

# INTERACTIONS MOLECULAIRES DES PROTEINES DE LA MEMBRANE ET DEFORMABILITÉ ERYTHROCYTAIRE

PIERRE BOIVIN

Laboratoire de Recherches d'Enzymologie des Cellules Sanguines  
Hôpital Beaujon 92118 CLICHY CEDEX, FRANCE.

Chargé d'apporter aux tissus l'oxygène recueilli dans les poumons le globule rouge doit, pour transiter à travers les capillaires, être capable de modifier profondément sa forme. Il possède pour ce faire une propriété fondamentale de déformabilité passive qui lui permet de s'adapter aux conditions circulatoires. Trois éléments essentielles interviennent dans l'existence de cette déformabilité: la viscosité interne, le rapport surface/volume, les qualités structurales et fonctionnelles de la membrane.

La viscosité interne dépend principalement de la concentration et des propriétés de l'hémoglobine. En fait, en dehors de la drépanocytose, de l'hémoglobine C, des hémoglobines instables et des circonstances où la viscosité propre de la solution de l'hémoglobine est modifiée, l'augmentation de la concentration intraglobulaire de l'hémoglobine est due soit à une perte d'eau (dessiccation) conséquence d'une fuite transmembranaire des cations non balancée par les systèmes de régulation, soit à une réduction de la surface membranaire par perte (ou manque) de fragments de celle-ci sans modification du contenu.

Les modifications du rapport surface/volume se font rarement dans le sens de l'augmentation: un tel fait se produit par exemple par surcharge membranaire en cholestérol aboutissant à une augmentation du diamètre des hématies sans accroissement de l'épaisseur et sans diminution de la déformabilité (platicyte). La diminution du rapport S/V peut être due à l'augmentation du volume par gonflement cellulaire par accumulation d'eau (ou hydrocytose) elle-même secondaire à des perturbations des teneurs en cations non compensées par une augmentation d'activité des pompes correspondantes; elle peut également être la conséquence de la diminution de la surface de la membrane par perte de ses constituants protéiques.

Ainsi la quantité de membrane présente et ses capacités fonctionnelles peuvent-elles intervenir indirectement dans ces deux facteurs de la déformabilité érythrocytaire que sont la viscosité interne et le rapport surface/volume.

Les propriétés structurales intrinsèques de la membrane interviennent également: une instabilité du squelette protéique membranaire aboutit à la perte de fragments de membrane avec réduction de la surface de celle-ci; une rigidification du squelette entraîne une diminution plus ou moins importante de la flexibilité membranaire; une altération des relations des protéines intrinsèques avec le cytosquelette, les protéines cytosoliques et les lipides peuvent altérer la déformabilité. Ainsi deux éléments apparaissent-ils fondamentaux dans la part qui revient à la membrane dans la déformabilité: la structure moléculaire des éléments constitutifs et les interactions entre les constituants membranaires.

Laissant volontairement de côté les problèmes des transferts transmembranaires, ceux de la composition lipidique de la membrane, et ses applications à la pathologie,<sup>45</sup> la présente revue sera essentiellement consacrée aux interactions des protéines membranaires, entre elles et avec celles du cytosol, et à quelques éléments modulateurs de ces interactions.

## INTERACTIONS MOLECULAIRES ENTRE PROTÉINES DU CYTOSQUELETTE

Ces protéines situées à la face interne de la double couche lipidique constituent le squelette du globule rouge.<sup>145</sup> Celui-ci se présente comme un grillage, un filet feutrant la face cytosolique de la membrane dont il peut être isolé après extraction des lipides et des pro-

téines intrinsèques dans un milieu de force ionique relativement élevé (0,6M) en présence de Triton X100.<sup>247</sup> Ce qui reste alors de la membrane («Triton Shells» des auteurs américains)<sup>244</sup> a pu être photographié et paraît formé de mailles inégales reliées les unes aux autres para des noeuds.<sup>96,177</sup> Ce squelette est responsable de la forme des globules rouges normaux et pathologiques:<sup>119,182,258</sup> les Triton Shells préparés à partir d'elliptocytes ou de drépanocytes irréversibles conservent la forme des hématies dont ils dérivent.<sup>146</sup> Il va de soi que le cytosquelette normal est parfaitement déformable puisqu'il suit nécessairement les modifications de forme globule rouge dans la microcirculation. Si, comme il est très probable, la déformabilité du cytosquelette est purement passive, elle met en jeu l'intégrité des protéines qui le constituent et les interactions moléculaires que commandent l'équilibre de la structure squelettique.

Trois protéines, la spectrine,<sup>152</sup> l'actine<sup>277</sup> et la protéine 4.1 forment l'essentiel du cytosquelette; elles sont extraites ensemble de la membrane érythrocytaire dans les milieux de faible force ionique.

### 1.°) Interactions entre molécule de spectrine

La molécule de base de la spectrine est un hétérodimère de Mr 460 000 formé d'une chaîne  $\alpha$  de Mr 240 000 et d'une chaîne  $\beta$  de Mr 220 000. Ces deux chaînes fibrillaires plus ou moins enroulées l'une sur l'autre<sup>252</sup> contractent entre elles des liaisons, dissociables par l'urée et le dodecyl sulfate de sodium (SDS) et leurs domaines fonctionnels commencent à être connus.<sup>97,166,168,264,265,266</sup> La spectrine peut être extraite des membranes sous deux formes: dimérique ou tétramérique selon les conditions physico-chimiques de l'extraction thermodynamique, modifiable selon la température et la force ionique du milieu.<sup>139,200,201,202,203,291</sup> Dans la membrane, l'équilibre est en faveur du tétramère qui semble constituer la forme physiologique de la spectrine.<sup>117</sup> Dimères et tétramères sont les uns et les autres des molécules hautement flexibles.<sup>158,252</sup> Des polymères de plus haut niveau sont obtenus *in vitro* en concentrant les solutions de spectrine: ces conditions de concentration sont analogues à celles présentes localement dans les mailles du cytosquelette et l'existence *in vivo* de polymères de spectrine d'un degré plus élevé que le tétramère est vraisemblable.<sup>167</sup> Il est important de constater que les interactions *in vitro* entre molécules de spectrine ne font intervenir aucune protéine complémentaire et sont sous la dépendance de seuls facteurs physiques. Selon Marrow et Marchesi<sup>167</sup> l'oligomérisation de la spectrine *in vivo* serait essentiellement conséquence de la concentration locale en spectrine, élevée du fait de la contrainte exercée par la fixation à l'ankyrine; cependant des sites d'interac-

tion non covalente pourraient être soumis à un contrôle allostérique par d'autres protéines, par les ions phosphates inorganiques ou une phosphorylation covalente. Un site d'interaction dimère-dimère est placé sur un peptide de Mr 80 000 situé vers une extrémité dite «tête» de la chaîne  $\alpha$ ;<sup>168</sup> la description récente d'une variante de la chaîne  $\beta$  raccourcie d'un peptide de Mr 6 000 dont la présence dans un dimère empêche totalement la formation du tétramère correspondant démontre que la chaîne  $\beta$  intervient également dans l'interaction dimère-dimère,<sup>50</sup> comme il avait été proposé par Speicher et coll.<sup>266</sup>

L'importance des interactions entre dimères de spectrine tient au fait que les anomalies de tétramérisation s'accompagnent en général d'une fragilité du cytosquelette<sup>139</sup> qui conduit à la perte de fragments de membrane et à une hémolyse pathologique. Tel est par exemple le cas de certaines elliptocytoses constitutionnelles dues vraisemblablement à une anomalie moléculaire de la spectrine entravant la tétramérisation;<sup>184</sup> dans de telles formes il existe une population d'érythrocytes de forte densité, de haute concentration corpusculaire en hémoglobine et peu déformables; le trouble de la déformabilité est dû principalement, sinon totalement, à l'augmentation de la viscosité interne et à la diminution du rapport S/V mais la lésion initiale est membranaire.

### 2.°) Interactions spectrine-actine-bande 4.1

Le complexe spectrine-actine-protéine 4.1 a pu être reconstitué *in vitro* à partir de ses éléments isolés,<sup>41,290</sup> à condition que l'actine soit polymérisée et la spectrine tétramérique. Le complexe ternaire isolé, examiné en microscopie électronique, montre les filaments d'actine décorés par les tétramères de spectrine qui semblent fixés à l'actine par leur extrémité distale c'est-à-dire opposée à celle para laquelle se lient deux dimères.<sup>43</sup> Protéine 4.1 qui apparaît comme une bande unique lors de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS selon Fairbanks et coll<sup>60</sup> est, sur les gels en plaques, obtenues selon la technique de Laemmli,<sup>131</sup> dédoublée en bande 4.1a et 4.1b, respectivement de Mr 80 000 et 78 000. La signification de ce dédoublement est incertaine; les deux composants sont des phosphoprotéines de structure moléculaire très voisine.<sup>88</sup> La différence de masse moléculaire peut s'expliquer soit par une analogie génétique aboutissant à deux protéines très semblables, soit par une protéolyse de 4.1a donnant naissance à 4.1b soit par une différence de charge électrique en rapport avec un contenu différent en phosphate ou quelque autre modification post-synthétique.<sup>88</sup> Les formes 4.1a et 4.1b se fixent à la spectrine mais sans que l'on sache si les interactions moléculaires sont identiques pour chaque composant. Se-

lon certains, le rapport qualitatif 4.1a/4.1b serait dépendant de l'âge des globules rouges, la quantité relative de 4.1a augmentant progressivement lors du vieillissement des hématies<sup>108,226</sup> pour une somme 4.1a + 4.1b constante. Il a été postulé que, si les deux composants 4.1a et 4.1b avaient, avec les protéines du cytosquelette, des interactions différentes, les modifications observées au cours du vieillissement pourraient être responsables d'une diminution de la déformabilité érythrocytaire.<sup>108</sup>

Il est maintenant admis que l'actine du globule rouge qui fait partie des  $\beta$ -actines s'y trouve sous une forme particulière dite de protofilaments<sup>27</sup> constitués d'un nombre limité de molécules d'actine monomère<sup>27, 39, 135, 192</sup>. Si effectivement aucun filament d'actine n'a jamais été vu dans la membrane érythrocytaire<sup>194,277</sup> il a été récemment montré que l'actine y était sous forme F composée de 30 monomères formant une double chaîne hélicoidale de 15 monomères de long.<sup>7</sup>

La spectrine facilite l'association de l'actine-F avec la surface cytoplasmique de la membrane<sup>68</sup> mais la formation in vitro de complexes binaire est encore l'objet d'incertitudes. A faible force ionique la spectrine purifiée entraîne la gélification de l'actine en l'absence de bande 4.1 indiquant la possibilité d'une interaction directe entre les deux protéines.<sup>195</sup> Cependant, cette interaction est faible et dépend des conditions expérimentales.<sup>27,42,290</sup> Par contre, la protéine 4.1 a une forte affinité pour la spectrine en solution avec une Kd au voisinage de  $10^{-7}$ M pH 7,6; chaque molécule de l'hétérodimère de spectrine fixe deux molécules des protéines 4.1<sup>289</sup> sur la partie caudale du dimère.<sup>43</sup> La présence de protéine 4.1 augmente considérablement la fixation de l'actine sur la spectrine tant en solution que sur les vésicules retournées déplétées en spectrine. Le mécanisme exact de cette stimulation est incertain: il est possible que la protéine 4.1 intervienne comme un pont entre spectrine et actine ou qu'elle favorise la fixation de cette dernière par un mécanisme allostérique.<sup>40</sup> Le rôle du calcium est discuté.<sup>69</sup> Dans certaines conditions, assez éloignées de l'état physiologique (pH 6,5) un complexe F-actine-protéine 4.1 peut être obtenu dont la formation est dépendante de la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  à une concentration voisine de  $10^{-5}$ M. S'il apparait que la présence de protéine 4.1 est nécessaire à l'association spectrine-actine, il a en outre été montré<sup>42</sup> que la présence de la bande 4.1 rend thixotropiques les gels spectrine-actine ce qui suggère que cette protéine est impliquée dans la propriété de flexibilité de la membrane. L'action stabilisatrice de la bande 4.1<sup>132</sup> sur le cytosquelette est par ailleurs suggéré par l'existence de déficit en cette protéine au cours de certaines formes d'elliptocytoses constitutionnelles<sup>2,61</sup> où les propriétés de la spectrine sont normales et par la démonstration d'anomalies de

l'interaction spectrine-protéine 4.1 chez certains malades porteurs de sphérocytose héréditaire.<sup>86,105</sup>

Certains points restent obscures. Le complexe ternaire formé in vitro est capable de provoquer la gélification de l'actine;<sup>290</sup> à faible force ionique la spectrine purifiée pourrait aussi induire la gélification de l'actine, en l'absence de bande 4.1<sup>39,41</sup> peut-être par simple nucléation à partir de la faible quantité d'actine polymérisée restée liée à la préparation de spectrine.<sup>27,41,225</sup> La structure particulière de l'actine érythrocytaire sous forme de courts filaments impose l'existence d'un système limitant la polymérisation. Le mécanisme en est inconnu; l'existence de protéines régulatrices agissant en «coiffant» une extrémité du filament, bloquant ainsi son élongation («actin capping protein») peut être évoquée; cependant, une telle protéine connue notamment dans les plaquettes sanguines<sup>44</sup> n'a pas été jusqu'ici isolée des membranes érythrocytaires. Il a été suggéré que les oligomères de F-actine présents dans le globule rouge étaient stabilisés sous cette forme par leur liaison à la spectrine<sup>7</sup> et que la dissociation du cytosquelette obtenue par exemple en exposant les ghosts à faible force ionique entraînait la rupture des liaisons actine-spectrine et permettait la dépolymérisation de celle-ci; certains oligomères restés fixés à la spectrine seraient plus résistants à la dépolymérisation; bien que supposé siégeant à l'extrémité caudale des dimères<sup>43,284</sup> le site de fixation de l'actine à la spectrine n'a pas encore été localisé avec certitude et l'on ignore s'il est unique, s'il siège sur la chaîne  $\alpha$  ou  $\beta$  ou s'il existe des sites multiples sur les deux chaînes comme il est suggéré par Calvert et al<sup>31,32</sup> Cependant, plusieurs protéines fixant l'actine («actin binding proteins») ont été récemment reconnues comme ayant une communauté antigénique partielle avec la chaîne  $\alpha$  de la spectrine ce qui suggère que l'actine pourrait s'attacher à celle-ci.<sup>48,79,80,89,188</sup>

### 3.°) Interactions spectrine-ankyrine

La spectrine purifiée sous forme hétérodimérique ou tétramérique se fixe sur les vésicules retournées déplétées en spectrine avec une haute affinité (Kd environ  $10^{-7}$ ) sur un site unique dont il existe approximativement  $10^5$  copies par cellules.<sup>12,17,87</sup> Le site de fixation est sur la chaîne  $\beta$  de la spectrine<sup>12,31</sup> sur un peptide situé vers la côté de la molécule comportant, sur la chaîne  $\alpha$  les sites d'interaction dimère-dimère (168). La chaîne  $\beta$  est en outre porteuse des sites de phosphorylation à cette extrémité et à la distance du site de fixation sur les vésicules<sup>50,266</sup>

L'accepteur la spectrine a été identifié tout d'abord comme un fragment peptidique de Mr 72 000 par Bennett;<sup>14</sup> il a été prouvé par la suite que ce peptide était antigéniquement rattaché à la bande 2.1 la-

quelle a été isolée sous l'appellation d'ankyrine.<sup>19</sup> Par protéolyse fractionnée l'ankyrine donne lieu à des produits de dégradation: les bandes 2.2, 2.3 et 2.6, un peptide de Mr 95 000 (bande 3'), le peptide 72 000 et des fragments plus petits de Mr 27 000 et 18 000.<sup>15</sup> L'établissement des cartes peptidiques a confirmé la parenté étroite de ces peptides.<sup>143</sup> Les peptides de la région 2, la bande 3' et le peptide 72 000 sont capables de fixer la spectrine; Yu et Goodman leur ont donné le nom d'ensemble de «Syndéines».<sup>305</sup> L'ankyrine est présente au nombre de 100 000 copies par cellule; en solution elle forme avec la spectrine un complexe avec une stoechiométrie de une molécule d'ankyrine pour une d'hétérodimère de spectrine;<sup>21,289</sup> comme les dimères de spectrine sont présents au nombre d'environ 200 000 copies par cellule, il est probable que la stoechiométrie dans la membrane est de une molécule de tétramère  $\alpha_2\beta_2$  pour une molécule d'ankyrine.<sup>87</sup> Les relations ankyrine métabolisme érythrocytaire sont incertaines: l'ankyrine serait nécessaire aux modifications de forme de globules rouges induites par la déphosphorylation en ATP.<sup>118</sup>

L'ankyrine n'est pas spécifique du globule rouge: des protéines ayant une communauté antigénique avec l'ankyrine ont été décelées dans les microtubules d'autres cellules,<sup>15,18,288</sup> ces protéines ayant probablement une fonction de liaison analogue à celle de l'ankyrine.<sup>15</sup>

#### 4.°) Interactions spectrine-phospholipides

Les interactions hydrophobes entre un complexe spectrine-actine isolé et une double couche de lipides synthétiques ont été étudiées *in vitro*. Ces études ont montré une préférence nette de la spectrine pour les phospholipides chargés négativement comme la phosphatidylsérine et la phosphatidylglycérol;<sup>162,163</sup> elles ont été confirmées par la méthode de la couche monomoléculaire de lipides.<sup>161</sup> Si les résultats de ces expériences *in vitro* peuvent être extrapolés *in vivo* il convient de remarquer que la spectrine d'une part, la phosphatidylsérine de l'autre, sont localisées à la face interne de la membrane et que la molécule de spectrine contient un domaine fortement hydrophobe susceptible de pénétrer la double couche lipidique.<sup>32</sup> Haest et coll<sup>95</sup> ont en outre montré que la formation de liaisons protéiques par oxydation des groupes sulfhydryles du cytosquelette entraînait un remaniement de la répartition des lipides membranaires tels que la phosphatidylsérine devenait sensible à l'action de la phospholipase à l'extérieur de la membrane.<sup>95</sup> Ces liaisons spectrine-phospholipides sont rapprochées de celles entre l'hémoglobine et la phosphatidylsérine que nous reverrons plus loin.

## INTERACTIONS DES PROTÉINES INTRINSEQUES

### 1.°) Interactions ankyrine-protéine 3

La protéine correspondant à la bande 3 de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS est la principale protéine intrinsèque de la membrane.<sup>29,30,267</sup> L'utilisation de marqueurs a permis de démontrer son caractère transmembranaire;<sup>169</sup> puis la purification<sup>75</sup> et la dissection de sa molécule par digestion trypsique, de reconnaître trois segments:

- un segment externe siège de l'extrémité carboxyterminale de la molécule sur un peptide de Mr 34 000 à 45 000<sup>53,54,154,271,270</sup> porteur des radicaux glucosidiques responsables de l'hétérogénéité de la bande 3<sup>55,71,84,285,287</sup> et de deux des radicaux sulfhydryles (204, 206). Par ces radicaux, le segment externe de la bande 3 est responsable d'interactions avec le milieu extérieur du globule rouge en particulier avec les lectines<sup>276</sup> et les réactifs des groupes SH<sup>121,243</sup> ce qui a été utilisé pour la purification de la bande 3 (et des autres glycoprotéines). Par son extrémité interne ce segment est lié à la double couche lipide;<sup>298</sup>
- un segment médian de Mr 17 000 daltons inclus dans la double couche lipidique. Il est, avec le segment précédent, support du canal des anions.<sup>30,106,149,205,210</sup> Des sites d'inhibition du transfert des anions de mécanisme d'action différent<sup>149</sup> sont situés sur ou au voisinage immédiat de ce segment;<sup>46</sup>
- un segment cytoplasmique d'environ Mr 43 000 daltons<sup>271</sup> et siège de l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale de la molécule<sup>5,55,70</sup> et fortement acide.<sup>70</sup> Ce segment porte les groupes sulfhydryles responsables du «cross-linking» des monomères de bande 3 obtenus par l'association Cu<sup>2+</sup>-orthophenanthroline<sup>206,211</sup> et au moins deux sites de phosphorylation.<sup>53</sup> Il est également le siège des sites de fixation à haute affinité de protéines cytoplasmiques ayant la propriété de se lier à la membrane tels que l'hémoglobine, l'aldolase, la glyceraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase et la phosphofructokinase selon un processus que nous reverrons plus loin<sup>34,104,122,127,160,174,251,273,274,303,306,308</sup>. La molécule complète de protéine 3 est associée en homodimère<sup>179,267,271</sup> et est repliée sur elle-même traversant la membrane au moins deux fois.<sup>116,204,269,270</sup> Il est possible que de plus

hauts polymères soient présents dans la membrane.<sup>52</sup> Tant sur le plan structural que fonctionnel le segment cytoplasmique 43 000 D et le reste de la molécule 55 000 D semblent largement indépendants: le fragment cytoplasmique peut être facilement clivé du reste de la bande 3 par protéolyse sans dénaturation du fragment transmembranaire<sup>6</sup> et sans modification importante du transfert des anions.<sup>93,212</sup>

Si les interactions moléculaires entre le segment interne de la bande 3 et les protéines cytoplasmiques peuvent éventuellement intervenir plus dans la déformabilité érythrocytaire, beaucoup plus importante sur le plan physiologique est l'interaction entre bande 3 et ankyrine qui amarre la protéine transmembranaire au cytosquelette. L'extraction par le Triton X100 des vésicules retournées déplétées en spectrine montre que la protéine 3 est fortement liée à l'ankyrine et à la protéine 4.2.<sup>20</sup> La protéine 4.2 est liée à la bande 3<sup>306</sup> mais comme il a été montré,<sup>20,22,98</sup> sa présence n'est pas nécessaire à la liaison ankyrine-protéine 3. Celle-ci se produit lorsque l'on met en présence le segment interne 43 000 D de la bande 3 et l'ankyrine purifiée,<sup>20,22</sup> avec une haute affinité (Kd  $8 \times 10^{-9}$ M) et une stoechiométrie voisine de une molécule de fragment 43 000 pour une molécule d'ankyrine. Sur des vésicules déplétées en ankyrine la fixation de l'ankyrine marquée est abolie par le clivage protéolytique préalable du segment interne de la protéine 3 et considérablement diminuée en présence d'immun-sérums spécifiques anti-fragment 43 000.<sup>20</sup> La fixation de l'ankyrine n'occupe que moins de 15% des segments 43 000 disponibles à la surface cytoplasmique de la membrane<sup>20</sup> puisque le nombre de copies d'ankyrine par cellule est de  $10^5$  et que celui de la bande 3 est de l'ordre de  $10^6$ .<sup>268</sup>

L'extraction de ghosts par le Triton X100 en présence de 0,1 M KC1 n'extrait pas la totalité de protéine 3, le reste étant formé d'un complexe avec l'ankyrine et les éléments du cytosquelette;<sup>20</sup> cette fraction particulière de la bande 3 a été isolée sous la forme d'un oligomère complexe ankyrine-bande 3, formé d'une chaîne monomérique de chaque peptide,<sup>16</sup> confirmant ainsi l'hétérogénéité au moins fonctionnelle de la protéine 3.<sup>217</sup>

L'interaction entre la protéine 3 et le cytosquelette pose le problème de la mobilité de la protéine 3 et de ses limites. Elgsaeter et coll avaient montré que la spectrine restreignait la diffusion latérale des particules intramembranaires dont on sait qu'elles sont formées de protéine 3<sup>58</sup> et que la précipitation de la spectrine à pH acide entraînait l'aggrégation des particules;<sup>59</sup> Yu et Branton<sup>304</sup> observaient le même phénomène en reconstituant les particules à partir de la bande 3 et de lipides. La mobilité latérale de la protéine 3 elle-

-même a été démontrée par fusion cellulaire avec le virus de Sendai ou le polyéthylène glycol après marquage par fluorescence.<sup>67</sup> Cette mobilité est augmentée de près de 50 fois dans les globules rouges de souris congénitalement dépourvues de spectrine.<sup>248</sup> La limitation de la mobilité latérale de la bande 3 par ses interactions avec le cytosquelette<sup>85</sup> a été confirmée par plusieurs travaux: Schindler et coll ont montré que la mobilité était augmentée par les polyphosphates qui déstabilisent le cytosquelette et diminuée par les polyamines qui affectent l'état d'agrégation de la spectrine.<sup>231</sup> Smith et Palek ont observé que la formation de liaisons disulfides par oxydation de la spectrine limitait la mobilité latérale de la bande 3.<sup>259</sup> Cette limitation pourrait être due soit aux liaisons moléculaires ankyrine-bande 3 soit à l'inclusion du segment cytoplasmique de la protéine 3 à l'intérieur des mailles du squelette par un phénomène purement physique; Golan et Veatch<sup>81</sup> suggèrent que les interactions entre bande 3 et cytosquelette pourraient être de deux ordres: d'une part la formation, dépendante de la température et de la force ionique d'un complexe bande 3-cytosquelette, et d'autre part une interaction à faible affinité, indépendante de la force ionique et de la température. Il proposent que cette dernière interaction pourrait être représentée par un complexe entre bande 3 et spectrine, complétée par des associations à haute et basse affinité entre spectrine et autres éléments membranaires.

Par ailleurs, la mobilité rotatoire de la protéine 3 à l'intérieur de la membrane a été trouvée par certains indépendantes du cytosquelette<sup>36</sup> mais par d'autres limitée par les protéines du cytosquelette dans des vésicules lipidiques reconstituées.<sup>219</sup>

L'environnement lipidique au moins partiel de la protéine 3 a conduit à des tentatives de reconstitution d'un système lipides-protéine 3 soit sous forme de liposomes soit en couches monomoléculaires de lipides. Des vésicules formées de lécithine, de lipides d'origine érythrocytaire, de cholestérol, de glycérophospholipide et de protéine 3, acquièrent la propriété de transfert des anions;<sup>216</sup> de même lorsque la bande 3 est incluse dans des liposomes formés essentiellement de phosphatidylcholine.<sup>142,304</sup>

En couche monomoléculaire de lipides l'interaction lipides-bande 3 est largement dépendante du pH, plus fort à pH acide que neutre ou alcaline, en fonction du pK de la protéine; l'affinité est nettement plus haute pour l'acide phosphatidique et la phosphatidylglycérol que pour la phosphatidylcholine et les sphingomyélines.<sup>233</sup> L'utilisation de marqueurs de spin confirme l'importance du pH dans la fluidité membranaire et le rôle qu'y jouent les protéines.<sup>302</sup> De telles interactions ont très vraisemblablement une importance fonctionnelle. Koppel et coll ont trouvé une relation entre la viscosité membranaire et la mobilité

latérale de la bande 3<sup>129</sup> et montré que celle-ci était augmentée par le triphosphatidylinositol, un phospholipide anionique;<sup>246</sup> cette action analogue à celle d'autres polyanions serait expliquée par une déstabilisation de squelette membranaire; le mécanisme serait alors identique à celui de l'action du 2-3 DPG qui lui aussi augmente la mobilité latérale de la bande 3.<sup>231</sup>

## 2.°) Interactions protéines membranaires-enzymes cytosoliques

Ces interactions peuvent se concevoir sur le plan structural par la démonstration de liaisons entre constituants membranaires et enzymes et sur le plan fonctionnel par l'action d'enzymes cytosoliques sur des substrats membranaires et réciproquement.

Dans les conditions habituelles de l'hémolyse hypotonique c'est-à-dire en milieu tamponné à pH 7,5 et à force ionique inférieure à 0,010 M, la plupart des activités enzymatiques de la glycolyse sont libérées dans le milieu, à l'exception de 30% de l'aldolase, 50 à 70% de la glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogénase (GAPDH), 5% environ de la phosphoglycérate kinase et la phosphofructokinase. La part d'activité enzymatique que reste fixé aux membranes est très largement dépendante de la température, du pH, de la force ionique et de la présence de ligands propres à chaque enzyme. Ainsi, l'augmentation de la force ionique à 0,150 M et au delà entraîne la libération des enzymes liés; la présence de NADH permet de décrocher la quasi totalité de la GAPDH<sup>150,251</sup> celle du fructose 1-6 diphosphate d'éluer l'aldolase.<sup>273</sup> La fixation d'enzymes purifiés sur les membranes préalablement déplétées de l'activité correspondante est obtenue essentiellement en abaissant la force ionique du milieu. Ainsi la GAPDH se fixe sur les stromas déplétés<sup>122</sup> sur deux types de sites à haute et basse affinité<sup>150</sup> dont le nombre total excède de 10 fois le contenu en GAPDH d'un érythrocyte et selon une coopération positive entre les molécules d'enzymes.<sup>306</sup> La même dualité de sites a été rapportée pour la fixation de l'aldolase<sup>273,274</sup> de la phosphoglycérate kinase.<sup>49</sup>

Les protéines enzymatiques se lient au peptide interne de la bande 3,<sup>122,273,274,306</sup> sur le segment acide situé au voisinage de l'extrémité NH<sub>2</sub> terminale<sup>174,282</sup> et sont compétitives les unes vis-à-vis des autres. La stoichiométrie des liaisons bande 3-enzyme a été déterminée: le dimère de protéine 3 fixe deux molécules de GAPDH tétramérique et de même chaque monomère de protéine 3 fixe une molécule d'aldolase<sup>274</sup> et une molécule de PFK.<sup>104</sup> Les enzymes fixés ont des caractéristiques cinétiques modifiés;<sup>124,232,263</sup> l'activité GAPDH par exemple est reversiblement inhibée par la fixation sur la bande 3.<sup>263,282</sup> Le rôle des interactions moléculaires entre bande 3 et certains enzymes

cytosoliques est inconnu. Il n'est pas prouvé avec certitude que les fixations réversibles, aisément réalisées *in vitro*, existent réellement *in vivo* même si certains travaux démontrent la proximité de la GAPDH de la membrane<sup>262</sup> et sa fixation *in situ*.<sup>128</sup> Les conditions expérimentales d'étude sont éloignées des états physiologiques; le mécanisme de la liaison paraît être purement électrostatique et si l'on peut penser que la translocation membrane-cytosol peut jouer un rôle dans le métabolisme glucidique de l'érythrocyte is reste à en apporter la preuve.

La fixation des protéines enzymatiques sur la bande 3 n'est peut être pas exclusive: Yeltman et Harris<sup>303</sup> ont montré que l'aldolase pouvait se lier au complexe spectrine-actine par l'intermédiaire de l'actine et la même constatation a été faite dans notre laboratoire par J. Etiemble pour la phosphofrukinase (non publié). Kirchner-Zilber et Shaklai<sup>127</sup> suggèrent que la bande 3 serait le siège des interactions à faible affinité de l'aldolase, les sites à haute affinité étant localisés dans le complexe spectrine-actine. D'autres types d'interactions moléculaires existent entre enzymes cytosoliques et membrane: ainsi a-t-il été montré que la translocation de la cytochrome B5 réductase de la membrane vers le cytosol était la conséquence d'un clivage protéolytique Ca<sup>2+</sup>-calmoduline dépendant.<sup>123</sup>

## 3.°) Interactions protéine 3-protéine 4.2

La protéine 4.2 est fixée à la protéine 3<sup>306</sup> dans les extraits au Triton et suit cette protéine lors de sa purification. Elle n'est pas déplacée de la bande 3 par la GAPDH comme le sont les protéines qui se fixent sur le peptide interne de celle-ci. Les relations de ces deux protéines ne sont pas actuellement éclaircies.

## 4.°) Interactions de la glycophorine A

La glycophorine A (ou glycoprotéine MN) principale sialoglycoprotéine de la membrane érythrocytaire a été identifiée par Winzler en 1969<sup>301</sup> purifiée et étudiée extensivement par Marchesi et ses collaborateurs<sup>151</sup> et Javald et Winzler.<sup>114</sup> Comme la protéine 3 elle traverse la membrane de part en part avec un segment externe porteur des radicaux glucosidiques un segment proprement transmembranaire «lipophile» et un segment interne cytosolique. Contrairement à ce qui est observé par la bande 3, l'extrémité NH<sub>2</sub> terminale est exposée vers l'extérieur du globule rouge, le COOH terminal vers l'intérieur.<sup>153,115,237</sup> L'analyse structurale des segments peptidiques a été effectuée<sup>109</sup> et la séquence totale achevée.<sup>279</sup>

La glycophorine est dans la membrane sous forme dimérique ou oligomérique.<sup>74,76,234</sup> Sur gel de pol-

yacrylamide SDS la glycophorine A est responsable de deux bandes colorées par la réaction à l'acide periodique Schiff PAS I et II; PAS I répond à la forme dimérique de PAS II.<sup>255</sup> Par sa structure et son antigénicité, elle est étroitement liée à la glycophorine B.<sup>73</sup>

Par son segment intramembranaire elle contracte des liens avec les lipides qui l'environnent.<sup>120</sup> Ces liaisons qui ont été étudiées à partir de reconstitution avec des vésicules lipidiques sont responsables de la formation de particules intramembranaires.<sup>236</sup> Elles immobilisent 4 à 5 molécules de phospholipides par molécule de peptide<sup>214</sup> et intéressent les résidus aminoacides 62-81 et 82-96.<sup>218</sup> Au moins dans les expériences de reconstitution, ces liaisons glycophorine A-phospholipides semblent modifier les transferts transmembranaires; l'introduction du fragment peptidique intramembranaire purifié dans les liposomes augment la perméabilité de la membrane liposomique vis-à-vis du  $K^{+134}$  et l'efflux du  $Na^{+}$  et du  $Ca^{2+213}$

Les interactions entre glycophorine A et autres protéines membranaires ont été discutées. Yu et Steck<sup>306</sup> n'avaient trouvé aucune liaison entre les sialoglycoprotéines d'une part, la bande 3 et les éléments du cytosquelette de l'autre.

Des relations glycophorine A-protéine 3 ont cependant été plus récemment démontrées par une élégante méthode: la mesure de la mobilité rotatoire de la bande 3 est établie en l'absence et en présence d'anticorps antiglycophorine A spécifiques; la présence de ces anticorps inhibe la mobilité de la bande 3 faisant conclure à l'existence de liaisons entre les deux protéines.<sup>178</sup>

D'autres expériences ont montré que la fixation d'une lectine de germe de blé sur la portion externe de la glycophorine A inhibait profondément la déformabilité érythrocytaire étudiée para ektacytométrie et qu'il en était de même si un immun-sérum spécifique de la moitié externe de la glycophorine A était utilisé.<sup>35</sup> cette inhibition serait provoquée par une interaction moléculaire entre la glycophorine et les protéine du cytosquelette.

### 5.°) Interaction glycophorine C-protéine 4.1

La glycophorine C répond à la glycoprotéine PAS 2 de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS. Mueller et Morrison<sup>171</sup> ont constaté que cette glycoprotéine était peu ou pas extractible par le Triton X100 et restait fixée au cytosquelette dans les «shells». Si à l'opposé les ghosts étaient déplétés en complexe cytosquelettique par incubation avec NaOH 0,1N, la glycophorine C était extraite par le Triton. Par extraction sélective des protéines du cytosquelette, en faisant varier le pH du milieu, ces auteurs ont pu montrer que la glycoprotéine était liée à la protéine

4.1; un argument supplémentaire pour authentifier cette liaison est la constatation chez un sujet atteint d'elliptocytose, de l'absence concomitante de la protéine 4.1 et de la glycophorine C.<sup>170</sup> Pour rendre compte de cette liaison Mueller et Morrison ont proposé le nom de glycoconnectine<sup>171</sup> pour cette glycoprotéine qui constituerait donc le second site d'amarage du cytosquelette aux protéines intrisèques.

### 6.°) Interactions hémoglobine-membrane

Les interactions entre l'hémoglobine et la membrane du globule rouge sont connues depuis que l'on a cherché à obtenir des «stromas blancs» par hémolyse hypotonique.<sup>51,160</sup> l'influence du pH et de la force ionique du milieu sur la libération de l'hémoglobine à partir des membranes<sup>51</sup> et sur la fixation de l'hémoglobine sur les membranes isolées<sup>64</sup> ont conduit à considérer les liaisons Hb-membrane comme purement électrostatiques et fait douter de leur rôle physiologique. En effet, si une faible quantité d'hémoglobine (environ 1%) reste fixée à la membrane à pH bas<sup>6,15</sup> la totalité est libérée à pH physiologique;<sup>7,6,160</sup> inversement, dans les expériences de fixation celle-ci ne se produit qu'à pH inférieur à 7. L'emploi de sondes fluorescentes<sup>241</sup> a confirmé le rôle du pH et montré la présence de deux types de sites membranaires à pH 6 l'un ayant une haute affinité, avec une constante ( $1 \times 10^8 M^{-1}$ ) pour un nombre de copies de  $1,2 \times 10^6$  par cellule, l'autre à faible affinité avec une constante de  $6 \times 10^6 M^{-1}$  pour  $6 \times 10^6$  sites par cellule.<sup>242</sup> Une compétition entre la fixation de l'Hb et celle de la GAPDH<sup>220</sup> pour les sites à haute affinité a conduit à identifier ceux-ci à la protéine 3 et plus particulièrement au fragment cytoplasmique de celle-ci.<sup>34,127,308</sup> La liaison artificielle hémoglobine-membrane obtenue par l'oxydation par le complexe  $Cu^{2+}$ -O-phenanthroline se fait sur ce segment d'une part, sur la chaîne  $\beta$  de la globine de l'autre.<sup>227</sup> A pH physiologique il a été montré par résonance paramagnétique électronique qu'il existait une interaction hémoglobine-membrane, largement dépendante de la concentration en hémoglobine mais répondant à une liaison à très basse affinité;<sup>72</sup> cette interaction s'accroît proportionnellement à la baisse du pH.

Cette interaction semble répondre à des sites de fixation situés non dans la fraction protéique de la membrane mais parmi les lipides.<sup>242</sup> Szundi et coll<sup>275</sup> utilisant les couches monomoléculaires de lipides ont montré que l'interaction de l'hémoglobine et de la couche lipidique se produisait dans les régions acides du film lipidique, qu'elle diminuait si le pH était augmenté, qu'elle était encore présente en pH physiologi-

que et qu'elle se faisait avec la phosphatidylsérine; se résultat a été confirmé<sup>253</sup> à partir de liposomes et il a été précisé que deux mécanismes successifs intervenaient: d'abord une interaction électrostatique entre Hb et vésicules puis une déshémoglobine de l'Hb avec transfert de l'hème dans la phase lipidique et rejet de la globine dans la phase aqueuse.

Oxy et déoxyhémoglobine sont toutes deux capables de se fixer sur la membrane au niveau de la bande 3<sup>220</sup> sous la forme de dimère à haute affinité pour l'oxygène pour l'oxyhémoglobine et sous forme de tétramère pour la deoxyhémoglobine;<sup>220</sup> la libération de l'oxygène par la chaîne bêta du dimère, liée à la membrane est fortement ralentie par la liaison ce qui est analogue à ce qui se produit pour les enzymes fixés dont les caractéristiques cinétiques sont modifiées. L'affinité de la deoxyhémoglobine A pour les membranes est plus faible que celle de l'oxyhémoglobine.<sup>238</sup>

Les interactions entre hémoglobine et membrane sont susceptibles de jouer un rôle dans la déformabilité membranaire dans les conditions pathologiques tels que la diminution du pH ou de la force ionique intracellulaire mais surtout en présence d'Hb S. Fisher et coll ont montré que dans les conditions expérimentales identiques plus d'Hb S que d'Hb A restait fixée aux membranes<sup>64</sup> et Shaklai et coll que la deoxyhémoglobine S avait une affinité plus grande que la deoxyhémoglobine A pour les membranes.<sup>240</sup> Une part de la deoxyhémoglobine S fixée aux membranes l'est irréversiblement selon une modalité à deux temps successifs: un premier temps de liaison avec la bande 3 et un second de liaison aux lipides reflétant l'hydrophobicité de l'HbS plus grande que celle de l'HbA. Cette liaison irréversible pourrait être un élément de la formation des drépanocytes irréversibles dont la déformabilité est, comme ils est connu pratiquement abolie. Par ailleurs, il a été suggéré que la membrane érythrocytaire accélérât la vitesse de polymérisation de la deoxyhémoglobine S, la face interne de la membrane servant de «moule» à la polymérisation<sup>250</sup> mais ce fait reste controversé.<sup>82</sup>

L'hémoglobine n'a pas d'interaction directe avec la spectrine. Cependant l'une et l'autre fixent de 2-3 diphosphoglycérate et la fraction de l'hémoglobine proche de la spectrine est en compétition avec celle-ci pour cette fixation; lorsque cette fraction d'Hb est sous forme d'oxy-Hb, le 2-3 DPG se fixe à la spectrine; mais après libération de l'O<sub>2</sub> la deoxyhémoglobine déplace de 2-3 DPG lié à la spectrine selon un processus de translocation entre les deux protéines.<sup>239</sup> Bien que le fait ait été proposé il n'est pas sûr que cette translocation joue un rôle dans l'affinité de l'oxygène pour l'Hb. Par contre, le 2-3 DPG et l'ATP qui comme les autres polyphosphates dissocient le cytosquelette pourraient moduler en les affaiblissant les interactions moléculaires des protéines de celui-ci.<sup>245</sup>

## ROLE DES PHOSPHORYLATIONS

La membrane érythrocytaire renferme des activités protéine-kinasiques multiples susceptibles de phosphoryler les protéines membranaires *in situ*.<sup>8</sup> Deux types de protéine kinase ont été purifiés de la membrane des globules rouges humains: une caséine kinase phosphorylant principalement la spectrine et la protéine 3 et accessoirement des composant mineurs, une histone kinase de type I dépendante de l'AMP cyclique et agissant sur l'anhydrine, les protéines 2.5, 2.9, 4.5, 4.9 et 5.<sup>25, 26</sup>

La phosphorylation de la spectrine est sous la dépendance de l'activité de la caséine kinase membranaire dont l'affinité pour la spectrine, supérieure à celle vis-à-vis de la caséine,<sup>25</sup> lui mérite le nom de spectrine kinase. Seule la chaîne bêta de la spectrine est phosphorylée par cet enzyme; quatre sites phosphorylables (sérine et thréonine) y sont situés vers une extrémité de la chaîne<sup>100</sup> à distance du site de fixation de celle-ci sur l'anhydrine.<sup>264, 265</sup> A l'état d'équilibre 90% des sites de phosphorylation de la spectrine sont occupés dans les membranes intactes.<sup>99, 100</sup>

Les travaux de Sheetz et Singer<sup>249</sup> et Birchmeier et Singer<sup>24</sup> semblaient indiquer que l'état de phosphorylation de la spectrine influençait la forme des érythrocytes et des ghosts et que les modifications morphologiques induites par la déplétion en ATP étaient produites à travers la déphosphorylation de la spectrine. Des résultats opposés ont été rapportés indiquant que l'état de phosphorylation de la spectrine n'avait pas de responsabilité dans les modifications de forme dues à la déplétion en ATP.<sup>4, 189</sup>

Dans l'état actuel de nos connaissances la phosphorylation de la spectrine ne semble intervenir ni dans l'équilibre dimère-tétramère,<sup>194, 291</sup> ni dans la fixation de la spectrine sur l'anhydrine<sup>4</sup> ni dans la liaison spectrine-actine.<sup>27</sup> Certains faits ne peuvent cependant être négligés: Pinder et coll<sup>193</sup> ont montré que la gélification des ghosts normaux était obtenue par incubation en présence d'ATP et de spectrine kinase et était inhibée par la présence d'une phosphatase, expériences évoquant le contrôle des interactions entre actine et spectrine par la phosphorylation de celle-ci;<sup>194</sup> si le fait lui-même est solidement établi, son interprétation reste incertaine.

Dhermy et coll<sup>50</sup> ont observé une variante bêta' de la chaîne bêta de la spectrine, raccourcie d'un peptide porteur de sites de phosphorylation et dont la présence dans un hétérodimère  $\alpha\beta'$  empêchait la formation d'un tétramère  $\alpha_2\beta'_2$ . Il n'est certes pas prouvé que ce défaut de tétramérisation soit du à l'absence des sites phosphorylés mais il pourrait en être ainsi.

Par ailleurs, il n'est nullement prouvé que la spectrine et d'autres protéines membranaires ne soient phosphorylées que par protéine-kinases jusqu'ici iso-

lées. Nelson et coll<sup>176</sup> ont décrit une activité protéine kinasique dépendante de la calmoduline et que aurait la spectrine comme substrat. D'autres protéines kinasiques ont leur activité dépendante de la présence de phospholipides et de  $Ca^{2+}$ : il paraît nécessaire d'en rechercher l'existence et le rôle éventuel dans la membrane érythrocytaire.<sup>283</sup>

Les protéines phosphorylées par l'activité dépendante de l'AMP-cyclique sont l'anhydrine, les protéines 2.5, 2.9, 4.1, 4.5, 4.9 et l'actine. L'actine érythrocytaire extraite de ghosts en milieu de faible force ionique est phosphorylée par la protéine kinase cAMP dépendante de la membrane selon un processus analogue à celui montré par d'autres auteurs.<sup>92, 198, 272, 293</sup> L'actine n'est pas phosphorylée par la protéine kinase AMPc dépendante dans la membrane entière, c'est-à-dire dans sa forme à fois polymérisée et liée aux autres éléments du cytosquelette; la dépolymérisation au moins partielle, que se produit dans les milieux de faible force ionique rend l'actine phosphorylable; dans la forme F in situ, les sites de phosphorylation ou bien sont masqués et inaccessibles à l'enzyme, ou bien sont saturés, et dans ce cas l'actine serait alors déphosphorylée simultanément à sa dépolymérisation. La présence d'oligomères réduits restés fixés à la spectrine en milieu de faible force ionique pourrait expliquer l'apparente phosphorylation AMP-cyclique dépendante de la chaîne alpha de la spectrine observée dans certaines conditions.

Le rôle joué éventuellement par la phosphorylation AMPc dépendante de l'actine érythrocytaire est inconnu. Il a été montré que la phosphorylation ralentissait et inhibait la polymérisation d'actines d'autre origine<sup>92, 293</sup> il peut être suggéré qu'il en est de même pour celle de l'érythrocyte et que si cette phosphorylation existe in vivo elle pourrait rendre compte du caractère limité de la polymérisation.

L'anhydrine est phosphorylée en présence d'AMP cyclique dans la membrane totale, les vésicules retournées ou en solution. Le rôle de cette phosphorylation est inconnu. Elle ne joue pas dans l'identiquement sur les vésicules retournées, que l'anhydrine y soit phosphorylée ou non (MC Lecomte, H. Gautero, P. Boivin, travaux non publiés) on ignore si elle intervient dans les relations avec la bande 3 ou les lipides. La bande 4.5 semble dériver par protéolyse de la protéine 3 principale protéine intrinsèque. Elle représenterait donc un fragment de cette protéine porteur des sites de phosphorylation AMPc dépendants, le reste de la protéine 3 étant phosphorylé sans stimulation par des nucléotides cycliques. En fait, il est possible que la protéine 4.5 qui est le support de la pénétration facilitée du glucose<sup>191</sup> soit une protéine autonome liée à la protéine 3.

Difficile à séparer de l'actine, la protéine 4.9 qui est composante des Triton Shells subit elle aussi une

importante phosphorylation AMPc dépendante. L'origine, la nature et le rôle de cette protéine sont inconnus.

Les bandes 2.5 et 2.9 qui pourraient être des produits de protéolyse partielle de l'anhydrine sont elles aussi porteuses de sites de phosphorylation AMPc dépendants. Si ces protéines (ou ces fragments) jouent un rôle dans les interactions cytosquelett-reste de la membrane ce rôle reste à prouver et l'importance de la phosphorylation à démontrer.

## ROLE DU CALCIUM

L'érythrocyte humain normal contient des très faibles quantités de calcium, la concentration en étant de l'ordre de  $10^{-7}M$ . La membrane érythrocytaire est maintenue contre un gradient électrochimique grâce à l'extrusion du calcium par une pompe supportée par une ATPase dépendante du  $Mg^{2+}$  et activée par le  $Ca^{2+}$ ,<sup>230</sup> en fonctionnement normal cette pompe peut rejeter hors du globule rouge 85 de  $Ca^{2+}$  par minute et par millilitre de globules rouges à pH 7,4 et à  $37^{\circ}C$ .<sup>224</sup>

Liée à la membrane dont elle peut être extraite avec les protéines hydrosolubles du cytosquelette<sup>126, 215, 297</sup> l'ATPase ( $Mg^{2+} + Ca^{2+}$ ) est présente sous deux formes à haute et faible affinité pour le  $Ca^{2+}$ ,<sup>126, 199, 228</sup> dont l'interconversion est sous la dépendance de la calmoduline.<sup>90, 112</sup> Celle-ci est contenue dans le cytosol de l'érythrocyte à partir duquel elle a été purifiée.<sup>113</sup> La forme à forte affinité pour le  $Ca^{2+}$  de la ( $Ca^{2+} + Mg^{2+}$ ) ATPase répond à l'existence d'un complexe enzyme + calmoduline (133, 229). La calmoduline est capable de se fixer sur les membranes<sup>292</sup> non seulement sur l'ATPase ce qui peut servir à purifier celle-ci sur des colonnes de Sepharose calmoduline<sup>78, 181</sup> mais probablement aussi sur la spectrine.<sup>260, 261</sup> La fixation de la calmoduline à la ( $Ca^{2+} + Mg^{2+}$ ) ATPase est réversible et dépend de la concentration en  $Ca^{2+}$  du milieu;<sup>66</sup> lorsque la concentration en  $Ca^{2+}$  est très basse de l'ordre de  $10^{-7} - 10^{-8}M$  comme cela est le cas dans l'érythrocyte normal, la calmoduline est dissociée de l'ATPase à laquelle elle se réassocie lorsque la concentration du  $Ca^{2+}$  augmente et atteint  $10^{-6}$  à  $10^{-5}M$ ;<sup>66</sup> une telle interaction dépendante du  $Ca^{2+}$  explique que la pompe à  $Ca^{2+}$  se mette en action lorsque la concentration cytosolique du calcium augmente, entraînant par une translocation de la calmoduline du cytosol à l'ATPase membranaire, une fixation équimolaire des deux protéines<sup>9</sup> et de ce fait le maintien d'une concentration basse du  $Ca^{2+}$  dans le cytosol par activation de l'ATPase. Il est à remarquer que comme beaucoup d'enzymes dont l'activité est dépendante de la calmoduline, la  $Ca^{2+}$  ATPase voit son activité augmentée par protéolyse

partielle<sup>180, 222</sup> et inhibée par un certain nombre de drogues principalement les phénothiazines;<sup>77</sup> par ailleurs il existerait un inhibiteur thermolabile antagoniste de la calmoduline dans le cytosol érythrocytaire.<sup>223</sup>

Toute diminution de l'activité de la ( $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ ) ATPase entraîne une accumulation du  $\text{Ca}^{2+}$  érythrocytaire. Tel serait notamment le cas du vieillissement physiologique des globules rouges pendant lequel cette activité diminue parallèlement à celle de la calmoduline.<sup>57</sup>

Depuis les travaux de Weed, la Celle et coll<sup>296</sup> il est connu que la déplétion métabolique entraîne une chute de l'ATP et une augmentation importante de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'érythrocyte lesquelles s'accompagnent d'une rétraction de la membrane, de la formation d'échinocytes et d'une diminution de la déformabilité.<sup>187</sup> Les conséquences de la déplétion en ATP et celles de l'accumulation du calcium doivent être séparées l'une de l'autre. Les modifications de forme du globule rouge qui suivent la déplétion métabolique ne sont pas dues à l'accumulation du  $\text{Ca}^{2+}$  et se produisent expérimentalement sur les ghosts dont le  $\text{Ca}^{2+}$  est maintenu bas par l'ionophore A23187 en présence d'EDTA.<sup>62</sup>

Selon certains auteurs les modifications de forme et la diminution de la déformabilité produites par l'accumulation du  $\text{Ca}^{2+}$  sont dues essentiellement à la déshydratation cellulaire que le  $\text{Ca}^{2+}$  entraîne par effet Gardos c'est-à-dire par perte de  $\text{K}^+$  et d'eau.<sup>37</sup> Les concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  nécessaire pour enduire les liaisons entre les protéines de la membrane dans les ghosts isolés et refermés sont hors des concentrations observées en physiologie comme en pathologie humaine.<sup>102, 103</sup> encore faut-il tenir compte dans l'interprétation des résultats que les expériences menées avec des ghosts refermés réalisent des conditions bien différentes de celles des hématies entières dont le cytosol contient des protéines en interactions permanentes avec celles de la membrane. Soumises à une pression de cisaillement sub-hémolytique, les hématies entières accumulent du  $\text{Ca}^{2+}$  et leur déformabilité est diminuée sans que soient modifiées les concentrations intracellulaires des cations sodium et potassium, les taux d'ATP et de  $\text{Mg}^{2+}$ , le volume et la morphologie cellulaire.<sup>182</sup>

En fait, l'intervention du cytosquelette dans les modifications de la forme et dans la diminution de la déformabilité érythrocytaire a été montrée par Palek et coll qui ont observé que la charge en  $\text{Ca}^{2+}$  des ghosts déplétés en spectrine ou exposés à la N-éthyl-maléimide restait dépourvue d'effet.<sup>185</sup> Par ailleurs, était démontré que dans les ghosts chargés en calcium on observait par électrophorèse SDS la formation d'agréats moléculaires et des phénomènes de protéolyse<sup>33, 125, 281</sup> évoquant l'intervention d'enzymes activées par le calcium.<sup>3</sup>

Les transglutaminases catalysent sous la dépendance du  $\text{Ca}^{2+}$  la formation de liaisons  $\epsilon(\gamma$  glutamyl)lysyl. Leur activité sur les protéines membranaires du globule rouge a été décrite par Dutton et Singer<sup>56</sup> et par Lorand et coll<sup>140</sup> qui ont montré la participation de la spectrine et de la protéine 3 dans la formation, induite par l'enzyme, de complexes protéiques de haut poids moléculaire. Il a été montré<sup>141</sup> que l'augmentation de la teneur en calcium intraglobulaire entraînait l'activation de l'enzyme et la formation dans la membrane de polymères intéressants principalement la spectrine et la protéine 4.1.<sup>3</sup> Ces polymères de masse moléculaire différent sont riches en liaisons  $\epsilon(\gamma$  glutamyl)lysine ce qui est un argument de plus pour penser qu'ils sont formés sous l'action d'une transglutaminase. Par ailleurs, la déplétion métabolique et la diminution du taux de l'ATP qui l'accompagne entraînent une inactivation de la transglutaminase et une remarquable diminution de la formation des complexes moléculaires sous l'influence du  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>38, 138</sup> Purifiée à partir du cytosol des érythrocytes humains<sup>28</sup> la transglutaminase activée par le  $\text{Ca}^{2+}$  intervient ainsi très certainement dans la diminution de la déformabilité membranaire qui accompagne l'accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'érythrocyte tant expérimentalement, en utilisant par exemple l'ionophore A23187<sup>130, 141</sup> que dans les conditions cliniques, telle la drépanocytose, où une telle accumulation se produit.

Il est à noter que la spectrine en elle-même a peu d'affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  et les cations bivalents en général et que les faibles interactions, de ceux-ci avec la spectrine n'entraînent d'agréation moléculaire que pour des concentrations élevées de  $\text{Ca}^{2+}$  (supérieures à 2mM) très loin des concentrations physiologiques.<sup>13</sup>

La présence d'enzyme protéolytique dans les érythrocytes est connue depuis les travaux déjà anciens de Morrison et Neurath<sup>165</sup> puis de Haschen<sup>101</sup> et de Schulz.<sup>235</sup> Des activités enzymatiques multiples ont été décelées et plus ou moins purifiées à partir du cytosol<sup>196, 197, 209</sup> certaines diminuant progressivement en fonction de l'âge des érythrocytes.<sup>155</sup> Une protéase cytosolique agissant à pH neutre a son activité dépendante de la présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  à concentration voisine de 50  $\mu\text{M}$ ; cette activité est réglée en outre par la présence d'un inhibiteur spécifique qui forme avec l'enzyme un complexe inactif lorsque la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  est élevée.<sup>156, 157</sup>

L'enzyme aurait une spécificité relative pour la chaîne  $\beta$  de la globine dont nous avons vu plus haut qu'elle était susceptible de se fixer au segment interne de la protéine 3. Une thiol protéase  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante et son inhibiteur spécifique ont également été purifiés.

L'enzyme aurait une spécificité relative pour la chaîne  $\beta$  de la globine dont nous avons vu plus haut qu'elle était susceptible de se fixer au segment interne de la protéine 3. Une thiol protéase  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante et son inhibiteur spécifique ont également été purifiés.

fiées du cytosol;<sup>173</sup> l'enzyme agirait préférentiellement sur les protéines 3 et 4.1 de la membrane érythrocytaire.

Le rôle physiologique et éventuellement pathologique de ces protéases cytosoliques  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendantes est encore très incertain; il a été proposé que l'une d'entre elles aurait comme substrat la pyruvate kinase érythrocytaire dont elle pourrait régler la structure et l'activité.<sup>47</sup> Il a été récemment démontré que la tropoline du muscle cardiaque devenait sensible à l'action d'une protéase neutre  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante lorsqu'elle était préalablement phosphorylée par une protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique.<sup>208</sup> On peut penser qu'un tel mécanisme pourrait intervenir vis-à-vis des protéines membranaires susceptibles d'une telle phosphorylation.

Des activités protéolytiques ont également été localisées dans les membranes érythrocytaires.<sup>9, 10, 11, 23, 164, 208, 278</sup> Ces enzymes seraient capables de dégrader les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de la globine<sup>9</sup> et seraient responsables de l'autodigestion des protéines membranaires;<sup>254, 278</sup> l'une d'elles, une protéase neutre  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante est activée *in vitro* sur la protéine 3 qui est dégradée en composants ayant la mobilité électrophorétique des bandes 4.5 et 7 et en peptides plus petits.<sup>83</sup>

Le calcium pourrait, par ailleurs, provoquer la translocation de protéases cytosoliques et leur liaison à la membrane: Allen et Cadman<sup>1</sup> ont montré ainsi que lorsque des membranes sont incubées en présence de protéase et de calcium on notait une diminution de la spectrine, des protéines 3 et 4.1 et l'apparition de multiples peptides de faible masse moléculaire. S'il en est de même *in vivo*, les protéases neutres cytosoliques ou membranaires activées par le calcium pourraient, dans les circonstances où se produit une accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, être responsables d'une dégradation protéolytique des protéines membranaires et par voie de conséquence d'une déstabilisation des interactions moléculaires. Dans l'exceptionnelle observation d'une anémie hémolytique accompagnée d'élévation du taux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et d'une perte de spectrine de tels phénomènes de protéolyse pourraient être discutés.<sup>207</sup>

## ROLE DE L'ATP

Dans les expériences d'incubation *in vitro* dans les conditions de déplétion métabolique c'est-à-dire en l'absence de glucose, la concentration de l'ATP érythrocytaire diminue rapidement. Lux et coll ont montré<sup>147</sup> que parallèlement à la chute du taux d'ATP, on observait une augmentation de la part inextractible de la spectrine. Celle-ci se produit rapidement lorsque la concentration en ATP est inférieure à 15% environ de la concentration normale. Une telle

augmentation ne se produit pas lorsque les hématies sont incubées en présence de glucose. L'extractibilité de la spectrine peut en outre être réversible si les conditions métaboliques permettant la production d'ATP sont réalisées après un certain temps d'incubation dans des conditions défavorables. De l'actine et de l'hémoglobine sont elle-mêmes accumulées et non extraites des membranes en déplétion d'ATP. Ces modifications vont de pair avec la perte de cations monovalents, l'accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$ , la diminution de la déformabilité érythrocytaire décrites par Weed et La Celle;<sup>296</sup> comme nous l'avons vu plus haut les modifications de forme induites par la déplétion métabolique sont indépendantes de celles provoquées par l'accumulation du  $\text{Ca}^{2+}$ . L'abaissement du pH du milieu à moins de 5,5-6 et l'élévation de la température à plus de 49°C entraînent la dénaturation de la spectrine et son inextractibilité sans relation avec la teneur en ATP<sup>136, 257</sup>

L'inextractibilité de la spectrine pourrait expliquer la libération par les hématies en déplétion métabolique de vésicules dont l'analyse a montré qu'elles ne contenaient plus de spectrine.<sup>144</sup> Une telle libération est également produite lors de l'accumulation du  $\text{Ca}^{2+}$ , inhibée par l'EDTA et peut-être sous la dépendance de la calmoduline;<sup>172</sup> le mécanisme interne intéressant la spectrine peut être identique à celui de la déplétion en ATP même si l'un des temps de la vésiculation est due à la formation de diacylglycérol à partir des phospholipides.

L'inextractibilité de la spectrine est expliquée par la formation de complexes macromoléculaires formés essentiellement de polymères de spectrine et de protéines 4.1, 4.5, 4.9, 5 et 8<sup>186</sup> complexes mis en évidence par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS dans les membranes solubilisées d'hématies incubées en déplétion métabolique aérobie à partir de la 18ème heure d'inhibition environ.<sup>186</sup> En même temps que ces formations de polymères de haut poids moléculaire, ces membranes sont le siège d'une rétention d'hémoglobine.<sup>186</sup> La formation des complexes de haut poids moléculaire se ferait en deux temps: un réarrangement des protéines membranaires suivi de liaisons disulfides par oxydation des groupes sulfhydriles des molécules protéiques voisines les unes des autres.

En fait, les conditions de déplétion métabolique réalisées expérimentalement *in vitro* sont la caricature de ce qui est susceptible de se produire *in vivo* dans les circonstances pathologiques s'accompagnant de diminution de la concentration d'ATP érythrocytaire. Si la formation de liaisons entre les protéines membranaires se produit en l'absence d'ATP cela signifie que celui-ci joue un rôle dans le maintien de l'équilibre des interactions moléculaires normales. La multiplicité des réactions dans lesquelles l'ATP est imparti lui fait jouer potentiellement un rôle important dans chacun

des éléments qui contrôlent la déformabilité érythrocytaire, même si ce rôle est encore mal compris.

Il intervient dans la viscosité interne: comme substrat des ATPases il règle la concentration des cations monovalents et par voie de conséquence le volume du globule rouge, l'ionocité du milieu intérieur; comme modulateur accessoire de la fixation de l'O<sub>2</sub> il modifie l'hémoglobine; il est un élément capital de l'intégrité structurale morphologique et fonctionnelle de la membrane: il est nécessaire à l'échange des phospholipides, il évite la formation des cross-linkages entre protéine membranaire; il est le substrat des protéine-kinases dépendantes et indépendantes de l'AMP-cyclique grâce auxquelles sont phosphorylées les protéines membranaires; comme substrat de l'ATPase à calcium il règle le taux de ce cation dans le cytosol et la membrane et évite indirectement la formation de complexes macromoléculaires anormaux; en excès, il destabilise le cytosquelette.

## ROLE DES OXYDATIONS

Les agents oxydants ont la capacité de réagir avec l'O<sub>2</sub> pour former les espèces réactives de l'oxygène ou radicaux libres dont la toxicité pour les cellules est redoutable; l'oxydation de l'hémoglobine peut être à l'origine de ces formes activées de l'oxygène O<sub>2</sub>, OH et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le globule rouge possède avec la superoxyde dismutase un agent de destruction rapide de l'O<sub>2</sub> avec la glutathion peroxydase un enzyme de détoxication des peroxydes. Dans ces circonstances pathologiques, les systèmes de lutte contre l'oxydation peuvent être débordés comme cela est le cas par exemple au cours des déficits en G6PD. Les agents oxydants entraînent alors trois types de lésions: la formation de dérivés d'oxydation de l'hémoglobine, le couplage des protéines de la membrane rigidifiant celle-ci et bloquant sa déformabilité, la peroxydation des lipides de la membrane.

Expérimentalement les conséquences de l'oxydation sur les membranes érythrocytaire ont été étudiées principalement au moyen des oxydants des groupes sulfhydryles.<sup>256,267,294,295</sup> Les agents réactifs des groupes SH que ne traversent pas la membrane sont dépourvus d'action; ceux que pénètrent dans le globule rouge en diminuant la déformabilité et les agents défonctionnels tels que la diamide, le tétrathionate, la N-N' p-phénylénédimaléimide sont plus efficaces que les agents monofonctionnels comme la N-éthylmaléimide. Leur action est empêchée ou réversée par les protecteurs des groupes sulfhydryles.<sup>63</sup> Le système oxydatif Cu<sup>2+</sup>-orthophénanthroline a été l'un des plus employés.<sup>94,138,267,294</sup> Sous son influence sont formés des oligomères de spectrine ne semblant pas dépasser le niveau du tétramère<sup>137</sup> et des complexes com-

prenant la spectrine et la bande 4.9, des dimères, trimères et tétramères de la bande 3, des dimères des bandes 4.1, 4.2 et 5 et des composants complexes de haut poids moléculaire. La diamide produit des cross-linkings analogues avec une action préférentielle sur la spectrine<sup>63</sup> et la formation de liaisons entre la spectrine et la bande 3, limitant la mobilité latérale de celle-ci.<sup>259</sup> Les cross-linkings produits sous l'influence de la diamide diminuent la température critique de fragmentation des hématies.<sup>307</sup> Celle-ci est très précisément de 49°C<sup>145,148</sup> et répond à la température de dénaturation de la spectrine, est abaissée aux environs de 44°C; le phénomène est réversible par les agents de réduction des groupes sulfhydryles. La diamide inhibe la phosphorylation de la spectrine<sup>107</sup> probablement en masquant les sites de phosphorylation dans les complexes multimoléculaires.

L'effet de liaison entre les protéines voisines obtenues par le système Cu<sup>2+</sup>-orthophénanthroline peut sembler-t-il être provoqué par le cuivre seul;<sup>175,221</sup> in vitro, le sulfate de cuivre provoque la formation de ponts disulfures et diminue la déformabilité globulaire avant que n'apparaissent la diminution du rapport surface/volume, l'oxydation de l'hémoglobine<sup>300</sup> et l'augmentation de la viscosité interne (175), données qui peuvent être en cause in vivo lors de l'intoxication par le cuivre et lors des hémolyses de la maladie de Wilson.

Expérimentalement, sur les hématies entières certains réactifs des groupes SH provoquent des liaisons entre l'hémoglobine d'une part et les protéines membranaires: spectrine, 2.2, 2.4, 3, 4.1, 4.2, 6 et 7;<sup>295</sup> ces liaisons oxydatives sont différentes de celles que nous avons vues plus haut entre hémoglobines et segment interne de la bande; elles peuvent expliquer les difficultés rencontrées pour obtenir des membranes blanches dépourvues d'Hb à partir de certains globules rouges pathologiques.

Les agents oxydants agissent en outre sur les lipides membranaires provoquant la peroxydation lipidique et la production de malonyldialdéhyde; le calcium aurait un rôle potentialisateur de cette peroxydation.<sup>111</sup> La malonyldialdéhyde provoquerait secondairement des liaisons entre protéines formant des complexes de haut poids moléculaire incluant la spectrine<sup>110</sup> et diminuerait la déformabilité<sup>190</sup> comme dans certaines conditions pathologiques.<sup>65</sup>

## CONCLUSION

Le rôle joué par la membrane dans la déformabilité érythrocytaire est fondamental. Il est vrai que le mécanisme immédiat de la déformabilité est souvent celui des modifications de la viscosité interne et/ou du rapport surface/volume. Mais en dehors des altérations des propriétés physiques de l'hémoglobine, la

viscosité interne est sous la stricte dépendance des transferts trans-membranaires d'eau et des cations qui sont une propriété fonctionnelle essentielle de la membrane. En dehors de l'hydratation elle-même due à des troubles de transfert primitivement membranaires entraînant une augmentation du volume érythrocytaire, les modifications du rapport surface/volume sont dues à une diminution de la surface membranaire. La perte de fragments de membrane peut être d'origine exogène comme au cours des anémies hémolytiques à autoanticorps ou par fragmentation, mais elle résulte dans de nombreux cas d'une altération structurale de la membrane elle-même.

La flexibilité membranaire dépend de l'intégrité d'une structure protéique complexe dans laquelle le squelette membranaire a un rôle privilégié mais non exclusif. Chaque molécule protéique intégrée dans ce squelette y intervient pour en assurer la stabilité, les exemples recueillis dans la pathologie congénitale en apportant la démonstration. L'équilibre de la membrane est également sous la dépendance des interactions entre les molécules du cytosquelette, les protéines dites intrinsèques et la bicouche lipidique. Malheureusement, les facteurs qui commandent ou influencent ces interactions sont encore mal connus. Les rôles du calcium, de l'ATP, des agents oxydants ont déjà fait l'objet de travaux importants dont les résultats ne sont pas toujours décisifs; celui des phosphorylations reste inexplicé. Il reste donc beaucoup à apprendre. Deux modèles méthodologiques peuvent, à côté des recherches physiques et chimiques habituelles, aider aux progrès: d'une part l'observation privilégiée d'anomalies structurales héréditaires de protéines membranaires qui permet de connaître le rôle de ces protéines et de leurs sites fonctionnels, d'autre part l'utilisation de substances chimiques par exemple médicamenteuse, modifiant les propriétés membranaires, à condition de connaître précisément le point d'impact de ces substances.

### BIBLIOGRAPHIE

1. ALLEN DW and CADMAN S.: Calcium-induced erythrocyte membrane changes. The role of adsorption of cytosol proteins and proteases. *Biochem. Biophys. Acta* 1979, 551, 1-9.
2. ALLOISIO N, DORLEAC E, GIROT R, DELAUNAY J.: Analysis of the red cell membrane in a family with hereditary elliptocytosis. Total or partial absence of protein 4.1. *Hum Genet* 1981, 59, 68-71.
3. ANDERSON DR, DAVIS JL and CARRAWAY KL.: Calcium-promoted changes of the human erythrocyte membrane. *J. Biol Chem*, 1977, 252, 6617-6623.
4. ANDERSON JM and TYLER JM.: State of spectrin phosphorylation does not affect erythrocyte shape or spectrin binding to erythrocyte membranes. *J. Biol Chem* 1980, 255, 1259-1265.
5. APPELL KC and LOW PS.: Partial structural characterization of the cytoplasmic domain of the erythrocyte membrane protein, band 3. *J. Biol Chem* 1981, 256, 11104-11111.
6. APPELL KC and LOW PS.: Evaluation of structural interdependence spanning and cytoplasmic domain of band 3. *Biochemistry* 1982, 21, 2151-2157.
7. ATKINSON MAL, MORROWS JS and MARCHESI VT.: The polymeric state of actin in the human erythrocyte cytoskeleton. *J. Cell Biochem* 1982, 18, 493-505.
8. AVRUCH J and FAIRBANKS G.: Phosphorylation of endogenous substrates by erythrocyte membrane protein kinases. I. A monovalent cation stimulated reaction. *Biochemistry* 1974, 13, 5507-5514.
9. BALLAS SK and BURKA ER.: Catabolism of hemoglobin by human erythrocyte membranes. *J. Lab. Clin. Med.* 1978, 92, 387-392.
10. BALLAS SK and BURKA ER.: Protease activity in human erythrocyte: localization to the cell membrane. *Blood* 1979, 53, 875-882.
11. BALLAS SK, BURKA ER and GILL FM.: Abnormal red cell membrane proteolytic activity in severe heterozygous  $\beta$ -thalassemia. *J. Lab. Clin. Med.* 1982, 99, 263-274.
12. BASKIN GS and LANGDON RG.: A spectrin-dependent ATPase of the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 1981, 256, 5428-5435.
13. BEAVEN GH and GRATZER WB.: Interaction of divalent cations with human red cell cytoskeletons. *Biochim. Biophys. Acta* 1980, 600, 140-149.
14. BENNETT V.: Purification of an active proteolytic fragment of the membrane attachment site for human erythrocyte spectrin. *J. Biol. Chem.* 1978, 253, 2292-2299.
15. BENNETT V.: The molecular basis for membrane — cytoskeleton association in human erythrocytes. *J. Cell. Biochem.* 1982, 18, 49-65.
16. BENNETT V.: Isolation of an ankyrin-band 3 oligomer from human erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1982, 689, 475-484.
17. BENNETT V. and BRANTON D.: Selective association of spectrin with the cytoplasmic surface of human erythrocyte plasma membrane. Quantitative determination with purified  $^{32}\text{P}$  spectrin. *J. Biol. Chem.* 1977, 252, 2753-2763.
18. BENNETT V and DAVIS J.: Erythrocyte ankyrin: immuno-reactive analogues are associated with mitotic structures in cultured cells and microtubules in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1981, 78, 7550-7554.

19. BENNETT V and STENBUCK PJ.: Identification and partial purification of ankyrin, the high affinity membrane attachment site for human erythrocyte spectrin. *J. Biol. Chem.* 1979, 254, 2533-2541.
20. BENNETT V and STENBUCK PJ.: The membrane attachment protein for spectrin in associated with band 3 in human erythrocyte membranes. *Nature* 1979, 280, 468-473.
21. BENNETT V and STENBUCK PJ.: Human erythrocyte ankyrin. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 1980, 255, 2540-2548.
22. BENNETT V and STENBUCK PJ.: Association between ankyrin and the cytoplasmic domain of band 3 isolated from the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 1980, 255, 6424-6432.
23. BERNACKI RJ and BOSMANN HB.: Red cell hydro-lases. II. Protéinase activities in human erythrocyte plasma membranes. *J. Membrane Biol.* 1972, 7, 1-14.
24. BIRCHMEIER W and SINGER SJ.: On the mechanism of ATP-induced shape changes in human erythrocyte membranes II. The role of ATP. *J. Cell Biol.* 1977, 73, 647-659.
25. BOIVIN P, GARBARZ M, DHERMY D and GALAND C.: In vitro phosphorylation of the red blood cell cytoskeleton complex by cyclic AMP-dependent protein kinase from erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1981, 647, 1-6.
26. BOIVIN P, GARBARZ M and GALAND C.: Casein kinase from human erythrocyte membrane, purification, characterization and comparison with the cytosolic enzyme. *Internat J. Biochem.* 1980, 12, 445-449.
27. BRENNER SL and KORN ED.: Spectrin/actin complex isolated from sheep erythrocytes accelerates actin polymerization by simple nucleation. *J. Biol. Chem.* 1980, 255, 1670-1676.
28. BRENNER SC and WOLD F.: Human erythrocyte transglutaminase. Purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1978, 522, 74-83.
29. BRETSCHER MS.: A major protein which spans the human erythrocyte membrane. *J. Mol. Biol.* 1971, 59, 351-357.
30. CABANTCHIK ZI and ROTHSTEIN A.: Membrane proteins related to anion permeability of human red blood cells. *J. Membr. Biol.* 1974, 15, 207-226.
31. CALVERT R, BENNETT P and GRATZER W.: Properties and structural role of the subunits of human spectrin. *Eur. J. Biochem.* 1980, 107, 355-361.
32. CALVERT R, UNGEWICKELL E and GRATZER W.: A conformational study of human spectrin. *Eur. J. Biochem.* 1980, 107, 363-370.
33. CARRAWAY KL, TRIPLETT RB and ANDERSON DR.: Calcium-promoted aggregation of erythrocyte membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1975, 379, 571-581.
34. CASSOLY R.: Interaction of hemoglobin with the red blood cell membrane. A saturation transfer electron paramagnetic resonance study. *Biochim. Biophys. Acta* 1982, 689, 203-209.
35. CHASIS JA, MOHANDAS N, HEATH BP, ROSSI ME and SHOHET SB.: Glycophorin. A modulates red cell membrane deformability through the membrane skeleton (Abst). *Blood* 1981, 58 suppl 1, 25a.
36. CHERRY RJ, BÜRKLY A, BUSSLINGER M, SCHNEIDER G and PARISH GR.: Rotational diffusion of band 3 proteins in the human erythrocyte membrane. *Nature* 1976, 263, 389-393.
37. CLARK MR, MOHANDAS N, FEO C, JACOBS MS and SHOHET SB.: Separate mechanisms of deformability loss in ATP-depleted and Ca-loaded erythrocyte. *J. Clin. Invest.* 1981, 67, 531-539.
38. COETZER TC and ZAIL SS.: Cross-linking of membrane proteins of metabolically-depleted and calcium-loaded erythrocytes. *Brit. J. Haemat.* 1979, 43, 375-390.
39. COHEN CM and BRANTON D.: The role of spectrin in erythrocyte membrane-stimulated polymerisation. *Nature (London)* 1979, 279, 163-165.
40. COHEN CM and FOLEY SF.: The role of band 4.1 in the association of actin with erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1982, 688, 691-701.
41. COHEN CM, JACKSON PL and BRANTON D.: Actin-membrane interactions: association of G-actin with the red cell membrane. *J. Supramolec Structure* 1978, 9, 113-124.
42. COHEN CM and KORSGREN C.: Band 4.1 causes spectrin-actin gels to become thixotropic. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980, 97, 1429-1435.
43. COHEN CM, TYLER JM and BRANTON D.: Spectrin actin association studied by electron microscopy of shadowed preparations. *Cell.* 1980, 21, 875-883.
44. COLLIER NC and WANG K.: Human platelet P235: a high Mr protein which restricts the length of actin filaments. *FEBS Lett* 1982, 143, 205-210.
45. COOPER RA.: Abnormalities of cell membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N. Engl. J. Med.* 1977, 297, 371-377.
46. COUSIN JL and MOTAIS R.: Inhibition of anion transport in the red blood cell by anionic amphiphilic compounds. Determination of the flufenamate-binding site by proteolytic dissection of the band 3 protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1982, 687, 147-155.
47. DAHLQUIST-EDBERG U and EKMAN P.: Purification of an  $Ca^{2+}$ -activated protease from rat erythrocytes and its possible effect on pyruvate kinase in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1981, 660, 96-101.
48. DAVIS J and BENNET V.: Microtubule-associated protein 2, a microtubule associated protein from brain, is immunologically related to the alpha subunit of erythrocyte spectrin. *J. Biol. Chem.* 1982, 257, 5816-5820.

49. DE BK and KIRTLEY ME.: Interaction of phosphoglycerate kinase with human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 1977, 252, 6715-6720.
50. DHERMY D, LECOMTE MC, GARBARZ M, BOURNIER O, GALAND C, GAUTERO H, FEO C, ALLOISIO N, DELAUNAY J and BOIVIN P.: Spectrin beta chain variant associated with hereditary elliptocytosis. *J. Clin. Invest.* 1982, 70, 707-715.
51. DODGE JR, MITCHELL C and HANAHAH DJ.: The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1963, 100, 119-130.
52. DORST HJ and SCHUBERT D.: Self-association of band 3-protein from human erythrocyte membrane in aqueous solutions. *Hoppe Seyler's Z Physiol. Chem.* 1979, 360, 1605-1618.
53. DRICKAMER LK.: Fragmentation of the 95,000 dalton transmembrane polypeptide in the lipid bilayer. *J. Biol. Chem.* 1976, 251, 5115-5123.
54. DRICKAMER LK.: Fragmentation of band 3 polypeptide from human erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 1977, 252, 6909-6917.
55. DRICKAMER LK.: Orientation of the band 3 polypeptide from human erythrocyte membranes. Identification of NH<sub>2</sub> terminal sequence and site of carbohydrate attachment. *J. Biol. Chem.* 1978, 253, 7242-7248.
56. DUTTON A and SINGER SJ.: Crosslinking and labeling of membrane proteins by transglutaminase-catalyzed reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1975, 72, 2568-2571.
57. EKHOLM JE, SHUKLA SD and HANAHAH DJ.: Change in cytosolic calmodulin activity of density (age) separated human erythrocyte towards membrane Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981, 103, 407-413.
58. ELGSAETER A and BRANTON D.: Intramembrane particles aggregation in erythrocyte ghosts. I. The effect of protein removal. *J. Cell Biol.* 1974, 63, 1018-1030.
59. ELGSAETER A, SHOTTON AD and BRANTON D.: Intramembrane particle aggregation in erythrocyte ghosts II. The influence of spectrin aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1976, 426, 101-122.
60. FAIRBANKS G, STECK TL and WALLACH DFH.: Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 1971, 6, 2606-2617.
61. FEO CS, FISHER S, PIAU JP, GRANGE MJ and TCHERNIA G.: Première observation de l'absence d'une protéine de la membrane érythrocytaire (bande 4.1) dans un cas d'anémie elliptocytaire familiale. *Nouv. Rev. Fr. Hématol* 1980, 22, 315-325.
62. FERRELL JE and HUESTIS WH.: Calcium does not mediate the shape change that follows ATP depletion in human erythrocyte. *Biochim. Biophys. Acta* 1982, 687, 321-328.
63. FISCHER TM, HAEST CWM, STÖHR M, KAMP D and DEUTICKE B.: Selective alteration of erythrocyte deformability by SH-reagents. Evidence for an involvement of spectrin in membrane shear elasticity. *Biochim. Biophys. Acta* 1978, 510, 270-282.
64. FISCHER S, NAGEL RL, BOOKCHIN RM, ROTH EF and TELLEZ-NAGEL I.: The binding of hemoglobin to membranes of normal and sickle erythrocyte. *Biochim. Biophys. Acta* 1975, 375, 422-433.
65. FLYNN TP, JOHNSON GJ and ALLEN DW.: Oxidative damage of erythrocyte membrane lipids and proteins in hemoglobin Köln disease (Abst). *Blood* 1981, 58, Suppl. 1 p. 48a.
66. FODER B and SCHARFF O.: Decrease of apparent calmodulin affinity to erythrocyte (Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>)-ATPase at low Ca<sup>2+</sup> concentration. *Biochim. Biophys. Acta* 1981, 649, 367-376.
67. FOWLER V and BRANTON D.: Lateral mobility of human erythrocyte integral membrane proteins. *Nature* 1977, 268, 23-26.
68. FOWLER VM, LUNA EJ, HARGREAVES W, TAYLOR DL and BRANTON D.: Spectrin promotes the association of F-actin with the cytoplasmic surface of the human erythrocyte membrane. *J. Cell Biol.* 1981, 88, 388-395.
69. FOWLER V and TAYLOR DL.: Spectrin plus band 4.1 cross-link actin. Regulation by micromolar calcium. *J. Cell Biol.* 1980, 85, 361-376.
70. FUKUDA M, ESHDAT Y, TARONE G and MARCHESI VT.: Isolation and characterization of peptides derived from the cytoplasmic segment of band 3, the predominant intrinsic membrane protein of the human erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 1978, 253, 2419-2428.
71. FUKUDA M, FUKUDA MN and HAKOMORI S.: Developmental change and the genetic defect in the carbohydrate structure of band 3 glycoprotein of human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 1979, 254, 3700-3703.
72. FUNG LWM.: Spin label detection of hemoglobin membrane interaction at physiological pH. *Biochemistry* 1981, 20, 7162-7166.
73. FURTHMAYR H.: Glycoproteins A, B and C: A family of sialoglycoproteins. Isolation and preliminary characterization of trypsin derived peptides. *J. Supramolec Struct.* 1978, 9, 79-95.
74. FURTHMAYR H, GALARDY RE, TOMITA M and MARCHESI VT.: The intramembranous segment of human erythrocyte glycoprotein A. *Arch. Biochem. Biophys* 1978, 185, 21-29.
75. FURTHMAYR H, KAHANE I and MARCHESI VT.: Isolation of the major intrinsic transmembrane protein of the human erythrocyte membrane. *J. Membr. Biol.* 1976, 26, 173-187.
76. FURTHMAYR H and MARCHESI VT.: Subunit structure of human erythrocyte glycophorin A. *Biochemistry* 1976, 15, 1137-1144.

77. GIETZEN K, MANSARD A and BADER H.: Inhibition of human erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$ -transport ATPase by phenothiazines and butyrophenones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980, *94*, 674-681.
78. GIETZEN K, TEJCKA M and WOLF HU.: Calmodulin affinity chromatography yields a functional purified erythrocyte ( $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ )-dependent adenosine triphosphate. *Biochem. J.* 1980, *189*, 81-88.
79. GLENNEY DR, GLENNEY P, OSBORN M and WEBER K.: An F-actin and calmodulin-binding protein from isolated intestinal brush border has a morphology related to spectrin. *Cell* 1982, *28*, 843-854.
80. GLENNEY JR, GLENNEY P and WEBER K.: Erythroid spectrin, brain fodrin, and intestinal brush border proteins (TW 260/240) are related molecules containing a common calmodulin-binding subunit bound to a variant cell-specific subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1982, *79*, 4002-4005.
81. GOLAN DE and VEATCH W.: Lateral mobility of band 3 in the human erythrocyte membrane studied by fluorescence photobleaching recovery: evidence for control by cytoskeletal interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1980, *77*, 2537-2541.
82. GOLDBERG MA, LALOS AT and BUNN HF.: The effect of erythrocyte membrane preparation on the polymerization of sickle hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 1981, *256*, 193-197.
83. GOLOVTCHENKO-MATSUMOTO AM, MATSUMOTO I and OSAWA T.: Degradation of band 3 glycoprotein *in vitro* by a protease isolated from human erythrocyte membrane. *Eur. J. Biochem.* 1982, *121*, 463-467.
84. GOLOVTCHENKO-MATSUMOTO AM and OSAWA T.: Heterogeneity of band 3, the major intrinsic protein of human erythrocyte membranes. *J. Biochem.* 1980, *87*, 847-854.
85. GOODMAN SR and BRANTON D.: Spectrin binding and the control of membrane protein mobility. *J. Supramolec Struct* 1978, *8*, 455-463.
86. GOODMAN SR, KESSELRING JJ, WEIDNER SA and EYSTER EM.: The molecular alteration in the cytoskeleton of hereditary spherocyte. *J. Supramolec Struct* 1981, Suppl. 5 p. 131.
87. GOODMAN SR and WEIDNER SA.: Binding of spectrin  $\alpha_2\beta_2$  tetramers to human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 1980, *255*, 8082-8086.
88. GOODMAN SR, YU J, WHITFIELD CF, CULP EN and POSNAK EJ.: Erythrocyte membrane skeletal protein bands 4.1a and b are sequence-related phosphoproteins. *J. Biol. Chem.* 1982, *257*, 4564-4569.
89. GOODMAN SR, ZAGON IS and KULIKOWSKI RR.: Identification of a spectrin like protein in non-erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1981, *78*, 7570-7574.
90. GOPINATH RM and VINCENZI FF.: Phosphodiesterase protein activator mimics red blood cell cytoplasmic activator of ( $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ ) ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977, *77*, 1203-1209.
91. GRAF E and PENNISTON JT.: Equimolar interaction between calmodulin and the  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase from human erythrocyte membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1981, *210*, 257-262.
92. GRAZI E and MAGRI E.: Phosphorylation of actin and removal of its inhibitory activity on pancreatic DNase I by liver plasma membranes. *FEBS Lett* 1979, *104*, 284-286.
93. GRINSTEIN S, SHIP S and ROTHSTEIN A.: Anion transport in relation to proteolytic dissection of band 3 protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1978, *507*, 294-304.
94. HAEST CWM, KAMP O, PLASA G and DEUTICKE B.: Intra and intermolecular cross-linking of membrane proteins in intact erythrocytes and ghosts by SH-oxidizing agents. *Biochim. Biophys. Acta* 1977, *469*, 226-230.
95. HAEST CWM, PLASA G, KAMP O and DEUTICKE B.: Spectrin as a stabilizer of phospholipid asymmetry in the human erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1979, *509*, 21-32.
96. HAINFELD JF and STECK TL.: The sub-membrane reticulum of the human erythrocyte: a scanning electron microscope study. *J. Supramolec Struct* 1977, *6*, 301-311.
97. HANSPAL M and RALSTON GB.: Purification of a trypsin insensitive fragment of spectrin from human erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1981, *669*, 133-139.
98. HARGREAVES WR, GIEDD KN, VERKLEIJ A and BRANTON D.: Reassociation of ankyrin with band 3 in erythrocyte membranes and in lipid vesicles. *J. Biol. Chem.* 1980, *255*, 11965-11972.
99. HARRIS HW, LEVIN N and LUX SE.: Comparison of the phosphorylation of human erythrocyte spectrin in the intact red cell and in various cell-free systems. *J. Biol. Chem.* 1980, *255*, 11521-11525.
100. HARRIS HW and LUX SE.: Structural characterization of the phosphorylation sites of human erythrocyte spectrin. *J. Biol. Chem.* 1980, *255*, 11512-11520.
101. HASCHEN RJ.: Charakterisierung und Bestimmung der Tripeptidase menschlicher Erythrozyten. *Acta biol. med. German* 1962, *8*, 209-216.
102. HEATH BP, CLARK MR, MOHANDAS N and SHOHET SB.: Effect of calcium on red cell membrane deformability and mechanical stability (Abst). *Blood* 1981, *58*, suppl. 1 p. 28a.
103. HEATH BP, MOHANDAS N, WYATT JL and SHOHET SB.: Deformability of isolated red blood cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1982, *691*, 211-219.

104. HIGASHI T, RICHARDS CS and UYEDA K.: The interaction of phosphofructokinase with erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 1979, *254*, 9542-9550.
105. HILL JS, SAWYER WH, HOWLETT GJ and WILEY JS.: Hereditary spherocytosis in man. Altered binding of cytoskeletal components to the erythrocyte membrane. *Biochem. J.* 1981, *201*, 259-266.
106. HO MK and GUIDOTTI G.: A membrane protein from human erythrocytes involved in anion exchange. *J. Biol. Chem.* 1975, *250*, 675-683.
107. HOSEY MM, PLUT DA and TAO M.: Inhibition of protein phosphorylation and induction of protein cross-linking in erythrocyte membranes by diamide. *Biochim. Biophys. Acta* 1978, *506*, 211-220.
108. JACKSON CW, MUELLER TJ, DOCKTER ME and MORRISON M.: Cytoskeletal alterations during red cell aging (Abst). *Blood* 1981, *58* suppl. 1 p. 29a.
109. JACKSON CW, SEGREST JP, KAHANE I and MARCHESI VT.: Studies on the major sialoglycoproteins of the human red cell membrane. Isolation and characterization of tryptic glycopeptides. *Biochemistry* 1973, *12*, 3131-3138.
110. JAIN SK and HOCHSTEIN P.: Polymerisation of membrane components in aging red blood cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980, *92*, 247-254.
111. JAIN SK and SHOHET SB.: Calcium potentiates the peroxidation of erythrocyte membrane lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1981, *642*, 46-54.
112. JARRETT HW and PENNISTON JT.: Partial purification of the  $\text{Ca}^{2+}$  —  $\text{Mg}^{2+}$  ATPase activator from human erythrocytes: its similarity to the activator 3':5' cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977, *77*, 1210-1216.
113. JARRETT HW and PENNISTON JT.: Purification of the  $\text{Ca}^{2+}$  stimulated ATPase activator from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 1978, *253*, 4076-4082.
114. JAVAID JI and WINZLER RJ.: Association of glycoprotein with the membranes. I. Isolation and molecular weight of the monomeric unit of the major glycoprotein from human erythrocyte. *Biochemistry* 1974, *13*, 3635-3638.
115. JAVAID JI and WINZLER RJ.: Association of glycoproteins with the membranes. II. Isolation and partial characterization of «lipophilic fragment» from human erythrocyte membrane glycoprotein. *Biochemistry* 1974, *13*, 3639-3642.
116. JENKINS RE and TANNER MJA.: The major human erythrocyte membrane protein. Evidence for an S-shaped structure which transverses the membrane twice and contains a duplicated set of sites. *Biochem. J.* 1975, *47*, 393-399.
117. JI TH, KIEHM DJ and MIDDAUGH CR.: Presence of spectrin tetramer on the erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 1980, *255*, 2990-2993.
118. JINBU Y, SATO S, NAKAO T and NAKAO M.: Ankyrin is necessary for both drug-induced and ATP induced shape change of erythrocyte ghosts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982, *104*, 1087-1092.
119. JOHNSON RM, TAYLOR G and MEYER DB.: Shape and volume changes in erythrocyte ghosts and spectrin-actin networks. *J. Cell Biol.* 1980, *86*, 371-376.
120. KAHANE I and GITLER C.: Red cell membrane glycoprotein labeling from within the lipid bilayer. *Science* 1978, *201*, 351-352.
121. KAHLENBERG A.: Preparative isolation of band 3 the predominant polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Anal Biochem.* 1976, *74*, 337-342.
122. KANT J and STECK TL.: Specificity in the association of glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase with isolated human erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 1973, *248*, 8457-8464.
123. KAPLAN JC, CHOURY D and PICHARDI AL.: Calcium dependent calmodulin stimulated endogenous proteolysis of human red cell membrane cytochrom b5 reductase. *Blood* 1981, *58*, Suppl. 1 p. 30a.
124. KARADSHEH NS and UYEDA K.: Changes in allosteric properties of phosphofructokinase bound to erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 1977, *252*, 7418-7420.
125. KING LE and MORRISON M.: Calcium effects on human erythrocyte membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1977, *471*, 162-168.
126. KIRKPATRICK GM, WOODS GM, LA CELLE PL and WEED RI.: Calcium and magnesium ATPases of the spectrin fraction of human erythrocytes. *J. Supramolec Structure* 1975, *3*, 415-425.
127. KIRSCHNER-ZILBER I and SHAKLAI N.: The specificity of hemoglobin for band 3 membrane sites. *Biochem. Internat.* 1982, *5*, 309-316.
128. KLIMAN HS and STECK TL.: Association of glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase with the human red cell membrane. *J. Biol. Chem.* 1980, *255*, 6314-6321.
129. KOPPEL DE, SHEETZ MP and SCHINDLER M.: Matrix control of protein diffusion in biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1981, *78*, 3576-3580.
130. KUETTNER IF, DREHER KL, RAO GHR, EATON JW, BALCKSHEAR PL and WHITE JG.: Influence of ionophore A23187 on the plastic behavior of normal erythrocytes. *Amer. J. Pathol.* 1977, *88*, 81-94.
131. LAEMMLI UK.: Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* 1970, *227*, 680-685.
132. LANGE Y, HADESMAN RA and STECK TL.: Role of the reticulum in the stability and shape of the isolated human erythrocyte membrane. *J. Cell Biol.* 1982, *92*, 714-721.

133. LARSEN FL, KATZ S and ROUFOGALIS BD.: Calmodulin regulation of  $Ca^{2+}$  transport in human erythrocytes. *Biochem. J.* 1981, *200*, 185-191.
134. LEA EJA, RICH GT and SEGREST JP.: The effects of the membrane-penetrating polypeptide segment of the human erythrocyte MN-glycoprotein on the permeability of model lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1975, *382*, 41-50.
135. LIN D.C.: Spectrin-4.1-action complex of the human erythrocyte: molecular basis of its ability to bind cytochalasins with high affinity and to accelerate actin polymerization in vitro. *J. Supramolec. Struct. Cell Biochem.* 1981, *15*, 129-138.
136. LIU SC, FAIRBANKS G and PALEK J.: Spontaneous, reversible cross-linking in the human erythrocyte membrane. Temperature and pH dependence. *Biochemistry* 1977, *16*, 4066-4074.
137. LIU SC and PALEK J.: Cross-linkings between spectrin and band 3 in human erythrocyte membranes. *J. Supramolec Struct.* 1979, *10*, 97-109.
138. LIU SC and PALEK J.: Metabolic dependence of protein arrangement in human erythrocyte membranes.II. Cross-linking of major proteins in ghosts from fresh and ATP-depleted red cells. *Blood* 1979, *54*, 1117-1130.
139. LIU SC and PALEK J.: Spectrin tetramer-dimer equilibrium and the stability of erythrocyte membrane skeletons. *Nature (Lond.)* 1980, *285*, 586-588.
140. LORAND L, SHISHIDO R, PARAMESWARAN KN and STECK TL.: Modification of human erythrocyte ghosts with transglutaminase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1975, *67*, 1158-1166.
141. LORAND L, WEISSMANN LB, EPEL DL and BRUNER-LORAND J.: Role of the intrinsic transglutaminase in the  $Ca^{2+}$ -mediated cross-linking of erythrocyte proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1976, *73*, 4479-4481.
142. LUKACOVIC MF, FEINSTEIN MB, SHA'AFI RI and PERRIE S.: Purification of stabilized band 3 protein of the human erythrocyte membrane and its reconstitution into liposomes. *Biochemistry* 1981, *20*, 3145-3151.
143. LUNA EJ, KIDD GH and BRANTON D.: Identification by peptide analysis of the spectrin-binding protein in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 1979, *254*, 2526-2532.
144. LUTZ HU, LIU SC and PALEK J.: Release of spectrin-free vesicles from human erythrocytes during ATP depletion. *J. Cell. Biol.* 1977, *73*, 548-560.
145. LUX SE.: Spectrin-actin membrane skeleton of normal and abnormal red blood cells. *Semin. Hematol.* 1979, *16*, 21-51.
146. LUX SE, JOHN KM and KARNOVSKI MJ.: Irreversible deformation of the spectrin-actin lattice in irreversibly sickled cells. *J. Clin. Invest.* 1976, *58*, 955-963.
147. LUX SE, JOHN KM and UKENA TE.: Diminished spectrin extraction from ATP-depleted human erythrocyte. Evidence relating spectrin to changes in erythrocyte shape and deformability. *J. Clin. Invest.* 1978, *61*, 815-827.
148. LYSKO KA, CARLSON R, TAVERNA R, SNOW J and BRANDTS JF.: Protein involvement in structural transitions of erythrocyte ghosts: use of thermal gel analysis to detect protein aggregation. *Biochemistry* 1981, *20*, 5570-5576.
149. MACARA IG and CANTLEY LC.: Mechanism of anion exchange across the red cell membrane by band 3: interactions between stilbenedisulfate and NAP-taurine binding sites. *Biochemistry* 1981, *20*, 5695-5701.
150. McDANIEL C, KIRTLEY ME and TANNER MJA.: The interaction of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with human erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 1974, *249*, 6478-6485.
151. MARCHESI VT and ANDREWS EP.: Glycoproteins: isolation from cell membranes with lithium diiodosalicylate. *Science* 1971, *174*, 1247-1248.
152. MARCHESI VT and STEERS E.: Selective solubilization of a protein component of the red cell membrane. *Science* 1968, *159*, 203-204.
153. MARCHESI VT, TILLACK TW, JACKSON RL, SEGREST JP and SCOTT RE.: Chemical characterization and surface orientation of the major glycoprotein of the human erythrocyte membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1972, *69*, 1445-1449.
154. MARKOWITZ S and MARCHESI VT.: The carboxyl-terminal of human erythrocyte band 3. Description, isolation and location in the bilayer. *J. Biol. Chem.* 1981, *256*, 6463-6468.
155. MELLONI E, SALAMINO F, SPARATORE B, MICETTI M, MORELLI A, BENATTI U, de FLORA A and PONTREMOLI S.: Decay of proteinase and peptidase activities of human and rabbit erythrocytes during cellular aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1981, *675*, 110-116.
156. MELLONI E, SPARATORE F, SALAMINO F, MICETTI M and PONTREMOLI S.: Cytosolic calcium dependent proteinase of human erythrocytes: formation of an enzyme-natural inhibitor complex induced by  $Ca^{2+}$  ions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982, *106*, 731-740.
157. MELLONI E, SPARATORE B, SALAMINO F, MICETTI M and PONTREMOLI S.: Cytosolic calcium dependent neutral proteinase of human erythrocytes: the role of calcium ions on the molecular and catalytic properties of the enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982, *107*, 1053-1059.
158. MIKKELSEN A and ELGSAETER A.: Human spectrin.V. A comparative electro optic study of heterotetramers and heterodimers. *Biochim. Biophys. Acta* 1981, *668*, 74-80.

159. MINOCHERHOMJEE AEV, AL-JOBORE A and ROUFOGALIS BD.: Modulation of the calcium transport ATPase in human erythrocytes by anions. *Biochim. Biophys. Acta* 1982, *690*, 8-14.
160. MITCHELL CD, MITCHELL WB and HANAHAN DJ.: Enzyme and hemoglobin retention in human erythrocyte stroma. *Biochim. Biophys. Acta* 1965, *104*, 348-358.
161. MOMBERS C, DE GIER J, DEMEL RA and VAN DEENEN LLM.: Spectrin-phospholipid interaction. A monolayer study. *Biochim. Biophys. Acta* 1980, *603*, 52-62.
162. MOMBERS CP, VAN DIGEK WM, VAN DEENEN LLM, DE GIER J and VERKLEIJ AJ.: Interaction of spectrin-actin and synthetic phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1977, *470*, 152-160.
163. MOMBERS CP, VERKLEIJ AJ, DE GIER J and VAN DEENEN LLM.: The interaction of spectrin-actin and synthetic phospholipids. The interaction with phosphatidylserine. *Biochim. Biophys. Acta* 1979, *551*, 271-281.
164. MORRE GL, KOCHOLATY WF, COOPER DA, GRAY JL and ROBINSON SL.: A proteinase from human erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1970, *212*, 126-133.
165. MORRISON WL and NEURATH H.: Proteolytic enzymes of the formed elements of human blood. I. Erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 1953, *200*, 39-51.
166. MORROW JS, HAIGH WB and MARCHESI VT.: Spectrin oligomers: a structural feature of the erythrocyte cytoskeleton. *J. Supramolec. Struct. Cell. Biochem.* 1981, *17*, 275-287.
167. MORROW JS and MARCHESI VT.: Self-assembly of spectrin oligomers in vitro: a basis for a dynamic cytoskeleton. *J. Cell. Biol.* 1981, *88*, 463-468.
168. MORROW JS, SPEICHER DW, KNOWLES WJ, HSU J and MARCHESI VT.: Identification of functional domains of human erythrocytes spectrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1980, *77*, 6592-6596.
169. MUELLER TJ and MORRISON M.: The transmembrane protein in the plasma membrane of normal human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 1974, *249*, 7568-7573.
170. MUELLER TJ and MORRISON M.: Cytoskeletal alterations in hereditary elliptocytosis. *J. Supramolec. Struct.* 1981, suppl. 5 p. 131.
171. MUELLER TJ and MORRISON M.: Glycoconnectine (PAS2) a membrane attachment site for the human erythrocyte cytoskeleton. In KRUEBERG WC, EATON JW and BREWER CJ Eds Erythrocyte membrane 2. Recent clinical and experimental advances Alan R. Liss 1981 p. 95-112.
172. MULLER H, SCHMIDT U and LUTZ HW.: On the mechanism of vesicle from ATP-depleted human red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1981, *649*, 462-470.
173. MURAKAMI T, HATANAKA M and MURACHI T.: The cytosol of human erythrocytes contains a highly  $Ca^{2+}$ -sensitive thiol protease (Calpain I) and its specific inhibitor protein (Calpastatin). *J. Biochem.* 1981, *90*, 1809-1816.
174. MURTHY SNP, LIU T, KAUL RK, KÖHLER H and STECK TL.: The aldolase binding site of the human erythrocyte membrane is at the NH<sub>2</sub> terminus of band 3. *J. Biol. Chem.* 1981, *256*, 11203-11208.
175. NAKASHIMA K, FUJII S and KANEKO T.: Membrane protein cross-linking is an early step in the pathogenesis of copper-induced hemolytic anemia. *Biomed. Res.* 1980, *1*, 548-551.
176. NELSON MJ, DALEKE DL and HUESTIS WH.: Calmodulin-dependent spectrin kinase activity in resealed human erythrocyte ghosts. *Biochim. Biophys. Acta* 1982, *686*, 182-188.
177. NERMUT MV.: Visualization of the «membrane skeleton» in human erythrocyte by freeze etching. *Eur. J. Cell. Biol.* 1981, *25*, 265-271.
178. NIGG EA, BRON C, GIRARDET M and CHERRY RJ.: Band 3-glycophorin A association in erythrocyte membrane demonstrated by combining protein diffusion measurements with antibody-induced cross-linking. *Biochemistry* 1980, *19*, 1887-1893.
179. NIGG E and CHERRY RJ.: Dimeric association of band 3 in the erythrocyte membrane demonstrated by protein diffusion measurements. *Nature* 1979, *277*, 493-494.
180. NIGGLI V, ADUNYAH ES, PENNISTON JT and CARAFOLI E.: Purified ( $Ca^{2+}$  +  $Mg^{2+}$ )-ATPase of the erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 1981, *256*, 395-401.
181. NIGGLI V, PENNISTON JT and CARAFOLI E.: Purification of the ( $Ca^{2+}$  +  $Mg^{2+}$ ) ATPase from human erythrocyte membrane using a calmodulin affinity column. *J. Biol. Chem.* 1979, *254*, 9955-9958.
182. O'REAR EA, UDDEN MM, McINTIRE LV and LYNCH EC.: Reduced erythrocyte deformability associated with calcium accumulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1982, *691*, 274-280.
183. PALEK J, LIU SC and LIU PA.: Polymerisation of red cell membrane protein contributing to spherocytic shape irreversibility. *Nature (Lond.)* 1978, *274*, 205-207.
184. PALEK J, LIU SC, LIU PY, PRCHAL J and CASTELBERRY RP.: Altered assembly of spectrin in red cell membrane in hereditary pyropoikilocytosis. *Blood* 1981, *57*, 130-139.
185. PALEK J, LIU A, LIU D, SNYDER LM, FORTIER NL, NJOKU G, KIERNAN F, FUNK D, CRUSBERG T.: Effect of procaine-HCl on ATP: calcium-dependent alterations in red cell shape and deformability. *Blood* 1977, *50*, 155-164.

186. PALEK J, LIU SC and SNYDER LM.: Metabolic dependence of protein arrangement in human erythrocyte membranes. I. Analysis of spectrin rich complexes in ATP-depleted red cells. *Blood* 1978, *51*, 385-395.
187. PALEK J, STEWART G and LIONETTI FJ.: The control of shape of human erythrocyte ghosts by calcium, magnesium and adenosine triphosphate. *Blood* 1974, *44*, 583-597.
188. PALFREY HC, SCHIEBLER W and GREENGARD P.: A major calmodulin-binding protein common to various vertebrate tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1982, *79*, 3780-3784.
189. PATEL VP and FAIRBANKS G.: Spectrin phosphorylation and shape change of human erythrocyte ghosts. *J. Cell. Biol.* 1981, *88*, 430-440.
190. PFAFFEROTT C, MEISELMAN HJ and HOCHSTEIN P.: The effect of malonylaldehyde on erythrocyte deformability. *Blood* 1982, *59*, 12-15.
191. PHUTRAKUL S and JONES MN.: The permeability of bilayer lipid membranes on the incorporation of erythrocyte membrane extracts and the identifications of the monosaccharide transport proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1979, *550*, 188-200.
192. PINDER JC, BRAY D and GRATZER WB.: Actin polymerization induced by spectrin. *Nature (Lond.)* 1975, *258*, 765-766.
193. PINDER JC, BRAY D and GRATZER WB.: Control of interaction of spectrin and actin by phosphorylation. *Nature (Lond.)* 1977, *720*, 752-754.
194. PINDER JC, UNGEWICKELL E, BRAY D and GRATZER WB.: The spectrin actin complex and erythrocyte shape. *J. Supramolec. Struct.* 1978, *8*, 439-445.
195. PINDER JC, UNGEWICKELL E, CALVERT R, MORRIS E and GRATZER WB.: Polymerisation of G-Actin by spectrin preparations: identification of the active constituent. *FEBS Lett* 1979, *104*, 396-400.
196. PONTREMOLI S, MELLONI E, SALAMINO F, SPARATORE B, MICHETTI M, BENATTI U, MORELLI A and DE FLORA A.: Identification of proteolytic activities in the cytosolic compartment of mature human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 1980, *110*, 421-430.
197. PONTREMOLI S, SALAMINO F, SPARATORE B, MELLONI E, MORELLI A, BENATTI U and DE FLORA A.: Isolation and partial characterization of three acidic proteinases in erythrocyte membranes. *Biochem. J.* 1979, *181*, 559-568.
198. PRATJE E and HEILMEYER LMG.: Phosphorylation of rabbit muscle troponin and actin by a 3'5'-c-AMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett* 1972, *27*, 89-93.
199. QUIST EE and ROUFOGALIS BD.: Calcium transport in human erythrocytes. Separation and reconstitution of high and low Ca affinity (Mg + Ca)-ATPase activities in membranes prepared at low ionic strength. *Arch. Biochem. Biophys.* 1975, *168*, 240-251.
200. RALSTON GB.: The isolation of aggregate of spectrin from bovine erythrocytes membranes. *Austr. J. Biol. Sci.* 1975, *28*, 259-266.
201. RALSTON GB.: The influence of salt on the aggregation state of spectrin from bovine erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1976, *443*, 387-393.
202. RALSTON GB.: Physico-chemical characterization of the spectrin tetramer from bovine erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1976, *455*, 163-172.
203. RALSTON GB, DUNBAR J and WHITE M.: The temperature-dependent dissociation of spectrin. *Biochim. Biophys. Acta* 1977, *491*, 345-348.
204. RAMJEESINGH M, GAARN A and ROTHSTEIN A.: The sulfhydryl groups of the 35000-dalton C-terminal segment of band 3 are located in a 9000 dalton fragment produced by chymotrypsin treatment of red cell ghosts. *J. Bioenerg Biomembr* 1981, *13*, 411-423.
205. RAMJEESINGH M, GRINSTEINS and ROTHSTEIN A.: Intrinsic segments of band 3 that are associated with anion transport across the red blood cell membranes. *J. Membr. Biol.* 1980, *57*, 95-102.
206. RAO A and REITHMEIER RAF.: Reactive sulfhydryl groups of the band 3 polypeptide from human erythrocyte membranes. Location in the primary structure. *J. Biol. Chem.* 1979, *254*, 6144-6150.
207. RAVINDRANATH Y and JOHNSON R.: A case of hemolytic anemia associated with severe microcytosis, elevated intracellular calcium (Ca) and loss of spectrin (Abst). *Blood* 1981, *58*, suppl. 1, P. 48a.
208. REICHEL D, JACOBSON E and HASCHEN RJ.: Zur Herkunft der proteinasen Aktivitäten in menschlichen Erythrozytensuspensionen. *Folia Haematol* 1973, *99*, 345-354.
209. REICHEL D, JACOBSON E and HASCHEN RJ.: Purification and properties of cathepsin D from human erythrocyte. *Biochim. Biophys. Acta* 1974, *341*, 15-26.
210. REITHMEIER RAF.: Fragmentation of the band 3 polypeptide from human erythrocyte membranes. Size and detergent binding of the membrane-associated domain. *J. Biol. Chem.* 1979, *254*, 3054-3060.
211. REITHMEIER RAF and RAO A.: Reactive sulfhydryl groups of the band 3 polypeptide from human erythrocyte membranes. Identification of the sulfhydryl groups involved in the Ca<sup>2+</sup>-o-phenanthroline cross-linking. *J. Biol. Chem.* 1979, *254*, 6151-6155.
212. RICE WR and STECK TL.: Pyruvate transport into inside out vesicles isolated from human erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1977, *468*, 305-317.

213. ROMANS AY, ALLEN TM, MECKES W, CHO-VETTI R, SHENG L, KERCRET H and SEGREST JP.: Incorporation of the transmembrane hydrophobic domain of glycophorin into small unilamellar phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1981, *642*, 135-148.
214. ROMANS AY, YEAGLE PL, O'CONNOR E and GRISHAM CM.: Interaction between glycophorin and phospholipids in recombined systems. *J. Supramolec. Struct.* 1979, *10*, 241-251.
215. ROSENTHAL AS, KREGENOW FM and MOSES HL.: Some characteristics of a  $Ca^{2+}$ -dependent ATPase activity associated with a group of erythrocyte membrane proteins which form fibrils. *Biochim. Biophys. Acta* 1970, *196*, 254-262.
216. ROSS AH and McCONNELL HM.: Reconstitution of band 3, the erythrocyte anion exchange protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977, *74*, 1318-1325.
217. ROSS A and McCONNELL HM.: Reconstitution of the erythrocyte anion channel. *J. Biol. Chem.* 1978, *253*, 4777-4782.
218. ROSS AH, RADHAKRISHNAN R, ROBSON RJ and KHORANA HG.: The transmembrane domain of glycophorin A as studied by cross-linking using photoactivable phospholipids. *J. Biol. Chem.* 1982, *257*, 4152-4161.
219. SAKAKI T, TSUJI A, CHANG C-H and ONISHI S-I.: Rotational mobility of an erythrocyte membrane integral protein band 3 in dimyristoyl phosphatidylcholine reconstituted vesicles and effect of cytoskeletal peripheral proteins. *Biochemistry* 1982, *21*, 2366-2372.
220. SALHANY JM and SHAKLAI N.: Functional properties of human hemoglobin bound to the erythrocyte membrane. *Biochemistry* 1979, *18*, 893-899.
221. SALHANY JM, SWANJON JC, CORDES KA, GAINES SB and GAINES KC.: Evidence suggesting direct oxidation of human erythrocyte membrane sulfhydryls by copper. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1978, *82*, 1294-1299.
222. SARKADI B, ENYEDI A and GARDOS G.: Molecular properties of the red cell calcium pump. I. Effects of calmodulin, proteolytic digestion and drugs on the kinetics of active calcium uptake in inside-out red cell membrane vesicles. *Cell Calcium* 1980, *1*, 287-289.
223. SARKADI B, SZASZ I and GARDOS G.: Characteristics and regulation of active calcium transport in inside-out red cell membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1980, *598*, 326-338.
224. SARKADI B, SZASZ I, GERLOCZY A and GARDOS G.: Transport parameters and stoichiometry of active ion extrusion in intact human red cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1977, *464*, 93-107.
225. SATO SB, YANAGIDA M, MARUYAMA K and ONISHI S.: Seeding role of spectrin in polymerization of skeletal muscle actin. *Biochim. Biophys. Acta* 1979, *578*, 436-444.
226. SAUBERMAN N, PIOTROWSKI, JOSHI W, FORTIER N and SNYDER LM.: Irreversible spectrin-hemoglobin cross linkages associated with oxidant hypersensitivity in pathologic or artificially dehydrated red cells (Abst). *Blood* 1981, *58*, suppl. 1 p. 34a.
227. SAYARE M and FIKIET M.: Cross linking of hemoglobin to the cytoplasmic surface of human erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 1981, *256*, 13152-13158.
228. SCHARFF O.:  $Ca^{2+}$  activation of membrane-bound ( $Ca^{2+}$  +  $Mg^{2+}$ )-dependent ATPase from human erythrocytes prepared in the presence or absence of  $Ca^{2+}$ . *Biochim. Biophys. Acta* 1976, *443*, 206-218.
229. SCHARFF O.: Regulation of ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ )-ATPase in human erythrocytes dependent on calcium and calmodulin. *Acta Biol. Med. Germ.* 1981, *40*, 457-463.
230. SCHATZMANN HJ and VINCENZI FF.: Calcium movements across the membrane of human red cells. *J. Physiol.* 1969, *210*, 369-395.
231. SCHINDLER M, KOPPEL DE and SHEETZ MP.: Modulation of membrane protein lateral mobility by polyphosphates and polyamines. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1980, *77*, 1457-1461.
232. SCHRIER SL, BEN BASSAT I, SEEGER M and GRUMET FC.: Characterization of erythrocyte membrane associated enzymes (glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase and phosphoglyceric kinase). *J. Lab. Clin. Med.* 1975, *85*, 797-810.
233. SCHUBERT D and KLAPPAUF E.: Interactions of Band 3-protein from human erythrocyte membranes with phospholipid monolayer at air-water surface. *Hoppe Seyler's Z Physiol. Chem.* 1980, *361*, 1171-1177.
234. SCHULTE TH and MARCHESI VT.: Self-association of human erythrocyte glycophorin A. Appearance of low mobility bands on sodium dodecylsulfate gels. *Biochim. Biophys. Acta* 1978, *508*, 425-430.
235. SCHULZ K.: Die Veränderung der Erythrozytenstromaprotease bei hämatologischen Erkrankungen. *Folia Haematol* 1965, *83*, 198-206.
236. SEGREST JP, GULIK-KRZYWICKI T and SARDET C.: Association of the membrane-penetrating segment of the human erythrocyte MN-glycoprotein with phospholipid bilayer. I. Formation of freeze-etch intramembranous particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1974, *71*, 3294-3298.
237. SEGREST JP, KAHANE I, JACOBSON RL and MARCHESI VT.: Major glycoprotein of the human erythrocyte membrane: evidence for an amphipathic molecular structure. *Arch. Biochem. Biophys.* 1973, *155*, 167-183.
238. SHAKLAI N and ABRAHAMI H.: The interaction of deoxyhemoglobin with the red cell membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980, *95*, 1105-1112.
239. SHAKLAI N, BENITEZ L and RANNEY HM.: Binding of 2-3 diphosphoglycerate by spectrin and its ef-

- fect on oxygen affinity of hemoglobin. *Am J. Physiol.* 1978, 234 (1), C36-C40.
240. SHAKLAI N, SHARMA VS and RANNEY HM.: Interaction of sickle cell hemoglobin with erythrocyte membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1981, 78, 65-68.
241. SHAKLAI N, YGUERABIDE J and RANNEY HM.: Interaction of hemoglobin with red blood cell membranes as shown by a fluorescent chromophore. *Biochemistry* 1977, 16, 5585-5592.
242. SHAKLAI N, YGUERABIDE J and RANNEY HM.: Classification and localization of hemoglobin sites on the red blood cell membrane. *Biochemistry* 1977, 16, 5593-5597.
243. SHAMI Y, SHIP S and ROHSTEIN A.: Rapid quantitative separation of the major glycoproteins (PAS 1, 2 and 3) from other human red cell membrane proteins in a non denaturing medium by affinity chromatography. *Anal Biochem.* 1977, 80, 438-445.
244. SHEETZ MP.: Integral membrane protein interaction with tritoncytoskeletons of erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1979, 557, 122-134.
245. SHEETZ MP and CASALY J.: 2-3-Diphosphoglycerate and ATP dissociate erythrocyte membrane skeletons. *J. Biol. Chem.* 1980, 255, 9955-9960.
246. SHEETZ MP, FEBBRORIELLO P and KOPPEL DE.: Triphosphoinositide increases glycoprotein lateral mobility in erythrocyte membranes. *Nature* 1982, 296, 91-93.
247. SHEETZ MP and SAWYER D.: Triton shells of intact erythrocytes. *J. Supramolec. Struct.* 1978, 8, 399-412.
248. SHEETZ MP, SCHINDLER M and KOPPEL DE.: Lateral mobility of integral membrane proteins is increased in spherocytic erythrocytes. *Nature* 1980, 285, 510-512.
249. SHEETZ MP and SINGER SJ.: On the mechanism of ATP-induced shape changes in human erythrocyte membranes. I. The role of the spectrin complex. *J. Cell. Biol.* 1977, 73, 638-646.
250. SHIBATA K, COTTAM GL and WATERMAN MR.: Acceleration of the rate of deoxyhemoglobin polymerization by the erythrocyte membrane. *FEBS Lett* 1980, 110, 107-110.
251. SHIN BC and CARRAWAY KL.: Association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 1973, 248, 1436-1444.
252. SHOTTON DM, BURKE BE and BRANTON D.: The molecular structure of human erythrocyte spectrin. Biophysical and electron microscopic studies. *J. Mol. Biol.* 1979, 131, 303-329.
253. SHVIRO Y, ZILBER I and SHAKLAI N.: The interaction of hemoglobin with phosphatidylserine vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1982, 687, 63-70.
254. SIEGEL DL, GOODMAN SR and BRANTON D.: The effect of endogenous proteases on the spectrin binding proteins of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1980, 598, 517-527.
255. SILVERBERG M and MARCHESI VT.: The anomalous electrophoretic behavior of the major sialoglycoprotein from human erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 1978, 253, 95-98.
256. SMITH DK, COCHRANE MR and PALEK J.: Alteration of red cell membrane stability and spectrin (Sp) self-association by sulfhydryl reagents (Abst). *Blood* 1981, 58, Suppl. 1 p. 36a.
257. SMITH BD and LA CELLE PL.: Parallel decrease of erythrocyte membrane deformability and spectrin solubility at low pH. *Blood* 1979, 53, 15-18.
258. SMITH JE, MOHANDAS N, CLARK M, GREENQUIST AC and SHOHET SB.: Deformability and spectrin properties in three type of elongated red cells. *Amer. J. Hemat.* 1980, 8, 1-13.
259. SMITH DK and PALEK J.: Modulation of lateral mobility of band 3 in the red cell membrane by oxidative cross-linking of spectrin. *Nature* 1982, 297, 424-425.
260. SOBUE K, FUJITA M, MURAMOTO Y and KAKIUCHI S.: Spectrin as a major modulator binding protein of erythrocyte cytoskeleton. *Biochem. Internat.* 1980, 1, 561-566.
261. SOBUE K, MURAMOTO Y, FUJITA M and KAKIUCHI S.: Calmodulin-binding protein of erythrocyte cytoskeleton. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981, 100, 1063-1070.
262. SOLTI M, BARTHA F, HALASZ N, TOTH G, SIROKMAN F and FRIEDRICH P.: Localization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in intact erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 1981, 256, 9260-9265.
263. SOLTI M and FRIEDRICH P.: Partial reversible inactivation of enzymes due to binding to the human erythrocyte membrane. *Mol. Cell. Biochem.* 1976, 10, 145-152.
264. SPEICHER DW and MARCHESI VT.: Spectrin domains: proteolytic susceptibility as a probe of protein structure. *J. Cell. Biochem.* 1982, 18, 479-492.
265. SPEICHER DW, MORROW JS, KNOWLES WJ and MARCHESI VT.: Identification of proteolytically resistant domains of human erythrocyte spectrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1980, 77, 5673-5677.
266. SPEICHER DW, MORROW JP, KNOWLES WJ and MARCHESI VT.: A structural model of human erythrocyte spectrin. Alignment of chemical and functional domains. *J. Biol. Chem.* 1982, 257, 9093-9101.
267. STECK TEL.: Cross-linking the major proteins of the isolated erythrocyte membrane. *J. Mol. Biol.* 1972, 66, 295-305.

268. STECK TL.: The organization of proteins in the human red blood cell membrane. *J. Cell. Biol.* 1974, *62*, 1-19.
269. STECK TL.: The band 3 protein of the human cell membrane: a review. *J. Supramolec. Struct.* 1978, *8*, 311-324.
270. STECK TL, KOZIARZ JJ, SINGH MK, REDDY G and KÖHLER H.: Preparation and analysis of seven major topographically defined fragments of band 3, the predominant transmembrane polypeptide of human erythrocyte membranes. *Biochemistry* 1978, *17*, 1216-1222.
271. STECK TL, RAMOS B and STRAPAZON E.: Proteolytic dissection of band 3, the predominant transmembrane polypeptide of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 1976, *15*, 1154-1161.
272. STEINBERG RA.: Actin nascent chains are substrates for cyclic AMP-dependent phosphorylation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1980, *77*, 910-914.
273. STRAPAZON E and STECK TL.: Binding of rabbit muscle aldolase to band 3, the predominant polypeptide of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 1976, *15*, 1421-1424.
274. STRAPAZON E and STECK TL.: Interaction of the aldolase and the membrane of human erythrocytes. *Biochemistry* 1977, *16*, 2966-2970.
275. SZUNDI I, SZELÉNYI JG, BREUER JH and BÉRCZI A.: Interactions of haemoglobin with erythrocyte membrane membrane phospholipids in monomolecular lipid layers. *Biochim. Biophys. Acta* 1980, *595*, 41-46.
276. TANNER MJA and ANSTEE DJ.: A method for the direct demonstration of lectin-binding components of the human erythrocyte membrane. *Biochem. J.* 1976, *153*, 265-270.
277. TILNEY LG and DETMERS P.: Actin in erythrocyte ghosts and its association with spectrin. *J. Biol. Chem.* 1975, *66*, 508-520.
278. TÖKES ZA and CHAMBERS SM.: Proteolytic activity associated with human erythrocyte membranes. Self-digestion of isolated human erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1975, *389*, 325-338.
279. TOMITA M, FURTHMAYR H and MARCHESI VT.: Primary structure of human erythrocyte glycoporphin A. Isolation and characterization of peptides and complete amino acid sequence. *Biochemistry* 1978, *17*, 4756-4770.
280. TOYO-OKA T.: Phosphorylation with cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase renders bovine cardiac troponin sensitive to the degradation by calcium-activated neutral protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982, *107*, 44-50.
281. TRIPLETT RB, WINGATE JM and CARRAWAY KL.: Calcium effects on erythrocyte membrane proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972, *49*, 1014-1020.
282. TSAI IH, MURTHY SNP and STECK TL.: Effect of red cell membrane binding on the catalytic activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 1982, *257*, 1438-1442.
283. TSUKAMOTO T, SUYAMA K and SONENBERG M.: Membrane phosphorylation and calcium binding in intact human erythrocytes (Abst). *Blood* 1978, *52*, Suppl. 1 p. 105.
284. TSUKITA S, TSUKITA S, ISHIKAWA H, SATO S and NAKAO M.: Electron microscopic study of reassociation of spectrin and actin with the human erythrocyte membrane. *J. Cell. Biol.* 1981, *90*, 70-77.
285. TSUJI T, IRIMURA T and OSAWA T.: The carbohydrate moiety of band-3 glycoprotein of human erythrocyte membranes. *Biochem. J.* 1980, *187*, 677-686.
286. TSUJI T, IRIMURA T and OSAWA T.: Heterogeneity in the carbohydrate moiety of band 3 glycoprotein of human erythrocyte membranes. *Carbohydrate Res.* 1981, *92*, 328-332.
287. TSUJI T, IRIMURA T and OSAWA T.: The carbohydrate moiety of band-3 glycoprotein of human erythrocyte membranes. Structures of lower molecular weight oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 1981, *256*, 10497-10502.
288. TYLER JM, HARGREAVES WR and BRANTON D.: Purification of two spectrin-binding proteins. Biochemical and electromicroscopic evidence for site-specific reassociation between spectrin and bands 2.1 and 4.1. *Proc. Natl. Sci. (USA)* 1979, *76*, 5192-5196.
289. TYLER JM, REINHARDT BN and BRANTON D.: Associations of erythrocyte membrane protein. Binding of purified bands 2.1 and 4.1 to spectrin. *J. Biol. Chem.* 1980, *255*, 7034-7039.
290. UNGEWICKELL E, BENNETT PM, CALVERT R, OHANIAN V and GRATZER WB.: In vitro formation of a complex between cytoskeletal proteins of the human erythrocyte. *Nature (Lond.)* 1979, *280*, 811-814.
291. UNGEWICKELL E and GRATZER WB.: Self-association of human spectrin. A thermodynamic and kinetic study. *Eur. J. Biochem.* 1978, *88*, 379-385.
292. VINCENZI FF and FARRANCE ML.: Interaction between cytoplasmic (Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>)ATPase activator and the erythrocyte membrane. *J. Supramolec. Struct.* 1977, *7*, 301-306.
293. WALSH MP, HINKINS S and HARTSHORNE DJ.: Phosphorylation of smooth muscle actin by the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981, *102*, 149-157.
294. WANG K and RICHARDS FM.: An approach to nearest neighbor analysis of membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 1974, *249*, 8005-8018.
295. WANG K and RICHARDS FM.: Reaction of dimethyl-3, 3'-dithiobispropionimidate with intact human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 1975, *250*, 6622-6626.

296. WEED RI, LA CELLE P, MERRIL EW, CRAIG A, GREGORY A, KARCH F and PICKENS F.: Metabolic dependence of red blood cell deformability. *J. Clin. Invest.* 1969, *48*, 795-809.
297. WEIDEKAMM E and BRDICZKA D.: Extraction and localization of a ( $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ )-stimulated ATPase in human erythrocyte spectrin. *Biochim. Biophys. Acta* 1975, *401*, 51-58.
298. WEINSTEIN RS, KHODADAD JK and STECK TL.: Fine structure of the band 3 protein in human red cell membranes: freeze fracture studies. *J. Supramolec. Struct.* 1978, *8*, 325-335.
299. WILEY JS and SHALLER CC.: Selective loss of calcium permeability on maturation of reticulocytes. *J. Clin. Invest.* 1977, *59*, 1113-1119.
300. WINTERBOURN CC and CARRELL RW.: Oxidation of human haemoglobin by copper. Mechanism and suggested role of the thiol group of residue  $\text{b}_{93}$ . *Biochem. J.* 1977, *165*, 141-148.
301. WINZLER RJ.: In *Red Cell Membrane Structure and Function*. F.A. Jamieson and PJ Greenwalt Ed. p157. Lippincot 1969 Philadelphia.
302. YAMAGUCHI T, KOGA M, FUJITA Y and KIMOTO E.: Effects of pH on membrane fluidity of human erythrocytes. *J. Biochem.* 1982, *91*, 1299-1304.
303. YELTMAN DR and HARRIS BG.: Localization and membrane association of aldolase in human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1980, *199*, 186-196.
304. YU J and BRANTON D.: Reconstitution of intramembrane particles in recombinants of erythrocyte protein band 3 and lipid: effects of spectrin-actin association. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1976, *73*, 3891-3895.
305. YU J and GOODMAN SR.: Syndeins: the spectrin-binding protein(s) of the human erythrocyte membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1979, *76*, 2340-2344.
306. YU J and STECK TL.: Associations of band 3, the predominant polypeptide of the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 1975, *250*, 9176-9184.
307. ZARKOWSKI H.: Membrane-active agents and heat-induced erythrocyte fragmentation. *Brit. J. Haemat.* 1982, *50*, 361-365.
308. ZILBER I and SHAKLAI N.: The interaction of hemoglobin with isolated band 3 cytoplasmic fragments. *Biochem. Internat.* 1982, *4*, 297-303.

Tirés à part: Pierre Boivin  
Laboratoire d'Enzymologie  
des Cellules Sanguines  
Hôpital Beaujon  
92118 Clichy CEDEX  
FRANCE