

N° d'ordre : 1125

50376  
1983  
139

50376  
1983  
139

# MÉMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

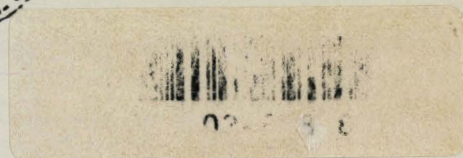
**DOCTEUR DE 3<sup>ème</sup> CYCLE**

Spécialité : BIOCHIMIE APPLIQUEE

par

Martine GOAVEC-ROLLAND

**ETUDE DES INTERACTIONS DES TRANSFERRINES  
(SERO- ET LACTOTRANSFERRINE) AVEC LES  
MACROPHAGES ALVEOLAIRES HUMAINS : ROLE  
DANS LE METABOLISME DU FER.**



Présenté le 2 décembre 1983 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :

Président  
Rapporteur  
Examineur

M. le Professeur J. MONTREUIL  
Melle le Professeur G. SPIK  
M. le Professeur C. VOISIN

A MES PARENTS, avec toute ma  
tendresse et ma reconnaissance.

*Je remercie Monsieur le Professeur Montreuil de m'avoir  
accueillie au sein de son Laboratoire de Chimie Biologique  
(Laboratoire associé au C.N.R.S. n° 217).*

*Je remercie également Mademoiselle le Professeur Geneviève Spik  
qui a bien voulu diriger ce travail.*

*Enfin, je tiens à remercier Monsieur Joël Mazurier pour ses  
conseils et sa gentillesse.*

## INTRODUCTION

CHAPITRE I - <u>GENERALITES SUR LES TRANSFERRINES</u>	p. 3
I - LOCALISATION ET ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS PHYSICO- CHIMIQUES DES TRANSFERRINES	p. 5
A - LOCALISATION DES TRANSFERRINES	p. 5
B - ETUDE DE LA PARTIE PROTEIQUE DES TRANSFERRINES	p. 7
C - ETUDE DE LA PARTIE GLYCANNIQUE DES TRANSFERRINES	p. 8
D - SITES DE FIXATION DU METAL	p. 12
E - CONCLUSION	p. 16
II - RÔLES BIOLOGIQUES DES TRANSFERRINES	p. 17
A - GENERALITES SUR LE METABOLISME DU FER	p. 17
B - ACTIVITES BIOLOGIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE	p. 22
C - ACTIVITES BIOLOGIQUES DE LA LACTOTRANSFERRINE	p. 27
CHAPITRE II - <u>GENERALITES SUR LES MACROPHAGES</u>	p. 36
I - PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES MACROPHAGES	p. 37
A - MORPHOLOGIE DES MACROPHAGES	p. 37
B - ORIGINE ET LOCALISATION DES MACROPHAGES	p. 37



II - RÔLES BIOLOGIQUES DES MACROPHAGES	p. 43
A - FONCTION ANTI-INFECTIEUSE - PHAGOCYTOSE	p. 43
B - ROLE DES MACROPHAGES DANS L'IMMUNITE A MEDIATION CELLULAIRE	p. 45
C - ROLE DES MACROPHAGES DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER	p. 46
D - ETUDE DES RECEPTEURS MEMBRANAIRES DES MACROPHAGES	p. 48
CHAPITRE III - <u>ROLE DES MACROPHAGES DANS LE METABOLISME</u> <u>DU FER</u>	p. 54
I - BIOSYNTHESE DE LA SÉROTRANSFERRINE PAR LE MACROPHAGE	p. 54
II - INTERACTION SÉROTRANSFERRINE - MACROPHAGE	p. 55
A - RECEPTEUR DE L'APOSEROTRANSFERRINE - MACROPHAGE	p. 55
B - RECEPTEUR DE LA SEROTRANSFERRINE SATUREE	p. 55
C - CONCLUSION	p. 57
III - ÉTUDE DE L'INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC LE MACROPHAGE	p. 57
A - ROLE DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS LA MYELOPOIESE	p. 57
B - ROLE DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS L'ANEMIE FERRIPRIVE	p. 57
C - ETUDE DES RECEPTEURS DE LA LACTOTRANSFERRINE	p. 60
D - ROLE DES GLYCANNES DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS LA RECONNAISSANCE DU MACROPHAGE	p. 64
E - CONCLUSION	p. 64

CHAPITRE IV - <u>LES TROUBLES DU METABOLISME DU FER</u>	p. 65	
I - INTERVENTION DES TRANSFERRINES DANS L'INFLAMMATION	p. 65	
II - CAS DE L'ANÉMIE	p. 67	
III - CAS DE L'HÉMOCHROMATOSE	p. 67	
A - HEMOCHROMATOSE SECONDAIRE	p. 67	
B - HEMOCHROMATOSE IDIOPATHIQUE	p. 67	
IV - CONCLUSION	p. 69	
<table border="1"><tr><td>CONCLUSION DES GENERALITES</td></tr></table>	CONCLUSION DES GENERALITES	p. 70
CONCLUSION DES GENERALITES		

## TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE V - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	p. 72
I - ISOLEMENT DES TRANSFERRINES HUMAINES	p. 72
A - LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE	p. 72
B - LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE	p. 72
C - DESATURATION DE LA LACTOTRANSFERRINE	p. 72
D - PROTEOLYSE PARTIELLE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE	p. 73
II - PRÉPARATION DES TRANSFERRINES MARQUÉES	p. 73
A - MARQUAGE A L'IODOGENE	p. 73
B - SATURATION EN FER	p. 75
C - DOUBLE MARQUAGE DES TRANSFERRINES	p. 76
III - MATÉRIEL CELLULAIRE	p. 76
A - MILIEU DE CULTURE ET TAMPONS	p. 76
B - CARACTERISATION DES CELLULES PAR LA METHODE DE MAY - GRUNWALD - GIEMSA	p. 77
C - TEST DE VIABILITE AU BLEU TRYPAN	p. 78
D - CHOIX DU MATERIEL	p. 78
E - PREPARATION DES MACROPHAGES ALVEOLAIRES	p. 79
F - ISOLEMENT DE MONOCYTES DE SANG HUMAIN	p. 80

IV - ÉTUDE DES INTERACTIONS TRANSFERRINES - CELLULES CIBLES	p. 82
A - ETUDE DE LA FIXATION DES TRANSFERRINES SUR LES CELLULES CIBLES	p. 82
B - CINÉTIQUE DE FIXATION DES TRANSFERRINES	p. 84
C - RÉACTION DE COMPÉTITION DE FIXATION DES TRANSFERRINES SUR LES CELLULES CIBLES	p. 84
D - EXPRESSION DES RÉSULTATS	p. 85

## RESULTATS

CHAPITRE VI - <u>MISE AU POINT DU SYSTÈME D'ÉTUDE DE L'INTERACTION DES TRANSFERRINES AVEC LES MACROPHAGES</u>	p. 88
I - ISOLEMENT DES TRANSFERRINES HUMAINES	p. 88
A - OBTENTION DE LA LACTOTRANSFERRINE	p. 88
B - PROTÉOLYSE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE	p. 88
C - MARQUAGE RADIOACTIF DES TRANSFERRINES	p. 89
II - OBTENTION DES MACROPHAGES ALVÉOLAIRES	p. 89
III - MISE AU POINT DU SYSTÈME PERMETTANT L'ÉTUDE DE L'INTERACTION DES TRANSFERRINES AVEC LES MACROPHAGES	p. 91
A - FIXATION DES TRANSFERRINES SUR LE PLASTIQUE DES BOÎTES DE CULTURE NUNC EN PRÉSENCE OU EN ABSENCE DE 1 % DE SÉRUM ALBUMINE BOVINE	p. 91



B - INFLUENCE DE LA TECHNIQUE DE SOLUBILISATION	p. 94
C - CONCLUSION	p. 98

CHAPITRE VII - ETUDE DE LA FIXATION DES TRANSFERRINES  
SUR LES MACROPHAGES p. 99

I - DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES DE FIXATION DE TRANSFERRINES SUR LES MACROPHAGES	p. 100
A - INTERACTION DE LA SEROTRANSFERRINE AVEC LE MACROPHAGE ALVEOLAIRE HUMAIN	p. 100
B - FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LES MACROPHAGES	p. 105
C - CONCLUSION	p. 110
II - ÉTUDE DES FACTEURS INFLUENÇANT LA FIXATION DES TRANSFERRINES SUR LE MACROPHAGE	p. 110
A - LA SEROTRANSFERRINE	p. 110
B - LA LACTOTRANSFERRINE	p. 115
III - EXISTENCE DE RÉCEPTEURS DIFFÉRENTS POUR LA SÉROTRANSFER- RINE ET LA LACTOTRANSFERRINE SUR LE MACROPHAGE ALVÉOLAIRE HUMAIN	p. 121
IV - CONCLUSION	p. 122

CHAPITRE VIII - <u>ETUDE DU TRANSFERT DU FER DES TRANSFERRINES AU MACROPHAGE</u>	p. 124
I - INCORPORATION DU FER DE LA SÉROTRANSFERRINE DANS LE MACROPHAGE	p. 124
II - INCORPORATION DU FER DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS LE MACROPHAGE	p. 126
III - CONCLUSION	p. 127
CHAPITRE IX - <u>ROLE DE LA PARTIE PEPTIDIQUE ET DE LA PARTIE GLYCANNIQUE DES TRANSFERRINES DANS L'INTERACTION AVEC LES RECEPTEURS DU MACROPHAGE</u>	p. 128
I - RÔLE DE LA PARTIE PEPTIDIQUE DE LA LACTOTRANSFERRINE	p. 128
II - RÔLE DES GLYCANNES DANS LE MÉCANISME DE RECONNAISSANCE DU MACROPHAGE	p. 130
A - MATERIEL ET METHODES	p. 131
B - RESULTATS	p. 133
C - CONCLUSION	p. 136

CHAPITRE X - ETUDE DE LA FIXATION DES TRANSFERRINES  
SUR LE MONOCYTE ISOLE DU SANG  
D'HEMOCHROMATOSE PRIMAIRE p. 139

I - INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC LE MONOCYTE p. 140

A - MATERIEL ET METHODES p. 140

B - RESULTATS p. 140

II - CONCLUSION p. 143

CONCLUSIONS GENERALES

p. 144

BIBLIOGRAPHIE

## INTRODUCTION

La découverte de la lactotransferrine dans le lait de femme a ouvert la voie, au Laboratoire, à un ensemble de recherches qui portent d'une part sur l'étude structurale des transferrines et d'autre part sur le rôle biologique de ces transferrines.

Les études entreprises pour déterminer la structure primaire de la sérotransferrine et de la lactotransferrine ont permis de mettre en évidence une grande analogie de la structure primaire de ces glycoprotéines et d'émettre l'hypothèse de l'hexaplication d'un gène ancestral. En outre, la structure des glycanes portés par ces glycoprotéines a été élucidée et fait apparaître des différences entre les glycanes de la sérotransferrine et de la lactotransferrine.

Ces différences structurales ont-elles un rôle dans les activités biologiques des transferrines et en particulier dans les mécanismes de reconnaissance des transferrines par les récepteurs membranaires de leur cellule-cible ? C'est la question à laquelle nous avons entrepris de répondre en prenant comme modèle cellulaire le macrophage.

Les macrophages sont des cellules qui interviennent d'une manière très active dans le métabolisme du fer en régulant la quantité de fer apportée et prélevée par la sérotransferrine humaine.

Des études préliminaires ont montré que, en plus de la présence des récepteurs de la sérotransferrine, les macrophages possèdent

...



des récepteurs de la lactotransferrine. Ces études ont été réalisées en système homologue et en système hétérologue.

Nous avons repris ces études en nous attachant à comparer l'interaction des formes saturées et des formes privées de fer de la sérotransferrine et de la lactotransferrine humaines avec les récepteurs membranaires des macrophages alvéolaires humains.

D'autre part, une étude comparative des interactions des transferrines dans les cas normaux et pathologiques nous a amené à prendre comme modèle cellulaire le monocyte sanguin, qui est la cellule précurseur des macrophages.

Dans les différents cas étudiés, nous nous sommes efforcés de préciser le rôle joué par la partie glycanique des transferrines.

Notre étude a donc consisté :

- 1 - à mettre au point le système d'étude constitué par le macrophage et les transferrines,
- 2 - à étudier la fixation des différentes formes de transferrines sur les récepteurs membranaires en utilisant des transferrines marquées à  $^{125}\text{I}$ ,
- 3 - à étudier le transfert du  $^{59}\text{Fe}$  des transferrines dans les macrophages alvéolaires,
- 4 - à étudier le rôle des glycanes des transferrines dans la reconnaissance des récepteurs membranaires des macrophages alvéolaires,
- 5 - à étudier le rôle des transferrines dans le cas d'hémochromatose.

Avant d'exposer les résultats obtenus, nous préciserons dans la partie Généralités l'état actuel de nos connaissances sur la structure des transferrines et sur leur rôle dans le métabolisme général du fer.

## CHAPITRE I

### GENERALITES SUR LES TRANSFERRINES

Les transferrines sont capables de fixer le fer sous sa forme ferrique, de le transporter dans tout l'organisme et de le livrer spécifiquement à diverses cellules (5, 6, 75).

Le terme de transferrine s'applique à toute une classe de glycoprotéines que l'on rencontre chez les Vertébrés et les Invertébrés (91, 119), ainsi :

- l'ovotransferrine, provenant du blanc d'oeuf des oiseaux, découverte en 1899 par Osborne (148),
- la sérotransferrine, découverte dans le plasma humain dès 1927 par Barkan (16),
- la lactotransferrine, présente dans le lait et dans d'autres liquides de sécrétion des mammifères. Elle fut découverte et isolée du lait de femme par Montreuil et al (135, 136), Johansson (99),

Les transferrines jouent un rôle important dans le métabolisme du fer, elles possèdent également une activité bactériostatique due à leur action ferriprive.

Toutes ces activités ont été détaillées dans les revues générales de Schade et al (170), de Sussman (191), de Weinberg (209), de Spik et al (184).

Les transferrines présentent des propriétés communes qui

...

sont les suivantes :

- ce sont des glycoprotéines monocaténaires de masse moléculaire voisine de 80 000
- elles fixent réversiblement en deux sites spécifiques :
  - . 2 atomes de  $\text{Fe}^{3+}$
  - . 2 ions bicarbonate (ou carbonate)
  - . et développent une coloration rose avec un maximum d'absorption à 465 nm
- elles sont composées de deux domaines structuraux possédant chacun un site métallique,
- elles présentent de nombreuses homologies dans la structure covalente de la partie polypeptidique
- elles assurent le transport du fer jusqu'à une cellule cible qu'elles reconnaissent spécifiquement
- elles possèdent une activité bactériostatique.

## I - LOCALISATION ET ETUDE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES TRANSFERRINES

### A - LOCALISATION DES TRANSFERRINES

Le tableau n° I p.6 résume les différentes localisations de la sérotransferrine, de la lactotransferrine et de la ferritine.

La sérotransferrine se trouve essentiellement dans le sang humain à une concentration de 3 g/litre. Un individu normal possède de 10 à 11 g de sérotransferrine dont 52 à 62 % sont extravasculaires.

Elle existe également en quantité variable dans l'urine, le liquide céphalo-rachidien, le lait, la bile, les sécrétions nasales, la salive, la lymphe.

La sérotransferrine se localise au niveau des hépatocytes, des cellules pariétales, des cellules épithéliales et des cellules épidermiques (121).

La lactotransferrine est surtout présente dans le lait, à une concentration variable selon le moment de la lactation. Son taux atteint 6 g/litre dans le colostrum puis tombe rapidement pour se stabiliser à 1-2 g/litre (Montreuil (136)). Elle existe aussi dans de nombreux milieux de sécrétion ; expectoration bronchique, sécrétion gastro-intestinale, liquide duodéal, mucus utérin, mucus nasal, bile hépatique, mucus bronchique, urine.

La lactotransferrine se retrouve dans les cellules épithéliales comme les cellules glandulaires, les cellules tubulaires du rein (124).



TABEAU I

REPARTITION COMPAREE DE LA SEROTRANSFERRINE, DE LA LACTOTRANSFERRINE ET DE LA FERRITINE DANS LES TISSUS HUMAINS d'après MASON et al (121)

Tissus	Transferrine	Lactotransferrine	Ferritine
<u>Tractus gastro-intestinal</u>			
Foie	Hépatocytes	Non	Hépatocytes, cellules de Kupfler
Estomac	Cellules pariétales	Cellules à mucus	Histiocytes
Duodénum	Cellules épithéliales	Cellules épithéliales	Cellules épithéliales
Vésicule biliaire	Cellules épithéliales	Non	Cellules épithéliales
<u>Glandes endocrines</u>			
Thyroïde	Colloïde	Non	Non
<u>Appareil urogénital</u>			
Rein	Tubules	Non	Epithélium cervical
Utérus	Epithélium cervical	Cellules glandulaires cervicales	Epithélium cervical
	Cellules myoépithéliales		
<u>Glandes exocrines</u>			
Tissu mammaire	Cellules périductulaires	Cellules acinaires, lait	Cellules périacinaires
<u>Moelle osseuse</u>	Non	Cellules myéloïdes	Histiocytes
<u>Système réticulo-endothélial</u>			
Histiocytes	Histiocytes activés	Non	Histiocytes
<u>Peau</u>	Cellules épidermiques	Non	Cellules épidermiques
<u>Système respiratoire</u>			
Bronches	Non	Cellules glandulaires	Non



La lactotransferrine a également été localisée dans les granules secondaires des leucocytes neutrophiles (21,15,38, 60, 122). Briggs et al (33) ont localisé la présence de lactotransferrine au niveau du noyau des granulocytes neutrophiles humains.

La concentration en lactotransferrine dans les leucocytes varie de  $1,82 \mu\text{g}/10^6$  polynucléaires neutrophiles à  $7,7 \mu\text{g}/10^6$  polynucléaires neutrophiles.

## B - ETUDE DE LA PARTIE PROTEIQUE DES TRANSFERRINES

### 1 - Séquence primaire

La détermination de la séquence peptidique de la sérotransferrine a été effectuée par Mc Gillivray et al (114). Elle est composée de 678 acides aminés.

La masse moléculaire de la sérotransferrine peut ainsi être déterminée avec précision, elle est de 79 650.

La séquence peptidique de la lactotransferrine est maintenant pratiquement totalement élucidée. Metz, Boutique et al (130) (131) (132) ont dénombré 715 acides aminés.

Ces deux transferrines présentent de larges séquences homologues au niveau des deux moitiés N et C terminales.

### 2 - Conformation

La séquence peptidique des transferrines est organisée en 6 domaines, chaque domaine comprend environ 110 acides aminés (127).

La moitié N-terminale de la molécule comprend 3 domaines ND<sub>1</sub>, ND<sub>2</sub>, ND<sub>3</sub> et la moitié C-terminale comprend également 3 domaines CD<sub>1</sub>, CD<sub>2</sub> et CD<sub>3</sub>.

La figure 1 fait apparaître le modèle moléculaire envisagé pour les transferrines.

Les domaines ND<sub>2</sub> et CD<sub>2</sub> sont impliqués dans la fixation du fer.

Metz-Boutique et al (127) émettent l'hypothèse d'une hexaplication d'un gène ancestral de 110 acides aminés, expliquant ainsi les homologies de séquences des transferrines, surtout au niveau des domaines ND<sub>2</sub> et CD<sub>2</sub> qui sont les mieux conservés.

La conformation des transferrines est étroitement liée au degré de saturation des 2 sites de fixation du fer. La fixation de deux atomes de fer implique de profonds remaniements dans la conformation de la molécule et une interaction entre les deux sites.

Des données cristallographiques ont permis à Gorinsky et al (74) de publier un modèle moléculaire de la sérotransferrine de lapin. Le modèle est défini comme un ellipsoïde de révolution de dimensions 95 x 60 x 50 Å, comportant deux lobes de volume presque identique. Chaque lobe, dont les axes forment un angle de 30° entre eux, est creusé d'une cavité ouverte sur l'axe de symétrie. L'une de ces cavités est délimitée d'un côté par une hélice  $\alpha$ , de l'autre par un feuillet plissé  $\beta$ .

#### C - ETUDE DE LA PARTIE GLYCANNIQUE DES TRANSFERRINES

Les transferrines se différencient par le nombre et la nature de leur glycanne. La fonction du glycanne est encore mal définie.

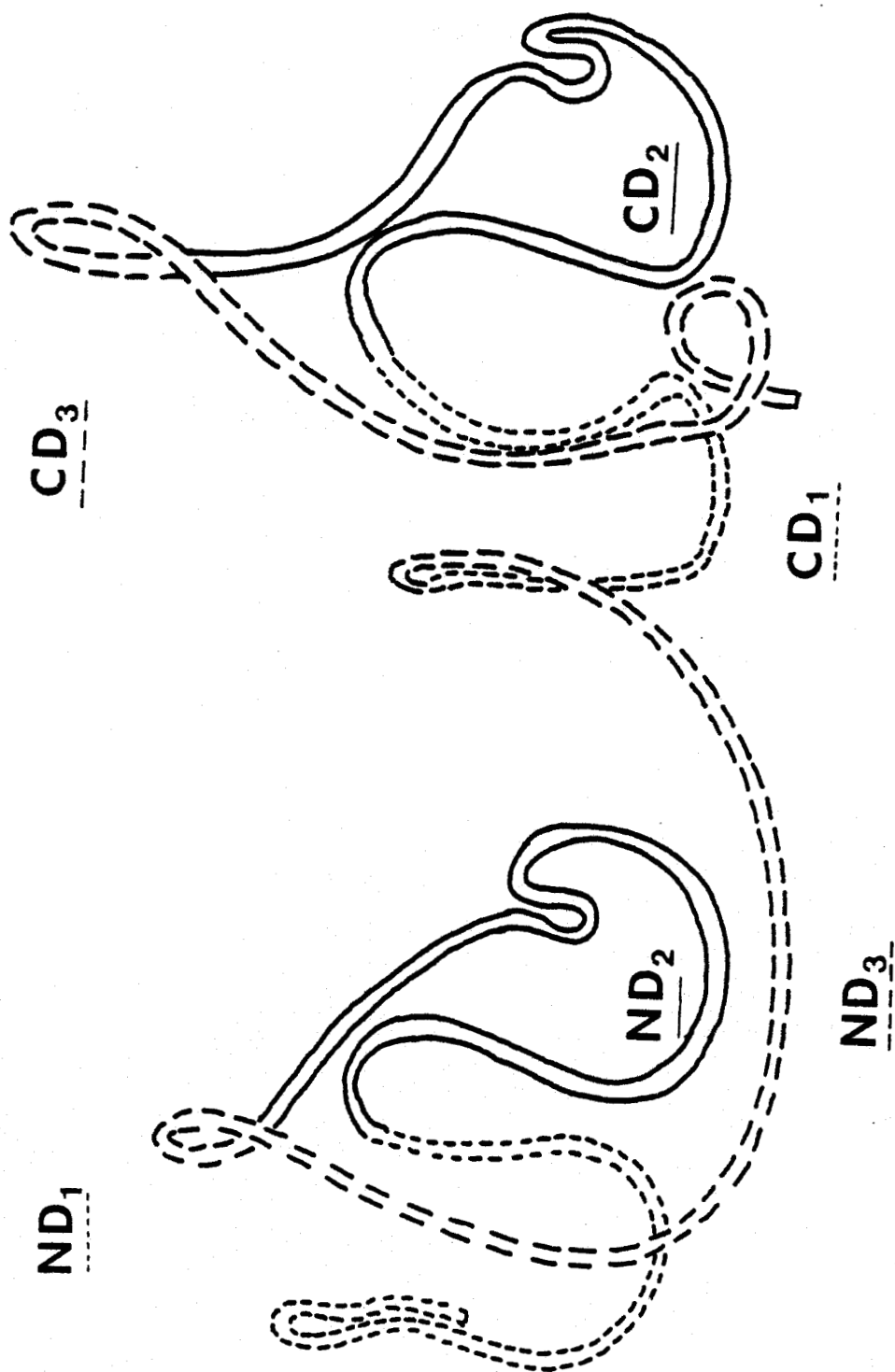


FIGURE 1 : MODELE MOLECULAIRE DES TRANSFERRINES. (127 )



## 1 - Localisation des glycanes

Le tripeptide Asn-x-Thr/Ser représente la séquence code pour la greffe de glycanne (142).

Le résidu Asn portant le glycanne est généralement situé dans une conformation spéciale  $\beta$ -turn et dans un environnement hydrophobe (4, 9, 19).

La sérotransferrine contient deux séquences codes glycosylées dans la moitié C-terminale CD<sub>1</sub> et CD<sub>3</sub>.

La lactotransferrine humaine contient quatre séquences codes. Une séquence code se situe dans la région N-terminale et elle est réellement glycosylée. Les trois autres séquences se situent dans la région C-terminale, cependant, une seule de ces séquences est glycosylée (127).

La localisation des glycanes est schématisée dans la figure n° 2.

## 2 - Structure des glycanes

La sérotransferrine humaine porte deux glycanes identiques de type N-acétyl lactosaminique, ainsi que Spik et al (180) l'ont démontré.

La structure de ce glycanne est précisée dans la figure n° 3.

La sérotransferrine peut également porter un glycanne de structure tri-antennée mais toujours de type N-acétyl-lactosaminique. L'existence de plusieurs variants de la sérotransferrine a été démontrée par de nombreux auteurs (120, 138, 179, 182, 183).

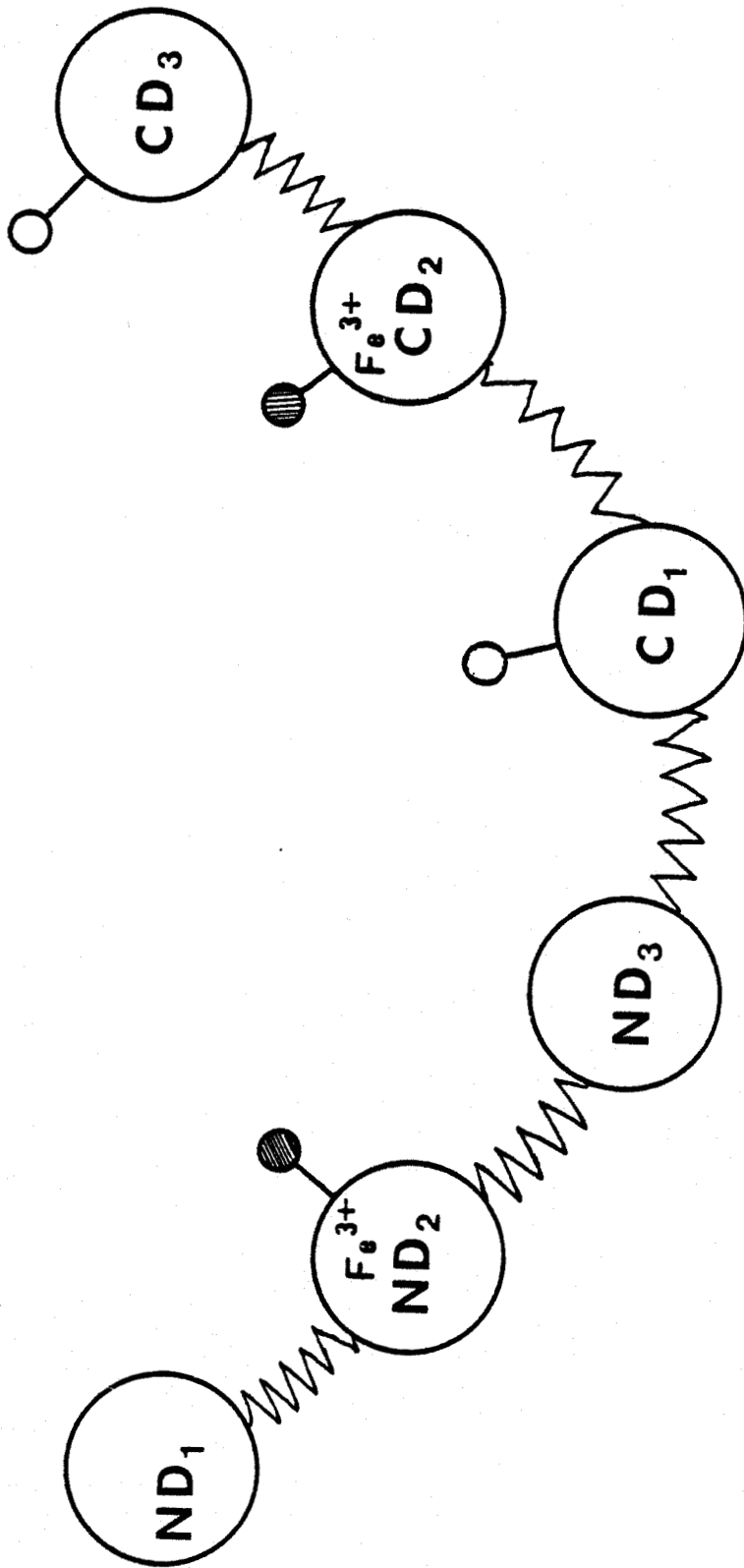


FIGURE 2 : LOCALISATION DES GLYCANNES ET DES SITES DE FIXATION DU METAL  
DANS LA SEROTRANSFERRINE ET DANS LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINES.

- Glycanna de la sérotransferrine
- Glycanna de la lactotransferrine.

La lactotransferrine humaine possède deux glycanes et leur structure présente de nombreuses variations dues à l'introduction de 1 à 3 résidus de L-fucose branchés en ( $\alpha$ 1-6) et ( $\alpha$ 1-3) sur une structure de type N-acétyl lactosaminique.

Ces structures ont été établies par Spik et al (181) et sont détaillées dans la figure n° 3.

### 3 - Conformation des glycanes

Des précisions ont été apportées sur la conformation du ou des glycanes des transferrines par Montreuil (137).

Différentes conformations ont été proposées ; en Y, en T et plus récemment en "oiseau blessé".

Des études de résonance paramagnétique électronique de Davoust et al (54) font état d'une grande flexibilité des glycanes et d'un degré de liberté interne dans la structure des glycopeptides.

## D - SITES DE FIXATION DU METAL

Pour une étude plus approfondie, nous renvoyons aux revues générales de Chasteen (44), de Aisen et Brown (3) et aux deux ouvrages édités par Crichton (49) et par Brown et al (36).

### 1 - Conditions de fixation du fer

Les transferrines peuvent fixer deux atomes de fer de manière réversible en développant une coloration rose saumon dont le maximum d'absorption est centré à 465 nm (109).

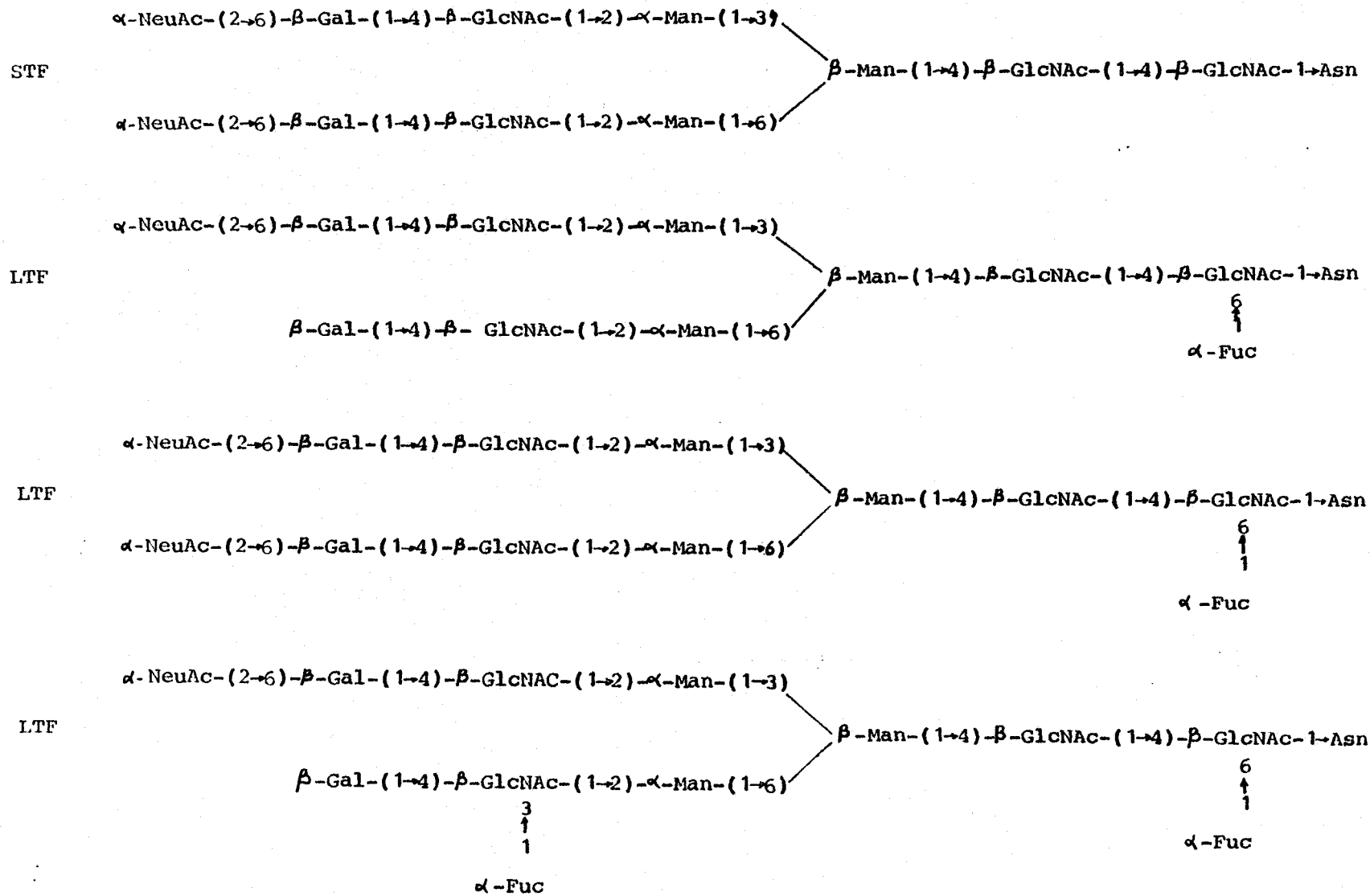
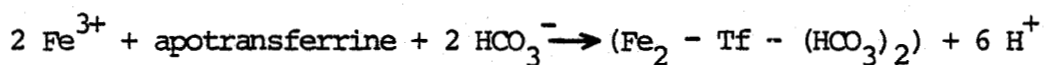


FIGURE 3 : STRUCTURE DES GLYCANNES DE LA SEROTRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE, SELON SPIK ET AL. ( 180 )



La fixation de chaque ion métallique nécessite la fixation d'un ion bicarbonate et la libération de 3 protons selon la formule suivante (172, 109) :



La fixation du métal et de l'anion est illustrée par la figure n° 4.

## 2 - Nature et localisation des sites de fixation du métal

Les travaux de Princiotto (157) ont permis de définir, sur la sérotransferrine, un site acido-labile sur la moitié N-terminale de la molécule dont l'ion est enlevé à pH 6,2 et un site acido-stable dont l'ion ne peut être éliminé qu'à pH 4,0.

L'existence d'un site acido-stable et d'un site acido-labile a été également mise en évidence dans le cas de la lactotransferrine humaine par Mazurier et al (125, 128).

Si l'on se réfère à la théorie des 6 domaines des transferrines, les domaines ND<sub>2</sub> et CD<sub>2</sub> représentent les sites de fixation du métal.

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

Certains acides aminés participent à la fixation du métal. Ainsi la participation de quatre ou six tyrosines a été démontrée (26,153). De même l'histidine intervient, mais le nombre d'acides aminés impliqués varie selon la transferrine (126, 107).

Le tryptophane (192,194) l'arginine (18) sont des acides aminés dont la liaison directe avec le métal n'a pas été prouvée. Ainsi l'arginine intervient dans le site anionique. Certains travaux (105,104) montrent également la participation de 2 molécules d'eau.

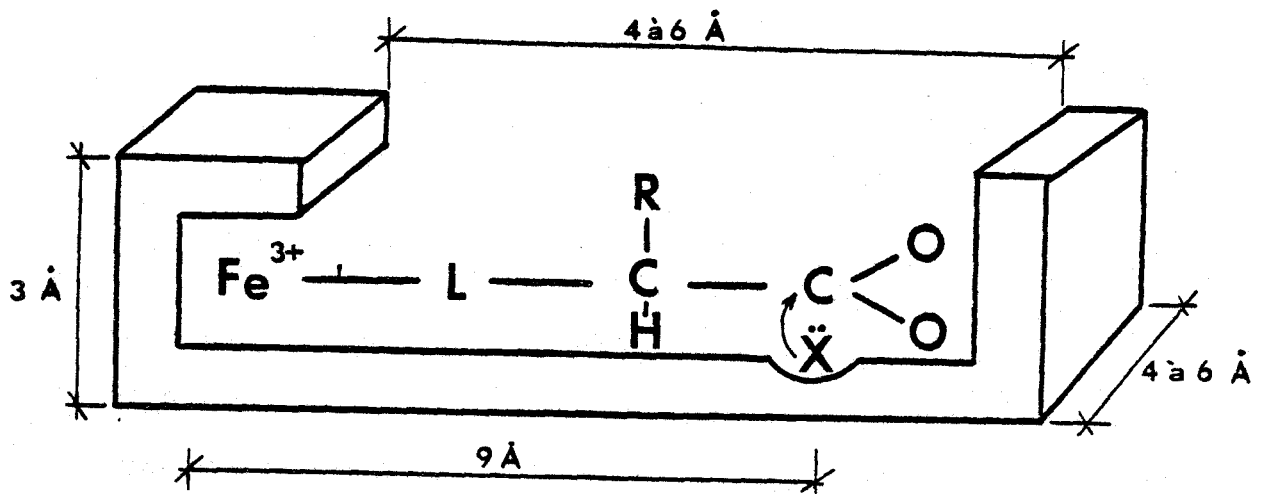


FIGURE 4 : MODELE DES SITES DE FIXATION DU FER ET DE L'ANION, SELON SCHLABACH ET AL. ( 30 )

#### 4 - Fixation d'autres métaux

Les transferrines fixent aussi d'autres ions métalliques divalents ou trivalents à raison de deux ions par molécule de transferrine. Les ions  $\text{Nd}^{3+}$  et  $\text{Pr}^{3+}$  font exception, car seul un ion est fixé (Bates et al) (17).

#### E - CONCLUSION

La sérotransferrine et la lactotransferrine sont deux glycoprotéines dont la structure primaire est désormais bien définie. Par contre, la structure des sites de fixation du métal n'est pas encore totalement connue. De plus, le problème de leur identité structurale et de leur rôle physiologique reste à approfondir.

## II - ROLES BIOLOGIQUES DES TRANSFERRINES

Le fer est pondéralement le plus important des métaux lourds dans l'organisme des mammifères. Il est présent à raison de 35 à 45 mg/kg.

Le fer peut être dissocié en plusieurs formes ; une forme fonctionnelle liée à l'hémoglobine, une forme de réserve, une forme de transport. Le métabolisme du fer fait intervenir ces différents aspects et peut être résumé par la figure n° 5.

### A - GENERALITES SUR LE METABOLISME DU FER

#### 1 - Absorption

Le système qui régule l'absorption quotidienne d'une quantité minime de fer (1-2 mg) est d'une réelle complexité et d'une extrême sensibilité.

En effet, ce système fonctionne pratiquement en vase clos, les pertes physiologiques de fer étant compensées par le fer alimentaire absorbé au niveau de la muqueuse intestinale.

#### 2 - Transport

La sérotransferrine est le principal transporteur du fer dans l'organisme. Les relations qui existent entre la sérotransferrine et les différents tissus sont représentées dans la figure n° 6 (87).

Les échanges en fer s'effectuent au niveau de 3 tissus principaux : l'érythron constitué de la moëlle érythropoïétique et des globules rouges circulants,



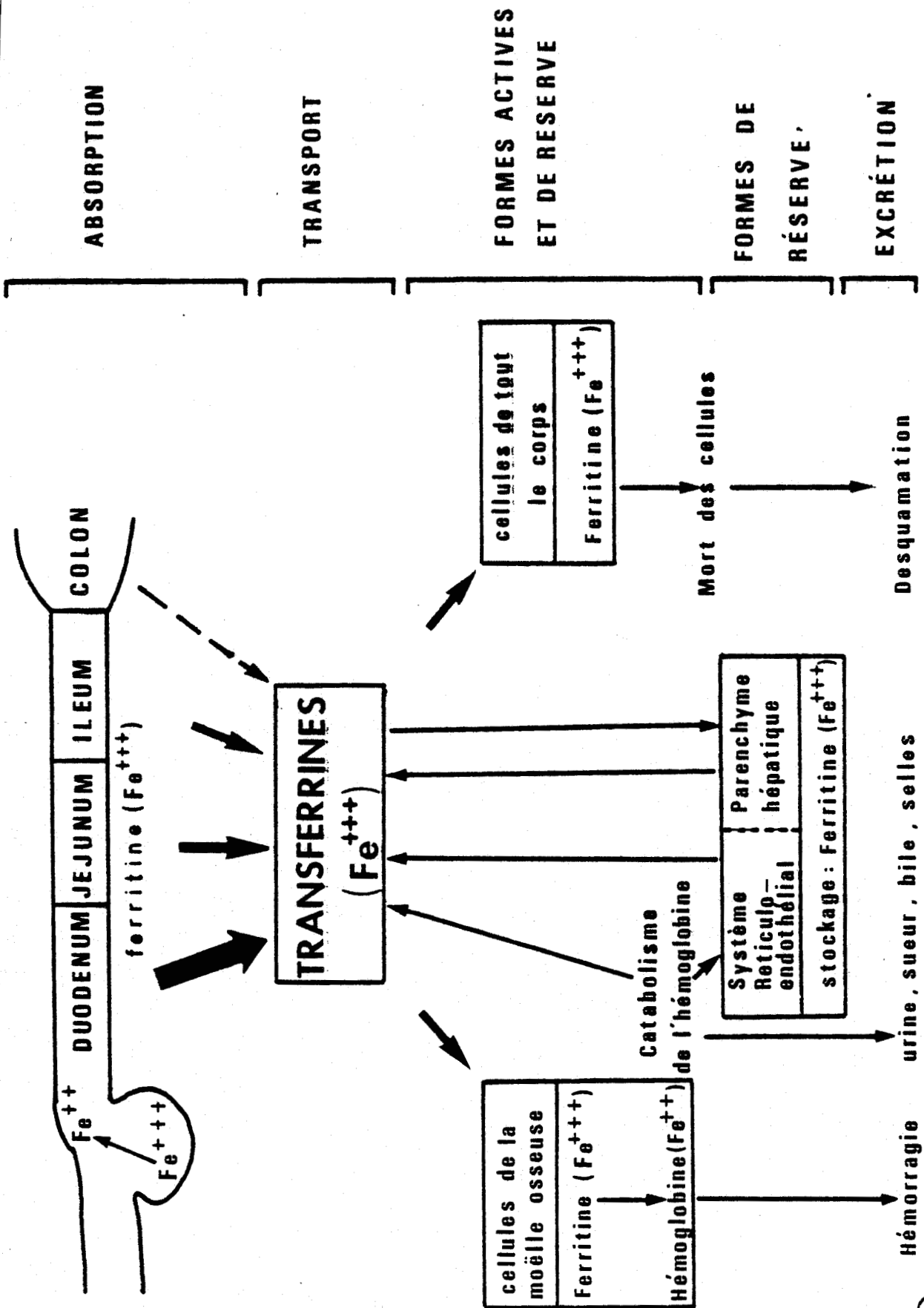


FIGURE 5 : SCHEMA GENERAL DU METABOLISME DU FER CHEZ L'HOMME.



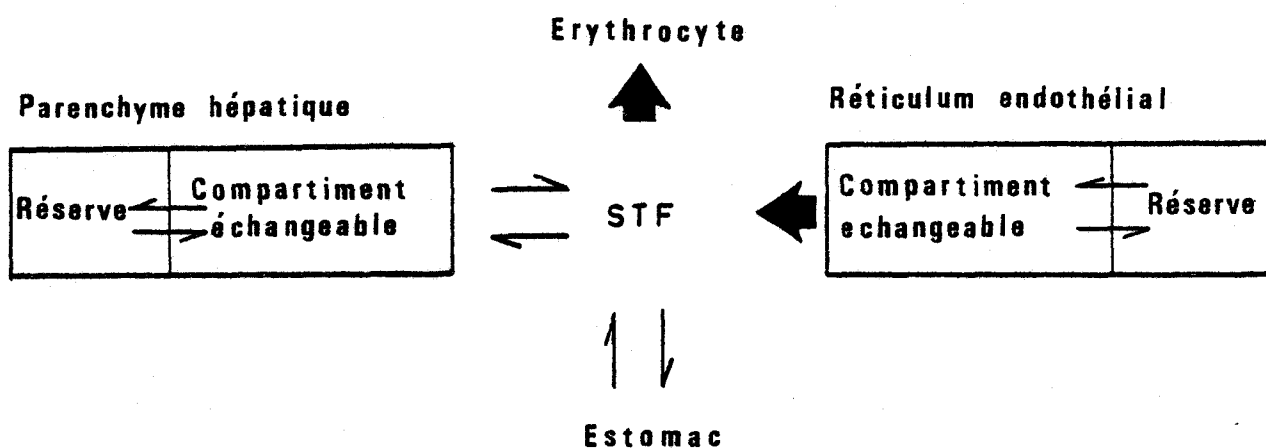


FIGURE 6 : RELATIONS ENTRE LA SEROTRANSFERRINE ( STF ) ET LES DIFFERENTS COMPARTIMENTS DU FER , SELON HERSHKO. (87 )

BUS  
LILLE

le système réticulo-endothélial et le parenchyme hépatique (48).

### 3 - Circulation du fer

La fig. n° 7 permet de définir les éléments intervenant dans la circulation du fer (167).

Le fer est utilisé, au niveau de la moëlle osseuse pour l'érythropoïese. Le fer circulant, sous forme d'hémoglobine dans les hématies, représente 65 % du fer total chez l'homme, soit 30 mg/kg.

Le fer reste sequestré dans les hématies jusqu'à la mort de ces cellules, soit environ 120 jours.

Les macrophages de la moëlle osseuse, du foie et de la rate phagocytent alors les hématies senescentes, dégradent l'hémoglobine et libèrent ainsi le fer.

Le fer peut alors être capté par la sérotransferrine et redevenir disponible pour l'érythropoïese. Cette forme de transport représente 0,08 % du fer total de l'organisme.

### 4 - Forme de réserve

Le foie constitue un organe important de réserve en fer. Les cellules parenchymateuses hépatiques contiennent environ 1/3 des réserves en fer de l'organisme. Le système réticulo-endothélial peut également mettre le fer en réserve.

Dans des conditions normales, la forme de réserve représente environ 10-15 mg/kg. Ce fer de réserve se répartit pour 2/3 dans la ferritine et pour 1/3 dans l'hémosidérine.

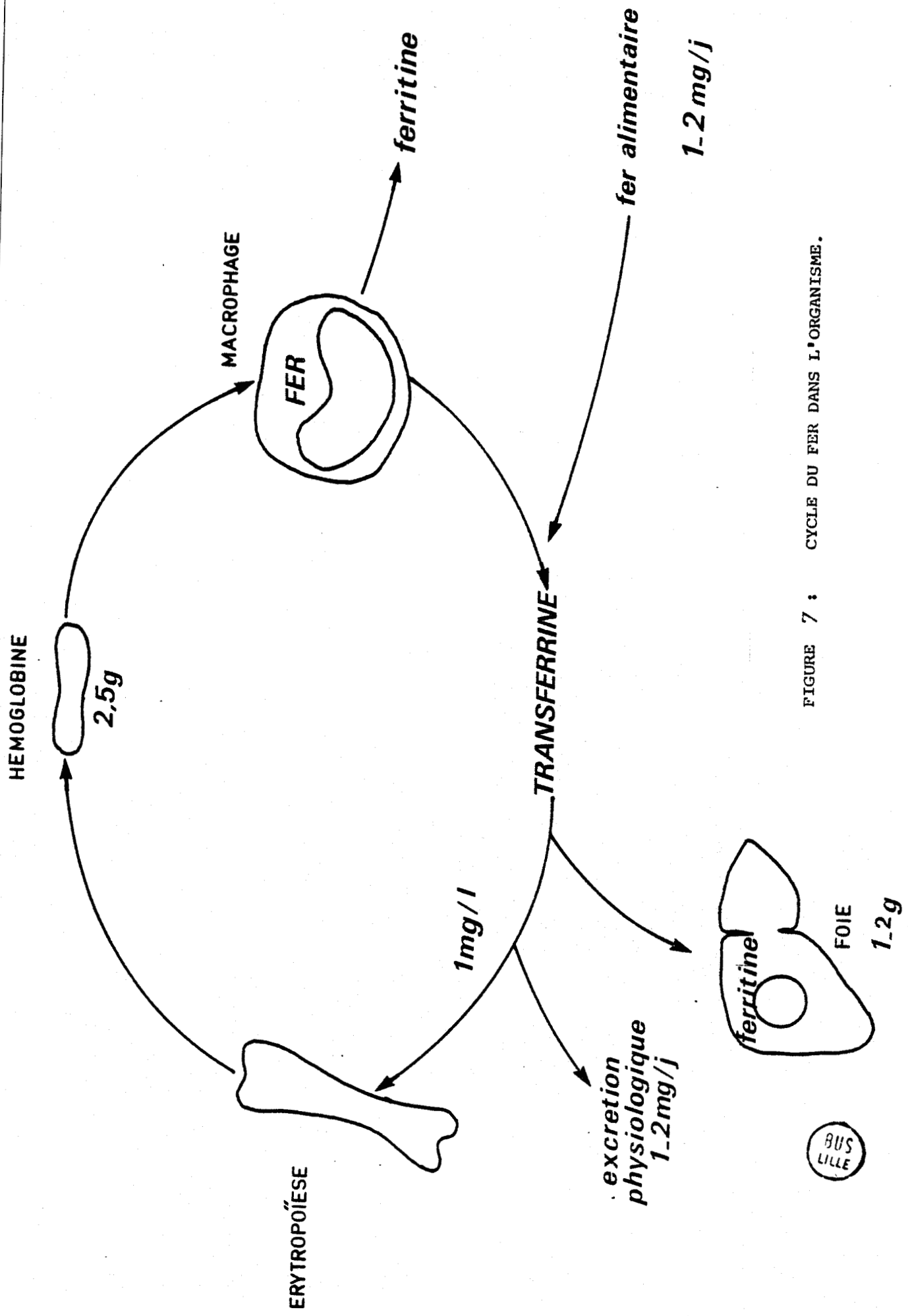


FIGURE 7 : CYCLE DU FER DANS L'ORGANISME.

a - La ferritine

La ferritine est une protéine de réserve du fer tissulaire dont le rôle est important. Cette protéine, de masse moléculaire 440 000 et constituée de 24 sous-unités, peut emmagasiner 4 500 atomes de fer ferrique par molécule (167, 108). Sa structure est représentée sur la fig. n° 8 (177).

En cas de besoin physiologique, le fer de la ferritine est mobilisé.

Il existe également une ferritine sérique, découverte chez l'homme en 1956 (161) dont le dosage constitue une estimation des réserves en fer de l'organisme.

b - L'hémosidérine

L'hémosidérine peut être définie comme un constituant amorphe composé de débris cellulaires et de molécules de ferritine plus ou moins dégradées. Selon Hershko (87), le fer de l'hémosidérine peut être mobilisé par l'organisme, mais avec une efficacité beaucoup plus faible que celui de la ferritine (87, 133, 216).

**B - ACTIVITES BIOLOGIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE**

Toutes les cellules requièrent la présence de fer pour croître et vivre. Le fer est un constituant des enzymes respiratoires et des protéines hémiques. Ceci explique sans doute la nécessité de la présence de la sérotransferrine dans les cultures cellulaires.

La sérotransferrine constitue une plaque tournante du

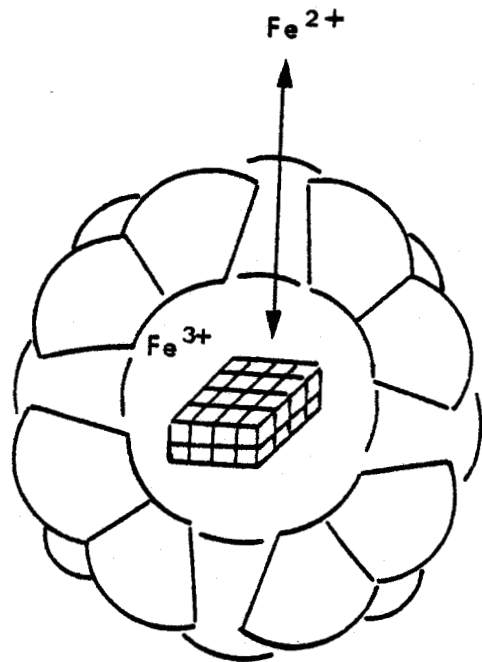


FIGURE 8 : SCHEMA DE LA STRUCTURE DE LA FERRITINE , SELON SIMKISS. (177 )



métabolisme du fer. Elle transporte et délivre le fer à différents organes, donc à différents types de cellules. Ceci implique l'existence de récepteurs spécifiques de la sérotransferrine situés à la surface des cellules où s'effectue le transfert du fer.

1 - Rôle de la sérotransferrine dans la biosynthèse de l'hémoglobine

Le rôle de la sérotransferrine dans la biosynthèse de l'hémoglobine est bien connue et a été étudiée sur le réticulocyte.

a - Différenciation cellulaire

Les cellules souches hématopoïétiques de la moëlle osseuse permettent, par différenciations successives, la formation de l'érythroblaste, du réticulocyte, puis de l'érythrocyte ou hématie.

Il existe une variation du nombre de récepteurs à sérotransferrine durant la différenciation érythroïde. Cette variation doit être liée à la régulation du transfert du fer (93, 150, 198).

Les études d'incorporation du fer ont été généralement effectuées sur le réticulocyte, précurseur immédiat de l'hématie. Cette cellule, dont la durée de vie est de 48 heures, est capable de capter le fer alors que l'hématie a perdu cette capacité. De plus le système réticulocyte - sérotransferrine constitue un système d'étude plus simple à obtenir que celui de l'érythroblaste-sérotransferrine

b - Mécanisme d'incorporation du fer

Ce mécanisme a d'abord été observé par Walsh et al (205) ; il a mis en évidence une incorporation du fer dans l'hémoglobine de l'érythroblaste et du réticulocyte. La participation de la sérotransferrine a été révélée par Jandl et al (97).

De nombreuses études ont confirmé ce fait et un schéma d'interaction a été proposé dans une revue générale (6).

Tout d'abord, il y a formation d'un complexe spécifique entre le récepteur et la sérotransferrine saturée, puis endocytose de ce complexe avec utilisation du fer pour la synthèse de l'hémoglobine et enfin exocytose de la sérotransferrine désaturée (6).

2 - Rôle de la sérotransferrine dans l'absorption intestinale du fer

Le fer contenu dans les aliments est, tout d'abord, absorbé par l'intestin (68, 195). C'est dans l'entérocyte, cellule intestinale dont la bordure en brosse est en contact direct avec les aliments, que le fer est stocké sous forme de ferritine avant d'être livré à la sérotransferrine (61, 76, 85). Un tel mécanisme suggère l'existence de 2 récepteurs : l'un ayant trait à l'absorption du fer dans l'entérocyte, l'autre permettant le passage du métal de la cellule dans le plasma. Le mécanisme est loin d'être élucidé. Il reste néanmoins acquis que la majeure partie du métal absorbé pénètre dans le plasma et que la sérotransferrine peut alors le diriger soit vers les formes actives, soit vers les formes de réserve. Il faut signaler cependant que Cox et al (50) ont montré que la lacto-



transferrine peut donner son fer aux cellules de l'intestin en se combinant à des récepteurs spécifiques alors que la sérotransferrine ne le peut pas.

3 - Rôle de la sérotransferrine dans la mise en réserve du fer dans l'hépatocyte

C'est principalement dans le foie qu'est synthétisée la sérotransferrine et c'est aussi dans cet organe que se situe la réserve de fer la plus importante de l'organisme, soit 30 % du métal stocké sous forme de ferritine.

La sérotransferrine livre son fer uniquement aux cellules parenchymateuses du foie (66). Une fixation spécifique de la sérotransferrine aux hépatocytes a été mise en évidence par Gardiner et al (70), Gröhlich et al (78) et résumée dans des revues générales (83, 6).

Ces derniers (78, 70) confirment que les sites spécifiques de la sérotransferrine ne représentent qu'un des moyens par lesquels l'hépatocyte peut incorporer le fer : il existe, en effet, des phénomènes de diffusion.

4 - Rôle de la sérotransferrine dans l'utilisation du fer à partir du macrophage

Les érythrocytes, au terme de leur vie, sont phagocytés par les macrophages. Le fer est alors soit mis en réserve, soit remis en circulation. Des études récentes ont permis de mettre en évidence la fixation de la forme désaturée de la sérotransferrine sur le macrophage péritonéal de souris (143). La fixation de l'aposérotransferrine sur le macrophage permet le retour du fer de l'érytrophagocytose à la circulation.

L'étude de l'interaction sérotransferrine-macrophage sera étudiée plus en détail dans le chapitre III.

#### 5 - Activité bactériostatique de la sérotransferrine

En cas d'infection, l'organisme va réagir en diminuant la quantité de fer de transport et en augmentant la quantité de fer de stockage.

Ainsi, il se produit une baisse de 15 à 20 pour 100 de la concentration en sérotransferrine (98). L'activité bactériostatique de la sérotransferrine qui a été mise en évidence "in vitro" par Schade et al (171, 173) s'exerce vis à vis de différentes bactéries.

#### 6 - Conclusion

Au travers de ce rapide panorama sur l'importance biologique de la sérotransferrine, nous pouvons conclure que cette protéine joue un rôle primordial dans le métabolisme du fer. Elle permet au fer de circuler dans l'organisme et régule ainsi, selon les besoins, l'équilibre entre la forme active et la forme de réserve du fer. De plus, elle intervient dans la lutte contre l'infection. Mais si la sérotransferrine est une protéine importante, elle n'est pas la seule à intervenir. En effet, la lactotransferrine est également une glycoprotéine qui intervient dans de nombreux mécanismes du métabolisme du fer.

#### C - ACTIVITES BIOLOGIQUES DE LA LACTOTRANSFERRINE

La lactotransferrine, par sa capacité à fixer réversiblement le fer, joue un rôle important dans les mécanismes de défense cellulaire et humorale.

1 - Régulation du stockage du fer dans le foie

L'implication de la lactotransferrine dans le stockage du fer est encore mal connue. Prieels (156) et al mettent en évidence l'existence d'un récepteur hépatique, chez le rat et la souris, responsable de la clairance de glycoprotéines portant un groupement fucose  $\alpha 1 \rightarrow 3$  N-acétylglucosamine. La lactotransferrine est éliminée "in vivo", à 90 % de la circulation sanguine via ce récepteur. La protéine est ensuite retrouvée dans les hépatocytes. L'importance de ce mécanisme est encore inexpliquée.

2 - Activité anti-microbienne

La lactotransferrine n'est pas seulement une protéine transportant le fer, elle peut également avoir un rôle bactériostatique (102, 123, 147, 159) sur différentes bactéries.

a - Libération de la lactotransferrine au lieu de l'agression

Le taux de lactotransferrine s'élève de façon considérable, en cas d'infection, soit par une activation de sa biosynthèse soit par une accélération du taux de renouvellement des leucocytes polynucléaires neutrophiles.

Ainsi, le taux de lactotransferrine augmente considérablement dans le liquide pancréatique en cas de pancréatite chronique (47) ce qui permet de différencier cette maladie du cancer du pancréas (63) où le taux de lactotransferrine n'augmente pas.

Le taux de lactotransferrine est également augmenté lors d'une inflammation dans le liquide synovial (20). Il existe d'autres cas dans lesquels le taux de lactotransferrine s'élève, sans qu'il y ait

infection ; ainsi l'alcoolisme (112), la leucémie (117).

b - Synergie d'action entre la lactotransferrine et les immunoglobulines

La lactotransferrine est présente dans la plupart des milieux de sécrétion, ainsi que le lysozyme et les immunoglobulines. Ces trois constituants agissent en synergie lors d'une attaque microbienne (160). L'activité bactériostatique de la lactotransferrine augmente en présence d'immunoglobulines sIgA ou sIgG spécifiques des bactéries pathogènes (37, 163, 164 ) et inhibe le passage du complexe fer-enterochiline à l'intérieur de la bactérie. Cette synergie d'action ne se manifeste pas avec des bactéries commensales (188).

3 - Rôle de la lactotransferrine dans l'activité bactéricide des leucocytes polymorphonucléaires

En cas d'agression microbienne, les granules secondaires des leucocytes polymorphonucléaires sont dégranulés et libèrent de l'apolactotransferrine dans le phagolysosome et le milieu extracellulaire (110).

La lactotransferrine exerce une activité bactéricide par ferriprivation intravacuolaire malgré l'acidité relative du milieu.

Elle peut également intervenir dans la régulation de la production de radicaux hydroxyles libres puissamment bactéricides.

Lors de la phagocytose, les neutrophiles convertissent l'oxygène en anion superoxyde  $O_2^-$  et en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ . Ces deux composés interagissent pour

former des radicaux hydroxyles à haut pouvoir d'oxydation.

Selon Ambruso et al ( 7 ), la lactotransferrine, grâce au fer ferrique  $Fe^{3+}$  qu'elle apporte, peut augmenter la production de radicaux hydroxyles libres.

Ces radicaux hydroxyles libres peuvent attaquer les molécules biologiques et induire la peroxydation des lipides ( 82 ). Par contre, la lactotransferrine faiblement saturée ( 79 ) est un inhibiteur de la peroxydation des lipides. Dans ce cas, la lactotransferrine secrétée dans le milieu extérieur présente une fonction protectrice vis à vis des neutrophiles et des tissus environnants.

#### 4 - Régulation de la granulopoïèse

Les neutrophiles polymorphonucléaires et les macrophages jouent un rôle important dans la défense antibactérienne et dans le métabolisme du fer.

Ces deux types de cellules sont issus d'une même cellule souche pré-différenciée granulo-monocytaire ; ils sont représentés sur la figure n° 9.

La régulation de la production granulo-monocytaire paraît être sous la dépendance de deux séries de facteurs antagonistes.

##### a - Les facteurs de stimulation

Les facteurs de stimulation sont groupés sous le terme "colony stimulating factor" ou C.S.F. et constituent un ensemble de glycoprotéines stimulant de façon spécifique les précurseurs granulo-monocytaires ( 14, 213, 169 ).

Ces facteurs sont essentiellement produits par

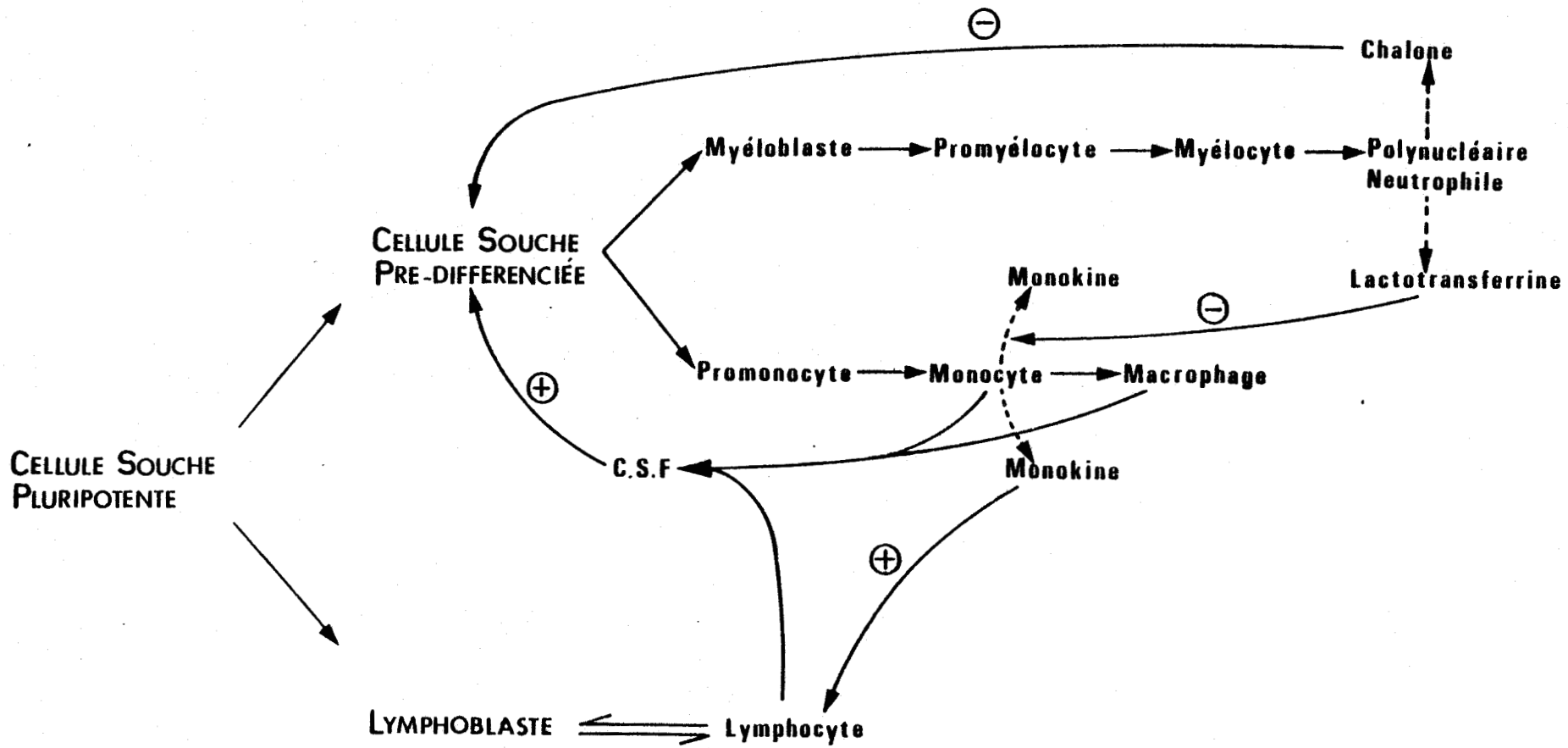


FIGURE 9 : REGULATION DE LA MYELOPOIESE , SELON GOLDE ET CLINE (110 )  
 MODIFIE PAR BAGBY. (14 )

⊖ Inhibition, ⊕ Activation, ---- Liberation.



les monocytes, les macrophages, (72, 190) et les lymphocytes activés (46).

b - Les facteurs d'inhibition

Les facteurs d'inhibition sont au nombre de trois :

b.1 - Les prostaglandines E, produites par les monocytes

b.2 - Le "colony inhibitory activity" ou C.I.A.

Ce facteur a été identifié à la lactotransferrine produite par les polymorphonucléaires neutrophiles (34). La lactotransferrine saturée en fer inhibe la production de C.S.F. à une concentration de  $10^{-17}$  M. Cette inhibition ne s'effectue pas directement sur la production de cellule souche granulomonocytaire (217), mais sur la production ou la libération d'une monokine (14). Cette monokine, produite par le monocyte, stimule la production de C.S.F. par le lymphocyte T (13) et les fibroblastes (14).

La lactotransferrine saturée en cuivre ou en zinc est inefficace (35).

b.3 - Les chalone

La chalone granulocytaire est un petit oligopeptide produit par les granulocytes, dont le rôle est de diminuer l'état de prolifération des cellules souches mais non leur nombre.

5 - Régulation de la migration des cellules immunocompétentes au lieu d'inflammation

Les polynucléaires neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes sont des cellules qui interviennent dans les mécanismes de défense de l'organisme, dans

la synthèse et la reconnaissance des transferrines et de la ferritine. Ceci constitue une intéressante coïncidence biologique, et permet à De Souza (59) de proposer une nouvelle théorie concernant le contrôle, par les protéines fixant le fer, de la migration des cellules lymphoïdes dans l'organisme.

Cette théorie est schématisée dans la figure n° 10. Les leucocytes polynucléaires sont les premières cellules à parvenir au site inflammatoire, elles synthétisent la lactotransferrine. Cette protéine va attirer les macrophages et les lymphocytes, par l'intermédiaire de récepteurs membranaires (203, 141, 154).

De plus, les macrophages attirent les lymphocytes par la synthèse de ferritine et de sérotransferrine.

Ainsi la cavalcade cellulaire vers le site inflammatoire pourrait s'expliquer par un mécanisme de reconnaissance impliquant les protéines fixant le fer.

#### 6 - Interaction avec le macrophage

L'intervention de la lactotransferrine dans le métabolisme du fer fait appel au système réticulo-endothélial. Elle a été mise en évidence dans les cas pathologiques.

Les mécanismes de l'interaction lactotransferrine-macrophages seront étudiés plus en détail dans le chapitre III.

#### 7 - Conclusion

Les rôles biologiques de la lactotransferrine sont multiples. Elle joue un rôle important dans la lutte contre l'infection tant par son implication dans l'anémie ferriprive que par son activité bactériosta-



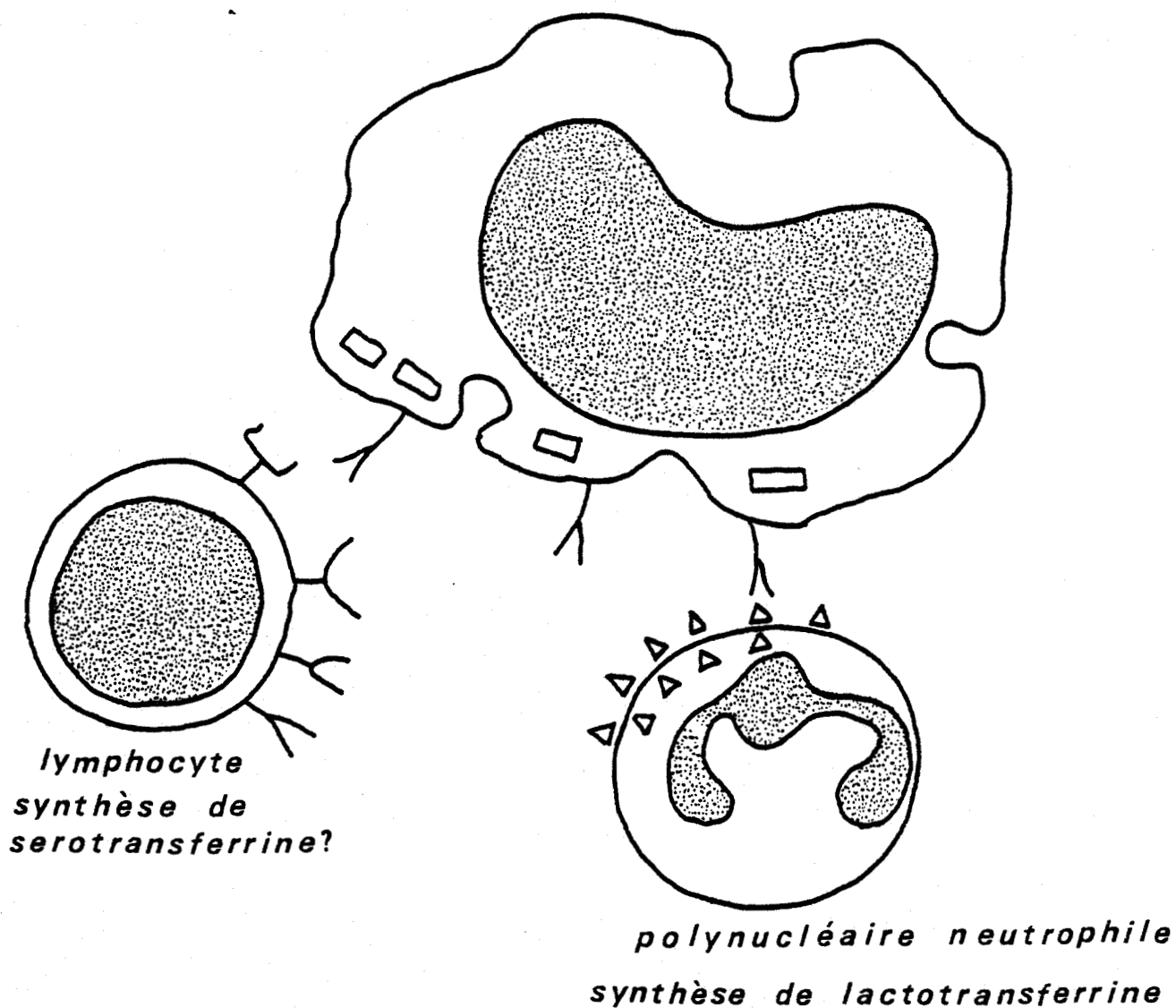


FIGURE 10 : ASSOCIATION DES PROTEINES FIXANT LE FER ET DES CELLULES PRESENTES AU SITE D'INFLAMMATION. ( 59 )

- ┌ Récepteur de ferritine , □ Ferritine
- └ Y Récepteur de lactotransferrine, Δ Lactotransferrine
- └ Y Récepteur de sérotransferrine diférique
- └ ) Récepteur de sérotransferrine saturée en zinc.

tique. Récemment, son intervention dans la granulopoïèse et la migration cellulaire a été soupçonnée.

La lactotransferrine joue donc un rôle important au sein de l'organisme. Ses relations avec la lignée leucocytaire restent à définir, en particulier avec le macrophage.

## CHAPITRE II

### GENERALITES SUR LES MACROPHAGES

C'est Elie Metchnikoff qui, en 1887, publia ses observations sur l'existence de cellules amiboïdes mononucléées, libres et mobiles, ayant la propriété de phagocytose, qu'il appela macrophages (129).

Ces cellules sont capables de phagocyter des bactéries, des virus mais également d'autres substances particulières telles les billes de latex, le carbone colloïdal.

Plus tard, grâce à des études de colorant vital, Aschoff ( 8 ) a déterminé la nature des cellules douées de phagocytose. Ces cellules, connues sous le nom de cellules du système réticulo-endothélial, peuvent se classer par ordre croissant d'activité phagocytaire en cellules endothéliales < cellules réticulées de la rate et des ganglions < cellules réticulo-endothéliales < histiocytes < splénocytes et monocytes.

Le terme de système réticulo-endothélial groupe des cellules hétérogènes, localisées différemment dans l'organisme, pouvant différer dans leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles. Une nouvelle classification a donc été établie tenant compte des cellules précurseurs, et le système phagocytaire mononucléé est né (201).

## I - PRESENTATION GENERALE DES MACROPHAGES

### A - MORPHOLOGIE DES MACROPHAGES

Elle est surtout établie de façon comparative par rapport aux polynucléaires (12). Le macrophage possède : un noyau homogène, ovale ou réniforme (non fragmenté) ; des mitochondries en quantité importante ; un réticulum endoplasmique dense, surtout pour les cellules stimulées ; un appareil de Golgi important ; des lysosomes nombreux, leur nombre varie en fonction de l'état immunitaire ; des tubules et des filaments dont le rôle dans la motilité de la cellule est déterminant ; des vacuoles de taille variable contenant quelquefois le matériel phagocyté ; et enfin des phagosomes.

### B - ORIGINE ET LOCALISATION DES MACROPHAGES

#### 1 - Origine des macrophages

Les macrophages ont pour cellules souches des cellules de la moëlle : les cellules souches granulo-monocytaire. Ces cellules peuvent donner naissance, par divisions successives, d'une part à des cellules polymorphonucléaires, d'autre part à des monocytes puis à des macrophages.

Les différentes étapes de divisions cellulaires sont schématisées sur la figure n° 9.

Les cellules polymorphonucléaires ne font pas partie du système phagocytaire mononucléé.

...

La cellule souche médullaire se transforme en promonocyte, qui lui-même donne naissance au monocyte, ces étapes se situent au niveau de la moëlle osseuse.

Le monocyte est ensuite transporté vers le sang périphérique où il peut se transformer en macrophage libre ou en macrophage tissulaire. La maturation du monocyte en macrophage s'accompagne d'une augmentation du nombre de récepteurs Fc (214).

La figure n° 11 montre le transfert du monocyte vers les différents tissus, chez la souris.

a - Origine du macrophage alvéolaire

L'origine et la capacité à proliférer du macrophage alvéolaire ont été longtemps une énigme. Des études sur l'animal ont montré qu'il dérive d'un précurseur médullaire, origine commune à tous les macrophages.

Les monocytes entrent dans la circulation sanguine au hasard, l'étape de passage dans les alvéoles pulmonaires demeure inconnue.

La figure n° 12 représente les deux possibilités de prolifération et de renouvellement du macrophage alvéolaire (31).

Le monocyte peut aller directement vers l'alvéole pour se transformer en macrophage alvéolaire. Il peut également se différencier en macrophage résidant dans le tissu interstitiel.

Le renouvellement des macrophages alvéolaires semble être dû en majeure partie à une migration des monocytes sanguins. En effet, Golde et al (73) ont montré que l'activité mitotique des

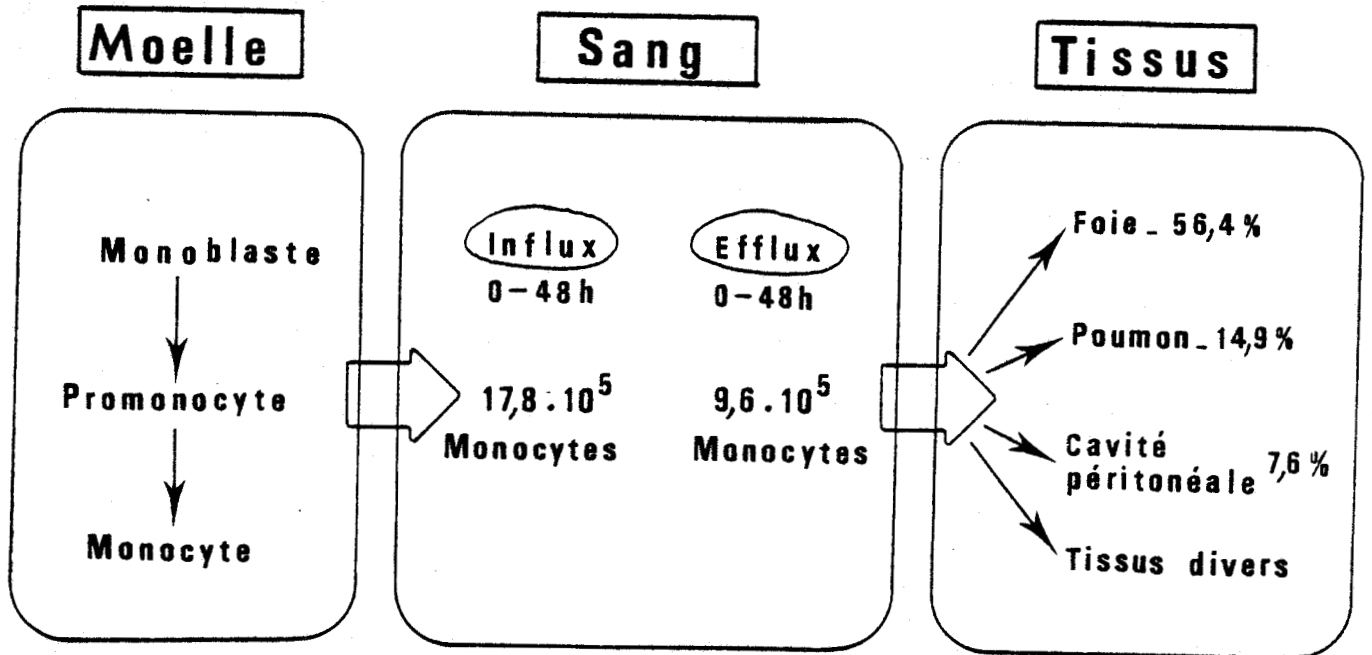


FIGURE 11 : MIGRATION DES MONOCYTES CHEZ LA SOURIS , SELON VAN OUD ABLASS ET AL. (28 )

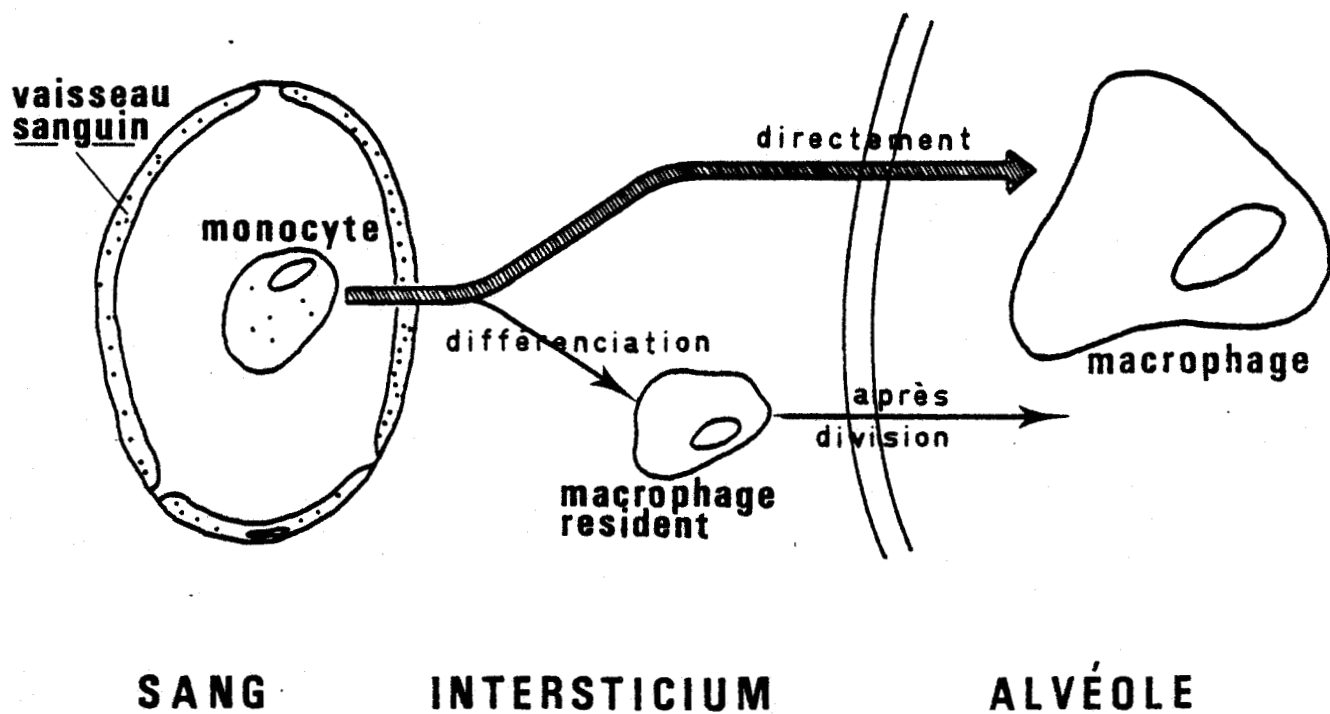


FIGURE 12 : ORIGINE DU MACROPHAGE ALVEOLAIRE , SELON BOWDEN ET AL. ( 31 )

macrophages alvéolaires humains est très faible. Seuls 0,35 - 1,25 % des macrophages sont capables de se diviser. De même Bowden et al (31) montrent que les cellules intersticielles résidentes de souris se divisent peu. En cas d'irradiation, le nombre de macrophages alvéolaires, chez la souris, est maintenu par division et migration de cellules intersticielles.

Lorsqu'il n'y a pas un état pathologique, l'influx de monocytes sanguins est la source majeure de renouvellement des macrophages alvéolaires.

#### b - Origine du macrophage péritonéal

L'origine du macrophage péritonéal a surtout été étudiée chez la souris (199, 200). Le macrophage péritonéal dérive du monocyte sanguin et n'est pas capable de se diviser. Au cours d'une inflammation il se produit une rapide entrée des monocytes sanguins dans la cavité péritonéale, et des expériences de marquage à la thymidine tritiée, confirment que cette augmentation locale de macrophages péritonéaux n'est pas due à une activité mitotique de ces cellules.

Le pourcentage de cellules capables de division est de 3 à 4, que ce soit dans un cas normal ou pathologique.

Les macrophages, alvéolaires ou péritonéaux ont donc une origine commune.

## 2 - Localisation des macrophages

Les cellules mononucléées phagocytaires sont présentes au niveau de plusieurs organes et tissus.



a - Le foie

Les cellules de Küpfer, jouxtant les cellules hépatiques constituent la barrière phagocytaire la plus importante de l'hôte. Elles jouent également un rôle dans le stockage du fer sous forme de ferritine.

b - La rate

Ce sont des macrophages spléniques. Ils se situent dans la pulpe rouge.

c - Les ganglions lymphatiques

Ce sont les macrophages thymiques, libres ou fixes.

d - Le poumon

Ce sont les macrophages alvéolaires. Ils présentent un contenu enzymatique lysosomal élevé, un métabolisme oxydatif important (de préférence à la glycolyse), une activité bactéricide faible (57), ils répondent peu aux stimuli chimiotactiques (100).

e - Les cavités séreuses

Ce sont les macrophages péritonéaux. Ils présentent une activité bactéricide supérieure à celle des macrophages alvéolaires mais un contenu lysosomal inférieur. De plus, ils répondent bien aux stimuli chimiotactiques.

f - Autres localisations

Les cellules mononucléées phagocytaires se situent également dans la moëlle osseuse ; ce sont les cellules souches promocytaires, les monocytes. Le tissu conjonctif et le sang contiennent aussi des monocytes.

## II - ROLES BIOLOGIQUES DES MACROPHAGES

Dans ce paragraphe, nous allons étudier les rôles biologiques du macrophage. Son intervention dans le métabolisme du fer sera étudié plus en détail dans le chapitre

### A - FONCTION ANTI-INFECTIEUSE - PHAGOCYTOSE

Les macrophages sont des cellules spécialisées dans l'ingestion et la phagocytose d'une grande variété de corps étrangers et débris cellulaires.

Selon Besterman et al (25), il faut séparer le mécanisme d'ingestion en deux mécanismes distincts : d'une part la phagocytose, phénomène actif, qui correspond à l'internalisation de particule de diamètre supérieur à  $10\mu m$ ; d'autre part, la pinocytose ou internalisation de petit substrat. La pinocytose peut se produire par l'intermédiaire de deux mécanismes distincts : d'une part, un phénomène passif ou "fluid phase pinocytosis" qui ne fait pas intervenir de récepteurs ; d'autre part un phénomène actif faisant intervenir la fixation du ligand sur un récepteur membranaire.

La phagocytose est le mécanisme le plus étudié dans le cadre de la fonction anti-infectieuse du macrophage (25, 2, 189, 77).

La phagocytose fait suite à une phase de chimiotactisme durant laquelle le macrophage ou le monococyte est attiré vers le site inflammatoire.

La phagocytose se décompose en deux étapes : l'attachement de la particule à la membrane cellulaire suivi de l'endocytose.

## 1 - Phase d'adhésion

Tout macrophage présente la possibilité d'adhérer à la surface de divers substrats (verre, plastique, micro-organisme).

Des facteurs extra-cellulaires tels la température, la force ionique, la présence de cations divalents ( $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ), d'opsonines (spécifiques ou non) peuvent agir sur le phénomène d'adhésion.

En outre, l'existence de récepteurs spécifiques, pour la partie Fc de différentes classes d'IgG (88) sur la membrane du macrophage, facilite l'adhésion des micro-organismes. Il existe également des récepteurs pour des fragments du complément  $C_3b$  et  $C_3d$ .

De plus, la nature hydrophobe (40), la charge, la composition chimique de la particule jouent également un rôle important. L'adhésion des particules est un phénomène dont l'indépendance énergétique est contestée.

## 2 - Phase d'ingestion de la particule

L'ingestion d'une particule est un mécanisme actif dépendant de la température, de la présence d'ions  $Ca^{++}$  et nécessitant de l'énergie.

L'ingestion fait intervenir un mécanisme "zipper" qui consiste en l'apposition continue de récepteurs et de la particule, par l'intermédiaire de pseudopodes, jusqu'à ce que la particule soit totalement enrobée (77).

L'ingestion s'accompagne d'une augmentation de la consommation d'oxygène faisant intervenir la glycolyse pour les macrophages péritonéaux, la phosphorylation oxydative pour les macrophages alvéolaires.

Les macrophages peuvent ingérer une quantité définie de particules, ils entrent ensuite dans une phase d'inhibition.

La particule ingérée peut ensuite être digérée après fusion des phagosomes avec les lysosomes, ou persister et se multiplier dans le cas de variétés virulentes.

## B - ROLE DES MACROPHAGES DANS L'IMMUNITE A MEDIATION CELLULAIRE

Il est possible de distinguer deux types d'infection ( 81) ; une infection purulente de courte durée, intense, résorbée par les polynucléaires et une infection granulomateuse provoquée par la survie de bactéries phagocytées dans les polynucléaires ou les macrophages. Pour combattre cette infection granulomateuse, il y a développement de l'immunité faisant appel au lymphocyte T et à la cellule phagocytaire monocluée.

Dans un premier temps, la prolifération bactérienne est limitée par la présence de macrophages résidents, via la phagocytose. Dans un second temps, les lymphocytes T interviennent en émettant un facteur chimiotactique, favorisant le rassemblement des macrophages et la formation d'une lésion granulomateuse.

Puis une prolifération des macrophages résidents va se produire ainsi qu'un afflux de monocytes sanguins. Au début, le granulome contient seulement des macrophages et des lymphocytes. Ensuite, arrivent des cellules épithéloïdes, des fibroblastes, des polynucléaires éosinophiles et basophiles.

Dans un troisième temps, les macrophages vont être activés par les lymphokines qui ont le pouvoir d'augmenter l'activité bactéricide du macrophage. Ces lymphokines sont le facteur d'inhibition de la migration ou M.I.F. et le

facteur d'activation du macrophage ou M.A.F.

Les interactions lymphocytes-macrophages sont réglées par le système d'histocompatibilité (M.H.C. chez la souris, H.L.A. chez l'homme).

Le locus I de la région H<sub>2</sub> du chromosome 17 de la souris ou de la région H.L.A. du chromosome 6 chez l'homme code pour un antigène de surface Ia sur le macrophage. Cet antigène est reconnu par le lymphocyte et la cellule peut alors exercer ses fonctions effectrices. Seule une faible proportion de macrophage présente cet antigène Ia.

L'ensemble de ces réactions est schématisée sur la figure n° 13.

#### C - ROLE DES MACROPHAGES DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER

L'absorption intestinale du fer fait intervenir des récepteurs mais, selon Cattan et al, Refsum et al, le macrophage villositaire joue également un rôle important dans le métabolisme intestinal du fer.

La barrière intestinale est composée de trois membranes ; tout d'abord l'épithélium où se trouvent les entérocytes, ensuite la "lamina propria" composée de cellules interstitielles, de macrophages et de capillaires, et enfin, la muqueuse musculaire.

Le fer alimentaire passe à travers l'entérocyte, par l'intermédiaire de chélateurs, puis une partie de ce fer passe dans la circulation sanguine, c'est la phase rapide (210). Le reste du fer est transféré au macrophage.

Le macrophage stocke également sous forme de ferritine le fer d'origine hémique. Ce stock macrophagique est le

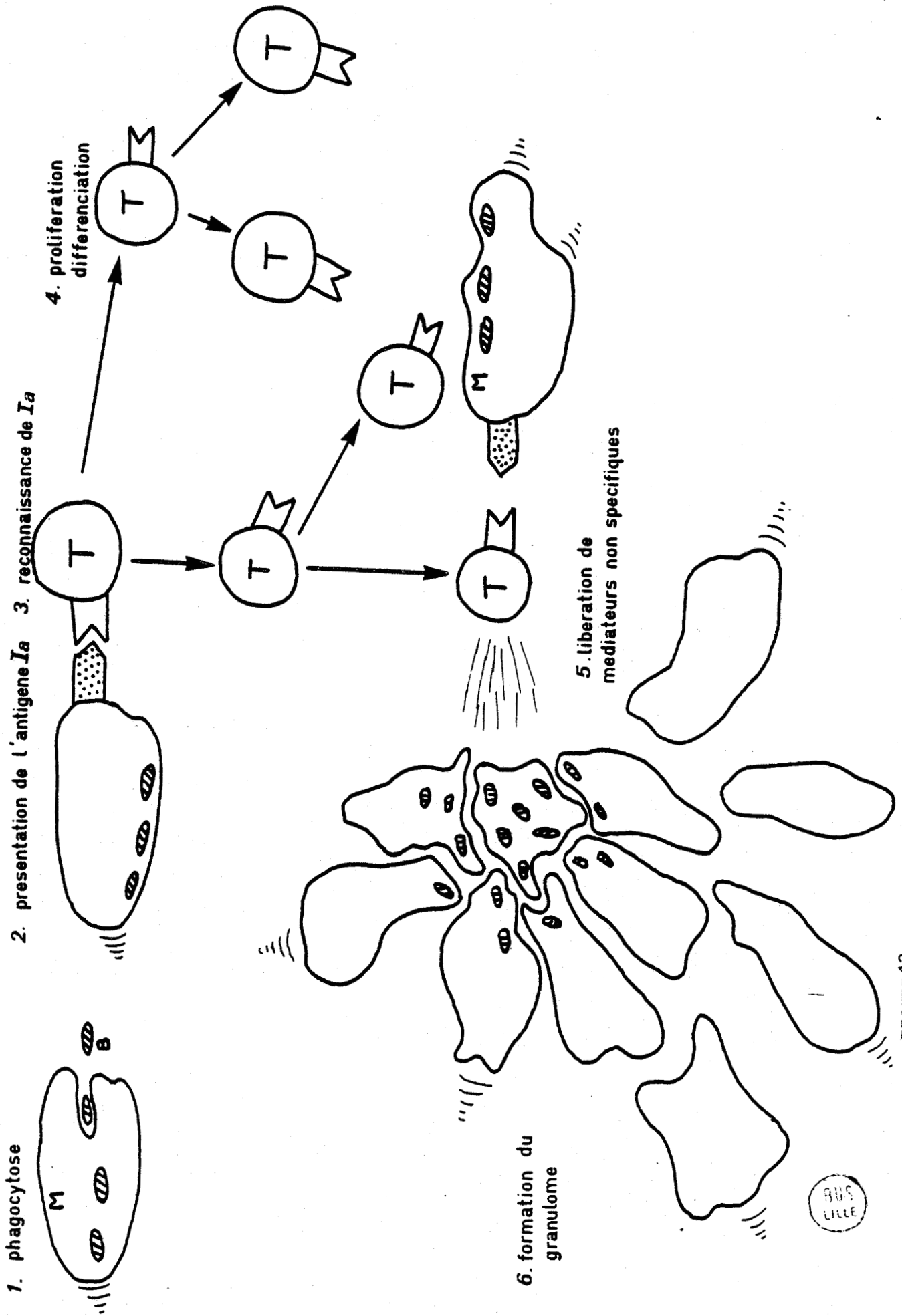


FIGURE 13 : PRINCIPALES ETAPES MISES EN JEU AU COURS D'UNE INFECTION CHEZ LA SOURIS . ( 81 )

stock le plus important de la villosité ; il suit les variations quantitatives du stock de tous les macrophages mononucléés de l'organisme (41, 42, 43, 56).

Le fer macrophagique peut être libéré vers la circulation sanguine en fonction des besoins, c'est la phase de "transfert retardé" ou bien une partie de ce fer peut être excrétée par les cellules à mucus (158).

Le macrophage joue un rôle de régulation. Ces différentes possibilités du transport du fer sont schématisées dans la fig. n° 14. Selon Refsum et al (158), le macrophage est une étape obligatoire dans le transfert du fer.

#### D - ETUDE DES RECEPTEURS MEMBRANAIRES DES MACROPHAGES

Le macrophage porte sur sa membrane de nombreux récepteurs.

Nous allons rapidement citer les plus importants.

##### 1 - Le récepteur du complément C<sub>3</sub>

Son existence est connue chez le lapin, le cobaye, l'homme ( 53, 162, 211 ) sur le macrophage alvéolaire. La fonction de ce récepteur C<sub>3</sub> n'est pas éclaircie mais il est possible qu'il agisse en synergie avec le récepteur F<sub>C</sub> à IgG.

##### 2 - Le récepteur à F<sub>C</sub>

Ce récepteur est capable de se lier spécifiquement avec le fragment F<sub>C</sub> des Ig cytophiles, surtout les IgG. Leur nombre varie en fonction de l'état de stimulation et de l'origine du macrophage.

Les macrophages ne semblent pas posséder de récepteurs pour les IgM (162).

...

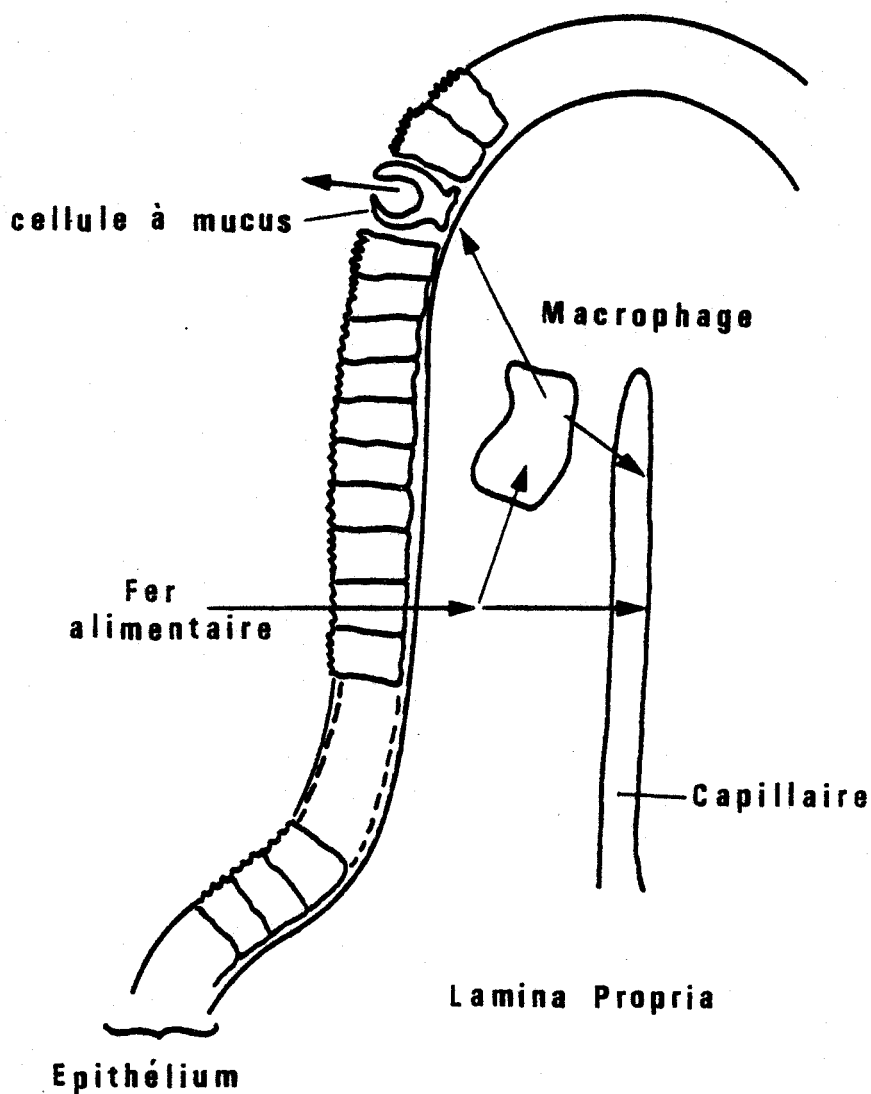


FIGURE 14 : TRANSPORT DU FER DANS LA VILLOSITE INTESTINALE  
SELON REFSUM ET AL. (158 )



Récemment, un récepteur à IgE a été mis en évidence sur le macrophage péritonéal de rat ( 58, 29 ).

3 - Récepteur à M.I.F. (migration inhibitory factor),  
à M.S.F. (migration stimulatory factor)

Le récepteur du facteur d'inhibition de migration a été bien étudié (89, 69 ). La fixation du M.I.F. sur ce récepteur est inhibée par le L. Fucose. Le macrophage porte également un récepteur du facteur d'activation. Son action est inhibée par la N-acétyl-D-galactosamine (69 ).

Ces deux récepteurs contiennent certainement des glycanes.

4 - Le récepteur d'endotoxine bactérienne

Haeffner-Cavaillon et al (80 ) ont montré l'existence d'un récepteur à endotoxine de bactérie Gram négative sur le macrophage péritonéal de lapin. Ce récepteur est différent du récepteur à mannose, présent à la surface de certains macrophages.

5 - Existence de récepteurs de glycoprotéines et reconnaissance de leur partie glycanique

Les glycoprotéines de surface jouent un rôle important dans la pinocytose, la différenciation, la reconnaissance et l'adhésion inter-cellule, comme récepteurs à hormones et virus et médiateurs de la spécificité immunologique (146).

La partie glycanique des glycoprotéines semble impliquée dans le transport de métabolites à travers les membranes cellulaires, dans l'insertion et l'orientation des glycoprotéines dans la membrane plasmatique,

dans la sécrétion et dans la protection contre la protéolyse (146, 139).

Le rôle de ces sucres a été étudié dans le système ligand-récepteur afin d'élucider le rôle de ces sucres. C'est Ashwell (1968) qui mit en évidence l'existence d'un récepteur hépatique reconnaissant le galactose en position terminale obtenu après désialylation de la céruléoplasmine. Ce fut le premier pas dans l'investigation du rôle des sucres dans les mécanismes de reconnaissance.

Différents récepteurs spécifiques d'un ou plusieurs sucres ont été mis en évidence dans la cellule mononucléée phagocytaire. Il est cependant assez difficile d'établir une classification bien claire.

#### a - Rôle des glycanes dans la reconnaissance d'un récepteur

La persistance de glycoprotéines modifiées, de glycoconjugués et de glycosydases lysosomales dans le plasma des mammifères est largement déterminée par la nature du sucre exposé en position terminale.

Stahl (185) met en évidence l'existence d'un récepteur reconnaissant le mannose et la N-Acétyle-glucosamine sur le macrophage alvéolaire de rat. Pour cela, il utilise de la RNase B exposant un résidu terminal mannose et de l'agalacto-orosomucoïde exposant un résidu terminal N-acétyleglucosamine. L'intervention d'un seul récepteur pour ces deux substances est déterminée par des réactions d'inhibition. La structure de la partie glycanique est importante. Ainsi le mannose lié en  $\alpha 1 \rightarrow 6$  est un meilleur inhibiteur que le mannose lié en  $\alpha 1 \rightarrow 3$  ou en  $\alpha 1 \rightarrow 2$ . Ces travaux confirment les travaux d'Achord (1) effectués in vivo.

Selon Stahl (186) ce récepteur spécifique du mannose et de la N-acétylglucosamine est un récepteur de pinocytose qui délivre les glycoprotéines fixées au lysosome. Ce récepteur n'est pas dégradé mais recyclé. Stahl (193) montre qu'il existe deux pools distincts de récepteurs intracellulaires, dans le macrophage alvéolaire. Le monosaccharide mannose à une concentration de 10 mM exerce un effet coopératif sur la fixation de Man-BSA sur le récepteur mannose du macrophage alvéolaire de lapin ( 90, 94 ). Imber et al (94) ont constaté que l'activation des macrophages par BCG ou par du thioglycollate entraîne une diminution du nombre de récepteur mannose sur le macrophage.

Le rôle physiologique de ce récepteur macrophagique n'est pas bien éclairci mais il semble impliqué dans l'élimination d'enzymes lysosomales de la circulation sanguine, de complexe antigène-anticorps (IgM) et de levures (207).

Parallèlement, Shepherd et al (175) ont établi une classification des sucres ayant un pouvoir inhibiteur sur la fixation de glycoprotéines exposant un résidu L-Fucose. Ces sucres sont les suivants par ordre d'inhibition décroissante :

$$\text{L - Fuc} = \text{D - Man} > \text{GLcNac} \approx \text{D - Glc} > \text{D - Xyl} \gg \gg$$
$$\text{D - Gal} = \text{L - Ara} = \text{D - Fuc}.$$

En fait, la fixation sur ce récepteur est inhibée à la fois par le L-fucose et le D-Mannose.

Ce récepteur possède donc une spécificité très large et est capable de fixer un grand nombre de glycoprotéines.

...

Stahl et al (187) montrent que ce récepteur mannose-fucose existe sur le macrophage dérivé de la moëlle osseuse et sur le macrophage péritonéal de souris. Mais l'apparition de ce récepteur dépend de l'état de différenciation de la cellule mononucléée phagocytaire. Ainsi le monocyte sanguin ne fixe pas le Man-BSA. Mais après trois jours en culture, le Man-BSA se fixe dans des conditions semblables à celles du macrophage alvéolaire (176).

### CHAPITRE III

## ROLE DES MACROPHAGES DANS LE METABOLISME DU FER

Dans ce chapitre, nous allons voir quelles sont les interactions transferrines - macrophages dans le métabolisme du fer.

#### I - BIOSYNTHESE DE LA SÉROTRANSFERRINE PAR LE MACROPHAGE

Haurani et al (84), puis Custer et al (52) ont montré l'existence d'une synthèse de transferrine par le macrophage péritonéal de souris. La synthèse de transferrine par les tissus de la rate, du foie de souris et de rat est connue (152).

Les cellules de la moëlle osseuse ne synthétisent pas de transferrine.

Cette transferrine synthétisée par le macrophage joue un rôle dans le métabolisme du fer.

En effet, selon Haurani (84), le fer de l'érythrophagocytose va se fixer préférentiellement à la transferrine macrophagique plutôt qu'à l'apoferritine. Ce phénomène est un processus rapide ; le temps de demi-libération du fer dans le système réticuloendothélial est de 1 à 2 heures. Il existe également une phase lente de libération du fer.

Le macrophage alvéolaire "in vivo" est incapable de métaboliser le fer associé à l'hémoglobine (62).

...

## II - INTERACTION SEROTRANSFERRINE - MACROPHAGE

La sérotransferrine joue un rôle essentiel dans le métabolisme du fer, qu'elle soit sous forme saturée ou désaturée. Des récepteurs pour ces deux formes ont été mis en évidence.

### A - RECEPTEUR DE L'APOSEROTRANSFERRINE

La fixation de l'aposérotransferrine a été étudiée sur le macrophage péritonéal de rat (143). L'aposérotransferrine se fixe de façon spécifique, réversible et saturable sur le macrophage péritonéal de rat.

Des analyses par la méthode de Scatchard ont déterminé la présence de 110 000 sites de fixation. Ce chiffre est quatre fois supérieur à celui obtenu pour la sérotransferrine saturée. Ceci est schématisé sur la figure n° 15.

Par ailleurs, Wyllie (219) a montré que le macrophage alvéolaire de lapin fixe préférentiellement la sérotransferrine ayant un faible degré de saturation.

La sérotransferrine peut donc prendre le fer au système réticulo-endothélial. La direction du fer est inversée par rapport à celle du réticulocyte.

### B - RECEPTEUR DE LA SEROTRANSFERRINE SATUREE

La sérotransferrine saturée se fixe également sur le macrophage péritonéal mais sur un récepteur différent et indépendant de celui de l'aposérotransferrine (143, 144).

...

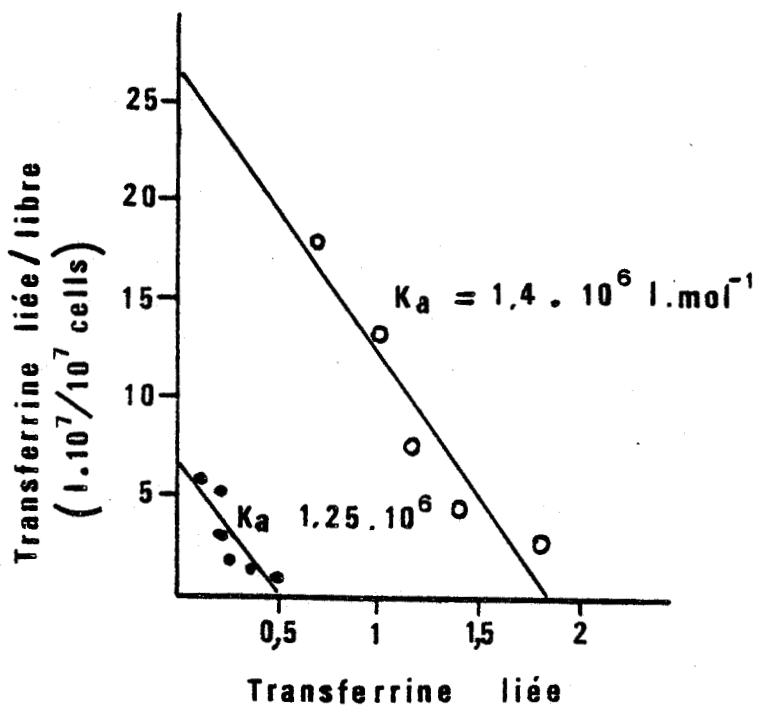


FIGURE 15 : DETERMINATION DU NOMBRE DE SITES DE LA SEROTRANSFERRINE SUR LE MACROPHAGE PERITONEAL , SELON NISHISATO ET AL. (143 )

- Apo-sérotansferrine N = 110 000 sites
- Sérotansferrine diférique N = 33 000 sites

Le nombre de sites récepteur de la sérotransferrine saturée est estimé à 30 000 par cellule avec une constante d'affinité de  $1,25 \cdot 10^6 \text{ l. mol}^{-1}$ . Ce fait reflète la capacité limitée du macrophage à prendre le fer de la sérotransferrine "in vivo" (67).

#### C - CONCLUSION

Le récepteur de la sérotransferrine sur le macrophage est important dans le métabolisme du fer. La sérotransferrine peut prendre le fer du macrophage mais elle peut aussi donner son fer au macrophage.

### III - ETUDE DE L'INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC LE MACROPHAGE

Les interactions de la lactotransferrine avec le macrophage sont variées et ne font pas seulement intervenir le métabolisme du fer.

#### A - ROLE DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS LA REGULATION DE LA MYELOPOIESE

Ce rôle de la lactotransferrine a été étudié au chapitre I des généralités.

#### B - ROLE DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS L'ANEMIE FERRIPRIVE

L'intervention de la lactotransferrine dans le métabolisme du fer fait appel au système réticulo-endothélial, dans les cas pathologiques.



Les mécanismes qui entrent en jeu lors d'une agression microbienne sont résumés dans la figure n°16.

L'ensemble de ces mécanismes permet la mise en place d'un état d'anémie ferriprive, caractérisé par une chute brutale du taux de fer sérique (208), une augmentation du fer de réserve dans le foie et les macrophages (151), et une diminution de l'absorption intestinale de fer (24).

Quelles sont les différentes étapes qui mènent à cet état d'anémie ferriprive ?

### 1 - Libération d'apolactotransferrine

Dans une première étape, l'agent infectieux active le leucocyte mononucléé. Sous l'effet de cette activation, il y a libération d'un agent pyrogène leucocytaire, qui est une protéine de faible masse moléculaire. Le rôle de cet agent est double ; d'une part, il diminue la production de sidérophores bactériens (103, 116, 145), d'autre part, il interagit avec les neutrophiles pour provoquer une dégranulation des granules secondaires et, par voie de conséquence, une libération de lactotransferrine dans le milieu extra-cellulaire (101, 202).

La lactotransferrine, ainsi sécrétée sous forme désaturée, prélève le fer de la sérotransferrine en présence d'ions citrates.

### 2 - Reconnaissance d'un récepteur du macrophage

La lactotransferrine saturée reconnaît un récepteur de la membrane plasmique du macrophage (39, 203, 118) Le fer est transféré sur la ferritine où il est bloqué tandis que la protéine est dégradée (204). La résultante de l'ensemble de ces mécanismes est l'ins-

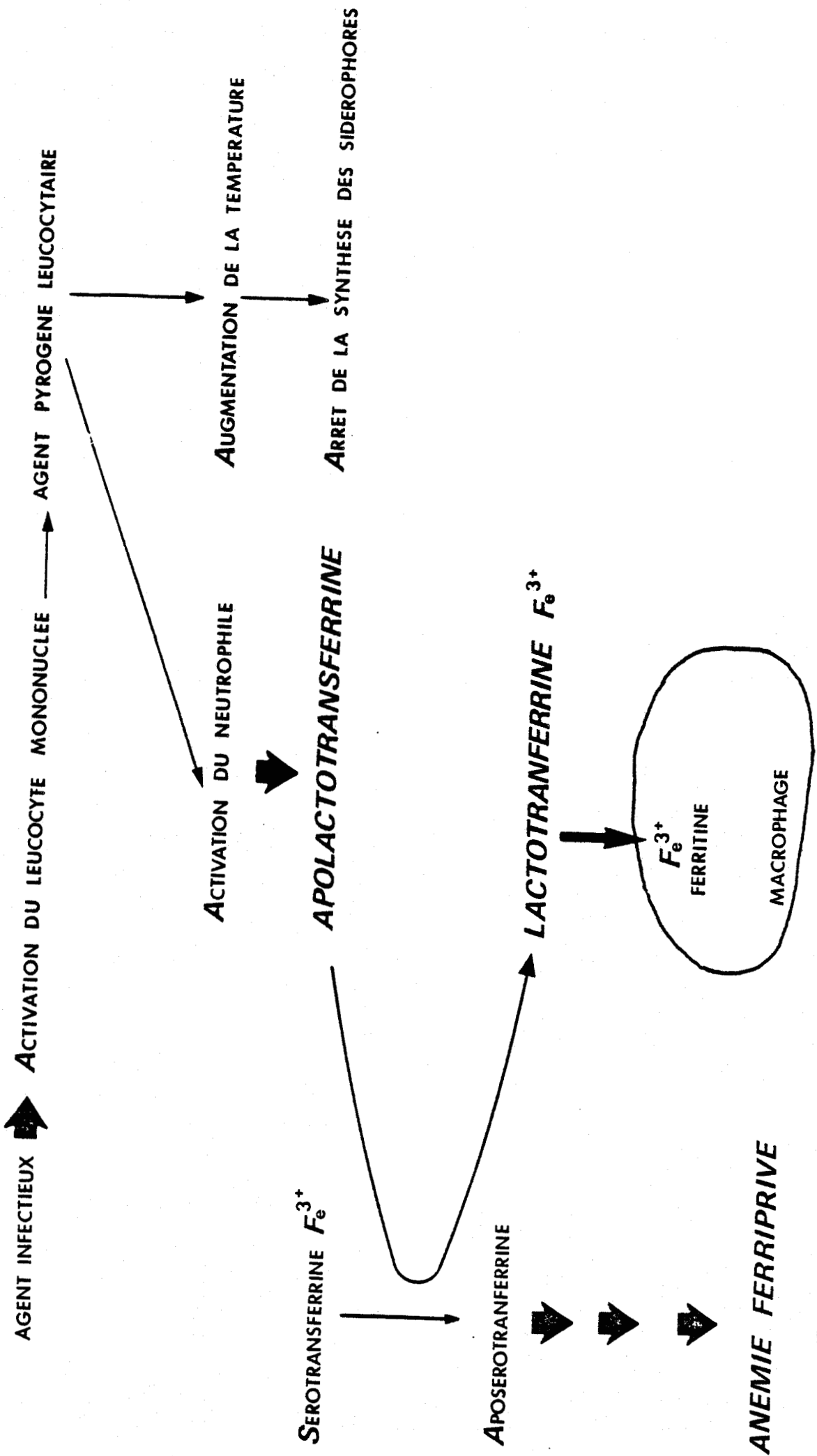


FIGURE 16 : MECANISMES INTERVENANT DANS L'ETABLISSEMENT DE L'ANEMIE FERRIPRIVE, SELON VAN SNICK ET AL. (202)



tallation de l'anémie ferriprive. L'accumulation du fer dans la ferritine diminue la quantité de fer disponible pour l'hématopoïèse.

## C - ETUDE DES INTERACTIONS LACTOTRANSFERRINE - MACROPHAGES

Les résultats donnés dans ce chapitre représentent les quelques études effectuées sur le macrophage et la lactotransferrine.

### 1 - Etudes réalisées par Van Snick et al

Dès 1976, Van Snick et al (203) mettent en évidence une fixation de la lactotransferrine humaine sur des cellules péritonéales de souris. Le système d'étude choisi est un système hétérologue.

Le nombre de sites de fixation de la lactotransferrine saturée est de  $20 \cdot 10^6$  par macrophage péritonéal. Selon eux, l'intégrité de la structure de la lactotransferrine est nécessaire pour qu'il y ait fixation sur le macrophage.

Par la suite, cette même équipe (118) a confirmé la fixation de la lactotransferrine sur le macrophage alvéolaire de souris.

### 2 - Etudes réalisées par Bennet et al

Ces auteurs ont analysé un système homologue constitué par la lactotransferrine humaine et le macrophage humain dérivant du monocyte après 7 jours en culture (22).

Le nombre de sites récepteurs détectés dans ce système est très élevé :  $200 \cdot 10^6$  sites par macrophage. Cette fixation est spécifique et dépendante de la présence d'ions  $Ca^{++}$ . Ce chiffre très élevé peut être le

résultat d'une polymérisation de la lactotransferrine sous la forme de tétramère. Le récepteur pourrait avoir une structure permettant l'interaction de plus d'un polymère de lactotransferrine.

Récemment Bennet et al (23) montrent la fixation de la lactotransferrine humaine sur le monocyte sanguin humain mais au niveau du DNA membranaire de surface de la cellule. Le nombre de "sites" serait de  $33 \cdot 10^6$  par cellule avec une constante de dissociation de  $1,8 \cdot 10^{-6} \text{ M.l}^{-1}$ . Après traitement des cellules à la DNase, la lactotransferrine ne se fixe plus. Ce phénomène de fixation peut être un phénomène non spécifique électrostatique ou un récepteur spécifique. Le DNA membranaire aurait un rôle biologique en permettant à la lactotransferrine d'avoir un effet inhibiteur sur production de CSF (colony stimulating factor).

### 3 - Etude réalisée par Campbell

En 1982, Campbell (39) étudie la fixation de glycoprotéines synthétisées par le polymorphonucléaire sur le macrophage alvéolaire humain (système homologue). Parmi ces glycoprotéines, se trouve la lactotransferrine.

Le phénomène de fixation est saturable à  $0^\circ\text{C}$  et le nombre de sites est de  $54 \cdot 10^6$  par cellule. La figure n° 17 représente cette fixation.

### 4 - Conclusion

De ces différentes expériences, il ressort que la lactotransferrine se fixe sur le macrophage via un récepteur membranaire. Le nombre de sites récepteurs est très variable d'un auteur à l'autre, par contre les constantes d'association sont voisines.

Ces résultats sont résumés dans le tableau II.

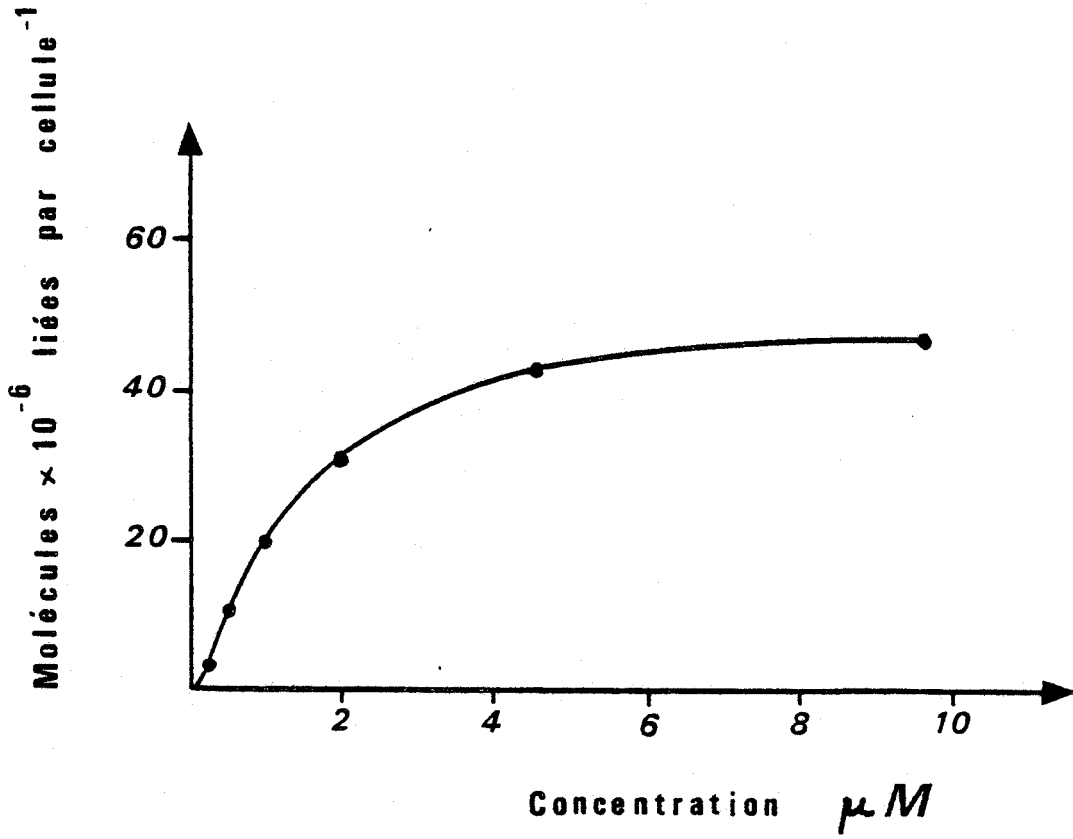


FIGURE 17 : FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE SUR LE MACROPHAGE ALVEOLAIRE HUMAIN , SELON CAMPBELL (39 ).

TABLEAU II

DETERMINATION DU NOMBRE DE SITES RECEPTEURS DE LA LACTOTRANSFERRINE  
HUMAINE SUR LE MACROPHAGE

AUTEURS	CELLULES	NOMBRE DE SITES	CONSTANTE D'AFFINITE
VAN SNICK et al. 1976	Macrophages alvéolaires de souris / péricotonéaux de souris	$20 \cdot 10^6$	$0,9 \cdot 10^6 \text{ l.mol}^{-1}$
BENNET et al. 1981	Macrophages humains dérivés de monocytes	$200 \cdot 10^6$	$3,75 \cdot 10^5 \text{ l.mol}^{-1}$
CAMPBELL 1982	Macrophage alvéolaire humain	$54 \cdot 10^6$	$0,58 \cdot 10^6 \text{ l.mol}^{-1}$



D - ROLE DES GLYCANNES DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS LA RECONNAISSANCE DU MACROPHAGE

Une seule étude a été entreprise pour déterminer l'importance des sucres du glycanne de la lactotransferrine dans la reconnaissance du récepteur membranaire du macrophage (95). La lactotransferrine défucosylée se fixe de la même façon que la lactotransferrine intacte. De plus, le mannose - BSA, la N-acétyl-glucosamine-BSA et le fucose-BSA ne sont pas inhibiteurs de la clairance de la lactotransferrine "in vivo" ou "in vitro".

Les auteurs concluent donc que le fucose ne joue pas de rôle dans la reconnaissance du récepteur.

E - CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence le rôle biologique important de la lactotransferrine dans ses interactions avec le macrophage. Au niveau de la détermination du nombre de récepteurs et de l'importance du glycanne, de nombreuses études restent encore à effectuer.

## CHAPITRE IV

### LES TROUBLES DU METABOLISME DU FER

Les cellules mononucléées phagocytaires contrôlent la distribution du fer plasmatique aux organes, avec la participation de la sérotransferrine et de la lactotransferrine. Dans la figure n° 18 se trouve représentée la cinétique du fer chez l'homme, dans un cas normal ainsi que dans trois cas pathologiques.

Dans un cas normal, le fer pénètre dans le macrophage puis il est transporté vers le plasma et ceci grâce aux transferrines. Seule une partie du fer reste sous forme de réserve dans le macrophage. Le fer sérique est ensuite surtout dirigé vers l'érythropoïèse, une faible quantité de fer sérique est orientée vers la réserve parenchymateuse.

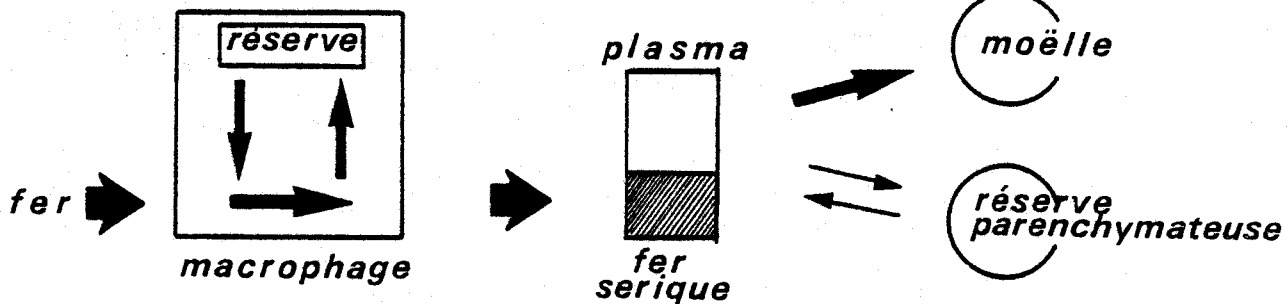
#### I - INTERVENTION DES TRANSFERRINES DANS L'INFLAMMATION

O'Shea et al (149) montrent que l'inflammation provoque une hyperactivité du système réticulo-endothélial qui se traduit par une augmentation de la destruction des globules rouges, une augmentation de l'incorporation de la sérotransferrine saturée et de sa dégradation, une augmentation du stockage du fer et un défaut de libération du fer. De plus, au cours d'une inflammation, le fer sérique diminue. Ceci est représenté sur la figure n° 18 b.

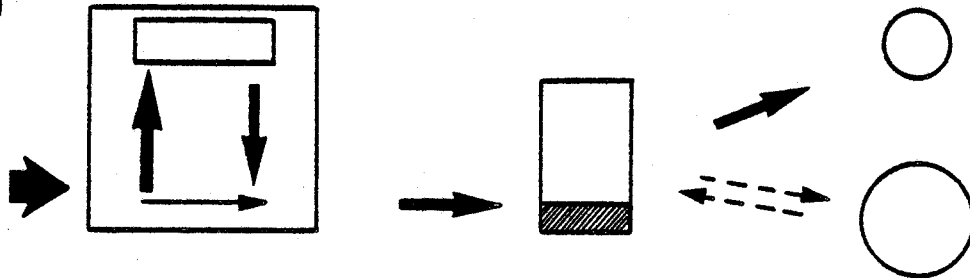
Le phénomène de l'inflammation fait intervenir, selon Van Snick et al (203) la lactotransferrine et aboutit à l'installation d'un état d'anémie ferriprive. Ce mécanisme a été détaillé au chapitre précédent.



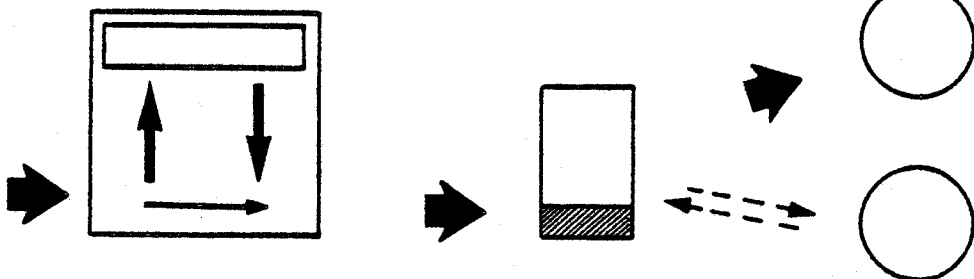
a) NORMAL



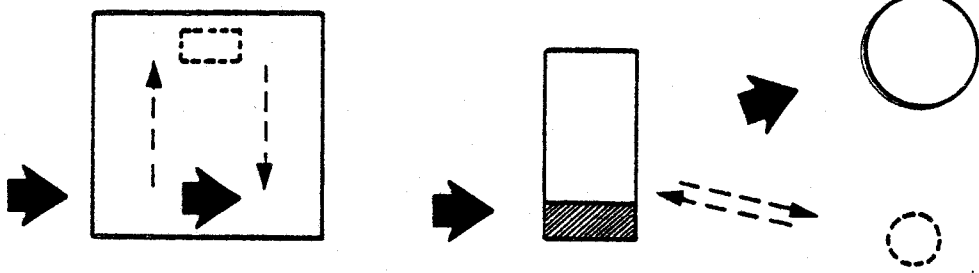
b) INFLAMMATION (début)



INFLAMMATION (état)



c) CARENCE



d) HÉMOCHROMATOSE

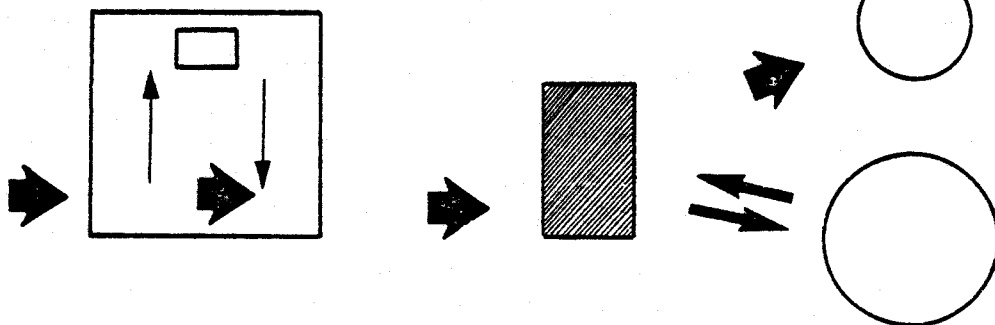


FIGURE 18 : CINÉTIQUE INTERNE DU FER CHEZ L'HOMME.  
CAS NORMAL ET PATHOLOGIQUES. ( 65 )

BUS LILLE

## II - CAS DE L'ANÉMIE

Lorsqu'un état de carence martiale s'établit, le fer de l'organisme est surtout dirigé vers l'érythropoïèse. Les réserves en fer de l'organisme sont alors mises à contribution ainsi que le montre la figure 18c. Mac Sween et al (115), Mac Donald et al (113) ont montré qu'il se produit une diminution de l'enrichissement en fer du macrophage alvéolaire de lapin, en cas d'anémie. L'avidité du macrophage pour le fer diminue.

## III - CAS DE L'HEMOCHROMATOSE

L'hémochromatose se caractérise par le dépôt d'un excès de fer dans divers organes mais surtout au niveau du foie. Il existe deux types d'hémochromatose.

### A - L'HEMOCHROMATOSE SECONDAIRE

Ce n'est pas une maladie héréditaire. Elle peut être associée à une anémie aphasique (l'excès de fer est alors surtout post-transfusionnel), à une anémie hémolytique d'origine intestinale, à une cirrhose alcoolique. Elle peut également être d'origine nutritionnelle, médicamenteuse ou métabolique.

### B - L'HEMOCHROMATOSE IDIOPATHIQUE

C'est une maladie génétique à transmission autosomique récessive. La nature précise des lésions métaboliques est inconnue, et leur expression varie d'un individu à l'autre (178).

L'hémochromatose idiopathique se caractérise par une surcharge en fer parenchymateuse liée à une augmentation du passage entéral du fer et par un défaut de stockage en fer des cellules réticulo-endothéliales de la moëlle osseuse (166). Ceci est représenté sur la figure

En vue d'éclaircir le rôle des cellules mononucléées dans le défaut du stockage du fer, Jacobs (96) a étudié l'incorporation du fer et son stockage dans le monocyte, le lymphocyte et le polymorphonucléaire du sang chez des personnes atteintes d'hémochromatose idiopathique. Les résultats obtenus ont montré que l'incorporation du fer, la synthèse de ferritine, la quantité de fer incorporée dans la ferritine ne sont pas différentes dans ces cellules de celles d'un patient normal.

Par contre, le taux de ferritine augmente dans ces trois types de cellules.

Le monocyte sanguin ne semble donc pas être défectueux au niveau de l'incorporation du fer, mais une anomalie dans la libération du fer au plasma peut exister. En effet, Fillet et al (64) montrent une libération plus rapide du fer des globules rouges par le macrophage hémochromatique. Cela pourrait expliquer l'augmentation du taux de fer sérique et du taux de saturation de la sérotransferrine. L'excès de fer sérique serait ensuite dirigé vers les cellules parenchymateuses du foie. Valberg et al (196) ont observé une augmentation du dépôt en fer dans les cellules hépatiques de patients hémochromatiques.

Une autre anomalie importante de l'hémochromatose idiopathique est l'augmentation anormale de l'incorporation du fer par le lumen gastro-intestinal (178).

Les macrophages des villosités intestinales présentent

une concentration élevée en fer (56, 41, 42, 43).  
Le fer colorable présente un aspect morphologique inhabituel.

Les macrophages sont disséminés sur toute la hauteur de la muqueuse intestinale (56), alors que, chez un sujet normal, ils se situent surtout à l'apex villositaire. Cet aspect n'est cependant pas constant. La raison de cette dispersion, de cet excès en fer reste à déterminer.

#### IV - CONCLUSION

Le métabolisme du fer est sous la dépendance de multiples facteurs, dont l'un des plus importants est l'interaction macrophage - transferrine.

Le rôle des transferrines dans le cas de l'anémie ferri-prive a été mis en évidence par Van Snick et al (202, 203, 204). Mais aucune étude n'a été entreprise pour éclaircir les relations macrophage - transferrine dans le cas de l'hémochromatose.

## CONCLUSION

La structure primaire des transferrines est désormais bien établie de même que la structure de leurs glycanes.

Des études préliminaires ont été réalisées, souvent en système hétérologue, afin de mettre en évidence l'existence de récepteurs des transferrines sur différentes cellules et en partie sur le macrophage.

Les résultats partiels obtenus par les auteurs sont néanmoins très variés. Afin d'apporter une explication à ces variations et surtout afin de préciser le rôle de la lactotransferrine dans la régulation du métabolisme du fer par le macrophage, nous avons entrepris une étude comparative de l'interaction des transferrines avec les récepteurs membranaires des macrophages et des monocytes.

TRAVAUX PERSONNELS

## CHAPITRE V

### MATERIEL ET METHODES

#### I - ISOLEMENT DES TRANSFERRINES HUMAINES

##### A - LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE

La sérotransferrine utilisée est une aposérotransferrine préparée et commercialisée par la firme Behring.

##### B - LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

La lactotransferrine humaine est isolée à partir du précipité P 7-8 obtenu par fractionnement du lait de femme selon la technique mise au point par Montreuil (134, 140). La purification du précipité P 7-8 est réalisée par chromatographie sur colonne de SP - Sephadex selon les conditions décrites par Chéron et al (45 ).

La pureté de la lactotransferrine est analysée en électrophorèse sur gel de polyacrylamide et en immuno-électrophorèse.

##### C - DESATURATION DE LA LACTOTRANSFERRINE

La lactotransferrine native est dissoute dans un tampon formiate de sodium 0,2M, phosphaté de sodium 0,2M E.D.T.A. 40 mM pH 4. La réaction est réalisée pendant 24 heures puis la solution est dialysée contre de l'eau (125)

## D - PROTEOLYSE PARTIELLE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

La lactotransferrine humaine possède un caractère basique qui peut être éliminé par une hydrolyse tryptique ménagée. L'isolement d'une lactotransferrine ayant perdu son caractère basique a été réalisé à partir de la lactotransferrine humaine diférrique selon le procédé décrit par Legrand et al (111).

## II - PRÉPARATION DES TRANSFERRINES MARQUÉES

Diverses méthodes existent pour marquer les protéines à  $^{125}\text{I}$ . La méthode la plus utilisée est la méthode à la chloramine T (92). La chloramine T en solution aqueuse libère de l'acide hypochloreux qui se comporte comme un oxydant envers  $\text{Na}^{125}\text{I}$  et permet la libération d'iode cationique qui va réagir avec les groupements électronégatifs de la protéine. Mais cette méthode possède l'inconvénient de dégrader la protéine.

Aulbert et al (10) ont montré l'existence d'une dénaturation progressive de la sérotransferrine durant le marquage radioactif en présence de chloramine T.

Nous avons donc choisi d'utiliser la méthode à l'iodogène, selon une technique décrite par la firme Pierce.

### A - MARQUAGE A L'IODOGENE

L'iodogène est un composé stable, insoluble dans l'eau, qui agit rapidement sous forme solide avec  $\text{I}^-$ . En effet, l'iodogène transforme l'iodure  $\text{I}^-$  en hypoiodite  $\text{I}^+$ . Cet ion  $\text{I}^+$  peut alors se fixer sur le résidu tyrosyl ionisé de la transferrine.

...



1 - Réactifs

- Iodogène ou 1, 3, 4, 6-tétrachloro 3a, 6a- diphenylglycoluril (Pierce) à raison de 1 mg/ml de chloroforme. Des fractions de 0,2 ml sont évaporées sous azote dans des microtubes en verre. Le réactif reste stable 1 mois.
- Les transferrines à marquer sont dissoutes à une concentration de  $1,25 \cdot 10^{-4}$  M dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,3.
- L'iodure de potassium est dissous à une concentration de  $2,6 \cdot 10^{-3}$  M. dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,3.
- $\text{Na}^{125}\text{I}$  sans entraîneur (IMS 30,  $3,7 \cdot 10^9$  Bq/ml, 100 mCi/ml Amersham).

2 - Mode opératoire

25  $\mu$  l de KI et 2  $\mu$  l  $^{125}\text{I}_2$  sont additionnés à 0,5 ml de la solution de transferrine.

Le mélange est transvasé dans le tube contenant l'iodogène et la réaction est effectuée à 4° C pendant 30 minutes.

La réaction est arrêtée par transfert du mélange dans un tube ne contenant pas d'iodogène.

3 - Purification des transferrines marquées

Les transferrines marquées sont immédiatement chromatographiées, pour éliminer l'iode radioactif libre, sur une colonne de Séphadex G 25 (1 cm x 25 cm). Le débit est de 6 ml/h et des fractions de 0,5 ml sont recueillies. La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur gamma Autologic.

## B - SATURATION EN FER DES TRANSFERRINES

### 1 - Saturation en fer des transferrines

Les apotransferrines sont dissoutes à raison de 0,5 à 20 mg/ml dans un tampon citrate - bicarbonate de sodium 0,1 M pH 8,2. Le fer est additionné sous forme de citrate ferrique préparé, selon la méthode de Azari et al (11), en dissolvant 260 mg de Fe Cl<sub>3</sub> (6 H<sub>2</sub>O) dans 100 ml de tampon citrate - bicarbonate de sodium 0,1 M pH 8,2.

La fixation des ions Fe<sup>3+</sup> est réalisée en ajoutant de 1,25 à 50 µl de la solution de citrate ferrique (60 µg Fe/100 µl) par ml de la solution d'apotransferrine. La saturation en fer s'effectue à température ambiante et est totale au bout de 3 heures.

L'élimination de l'excès de réactif est effectuée par déssalage de la transferrine sur colonne de Séphadex G 25.

### 2 - Saturation en <sup>59</sup>Fe des transferrines

Le marquage au <sup>59</sup>Fe se fait en introduisant extemporanément dans la solution de chlorure ferrique de Azari et Baugh (11), 2 p 100 de <sup>59</sup>FeCl<sub>3</sub> (HCl 0,1 N, 1 mCi/ml, 74 µg/ml, Amersham - Grande Bretagne). La quantité d' HCl additionnée est neutralisée par addition de soude 1 N.

L'excès de <sup>59</sup>Fe est éliminé par chromatographie sur colonne de Séphadex G 25.

...

C - DOUBLE MARQUAGE DES TRANSFERRINES

Les apotransferrines sont marquées avec  $^{125}\text{I}$  et déssalées sur colonne de Sephadex G 25 équilibrée dans une solution de citrate - bicarbonate. La concentration en apotransferrine est alors déterminée de façon spectrophotométrique à 280 nm et la saturation en  $^{59}\text{Fe}$  est ensuite réalisée comme décrite précédemment. La transferrine saturée en  $^{59}\text{Fe}$  est ensuite chromatographiée sur colonne de Sephadex G 25 équilibrée dans le tampon d'utilisation.

III - MATÉRIEL CELLULAIRE

A - MILIEU DE CULTURE ET TAMPONS

1 - Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est du RPMi - 1640 (Flobio). Il est complété avec 0,3 % de L - Glutamine et 25 mM Hépès. Son pH est ajusté avec HCl 1 N. à 7,2.

Selon son utilisation, il est complété avec 10 % de sérum de veau foetal.

2 - Tampon de Hank's sans calcium

a) Solution mère

NaCl	16 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ anhydre	0,096 g
KCl	0,8 g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,12 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,4 g	Glucose	2 g
Eau distillée q.s.p.	200 ml		

...

b) Solution diluée

A 50 ml de la solution-mère sont ajoutés 175 mg  $\text{NaHCO}_3$ . Cette solution est amenée à un volume final de 500 ml avec de l'eau distillée. Le pH de la solution est de 7,2.

3 - Tampon phosphate isotonique

$\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2 \text{H}_2\text{O}$	3,27 g/l
$\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12 \text{H}_2\text{O}$	32,006 g/l

Le pH de la solution obtenue est de 7,4.

B - CARACTERISATION DES CELLULES PAR LA METHODE DE MAY - GRUNWALD - GIEMSA

Cette coloration permet de déterminer la nature de la cellule observée.

Méthode

Un frottis de cellules est réalisé en déposant une goutte de suspension cellulaire sur une lame de verre préalablement lavée et séchée. Puis les cellules sont étalées avec une lamelle.

Lorsque le frottis est sec, la lame est recouverte de colorant de May - Grunwald (bleu de Méthylène Eosine) durant 3 minutes. Le colorant est ensuite dilué par addition d'eau distillée durant 3 minutes. La lame est ensuite immergée dans du colorant de Giemsa dilué au 1/30 durant 20 minutes. La lame est rincée à l'eau, décolorée par de l'alcool, à nouveau rincée à l'eau puis laissée à sécher.

L'observation de la lame se fait à l'immersion.

Cette coloration peut être effectuée sur des cellules en culture.

La formule cellulaire est déterminée par comptage de 100 cellules.

#### C - TEST DE VIABILITE AU BLEU TRYPAN

Ce test permet de déterminer la viabilité de la cellule. En effet, le Bleu Trypan (0,1 g/10 ml de NaCl 9 %) ne pénètre pas dans une cellule vivante.

Les cellules sont diluées volume à volume avec la solution de Bleu Trypan et sont incubées 10 minutes à 37 ° C.

Le pourcentage de viabilité est déterminé après observation de 100 cellules au microscope optique.

#### D - CHOIX DU MATERIEL

L'obtention de macrophages alvéolaires humains a été rendue possible grâce à la collaboration de Monsieur le Professeur Voisin et de son équipe du Service Fibroscopie de l'hôpital Calmette \*.

Les lavages broncho-alvéolaires ont été réalisés essentiellement sur des patients présentant une sarcoïdose.

La sarcoïdose est une maladie granulomateuse d'origine inconnue dont les symptômes vont de la simple fièvre à des lésions pulmonaires (71, 165). Le lavage broncho-alvéolaire est pratiqué par injection de sérum physiologique.

...

\* Nous tenons à exprimer au Professeur Voisin et à toute son équipe nos plus vifs remerciements

Les macrophages alvéolaires ainsi obtenus présentent les caractéristiques des macrophages activés, c'est-à-dire une augmentation de la régénération post-phagocytaire du récepteur Fc, une augmentation de l'activité du cycle des pentoses. En outre, l'existence d'une corrélation entre le taux de sécrétion de lysozyme par le monocyte et le taux de lysozyme sérique a été mise en évidence.

#### E - PREPARATION DES MACROPHAGES ALVEOLAIRES

La préparation des macrophages alvéolaires humains a été effectuée dans le laboratoire du Professeur Voisin et sous la direction de Mademoiselle Aertz\*.

Les cellules obtenues à partir d'un lavage broncho-alvéolaire sont centrifugées à 800 g. durant 10 minutes. Les culots cellulaires sont rassemblés et ajustés à un volume final de 10 ml avec du tampon Hank's.

Une numération cellulaire, un test de viabilité au Bleu Trypan sont réalisés. Une formule cellulaire est ensuite effectuée au microscope en contraste de phase ou après coloration au Giemsa - May - Grunwald.

Les cellules sont ensuite mises en culture en boîte de Nunc - Delta, 24 cupules de 2 cm<sup>2</sup> (Polylabo) dans du milieu de culture RPMI - 1640 complété avec 10% de sérum de veau foetal, 0,3 % de L - Glutamine, 25 mM d'Hépès. Le pH est ajusté à 7,2 par de l'acide chlorhydrique 1 N. La densité de mise en culture est de  $2,5 \cdot 10^5$  cellules /cm<sup>2</sup>.

Les cellules sont incubées durant deux heures à 37° C dans une atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Puis le milieu de culture est changé, permettant ainsi l'élimination des lymphocytes. Le milieu est remplacé par du milieu frais.

...

\* Nous remercions Mademoiselle Aertz pour ses conseils judicieux, ainsi que toute son équipe

F - ISOLEMENT DE MONOCYTES DE SANG HUMAIN \*

La méthode utilisée est celle décrite par Boyum ( 32 ) et modifiée par De Boer et al (55 ).

L'isolement des monocytes doit être effectué dans les deux heures qui suivent le prélèvement. La manipulation est décrite dans la légende de la figure n°19.

Le sang est recueilli sur citrate de sodium puis il est centrifugé à 3 300 g, pendant 20 minutes à 20°C. Après centrifugation, le plasma est éliminé et les culots cellulaires sont rassemblés. Les cellules sont diluées volume à volume avec du tampon P.B.S. stérile ph 7,4.

Ensuite, 16 ml de cette suspension sont déposés sur 8 ml de Lymphoprep de densité 1,077 (Pharmacia) et centrifugés à 400 g pendant 30 minutes à 20°C.

Après la centrifugation, différentes fractions sont obtenues ; la fraction supérieure contient les plaquettes ; l'anneau blanc situé à l'interface contient les lymphocytes et les monocytes, et enfin le culot des cellules rouges et des polynucléaires.

L'anneau blanc, contenant les monocytes, est récupéré. Les cellules sont alors lavées trois fois dans du tampon P.B.S. stérile à basse vitesse, ceci afin d'éliminer les plaquettes. Les cellules sont ensuite ajustées à un volume de 10 ml avec du RPMI - 1640, complété avec 10 % de sérum de veau foetal, 0,3 % de L - glutamine, 25 mM Hépès et ajusté à pH 7,2 avec de l'acide chlorhydrique 1 N. Les cellules sont comptées puis mises en culture à raison de  $10^6$  cellules sous 0,5 ml. Au temps 2 heures, le milieu est éliminé ainsi que les lymphocytes et les cellules non-adhérentes.

\* Nous remercions le Centre Régional de Transfusion Sanguine pour les prélèvements de sang humain.

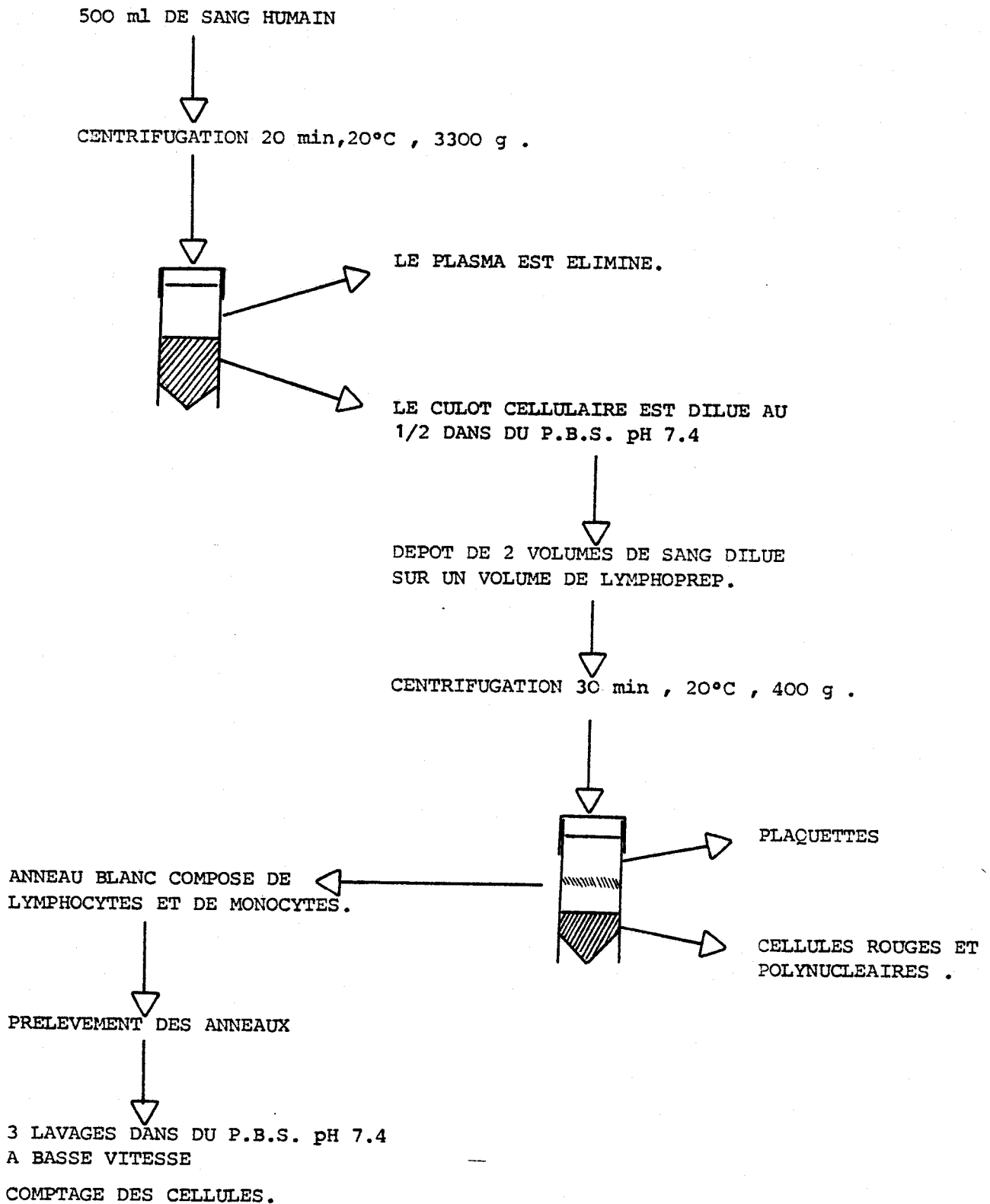


FIGURE 19 : ISOLEMENT DES MONOCYTES DU SANG HUMAIN , SELON (32) .



#### IV - ÉTUDE DES INTERACTIONS TRANSFERRINES - CELLULES CIBLES

##### A - ETUDE DE LA FIXATION DES TRANSFERRINES SUR LES CELLULES CIBLES

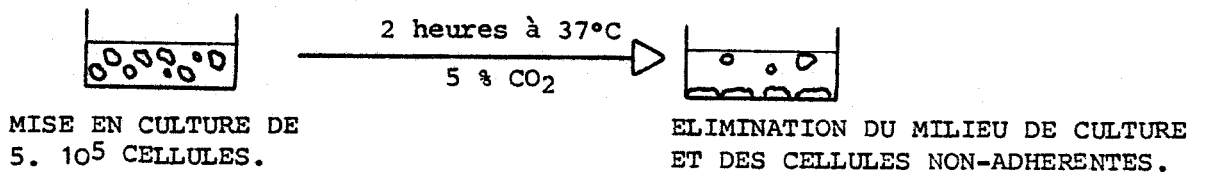
Les manipulations de fixation des transferrines sur les récepteurs membranaires spécifiques ont été réalisées à la fois sur le macrophage alvéolaire et sur le monocyte sanguin. Le protocole suivi est identique pour ces deux types de cellules et est représenté dans la figure n°20. Les cellules en culture sont pré-incubées deux heures dans du milieu RPMI - 1640 sans sérum de veau foétal. Ceci afin d'éliminer la sérotransferrine qui existe dans le milieu de culture lors de l'addition de 10 % de sérum de veau foetal. Cette incubation s'effectue à 37°C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>.

Les boîtes de culture (Nunc - Delta - 24 cupules) sont mises ensuite à 4°C ou à la température de la glace fondante. Le milieu de culture présent dans les puits de culture est éliminé à l'aide d'une pipette.

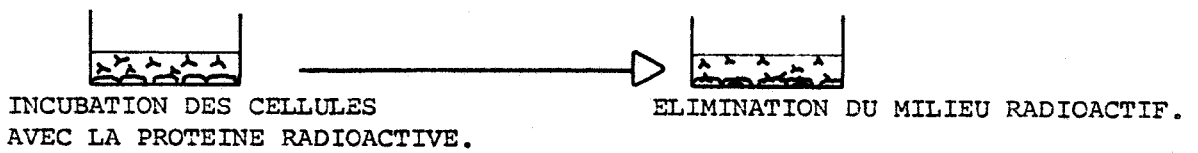
Les transferrines marquées à <sup>125</sup>I sont diluées dans du milieu de culture RPMI - 1640 complété avec 0,3 % de L - glutamine, 25 mM Hépes dont le ph est ajusté à 7 - 7,2. Les concentrations en transferrines vont de 3,75. 10<sup>-8</sup> M à 8,3. 10<sup>-6</sup> M. Le volume de réaction est de 0,3 ml. Les incubations sont effectuées durant deux heures à 4°C, à raison de deux puits par concentration. Pour chaque concentration, une estimation de la fixation non-spécifique est réalisée en ajoutant 100 fois en excès de la transferrine non radio-active. Un aliquote du surnageant de chaque puits est prélevé afin de déterminer la quantité de transferrine libre.

La réaction est arrêtée par élimination du milieu de culture radioactif puis les cellules sont lavées trois fois avec du tampon Hank's complété avec 2 mM CaCl<sub>2</sub>.

1ère ETAPE



2ème ETAPE



3ème ETAPE

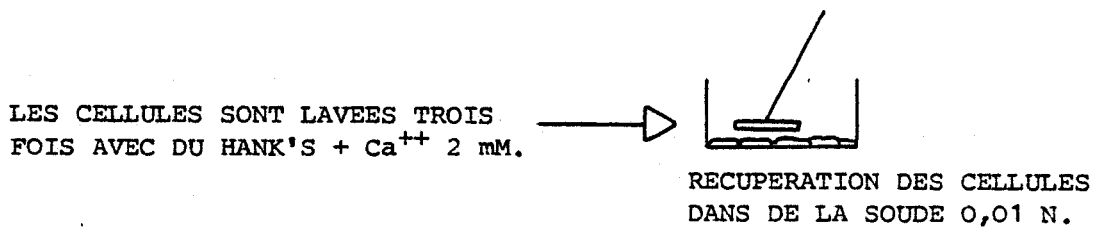


FIGURE 20 : PROCESSUS DE LA FIXATION DES PROTEINES RADIOACTIVES SUR LES MACROPHAGES EN CULTURE.



Les cellules sont ensuite récupérées à l'aide d'un grattoir dans 0,2 ml de soude 0,01 N et réparties dans les tubes à hémolyse pour le comptage au compteur Gamma.

#### B - CINETIQUE DE FIXATION DES TRANSFERRINES

Les cellules sont préparées de façon identique à celle décrite précédemment.

La concentration en transferrine est constante.

Les incubations sont réalisées à 4°C ou à 37°C pour des temps variant de 0 à 2 heures et parfois de 0 à 24 heures, en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>.

Comme précédemment les cellules sont lavées et récupérées. La radioactivité de la transferrine fixée sur les cellules est déterminée.

#### C - REACTION DE COMPETITION DE FIXATION DES TRANSFERRINES SUR LES CELLULES CIBLES

Les cellules sont préparées comme décrit au premier paragraphe.

Une quantité définie de transferrine radioactive est ajoutée aux cellules sous un volume de 0,1 ml. Puis des concentrations croissantes de compétiteur, de  $0,2 \cdot 10^{-6}$  à  $10 \cdot 10^{-6}$  M, sont ajoutées sous un volume de 0,2 ml. Le temps d'incubation est de deux heures à 4° C.

Les cellules sont ensuite lavées et récupérées comme précédemment.

La radioactivité de la transferrine fixée aux cellules est déterminée à l'aide d'un compteur gamma Autologic.

D - EXPRESSION DES RESULTATS

Après détermination des quantités de transferrine libre et fixée et après soustraction de la quantité de transferrine fixée de façon non spécifique sur les cellules, les résultats sont exprimés d'une part en mole de transferrine fixée en fonction de la concentration de transferrine ajoutée et d'autre part selon la technique de Scatchard (168).

La technique de Scatchard est une représentation qui fait apparaître l'existence d'une ou plusieurs catégories de site de fixation d'un ligand sur une protéine. Ici le complexe est formé par la protéine et le récepteur cellulaire.

Si l'on considère une protéine P à une concentration initiale (Po) à laquelle peut se lier un ligand L à la concentration (Lo), si (PL) est celle du complexe PL, à l'équilibre :

$$P + L \rightleftharpoons PL$$

$$\frac{(P) \cdot (L)}{(PL)} = K_1 \text{ où } (P) = (Po) - (PL)$$

$K_1$  est une constante de dissociation ( $M. l^{-1}$ ).

Si P possède n sites de liaison pour L, on peut écrire n constantes d'équilibre  $K_1, \dots, K_n$ . Si chaque site est indépendant et équivalent et qu'il n'existe aucune interaction entre eux, on peut dire que  $K_1 = nK$  où K est la constante intrinsèque pour chaque site.

D'où :

$$K_i = \frac{n - i + 1}{i} K$$

si :

$$B = \frac{(PL)}{Po}$$

on obtient :

$$K_{Ass} = \frac{(PL)}{(nPo - PL) \cdot (L)} \text{ soit } K_A (nPo - PL) = \frac{(PL)}{(L)}$$

d'où :

$$K_A (n - B) = \frac{B}{(L)}$$

...

En représentant  $B/(L)$  en fonction de  $B$ , on obtient une droite dont l'intersection avec l'ordonnée fournit  $nK_A$  et celle avec l'axe des abscisses donne  $n$  qui est le nombre maximum de sites de liaison et dont la pente est égale à  $-K_A$ .

RESULTATS

CHAPITRE VI  
MISE AU POINT DU SYSTEME D'ETUDE  
DE L'INTERACTION DES TRANSFERRINES  
AVEC LES MACROPHAGES

I - ISOLEMENT DES TRANSFERRINES HUMAINES

A - OBTENTION DE LA LACTOTRANSFERRINE

La lactotransferrine, isolée de lait humain, s'est révélée pure et répond aux critères de pureté en électrophorèse sur gel de polyacrylamide et l'immuno-électrophorèse en présence d'un immun-sérum de lapin anti-protéines du lactosérum humain.

B - PROTEOLYSE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

La protéolyse partielle de la lactotransferrine permet d'obtenir trois fragments dont les proportions sont les suivantes : 20 % de moitié N-terminale, 33 % d'un fragment correspondant à la moitié C-terminale et 43 % de la lactotransferrine modifiée.

Le comportement électrophorétique et chromatographique de la lactotransferrine modifiée est différent de celui de la lactotransferrine initiale. En électrophorèse, la lactotransferrine modifiée migre moins vers l'anode et lors de la chromatographie sur colonne de SP - Sephadex, elle n'est plus retenue.

La détermination de la séquence N-terminale de cette lactotransferrine modifiée montre l'absence des trois premiers acides aminés : Gly - Arg - Arg.

Les différences de comportement sont donc liées à la perte de son caractère basique, ceci étant en relation avec la basicité des 3 acides aminés éliminés.

### C - MARQUAGE RADIOACTIF DES TRANSFERRINES

Le marquage à l'iodogène permet d'obtenir de fortes radioactivités spécifiques et évite le contact entre la protéine et les réactifs oxydants généralement utilisés pour le marquage à l' $^{125}\text{I}$ .

Les rendements de marquage sont de l'ordre de 85 %.

La protéine marquée à l' $^{125}\text{I}$  est conservée 15 jours. Au-delà, une dénaturation apparaît et est visible sur gel de polyacrylamide.

## II - OBTENTION DES MACROPHAGES ALVÉOLAIRES

Les lavages effectués sur des patients témoins présentent un très faible pourcentage de lymphocytes.

Par contre, les lavages broncho-alvéolaires de patients atteints de sarcoïdose se caractérisent par un pourcentage très élevé de lymphocytes. Le pourcentage en lymphocytes varie de 7 à 40 %.

Le tableau n° III<sub>f</sub> donne les résultats moyens des formules cellulaires effectuées sur les lavages broncho-alvéolaires.

Nous constatons que la viabilité des cellules est bonne et est de l'ordre de 90 %

...



TABLEAU III : COMPOSITION DES LAVAGES BRONCHO-ALVEOLAIRES.

ORIGINE	NUMERATION DES CELLULES.	POURCENTAGE DE MACROPHAGES.	POURCENTAGE DE LYMPHOCYTES.	POURCENTAGE DE VIABILITE DES MACROPHAGES.
SARCOIDOSE : (n > 30)				
FUMEURS	40. 10 <sup>6</sup>	72,4	27,1	88,6
NON FUMEURS	23.10 <sup>6</sup>	77	22,1	91
TEMOIN : (n= 5)				
FUMEURS	43. 10 <sup>6</sup>	97	3	92

915  
LITE

### III - MISE AU POINT DU SYSTÈME PERMETTANT L'ÉTUDE DE L'INTERACTION DES TRANSFERRINES AVEC LES MACROPHAGES

Des études préalables ont montré que certaines molécules, telles l'insuline (51), la sérotransferrine (155) se fixent sur les cellules-cibles mais aussi sur les supports utilisés au cours de l'expérimentation, tels que les filtres Millipore et le polypropylène.

Lors de l'expérimentation, la méthodologie oblige à mesurer le taux de transferrine fixée sur la cellule. L'utilisation de cellules en culture rend nécessaire la solubilisation des cellules à l'aide de soude 1 N ou 0,1 N.

Nous savons que la sérotransferrine se fixe au plastique (155), de même que la lactotransferrine. Or, il est également connu que la lactotransferrine peut s'associer avec de nombreux constituants parmi lesquels la sérum albumine bovine (86).

Dans la plupart des études sur les interactions transferrines - cellules cibles, les auteurs travaillent en présence de 1 à 3 % de sérum albumine bovine, ceci afin de diminuer la fixation non spécifique.

Nous avons donc entrepris de voir quelle est l'importance de la fixation des transferrines au plastique ou plus exactement l'importance de la libération de la transferrine liée au plastique et l'interférence de ce phénomène en présence de sérum albumine bovine. En effet, ces deux facteurs nous semblent être des causes d'erreur dans l'interprétation des résultats.

#### A - FIXATION DES TRANSFERRINES SUR LE PLASTIQUE DES BOITES DE CULTURE NUNC EN PRESENCE OU EN ABSENCE DE 1 % DE SERUM ALBUMINE BOVINE

Dans l'étude de la fixation des transferrines sur le plastique, nous avons mené ces expériences de manière comparative en absence ou en présence de 1 % de sérum albumine bovine.

## 1 - Matériel et méthode

La concentration en sérotransferrine varie de  $0,5 \cdot 10^{-6}$  M à  $2 \cdot 10^{-6}$  M.

La concentration en lactotransferrine varie de  $0,09 \cdot 10^{-6}$  M à  $0,2 \cdot 10^{-6}$  M.

Le temps d'incubation est de 1 heure à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le milieu radioactif est éliminé et de la soude 1 N est ajoutée durant une nuit.

## 2 - Résultats

### a) La sérotransferrine

Le pourcentage de sérotransferrine libérée du plastique par la soude 1 N est de 0,27 en présence de sérum albumine bovine et de 0,75 en absence de sérum albumine.

Nous constatons que la quantité de sérotransferrine libérée diminue en présence de sérum albumine.

### b) La lactotransferrine

La quantité de lactotransferrine libérée du plastique par la soude 1 N est doublée en présence de sérum albumine. La figure n° 21 A montre que la courbe de fixation de la lactotransferrine, en absence de sérum albumine, sur le plastique atteint un niveau de saturation pour une concentration de  $0,2 \cdot 10^{-6}$  M.

Nous avons donc déterminé, pour ce système lactotransferrine-plastique, un nombre de "sites" de fixation de la lactotransferrine selon la méthode de Scatchard (figure n° 21 B) :  $0,54 \cdot 10^{12}$  molécules de lactotransferrine se fixent sur une surface de  $30 \text{ mm}^2$  avec une constante d'affinité de  $0,25 \cdot 10^{11} \text{ M} \cdot \text{l}^{-1}$ .

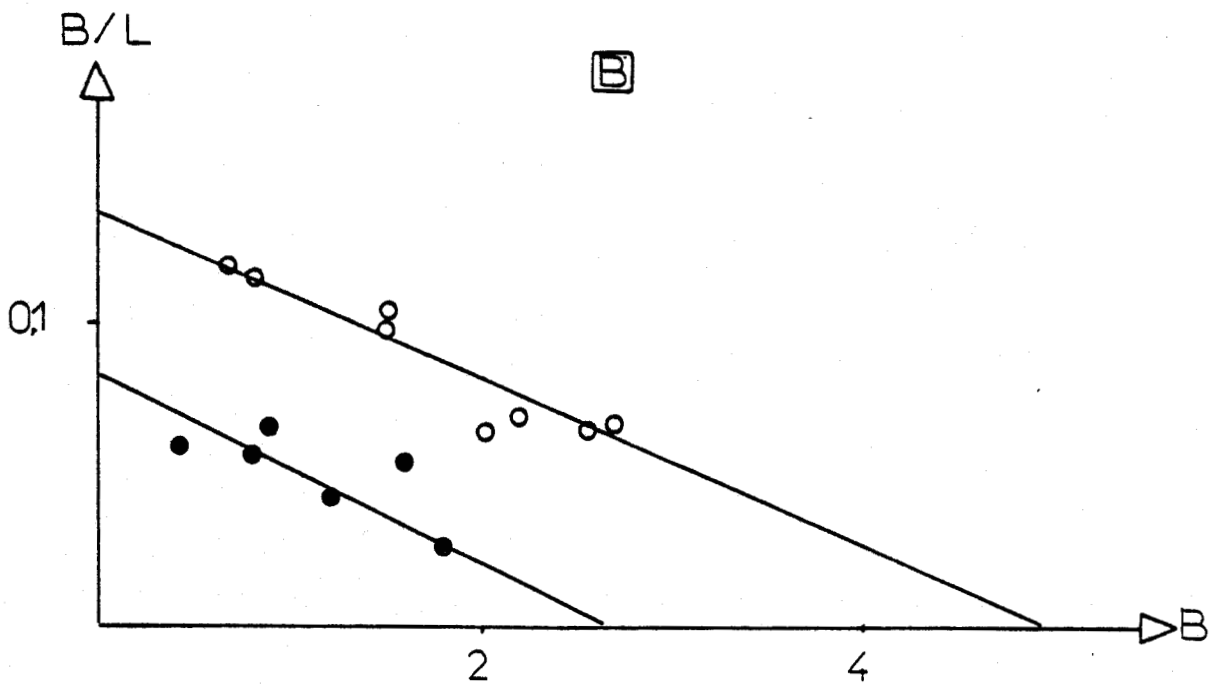
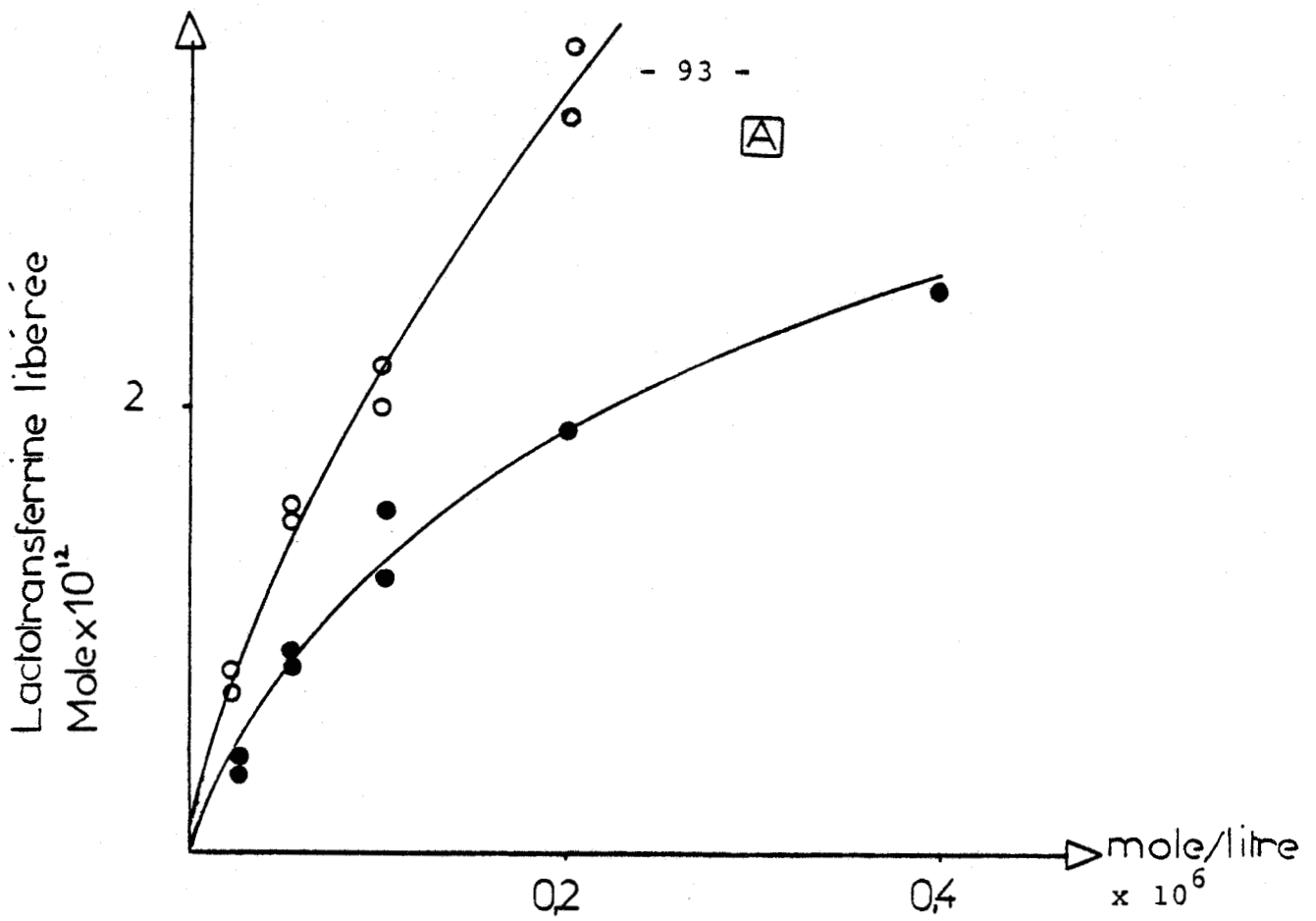


FIGURE 21 : INFLUENCE DE LA SERUM ALBUMINE BOVINE SUR LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR UN SUPPORT PLASTIQUE.

A ● : Lactotransferrine      ○ : Lactotransferrine en présence  
en présence de 1% de sérum  
albumine.

B : Représentation de Scatchard.



En présence de 1 % de sérum albumine bovine, la quantité de lactotransferrine libérée est multipliée par un facteur 2,6.

Le nombre de "sites" est alors de  $1,3 \cdot 10^{12}$  molécules de lactotransferrine pour  $30 \text{ mm}^2$  et la constante d'affinité est de  $0,18 \cdot 10^{11} \text{ M.l}^{-1}$ .

### 3 - Discussion

La sérotransferrine se fixe au plastique et est libérée en présence de soude 1 N. La présence de 1 % de sérum albumine bovine diminue la quantité de sérotransferrine libérée. La lactotransferrine possède la capacité de se fixer sur le plastique. Cette fixation est doublée en présence de sérum albumine bovine à la concentration de 1 %. Par contre, la constante d'affinité pour le plastique reste identique.

Pour minimiser au maximum les causes d'erreur au cours de nos expériences, nous avons donc choisi de travailler en absence de sérum albumine bovine lors de l'utilisation de la lactotransferrine. En effet, lors de l'utilisation de cellules-cibles en culture, les cellules ne sont pas confluentes et par conséquent la lactotransferrine se fixe à la fois sur les cellules et le plastique, gênant ainsi l'interprétation des résultats.

Ne pouvant éviter la fixation de la lactotransferrine sur les puits de culture, nous avons essayé de voir si une modification ne pouvait pas être apportée dans la technique de solubilisation des cellules, afin de minimiser la libération de la lactotransferrine à partir du plastique.

### B - INFLUENCE DE LA TECHNIQUE DE SOLUBILISATION

Nous avons utilisé de la soude à des concentrations de 1 N ; 0,1 N ; 0,01 N du triton X-100 à 1 %.

## 1 - Matériel et méthode

La concentration en sérotransferrine est de  $0,5 \cdot 10^{-6}$  M et celle en lactotransferrine est de  $0,2 \cdot 10^{-6}$  M. La solubilisation est effectuée à température ambiante durant deux heures.

## 2 - Résultats

### a) La sérotransferrine

Sur le tableau n° IV page 96 , nous voyons que la quantité de sérotransferrine varie d'un facteur 3 en absence de sérum albumine bovine lorsque de la soude 0,01 N ou 1 N est utilisée.

Par contre, en présence de sérum albumine bovine, la quantité de sérotransferrine libérée ne varie pas quelle que soit la méthode utilisée.

### b) La lactotransferrine

Les résultats obtenus, représentés sur le tableau n° V page 97 , mettent en évidence une forte variation dans la quantité de lactotransferrine libérée selon la technique utilisée.

Dans tous les cas, la présence de 1 % de sérum albumine bovine augmente la libération de lactotransferrine. L'utilisation de soude 0,01 N diminue d'un facteur 10 la libération de lactotransferrine.

## 3 - Discussion

La technique de solubilisation joue un rôle important dans la libération de la lactotransferrine à partir du plastique. Ce n'est pas le cas pour la sérotransferrine.

TABLEAU IV : POURCENTAGE DE SEROTRANSFERRINE , LIEE AU PLASTIQUE , ET LIBEREE PAR DIVERSES TECHNIQUES DE SOLUBILISATION.

La concentration de la sérotransferrine utilisée est de  $0,5 \cdot 10^{-6}$  M/L.

TECHNIQUES DE SOLUBILISATION	SEROTRANSFERRINE	SEROTRANSFERRINE + 1% S.A.B
NaOH 0.01 N	0.2	0.2
NaOH 0.1N	0.35	0.22
NaOH 1N	0.75	0.27



TABLEAU V : POURCENTAGE DE LACTOTRANSFERRINE ,LIEE AU PLASTIQUE,  
LIBEREE PAR DIVERSES TECHNIQUES DE SOLUBILISATION.

La concentration de la lactotransferrine utilisée  
est de  $0.2 \cdot 10^6 \text{M/L}$  .

TECHNIQUE DE SOLUBILISATION	LACTOTRANSFERRINE	LACTOTRANSFERRINE + 1% S.A.B.
NaOH 0.01 N	0.44	1.2
NaOH 0.1 N	2.7	5.5
NaOH 1 N	4	5.5
Triton X-100 1%	3	6





C - CONCLUSION

La libération des transferrines en présence ou en absence de 1 % de sérum albumine bovine peut paraître faible en quantité, mais il faut savoir que cette libération n'est pas négligeable. En effet, dans le système transferrine - macrophage, le taux de fixation des transferrines sur les cellules - cibles varie de 1 à 3 %. Nous avons donc essayé de minimiser les causes d'erreur engendrées par la méthodologie. Lors de l'utilisation de sérotransferrine, nous travaillerons en présence de sérum albumine. Nous n'en utiliserons pas en présence de lactotransferrine. Comme technique de solubilisation des cellules, nous avons opté pour la soude 0,01 N et un décrochage mécanique des cellules.

## CHAPITRE VII

### ETUDE DE LA FIXATION DES TRANSFERRINES SUR LES MACROPHAGES

Dans le chapitre des généralités, nous avons vu que les transferrines, sérotransferrine et lactotransferrine, sont des glycoprotéines dont les rôles biologiques sont variés. Leur interaction avec les cellules mononucléées phagocytaires est essentielle dans le métabolisme du fer.

Ainsi, des études (143) ont mis en évidence l'apport de fer par la sérotransferrine au macrophage et la prise de fer par l'aposérotransferrine. Selon Nishisato et al (143), ce mécanisme met en jeu deux récepteurs membranaires différents.

La lactotransferrine interviendrait également dans le métabolisme du fer, essentiellement dans les cas d'infection. Ainsi, Van Snick et al (204) ont montré qu'il existe un récepteur membranaire de la lactotransferrine sur le macrophage. Les études ont été effectuées, pour la plupart, en système hétérologue et la mise en évidence du récepteur paraît certaine. Au laboratoire, nous avons entrepris de poursuivre ces études en analysant d'une manière comparative la fixation de la sérotransferrine et de la lactotransferrine sur les macrophages.

Afin de mieux comprendre leur rôle respectif et de reconstituer au mieux le système physiologique, nous avons choisi de travailler en système homologue.

# I - DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES DE FIXATION DES TRANSFERRINES SUR LES MACROPHAGES

## A - INTERACTION DE LA SÉROTRANSFERRINE HUMAINE AVEC LE MACROPHAGE ALVEOLAIRE HUMAIN

### 1 - Matériel et méthode

Nous avons travaillé dans les conditions décrites p 82 avec une concentration en sérotransferrine de 0,036 à  $0,6 \cdot 10^{-6}$  M pour la sérotransferrine saturée et de 0,08 à  $0,4 \cdot 10^{-6}$  M pour l'aposérotransferrine. Les cellules utilisées sont des macrophages alvéolaires humains ou des monocytes ( $1,5$  à  $4 \cdot 10^5$  cellules).

L'incubation est réalisée à 4°C durant deux heures.

### 2 - Résultats

Les résultats obtenus sont exprimés dans les figures n° 22 et 23.

#### a) L'aposérotransferrine

L'aposérotransferrine se fixe à la fois sur le macrophage alvéolaire et sur le monocyte.

Cette fixation est saturable et atteint un plateau à la concentration de  $0,2 \cdot 10^{-6}$  M.

Les résultats obtenus sont exprimés selon la méthode de Scatchard sur la figure n° 22 et permettent de conclure à l'existence d'une seule classe de sites indépendants à haute affinité. Le nombre de sites est de 80 000 par macrophage et la constante d'affinité est de  $16 \cdot 10^6$  l.M<sup>-1</sup>.

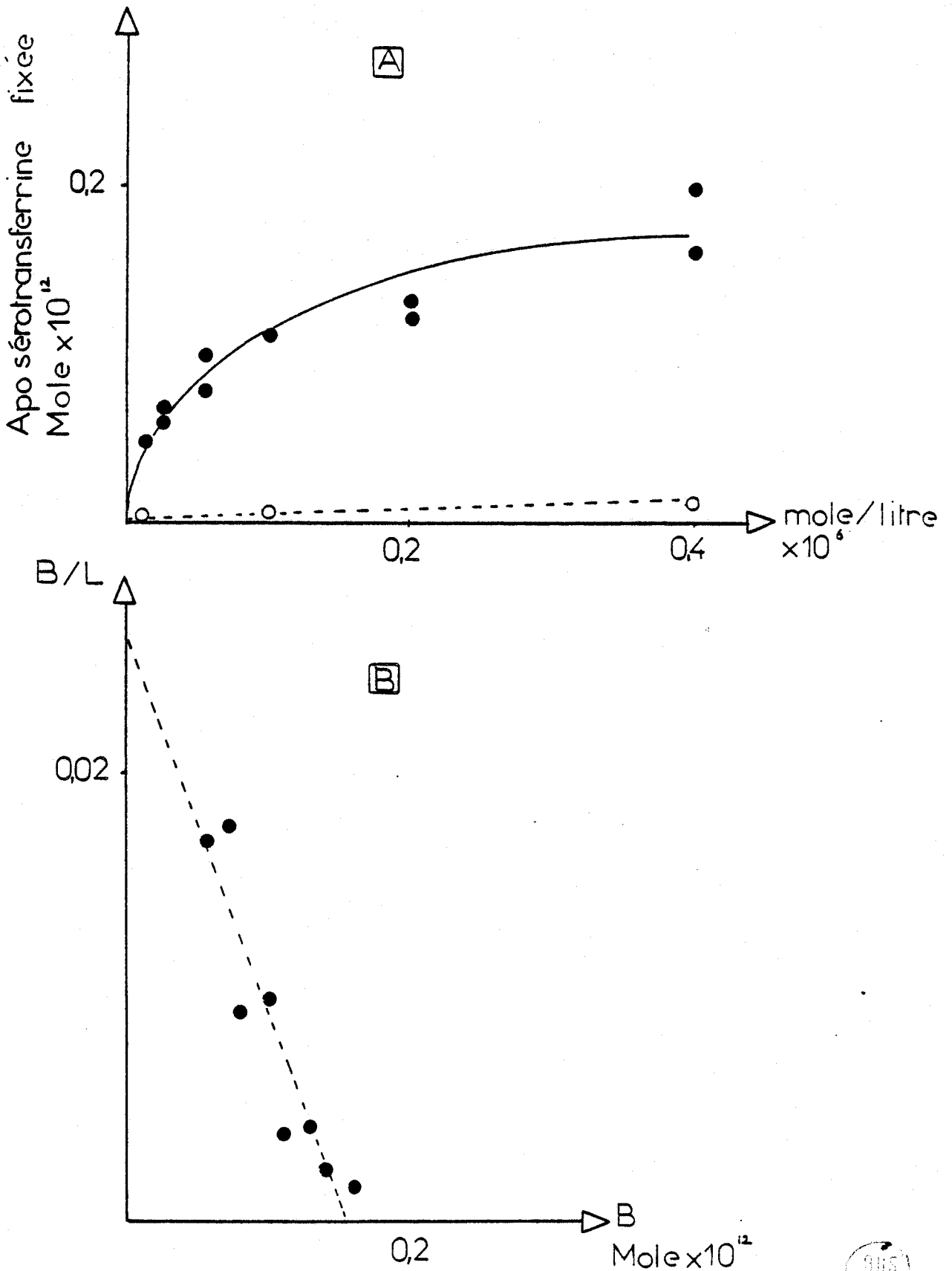


FIGURE 22 : FIXATION DE L'APOSERORANSFERRINE HUMAINE SUR LES MACROPHAGES ALVEOLAIRES HUMAINS

A : Effet de la concentration en aposérotransferrine  
● : fixation spécifique, ○ : fixation non spécifique  
B : Représentation de Scatchard.



Le nombre de sites déterminé sur le monocyte est inférieur ( $n = 40\ 000$ ) mais la constante d'affinité est identique (figure n° 24).

b) La sérotransferrine saturée

La sérotransferrine saturée se fixe également sur le macrophage alvéolaire et sur le monocyte. Cette fixation est dépendante de la concentration en sérotransferrine saturée et elle est saturable (figure n° 23).

Le nombre de sites est de 40 à 50 000 par macrophage alvéolaire et la constante d'affinité est de  $20 \cdot 10^6 \text{ l.M}^{-1}$ .

Les paramètres obtenus sur le monocyte sont identiques (figure n° 24).

3 - Discussion

La sérotransferrine saturée ou non se fixe sur le macrophage alvéolaire et sur le monocyte.

Le nombre de sites pour l'aposérotransferrine est supérieur à celui de la sérotransferrine saturée sur le macrophage alvéolaire.

Ceci semble indiquer que la sérotransferrine possède une plus grande aptitude à prendre le fer du macrophage. Par contre, le rôle de la sérotransferrine dans l'apport de fer au macrophage semble moins important.

Nos résultats sont en accord, quant au nombre de sites, avec ceux obtenus précédemment par Nishisato et al (143)

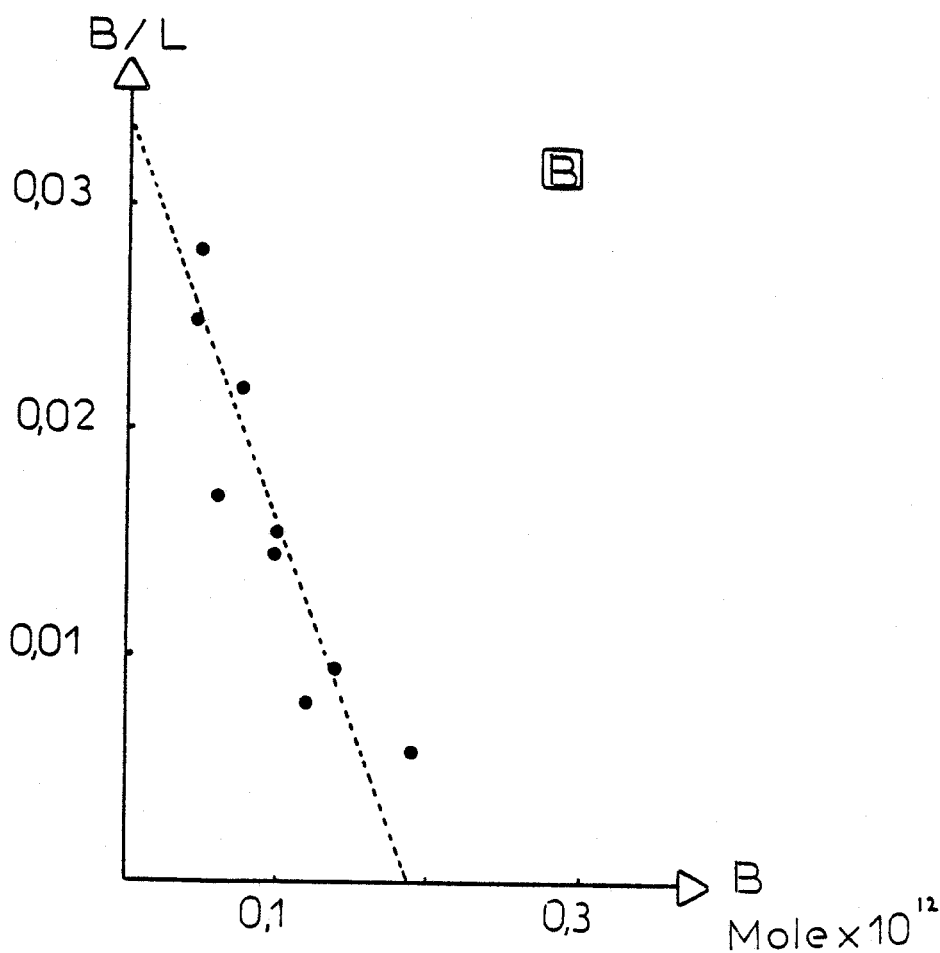
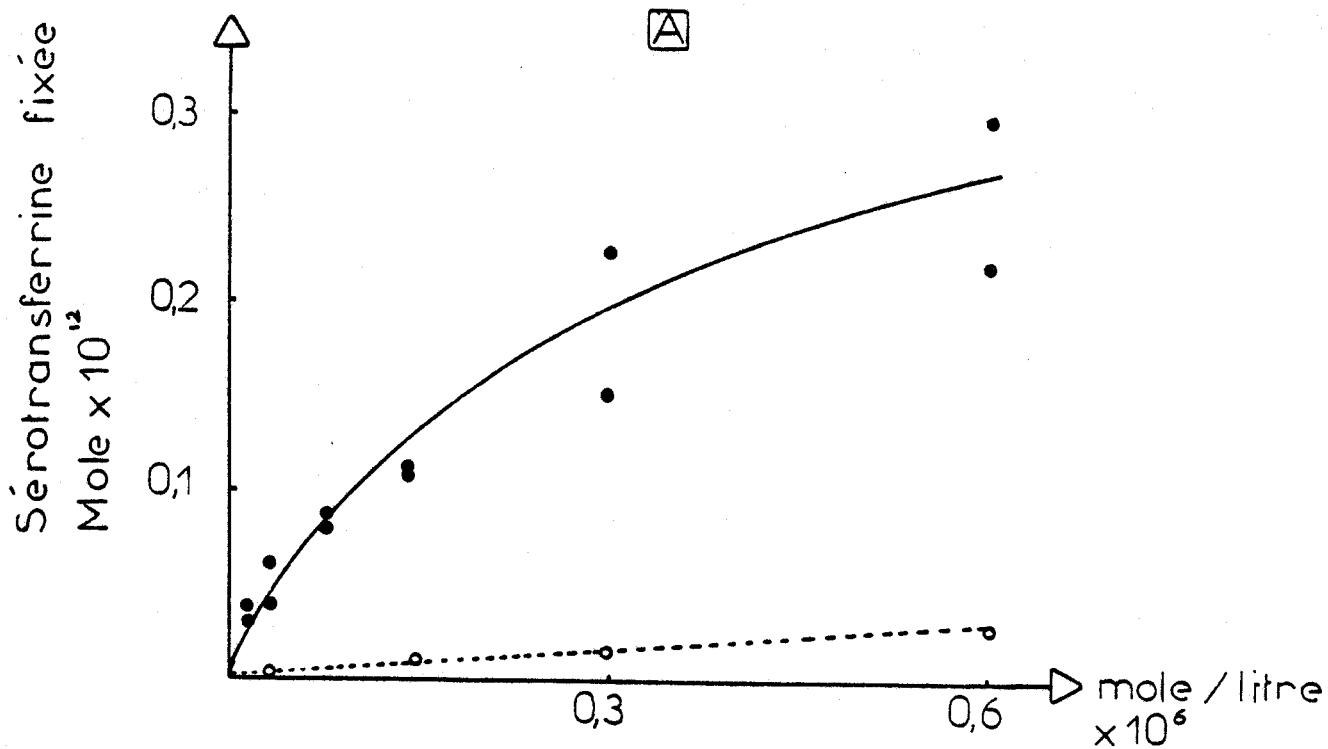


FIGURE 23 : FIXATION DE LA SEROTRANSFERRINE SATURÉE EN FER SUR LES MACROPHAGES ALVEOLAIRES HUMAINS

A : Effet de la concentration en sérotransferrine saturée sur la fixation sur les cellules. ● : fixation spécifique , ○ : fixation non spécifique.  
B : Représentation de Scatchard.



sur le macrophage péritonéal de rat et la sérotransferrine de rat.

Par contre, la constante d'affinité que nous obtenons est 10 fois supérieure à celle obtenue en système homologue chez le rat.

## B - FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LES MACROPHAGES

### 1 - Matériel et méthodes

L'interaction de la lactotransferrine avec les macrophages a été effectuée dans les conditions décrites au chapitre V.

La concentration en lactotransferrine varie de 0,08 à  $8,2 \cdot 10^{-6}$  M. Le temps d'incubation est de deux heures à 4°C en présence de 4 à  $5 \times 10^5$  cellules.

### 2 - Résultats

#### a) L'apolactotransferrine

Les résultats obtenus sont donnés dans la figure n° 25 page 106.

L'examen des courbes ne permet pas de mettre en évidence une différence dans la fixation de l'apolactotransferrine sur le macrophage alvéolaire ou sur le monocyte.

La courbe de fixation atteint un niveau de saturation à la concentration de  $4,1 \times 10^{-6}$  M.

Cette saturation suggère l'existence d'un nombre limité de récepteurs.

Selon la méthode de Scatchard, il existe  $10 \times 10^6$  sites sur le macrophage alvéolaire et la constante d'affinité est de 5 à  $10 \times 10^6$  l.M<sup>-1</sup>.



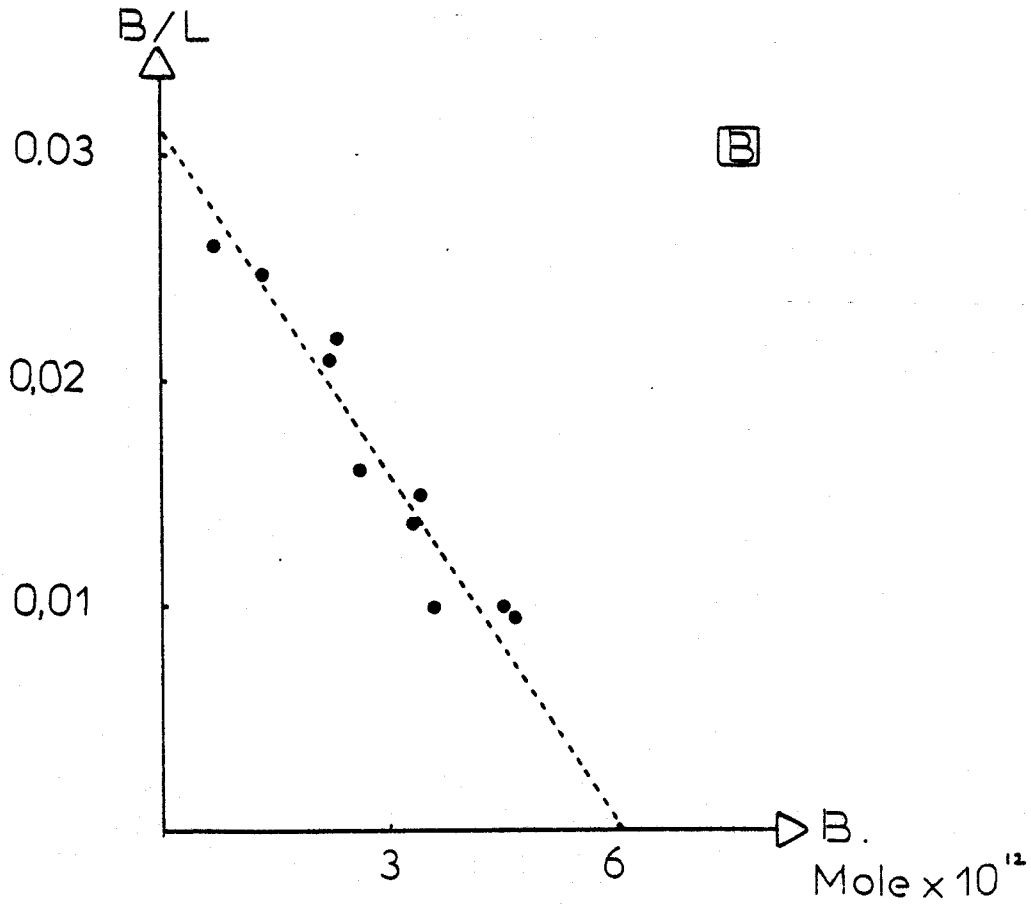
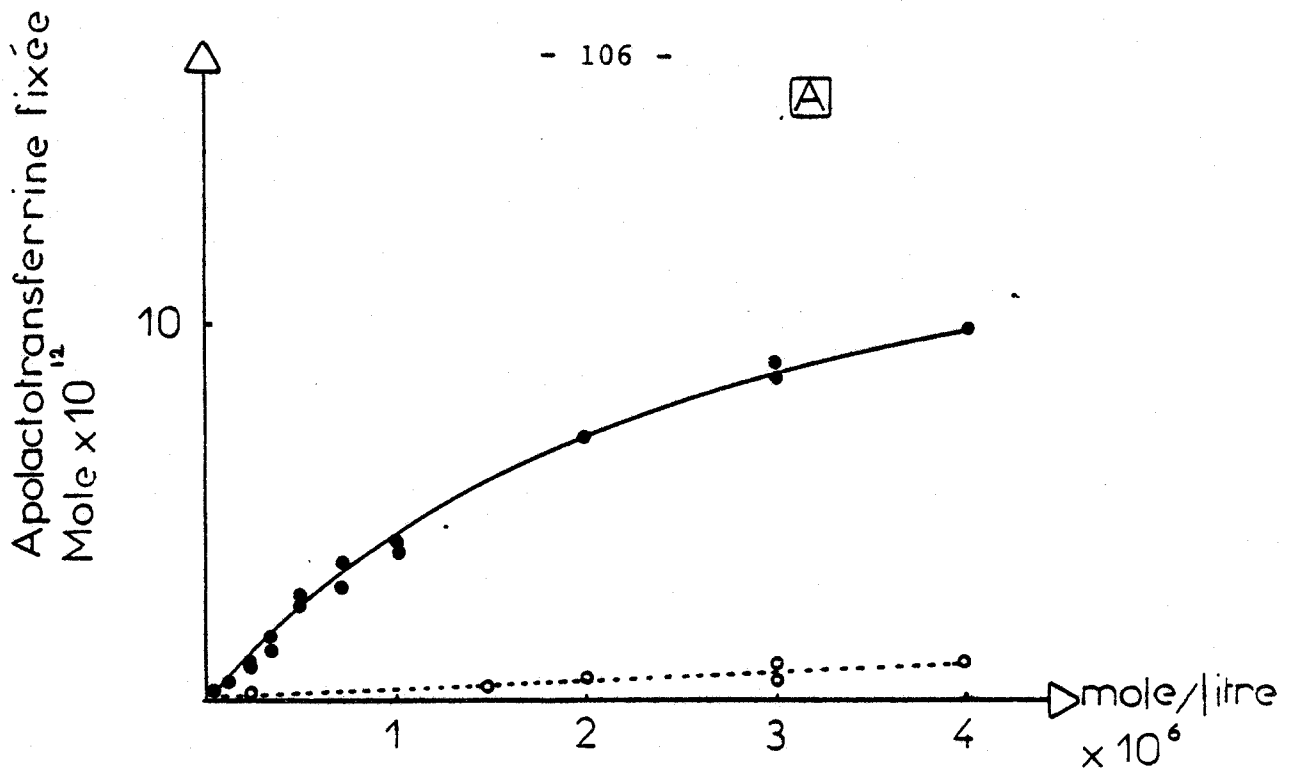


FIGURE 25 : FIXATION DE L' APOLACTOTRANSFERRINE HUMAINE SUR LES MACROPHAGES ALVEOLAIRES HUMAINS

A : Effet de la concentration en apolactotransferrine sur la fixation sur les cellules . ● : fixation spécifique , ○ : fixation non-spécifique.  
B : Représentation de Scatchard.



Le nombre de sites sur le monocyte est identique, la constante d'affinité est de  $2 \cdot 10^6 \text{ l.M}^{-1}$  (figure n° 27).

b) La lactotransferrine saturée

La figure n° 26 page 108 représente les résultats obtenus.

Le macrophage alvéolaire témoin et le monocyte présentent les mêmes caractéristiques : le nombre de sites est de  $12 \cdot 10^6$  par cellule et la constante d'affinité est de  $2 \cdot 10^6 \text{ l. M}^{-1}$ .

Le macrophage alvéolaire de sarcoïdose présente un nombre de sites inférieur qui est de  $6 \cdot 10^6$  sites par cellule. La constante d'affinité reste identique à celle du macrophage alvéolaire témoin.

3 - Discussion

Ces études montrent qu'il existe sur le macrophage humain un ou deux types de récepteurs reconnaissant la lactotransferrine, qu'elle soit sous forme saturée ou désaturée.

Selon Van Snick et al (203), la fixation de la lactotransferrine saturée est inhibée à 32 % par l'apolactotransferrine tandis que l'apolactotransferrine est inhibée à 75 % par la lactotransferrine saturée. Ces faits laissent penser que la lactotransferrine saturée ou non reconnaît un seul récepteur.

Toutes les études publiées sur la fixation de la lactotransferrine sur le macrophage font apparaître un nombre de récepteurs plus élevés. Ainsi Van Snick et al (203) caractérisent  $22 \cdot 10^6$  sites par cellule (système hétérologue), Bennet et al (22) trouvent  $200 \cdot 10^6$  sites par macrophage (système homologue) et Campbell (39) dénombre

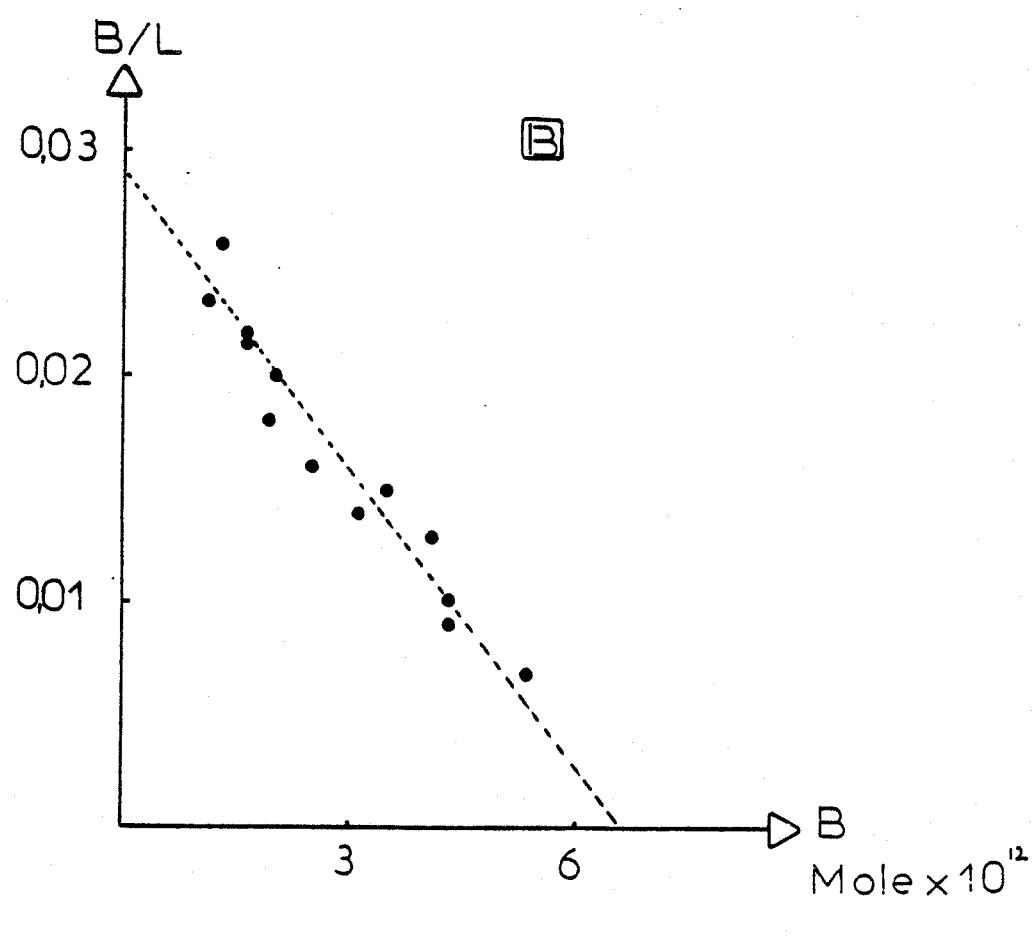
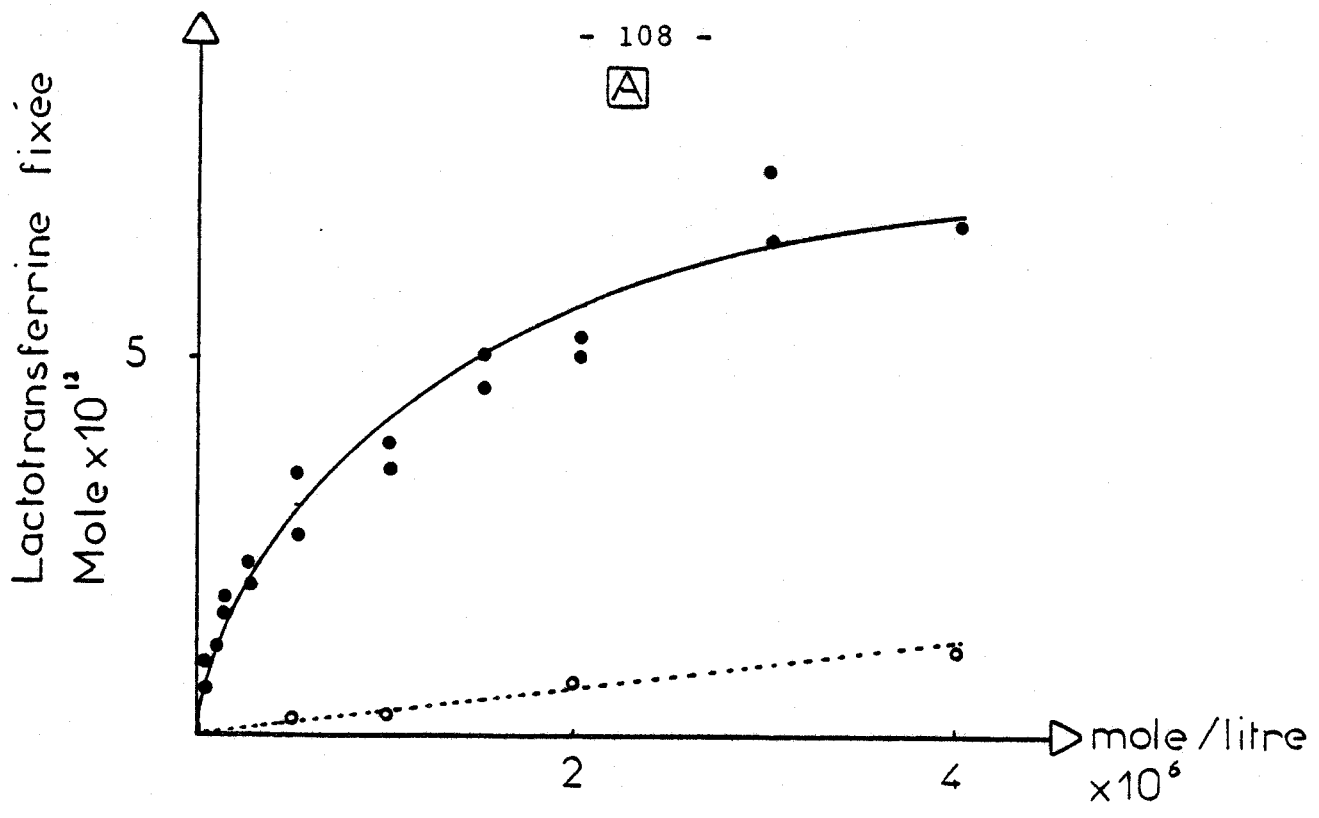


FIGURE 26 : FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE SATURÉE EN FER SUR LES MACROPHAGES ALVEOLAIRES HUMAINS

A : Effet de la concentration en lactotransferrine saturée sur la fixation sur les cellules. ● : fixation spécifique , ○ : fixation non spécifique.  
B : Représentation de Scatchard.

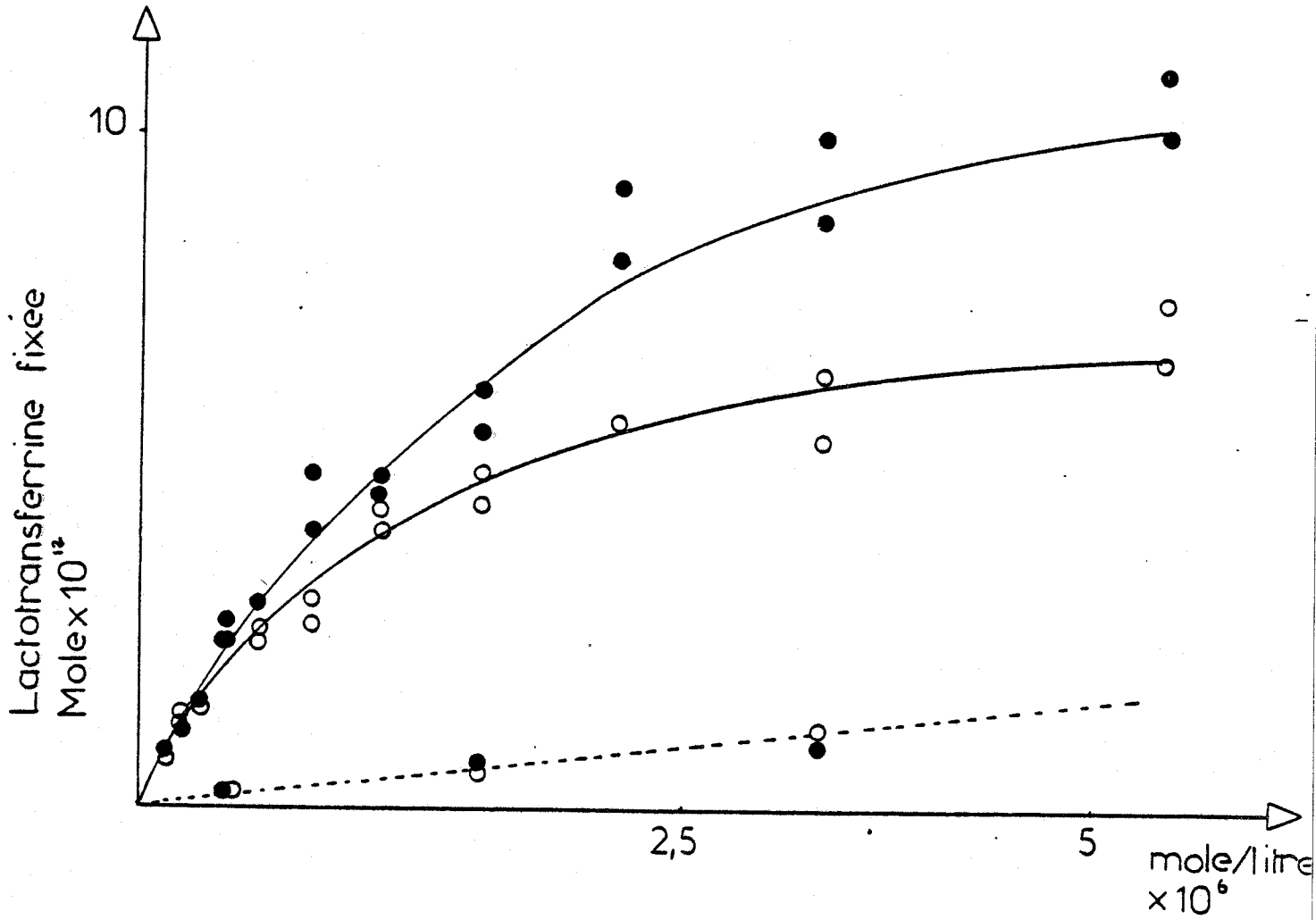


FIGURE 27 : FIXATION DE L'APOLACTOTRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANSFERRINE SATURÉE EN FER SUR LES MONOCYTES HUMAINS.

- Apolactotransferrine: — fixation spécifique  
--- fixation non spécifique
- Lactotransferrine saturée : — fixation spécifique  
--- fixation non spécifique



$54.10^6$  sites par macrophage alvéolaire (système homologue) et plus récemment Birgens et al (27) caractérisent  $1,6.10^6$  sites par monocyte. Il faut toutefois noter que tous ces auteurs ont utilisé de la sérum albumine bovine à raison de 1 à 2,5 % dans leur milieu d'incubation. Or, la sérum albumine fixe, comme nous l'avons vu précédemment, la lactotransferrine. Ceci introduit donc une sur-estimation du nombre de récepteurs de la lactotransferrine. Au cours de nos expériences, nous n'avons pas utilisé de sérum albumine. Seuls Birgens et al (27) trouvent un nombre de récepteurs inférieur au nôtre.

La constante d'association que nous avons établie ( $K_A = 2.10^6$ ) est légèrement supérieure à celles publiées auparavant, surtout dans le cas de la lactotransferrine saturée ( $K_A = 0,6.10^6 \text{ l. M}^{-1}$ ).

### C - CONCLUSION

Le macrophage et le monocyte reconnaissent la sérotransferrine et la lactotransferrine. Cette reconnaissance semble s'effectuer par l'intermédiaire de récepteurs.

Le nombre de sites de la lactotransferrine est environ 150 fois supérieur à celui de la sérotransferrine, par contre la constante d'affinité de la lactotransferrine est inférieure à celle de la sérotransferrine.

## II - ÉTUDE DES FACTEURS QUI INFLUENCENT LA FIXATION DES TRANSFERRINES SUR LE MACROPHAGE

### A - LA SEROTRANSFERRINE

Nous allons successivement étudier le comportement de la

sérotransferrine en cinétique avec variation de la température et la réversibilité de sa fixation.

1 - Cinétique de fixation en fonction de la température

a) Matériel et méthodes

L'expérimentation suivie est celle décrite page 84. Les incubations sont effectuées à 4°C ou à 37°C. La concentration en sérotransferrine est de 0,1. 10<sup>-6</sup> M pour 1,5.10<sup>5</sup> cellules en culture.

b) Résultats

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure n° 28.

La fixation de la sérotransferrine est linéaire durant les quinze premières minutes, puis atteint un plateau aux temps de 15 à 30 minutes.

Les courbes de fixation de la sérotransferrine atteignent un plateau à 4°C comme à 37°C.

Les macrophages fixent 40 à 50 % de sérotransferrine en plus lorsque la température s'élève de 4°C à 37°C.

c) Discussion

La différence de fixation observée à ces deux températures peut refléter une différence de fluidité de la membrane. A 4°C, la membrane plasmique du macrophage est immobile et seul un nombre limité de récepteurs est accessible au ligand extra-cellulaire. A 37°C, les récepteurs ont une plus grande

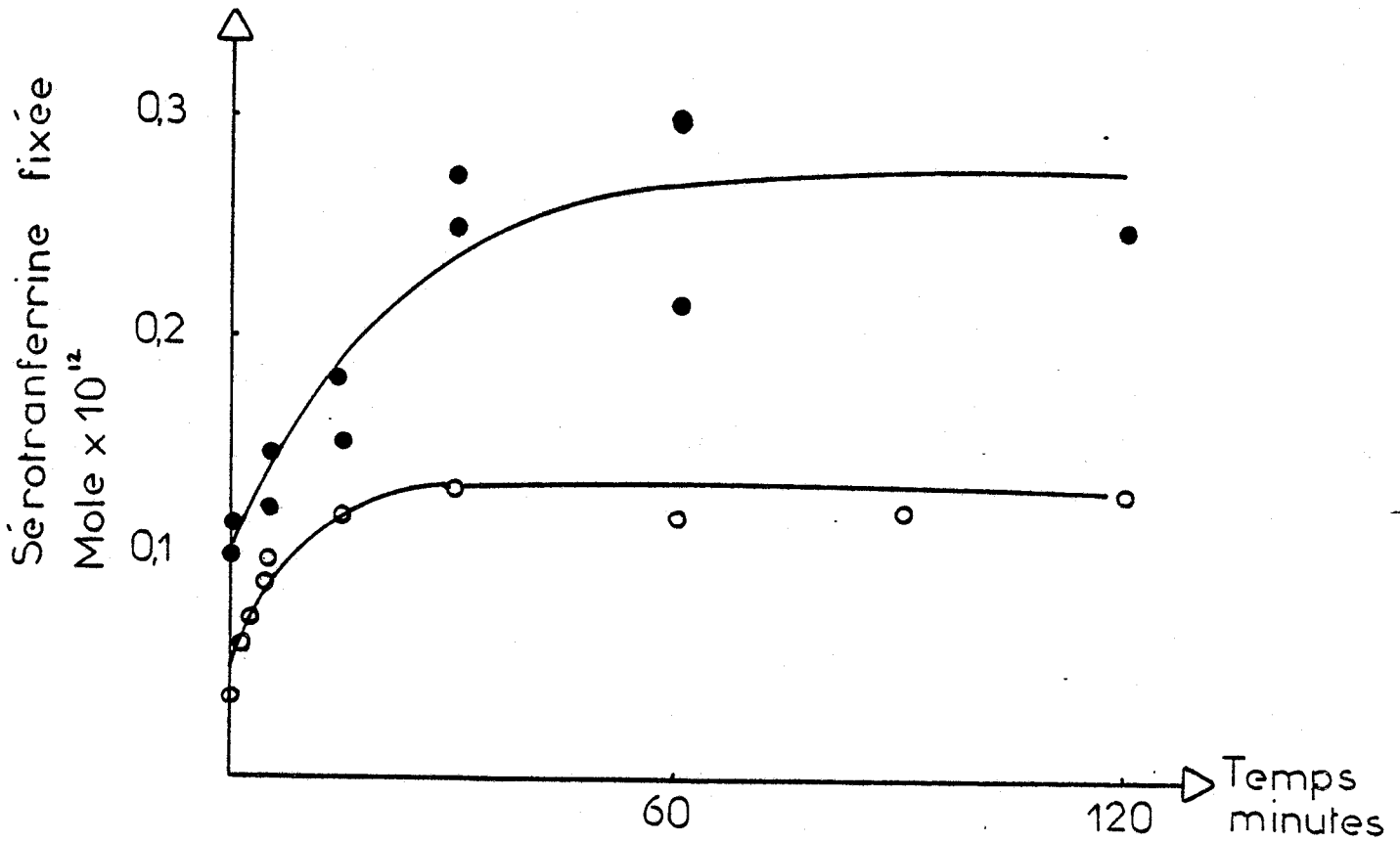


FIGURE 28 : CINÉTIQUE DE FIXATION DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE SUR LES MACROPHAGES ALVEOLAIRES HUMAINS EN FONCTION DE LA TEMPERATURE.

- : Cinétique réalisée à 4°C
- : Cinétique réalisée à 37°C.



mobilité et deviennent ainsi plus accessibles au ligand extra-cellulaire. Ces phénomènes sont en relation avec les phénomènes d'endocytose et de fluidité des membranes.

2 - Réversibilité de la fixation de la sérotransferrine sur le macrophage alvéolaire

a) Matériel et méthode

Pour démontrer que la fixation de la sérotransferrine est réversible, nous avons utilisé la technique décrite page 84.

La concentration en sérotransferrine radioactive est de  $0,1 \cdot 10^{-6}$  M. La sérotransferrine froide utilisée comme compétiteur a une concentration de  $0,2 \cdot 10^{-6}$  M à  $2 \cdot 10^{-6}$  M. Le volume réactif final est de 0,3 ml.

b) Résultats

Sur la figure n° 29 page 114, nous constatons que la fixation de la sérotransferrine saturée en fer est réversible par addition de sérotransferrine saturée en fer froide. Le phénomène observé est identique dans le cas de l'aposérotransferrine (fig. n° 30). Les concentrations nécessaires pour obtenir une inhibition de 40 % sont de  $0,3 \cdot 10^{-6}$  M pour la sérotransferrine saturée en fer et de  $0,5 \cdot 10^{-6}$  M pour l'aposérotransferrine.

De plus, l'aposérotransferrine ne déplace pas la sérotransferrine saturée en fer. L'inverse est également vrai.

c) Discussion

La fixation de la sérotransferrine saturée en fer sur le macrophage est réversible, de même celle de



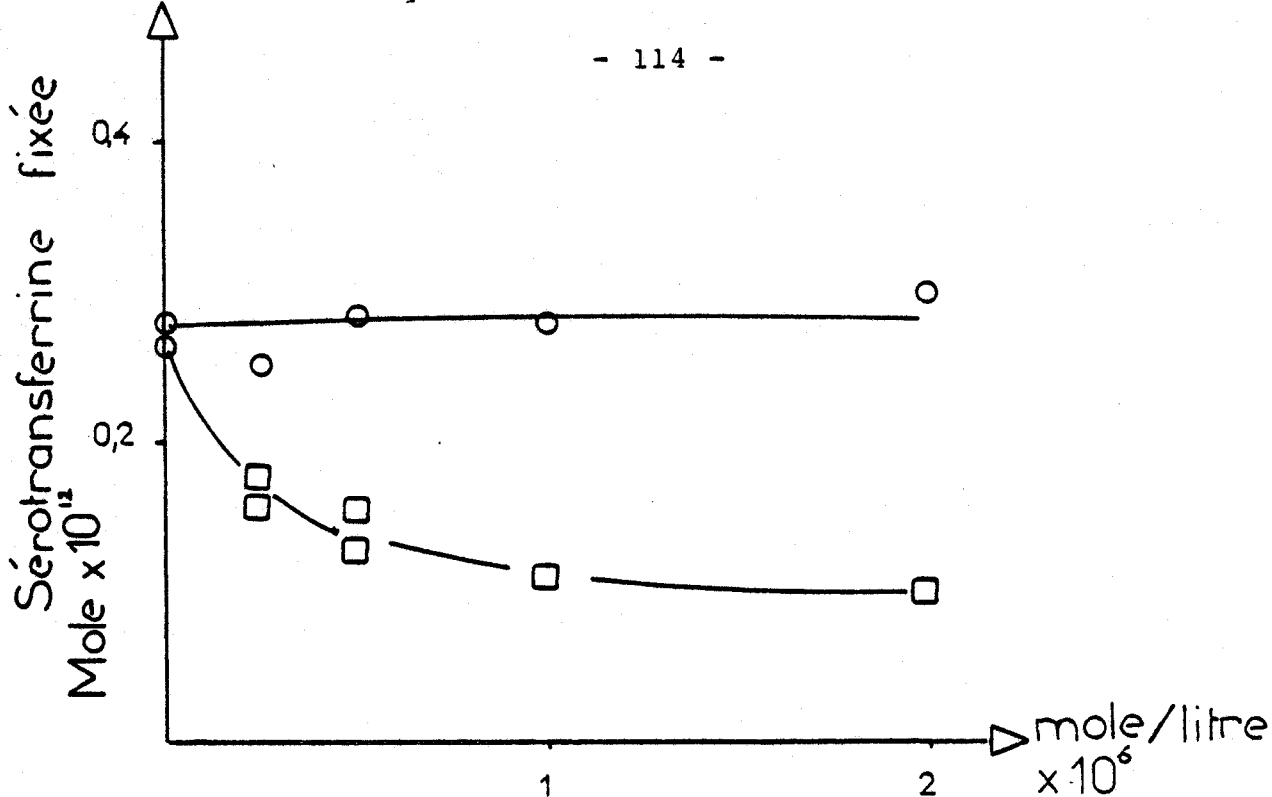


FIGURE 29 : COMPETITION DE LA FIXATION DE LA SEROTRANSFERRINE SATURÉE PAR DE L'APOSEROTRANSFERRINE ET DE LA SEROTRANSFERRINE SATURÉE.

□ Sérotransferrine saturée    ○ Apo sérotransferrine.

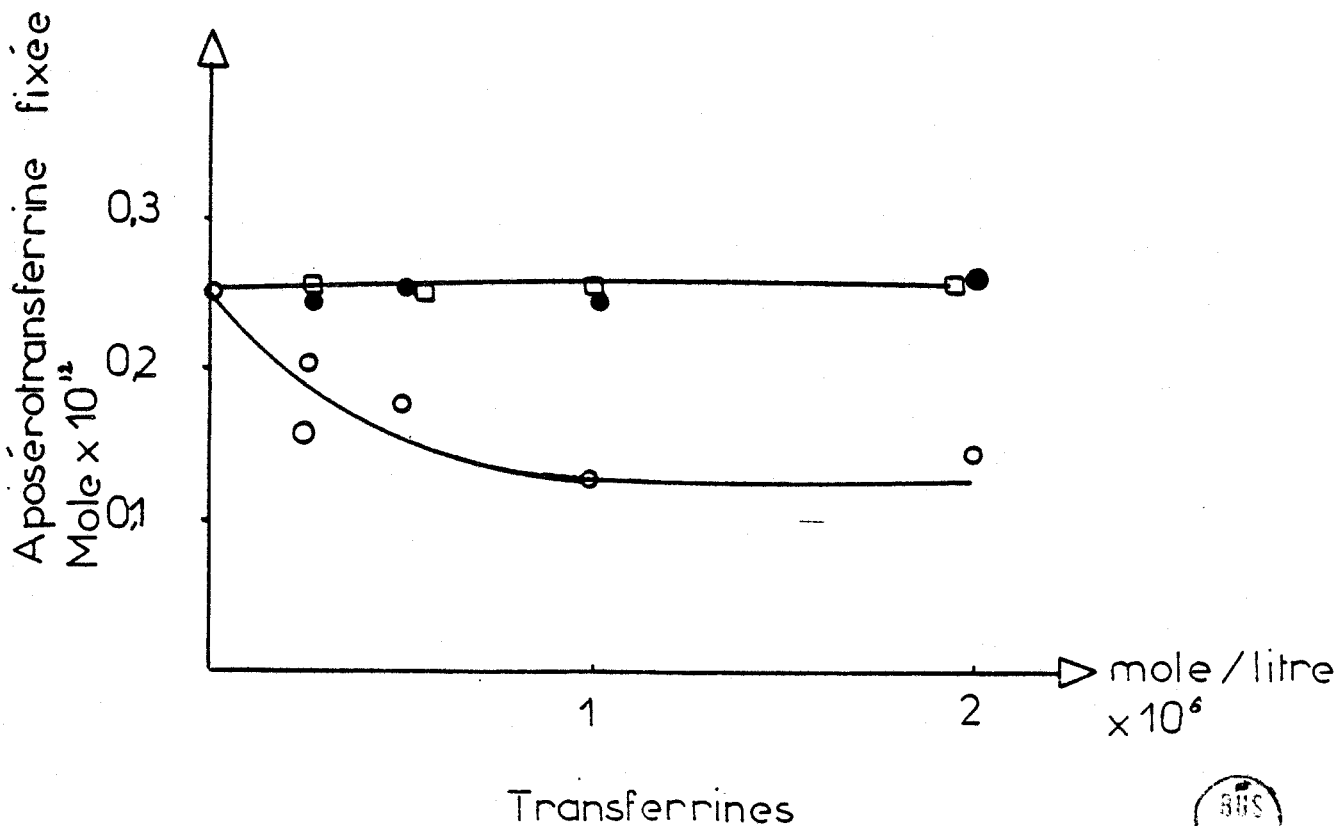


FIGURE 30 : COMPETITION DE LA FIXATION DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE SUR LE MACROPHAGE ALVEOLAIRE HUMAIN PAR DE LA SEROTRANSFERRINE ET PAR DE LA LACTOTRANSFERRINE.

○ Aposérotransferrine    ● Sérotransferrine saturée  
 □ Lactoferrine saturée



l'aposérotransferrine. Par contre, l'aposérotransferrine ne peut pas déplacer la sérotransferrine saturée en fer. Ceci laisse prévoir l'existence de deux sites de reconnaissance des sérotransferrines différents sur le macrophage alvéolaire.

## B - LA LACTOTRANSFERRINE

### 1 - Cinétique de fixation de la lactotransferrine en fonction de la température

#### a) Matériel et méthode

La fixation de la lactotransferrine à une concentration de  $0,8 \cdot 10^{-6}$  M est suivie par incubation à 4°C ou à 37°C.

#### b) Résultats

La figure n° 31 page 116 montre les résultats obtenus. La lactotransferrine se fixe sur le macrophage alvéolaire selon un phénomène saturable à 4°C et à 37°C. Le plateau est atteint dans les deux cas après une heure d'incubation.

La fixation à 4°C est inférieure de 40 % à la fixation à 37°C.

#### c) Discussion

Nous avons choisi de travailler à 4°C lors de l'étude de la fixation des transferrines sur le macrophage alvéolaire et à 37°C lors des études sur le passage du fer des transferrines dans les macrophages.

### 2 - Compétition de la fixation de la lactotransferrine sur le macrophage alvéolaire par de la lactotransferrine

Cette expérience a pour but de montrer la réversibilité de la fixation de la lactotransferrine sur le macrophage alvéolaire.

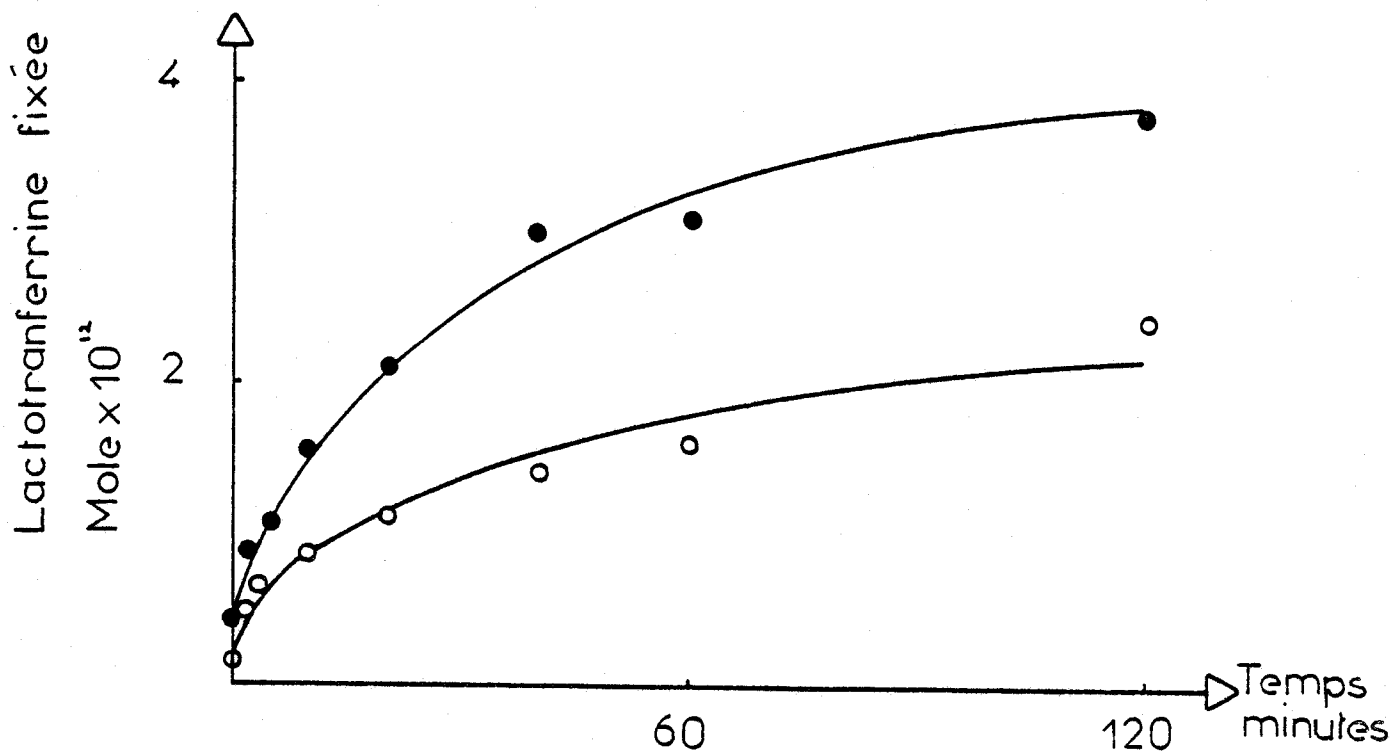


FIGURE 31 : CINÉTIQUE DE FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE SUR LES MACROPHAGES ALVEOLAIRES HUMAINS EN FONCTION DE LA TEMPERATURE.

○ : Cinétique réalisée à 4°C

● : Cinétique réalisée à 37°C.



a) Matériel et méthode

Cette expérience est réalisée suivant le protocole décrit dans le chapitre n° V.

La concentration en lactotransferrine radioactive est de  $0,9 \cdot 10^{-6}$  M. La concentration en lactotransferrine froide varie de  $0,2 \cdot 10^{-6}$  M à  $8 \cdot 10^{-6}$  M. L'incubation est réalisée à 4°C durant une heure.

b) Résultats

La fixation de la lactotransferrine est inhibée par des doses croissantes de lactotransferrine saturée en fer ou d'apolactotransferrine. L'inhibition est de 50 % pour une concentration en apolactotransferrine de  $3 \cdot 10^{-6}$  M et pour une concentration en lactotransferrine saturée de  $2,9 \times 10^{-6}$  M.

Les résultats obtenus sont exprimés dans la figure n° 32.

c) Discussion

La réversibilité de la fixation de la lactotransferrine sur le macrophage alvéolaire est désormais bien établie. De plus, cette expérience permet de montrer que les deux formes de lactotransferrine se fixent sur le même récepteur puisque l'apolactotransferrine et la lactotransferrine saturée inhibent toutes deux la fixation de la lactotransferrine saturée.

3 - Expérience de chasse

La fixation de la lactotransferrine sur le macrophage alvéolaire humain est suivie en cinétique par addition de lactotransferrine non radioactive à une concentration dix fois supérieure.

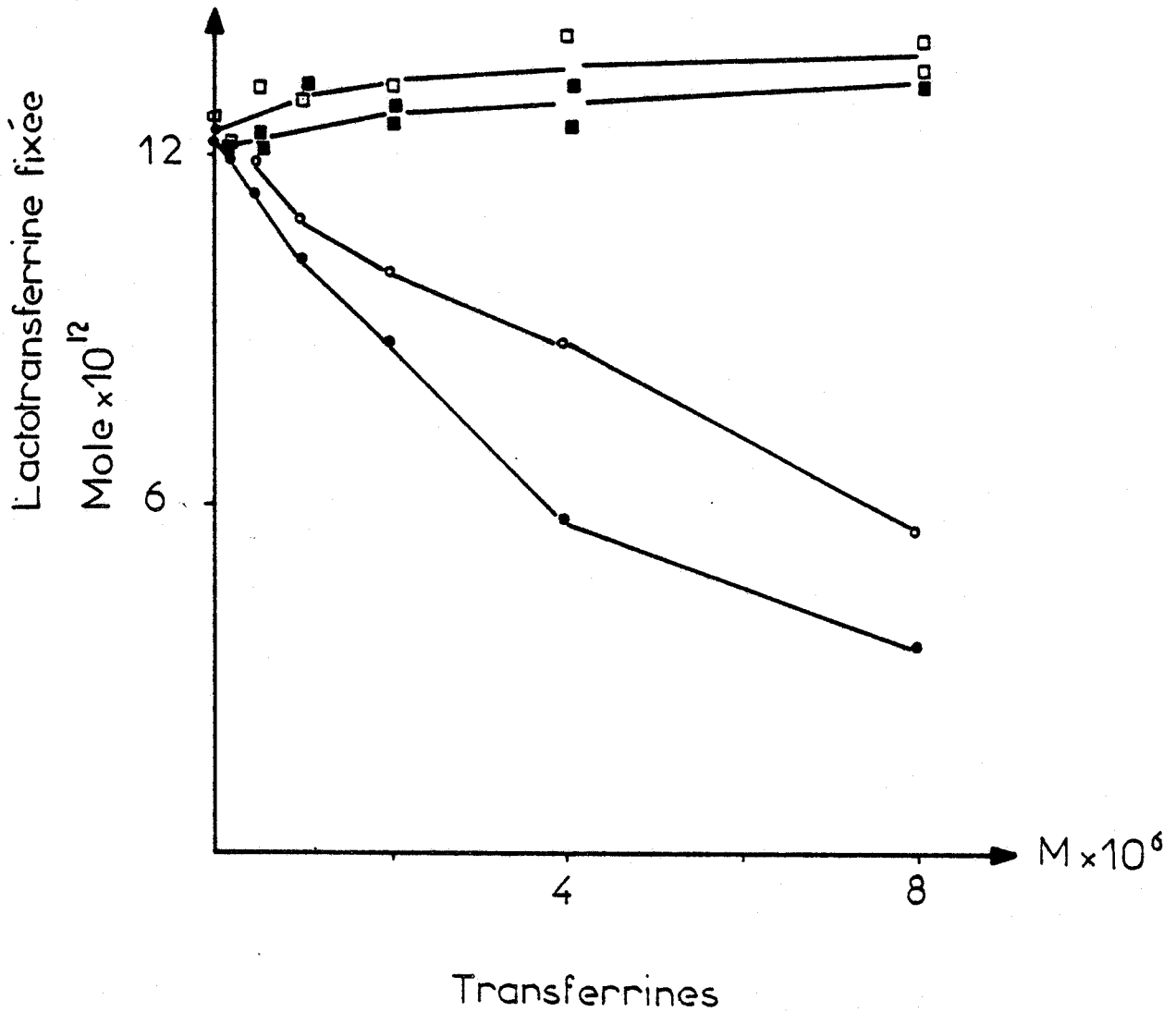


FIGURE 32 : COMPETITION DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE SUR LE MACROPHAGE ALVEOLAIRE HUMAIN PAR DE LA LACTOTRANSFERRINE ET DE LA SEROTRANSFERRINE.

- Apolactotransferrine
- Aposérotransferrine
- Lactotransferrine saturée
- Sérotransferrine saturée



a) Matériel et méthode

La concentration en lactotransferrine radioactive est de  $1,56 \cdot 10^{-7}$  M pour  $1.5 \cdot 10^5$  cellules.

La fixation de la lactotransferrine radioactive sur les macrophages alvéolaires est suivie à 4° C à des temps variant de 1 minute 30 à 60 minutes. Les cellules sont lavées trois fois dans du tampon de Hank's complété avec du chlorure de calcium 2 mM. Puis les cellules sont incubées avec  $1,56 \cdot 10^{-6}$  M de lactotransferrine non radioactive. Le déplacement de la lactotransferrine radioactive est suivi en cinétique à 4° C.

b) Résultat

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure n° 33.

Nous constatons que l'addition de lactotransferrine froide dix fois plus concentrée provoque une diminution de la fixation de la lactotransferrine marquée.

Au temps de chasse d'une heure, 72 % de la lactotransferrine radioactive ont été déplacés.

c) Discussion

Nous avons montré que la fixation de la lactotransferrine sur le macrophage est réversible. Il ne s'agit donc pas simplement d'un phénomène de phagocytose.

Ce résultat nous amène à conclure à l'existence d'un récepteur membranaire de la lactotransferrine sur le macrophage alvéolaire.

...

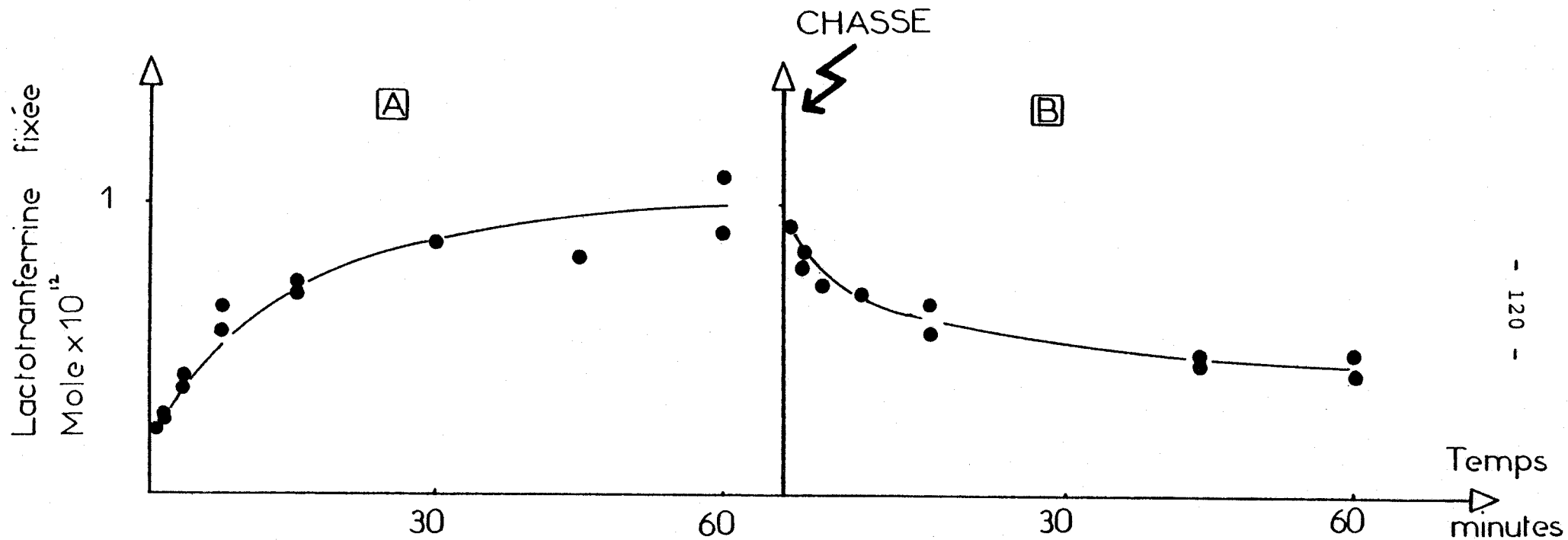


FIGURE 33 : MISE EN EVIDENCE D'UNE FIXATION REVERSIBLE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE SUR LE MACROPHAGE ALVEOLAIRE HUMAIN.

A : Cinétique de fixation de la lactotransferrine humaine à 4°C, soit une concentration de  $0,15 \cdot 10^{-6}$  mole/litre en lactotransferrine pour  $10^5$  cellules.  
 B : Réaction de chasse en présence de lactotransferrine froide 10 fois en excès.

#### 4 - Conclusion

Le macrophage alvéolaire humain reconnaît de façon spécifique, via un ou plusieurs récepteurs, la sérotransferrine et la lactotransferrine humaines. Cette reconnaissance spécifique est saturable, réversible et dépendante de la température.

### III - EXISTENCE DE RÉCEPTEURS DIFFÉRENTS POUR LA SÉROTRANSFERRINE ET LA LACTOTRANSFERRINE SUR LE MACROPHAGE ALVÉOLAIRE HUMAIN

La démonstration est faite de la fixation des transferrines sur le macrophage alvéolaire humain.

Mais un point reste à élucider. S'agit-il du même récepteur pour les deux transferrines ? Pour le démontrer, nous avons procédé à des réactions de compétition.

#### a) Matériel et méthode

La méthode utilisée est décrite dans le chapitre V.

La fixation de la lactotransferrine radioactive à une concentration de  $0,9 \cdot 10^{-6}$  M sur le macrophage alvéolaire va être étudiée en présence de compétiteurs à des concentrations croissantes de  $0,2 \cdot 10^{-6}$  M à  $8 \cdot 10^{-6}$  M. Les compétiteurs sont la sérotransferrine et la lactotransferrine.

#### b) Résultats

La figure n° 32 page 118 met en évidence une différence de comportement entre la sérotransferrine et la lactotransferrine dans l'inhibition de la fixation de la lactotransferrine sur le macrophage alvéolaire.



La sérotransferrine saturée en fer et l'aposérotransferrine n'inhibent pas la fixation de la lactotransferrine. La lactotransferrine apo et saturée inhibe sa propre fixation. De même la fixation de l'aposérotransferrine n'est pas inhibée par la lactotransferrine.

c) Discussion

Le macrophage alvéolaire porte sur sa membrane plasmique deux types de récepteurs pour les transferrines. Ces deux récepteurs semblent différents. Ce qui laisse supposer que les deux transferrines ont des rôles biologiques différents envers le macrophage.

#### IV - CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons entrepris d'étudier la fixation des transferrines sur le macrophage.

Nous avons mis en évidence l'existence de deux récepteurs membranaires dont l'un reconnaît la lactotransferrine et l'autre la sérotransferrine. Pour la sérotransferrine, le récepteur semble être différent selon qu'il s'agit de l'aposérotransferrine ou de la sérotransferrine saturée.

Ceci serait en accord avec les résultats de Nishisato et al (144).

Les paramètres de fixation des transferrines sur le macrophage alvéolaire sont rassemblés dans le tableau n°VI.

TABLEAU VI PARAMETRES DE LA FIXATION DES TRANSFERRINES SUR LE MACROPHAGE ALVEOLAIRE HUMAIN.

TRANSFERRINES	NOMBRE DE RECEPTEURS PAR MACROPHAGE.	CONSTANTE D'AFFINITE $l.M^{-1}$
Aposérotransferrine	80 000	$16 \cdot 10^6$
Sérotransferrine saturée	40-50 000	$20 \cdot 10^6$
Apolactotransferrine	$10 \cdot 10^6$	$5-10 \cdot 10^6$
Lactotransferrine saturée	$12 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$



## CHAPITRE VIII

### ETUDE DU TRANSFERT DU FER DES TRANSFERRINES AU MACROPHAGE

La démonstration étant faite de l'existence de récepteurs des transferrines sur le macrophage alvéolaire, nous avons été amenés à préciser, d'une manière comparative, le transfert du fer à partir de ces deux transferrines.

#### I - INCORPORATION DU FER DE LA SÉROTRANSFERRINE DANS LE MACROPHAGE

Nous avons utilisé de la sérotransferrine marquée à  $^{125}\text{I}$  et saturée en  $^{59}\text{Fe}$ , à une concentration de  $0,1 \cdot 10^{-6}$  M. Nous avons suivi le devenir du fer à  $37^\circ \text{C}$  par une cinétique de 8 heures.

##### a) Résultat

La fixation de la sérotransferrine saturée en fer est mesurée par détermination d' $^{125}\text{I}$  et elle atteint un plateau au temps 30 minutes.

La quantité de  $^{59}\text{Fe}$  incorporée augmente de façon linéaire avec le temps. En effet, le rapport  $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$  augmente avec le temps, suggérant un passage important du fer dans le macrophage. Ces résultats sont représentés sur la figure n° 34 A.

##### b) Discussion

La sérotransferrine se fixe sur le macrophage et donne son fer de façon active. L'incorporation du fer doit se produire par dissociation du complexe

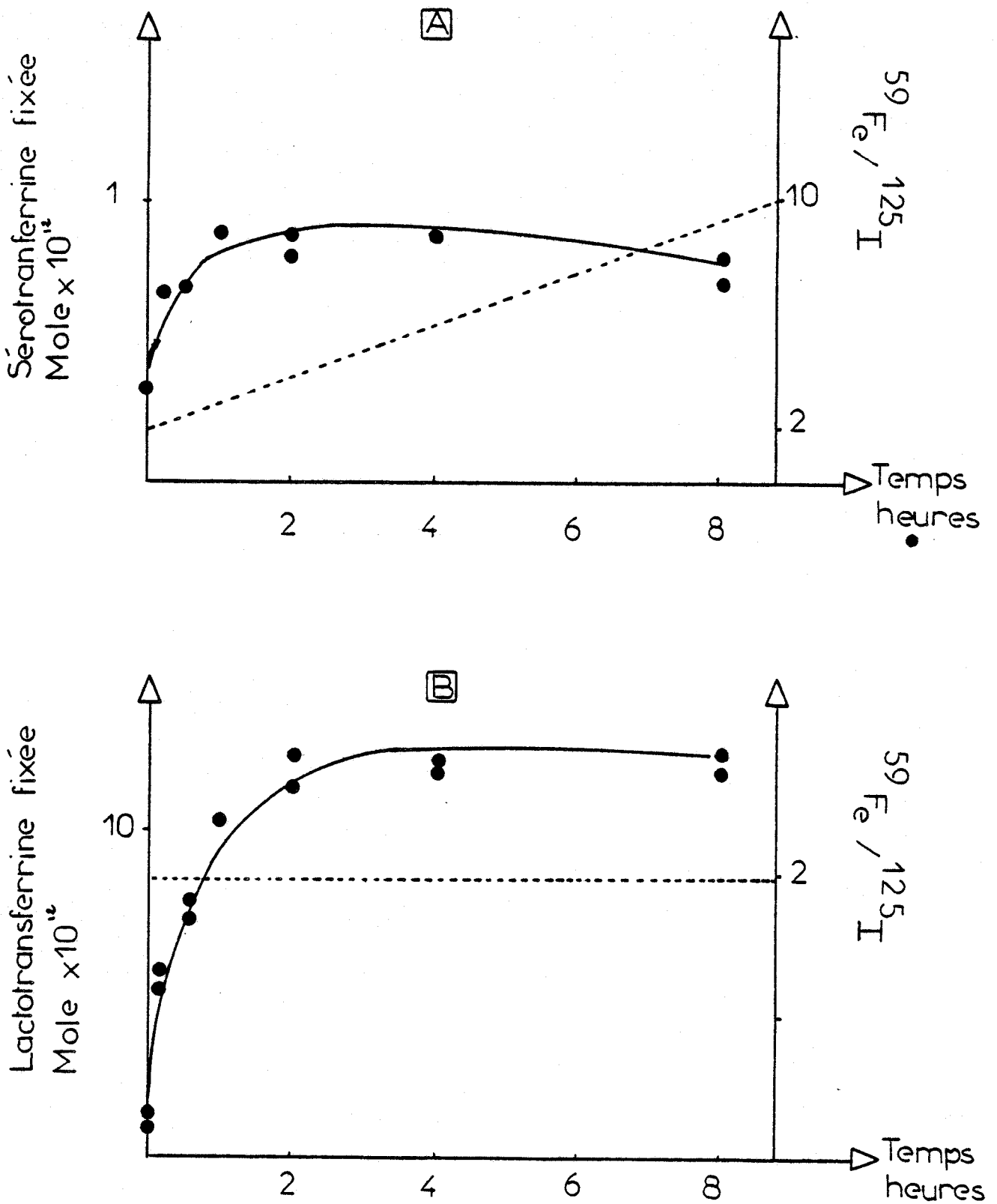


FIGURE 34 : CINETIQUE DE FIXATION DES TRANSFERRINES A 37°C SUR LES MACROPHAGES ALVEOLAIRES HUMAINS ET TRANSFERT DU FER. La fixation des transferrines est suivie par <sup>125</sup>I. Le transfert du fer est suivi par l'évolution du rapport <sup>59</sup>Fe / <sup>125</sup>I.

A : Sérotransferrine

B : Lactotransferrine

fer - sérotransferrine dans un compartiment intracellulaire avec libération de la sérotransferrine intacte. La saturation existant au niveau de la fixation de la sérotransferrine suggère que la protéine est recyclée et non pas dégradée à l'intérieur du macrophage.

## II - INCORPORATION DU FER DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS LE MACROPHAGE

### a) Matériel et méthode

Le protocole est identique à celui utilisé dans l'expérience avec la sérotransferrine.

### b) Résultats

Comme le montre la figure n° 34 B, l'incorporation du  $^{59}\text{Fe}$  suit la fixation de la lactotransferrine, le rapport  $\frac{^{59}\text{Fe}}{^{125}\text{I}}$  reste constant.

Les cinétiques d'incorporation du  $^{59}\text{Fe}$  et de la protéine marquée à  $^{125}\text{I}$  sont superposables.

### c) Discussion

Nous pouvons conclure de cette expérience qu'il n'y a pas dissociation entre l'incorporation du fer et de la protéine. Ce qui permet de supposer que la protéine n'est pas recyclée mais stockée à l'intérieur du macrophage. Une hypothèse a été émise par Van Snick (204) après expérimentation sur un système hétérologue. Selon lui, la lactotransferrine est dégradée dans le macrophage.

### III - CONCLUSION

La sérotransferrine et la lactotransferrine sont deux glycoprotéines ayant la capacité de donner leur fer au macrophage. Mais le système d'incorporation du fer semble différent. En effet, la sérotransferrine donnerait son fer par dissociation et la protéine ne serait pas dégradée. Par contre, la lactotransferrine ne serait pas recyclée. Van Snick et al (204) ont d'ailleurs montré la dégradation de la lactotransferrine humaine par le macrophage péritonéal de rat.

## CHAPITRE IX

# ROLE DE LA PARTIE PEPTIDIQUE ET DE LA PARTIE GLYCANNIQUE DES TRANSFERRINES DANS L'INTERACTION AVEC LES RECEPTEURS DU MACROPHAGE

### I - RÔLE DE LA PARTIE PEPTIDIQUE DE LA LACTOTRANSFERRINE

La lactotransferrine est une protéine basique certains auteurs ont émis l'idée que l'interaction lactotransferrine - macrophage peut se résumer à une simple interaction électrostatique.

Afin d'éliminer cette hypothèse, nous avons procédé à une modification de la structure peptidique de la lactotransferrine aboutissant à une modification de la charge de protéine.

#### a) Matériel et méthodes

La structure de la lactotransferrine est modifiée selon le protocole décrit dans le chapitre V.

Les incubations sont effectuées de façon comparative avec de la lactotransferrine normale et de la lactotransferrine modifiée.

Les cellules utilisées sont des macrophages alvéolaires humains. Les concentrations en protéine varient de  $0,1 \cdot 10^{-6}$  M à  $4 \cdot 10^{-6}$  M.

#### b) Résultats

La fixation de ces deux lactotransferrines est exprimée de façon comparative dans la figure n° 35.

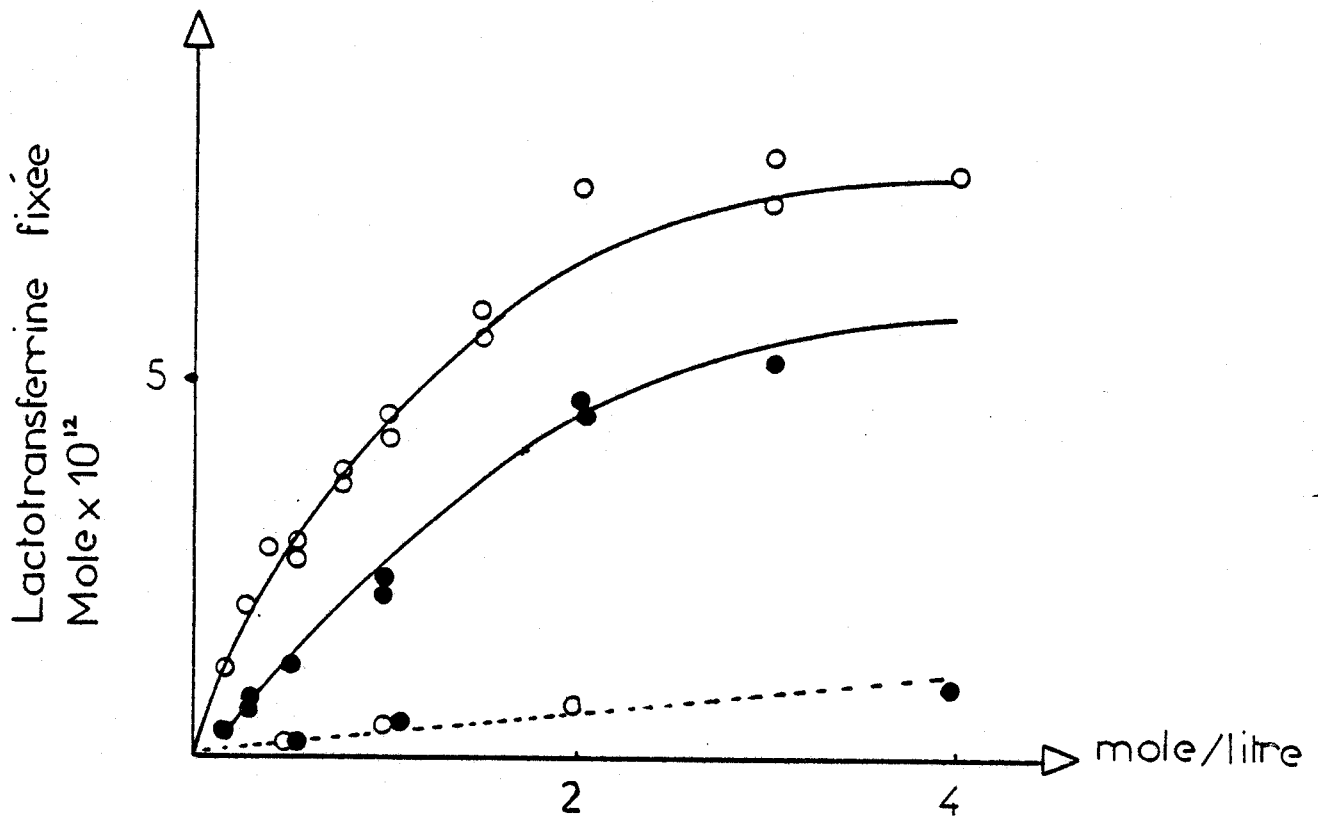


FIGURE 35 : FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE SATURÉE ET DE LA LACTOTRANSFERRINE MODIFIÉE SATURÉE SUR LE MACROPHAGE ALVEOLAIRE HUMAIN.

Lactotransferrine saturée ○—○ fixation spécifique  
○—○ fixation non spécifique.

Lactotransferrine modifiée ●—● fixation spécifique  
●—● fixation non spécifique.





Nous constatons que la lactotransferrine modifiée se fixe légèrement moins que la lactotransferrine normale. La détermination des paramètres de la fixation de la lactotransferrine modifiée, selon la méthode de Scatchard, donne un nombre de sites de  $8.10^6$  par macrophage et une constante d'affinité de  $2,5.10^6 \text{ l.mol}^{-1}$

La lactotransferrine, dont la charge est modifiée, reconnaît toujours le macrophage alvéolaire humain.

Les résultats obtenus montrent que l'affinité de la lactotransferrine n'est pas modifiée. Le nombre de sites est légèrement inférieur à celui obtenu pour la lactotransferrine normale.

Nous pouvons donc écarter l'hypothèse selon laquelle l'interaction lactotransferrine - macrophage est une interaction ionique.

## II - RÔLE DES GLYCANNES DANS LE MÉCANISME DE RECONNAISSANCE DU MACROPHAGE

La sérotransferrine et la lactotransferrine sont deux glycoprotéines dont la structure des glycanes a été définie dans le chapitre des Généralités n° I.

La sérotransferrine porte deux glycanes identiques de type N-acétyl lactosaminique bi-antenné ne contenant pas de fucose.

La lactotransferrine porte également deux glycanes dont les structures sont de type N-acétyl lactosaminique bi-antenné renfermant un ou deux résidus fucoses branchés en  $\alpha(1 \rightarrow 3)$  ou  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  sur une N-acétyl glucosamine.

De nombreuses études ont été effectuées pour déterminer le rôle

des sucres des glycoprotéines dans la reconnaissance d'un récepteur membranaire.

Stahl et al (186) ont mis en évidence l'existence d'un récepteur à mannose et à N-acétyl glucosamine sur le macrophage. Sheperhd et al (176) ont montré l'existence d'un récepteur reconnaissant à la fois le mannose et le fucose sur le monocyte.

Nous avons donc entrepris de déterminer si les glycannes de la sérotransferrine et de la lactotransferrine ont un rôle dans la reconnaissance du récepteur membranaire du macrophage.

#### A - MATERIELS ET METHODES

Nous avons utilisé pour cette expérience des macrophages alvéolaires humains.

Le rôle des glycannes a été exploré en utilisant une technique de compétition de la fixation des transferrines par des néoglycoprotéines.

Les compétiteurs, constitués par de la sérum albumine bovine néo-glycosylée, nous ont été aimablement fournis par Monsieur le Professeur Monsigny.

Les compétiteurs sont utilisés à des concentrations variant de 0,25 à  $10 \times 10^{-6}$  M en sérum albumine bovine.

La quantité de sucre par mole de sérum albumine bovine est exprimée dans le tableau VII.

La réaction de compétition a été réalisée par addition d' $\alpha$ -mannosyl sérum albumine, de  $\alpha$ -L-fucosyl sérum albumine, de  $\beta$ -galactosyl sérum albumine, de N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminyl sérum albumine.

TABLEAU VII : DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN SUCRES DES SERUM ALBUMINE NEO-GLYCOSYLEES.

Sérum Albumine Néo-glycosylées.	Nombre de sucre par mole de sérum albumine.
Mannosyl S.A.B	13,8
Fucosyl S.A.B	17
Galactosyl S.A.B	11
N Acetyl Glucosaminyl S.A.B	49



B - Résultats

1 - Compétition de la fixation de la sérotransferrine par de la sérum albumine - néo-glycosylée

Dans cette expérience, la  $\alpha$  - L - fucosyl sérum albumine sert de témoin, car la sérotransferrine ne contient pas de fucose dans ses glycanes.

Sur la figure n° 36, nous constatons que ces diverses protéines néo-glycosylé n'inhibent pas la fixation de la sérotransferrine sur le macrophage alvéolaire.

Le même expérience a été effectuée sur les monocytes humains et les résultats obtenus sont identiques.

2 - Compétition de la fixation de la lactotransferrine sur le macrophage alvéolaire par la sérum albumine néo-glycosylée

Dans la figure n° 37, nous avons rassemblé les résultats obtenus.

Le témoin que nous avons utilisé est la sérum - albumine bovine. Nous pouvons observer qu'à cette concentration 0,06 % elle est sans action sur la fixation de la lactotransferrine sur le macrophage alvéolaire.

Par contre, la  $\alpha$  - L - fucosyl sérum albumine inhibe fortement la fixation de la lactotransferrine.

La fixation de la lactotransferrine à une concentration de  $0,9 \cdot 10^{-6}$  M est inhibée à 50 % par une concentration de  $10^{-5}$  M en N - acétyl - glucosaminyl sérum albumine de  $1,5 \cdot 10^{-6}$  M  $\alpha$  - mannosyl - protéine et de  $0,7 \cdot 10^{-6}$  M en  $\alpha$  - L - fucosyl protéine. Ces concen-

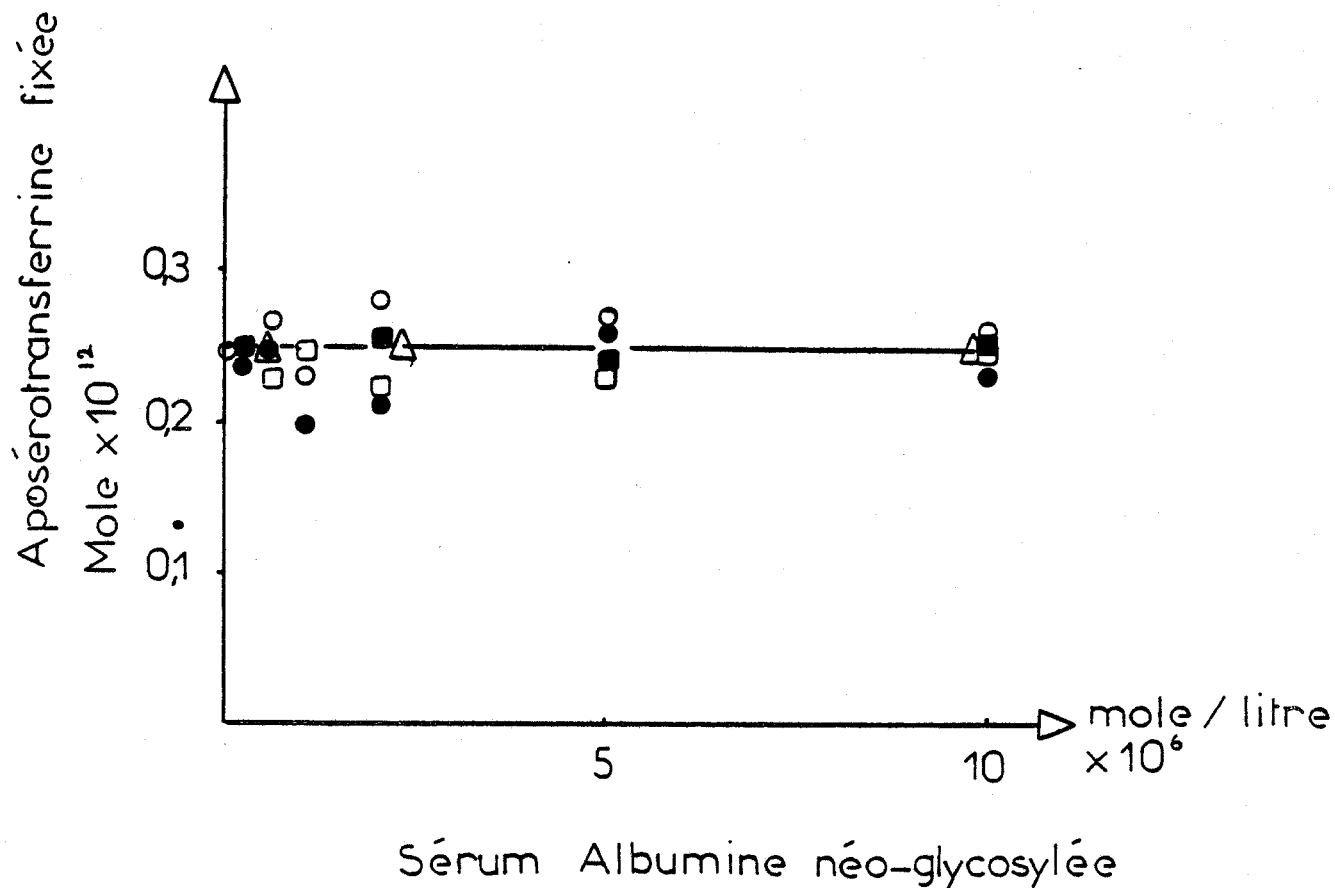


FIGURE 36 : COMPETITION DE LA FIXATION DE LA SEROTRANSFERRINE HUMAINE SUR LE MACROPHAGE ALVEOLAIRE HUMAIN PAR DE LA SERUM ALBUMINE BOVINE NEO-GLYCOSYLEE;

- Sérum Albumine Bovine  $\Delta$  Fucosyl - S.A.B
- Galactosyl-S.A.B □ Mannosyl-S.A.B
- N-Acetyl Glucosaminyl-S.A.B

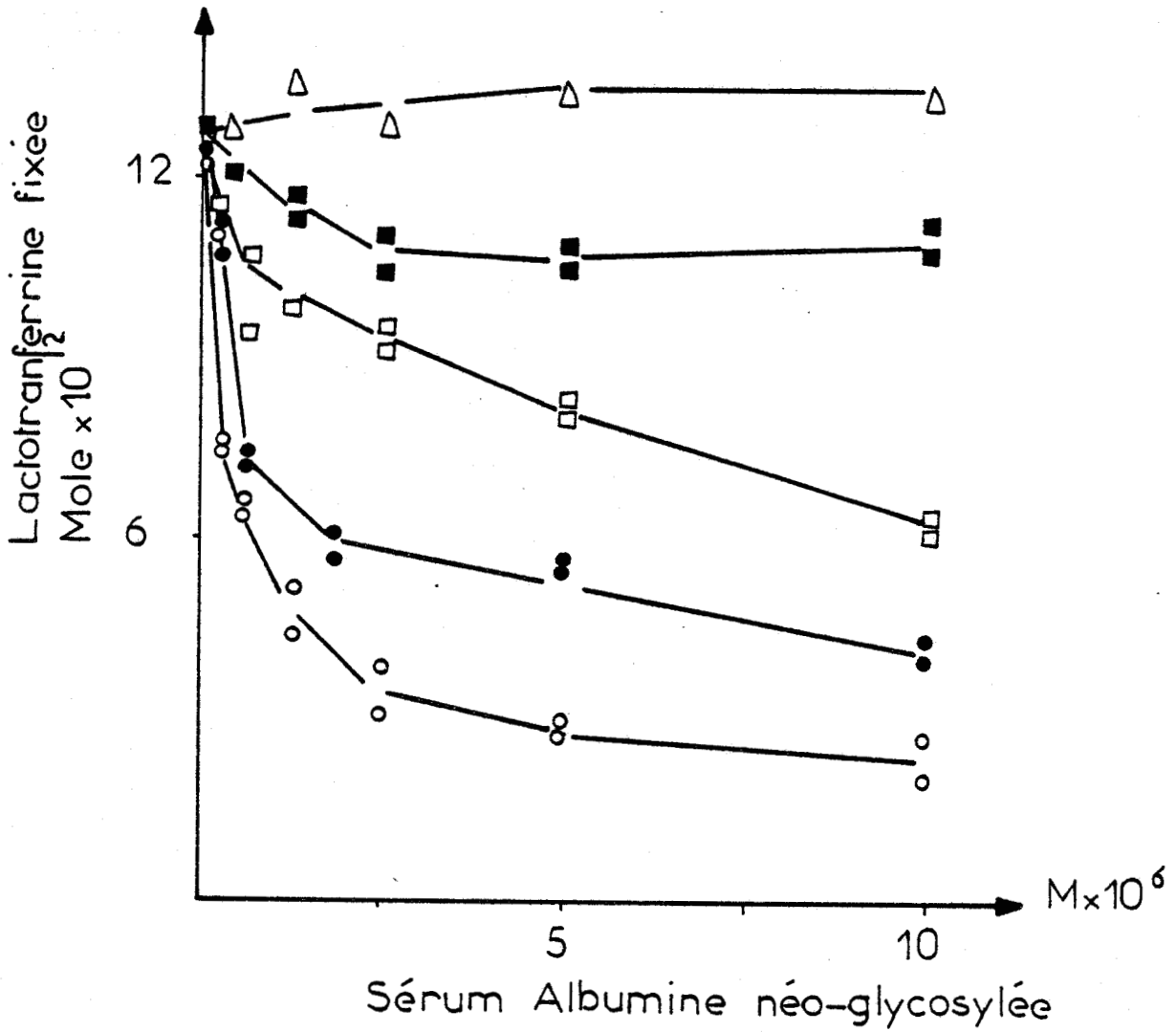


FIGURE 37 : COMPETITION DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LE MACROPHAGE ALVEOLAIRE HUMAIN PAR DE LA SERUM ALBUMINE BOVINE NEO-GLYCOSYLEE.

- △ sérum albumine bovine (S.A.B.)
- Galactosyl-S.A.B.
- Mannosyl-S.A.B.
- N-Acetyl Glucosaminyl-S.A.B.
- Fucosyl-S.A.B.



trations sont exprimées en concentration de sérum albumine bovine.

Au vu de leur composition respective en sucre, la  $\alpha$ -L-fucosyl sérum albumine possède le même pouvoir d'inhibition que la mannosyl - sérum albumine.

### C - CONCLUSION

Les glycanes de la sérotransferrine n'interviennent pas dans la reconnaissance du récepteur membranaire du macrophage. Ceci est en accord avec les travaux réalisés par Kornfeld (106) sur les réticulocytes.

Par contre, les glycanes de la lactotransferrine semblent jouer un rôle dans la reconnaissance du récepteur. Le fucose et le mannose semblent plus spécialement impliqués dans cette reconnaissance. Le galactose n'intervient pas. Si le fucose de la lactotransferrine intervient dans la reconnaissance du récepteur, il nous est cependant impossible de savoir quel est le fucose impliqué. Est-ce le fucose branché en  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) sur la N - acétyl glucosamine du point d'attache ou bien le fucose branché en  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3) sur une glucosamine de l'antenne ? L'inhibition de la fixation par des glycopeptides de structure bien définie nous permettra de répondre à cette question.

Les résultats que nous avons obtenus sont en contradiction avec ceux obtenus par Imber et al. Ces auteurs ont montré que le fucose ne joue pas de rôle dans la reconnaissance du macrophage par la lactotransferrine. En effet, la lactotransferrine défucosylée se fixe sur le macrophage alévoilaire de la même façon que la lactotransferrine native. De plus, des protéines (sérum albumine bovine) fucosylées ou mannosylées ou portant des N - acétyl - glucosamines n'inhibent pas la fixation de la lactotransferrine "in vivo" et "in vitro".

Par ailleurs, Campbell (39) constate une absence d'inhibition de la fixation de la lactotransferrine humaine sur le macrophage alvéolaire humain, en présence de mannane de levure, et de sérotransferrine.

La sérotransferrine ne portant pas de fucose, il conclut que cette absence d'inhibition est due à l'absence de fucose, les deux transferrines ayant des structures fortement homologues. A partir de ces observations, il envisage la possibilité de l'existence d'un récepteur fucose différent de celui décrit par Stahl et al (186).

Les résultats que nous avons obtenus sont en contradiction avec ceux de Imber et al (94) qui trouvent que l'inhibition obtenue par la fucosyl sérum albumine de l'ordre de 10 % et par la mannosyl sérum albumine de l'ordre de 30 % n'est pas significative.

L'explication de cette contradiction peut, peut-être, être expliquée par la différence des méthodologies utilisées.

En effet, cet auteur a utilisé un système d'étude hétérologue constitué par le macrophage péritonéal de souris et la lactotransferrine humaine. La concentration en lactotransferrine est de 5 nM. Cette concentration très faible est compatible avec le  $K_D$  qu'ils ont mesuré. Néanmoins les courbes de Scatchard présentées montrent une valeur B/L qui avoisine 5, ce qui semble indiquer que la réaction n'est pas équilibrée et que toute la lactotransferrine présentée est fixée par le macrophage. De plus, puisque la quantité de ligand libre tend vers 0, le rapport B/L calculé n'a plus aucune précision.

Par ailleurs, les mesures que nous avons réalisées sur le macrophage humain sont en accord avec d'autres auteurs, la constante de dissociation est de  $2.10^6 \text{ M.l}^{-1}$ , ce qui nous amène à effectuer les expériences d'inhibition en présence d'une concentration en lactotransferrine de



50 nM à 900 nM, c'est-à-dire de 10 à 180 fois supérieur.

D'autre part, nous avons mesuré la fixation de la lacto-transferrine sur le macrophage en récupérant les cellules par de la soude 0,01 N et non par de la soude 0,1 N . En effet, l'extraction à la soude 0,1 N permet outre de récupérer la protéine fixée sur le macrophage, la protéine fixée de façon non spécifique sur le plastique. C'est un fait qui peut, à la concentration utilisée, intervenir dans l'interprétation des résultats.

## CHAPITRE X

### ETUDE DE LA FIXATION DES TRANSFERRINES SUR LE MONOCYTE ISOLE DU SANG D'HEMOCHROMATOSE PRIMAIRE

L'hémochromatose est due à un trouble pathologique du métabolisme du fer.

La cinétique interne du fer dans le cas de l'hémochromatose est modifiée et caractérisée par une relative pauvreté des dépôts de fer dans le système histiocytaire.

Jusqu'à présent aucune anomalie de la structure de la transferrine ou de la ferritine n'a pu être mise en évidence. Et malgré cela, la sérotransferrine est saturée en fer à 90 % et le macrophage présente une anomalie au niveau de la rétention du fer. L'explication de la modification de la cinétique interne du fer est donc ailleurs.

Afin d'apporter des renseignements sur le rôle des transferrines dans ce cas pathologique, nous avons entrepris d'étudier les récepteurs de ces transferrines sur le monocyte.

Les résultats qui figurent dans ce chapitre sont des résultats préliminaires compte tenu des difficultés que nous avons rencontrées pour obtenir du sang de patient atteint d'hémochromatose. Néanmoins nous avons choisi de faire figurer ces résultats en raison de leur intérêt.

Nous avons étudié trois cas d'hémochromatose primaire en début de traitement. Un prélèvement de 500 ml de sang a été réalisé sur **trois** malades.

Les quantités de fer sérique et de ferritine sérique ont été déterminées par l'application des méthodes de dosage classiques

en laboratoire d'analyses médicales.

Les résultats figurent dans le tableau n° VIII page 141 . Nous constatons que le fer sérique est très élevé, ainsi que le taux de ferritine sérique. La sérotransferrine est saturée à 90 % et 100 %.

## I - INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC LE MONOCYTE

Les expériences sont menées de manière comparative sur des monocytes normaux et sur des monocytes d'hémochromatose.

### A - MATERIEL ET METHODE

La gamme de concentration en lactotransferrine va de  $8 \cdot 10^{-8}$  M à  $7 \cdot 10^{-6}$  M . L'incubation est effectuée à 4°C durant deux heures. La fixation non-spécifique est déterminée par 100 fois en excès de lactotransferrine froide.

### B - RESULTATS

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure n° 38 page 142.

La lactotransferrine saturée se fixe de façon comparable sur les deux types de cellules, selon un phénomène saturable.

Le nombre de sites de la lactotransferrine est de  $13 \cdot 10^6$  par monocyte d'hémochromatose et la constante d'affinité est de 1 à  $2 \cdot 10^6$  l.M<sup>-1</sup>. Ces valeurs sont identiques à celles que nous avons trouvées pour le monocyte normal. Dans le cas de l'apolactotransferrine, le nombre de sites sur le monocyte normal est de  $12 \cdot 10^6$  et la constante

**TABLEAU VIII :** DOSAGE DU FER SÉRIQUE, DE LA FERRITINE SÉRIQUE ET DÉTERMINATION DU TAUX DE SATURATION EN FER DE LA SÉROTRANSFERRINE.

PATIENTS	FER SÉRIQUE mg/l		FERRITINE SÉRIQUE ng/ml		TAUX DE SATURATION DE LA SÉROTRANSFERRINE			
	Dosage	Normes		Résultat	Valeur moyenne normale	Dosage	Normes	
		Mini	Maxi				Mini	Maxi
Mme D.J.	2.7	0.8	1.90	6166	23	90	20	50
M <sup>r</sup> H.P.	3.10	0.6	1.80	640	46	100	20	50



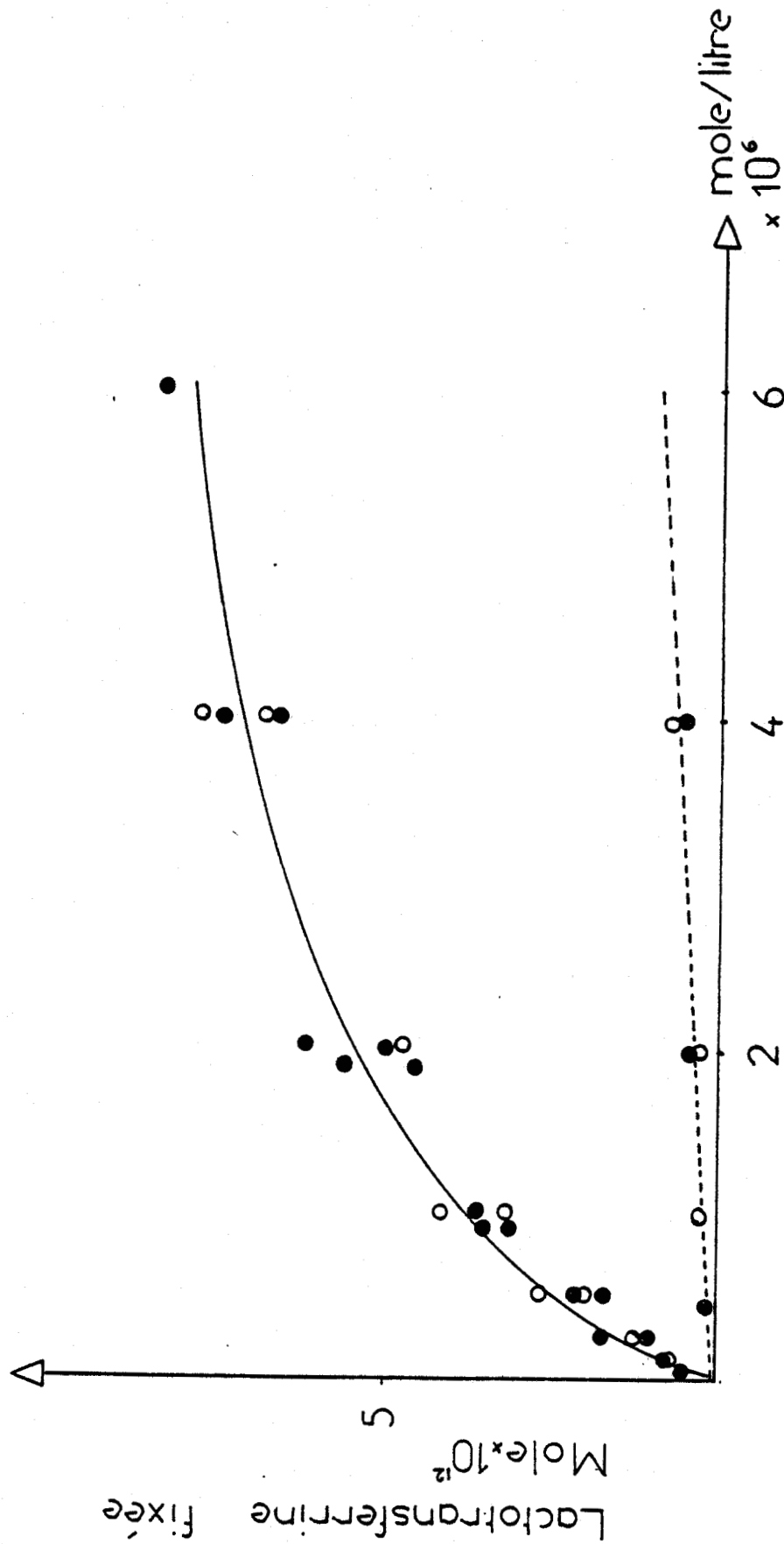


FIGURE 38 :

FIXATION DE L'APOLACTOTRANSFERRINE ET DE LA LACTOTRANSFERRINE SATURÉE EN FER SUR LES MONOCYTES D'HEMOCHROMATOSE .

- Apolactotransferrine — fixation spécifique --- fixation non spécifique
- Lactotransferrine saturée — fixation spécifique --- fixation non spécifique



d'affinité est de  $10^6 \text{ l. M}^{-1}$ .

Pour l'hémochromatose, le nombre de sites est variable mais la constante d'affinité est identique.

## II - CONCLUSION

L'interaction de la lactotransferrine avec les monocytes n'est pas modifiée dans le cas de l'hémochromatose. Il ne semble donc pas exister de troubles du métabolisme du fer à ce niveau. Le cas de la sérotransferrine reste à examiner, afin de déterminer si il existe une modification dans le nombre de récepteurs de la sérotransferrine sur le monocyte d'hémochromatose. Ceci afin d'expliquer la relative pauvreté des réserves en fer du monocyte et le taux élevé de la saturation en fer de la transferrine sérique.

## CONCLUSIONS GENERALES

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de notre travail, qui a porté sur l'étude des interactions de la sérotransferrine et de la lactotransferrine humaines avec les récepteurs membranaires des macrophages alvéolaires humains sont les suivantes :

1. Nous avons tenté de mettre au point un système d'étude nous permettant d'analyser les interactions des transferrines avec les macrophages alvéolaires humains en culture, en éliminant les principales causes d'erreurs et en particulier celles qui proviennent de la fixation non-spécifique de la lactotransferrine sur différents supports, comme le plastique, ou sur différentes protéines comme la sérum albumine bovine.
2. Nous avons mis en évidence l'existence de récepteurs membranaires de la sérotransferrine et de la lactotransferrine sur le macrophage alvéolaire humain et sur le monocyte humain. Grâce à l'application de la méthode de Scatchard, nous avons établi que le nombre de récepteurs de la lactotransferrine saturée ou non est de  $10$  à  $12 \cdot 10^6$  par macrophage, tandis que le nombre de récepteurs de l'aposérotransferrine est de  $80\ 000$  et celui de la sérotransferrine saturée est de  $40$  à  $50\ 000$  par macrophage, donc nettement inférieur à celui de la lactotransferrine. La constante d'association de la lactotransferrine est de  $5$  à  $10 \cdot 10^6 \text{ l.mol}^{-1}$ , elle est inférieure à celle de la sérotransferrine qui est de  $1$  à  $2 \cdot 10^7 \text{ l.mol}^{-1}$ .

3. Nous avons ensuite vérifié que la fixation des différentes transferrines sur les récepteurs des macrophages est spécifique, saturable, réversible et dépendante de la température. L'ensemble de ces différents critères est bien en faveur de la spécificité de reconnaissance des transferrines par des récepteurs membranaires.
4. Nous avons également montré par des réactions d'inhibition que la fixation de la lactotransferrine et de la sérotransferrine se fait par l'intermédiaire de récepteurs différents. De plus, l'aposérotransferrine semble se fixer sur le macrophage alvéolaire sur un récepteur différent de celui de la sérotransferrine saturée.
5. Nous nous sommes ensuite intéressés au transfert du fer des transferrines au macrophage alvéolaire et nous avons constaté que l'incorporation du fer est différente en présence de sérotransferrine ou de lactotransferrine. En effet, la sérotransferrine semble donner son fer dans un compartiment intracellulaire puis l'aposérotransferrine est recyclée. En revanche la lactotransferrine donne son fer mais elle ne semble pas être recyclée, ainsi que le montrent les courbes d'incorporation du fer et de la lactotransferrine qui sont superposables.
6. Les transferrines étant des glycoprotéines, nous avons étudié le rôle joué par les glycanes dans la reconnaissance des récepteurs membranaires des macrophages. Nous avons observé que les glycanes de la sérotransferrine n'intervenaient pas dans la reconnaissance contrairement à ceux de la lactotransferrine. En effet, l'utilisation de protéines néo-glycosylées et en particulier de fucosyl - sérum - albumine nous a permis de préciser le rôle important joué par le fucose dans cette interaction.



7. Enfin, dans des expériences préliminaires, nous avons étudié la fixation des transferrines sur les monocytes de patients atteints d'hémochromatose. Ces études avaient pour objet la fixation de la lactotransferrine sur les monocytes d'hémochromatose. Le nombre de récepteurs de la lactotransferrine est identique sur le monocyte normal et sur le monocyte d'hémochromatose.

Notre travail a apporté des résultats positifs intéressants, cette étude sera poursuivie dans les différentes voies suivantes :

1. Visualisation des différents récepteurs par des techniques d'autoradiographie.
2. Détermination du rôle de la partie protéique des transferrines en utilisant les moitiés C et N terminales des transferrines préparées au Laboratoire.
3. Détermination plus poussée du rôle des glycanes et en particulier étude de la nature de la liaison fucosyl susceptible d'être reconnue, par les récepteurs membranaires.
4. Etude des interactions des récepteurs membranaires avec d'autres complexes métalliques des transferrines.
5. Poursuite de l'étude des cas pathologiques afin de déterminer le rôle joué par les transferrines dans la régulation du métabolisme du fer.
6. Isolement des différents récepteurs des transferrines et en particulier de la lactotransferrine, à partir de macrophages en culture continue.

En conclusion, les études que nous avons entreprises sur l'interaction des transferrines avec les macrophages représentent une introduction au Laboratoire d'un nouveau type de recherches dans le domaine de la biologie et de la pathologie des transferrines.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- 1 - ACHORD D.T., BROT F.E., SLY W.S.,  
Biochem Biophys. Res. Commun., 1977, 77, 409 - 415
- 2 - AGGELER J., WERB Z.,  
J. Cell. Biol. 1982, 94, 613 - 623
- 3 - AISEN P, BROWN EB,  
Prog. Hématol, 1975, 9, 25 - 56
- 4 - AISEN P, in " Iron and biochemistry and Médecine ",  
JACOBS A., WORWOOD M., Academic Press, London and  
New-York, 1980, 87-129
- 5 - AISEN P., LISTOWSKY I.,  
Annu. Rev. Biochem, 1980, 49, 357 - 393
- 6 - AISEN P., in " Biological Aspects of Métales and Métal  
Related diseases, ed by B. Sarkar Raven Press -  
New-York, 1983, 67 - 80
- 7 - AMBRUSO D.R., JOHNSTON R.B., J. Clin  
Invest., 1981, 67, 352 - 360
- 8 - ASCHOFF L., in " Lectures on Pathology "  
1924, pp. 1-33, HOEBER P.B., Inc. New-York
- 9 - AUBERT J.P., BISERTE G., LOUCHEUX - LEFEBVRE M.H., Archs  
Biochem. Biophys., 1976, 175, 410 - 418
- 10 - AULBERT E., SÖRJE H., GERIEKE D.,  
Naturwissenschaften, 1981, 68, 212
- 11 - AZARI P., BAUGH R.F., Arch. Biochem. Biophys.,  
1967, 118, 138 - 144
- 12 - BACH J.F., Immunologie, Flammarion ed,  
2ème édition, Flammarion - Médecine - Sciences, Paris, 1979



- 13 - BAGDY G.C., VASILIKI D.R., BENNET R.M., VANDENBARK A.A., GAREWAL H.S., J. Clin, Invest., 1981, 68, 56 - 63
- 14 - BAGBY G.C., Mc CALL E., LAYMAN D.L., J.Clin, Invest. 1983 71, 340 - 344
- 15 - BAGGIOLINI M., DE DUVE D., MASSON P.L., HEREMANS J.F., J. Exp. Med, 1970, 131, 559 - 570
- 16 - BARKAN G., Physiol. Chem., 1927, 171, 194 - 221
- 17 - BATES G.W., WORKMAN E.F., SHLABACH M.R., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1973, 50, 84
- 18 - BATES G.W., SHLABACH M.R., F.E.B.S. Letters, 1973, 33, 289
- 19 - BEELEY J.G., Biochem. J., 1976, 159, 335 - 345
- 20 - BENNET R.M., EDDIE - QUARTEY A.C., HOLT P.J.L., Arthr. Rheum, 1973, 16, 186 - 190
- 21 - BENNET R.M., KOKOCINSKI T., Br. J. Haematol, 1978, 39, 509 - 521
- 22 - BENNET R. M., DAVIS J., J. Immunol, 1981, 127 1211 - 1216
- 23 - BENNET R.M., DAVIS J., CAMPBELL S., PORTNOFF S., J. Clin., Invest, 1983, 71, 611 - 618
- 24 - BERESFORD C.H., NEALE R.J., BROOKS O.G., Lancet 1971, , 568-572
- 25 - BESTERMAN J.M., LOW R.B., Biochem. J., 1983, 210, 1 - 13
- 26 - BEZKOROVAINY A, GROHLICH D, Biochem. Biophys. Act. 1972, 263, 645
- 27 - BIRGENS H.S., HANSEN N.E., KARLE H., KRISTENSEN L.Ø, Br. J. Haemat, 1983, 54, 383 - 391



- 28 - BLUSSE VAN OUD ALBLAS A., VAN FURTH R.,  
J. exp. Med., 1979, 149, 1504 - 1518
- 29 - BOLTZ - NITULESCU G., SPIEGELBERG H.L., Cell.  
Immunol., 1981, 59, 106 - 114
- 30 - BOLTZ - NITULESCU G., PLUMMER J.M., SPIEGELBERG H.L., J.  
Immunol., 1982, 128, 2265 - 2268
- 31 - BOWDEN D.H., ADAMSON I.Y.R., Lab. Invest, 1980,  
42/5, 511 - 517
- 32 - BOYUM A., Scand. J. Clin. Lab. invest., 1968, 97,  
77 - 89
- 33 - BRIGGS R.C., GLASS W.F., MONTIEL M.M., HNILICA L.S.,  
J. Histochem and Cytochem, 1981, 29, 1128 - 1136
- 34 - BROXMEYER H.E., SMITHYMAN A., EGER R.R., MEYERS P.A.,  
DE SOUSA M., J. Exp. Med., 1978, 148, 1052 - 1067
- 35 - BROXMEYER H.E., DE SOUSA M., SMITHYMAN A., RALPH P.,  
HAMILTON J., KURLAND J.I., BOGNACKI J., Blood 1980,  
55, 324 - 333
- 36 - BROWN J.W., in Proteins of iron metabolism, Brown ed,  
New York, 1976
- 37 - BULLEN J.J., ROGERS H.J., LEIGH L., Br. Med J.,  
1972, 69 - 75
- 38 - BULLEN J.J., ARMSTRONG J.A., Immunology, 1979, 36  
781 - 791
- 39 - CAMPBELL E.J., Proc. Natl. Acad. Sci., 1982, 79  
6941 - 6945
- 40 - CAPO C., BONGRAND P., BENOLIEL A.M., RYTER A., DEPIEDS R.,  
Ann. Immunol., 1981, 132, 165 - 173
- 41 - CATTAN D., DEBRAY C., JORI J.P., MARCHE C.,  
Nouvelle revue française d'hématologie, 1966, 6, 431 - 435



- 42 - CATTAN D., Gastroenterol. Clin. Biol., 1979,  
3, 59 - 66
- 43 - CATTAN D., The Lancet, 1983, 9, 106
- 44 - CHASTEEN N.P. Coordination Chem. Rev., 1977,  
22, 1 - 36
- 45 - CHERON A., MAZURIER J., FOURNET B., C.R. Acad. Sci.,  
1977, 284, 585 - 588
- 46 - CLINE M.J., GOLDE D.W., Nature, 1974, 248, 703
- 47 - COLOMB E., ESTEVENON J.P., FIGARELLA C., GUY O., SARLES H.,  
Biochem. Biophys. Acta, 1974, 342, 306 - 312
- 48 - COOK J.D., BARRY W.E., HERSHKO C., FILLET G., FINCH  
C.A., Amer J. path, 1973, 72, 337
- 49 - CRICHTON R., in Proteins of iron storage,  
CRICHTON ed, North - Holland, Amsterdam, 1975
- 50 - COX T.M., MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J.,  
PETERS T.J., Biochim. Biophys. Acta, 1979, 588, 120 - 128
- 51 - CUATRECASAS P., HOLLENEBERG M.D.,  
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1975, 62, 31 - 41
- 52 - CUSTER G., BALCERZAK S., RINEHART J., Am. J.,  
Hématol., 1982, 13, 23 - 36
- 53 - DAUGHADAY C.C., DOUGLAS S.D., J. Reticuloendo-  
thél. Soc, 1976, 19, 37
- 54 - DAVOUST J., MICHEL V., SPIK G., MONTREUIL J.,  
DEVAUX PF, Febs Letters, 1981, 125, 271 - 276
- 55 - DE BOER M., REIJNEKE R., VAN DE GRIEND R.J.,  
LOOS J.A., ROOS D., J. Immun. Meth., 1981, 43, 225 - 239
- 56 - DEBRAY C., CATTAN D., MARCHE C., JORI J.P.,  
Société médicale des hôpitaux de PARIS, 1965, 116,  
1635 - 1652



- 57 - DEMOULIN A., DEMOULIN - BRAHY L., DEKEGEL D.,  
Path. Biol., 1980, 28, 117 - 125
- 58 - DESSAINT J.P., TORPIER G., CAPRON M., BAZIN H.,  
CAPRON A., Cell. Immunol., 1979, 46, 12 - 23
- 59 - DE SOUZA M., Symp. Soc. Exp. Biol., 1978, 32, 393 - 409
- 60 - DE VET B.J.C.M., TEN HOOPEN C.H., Acta. Med. Scand,  
1978, 203, 197 - 203
- 61 - DOWDLE G.B., SCHACHTER D., SHENKER H., Am. J. Physiol.,  
1960, 198, 609
- 62 - FAIRBANKS V., BEUTLER E., in " Hematology ", WILLIAMS  
WF., BEUTLER E., ERSLEV A.J, RUNDLES RW. (Ed), New-York  
Mc. Graw-Hill, 1977, 387
- 63 - FEDAIL S.S., HARVEY R.F., SALMON P.R., READ A.E., Lancet  
1978, 1, 178
- 64 - FILLET G., MARSAGLIA G., Blood, 1975, 46, 1007
- 65 - FILLET G., le fer dans l'organisme, métabolisme et  
réutilisation, MASSON ed, PARIS, 1977, 109
- 66 - FINCH C.A., HOSAIN F., MORGAN E.H., MARSAGLIA G.,  
GIBLETT E., HILLMAN R.S., Séries Haemat, 1965, 6, 30
- 67 - FINCH C.A., DEUBELBEISS K., COOK J.D., ESCHBACH J.W.,  
HARKER L.A., FUNK D.D., MARSAGLIA G., HILLMAN R.S.,  
SLICHTER S., ADAMSON J.W., GANZONI A., GIBLETT E.,  
1970, Médecine, 49, 17 - 53
- 68 - FORTH W., RUMMEL W., Physiological Reviews, 1973, 53/3  
746 - 753
- 69 - FOX R.A., GREGORY D.S., FELDMAN J.D.,  
J. Immunol., 1974, 112, 1867 - 1872
- 70 - GARDINER M., MORGAN E., AUST. J. Exp. Biol. and  
Med Sci., 1974, 52, 723 - 736



- 71 - GEE J.B.L., BODEL P.T., ZORN S.K., HINMAN L.M., STEVENS C.A.,  
MATTAY R.A., Lung, 1978, 155, 243 - 253
- 72 - GOLDE D.W., CLINE M.J., J. Clin. Invest., 1972, 51,  
2981 - 2983
- 73 - GOLDE D.W., BYERS L.A., Nature, 1974, 247, 373 - 375
- 74 - GORINSKY B., HORSBURGH C., LINDLEY P.F., MOSS DS,  
PARKAN M., WATSON J.C., Nature, 1979, 281, 157 - 158
- 75 - GORINSKY B., " Advances in. Red. Cell. Biology ", Weatherall  
D.J. et al., Raven Press, New-York, 1982, 7 - 17
- 76 - GRANICK S., Bull. N.Y. Acad. Med., 1954, 30, 81
- 77 - GRIFFIN F.M., GRIFFIN J.A., LEIDER J.E., SILVERSTEIN  
S.C., J. Exp. Med., 1975, 142, 1263 - 1282
- 78 - GRÖHLICH D., COLIN G., MORLEY G.G.D., BEZKOROVAINY A.,  
Int. J. Biochem., 1979,
- 79 - GUTTERIDGE J.M.C., PATERSON S.K., SEGAL A.W., HALLIWELL B.,  
Biochim. J., 1981, 199, 259 - 261
- 80 - HAEFFNER - CAVAILLON N., CHABY R., CAVAILLON J.M.,  
SZABO L., J. Immunol, 1982, 128, 1950 - 1954
- 81 - HAHN H., KAUFMANN S.H.E., Rev. inf. Dis.,  
1981, 3/6, 1221 - 1250
- 82 - HALIWELL B., RICHEMOND R., WONG S.F., GUTTERIDGE J.  
M.C., in " Biological and Clinical Aspects of Superoxyde  
and superoxyde Dismutase ", Bannister W.H., Bannister J.V.,  
eds, Elsevier, North-Holland, Amsterdam, 32 - 40
- 83 - HARFORD J., ASHWELL G., in " the Glycoconjugates ",  
M.I. Horowitz (Ed), Academic New York, 1981, IV, 27 - 55



- 84 - HAURANI F.I., MEYER A., O'BRIEN R., J.Of Ret. Soc.,  
1973, 14, 309 - 316
- 85 - HELBOCK H.J., SALTMAN P., Biochim. Biophys. Acta, 1967,  
135, 979
- 86 - HEKMAN A.M., Biochem. Biophys. Acta, 1971, 251, 380
- 87 - HERSHKO C., Haematology, 1977, 10, 105
- 88 - HEUSSER C.H., ANDERSON C.L., GREY H.M., J. Exp. Méd.,  
1977, 145, 1316
- 89 - HOMMA Y., ONOZAKI K., HASHIMOTO T., MIURA K.,  
NAGAO S., TANAKA A., Int. Archs. Allergy. Appli.  
Immu., 1981, 65, 27 - 33
- 90 - HOPPE C.A., LEE Y.C., J. Biol. Chem., 1982, 257  
12 831 - 12 834
- 91 - HUEBERS H.A., HUEBERS E., FINCH C.A., MARTIN A.W.,  
J. Comp. Physiol., 1982, 148, 101 - 109
- 92 - HUNTER W., GREENWOOD F., Nature, 1962, 194, 495 - 496
- 93 - IACOPETTA B.J., MORGAN E.H., YEOH G.C.T., Bioch.  
Biophys. Acta, 1982, 687, 204 - 210
- 94 - IMBER M.J., PIZZO S.V., JOHNSON W.J., ADAMS D.O.,  
J. Biol. Biochem., 1982, 257, 5 129 - 5 135
- 95 - IMBER M.J., PIZZO S.V., Biochem J., 1983, 212, 249 - 257
- 96 - JACOBS A., SUMMERS M.R., Br. J. Haematol, 1981,  
49, 649 - 652
- 97 - JANDL J.H., KATZ J.H., J. Clin. Invest., 1963, 42, 314 - 326
- 98 - JARNUM S.J., LASSEN N.A., Scand J. Clin. Invest.,  
1961, 13, 357 - 368



- 99 - JOHANSSON B., Acta Chem Scand, 1960, 14, 510
- 100 - KARNOVSKY M.L., LAZDINS J.K., J. Immunol., 1979, 121, 809 - 813
- 101 - KEMPNER M.S., DINARELLO C.A., GALLIN J.I., J. Clin Invest., 1978, 1330 - 1336
- 102 - KIRKPATRICK C.H., GREEN I., RICH P.R., SCHADE A.L., J. Infect. Dis., 1971, 124, 539 - 544
- 103 - KLUGER M.J., ROTHENBURG B.A., Science, 1979, 203, 374 - 376
- 104 - KOENIG S., SCHILLINGER W., J. Biol. Chem., 1969, 244, 3283
- 105 - KOENIG S., SCHILLINGER W., J. Biol. Chem., 1969, 244, 6520
- 106 - KORNFELD S., Biochemistry, 1968, 7, 945 - 954
- 107 - KRYS TEVA M., MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J., F.E.B.S. letters, 1975, 56, 337 - 340
- 108 - LAUFBERGER V., Bull. Soc. Chim. Biol., 1937, 19, 1575 - 1582
- 109 - LAURELL C.B., INGELMAN B., Acta Chem Scand, 1947, 1, 770
- 110 - LEFELL M.S., SPITZNAGEL J.K., Infect. Immun., 1972, 6, 761 - 765
- 111 - LEGRAND D., MAZURIER J., METZ-BOUTIQUE M.H., JOLLES J., JOLLES P., MONTREUIL J., SPIK G., Biochim. Biophys. Acta, soumis à publication
- 112 - LUNDIN L., HALLGREN R., VENGE P., Scand J. Haematol., 1980, 25, 431 - 438



- 113 - MAC DONALD R.A., MAC SWEEN N.M., PECHET G.S.,  
Lab. Invest., 1969, 21/3, 236 - 245
- 114 - MC GILLIVRAY R.T.A., MENDEZ E., SINHA S.K., SUTTON M.R.,  
LINEBACK - ZINS J., BREW K.,  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1982, 79, 2504 - 2508
- 115 - MAC SWEEN R.N.M., MAC DONALD R.A.,  
Lab. Invest., 1969, 21/3, 230 - 235
- 116 - MACKOWIAK P.A., MARLING-CASON M., COHEN R.L.,  
The J. of. infectious diseases, 1982, 145, 550 - 553
- 117 - MALMQUIST J., Scand. J. Haemat., 1972, 9, 305 - 310
- 118 - MARKOVETZ B., VAN SNICK J.L., MASSON P.L., Thorax,  
1979, 34, 209 - 212
- 119 - MARTIN A., HUEBERS E., WEBB J., 5th Intern. Conf.  
Proteins of Iron storage and transport., Sapporo,  
Japan, 1983, 120
- 120 - MARZ L., HATTON M.W.C, BERRY L.R., REGOECZI E., CAN J.  
Biochem., 1982, 60, 624 - 630
- 121 - MASON D.Y., TAYLOR C.R., J. Clin  
Path., 1978, 31, 316 - 327
- 122 - MASSON P.L., HEREMANS J.F., SCHONNE E.,  
J. Exp. Med., 1969, 130, 643 - 659
- 123 - MASSON P.L., HEREMANS J.F.,  
in Protids of biological fluids, Peeters H., ed,  
Elsevier, Amsterdam, 1966, 14, 115 - 142
- 124 - MASSON P.,  
La Lactoferrine, Arscia.S.A. Ed., Bruxelles, 1970, 147
- 125 - MAZURIER J., SPIK G.,  
Biochim. Biophys. Acta, 1980, 629, 399 - 408



- 126 - MAZURIER J., LEGER D., TORDERA V., MONTREUIL J., SPIK G.,  
Eur. J. Biochem, 1981, 119, 537 - 543
- 127 - MAZURIER J., METZ-BOUTIQUE M.H., JOLLES J., SPIK G.,  
MONTREUIL J., JOLLES P.,  
Experientia, 1983, 39, 135 - 141
- 128 - MAZURIER J., LHOSTE J.M., MONTREUIL J., SPIK G.,  
Biochim. Biophys. Acta, 1983, 745, 44 - 49
- 129 - METCHNIKOFF E.,  
Ann. Inst. Pasteur, 1887, 1, 321
- 130 - METZ-BOUTIQUE M.H., JOLLES J., JOLLES P., MAZURIER J.,  
SPIK G., MONTREUIL J.,  
Biochim. Biophys. Acta, 1980, 622, 308 - 314
- 131 - METZ-BOUTIQUE M.H., MAZURIER J., JOLLES J., SPIK G.,  
MONTREUIL J.,  
Biochim. Biophys. Acta, 1981, 670, 243 - 254
- 132 - METZ-BOUTIQUE et al, communication personnelle, 1983
- 133 - MILLAR J.A., CUMMING R.L.C., SMITH J.,  
Biochem J, 1970, 119, 643 - 649
- 134 - MONTREUIL J., MULLET S.,  
C.R. Acad. Sci., 1960, 250, 1376
- 135 - MONTREUIL J., MULLET S.,  
C.R. Acad. Sci., 1960, 250, 1376
- 136 - MONTREUIL J., TONNELAT J., MULLET S.,  
Biochem. Biophys. Acta, 1960, 45, 413
- 137 - MONTREUIL J.,  
Pure and Applied Chem, 1975, 42, 431 - 477
- 138 - MONTREUIL J., SPIK G.,  
in " Proteins of Iron storage and transport  
in Biochemistry and Medicine " Crichton R.R.,  
ed, North - Holland, Amsterdam, 1975, 27 - 38



- 139 - MONTREUIL J., in " Comprehensive Biochemistry ", Elsevier ed, Amsterdam Oxford New-York, 1982, 193, 1 - 188
- 140 - MONTREUIL J., CHOSSON A., HAVEZ R., MULLET S., C.R. Acad. Sci., 1960, 154, 732. MONTREUIL J., Ann. Nutr. Alim., 1971, 25, A.1 - A.37
- 141 - MOROZ C., GILER S., KUPFER B., URCA I., New England J. Med, 1977, 297, 1172 - 1173
- 142 - NEUBERGER A., MARSHALL R.D., in " Carbohydrates and their rôle ", SCHULTZE H.W., CAIN R.F., WROLSTAD R.W., Eds, Avi , Westport, Conn. U.S.A., 1969, 115 - 132
- 143 - NISHISATO T., AISEN P., Br. J. Haematol., 1982, 52, 631 - 640
- 144 - NISHISATO T., AISEN P., " Sixth International Conférence of " Proteins of Iron storage and Transport " Sapporo, Japon, 1983, 134
- 145 - NORBERT J., ROBERTS J.R., Microbiological Reviews, 1979, 43, 241 - 249
- 146 - OLDEN K., PARENT J.B., WHITE S.L., Biochim. Biophys. Acta, 1982, 650, 209 - 232
- 147 - ORAM J.D., REITER B, Biochim. Biophys. Acta, 1968, 170, 351 - 366
- 148 - OSBORNE T.B.J, J. Am. Chem. Soc, 1899, 21, 477
- 149 - O'SHEA M.J., KERSHENOBICH D., TAVILL A.S., Br. J. Haematol, 1973, 25, 707 - 714
- 150 - PAN B.T., BLOSTEIN R., JOHNSTONE R.M., Biochem. J., 1983, 210, 37 - 47



- 151 - PEKAREK R.S., BOSTIAN K.A., BARTELONI P.J., CALIA F.M.,  
BEISEL W.R., Am. J. Med Sci., 1969, 258, 14 - 25
- 152 - PHILLIPS M.E., THORBECKE G.J.,  
Int. Arch. Allergy, 1966, 29, 553
- 153 - PHILLIPS J.L., AZARI P.,  
Arch. Biochem. Biophys., 1972, 151, 445
- 154 - PHILLIPS J.L.,  
Biochem. biophys. Res. Comm., 1976, 72, 634 - 639
- 155 - PHILLIPS J.L.,  
Biochem. biophys. Res. Comm., 1976, 71, 726 - 732
- 156 - PRIEELS J.P., PIZZO S.V., GLASGOW L.R., PAULSON J.C.,  
HILL R.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, 75,  
2215 - 2219
- 157 - PRINCIOTTO J.V., ZAPOLSKI E.J.,  
Nature, 1975, 255, 87
- 158 - REFSUM S.B., SCHREINER B., Scand.J. Gastroent.,  
1980, 15, 1013 - 1020
- 159 - REITER B., BROCK J.H., STEEL E.D., Immunology,  
1975, 28, 83 - 95
- 160 - REITER B., Int. J. Tiss. Reac., 1983, V, 87 - 96
- 161 - REISSMAN K.R., DIETRICH M.R., J. Clin. Invest.,  
1956, 35, 588
- 162 - REYNOLDS H.Y., ATKINSON J.P., NEWBALL H.H.,  
FRANK M.M., J. Immunol., 1975, 114 - 1813
- 163 - ROGERS H.J., Immunology, 1976, 30, 425 - 433
- 164 - ROGERS H.J., SYNGE C., Immunology, 1978, 34, 19 - 28



- 165 - RØMER F.K., AHLBOM G., JENSEN J.U.,  
Eur. J. Respir. Dis., 1982, 63, 330 - 336
- 166 - ROSS C.E., MUIR W.A., GRAHAM R.C., KELLERMEYER R.W.,  
Am. J. Clin. Path., 1975, 63, 179
- 167 - RYMER J.C., Path. Biol., 1981, 29/5, 301 - 304
- 168 - SCATCHARD G., Ann. N-Y Acad. Sci., 1949, 51, 660 - 672
- 169 - SHADDUCK R.K., PIGOLI G., WAHEED A., BOEGEL F.,  
J. Of Supramolecular Structure, 1980, 14, 423 - 429
- 170 - SCHADE A.L., CAROLINE L., Science, 1944, 100, 14 - 15
- 171 - SCHADE A.L., CAROLINE L., Science, 1946, 104, 340 - 341
- 172 - SCHADE A., REINHART R.W., LEVY H.,  
Arch. Biochem., 1949, 26, 170
- 173 - SCHADE A.L.,  
in Protides of the biological fluids ,  
8ème Colloque de Bruges, Elsevier Ed, 1961, 261
- 174 - SCHLABACH M.R., BATES G.W.,  
J. Biol. Chem., 1975, 250, 2182
- 175 - SHEPHERD V.L., LEE Y.C., SCHLESINGER P.H., STAHL P.,  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1981, 78, 1019 - 1022
- 176 - SHEPHERD V.L., CAMPBELL E.J., SENIOR R.M., STAHL D.,  
J. Reticuloendo. Soc., 1982, 32, 423 - 431
- 177 - SIMKISS K., Endeavour, 1979, 3, 2 - 6
- 178 - SIMON M., HESPEL J.P., BRISSOT P., FAUCHET R.,  
EDAN G., LE REUN M., LE MIGNON L., GENETET B.,  
BOUREL M., Ann. Méd. Interne, 1981, 132, 413 - 433



- 179 - SPIK G., VANDERSYPPE R., FOURNET B., BAYARD B.,  
CHARET P., BOUQUELET S., STRECKER G., MONTREUIL J.,  
Actes Coll. Intern., 1974, 221, 483 - 500
- 180 - SPIK G., BAYARD B., FOURNET B., STRECKER G.,  
BOUQUELET S., MONTREUIL J.,  
F.E.B.S. letters, 1975, 50, 296 - 299
- 181 - SPIK G., MAZURIER J.,  
in Proteins of iron métabolism, Brown Ed,  
New-York, 1977, 143 - 159
- 182 - SPIK G., Falk Symposium n° 34 on structural  
Carbohydrates in the Liver, Basel, 1982, 42
- 183 - SPIK G.,  
in " The Biochemistry and Physiology of Iron"  
SALTMAN P., HEGENAUER J., eds, Elsevier North-Holland  
1982, 49 - 56
- 184 - SPIK G., MONTREUIL J.,  
Bull. Europ. Physiopath. resp. 1983, 19, 123 - 130
- 185 - STAHL P., RODMAN J., MILLER J., SCHLESINGER P.,  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1978, 75, 1399 - 1403
- 186 - STAHL P., SCHLESINGER P.H., SIGARDSON E., RODMAN J.S.,  
LEE Y.C., Cell, 1980, 19, 207 - 217
- 187 - STAHL P., GORDON S., J. Cell Biol, 1982, 93, 49 - 56
- 188 - STEPHENS S., DOLBY J.B., MONTREUIL J., SPIK G.,  
Immunology, 1980, 41, 597 - 603
- 189 - STOSSEL T.P.,  
Seminars in Hematology, 1975, 12, 83 - 116
- 190 - SULLIVAN R., GANS P.J., Mc CARROLL L.A.,  
J. of. Immunol., 1983, 130, 800 - 807



- 191 - SUSSMAN SS,  
in " Iron in Biochemistry and Medicine "  
Jacobs A and Wordwood M. (Ed)., Acad. Press,  
1974, 4, 649 - 679
- 192 - TAN A.T., WOODWORTH R.C.,  
J. Polym. Sci. Part. C., 1970, 599
- 193 - TIETZE C., SCHLESINGER P., STAHL P.,  
J. Cell. Biol., 1982, 92, 417 - 424
- 194 - TOMIMATSU Y., DONOVAN J.W.,  
F.E.B.S. Letters, 1976, 71/2, 299 - 302
- 195 - TURNBULL A.,  
in Iron in Biochemistry and Medicine, A. Jabobs and  
Worwood Ed., Acad. Press, London, 1974, 370 - 404
- 196 - VALBERG L.S., SIMON J.B., MANLEY P.N., CORBETT W.E.,  
LUDWIG J., J. Lab. Clin. Med., 1975, 86, 479
- 197 - VAN BOCKXMEER F., HEMMAPLARDH D., MORGAN E.H.,  
in " Proteins of Iron Storage and Transport  
in Biochemistry and Medicine ", Crichton R.R. (Ed)  
North-Holland, Amsterdam, 1975, 111 - 119
- 198 - VAN BOCKXMEER F.M., MORGAN E.H.,  
Bioch. Biophys. Acta, 1979, 584, 76 - 83
- 199 - VAN FURTH R., COHN Z.A.,  
J. Exp. Med., 1968, 128, 415 - 433
- 200 - VAN FURTH R., DIESSELHOFF - DEN DULK M., MATTIE H.,  
J. Exp. Med., 1973, 138, 1314 - 1330
- 201 - VAN FURTH R., in The mononuclear Phagocyte,  
VAN FURTH R. ed, Blackwells, Oxford, 1970, 151



- 202 - VAN SNICK J.L., MASSON P.L., HEREMANS J.F.,  
J. Exp. Med., 1974, 140, 1068 - 1084
- 203 - VAN SNICK J.L., MASSON P.L.,  
J. Exp. Med., 1976, 144, 1568 - 1580
- 204 - VAN SNICK J.L., MARKOWETZ B., MASSON P.L.,  
J. Exp. Med., 1977, 146, 817 - 827
- 205 - WALSH R.J., THOMAS E.D., CHOW S.K., FLUNARTY R.G.,  
FINCH A., Science, 1949, 110, 396 - 398
- 206 - WARNER R.C., WEBER F., J. Amer Chem. Soc, 1952,  
75, 5094
- 207 - WARR G.A., Biochem. Biophys. Res. Com., 1980, 93  
737 - 745
- 208 - WEINBERG E.D., Science, 1974, 184, 952 - 956
- 209 - WEINBERG S., Microbiological Reviews,  
1978, 42/1, 45 - 66
- 210 - WHEBY M.S., CROSBY W.H.,  
Blood, 1963, 22, 416 - 428
- 211 - WHITCOMB M.E., Am. Rev. Resp. Dis., 1978, 118, 431
- 212 - WILLIAMS J., ELLEMAN T.C., KINGSTON I.B.,  
WILKINS A.G., KUHN K.A.  
Eur. J. Biochem., 1982, 122, 297 - 303
- 213 - WING E.J., WAHEED A., SHADDUCK R.K., NAGLE L.S.,  
STEPHENSON K., 1982, 69, 270 - 276
- 214 - WUEST D., CRANE R., RINEHART J.J.,  
J. Reticulo. Soc., 1981, 30/2, 147 - 155



- 215 - WYLLIE J.C.  
Br. J. Haema., 1977, 37, 17 - 24
- 216 - WYLLIE J.L., KAUFMAN N.,  
Br. J. Haema., 1971, 20, 321 - 327
- 217 - ZUCALI J.R., BROXMEYER H.E., ULATOWSKI J.A.,  
Blood, 1979, 54, 951 - 954.





## RÉSUMÉ

Les transferrines (sérotransferrine et lactotransferrine) sont des glycoprotéines de transport du fer qui interagissent avec des récepteurs membranaires de différentes cellules-cibles.

Dans le cadre des études entreprises au laboratoire sur le rôle biologique des transferrines dans la régulation du métabolisme du fer, nous avons étudié plus particulièrement la fixation des transferrines et le transfert du fer aux macrophages alvéolaires humains. Nos recherches ont conduit à la mise en évidence à la surface des monocytes et des macrophages alvéolaires humains, de sites récepteurs de l'aposérotransferrine, de la sérotransferrine saturée en fer et de la lactotransferrine saturée ou non en fer. Ces récepteurs fixent les transferrines d'une manière spécifique, réversible et dépendante de la température. En outre, l'inhibition de la fixation de la lactotransferrine sur les récepteurs des macrophages par des néoglycosylprotéines démontre l'intervention des glycanes de la lactotransferrine dans le mécanisme de reconnaissance et de fixation de cette dernière par la membrane macrophagique.

Les expériences de cinétique de transfert du métal réalisées à l'aide de transferrines marquées au  $^{59}\text{Fe}$ , font apparaître de nettes différences dans les mécanismes du prélèvement du fer. En effet, la sérotransferrine saturée en fer est endocytée, puis exocytée sous forme d'aposérotransferrine, tandis que la lactotransferrine saturée en fer n'est pas exocytée, étant vraisemblablement dégradée par les enzymes du macrophage.

L'ensemble de nos recherches souligne l'importance des interactions des transferrines avec les récepteurs du macrophage dans la régulation du métabolisme du fer plasmaticque.

MOYS CHERRA : Lactotransferrine    Macrophage alvéolaire    Transferrine  
Rénochromatose    Monocyte    Métabolisme du fer