984) Biosynthesis of abnormally glycosylated α 1-antitrypsin by human hepatoma cell line. Hepatology, **4**, 235-241

CARVER, J.P., MACKENZIE, A.E. and HARDAM, K.D. (1985) Molecular model for the complex between concanavalin A and a biantennary-complex class glycopeptides. Biopolymers, **2**, 49-63

CASTELL, J.V., GOMEZ-LECHON, M.J, DAVID, M., ANDUS, T., GEIGER, T., TRULLENQUE, R., FABRA, R. and HEINRICH, P.C. (1989) Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. FEBS Lett., **242**, 237-239

CASTELL, J.V., GOMEZ-LECHON, M.J., DAVID, M., HIRANO, T., KISHIMOTO, T. and HEINRICH, P.C. (1988) Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. FEBS Lett., **232**, 347-350

CHAN, V.T. and WOLF, G. (1987) The role of vitamin A in the glycosylation reactions of glycoprotein synthesis in an in vitro system. Biochem. J., **247**, 53-62

CHEN, C., FENDERSON, B.A., ANDREWS, P.W. and HAKOMORI, S. (1989) Glycolipid glycosyltransferase in human embryonal carcinoma cells during retinoic acid induced differentiation. Biochemistry, **28**, 2229-2238

CHILDS, R.A. and FEIZI, T. (1981) Differences in carbohydrate moieties of high molecular weight glycoproteins of human lymphocytes of T and B origins revealed by monoclonal autoantibodies with anti-I and anti-i specificities. Biochem. Biophys. Res. Commun., **102**, 1158-1164

CHUNG, M.C.M. and Mac KENZIE, H.A. (1985) Studies of equine transferrin. The isolation and partial characterization of the D and R variants. Comp. Biochem. Physiol., **80B**, 287-297

CODDEVILLE, B. (1986) Etude de la structure primaire des glycanes de transferrines (sero-, lacto-, ovo- transferrine) de diverses espèces animales. Thèse d'Université, Lille.

CODDEVILLE, B., STRATIL, A., WIERUSZESKI, J.M., STRECKER, G., MONTREUIL, J. and SPIK, G. (1989). Primary structure of horse serotransferrin glycans. Demonstration that heterogeneity is related to the number of glycans and to the presence of N-acetylneuraminic acid and N-acetyl-4-O-acetylneuraminic. Eur. J. Biochem., **186**, 583-590

CONTENT, J., FONTAINE, V. and SNYERS, L. (1988) Modulation of IL-6 receptors in human cells. The New York Academy of Sciences/National Foundation for Cancer Research., **12**, 14

CROWLEY, J.F., GOLDSTEIN, I.J., ARNAP, J. and LÖNNGEN, J. (1984) Carbohydrate binding studies on the lectin from Datura stramonium. Arch. Biochem. Biophys., **231**, 524-533

CUMMING, D.A. (1991) Glycosylation of recombinant protein therapeutics : control and functional implications. Glycobiology, **1**, 115-130

CUMMINGS, R.D. and MATTOX, S.A. (1988) Retinoic acid-induced differentiation of the mouse teratocarcinoma cell line F9 is accompanied by an increase in the activity of UDP-galactose : β -D-galactosyl- α 1,3-galactosyltransferase. J. Biol. Chem., **263**, 511-519

CUSTER, G., BALCERZACK, S. and RINEHART, J. (1982) Human macrophage hemoglobin-iron metabolism in vitro. Amer. J. Haematol., **13**, 23-36

DANIEL, P.F. and WOLF, G. (1975) Incorporation of labeled glucosamine into glycoproteins by organes culture of hamster trachea : adverse effects of HEPES buffer. In Vitro, **11**, 347

DAMBUYANT, C., SIZARET, P. and MARTEL, N. (1978) Immunochemical characteristics of concanavalin-A reactive and non-reactive alpha-fetoprotein. Scand. J. Immunol. Suppl., **8**, 323

DARLINGTON, G.J., WILSON, D.R. and LACHMAN, L. (1986) Monocyte-conditioned medium, interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulated the acute phase response in human hepatoma cells in vitro. J. Cell. Biol., **103**, 787-793

DATEMA, R. and SCHWARZ, R.T. (1981) Effect of energy depletion on the glycosylation of a viral glycoprotein. J. Biol. Chem., **256**, 11191-11198

DEBRAY, H. (1979) Les glycoconjugués de la membrane de surface des cellules normales et cancéreuses. Bull. Cancer., **66**, 353-372

DEBRAY, H., DECOUT, D., STRECKER, G., SPIK, G. and MONTREUIL, J. (1981) Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylation. Eur. J. Biochem., **117**, 41-55

DEBRAY, H., QIN, Z., DELANNOY, P., MONTREUIL, J., DUS, D., RADZIKOWSKI, C., CHRISTENSEN, B. and KIELER, J. (1986) Altered glycosylation of membrane glycoproteins in human uroepithelial cell lines. Int. J. Cancer., **37**, 607-611

DEBRUYNE, V., MONTREUIL, J. and SPIK, G. (1984) Crossed immunoaffinity electrophoresis of human transferrin in normal and cirrhotic sera. Prot. Biol. Fluids, **31**, 63-68

DE JONG, G., VAN DIJK, J.P and VAN EIJK, H.G. (1990) The biology of transferrin. Clin. Chim. Acta. **190**, 1-46

DEKKER, C.J., KROSS, M.J., VAN DER HEUL, C. and VAN EIJK, H.G. (1985). Uptake of sialo and asialo transferrins by isolated rat hepatocytes. Int. J. Biochem., **17**, 701-706

DELANNOY, P., DEBRAY, H. et MONTREUIL, J. (1985) Modifications de la structure des glycanes de la fibronectine provoquées par la transformation des cellules BHK21/C13 induite par le virus du sarcome de Hamster. C. R. Acad. Sc. Paris, **301**, 767-771

DELERS, F. and ENGLER, R. (1986) Biosynthesis and secretion of haptoglobin by chicken embryo hepatocyte primary culture. Marker Proteins in Inflammation, Vol 3, Walter de Gruyter and Co., Berlin. New York, 261-264

DENIS, J.W., LAFERTE, S., WAGHORNE, C., BREITMAN, M.L. and KERBEL, R.S. (1987) β 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. Science, **236**, 582-585

DESVERGNE, B., LESCOAT, G., GLAISE, D., KNEIP, B., DEUGNIER, Y., GUGUEN-GUILLOUZO, C., BOUREL, M. and BRISSOT, P. (1987) VIII^{ème} Colloque international sur les protéines de transport et d'emmagasinement du fer, Québec, Canada, p 45

DIPPOLD, W.G., LLOYD, K.O., LI, L.T., IKEDA, H., OETTGEN, H.F. and OLD, L.G. (1980) Cell surface antigens of human malignant

melanoma : definition of six antigenic systems with mouse monoclonal antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 6114-6118

DORLAND, L., HAVERKAMP, J., SCHUT, B.L., Vliegenthart, J.F.G., SPIK, G., STRECKER, G., FOURNET, B. and MONTREUIL, J. (1977) The structure of the asialo-carbohydrate units of human serotransferrin as proven by 360 MHz proton magnetic resonance spectroscopy. FEBS Lett., **77**, 15-20

DORLAND, L., HAVERKAMP, J., Vliegenthart, J.F.G., SPIK, G., FOURNET, B. and MONTREUIL, J. (1979) Investigation by 360-MHz¹H-nuclear-magnetic-resonance spectroscopy and methylation analysis of the single glycan chain of chicken ovotransferrin. Eur. J. Biochem., **100**, 569-574

DURHAM, J.P., RUPPERT, M. and FONTANA, J.A. (1983) Glycosyl-transferase activities and the differentiation of human promyelotic (HL-60) cells by retinoic acid and phorbol ester. Biochem. Biophys. Res. Commun., **110**, 348-355

EGGO, M.C. and BURROW, G.N. (1982) Stimulation of protein glycosylation by thyrotropin. Endocrinology, **111**, 1663-1665

ELBEIN, A.D. (1987) Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharide chains. Annu. Rev. Biochem., **56**, 497-534

EKBLOM, P. and THESLEFF, I. (1985) Control of kidney differentiation by soluble factors secreted by the embryonic liver and the yolk sac. Dev. Biol., **110**, 29-38

EKBLOM, P., THESLEFF, I., SAXEN, L., MIETTINEN, A. and TIMPL, R. (1983). Transferrin as a fetal growth factor : acquisition of responsiveness related to embryonic induction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 2651-2655

FEIZI, T. (1981) Carbohydrate differentiation antigens. Trends Biol. Sci., **6**, 333-335

FEIZI, T. (1985) Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. Nature, **314**, 53-57

FEIZI, T. and CHILDS, R.A. (1987) Carbohydrates as antigenic determinant of glycoproteins. Biochem. J., **245**, 1-11

FENDERSON, B.A., EDDY, E.M. and HAKOMORI, S. (1990) Glycoconjugate expression during embryogenesis and its biological significance. BioEssays, **12**, 173-179

FIRESTONE, G.L., JOHN, N.J. and YAMAMOTO, K.R. (1986) Glucocorticoid-regulated glycoprotein maturation in wild-type and mutant rat cell lines. J. Cell. Biol. **103**, 2323-2331

FOURNET, B., MONTREUIL, J., STRECKER, G., DORLAND, L., HAVERKAMP, J., VLIEGENTHART, J.F.G., BINETTE, J.P. and SCHMID, K. (1978) Determination of the primary structures of 16 asialo-carbohydrate units derived from human plasma α 1-acid glycoprotein by 360-Mhz ^1H NMR spectroscopy and permethylation analysis. Biochemistry, **17**, 5206-5214

FRANC, J.L., HOVSEPIAN, S., FAYET, G. and BOUCHILLOUX, S. (1984) Differential effects of thyrotropin on various glycosyltransferases in porcine thyroid cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. **118**, 910-915

FUKUDA, M.N, SASKI, H., LOPEZ, L. and FUKUDA, M. (1989) Survival of recombinant erythropoietin in the circulation : the role of carbohydrate. Blood, **73**, 84-89

FULLER, G.M., OTTO, J.M., WOLOSKI, B.M., Mac GARY, C.T. and ADAMS, M.A. (1985) The effects of hepatocyte stimulating factor on fibrinogen biosynthesis in hepatocyte monolayers. J. Cell. Biol., **101**, 1481-1486

GANAPATHI, M.K., SCHULTZ, D., MACKIEWICZ, A., SAMOLS, D., HU, S.I., BRABENEC, A., MACINTYRE, S.S. and KUSHNER, I. (1988) Heterogenous nature of acute phase response. J. Immunol. **141**, 564-569

GAULDIE, J., LAMONTAGNE, L. and STADYNCK, A. (1985) Acute phase response in infectious disease. Surv. Synth. Path. Res., **4**, 126-151

GAULDIE, L., RICHARDS, C., HARNISH, D., LANDSORP, P. and BAUMANN, H. (1987). Interferon β_2 /B-cell stimulating factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 7251-7255

GERSHAM, H. and ROBBINS, P.W. (1981) Transitory effects of glucose starvation on the synthesis of dolichol linked oligosaccharides in mammalian cells. J. Biol. Chem., **256**, 7774-7780

GESUNDHEIT, N., FINK, D.L., SILVERMAN, L.A. and WEIN TRAU, B.D. (1987) Effects of thyrotropin-releasing hormone on the carbohydrate structure of secreted mouse thyrotropin. J. Biol. Chem., **262**, 5197-5203

GITLIN, L. and PERICELLI, A. (1970) Synthesis of serum albumin, prealbumin, α -fetoprotein, α_1 -antitrypsin and transferrin by the human yolk sac. Nature, **228**, 995-997

GITLIN, D., KITZES, J. (1967) Synthesis of serum albumin, embryo specific α -globulin and conalbumin by the chick yolk sac. Biochim. Biophys. Acta., **147**, 334-341

GLASNAK, V. and JAROLIMOVA. (1980) Biochemical polymorphic traits of evaluating the parents stocks horse breeding in Czechoslovakia. Zivocisna vyroba, **25**, 461-468

GOOCHEE, C.F. and MONICA. T (1990) Environmental effects on protein glycosylation. Biotechnology, **8**, 421-427

GORDON, A.H., KOJ, A. eds. (1987) The acute phase response to injury and infection. Amsterdam, Oxford, New York : Elsevier.

GRAHAM, I. and WILLIAMS, J. (1975) A comparison of glycopeptides from the transferrins of several species. Biochem. J., **145**, 263-279

GRIENINGER, G. and GRANICK, S. (1975) Synthesis and differentiation of plasma proteins in cultured embryonic chicken liver cells : a system for study of regulation of protein synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 5007-5011

GRIENINGER, G., HERTZBERG, K.M. and PINDYCK, J. (1978) Fibrinogen synthesis in serum-free hepatocyte cultures : stimulation by glucocorticoids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 5506-5510

GRIENINGER, G., PLANT, P.W. and CHIASSON, M.A. (1984) Selective intracellular degradation of fibrinogen and its reversal in cultured hepatocytes. J. Biol. Chem., **259**, 14973-14978

GROSS, V., ANDUS, T., TRAN-THI, T.-A., BAUER, J., DECKER, K. and HEINRICH, P.C. (1984) Induction of acute phase proteins by dexamethasone in rat hepatocyte primary cultures. Exp. Cell. Res., **151**, 46-54

GROSS, V., STEUBE, K., TRAN-THI, T.-A., HÄSSINGER, D., LEGLER, G., DECKER, K., HEINRICH, P.C. and GEROK, W. (1987) The role of N-glycosylation for the plasma clearance of rat liver secretory glycoproteins. Eur. J. Biochem., **162**, 83-88

GUILLOUZO, A., DELERS, F., CLEMENT, B., FONTAINE, M., BIOU, D., GILBERT, D. and GUGUEN-GUILLOUZO, C. (1986) Long term production of acute-phase proteins by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver cell type in serum free medium. Biochem. Biophys. Res. Commun., **120**, 311-317

HAFFAR, O.K., APONTE, G.W., BRAVO, D.A., JOHN, N.J., HESS, R.T. and FIRESTONE, G.L. (1988) Glucocorticoid-regulated localization

of cell surface glycoproteins in rat hepatoma cells is mediated within the Golgi complex. J. Cell. Biol., **106**, 1463-1474

HAKOMORI, S. (1984) Tumor-associated carbohydrate antigen. Ann. Rev. Immunol. **2**, 103-126

HAKOMORI, S. (1985) Aberrant glycosylation in cancer cell membrane as focused on glycolipids : overview and perspectives. Cancer Res., **45**, 2405-2414

HANOVER, J.A. and LENNARZ, W.J. (1981) Transmembrane assembly of membrane and secretory glycoproteins. Arch. Biochem. Biophys., **211**, 1-19

HANSEN, J.E.S., JENSEN, S.P., NORGAARD-PEDERSEN, B. and BOG-HANSEN, T. C. (1986). Electrophoretic analysis of the glycan microheterogeneity of orosomucoid in cancer and inflammation. Electrophoresis, **7**, 180-183

HARDER, G., JAMIESON, J.C. and WOLOSKI, B.M. (1990) Stimulation of release Gal β 1-4GlcNAc α 2-6 sialyltransferase from the faza hepatoma cell line by dexamethasone and phorbol ester. Int. J. Biochem. **22**, 11-14

HARPAZ, N. and SCHACHTER, H. (1980) Control of glycoprotein synthesis. Processing of asparagine-linked oligosaccharides by one or more rat liver golgi α -D-mannosidases dependent on the prior action of UDP-N-acetylglucosamine : α -D-mannoside β 2-N-acetylglucosaminyl-transferase I. J. Biol. Chem., **255**, 4894-4902

HATTON, M.W.C., MARZ, L., BERRY, L.R., DEBANNE, M.T. and REGOECZI, E. (1979) Bi- and tri-antennary human transferrin glycopeptides and their affinities for the hepatic lectin specific for asialo-glycoproteins. Biochem. J., **181**, 633-638

HAURANI, F.I., MEYER, A. and O'BRIEN, R. (1973) Production of transferrin by the macrophages. J. Reticuloendoth. Soc., **14**, 309-316

HEEGAARD, N.H.H., HAGERUP, M., THOMSEN, Å.c. and HEEGAARD, P.M.H. (1989) Concanavalin A crossed affinity immunoelectrophoresis and image analysis for semiquantitative evaluation of microheterogeneity profiles of human serum transferrin from alcoholics and normal individuals. Electrophoresis, **10**, 836-840

HEINRICH, P.C, CASTELL, J.V. and ANDUS, T. (1990) Interleukin-6 and acute phase response. Biochem. J., **265**, 621-636

HERTZBERG, K.M., PINDYCK, J., MOSESSON, M.W. and GRIENINGER, G. (1981) Thyroid hormone stimulation of plasma protein synthesis in cultured hepatocytes. J. Biol. Chem., **256**, 563-566

HETTKAMPS, H., LEGLER, G. and BAUSE, E. (1984) Purification by affinity chromatography of glucosidase I, and endoplasmic reticulum hydrolase involved in the processing of asparagine-linked oligosaccharides. Eur. J. Biochem., **142**, 85-90

HOFLACK, B., CACAN, R. and VERBERT, A. (1981) Dolichol pathway in lymphocytes from rat spleen. Influence of the glucosylation on the cleavage of dolichyl diphosphate oligosaccharides into phosphooligosaccharides. Eur. J. Biochem., **117**, 285-290

HOLMES, E.H., OSTRANDER, G.K., CLAUSEN, and GROEM, N. (1987) Oncofetal expression of Le^x carbohydrate antigens in human colonic adenocarcinomas. J. Biol. Chem., **262**, 11331-11338

HORIUTI, Y., NAKAMURA, T. and ICHIHARA, A. (1982) Role of serum in maintenance of functional hepatocytes in primary culture. J. Biochem (Tokyo), **92**, 1985-1994

HUEBERS, H.A., HUEBERS, E., FINCH, C.A. and MARTIN, A.W. (1982) Characterisation of an invertebrate transferrin from the crag Cancer magister (arthropoda). J. Comp. Physiol., **148**, 101-109

HUNT, L.A. and WRIGHT, S.E. (1985) Both acidic-type and neutral-type asparaginyoligosaccharides of host-cell glycoproteins are

altered in Rous-sarcoma-virus-transformed chick-embryo fibroblasts. Biochem. J. , **229**, 441-451

IDZERDA, R.L., HUEBERS, A., FINCH, C.A. and MAC KNIGHT, C.S. (1986) Rat transferrin gene expression tissue specificity and regulation by iron deficiency. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 2723-2727

II, I., KIMURA, I. and OGAWA, E. (1982) A myotrophic protein from chick embryo extract : its purification, identity to transferrin, and indispensability for avian myogenesis. Dev. Biol., **94**, 366-377

ISHIZAWA, K. (1989) Regulation of the IgE antibody response. Int. Arch. Allergy. Immun., **88**, 8-13

IWASA, F., GALBRAITH, R.A. and SASSA, S. (1988) Effects of dimethyl sulphoxide on the synthesis of plasma proteins in the human hepatoma HepG2. Induction of an acute-phase-like reaction. Biochem. J., **253**, 927-930

JABBAL, I. and SCHACHTER, H. (1971) Pork liver guanosine diphosphate-L-fucose glycoprotein fucosyltransferases. J. Biol. Chem., **246**, 5154-5161

JAEKEN, J., STIBLER, H. and HAGBERG, B. (1991) The Carbohydrate-Deficient Glycoprotein Syndrome. A new inhibited multisystemic disease with severe nervous system involvement. Acta Paediatr. Scand. Suppl, **375**

JAMIESON, J.C., LAMMERS, G., JANZEN, R. and WOLOSKI, B.M. (1987) The acute phase response to inflammation : the role of monokines in changes in liver glycoproteins and enzymes of glycoprotein metabolism. Comp. Biochem. Physiol. (B), **87**, 5

JAMIESON, J.D. and PALADE, G.E. (1968) J. Cell. Biol., **39**, 589-603

JELTSCH, J.M. and CHAMBON, P. (1982) The complete nucleotide sequence of the chicken ovotransferrin mRNA. Eur. J. Biochem., **122**, 291-295

JOHANSSON, B. (1960) Isolation of iron containing red protein from human milk. Acta. Chem. Scand., **14**, 510-512

KAPADIA, A., FEIZI, T. and EVANS, M.J. (1981) Changes in the expression and polarization of blood group I and i antigens in post-implantation embryos and teratocarcinomas of mouse associated with cell differentiation. Exp. Cell. Res., **131**, 185-195

KAPLAN, H.A., WOLOSKI, B.M., HELLMAN, M. and JAMIESON, J.C. (1983) Studies on the effect of inflammation on rat liver and serum sialyltransferase. Evidence that inflammation causes release of Gal β 1,4GlcNAc α 2,6 sialyltransferase from liver. J. Biol. Chem., **258**, 11505-11509

KEHRL, J.H., WAKEFIELD, L.M., ROBERTS, A.B., JAKOWLEW, S., ALVAREZ-MON, M., DERYNCK, R., SPORN, M.B. and FAUCI, A.S. (1986) Production of transforming growth factor β by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. J. Exp. Med., **163**, 1037-1050

KERCKAERT, J.P. and BAYARD, B. (1982) Glycan uniformity within molecular variants of transferrin with distinct affinity for concanavalin A. Biochem. Biophys. Res. Commun., **105**, 1023-1030

KERCKAERT, J.P., BAYARD, B. and BISERTE, G. (1979) Microheterogeneity of alpha-fetoprotein in patient serum as demonstrated by lectin affino-electrophoresis. Scand. J. Immunol., **14**, 15-20

KHATRA, B.S., HERNIS, D.G. and BREW, K. (1974) Some kinetic properties of human-milk galactosyl transferase. Eur. J. Biochem., **44**, 537-543

KISHIMOTO, T. and HIRANO, T. (1988) A new interleukin with pleiotropic activities. BioEssays, **9**, 11-15

KNOWLES, B.B., HOWE, C.C. and HADEN, H.P. (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. Science, **209**, 497-499

KOBATA, A. (1984) Biology of carbohydrates. Ed. V. Ginsburg, P.W. Robbins, **Vol 2**, chapter 2. New York : Wiley, 87-161

KOJ, A. (1984) Metabolic studies of acute-phase proteins. In "Pathophysiology of plasma protein metabolism" (Mariani, E., ed). New York : Macmillan, 221-248

KOJ, A., GAULDIE, J., REGOECZI, E., SAUDER, D.N. and SWEENEY, G.D. (1984) The acute-phase response of cultured Rat hepatocytes. System characterisation and the effect of human cytokines. Biochem. J. **224**, 505

KORNFELD, R. and KORNFELD, S. (1980) Structure of glycoproteins and their oligosaccharide units. in "Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans" (Lennarz, W. J., ed) New York and London : Plenum Press, 1-34

KORNFELD, R. and KORNFELD, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Ann. Rev. Biochem., **54**, 631-664

KRUSIUS, T. and FINE, J. (1981) Use of Smith degradation in study of the branching pattern in the complex-type carbohydrate units of glycoproteins. Carbohydr. Res., **90**, 203-214

KRUSIUS, T., FINNE, J. and RAUVALA, H. (1976) The structural basis of the different affinities of two types of ascidic N-glycosidic glycopeptides for concanavalin A-Sepharose. FEBS Lett, **71**, 117-120

KULKARANI, A.B., REINKE, R. and FEIGELSON, P. (1985) Acute-phase mediators and glucocorticoids elevate $\alpha 1$ -acid glycoprotein gene transcription. J. Biol. Chem., **260**, 15386-15389

KUSHNER, I. and MACKIEWICZ, A. (1987) Acute phase proteins as disease markers. Disease Markers, **5**, 1-11

LAURELL, C.B. (1947) Studies on the transportation and metabolism of iron in the body, with special reference to the iron-binding component in human plasma. Acta. Physiol. Scand., **14 Suppl 46**, 1-29

LE, P.T. and MORTENSEN, R.F. (1984) In vitro induction of hepatocyte synthesis of acute phase reaction mouse serum amyloid P-component by macrophages and IL-1. J. Leuk. Biol., **35**, 587

LEBRETON, J.P., DAVEAU, M., HIRON, M., FONTAINE, M., BIOU, D., GILBERT, D. and GUGUEN-GUILLOUZO, C. (1986) Long term biosynthesis of complement component C3 and α -1 acid glycoprotein by adult rat hepatocytes in a co-culture system with an epithelial liver cell-type. Biochem. J., **235**, 421-427

LECLERCQ, Y., SAWATZKI, G., WIERUSZESKI, J.M., MONTREUIL, J. and SPIK, G. (1987) Primary structure of glycans from mouse serum and milk transferrins. Biochem. J., **247**, 571-578

LEE, D.C., Mac KNIGHT, G.S. and PALMITER, R.D. (1980) The chicken transferrin gene. J. Biol. Chem., **255**, 1442-1447

LEE, D.C., Mac KNIGHT, G.S. and PALMITER, R.D. (1978) The action of estrogen and progesterone on the expression of the transferrin gene. J. Biol. Chem. **253**, 3494-3503

LEGER, D. (1987) Etude des relations structure-fonction de la sérotransferrine de Lapin : Influence de la modification de la chaîne peptidique, des glycanes et des sites de fixation du fer sur l'incorporation du métal par les réticulocytes de Lapin. Thèse d'Etat, Lille

LEGER, D., CAMPION, B., DECOTTIGNIES, J.P., MONTREUIL, J. and SPIK, G. (1989) Physiological significance of the marked increased branching of the glycans of human transferrin during pregnancy. Biochem. J., **257**, 231-238

LEGER, D., TORDERA, V. and SPIK, G., DORLAND, L., HAVERKAMP, J. and VLIAGENTHART. J. F. G. (1978) Structure

determination of the single glycan of rabbit serotransferrin by methylation analysis and 360 MHz ^1H NMR spectroscopy. FEBS Lett, **93**, 255-260

LEHLE, L. and BAUSE, E. (1984) Primary structural requirements for N- and O-glycosylation of yeast mannoproteins. Biochim. Biophys. Acta., **799**, 246-251

LE MARER, N., LAUDET, V., SVENSSON, E.C., CAZLARIS, H., VAN HILLE, B., LAGROU, C., STEHELIN, D., MONTREUIL, J., VERBERT, A. and DELANNOY, P. (1992) The c-Ha-ras oncogene induces an increase of the expression of the β -galactoside- α -2,6-sialyltransferase in Rat fibroblasts (FR3T3) cells. Glycobiology, **2**, 49-56

LEVIN, M.J., TUILL, D., UZAM, G., DREYFUS, J.C. and KAHN, A. (1984) Expression of the transferrin gene during development of non hepatic tissues : high level of transferrin mRNA in fetal muscle and adult brain. Biochem. Biophys. Res. Commun., **122**, 212-217

LIANG, T.J. and GRIENINGER, G. (1981) Direct effect of insulin on the synthesis of specific plasma proteins : biphasic response of hepatocytes cultured in serum- and hormone-free medium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 6972-6976

LIU, C.K., SCHMIED, R., SCHREIBER, C., ROSEN, A., QIAN, G.X. and WAXMAN, S. (1983) Glycosyltransferase alterations are cell type related when human promyelotic leukemia (HL-60) cells are treated with various inducers of differentiation. Exp. Hematol., **11**, 738-746

LODISH, H.F. and KONG, N. (1984) Glucose removal from N-linked oligosaccharides is required for efficient maturation of certain secretory glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the golgi complex. J. Cell. Biol., **98**, 1720-1729

LOTAN, R., LOTAN, D. and AMOS, B. (1988) Enhancement of sialyltransferase in two melanoma cell lines that are growth inhibited by retinoic acid results in increased sialylation of different cell surface glycoproteins. Exp. Cell. Res., **177**, 284-294

LOUACHE, F., TESTA, U., PELICCI, P., THOMOPOULOS, P., TITEUX, M. and ROCHANT, H. (1984) Regulation of transferrin receptors in human hematopoietic cell lines. J. Biol. Chem., **259**, 11576-11582

LUM, J.B., INFANTE, A.J., MAKKER, D.M. and BOWMAN, B.H. (1986) Transferrin synthesis by inducer T lymphocytes. J. Clin. Invest., **77**, 841-849

Mac FARLANE, I.G. (1983) Hepatic clearance of serum glycoproteins. Clin. Sci., **64**, 127-135

Mac GILLIVRAY, R.T.A and BREW, K. (1975) Transferrin : internal homology in the amino acid sequences. Science, **190**, 1306-1307

Mac GILLIVRAY, R.T.A., MENDEZ, E. and BREW, K. (1977) Structure and evolution of serum transferrin. In "Proteins of Iron metabolism" (E.B. Aisen, J. Felding and R.R. Crichton, eds) Grune and Stratton, New York, 133-141

Mac GILLIVRAY, R.T.A., MENDEZ, E., SHEWALE, J.G., SINHA, S.K., SUTTON, M.A., LINEBACK-ZINS, J. and BREW, K. (1983) The primary structure of human serum transferrin. The structure of seven cyanogen bromide fragments and the assembly of the complete structure. J. Biol. Chem., **258**, 3543-3553

Mac GILLIVRAY, R.T.A., MENDEZ, E., SINHA, S.K., SUTTON, M.A., LINEBACK ZINS, J. and BREW, K. (1982). The complete amino sequence of human serum transferrin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 2504-2508

MACKIEWICZ, A. and BREBOROWICZ, J. (1980) The in vitro production of alpha fetoprotein variants by human fetal organs. Oncodev. Biol. Med., **1**, 251-261

MACKIEWICZ, A., DEWEY, M.J., BERGER, F.G. and BAUMANN, H. (1991) Acute phase mediated change in glycosylation of rat α 1-acid glycoprotein in transgenic mice. Glycobiology, **1**, 265-269

MACKIEWICZ, A., GANAPATHI, M.K., SCHULTZ, D., BRABENEC, A., WEINSTEIN, J., KELLEY, M.F. and KUSHNER, I. (1990) Transforming growth factor β 1 regulates production of acute phase proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**, 1491-1495

MACKIEWICZ, A., GANAPATHI, M.K., SCHULTZ, D. and KUSHNER, I. (1987a) Monokines regulate glycosylation of acute phase proteins. J. Exp. Med., **166**, 253-258

MACKIEWICZ, A., JAKUBECK, P., SAJDAK, S. and BREBOROWICZ, J. (1984) Microheterogeneity forms of alpha-fetoprotein present in amniotic fluid. Placenta, **5**, 373-380

MACKIEWICZ, A., KAHN, M.A., REYNOLDS, T.L., VANDER LINDEN, S. and KUSHNER, I. (1989a). Serum IgA, acute phase proteins, and glycosylation of α 1-acid glycoprotein in ankylosing spondylitis. Ann. Rheum. Dis., **48**, 99-103

MACKIEWICZ, A. and KUSHNER, I. (1989b) Interferon β ₂/B-cell stimulating factor 2/interleukin-6 affects glycosylation of acute phase proteins in human hepatoma cell lines. Scand. J. Immunol., **29**, 265-271

MACKIEWICZ, A. and KUSHNER, I. (1989c) Role of IL-6 in acute phase protein glycosylation. Ann. NY. Acad. Sci., **557**, 515-517

MACKIEWICZ, A. and KUSHNER, I. (1990) Transforming growth factor β 1 influences glycosylation of α 1-protease inhibitor in human hepatoma cell lines. Inflammation, **14**, 485-497

MACKIEWICZ, A., MACINKOWSKA-PIETA, R., BALLOU, S., MACKIEWICZ, S. and KUSHNER, I. (1987b). Microheterogeneity of alpha-1-acid glycoprotein in detection of intercurrent infection in systemic lupus erythematosus. Arthritis. Rheum, **30**, 513-518

MACKIEWICZ, A., PAWLOWSKY, T., MACKIEWICZ-PAWLOWSKA, A., WIKTOROWICZ, K. and MACKIEWICZ, S. (1987c). Microheterogeneity

forms of alpha-1-acid glycoprotein as indicators of rheumatoid arthritis activity. Clin. Chim. Acta, **163**, 185-190

MACKIEWICZ, A., SCHULTZ, D., MATHISON, J., GANAPATHI, M.K. and KUSHNER, I. (1989d). Effect of cytokines on glycosylation of acute phase proteins in human hepatoma cell lines. Clin. Exp. Immunol., **75**, 70-75

MAEDA, K., Mac KENZIE, H.A. and SHAW, D.C. (1980) Nature of the heterogeneity within genetic variants of bovine serum transferrin. Anim. Blood. Grps. Biochem. Genet., **11**, 63-75

MARSHALL, R.D. and NEUBERGER, A. (1970) Aspects of the structure and metabolism of glycoproteins. Adv. Carbohydr. Chem., **25**, 407-478

MARTIN, A.W., HUEBERS, E. AND WEBB, J. (1983) in "Proteins of Iron Storage and Transport" (I. Urushizaki, P. Aisen, I. Listowski and J.W. Drysdale, eds.) Elsevier Biomedical, New york, 259-260

MÄRZ, L., HATTON, M.W.C., BERRY, L.R. and REGOECZI, E. (1982). The structural heterogeneity of the carbohydrate moiety of desialylated human transferrin. Can. J. Biochem., **60**, 624-630

MAZURIER, J., AUBERT, J.P., LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. and SPIK, G. (1976) Comparative circular dichroism studies of iron-free and iron-saturated forms of human serotransferrin and lactotransferrin. FEBS Lett., **66**, 238-242

MAZURIER, J., DAUCHEZ, M., VERGOTEN, G., MONTREUIL, J. and SPIK, G. (1991) Modélisation moléculaire des glycannes : structure tridimensionnelles et interaction avec la fraction protéique., L'exemple de la sérotransferrine de lapin. C. R. Acad. Sci. Paris, t. **313**, Série III, 7-14

MEGAW, J.M. and JOHNSON, L.D. (1979) Glycoprotein synthesized by cultured cells : effects of serum concentrations and buffer on sugar content. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **161**, 60-65

MENEZES-FERREIRA, M.M., PETRICK, P.A. and WEINTRAUB, B.D. (1986) Regulation of thyrotropin (TSH) bioactivity by TSH-releasing hormone and thyroid hormone. Endocrinology, **118**, 2125-2130

MIZUOCHI, T., NISHIMURA, R., DERAPPE, C., TANIGUCHI, T., HAMAMOTO, T., MOCHIZUKI, M. and KOBATA, A. (1983) Structures of the asparagine-linked sugar chains of human chorionic gonadotropin produced in choriocarcinoma. J. Biol. Chem., **258**, 14126-14129

MONTREUIL, J. (1975) Recent data on the structure of the carbohydrate moiety of glycoproteins. Metabolic and biological implications. Pure and Appl. Chem., **42**, 431-477

MONTREUIL, J. (1980) Primary structure of glycoprotein glycans. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., **37**, 157-223

MONTREUIL, J. (1982) Glycoproteins. in "Comprehensive Biochemistry", (Neuberger, A., van Deenen, L.L.M., eds), Elsevier Scientific Publishing Compagny, Amsterdam, Oxford, N.Y., **19 B** part II, 1-188

MONTREUIL, J. (1984) Spatial conformation of glycans and glycoprotein. Biol. Cell., **51**, 115-132

MONTREUIL, J., DEBRAY, H., DEBEIRE, P. and DELANNOY, P. (1983) Lectins as oligosaccharide receptors glycoproteins. in "Structural Carbohydrate in the Liver" (Popper, H., Reutter, W., Gudat, F. and Köttgen, e., eds.), 239-258, MPT Press Limited, Boston

MONTREUIL, J. et MULLET, S. (1960) Isolement d'une lactosidérophiline du lait de Femme. C. R. Acad. Sci. Paris, **250**, 1736-1737

MONTREUIL, J. and SPIK, G. (1975) Comparative studies of carbohydrate and protein moieties of human serotransferrin and lactotransferrin. in "Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medecine" (R. R. Crichton, ed.) Elsevier North Holland, Amsterdam, 27

MONTREUIL, J., SPIK, G. et CHOSSON, A. (1962) Recherche sur la structure des glycoprotéides. III Identification chromatographique de la N-acétyl-lactosamine dans les hydrolysats de divers glycoprotéides. Hypothèse de l'existence d'un schéma général de structure des glycoprotéides. C. R. Acad. Sci. Paris, **255**, 3493

MONTREUIL, J., TONNELAT, J. and MULLET, S. (1960) Préparation et propriétés de la lactosidérophiline (lactotransferrine) du lait de Femme. Biochim. Biophys. Acta., **45**, 413-421

MORGAN, E.H. (1981)

In "Molecular aspects of medicine", Oxford, Bergamon Press, 1-123

MOSKAL, J.R., LOCKNEY, M.W., MARVEL, C.C., TROSKO, J.E. and SWEELEY, C.C. (1987) Effects of retinoic acid and phorbol-12-myristate-13-acetate on glycosyltransferase activities in normal and transformed cells. Cancer Res, **47**, 787-790

NAGY, B. and LEHRER, S.S. (1972) Circular dichroism of iron, copper, and zinc complexes of transferrin. Arch. Biochem. Biophys., **148**, 27-36

NARASIMHAM, S. (1982) Control of glycoprotein synthesis. UDP-GlcNAc : glycopeptide β 4-N-acetylglucosaminyltransferase III, an enzyme in hen oviduct which adds GlcNAc in β -4 linkage to the β -linked mannose of the trimannosyl core of N-glycosyl oligosaccharides. J. Biol. Chem., **257**, 10235-10242

NARASINHAM, S., STANLEY, P. and SCHACHTER, H. (1977) Control of glycoprotein synthesis. Lectin mutant resistant mutant containing only one of two distinct N-acetylglucosaminyltransferase activities present in wild type Chinese hamster ovary cells. J. Biol. Chem., **252**, 3926-3933

NICOLLET, I., LEBRETON, J.P., FONTAINE, M. and HIRON, M. (1981) The use of Concanavalin A crossed immuno-affinoelectrophoresis to detect hormone-associated variations in α_1 acid glycoprotein. Clin. Chim. Acta., **109**, 59-67

OGATA, S.I., PLURAMATSU, J. and KOBATA, A. (1976) New structural characteristic of the large glycopeptides from transformed cells. Nature, **259**, 580-582

OHKAWA, K., ABE, T., TSUKUDA, Y., TAKETA, K., KIMUA, E. and TERASHIMA, Y. (1989) An improved sensitive assay method for the heterogeneity of α -fetoprotein : possible application for early differential diagnosis. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., **27**, 337-341

OHKAWA, K., TAKADA, K., TAKIZAKA, N., HATANO, T., TSUKADA, Y. and MATSUDA, M. (1990) Clear cell carcinoma of the human ovary synthesizes and secretes a transferrin with microheterogeneity of lectin affinity. FEBS Lett, **270**, 19-23

OLDEN, K., BERNARD, B.A., HUMPHRIES, M.J., YEOH, T.K., YEO, K.T., WHITE, S., NEWTON, S.A., BAUER, H.C. and PARENT, J.B. (1985) Function of glycoprotein glycans. Trends Biochem Sci, **10**, 78-81

OLDEN, K., PARENT, J.B. and WHITE, S. (1982) Carbohydrate moieties of glycoproteins, a re-evaluation of their functions. Biochim. Biophys. Acta., **650**, 209-232

PAULSON, J.C., WEINSTEIN, J. and SCHAUER, A. (1989) Tissue-specific expression of sialyltransferase. J. Biol. Chem., **264**, 10931-10934

PAWLOWSKI, T., MACKIEWICZ, S. and MACKIEWICZ, A. (1989) Microheterogeneity of alpha-1-acid glycoprotein in the detection in patients of intercurrent infection with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum, **32**, 347-351

PEPYS, M.B. and BALTZ, M.L. (1983) Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. Adv. Immunol., **34**, 141-211

PERLMUTTER, D.H., DINARELLO, C.A., PUNSAL, P.I. and COLTEN, H.R. (1986) Cachectin/tumor necrosis factor regulates hepatic acute phase gene expression. J. Clin. Invest., **78**, 1349-1354

PETREN, S. (1987) Determination of transferrin isoproteins in human cerebrospinal fluid using isoelectric focusing zone immunoelectrophoresis assay. Electrophoresis, **8**, 515-517

PHILLIPS, M.E. and THORBECKE, G.J. (1966) Studies on the serum proteins of chimeras. Identification and study of the site of origin of donor type serum proteins in Rat into Mouse chimeras. Int. Arch. Allergy. Apply. Immunol., **29**, 553-558

PIERCE, M. and ARANGO, J. (1986) Rous sarcoma virus-transformed Baby Hamster Kidney Cells express higher levels of Asn-linked tri- and tetra-antennary glycopeptides containing [GlcNAc(β 1-6)Man(α 1-6)Man] and poly-N-acetyllactosamine sequences that Baby Hamster Kidney Cells. J. Biol. Chem., **261**, 10772-10777

PINTO, M., APPAY, M.D., SIMON-ASSMAN, P., CHEVALIER, G., DRACOPOLI, N., FOGH, J. and ZWEIBAUM, A. (1982) Enterocytic differentiation of cultured human colon cancer cells by replacement of glucose by galactose in medium. Biol. Cell., **44**, 193-196

PLANT, P.W., LIANG, T.J., PINDYCK, J. and GRIENINGER, G. (1981) Serum stimulation of plasma protein synthesis in culture is selective and rapidly reversible. Biochim. Biophys. Acta., **655**, 407-412

POS, O., MOSHAGE, H.J., YAP, S.H., SNIDERS, J., AARDEN, L.A., VAN GOOL, J., BOERS, W., BRUGMAN, A.M. and VAN DIJK, W. (1989) Effects of monocytic products, recombinant interleukin-1 and recombinant interleukin-6 on glycosylation of α 1 acid glycoprotein : studies with primary human hepatocyte cultures and rats. Inflammation, **13**, 415-427

POS, O., VAN DIJK, W., LADIGES, N., LINTHORST, C., SALA, M., VAN TIEL, D. and BOERS, W. (1988) Glycosylation of four acute-phase

glycoproteins secreted by rat liver cells in vivo and in vitro. Effects of inflammation and dexamethasone. Eur. J. Cell. Biol., **46**, 121-128

RADEMACHER, T.W., PAREKH, R.B. and DWEK, R.A. (1988) Glycobiology. Ann. Rev. Biochem., **57**, 785-838

RAMADORI, G. , SIPE, J.D., DINARELLO, C.A., MITZEL, S.B. and COLTEN, H.R. (1985) Pretranslational modulation of acute phase hepatic protein synthesis by murine recombinant interleukin 1 (IL-1) and purified human IL-1. J. Exp. Med., **162**, 930-942

RAYNES, J. (1982) Variation in the relative proportions of microheterogeneous forms of plasma glycoproteins in pregnancy and disease. Biomedecine, **36**, 77-86

REGOECZI, E., CHINDEMI, P.A. and DEBANNE, M.T. (1984) Transferrin glycans : A possible link between alcoholism and hepatic siderosis. Alcohol. Clin. Exp. Res., **8**, 287-292

REGOECZI, E., CHINDEMI, P.A., RUDOLPH, J.R., SPIK, G. and MONTREUIL, J.M. (1987) The chromatographic heterogeneity of rat transferrin on immobilized concanavalin A and lentil lectin. Biochem. Cell. Biol., **65**, 948-954

REITMAN, M.L., TROWBRIDGE, I.S. and KORNFELD, S. (1982) A lectin-resistant mouse lymphoma cell line is deficient in glucosidase II, a glycoprotein-processing enzyme. J. Biol. Chem., **257**, 10357-10363

RENFREE, M.B. and Mac LAREN, A. (1974) Foetal origin of transferrin in mouse amniotic fluid. Nature, **252**, 159-161

RICHARDS, C., GAULDIE, J. and BAUMANN, H. (1991) Cytokine control of acute phase protein expression. Eur. Cytokine. Net., **2**, 89-98

RONIN, C. and FENOUILLET, E., HOVSEPIAN, S. and FAYET, G. and FOURNET, B. (1986) Regulation of thyroglobulin glycosylation. J. Biol. Chem., **261**, 7287-7293

ROTHMAN, J.F., MILLER, R.L. and URBANI, L.J. (1984a) Intercompartmental transport in the golgi complex is a dissociative process : facile transfer of membrane protein between two golgi populations. J. Cell. Biol., **99**, 260-271

ROTHMAN, J.F., URBANI, L.J. and BRANDS, R. (1984b) Transport of protein between cytoplasmic membranes of fused cells : correspondence to process reconstituted in a cell-free system. J. Cell. Biol., **99**, 248-259

RUDOLPH, N.S., OHLSSON-WILHEM, B.M. and LEARY, J.F. (1985) Regulation of K 562 transferrin receptors by exogenous iron. J. Cell. Physiol., **122**, 441-450

RUOSLAHTI, E., ENGWALL, E., PEKKALA, A. and SEPPÄLÄ, M. (1978) Developmental changes in carbohydrate moiety of human alpha-fetoprotein. Int. J. Cancer., **22**, 515

SAIRAM, M.R. (1989) Role of carbohydrate in glycoprotein hormone signal transduction. FASEB. J., **3**, 1915-1926

SAKAMOTO, J., FURUKAWA, K., CORDON-CARDO, C., YIN, B.W.T., RETTIG, W.J., OETTGEN, H.F., OLD, L.J. and LLOYD, K.O. (1986) Expression of Lewis^a, Lewis^b, X, and Y blood group antigens in human colonic tumors and normal tissue and in human tumor-derived cell lines. Cancer. Res., **46**, 1553-1561

SASAK, W., HERSCOVICS, A. and QUARONI, A. (1982) Cell density-dependent changes in cell-surface glycopeptides and in adhesion of cultured intestinal epithelial cells. Biochem. J., **201**, 359-366

SATO, G. (1975) in "Biochemical Action of Hormones" (Litwack, G., ed.), **vol III**, 391-396, Academic Press, New york.

SCHACHTER, H. (1986) Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein bound oligosaccharides. Biochem. Cell. Biol., **64**, 163-181

SCHACHTER, H. and ROSEMAN, S. (1980) Mammalian glycosyltransferases. Their role in the synthesis and function of complex carbohydrates and lipids. in "Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans" Lennarz, W.J. (eds), Plenum Press. New York, 85-160

SCHADE, A.L. and CAROLINE, L. (1944) Raw hen egg white and the role of iron in growth inhibition of *Shigelle dysenteria*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. Science, **100**, 14-15

SCHADE, A.L. and CAROLINE, L. (1946) An iron binding component of human blood plasma. Science, **104**, 340-341

SCHAUER, R. (1988) Sialic acids as antigenic determinants of complex carbohydrates. Adv. Exp. Med. Biol., **228**, 47-72

SCHELLENBERG, F., BENARD, J.Y., LE GOFF, A.M., BOURDIN, C. and WEILL, J. (1989) Evaluation of carbohydrate-deficient transferrin compared with Tf Index and other markers of alcohol abuse. Alcohol. Clin. Exp. Res., **13**, 605-610

SCHMID, K., BINETTE, J.P., DORLAND, L., VLIEGENTHART, J.F.G., FOURNET, B. and MONTREUIL, J. (1979) The primary structure of the asialo-carbohydrate units of the first glycosylation site of human plasma α 1-acid glycoprotein. Biochim. Biophys. Acta., **581**, 356-359

SCHULTZE, H.E., SCHMIDTBERGER, R. and HAUPT, H. (1958) Determination of the carbohydrate components of plasma proteins. Biochem. Z., **329**, 490

SELL, S. and BECKER, F.F. (1978) J. Natl. Cancer. Inst., **60**, 19-26

SERBOURCE-GOGUEL, N., CORBIC, M., ERLINGER, S., DURAND, G., AGNERAY, J. and FEGER, J. (1983) Measurement of serum α 1-acid glycoprotein and α 1-antitrypsin desialylation in liver disease. Hepatology, **3**, 326-359

SERBOURCE-GOGUEL SETA, N., DURAND, G., CORBIC, M., AGNERAY, J. and FEGER, J. (1986) Alterations in relative proportions

of microheterogenous forms of human α 1-acid glycoprotein in liver disease. J. Hepatol., **2**, 245-252

SETA, N., GIAI-BRUERI, M., DURAND, G. and FEGER, J. (1989) Glycoforms of serum α 1-acid glycoprotein (AGP) in patients with mediastinal infection.

SHAPIRO, L.E. and WAGNER, N. (1989) Transferrin is an autocrine growth factor secreted by Reuber H-35 cells in serum-free culture. In vitro Cell Dev. Biol., **25**, 650-654

SHIBUYA, N., GOLDSTEIN, I.J., BROEKAERT, W.F., NSIMBA-LUBAKI, M., PEETERS, B. and PNEUMANS, W.J. (1987) The elderberry (Sambucus nigra L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(α 2-6)Gal/GalNAc sequence. J. Biol. Chem., **262**, 1596-1601

SKINNER, M.K., COSAND, W.L. and GRISWOLD, M.D. (1984) Purification and characterisation of testicular transferrin secreted by rat Sertoli cells. Biochem. J., **218**, 313-320

SKINNER, M.K. and GRISWOLD, M.D. (1980) Sertoli cells synthesize and secrete transferrin-like protein. J. Biol. Chem., **255**, 9523-9525

SMETS, L.A. and VAN BEEK, W.P. (1984) Carbohydrates of the tumor cell surface. Biochim. Biophys. Acta., **738**, 237-249

SMITH, C., KELLEHER, P., BELANGER, L. and DALLAIRE, E.L. (1979) Reactivity of amniotic fluid alphafetoprotein with concanavalin A in diagnosis of neural tube defects. Br. Med. J., **1**, 920-925

SNIDER, M.D. (1984) in "Biology of Carbohydrates" (Ginsburg, V. and Robbins, P. W., eds) John Wiley and Sons, New York. **2**, 199-288

SPIK, G. (1968) Etude comparative des propriétés physico-chimiques et de la structure de la transferrine et de le lactotransferrine humaine. Thèse Doctorat ès Science, Lille

SPIK, G. (1982) Structure, conformation and functions of glycans of serum transferrins. In Saltman, P. and Hegenauer, J. (eds). The Biochemistry and Physiology of Iron. 49. (Amsterdam : Elsevier North Holland)

SPIK, G., BAYARD, B., FOURNET, B., STRECKER, G., BOUQUELET, S. and MONTREUIL, J. (1975) Studies on glycoconjugates. LXIV. Complete structure of two carbohydrate units of human serotransferrin. FEBS Lett, **50**, 296-299

SPIK, G., CODDEVILLE, B. and MONTREUIL, J. (1988) Comparative study of the primary structures of sero-, lacto- and ovotransferrin glycans from different species. Biochimie, **70**, 1459-1469

SPIK, G., CODDEVILLE, B., STRECKER, G., MONTREUIL, J., REGOECZI, E., CHINDEMI, P.A. and RUDOLPH, J.R. (1991) Carbohydrate microheterogeneity of rat serotransferrin. Determination of glycan primary structures and characterization of a new type of trisialylated diantennary glycan. Eur. J. Biochem., **195**, 397-405

SPIK, G., DEBRUYNE, V. and MONTREUIL, J. (1983) Alterations of the carbohydrate structure of human serotransferrin in liver diseases. in "Structural Carbohydrates in Liver" (H. Popper, W. Reutter, E. Köttgen et F. Gudat, eds) MPT Press Limited, Proceedings of the 34th Falk Symposium, Basel, 477-483

SPIK, G., DEBRUYNE, V., MONTREUIL, J., VAN HALBEEK, H. and Vliegenthart, J.F.G. (1985) Primary structure of two sialylated triantennary glycans from human serotransferrin. FEBS Lett., **183**, 65-69

SPIK, G., FOURNET, B., BAYARD, B., VANDERSYPPE, R., STRECKER, G., BOUQUELET, S., CHARET, P. and MONTREUIL, J. (1974a) Etudes sur les groupements glycaniques de la séro- et de la lactotransferrine humaine. Arch. Inter. Physiol. Biochim., **82**, 791

SPIK, G., FOURNET, B., and MONTREUIL, J. (1979) Etude de la structure du glycanne de l'ovotransferrine de Poule. C. R. Acad. Sci. Paris, **288**, 967-970

SPIK, G., MONSIGNY, M. et MONTREUIL, J. (1965) Etudes sur les glycoprotéides. XII - Mise en évidence d'une liaison de l'acide aspartique et de la glucosamine dans la transferrine humaine. C. R. Acad. Sci. Paris, **261**, 1137-1139

SPIK, G. et MONTREUIL, J. (1969) Etude sur les glycoprotéines. XXXVIII. Démonstration de la nature N-(β -aspartyl)-N-acétyl-glucosaminyldamine de la liaison glucides-protéine dans la transferrine humaine. Bull. Soc. Chim. Biol., **51**, 1271-1285

SPIK, G., VANDERSYPPE, R., FOURNET, B., BAYARD, B., CHARET, P., BOUQUELET, S., STRECKER, G. and MONTREUIL, J. (1974b) Structure of glycopeptides isolated from human serotransferrin and lactotransferrin. Actes Coll. Intern., CNRS. Paris, **221**, 483-500

SPIRO, M.J. (1980) Preferential response of thyroid glycosyl transferases to changes in thyrotropin stimulation. Arch. Biochem. Biophys., **202**, 35-42

SPIRO, M.J. and SPIRO, R.G. (1979) Glycosylation of proteins by oligosaccharides-lipids. Studies on a thyroid enzyme involved in oligosaccharide transfer and the role of glucose in this reaction. J. Biol. Chem., **254**, 7668-7674

SPIRO, R.G. (1973) Glycoproteins. Adv. Prot. Chem., **27**, 349-467

STALLARD, B.J. and GRISWOLD, M.D. (1990) Germ cell regulation of transferrin mRNA levels. Mol Endocrinol., **4**, 393-401

STAMATOS, C.J., SQUICCIARINI, J. and FINE, R.E. (1983) Chick embryo spinal cord neurons synthesize a transferrin-like myotrophic protein. FEBS Lett., **153**, 387-390

STANELONI, R.J., UGALDE, R.A. and LELOIR, L.F. (1980) Addition of glucose to dolichyl diphosphate oligosaccharide and transfer to protein. Eur. J. Biochem., **105**, 275-278

STANLEY, P. (1987) Glycosylation mutants and the functions of mammalian carbohydrate. Trends Imm. Genet, **3**, 77-81

STANLEY, P., NARASIMHAM, S., SIMINOVITCH, L. and SCHACHTER, H. (1975) Chinese Hamster Ovary Cells selected for resistance to the cytotoxicity of phytohemagglutinin are deficient in a UDP-N-acetylglucosamine-glycoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 3323-3327

STARK, N.J. and HEATH, E.C. (1979) Glucose-dependent glycosylation of secretory glycoprotein in mouse myeloma cells. Arch. Biochem. Biophys., **192**, 599-609

STIBLER, H. and BORG, S. (1981) Evidence of a reduced sialic acid content in serum transferrin in male alcoholics. Alcohol. Clin. Exp. Res., **5**, 545-549

STIBLER, H. and BORG, S. (1986a) Carbohydrate composition of serum transferrin in alcoholic patients. Alcohol. Clin. Exp. Res., **10**, 61-64

STIBLER, H. and BORG, S. (1986b) Glycoprotein sialyl- and galactosyltransferase activities in erythrocyte membrane in alcoholic patients and healthy controls. Drug. Alcohol. Depend., **16**, 331-340

STIBLER, H. and BORG, S., JOUSTRA, M. and HULTCRANRZ, R. (1987) Analysis of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in serum in relation to alcohol consumption. Proceeding of the IXth International Symposium on the Glycoconjugates (J. Montreuil, A. Verbert, G. Spik and B. Fournet, eds) Lille, France.

STIBLER, H. and HULTCRANTZ, R. (1987) Carbohydrate-deficient transferrin in serum in patients with liver diseases. Alcohol. Clin. Exp. Res., **11**, 468-473

STIBLER, H., JAEKEN, J. and KRISTIANSOON, B. (1991) Biochemical characteristics and diagnosis of the Carbohydrate-Deficient Glycoprotein syndrome. Acta Paediatr. Scand. Suppl., **375**, 21-31

STRATIL, A., TOMASEK, V., BOBACK, P. and GLASNAK, V. (1984) Heterogeneity of horse transferrin : the role of carbohydrate moiety. Animal. Blood. Grps. Biochem. Genet., **15**, 89-101

TAKASAKI, S., IKEHIRA, H. and KOBATA, A. (1980) Increase of asparagine-linked oligosaccharides with branched outer chains caused by cell transformation. Biochem. Biophys. Res. Commun., **92**, 735-742

TAKETA, K., ICHIKAWA, E., TAGA, H. and HIRAI, H. (1985) Antibody-affinity blotting, a sensitive technique for the detection of α -fetoprotein separated by lectin affinity electrophoresis in agarose gels. Electrophoresis, **6**, 492-497

THIBODEAU, S.N., LEE, D.C. and PALMITER, R.D. (1978) Identical precursors of serum transferrin and egg white conalbumin. J. Biol. Chem., **253**, 3771-3774

THOMPSON, S. and TURNER, G.A. (1987) Elevated levels of abnormally-fucosylated haptoglobins in cancer sera. Br. J. Cancer., **56**, 605-610

TOMIMATSU, Y. and VICKERY, L.E. (1972) Circular dichroism studies of human serum transferrin and chicken ovotransferrin and their cooper complexes. Biochim. Biophys. Acta., **285**, 72-83

TREUHEIT, M. and HALSALL, H.B. (1991) Glycan composition at the five glycosylation sites in human α 1-acid glycoprotein (OMD) in health and disease. Glycoconjugate J, (Abstracts of the 11th International Symposium on Glycoconjugate), **8**, 251

TSUTSUMI, M., SKINNER, M.K. and SANDERS-BUSH, E. (1989) Transferrine gene expression and synthesis by cultured chorioid plexus epithelial cells. Regulation by serotonin and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. J. Biol. Chem., **264**, 9626-9631

TURCO, S. J. (1980) Modification of oligosaccharide-lipid synthesis and protein glycosylation in glucose-deprived cells. Arch. Biochem. Biophys., **205**, 330-339

TURCO, S. J., STETSON, B. and ROBBINS, P.W. (1977) Comparative rates of transfer of lipid-linked oligosaccharides to endogenous glycoprotein acceptors in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 4411-4414

UZAN, G., FRAIN, M., PARK, I., BESMOND, C., MAESSEN, G., TREPAT; J.S., ZAKIN; M.M. and KAHN, A. (1984) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human transferrin. Biochem. Biophys. Res. Commun., **119**, 273-281

VAN BEEK, W.P., SMETS, L.A. and EMMELOT, P. (1975) Changed surface glycoprotein as marker of malignancy in human leukaemic cells. Nature, **253**, 457-460

VAN DIJK, W., POS, O., VAN DER STELT, M.E., MOSHAGE, H.J., YAP, S.H., DENTE, L., BAUMANN, P. and EAP, C.B. (1991) Inflammation-induced changes in expression and glycosylation of genetic variants of α 1-acid glycoprotein. Biochem. J., **276**, 343-347

VAN DIJK, W., BOERS, W. and SALA, M., LASTHUIS, A-M. and MOOKERJEA, S. (1986) Activity and secretion of sialyltransferase in primary monolayer cultures of rat hepatocytes cultured with and without dexamethasone. Biochem. Cell. Biol., **64**, 79-84

VAN EIJK, H.G., VAN NOORT, W.L., DUBELLAR, M.L. and VAN DER HEUL, C. (1983) The microheterogeneity of human transferrins in biological fluids. Clin. Chim. Acta., **132**, 167-171

VAUGHAN, L., LORIER, M.A. and CARELL, R.W. (1982) α 1-antitrypsin microheterogeneity isolation and physiological significance of isoforms. Biochim. Biophys. Acta., **701**, 339-345

VENTURA, M., BASTOS-ARRAGO, J. and IKEMOTO, H. (1973) Conformation of human serum transferrin. An. Acad. Brasil. Ciênc., **45**, 449-453

WANG, W.C.H. and CUMMINGS, R.D. (1988) The immobilized leucoagglutinin from the seeds of Maackia amurensis binds with high

affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked α -2,3 to penultimate galactose residue. J. Biol. Chem., **263**, 4576-4585

WANG, X.C., O'HANLON, T.P. and LAU, J.T.Y. (1989) Regulation of β -galactoside α 2,6-sialyltransferase gene expression by dexamethasone. J. Biol. Chem., **264**, 1854-1859

WANG, X.C., SMITH, T.J. and LAU, J.T.Y. (1990) Transcriptional regulation of the liver β -galactoside α 2,6 sialyltransferase by glucocorticoids. J. Biol. Chem., **265**, 17849-17853

WARD, J.H., JORDAN, I., KUSHNER, J.P. and KAPLAN, J. (1984) Regulation of HeLa cell transferrin receptors. J. Biol. Chem., **257**, 10317-10323

WELLS, C., BOG-HANSEN, T.C., COOPER, E.H. and GLASS, M.R. (1981) The use of Concanavalin A crossed immuno-affinoelectrophoresis to detect hormone-associated variations in α 1-acid glycoprotein. Clin. Chim. Acta., **109**, 59-67

WEST, C.M. (1986) Current ideas on the significance of protein glycosylation. Mol. Cell. Biochem., **72**, 3-20

WIELAND, F., DOMPERT, W., BENHARD, G. and SUMPLER, M. (1980) Halobacterial glycoprotein saccharides contain covalently linked sulphate. FEBS Lett., **120**, 110-114

WILLIAMS, J. (1962a) A comparison of conalbumin and transferrin in the domestic fowl. Biochem. J., **83**, 355-364

WILLIAMS, J. (1962b) Serum proteins and the livetins of hen's-egg yolk. Biochem. J., **83**, 346-355

WILLIAMS, J. (1968) Comparison of glycopeptides from the ovotransferrin and serum transferrin of the hen. Biochem. J., **108**, 57-61

WILLIAMS, J., ELLMAN, T.C., KINGSTON, I.B., WILKINS, A.G. and KUHN, K.A. (1982) The primary structure of hen ovotransferrin. Eur. J. Biochem., **122**, 297-300

WILSON, J.R., WILLIAMS, D. and SCHACHTER, H. (1976) The control of glycoprotein synthesis : N-acetylglucosamine linkage to a mannose residue as a signal for the attachment of L-fucose to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue of glycopeptide from α 1-acid glycoprotein. Biochem. Biophys. Res. Commun., **72**, 909-916

WINZLER, R.J. (1965) Metabolism of glycoprotein. Clin. Chim. Acta., **11**, 329-347

WOLF, G. (1984) Multiple functions of vitamin A. Physiol. Rev., **64**, 873-937

WOLOSKI, B.M., FULLER, G.M., JAMIESON, J.C. and GOSPODAREK, E. (1986) Studies on the effect of the hepatic-stimulating factor on galactose-beta 1-4-N-acetyl-glucosamine alpha 2-6-sialyltransferase in cultured hepatocytes. Biochim. Biophys. Acta., **885**, 185

WOLOSKI, B.M., GOSPODAREK, E. and JAMIESON, J.C. (1985a) Studies of monokines as mediators of the acute phase response : effects on sialyltransferase, albumin, α 1-acid glycoprotein and β -N-acetylhexosaminidase. Biochem. Biophys. Res. Commun., **130**, 30-36

WOLOSKI, B.M., SMITH, E.M., MEYER, W.J., FULLER, G.M. and BLALOCK, J.E. (1985b) Corticotropin-releasing activity of monokines. Science, **230**, 1035-1037

WONG, G.G. and CLARK, S.C. (1988) Multiple actions of interleukin 6 within a cytokine network. Immunology Today, **9**, 137-139

WONG, K.L., DEBANNE, M.T., HATTON, M.W.C. and REGOECZI, E. (1978) Human transferrin, asialotransferrin and the intermediate forms. Int. J. Peptide. Protein. Res., **12**, 27-37

WOODBURRY, R.G., BROWN, J.P., YEH, M.Y., HELLSTRÖM, I. and HELLSTRÖM, K.E. (1980) Identification of a cell surface protein, p97, in human melanomas and certain other neoplasm. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 2183-2187

XUAN, M., ITZKOWITZ, S.H., PALEKAR, A., SHAMSUDDIN, A.M., PHELPS, P.C., TRUMP, B.F. and KIM, Y.S. (1985) Cancer. Res., **45**, 4499-4511

YAMAMOTO, K., TSUJI, T., TARUTANI, O. and OSAWA, T. (1984) Structural changes of carbohydrate chains of human thyroglobulin accompanying malignant transformations of thyroid glands. Eur. J. Biochem., **143**, 133-144

YAMASHITA, K., HITOI, A., TANIGUCHI, N., YOKOSAWA, N., TSUKADA, Y. and KOBATA, A. (1983a) Comparative study of the sugar chains of gamma-glutamyltransferases purified from rat liver and rat AH-66 hepatoma cells. Cancer Res., **43**, 5059-5063

YAMASHITA, K., KOIDE, N., ENDO, T., IWAKI, Y. and KOBATA, A. (1989) Altered glycosylation of serum transferrin of patients with hepatocellular carcinoma. J. Biol. Chem., **264**, 2415-2423

YAMASHITA, K., HITOI, A., TSUCHIDA, Y., NISHI, S. and KOBATA, A. (1983b) Sugar chain of alpha-fetoprotein produced in human yolk sac tumor. Cancer. Res., **43**, 4691-4695

YAMASHITA, K., OHKURA, T., TACHIBANA, Y., TAKASAKI, S. and KOBATA, A. (1984) Comparative study of the oligosaccharides released from Baby Hamster Kidney Cells and their polyoma transformant by hydrazinolysis. J. Biol. Chem., **259**, 10834-10840

YAMASHITA, K., TACHIBANA, Y., TAKEUSHI, T. and KOBATA, A. (1981) Structural study of the sugar chains of α -amylases produced ectopically in tumors. J. Biochem., **90**, 1281-1289

YANG, F., LUM, J.B., Mac GILL, J.R., MOORE, C.M., NAYLOR, S.L., VAN BRAGT, P.H., BALDWIN, W.D., and BOWMAN, B.H. (1984)



Human transferrin : cDNA characterization and chromosomal localization.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**, 2752-2756

YEOH, G.C.T. and MORGAN, E.H. (1974) Albumin and transferrin synthesis during development in the Rat. Biochem. J., **144**, 215-224

YEOH, G.C.T., WASSENBURG, J.A., EDKINS, E. and OLIVER, I.T. (1979) Synthesis and secretion of albumin and transferrin by foetal rat hepatocyte cultures. Biochim. Biophys. Acta., **565**, 347-355

YOGESWARREN, G. and SALK, P.L. (1981) Metastatic potentiel is positively correlated with cell-surface sialylation of cultured murine tumor cell lines. Science, **212**, 1514-1516

YOSHIMA, H., MIZUOCHI, T., ISHII, M. and KOBATA, A. (1980) Structure of the asparagine-linked sugar chains of alpha-fetoprotein purified from ascites fluid. Cancer. Res, **40**, 4276-4281

ZISKA, S.E., BHATTACHARJEE, M., HERBER, R.L., QASBA, P.K. and VONDERHAAR, B.K. (1988) Thyroid hormone regulation of α -lactalbumin : differential glycosylation and messenger ribonucleic acid synthesis in mouse mammary glands. Endocrinology, **123**, 2242-2248

ZWEIBAUM. A., PINTO, M., CHEVALIER, G., DUSSAULX, E., TRIADOU, N., LACROIX, B., HAFFEN, K., BRUN, J.L. and ROUSSET, M. (1985) Enterocytic differentiation of subpopulation of the human colon tumor cell line HT 29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. J. Cell. Physiol., **122**, 21-29

APPENDICE TECHNIQUE

TAMPON

TAMPON TBS : Tris Buffered Saline

Tris : 50 mM

NaCl : 150 mM

NaN₃ : 5 mM

Ajuster le pH à 7,8 avec HCl 2N, H₂O q.s.p. 1 litre

A - PREPARATION ET CULTURE DES CELLULES

I - PREPARATION DES HEPATOCYTES EMBRYONNAIRES DE POULET

La préparation des hépatocytes est réalisée selon le procédé décrit par ALTHAUS et al., (1979) et modifié par DELERS et al., (1986).

Les oeufs embryonnés à 16 jours d'incubation sont mirés, nettoyés à l'alcool avant introduction sous la hotte stérile. Le matériel de perfusion : cuve et thermostat pour bain-marie, pompe péristaltique multicanaux sont soigneusement lavés et mis à stériliser par rayonnement U.V sous la hotte pendant la nuit. Les tuyaux et les raccords ainsi que les outils de dissection sont autoclavés à 120° C pendant 30 mn. Toute la préparation des hépatocytes se fait sous la hotte, sous atmosphère stérile. L'installation du matériel de perfusion est représentée dans la figure 36 (p. 201), la préparation des hépatocytes dans la figure 37 (p. 202).

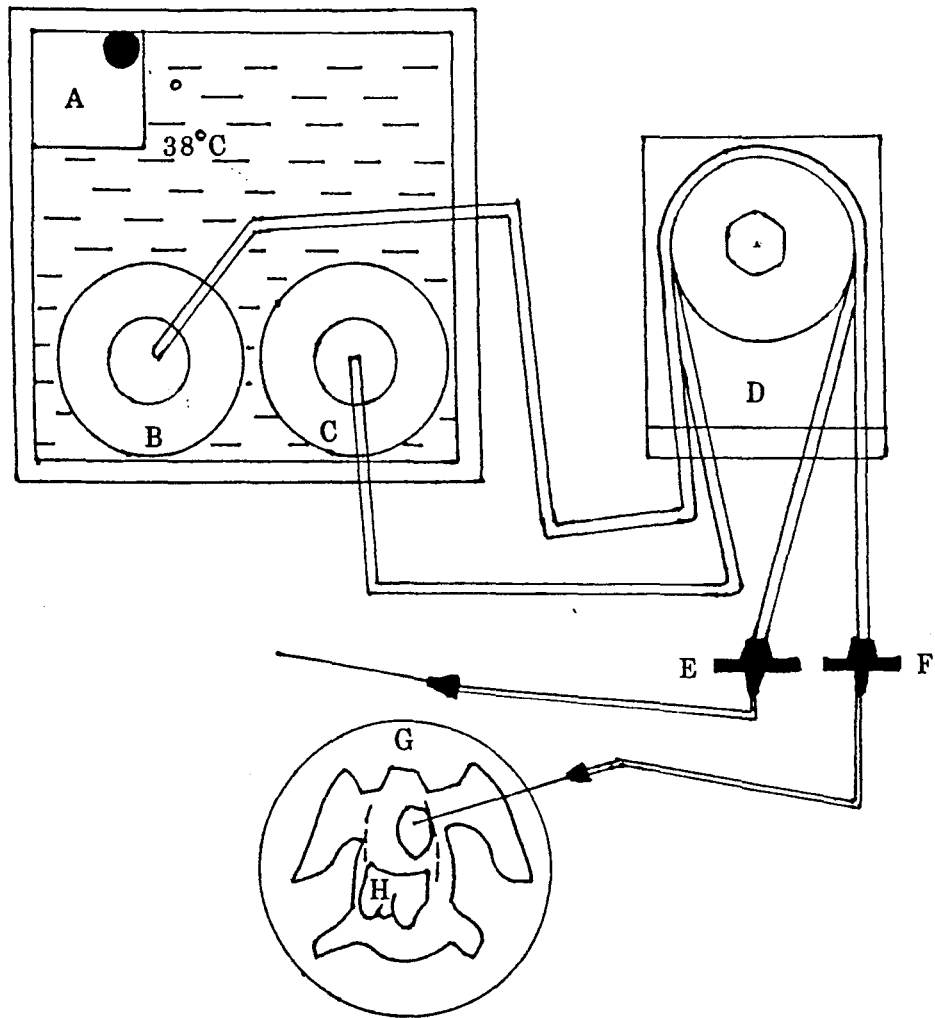


Figure 36 : Montage du système de perfusion

A : Thermostat

B : Flacon contenant le tampon HEPES-EDTA servant à la première perfusion.

C : Flacon contenant la collagénase 0,05 % (w/v) dans le tampon HEPES-calcium.

D : Pompe péristaltique à deux canaux.

E, F : Filtre Millipore (0,22 μ m) faisant office de piège à bulles.

G : Boîte de Pétri stérile contenant l'embryon de Poulet.

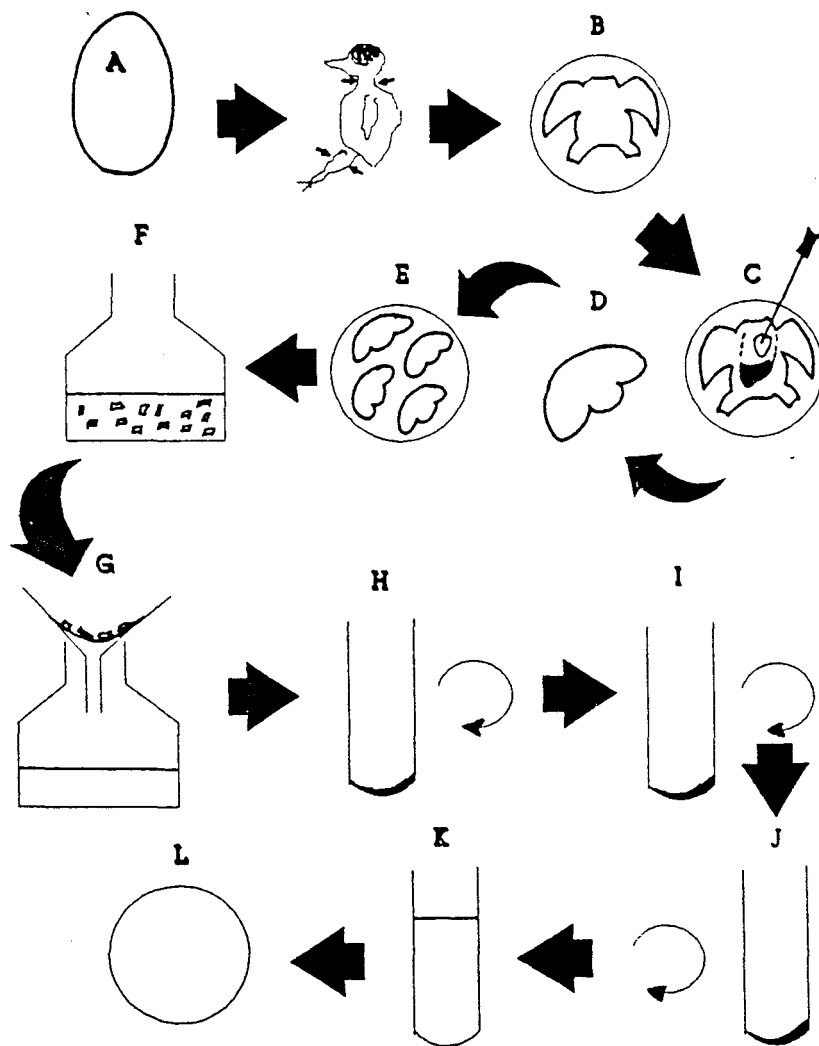


Figure 37 : Préparation des hépatocytes d'embryon de Poulet

- A : Ouverture des oeufs au niveau de la poche à air.
- B : Préparation de l'embryon.
- C : Perfusion.
- D : Nettoyage du foie.
- E : Digestion des foies entiers par la collagénase (20 mn, 37 °C).
- F : Dilacération des foies et dispersions des hépatocytes (30 mn, 37 °C)
- G : Filtration à travers quatre épaisseurs de gaze.
- H : Lavage des hépatocytes.
- I : Lyse différentielle des érythrocytes par la solution hypotonique de Sassa (3 mn).
- J : Nouveaux lavages, comptages,viabilité.
- K,L : Suspension dans le milieu de culture et ensemencement.

1 - Perfusions

L'embryon est extrait de l'oeuf, les membres postérieurs et la tête sont sectionnés. L'embryon est alors déposé dans une boîte de Pétri (60x15mm) où on effectue une dissection pour dégager le coeur et le foie. Deux perfusions à 38° C se succèdent et sont réalisées par voie intra-cardiaque à l'aide d'une aiguille (0,2x55mm) reliée au système de perfusion et enfoncée dans le ventricule gauche. La pompe péristaltique assure un débit de 16 ml/mn. La première perfusion est effectuée avec le tampon HEPES-EDTA (HEPES 30 mM pH 7,4; NaCl 0,15 M; EDTA 2mM; D-glucose 5,5 mM) pendant une minute. Puis une seconde perfusion est réalisée avec le tampon HEPES-Collagénase (HEPES 30 mM pH 7,4; NaCl 0,15 M; D-glucose 5,5 mM; CaCl₂ 2 mM; Collagénase 0,05 % (Sigma)) pendant 30 secondes.

On observe que le foie gonfle et se décolore très rapidement. Si le foie ne blanchit pas ou s'il présente un aspect non uniforme en fin de perfusion, l'embryon est rejeté.

2 - Préparation des cellules isolées

Le foie est prélevé, puis placé dans une solution d'HEPES-calcium (HEPES 30 mM pH 7,4; NaCl 0,15 M; D-glucose 5,5 mM; CaCl₂ 2 mM). Il est débarrassé des fragments d'intestin, du tissu conjonctif et de la vésicule biliaire. Après un lavage supplémentaire dans le tampon HEPES-calcium, les foies sont placés en attente dans une boîte de Pétri de 60 mm de diamètre contenant 10 ml de solution HEPES-collagénase. Quand 8 à 12 foies ont été prélevés, la boîte est incubée à 37° C durant 20 mn. Les foies sont ensuite dilacérés et les fragments, repris à l'aide de 5 ml supplémentaires de la solution de

collagénase, sont placés dans un flacon de Roux de 25 cm² maintenu à plat dans l'incubateur à 37° C. A intervalles réguliers de 10 mn, on effectue 2 à 3 dispersions à l'aide d'une pipette en verre de 10 ml. La suspension obtenue est ensuite filtrée à travers 4 épaisseurs de gaze stérile et centrifugée à 200 g pendant 90 s dans un tube à fond rond hermétiquement fermé. Le culot cellulaire obtenu est lavé deux fois par le tampon HEPES-EDTA afin d'éliminer la collagénase. On élimine les hématies présentes en effectuant une lyse différentielle. Les hépatocytes sont resuspendus 3 mn (temps de lyse inclus) dans la solution hypotonique de Sassa (NH₄Cl 0,13 M; Tris 0,017 M; KHCO₃; pH 7,5). Après un dernier lavage dans le tampon HEPES-EDTA, on pratique un comptage des hépatocytes, après dilution d'un prélèvement de la suspension, dans une solution de trypsine EDTA, plus bleu Trypan. On procède ainsi à l'évaluation du nombre de cellules viables par le test d'exclusion au bleu Trypan.

II - CULTURE CELLULAIRE

1 - Ensemencement des cellules

a) Hépatocytes embryonnaires de Poulet

3,5 à 4x10⁶ cellules sontensemencées dans des boîtes à 6 puits de 35 mm de diamètre (Nunclon Delta, Nunc) dans 2 ml de milieu de William's ME (Flow laboratories) et placées dans une étuve humide à 37° C en présence de 5 % de CO₂. Au bout de 4 heures, le milieu est renouvelé. 24 heures après l'ensemencement la monocouche est obtenue et l'homogénéité de celle-ci est évaluée par observation au microscope.

b) Cellules HepG2

Les cellules HepG2, lignée provenant de biopsies de tumeurs de foies humains (ADEN et al., 1979; KNOWLES et al., 1980) ont été fournies au Laboratoire par le Professeur Trouet de l'Université de Louvain en avril 1984.

Les cellules sont cultivées dans un milieu essentiel minimum de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) tamponné par 10 mM Hepes pH 7,3, auquel sont ajoutés 10^5 unités de pénicilline et 100 mg de streptomycine par litre. Le milieu est enrichi par 10 % de sérum de veau foetal (Gibco). Les cellules sont placées dans une étuve humide à 37° C en présence de 5 % de CO₂.

10^6 cellules sont mises à proliférer dans un flacon de 25 cm² (Falcon) contenant 5 ml de DMEM enrichi par 10 % en sérum de veau foetal. Après 4 à 5 jours, le nombre des cellules a triplé. Les cellules sont alors décollées par une solution de trypsine 0,25 %; EDTA 0,1 % dans le PBS. Après centrifugation à 1000 t/mn pendant 10 mn et comptage d'une fraction de la suspension cellulaire sur cellule Neubauer, les cellules sont réparties soit dans des flacons de 25 cm² (10^6 cellules par flacon) ou dans des boîtes de 24 puits de 2 cm² (Limbro), ($0,3 \times 10^6$ cellules par puits) afin de réaliser les incubations dans les divers milieux étudiés *.

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

B - ISOLEMENT DE LA TRANSFERRINE ADULTE ET
EMBRYONNAIRE DE POULET

I - IMMOBILISATION DE L'OVOTRANSFERRINE DE POULE

L'ovotransferrine de Poule (OTF) (Sigma), est immobilisée sur Sépharose 4B (Pharmacia) par la méthode au bromure de cyanogène selon la méthode décrite par CUATRECASAS et al., (1968); et MARCH et al., (1974).

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

100 ml de Sépharose 4-B sont lavés sur un creuset filtrant en verre fritté (porosité = G3) par de grands volumes d'eau distillée froide. Le gel éssoré est transvasé dans un b cher et resuspendu par 100 ml de K_2CO_3 2 M, pH 11,8, placé dans la glace. Le gel (dont la température est inférieure à 10  C) est activé par addition de 4 ml de BrCN dans l'acétonitrile (0,25 g de BrCN par ml d'acétonitrile) et agitation douce pendant 2 mn. Le gel activé est ensuite transvasé dans un filtre en verre fritté, lavé abondamment par de l'eau froide et essor .

2 - Immobilisation de l'ovotransferrine de Poule

L'ovotransferrine de Poule saturée en fer (5 mg/ml de gel activé) est solubilisée dans 50 ml de $NaHCO_3$ 0,2 M, pH 8,5. Le gel activé est mélangé à la solution d'ovotransferrine et la suspension est agitée sur un mélangeur rotatif pendant 48 h à 4  C.

Le gel est ensuite transvasé dans un filtre en verre fritté pour

être lavé par 500 ml de NaHCO_3 afin d'éliminer l'excès de protéines non couplées. Un dosage de protéines selon la méthode de PETERSON (1977) est réalisé sur le filtrat afin de déterminer le rendement de couplage. Le gel est ensuite resuspendu dans 50 ml d'éthanolamine 1 M pour bloquer les groupements actifs du gel encore libres et agité 2 h à 20° C. Le gel est ensuite lavé successivement par 500 ml d'eau, 500 ml d'acétate de sodium 0,1 M, pH 8,15 et 500 ml de TBS. Puis le gel est monté dans une colonne (IBF 1x10 cm) et équilibré dans le TBS.

II - PREPARATION DE LA COLONNE D'IMMUNOAFFINITE

1 - Isolement des anticorps dirigés contre l'ovotransferrine de Poule

Les IgG anti-ovotransferrine de Poule sont isolées de l'immunsérum préparé chez le Lapin, par chromatographie d'affinité sur une colonne d'ovotransferrine de Poule immobilisée sur Sépharose 4-B.

20 ml d'immunsérum de Lapin (*) sont déposés sur une colonne de 10 ml d'ovotransferrine-Sépharose 4-B équilibrée dans le TBS à un débit de 20 ml/h. La colonne est ensuite rincée par du TBS à un débit de 50 ml/h jusqu'au retour de la ligne de base représentée par l'absorbance du TBS à 280 nm. Les protéines retenues non spécifiquement sur le gel, sont éluées par 100 ml de TBS-NaCl 1 M puis le gel est rééquilibré par 50 ml de TBS. L'éluion des IgG anti-ovotransferrine de Poule est réalisée par le passage de

(*) : Nous remercions Monsieur Hervé PREVOTEAU pour le don de l'immunsérum de Lapin anti-ovotransferrine de Poule.

glycocolle-HCl 0,2 M pH 2,8. L'éluat est collecté dans un bécher sous agitation douce, le pH est suivi à l'aide d'une électrode immergée dans l'éluat et, est maintenu à 7-7,5 par addition de Tris 1 M.

Après élution des IgG, la colonne est rééquilibrée dans le TBS. Un dosage de protéines (PETERSON, 1977) sur une fraction de la solution immunoglobulinique est effectué.

2 - Immobilisation des anticorps anti-ovotransferrine de Poule

Les IgG anti-ovotransferrine sont concentrées à 10 ml par dialyse sous vide à l'aide d'immersible CX30 (Millipore) et équilibrées par du NaHCO₃ 0,2 M pH 8,5 puis immobilisées sur du Sépharose 4-B activé au BrCN selon la méthode décrite au paragraphe B-I-1, p. 206 à raison de 5 mg de protéines par ml de gel.

Les IgG gréffées sur Sépharose 4-B sont ensuite montées dans une colonne de 10 ml (IBF 1x10 cm) et équilibrées dans le TBS.

III - ISOLEMENT DE LA SEROTRANSFERRINE ADULTE ET EMBRYONNAIRE

1 - Récupération des sérums

a) *Adulte*

Le sang de Poulet est récupéré dans un abattoir local et stocké à 4° C jusqu'à la formation du caillot. Le sérum est prélevé et stocké à -20 °C jusqu'à utilisation.

b) Embryon à 16 jours d'incubation

Les oeufs embryonnés proviennent d'un élevage avicole local. Ils sont prélevés après 16 jours d'incubation dans une couveuse à 38° C sous atmosphère humide.

L'embryon est extrait de l'oeuf et lavé deux fois dans une solution de NaCl 0,9 %. L'embryon est placé dans une boîte de Pétri de 60 mm de diamètre, où on effectue une dissection rapide afin de dégager le coeur. Une perfusion intra-cardiaque à un débit de 16 ml/mn est alors effectuée avec du NaCl 0,9 % pendant environ 30 s (jusqu'à ce que le perfusé ne soit plus rouge). Le perfusé est récupéré dans la boîte de Pétri et centrifugé afin d'éliminer les globules rouges.

2 - Isolement des sérotransferrines

a) Isolement de la sérotransferrine de Poulet

La sérotransferrine du sérum de Poulet est isolée par chromatographie d'immunoaffinité sur une colonne d'anticorps anti-ovotransferrine de Poule immobilisés sur Sépharose 4-B.

L'injection du sérum est réalisée à un débit de 10 ml/h. La chromatographie est suivie par détection de l'absorbance à 280 nm. Les différents lavages (TBS; TBS-NaCl 1 M; TBS) sont effectués à un débit de 30 ml/h. La sérotransferrine fixée aux anticorps est éluée par le tampon glycolle-HCl 0,2 M pH 2,8. L'éluat est immédiatement ramené à pH 7,4 par addition de Tris 1 M. Après addition de la solution de chlorure ferrique d'AZARI et BAUGH (400 µg de FeCl₃ par ml), à raison de 4 µl par mg de protéine, la sérotransferrine saturée en fer est concentrée sous vide à l'aide d'un Immersible CX 30 puis dessalée par fraction de 0,5 ml sur une colonne de Séphadex G-25 (Fast

Desalting Column HR 10/10, Pharmacia) en système FPLC, équilibrée dans l'eau. Après dessalage la solution de transferrine est lyophilisée.

b) Fractionnement des variants de la sérotransferrine de Poulet

La sérotransferrine de Poulet isolée par chromatographie d'immunoaffinité est fractionnée par chromatographie d'échange d'ions en FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) sur une colonne mono-Q HR-10 (Pharmacia) dont les groupements échangeurs d'anions sont des amines quaternaires.

6 mg de sérotransferrine sont solubilisés dans 0,5 ml de tampon A (Tris 50 mM pH 8,6) puis centrifugés à 13500 t/mn pendant 5 mn. La colonne mono-Q est équilibrée dans le tampon A, le débit est de 3 ml/mn. Après injection de la sérotransferrine, la colonne est lavée par le tampon A pendant 5 mn, puis est éluée par le tampon B (Tris 50 mM, NaCl 1M, pH 8,6) selon le gradient suivant :

- 8 ml de 92,5 % A , 7,5 % B
- 31 ml de 90 % A, 10 % B
- 8 ml de 87,5 % A, 12,5 % B
- 10 ml de 85 % A, 15 % B, et 5 ml de 100 % B

La chromatographie est suivie par détection de l'absorbance à 280 nm.

c) Isolement de la sérotransferrine d'embryon

Le variant majeur de la sérotransferrine de Poulet (TfA2) est injecté à un Lapin pour la production d'immunsérum anti-sérotransferrine de Poulet (protocole paragraphe C-III-1, p. 219). La sérotransferrine d'embryon est isolée par chromatographie d'immunoaffinité sur colonne d'anticorps anti-sérotransferrine de Poulet

(protocole d'isolement des anticorps paragraphe B-II-1, p. 207) immobilisés sur Sépharose 4-B (protocole d'immobilisation des anticorps, paragraphe B-II-2, p. 208).

Le perfusat est concentré sur un filtre Immersible CX 30 (Millipore) afin de diminuer le volume à injecter sur la colonne. Le déroulement de la chromatographie est décrit au paragraphe B-III-2-a, p. 209.

La sérotransferrine embryonnaire isolée par chromatographie d'affinité est fractionnée, sur une colonne mono Q HR-10, de la même façon que la sérotransferrine de Poulet adulte.

3 - Isolement et fractionnement de la transferrine synthétisée par les hépatocytes embryonnaires

Les milieux de culture à 24, 48 et 72 heures sont récoltés, centrifugés à 200 g pendant 3 mn pour éliminer les cellules décollées. Le milieu de culture est dialysé à 4° C pendant 48 h contre du Tris 10 mM pH 8,6. La transferrine est ensuite isolée et fractionnée en une seule étape sans concentration, par chromatographie d'échange d'ions en FPLC sur colonne mono-Q HR-10. Le milieu concentré est filtré sur un filtre Millipore de 0,22 μ m puis injecté sur la colonne équilibrée dans le tampon A (Tris 50 mM pH 8,6) à un débit est de 3ml/mn. La colonne est lavée par le tampon A. Puis l'élution est effectuée par le tampon B (Tris 50 mM, NaCl 1 M pH 8,6) selon le gradient suivant :

- 12 ml de 95 % A, 5 % B
- 8 ml de 92,5 % A, 7,5 % B
- 18 ml de 90 % A, 10 % B puis 46 ml jusqu'à 100 % de B et 5 ml de 100 % de B.

C - METHODES ANALYTIQUES

I - METHODES CHIMIQUES

1 - Etude de la protéine

a) *Dosage des protéines*

La concentration des protéines est déterminée par la méthode de LOWRY et al., (1951) modifiée par PETERSON (1977).

5 à 100 μg de protéines en solution sont ajustés à 1 ml par de l'eau distillée. Après addition de 0,1 ml de désoxycholate de sodium 0,15 %, les tubes sont agités et laissés à température ambiante pendant 10 mn. Les protéines sont ensuite précipitées par addition de 0,1 ml d'une solution d'acide trichloracétique à 72 %. Après agitation et centrifugation à 3000 g pendant 20 mn, le surnageant est éliminé par aspiration.

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

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

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

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

b) Saturation en fer des transferrines de Poulet

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

La transferrine est solubilisée dans un tampon citrate de sodium 0,1 M, bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 8,2, à raison de 10 mg de transferrine par ml de tampon. La saturation en fer est réalisée par addition d'une solution de chlorure ferrique (260 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ dissous dans 100 ml du tampon citrate bicarbonate 0,1 M). La quantité de fer de cette solution est déterminée par dosage colorimétrique à la sulfobathophénantroline (Biopack-fer, Biotrol, Paris). 1,5 μg de fer sont nécessaires pour saturer 1 mg de transferrine, à 4° C pendant 24 h.

c) Marquage du variant TfA2 de la sérotransferrine de Poulet à 1^{125}I

Le marquage du variant TfA2 à 1^{125}I est réalisé par la méthode à l'Iodogène (Pierce) décrite par FRACKER et SPECK (1978) et SALACINSKY et al., (1981).

Des tubes à hémolyse en verre sont tapissés par 100 μg d'Iodogène mis en solution dans le chloroforme à raison de 1 mg/ml et séchés sous courant d'azote. La solution d'iode radioactive $\text{Na } ^{125}\text{I}$, sans entraîneur, 185 MBq/5 mCi/50 μl ; Amersham) est diluée au 5^{ème} dans le TBS.

La solution de transferrine (250 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ de TBS) est placée dans le tube contenant l'Iodogène. 20 μl de la solution d'iode radioactive sont alors ajoutés et le tube est placé dans la glace, sous agitation douce, pendant 2 mn.

La transferrine marquée à l'iode est séparée de l'iode en excès par dessalage sur colonne de Séphadex G-25 (PD-10, Pharmacia) équilibrée dans le TBS.

La radioactivité spécifique est déterminée après mesure de la concentration en protéines (absorbance à 280 nm) et comptage d'une fraction de la solution radioactive dans un compteur multigamma (Compugamma, LKB).

2 - Etudes des glycanes

a) Détermination des rapports molaires en monosaccharides

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

200 à 250 μg de glycoprotéines sont méthanolysés, en présence de 1 μg de mésoinositol, utilisé comme témoin interne, par 0,25 ml de méthanol chlorhydrique 0,5 N à 80° C pendant 24 h. La N-réacétylation est effectuée, en présence de quelques grains de carbonate d'argent, par addition de 10 μl d'anhydride acétique à 20° C, 18 h à l'obscurité. Après centrifugation, le surnageant, introduit dans une pipette Pasteur scellée à une extrémité, est délipidé trois fois par 0,25 ml d'heptane bidistillé puis évaporé sous courant d'azote. Le résidu sec est repris par 20 μl de pyridine et 20 μl de réactif de silylation (BSTFA : Bis Silyl-Trifluoroacétamide). La réaction est effectuée en 3 h à 20° C.

Les monosaccharides silylés sont analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire (0,32 mm x 20 m) CP Sil 5-B. La température varie de 120 à 240° C, à raison de 2° C/mn. La pression d'entrée du gaz vecteur (hélium) est de 0,5 bars.

c) Libération des oligosaccharides par hydrazinolyse

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

4 à 5 mg de transferrine sont solubilisés dans 0,3 ml d'hydrazine anhydre. Le tube bouché hermétiquement est placé 2 h à 100° C. A la fin de la réaction, l'hydrazine est évaporée sous courant d'azote. Le culot est repris deux fois par 1 ml de toluène et évaporé sous azote puis repris par 0,5 ml d'eau et déssalé sur colonne de BioGel P-2. Après lyophilisation, la fraction oligosaccharidique est reprise par 0,3 ml de NaHCO₃ saturé et N-réacétylée par addition de cinq fois 10 µl d'anhydride acétique toutes les 20 mn à 20° C. La réaction est arrêtée par acidification avec de la résine Dowex 50x8, 25-50 mesh, sous forme H⁺. La solution est concentrée à l'évaporateur rotatif et déssalée sur colonne de BioGel P-2. Les oligosaccharides sont ensuite réduits par addition de 1 mg/ml de BH₄K, après avoir ajusté le pH à 6-7 avec NaOH 0,1 N. La réaction est arrêtée après 2 h par dessalage sur colonne de Biogel P-2 et la fraction contenant les oligosaccharides est lyophilisée.

c) Etude de la structure des glycannes par résonance magnétique nucléaire

Les analyses en résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton à 400 MHz des oligosaccharides ont été réalisées au Laboratoire dans le

Centre Commun de Mesures de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois (*).

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

Les analyses sont effectuées à l'aide d'un appareil BRUKER AM-40 WB (400 MHz) opérant en transformés de Fourier. Les glissements chimiques sont donnés par rapport au sodium-4, 4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonate (indirectement par rapport à l'acétone ajoutée dans D₂O; $\delta = 2,225$ ppm).

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

II - METHODES ELECTROPHORETIQUES

1 - Electrophorèse en gradient de gel de polyacrylamide

Les électrophorèses en gradient de gel de polyacrylamide sont réalisées horizontalement à l'aide d'un appareil PhastSystem (Pharmacia) avec des gels et des tampons d'électrophorèse prêts à l'emploi (Pharmacia). Le gel de séparation est constitué d'un gradient en acrylamide variant de 10 à 15 % (32 mm), le gel de concentration est à 5 % en acrylamide (13 mm). Le système tampon dans les gels d'acrylamide est de 0,112 M acétate et 0,112 M Tris pH 6,4 avec SDS ou sans SDS.

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

a) Electrophorèse en gradient de gel de polyacrylamide en présence de SDS

Les échantillons sont solubilisés dans le tampon échantillon (10 mM Tris/HCl pH 8, SDS 2,5 %) à raison de 100 à 200 ng/ μ l et par bande de protéine. 1 μ l est déposé par piste.

L'électrophorèse se fait selon le programme préconisé par Pharmacia (fiche technique n° 110 du manuel d'utilisation). Le tampon d'électrophorèse se présente sous forme de deux blocs d'agarose (Buffer Strips) de même largeur que le gel, déposés à l'anode et à la cathode. Ces blocs d'agarose sont composés de 2 % d'agarose IEF, 0,20 M Tricine, 0,20 M Tris et 0,55 % SDS pH 7,5.

Après électrophorèse, les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie (1 tablette de PhastGel Blue R dissout dans 30 % de méthanol et 10 % d'acide acétique) pendant 10 mn à 50 °C et décolorées par plusieurs passages dans le tampon de décoloration (méthanol : acide acétique : eau distillée, 3:1:6).

b) Electrophorèse en gradient de gel de polyacrylamide sans dénaturants

Les échantillons sont additionnés d'un volume de tampon échantillon (Tris-HCl 10 mM pH 8,6) pour une concentration finale en transferrine de 100-200 ng/ μ l et par bande de protéine.

L'électrophorèse se fait selon le programme décrit par Pharmacia (fiche technique n° 120 du manuel d'utilisation), on arrête celui-ci à 145 Vh. Les blocs d'agarose représentant le système tampon d'électrophorèse sont composés de 2 % d'agarose IEF, 0,88 M L-alanine, 0,25 M Tris pH 8,8.

Après électrophorèse, les protéines sont, soit révélées au Coomassie comme précédemment, soit transférées sur feuille de nitrocellulose.

2 - Electrophorèse en gel homogène de polyacrylamide sans dénaturants

L'électrophorèse en gel homogène de polyacrylamide est réalisée dans un appareil vertical en plaques (1,5 x 140 x 180 mm), (Biorad) dans le système préconisé par LAEMMLI (1970) sans SDS.

Le gel de séparation est constitué d'un gel homogène à 10 % en acrylamide dans le tampon Tris-glycocolle, HCl pH 8,9. Le gel de concentration est un gel homogène à 5 % d'acrylamide dans le tampon Tris-glycocolle, HCl pH 6,8. Le tampon d'électrophorèse et les gels ne contiennent pas d'agents dénaturants.

Les milieux sont additionnés de tampon Tris-HCl 10 mM pH 8,6; glycérol 20 % pour une concentration finale en transferrine de 100 ng par bande, pour la révélation avec les anticorps et de 200 ng pour la révélation avec la Con A. De 10 à 20 μ l de la solution échantillon sont déposés dans les puits du gel de concentration.

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

3 - Electrotransfert sur feuille de nitrocellulose (Western blotting)

a) *Grand gel*

Les protéines, séparées par électrophorèse en gel d'acrylamide, sont ensuite transférées par électrophorèse (cellule de transfert Biorad)

sur feuille de nitrocellulose (Schleicher et Schuell) dans le tampon Tris 25 mM, glycolle 192 mM, pH 8,4, contenant 20 % (v/v) de méthanol selon la méthode décrite par TOWBIN et al., (1979) et BURNETTE (1981). L'électrophorèse est réalisée à 200 mA, à 4° C pendant 4 h.

Après le transfert, les protéines fixées sur la nitrocellulose sont révélées par immuno-révélation ou par affino-révélation.

b) PhastGel

Les protéines, séparées par électrophorèse en gel d'acrylamide, sont ensuite transférées par électrophorèse semi sèche (cellule de transfert Phast transfert, Pharmacia). La feuille de nitrocellulose est préalablement humidifiée dans le tampon Tris 25 mM, glycolle 192 mM, pH 8,4, contenant 20 % (v/v) de méthanol. Le transfert est effectué à 15° C pendant 10 mn avec un courant de 25 mA par gel (Fiche n° 21 du manuel d'utilisation du PhastSystem).

Après le transfert, les protéines fixées sur la nitrocellulose sont révélées par immuno-révélation ou par affino-révélation.

III - METHODES IMMUNOLOGIQUES

1 - Préparations de l'immunsérum

A 1 mg de variant TfA2 de la sérotransferrine de Poulet solubilisée dans 1 ml de sérum physiologique, on ajoute 0,5 ml d'adjuvant complet de Freund. Le mélange est injecté sur le dos d'un lapin en une quarantaine d'injections intradermiques selon la méthode de VAITUKATIS et al., (1971). Après 15 jours, l'injection de 0,5 mg de variant TfA2 solubilisé dans 0,5 ml de sérum physiologique plus 0,25 ml

d'adjuvant complet de Freund est réalisée en intra-musculaire dans une patte arrière et répétée 15 jours après.

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

2 - Dosage radio-immunologique

La concentration de la transferrine synthétisée par les cellules en culture (cellules HepG2 et hépatocytes embryonnaires de Poulet) et les concentrations des sérotransferrines de Poulet (adulte et embryonnaire) sont évaluées par dosage radio-immunologique (RIA) selon la méthode décrite par JOHNSTONE et THORPE (1982).

200 μ l d'immunsérum anti-transferrine dilués au 1/200 avec du NaHCO_3 0,2 M, pH 9,2 sont mis à incuber pendant 18 h à 37° C dans des tubes à ailettes à forte absorption de protéines (Startubes, Nunc). Après élimination de la solution d'immunsérum et lavage par du TBS, les sites non occupés par les anticorps sont saturés par de la sérumalbumine bovine en solution à 1 % dans NaHCO_3 0,2 M, pH 9,2, pendant 2 h à 37° C. Les tubes sont ensuite rincés par du TBS.

100 μ l d'une solution d'échantillon à doser sont mis à incuber avec une quantité constante de transferrine marquée à ^{125}I (50 μ l d'une solution à 2 $\mu\text{g/ml}$) dans les tubes tapissés par les anticorps pendant 4 h à 37° C. Parallèlement, une gamme étalon de transferrine marquée à ^{125}I est réalisée, la concentration de transferrine variant de 36 ng à 20 $\mu\text{g/ml}$. Chaque essai est réalisé en trois exemplaires. Les tubes sont ensuite vidés, rincés trois fois par 1 ml de TBS puis la

radioactivité résiduelle est comptée dans un compteur multigamma (compugamma LKB).

3 - Dosage par immunoélectrophorèse

L' α 1-antitrypsine synthétisée par les cellules HepG2 en culture est dosée par immunoélectrophorèse selon la méthode de LAURELL (1965).

L'Agarose (Indubiose A 37 HAA, IBF) est dissous à 100° C dans le tampon d'électrophorèse : Véronal acide 24mM, Tris 73mM, lactate de calcium 0,17 mM, pH 8,6. Après refroidissement de l'Agarose à 55° C l'immunsérum anti α 1-antitrypsine (Sigma) est ajouté pour une dilution finale au 350^{ème}. La solution est doucement homogénéisée avant d'être déposée sur une plaque de verre à raison de 1,5 ml de gel par 10 cm² et laissée gélifiée par refroidissement.

Le milieu de culture des cellules HepG2 est concentré de 3 à 8 fois par Centricon CX 30 (Millipore). On effectue 3 dépôts par échantillon.

Une gamme étalon de 1 à 5 μ g/ml d' α 1-antitrypsine (Sigma) est réalisée en triple exemplaires.

L'électrophorèse se fait à 10 V/cm pendant 4 h à l'aide d'un appareil LKB 2117 multiphor muni d'une plaque réfrigérante. Les protéines de l'immunsérum n'ayant pas réagies avec l'antigène sont absorbées par plusieurs couches de papier Whatman appliquées sur l'Agarose pendant 10 mn. On réhydrate l'Agarose en immergeant les plaques dans le NaCl 0,9 % pendant 10 mn avant de renouveler l'application de papiers Whatman. Les plaques sont ensuite séchées sous courant d'air chaud avant d'être colorées à l'Amidoschwartz (0,5g d'Amidoschwartz, méthanol:acide acétique:eau distillée, 50:5:45) pendant

5 mn puis décolorées dans le décolorant (méthanol:acide acétique:eau distillée, 2:1,4:0,28).

4 - Affinoélectrophorèse et Immunotransfert

L'affinoélectrophorèse en présence de Con A est réalisée selon les méthodes décrites par SALIER et al., (1980) et NICOLLET et al., (1981). L'immunotransfert sur membrane de nitrocellulose tapissée par des anticorps spécifiques s'effectue selon le protocole de TAKETA et al., (1985). La révélation de type ELISA permet une quantification par spectrométrie.

a) Préparation de la membrane de transfert

La membrane de nitrocellulose (0,45 μm , Schleicher et Schuell) est mise à incuber pendant une heure dans une solution d'anticorps spécifiques (100 μg d'IgG/ml de NaHCO_3 0,2 M, pH 9,2). Les anticorps anti-transferrine humaine sont préparés chez le Lapin et purifiés au Laboratoire. Les anticorps anti- $\alpha 1$ antitrypsine préparés chez le Lapin proviennent de la firme Sigma.

L'excès d'anticorps est éliminé, la membrane est rapidement lavée par du TBS et mise à incuber pendant 30 mn dans une solution de Tween 20 (0,5 % dans le TBS) pour bloquer les sites libres de la nitrocellulose. La membrane est ensuite lavée trois fois 2 mn par du TBS et stockée à 4° C dans le tampon jusqu'à utilisation (2 à 3 jours). Pour de plus longues conservations, la membrane est séchée sous courant d'air chaud avant d'être stockée à 4° C.

b) Affinoélectrophorèse

Le tampon d'électrophorèse est constitué de Tris-HCl 72 mM, véronal sodé 24 mM, lactate de sodium 44 mM, pH 8,6. La Con A (IBF) est dissoute à raison de 100 mg par ml dans le tampon d'électrophorèse contenant en outre $MnCl_2$, $MgCl_2$, et $CaCl_2$ (1 mM chacun). L'Agarose, Seakem HGT (FMC Bioproducts) de faible EEO ($\leq 0,10$) est utilisé pour l'étude de la transferrine et l'Indubiose A 37 HAA (IBF) de moyenne EEO (0,15) utilisé pour l'étude de l' $\alpha 1$ -antitrypsine sont mis à fondre au bain-marie bouillant puis refroidi à $55^\circ C$. La solution de Con A est ajoutée à la concentration finale de 2 mg/ml de gel pour l'étude de la transferrine et de 1 mg/ml de gel pour l'étude de l' $\alpha 1$ -antitrypsine). La solution est doucement homogénéisée, puis immédiatement coulée sur une lame de verre à raison de 1,5 ml de gel pour 10 cm^2 et laissée gélifier par refroidissement.

Les milieux de culture sont concentrés de 1 à 15 fois par centrifugation sur unité d'ultrafiltration Centricon 30 (Millipore), de manière à obtenir une concentration d'environ $5\ \mu\text{g/ml}$ de transferrine ou d' $\alpha 1$ -antitrypsine. $5\ \mu\text{l}$ de milieu concentré sont déposés dans des puits pratiqués à l'emporte pièce. L'électrophorèse est réalisée à raison de $12,5\text{ V/cm}$ pendant 1 h à $4^\circ C$ dans un appareil LKB 2117 multiphor.

c) Immunotransfert

Après électrophorèse, le gel est délicatement recouvert, de manière à éviter les bulles d'air, par la membrane de nitrocellulose tapissée par les anticorps spécifiques de Lapin, puis par 3 épaisseurs de papier Whatman 3, coupées à la largeur du gel et humidifiées dans le TBS. L'ensemble est soumis à une pression de l'ordre de 50 g/cm^2 pendant 1 h.

d) Révélation

La membrane, après transfert, est incubée pendant une heure dans une solution renfermant des anticorps spécifiques développés chez la Chèvre (Sigma), (dilution au 1/1000 par du TBS, Tween 20 0,05 %, 50mM α -méthyl-D-Glucoside).

La membrane est abondamment lavée par le TBS, puis incubée 1 h dans une solution renfermant des anticorps anti-IgG de Chèvre conjugués à la peroxydase (Sigma), (dilution au 1/1000 par du TBS, Tween 20 0,05 %). La membrane est lavée abondamment par du TBS.

La révélation de l'activité peroxidasique est réalisée par incubation de la membrane dans une solution de DAB (3,3'-diamino benzidine tetrachloride) à 0,04 % (p/v) à laquelle on ajoute 0,05 % d' H_2O_2 à 30 % (p/p) jusqu'au développement de la coloration.

La membrane est alors abondamment lavée à l'eau, puis séchée et analysée en lumière visible à l'aide d'un densitomètre (BIO-RAD, Model 620 Video Densitometer), couplé à un ordinateur (Shimadzu C-R4A Chromatopac).

IV - REVELATION DES GLYCOVARIANTS PAR LES LECTINES

1 - La concanavoline A

La révélation des glycovariants par la Concanavoline A (Con A) est réalisée selon la méthode de HAWKES, (1982) modifiée selon la méthodes de BARTLES ET HUBBARD, (1984).

Après transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose (protocole p. 218), celle ci est incubée 10 mn dans une solution bloquante (2 % de polyvinylpyrrolidone p/v dans le TBS) pour bloquer

les sites libres de la membrane. La solution bloquante est ensuite éliminée et remplacée par une solution de Con A (50 µg/ml dans la solution bloquante plus CaCl₂, 1mM; MnCl₂, 1mM; MgCl₂, 1 mM). La membrane est incubée à température ambiante pendant 1 h. On effectue 3 lavages rapides avec la solution bloquante, puis la membrane est mise à incuber dans une solution de peroxydase (Sigma) (50 µg/ml dans la solution bloquante) pendant 1 h à température ambiante. La membrane est à nouveau lavée comme précédemment avant la révélation de l'activité de la peroxydase par incubation dans une solution de DAB à 0,04 % (p/v) à laquelle on ajoute 0,05 % d'H₂O₂ à 30 % (p/p) jusqu'à développement de la coloration. La membrane de nitrocellulose est alors lavée abondamment à l'eau, puis séchée sous courant d'air chaud.

2 - Autres lectines

La révélation des glycovariants par la SNA (Sambucus nigra agglutinin), la MMA (Maackia amurensis agglutinin), et par la DSA (Datura stramonium agglutinin) est réalisée avec le "Glycan differentiation Kit" de Boehringer Mannheim Biochemica et se fait selon les recommandations incluses dans le kit. Ce kit comprend tous les réactifs que nous allons citer par la suite.

Les glycoprotéines sont transférées par électrotransfert (protocole p. 219) après séparation par électrophorèse en gel de polyacrylamide (PhastGel) (protocole p. 217). Les volumes sont donnés pour une membrane de nitrocellulose de 50 à 100 cm². Les incubations se font à température ambiante sous agitation douce.

Les membranes sont incubées pendant 30 mn dans 20 ml de solution bloquante (0,5g de réactif bloquant dans 100 ml de TBS pH 7,5

en chauffant à 50-60° C). Puis on effectue 2 lavages dans le tampon 1 (TBS; MgCl₂, 1 mM; MnCl₂, 1 mM; CaCl₂, 1 mM; pH 7,5).

L'incubation des différentes lectines marquées à la digoxigénine se fait pendant 1 h dans 10 ml de tampon 1 selon les proportions suivantes : SNA et DSA, 10µl; MAA, 50 µl. Les membranes sont lavées dans 50 ml de TBS, 3 fois 10 mn. La révélation des différentes lectines se fait par révélation de l'activité de la phosphatase liée à des anticorps polyclonaux anti-digoxigénine.

10 µl de conjugué anticorps-phosphatase sont ajoutés à 10 ml de TBS pour l'incubation des membranes de nitrocellulose pendant 1 h. 3 nouveaux lavages de 10 mn sont alors effectués avec 50 ml de TBS.

La révélation de l'activité de la phosphatase se fait avec 50 µl de substrat NBT (100mg de 4-nitroblue tetrazolium chloride dissous dans 1,3 ml de diméthylformamide 70 % v/v), plus 37,5 µl de X-phosphate (50mg de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate dissous dans 1 ml de diméthylformamide 70 % v/v), plus 10 ml de tampon 2 (Tris-HCl, 0,1 M; MgCl₂, 0,05 M; NaCl, 0,1 M; pH 9,5). Les membranes de nitrocellulose sont incubées dans la solution de révélation, après quelques mn, la coloration grise apparaît. Les membranes sont alors abondamment lavées à l'eau et séchées sous courant d'air chaud.

MILIEUX DE CULTURE

	DMEM mg/l	RPMI 1640 mg/l	Williams E mg/l
L-analine	*	*	90,00
L-arginine	84,00	200,00	60,50
L-asparagine H ₂ O	*	56,82	20,00
Acide L-aspartique	*	20,00	30,00
L-cystéine	56,78	*	52,05
L-cystine	*	59,15	23,70
Acide L-glutamique	*	20,00	50,00
L-glutamine	584,00	300,00	292,00
Glycine	30,00	10,00	50,00
Glutathion	*	1,00	0,05
L-histidine HCl H ₂ O	42,00	15,00	20,30
L-hydroxyproline	*	20,00	*
L-isoleucine	104,80	50,00	50,00
L-leucine	104,80	50,00	75,00
L-lysine HCl	146,20	40,00	87,50
L-méthionine	30,00	15,00	15,00
L-phénylalanine	66,00	15,00	25,00
L-proline	*	20,00	30,00
L-sérine	42,00	30,00	10,00
L-thréonine	95,20	20,00	40,00
L-tryptophane	16,00	5,00	10,00
L-tyrosine	89,50	24,86	43,50
L-valine	93,60	20,00	50,00
Biotine	*	0,20	0,50
Calciférol	*	*	1,00
D-Ca-pantothénate	4,00	0,25	1,00
Choline chlorure	4,00	3,00	1,50
Acide folique	4,00	1,00	1,00
Acide L-ascorbique	*	*	2,00
I-inositol	7,00	35,00	2,00
Ménadione	*	*	0,01
Nicotinamide	4,00	1,00	1,00
Acide p-aminobenzoïque	*	1,00	*
Pyridoxal HCl	4,00	1,00	1,00
Riboflavine	0,40	0,20	0,10
Thiamine HCl	4,00	1,00	1,00
DL- α -tocophérol phosphate	*	*	0,01
Vitamine A	*	*	0,10
Vitamine B12	*	0,005	0,20
Ca(NO ₃) ₂	*	69,49	*
CaCl ₂ 2H ₂ O	264,90	*	264,90
CuSO ₄ 5H ₂ O	*	*	0,00009
Fe(NO ₃) ₃ 9H ₂ O	0,10	*	0,0001
KCl	400,00	400,00	400,00
MgSO ₄ 7H ₂ O	200,00	100,00	200,00
MnCl ₂ 4H ₂ O	*	*	0,0001
NaCl	6400,00	6000,00	6800,00
NaHCO ₃	3700,00	2000,00	2200,00
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	141,30	*	158,30
Na ₂ HPO ₄	*	800,70	*
ZnSO ₄ 7H ₂ O	*	*	0,0002
D-glucose	4500,00	2000,00	2000,00
Linoléate de méthyl	*	*	0,03
Rouge de phénol	15,00	5,00	10,00
Sodium pyruvate	110,00	*	25,00

BIBLIOGRAPHIE DE L'APPENDICE TECHNIQUE

ADEN, D.P., FOGEL, A., PLOTKIN, S., DAMJANOV, I. and KNOWLES, B.B. (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. Nature, **282**, 615-617

ALTHAUS, F.R., SINCLAIR, J.F., SINCLAIR, P. and MEYER, U.A. (1979) Drug-mediated induction of cytochrome(s) P-450 and drug metabolism in cultured hepatocytes maintained in chemically defined medium. J. Biol. Chem., **254**, 2148-2153

AZARI, P. and BAUGH, R.F. (1967) A simple and rapid procedure for preparation of large quantities of pure ovotransferrin. Arch. Biochem. Biophys., **118**, 138-144

BARTLES, J.R. and HUBBARD, A.L. (1984) ¹²⁵I-Wheat germ agglutinin blotting : increased sensitivity with polyvinylpyrrolidone quenching and periodate oxidation/reductive phenylation. Anal. Biochem., **140**, 284-292

BURNETTE, M.N. (1981) "Western blotting" dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal. Biochem., **112**, 195-203

CUATRECASAS, P., WILCHEK, M. and ANFINSEN, C.B. (1968) Selective enzyme purification by affinity chromatography. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **61**, 636-643

DELERS, F., DOMINGO, M., RONDEAU, Y. and ENGLER, R. (1984). Markers protein in inflammation, **2**, 575-579

FRAKER, P. and SPECK, J.C. (1978) Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloramide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a, 6a-diphenyl glycoluryl. Biochem. Biophys. Res. Commun., **80**, 849-857

HAWKES, R. (1982). Identification of concanavalin A-binding proteins after sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis and protein blotting. Anal. Biochem., **123**, 143-146

JOHNSTONE, A. and THORPE, R. (1982). in "Immunochemistry in practice", Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edimburg, 235-255

KAMERLING, J.P., GERWIG, G.J., VLIEGENTHART, J.F.G. and CLAMPS, J.R. (1975) . Biochem. J., **151**, 491-495

KNOWLES, B.B, HOWE, C.C and ADEN, H.P. (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. Science, **209**, 497-499

LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227**, 680-685

LAURELL, C.B. (1966) Anal. Biochem., **15**, 45-52

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**, 265-275

MARCH, S.C., PARIKH, I. and CUATRECASAS, P. (1974) A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. Anal. Biochem., **60**, 149-152

NICOLLET, I., LEBRETON, J.P., FONTAINE, M. and HIRON, M. (1981). Evidence for alpha-1-acid glycoprotein populations of different pI values after concanavalin A affinity chromatography. Study of their evolution during inflammation in man. Biochim. Biophys. Acta, **668**, 235-241

PETERSON, G.L. (1977) A simplification of the assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. Anal. Biochem., **83**, 346-356

READING, C.L., PENHOET, E.E. and BALLOU, C. (1978) Carbohydrate structure of vesicular stomatitis virus glycoprotein. J. Biol. Chem., **253**, 5600-5612

SALINCINSKY, P.R.P., MAC LEAN, C., SYKES, J.E.C., CLEMENT-JONES, V.V. and LOWRY, P.J. (1981) Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent 1,3,4,6 α -tetrachloro-3 α , 6 α -diphenyl glycoluryl (Iodogen). Anal. Biochem., **117**, 136-146

SALIER, J.P., FAYE, L., VERGAINE, D. and MARTIN, J.P. (1980). True and false glycoprotein microheterogeneity observed with lectin crossed affino immunoelectrophoresis of α -trypsin-inhibitor. Electrophoresis, **1**, 193-197

TAKETA, K., ICHIKAWA, E., TAGA, H. and HIRAI, H. (1985). Antibody-affinity blotting, a sensitive technique for the detection of α -fetoprotein separated by lectin affinity electrophoresis in agarose gels. Electrophoresis, **6**, 492-497

TOWBIN, H., STAHELIN, T. and GORDON, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 4350-4354

VAITUKATIS, J., ROBBINS, J.B., NIESCHLAG, E. and ROSS, G.T. (1971). A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. End., **33**, 988-991

VLIEGENTHART, J.F.G., DORLAND, L. and VAN HALBEEK, H. (1983) High-resolution, ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy as a tool in the structural analysis of carbohydrate related to glycoproteins. Adv. Carb. Biochem., **41**, 209-374

VLIEGENTHART, J.F.G., VAN HALBEEK, H. and DORLAND, L. (1981) The application of 500-MHz high-resolution ¹H-NMR spectroscopy for the structure determination of carbohydrate derived from glycoproteins. Pure Appl. Chem., **53**, 45-77

