

N° d'ordre : 144

50376
1987
355

50376
1987
355

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

par

Yves LECLERCO



INTERACTIONS TRANSFERRINES MACROPHAGES : ROLE DES GLYCANNES DANS LA RECONNAISSANCE PAR LES RECEPTEURS MEMBRANAIRES DU MACROPHAGE PERITONEAL DE SOURIS

Exemplaire corrigé après avis du jury

Présentée le 29 Octobre 1987 devant la Commission d'Examen

Président :	J. MONTREUIL
Rapporteur :	M. MONSIGNY
Rapporteur :	G. STRECKER
Examineur :	G. SPIK
Examineur :	G. SAWATZKI

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

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

A Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL

C'est au sein de votre Laboratoire que ce travail a pu être réalisé, je vous suis reconnaissant de m'y avoir accueilli et tiens à vous témoigner mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Michel MONSIGNY

Vous avez accepté de juger ce travail. Je tiens à vous exprimer mes plus vifs remerciements pour avoir accepté d'être le rapporteur de cette thèse et pour l'intérêt que vous voulez bien porter à ce travail.

A Monsieur le Docteur Gérard STRECKER

Gérard, tu m'as fait l'honneur de juger ce travail. Tes conseils m'ont toujours été précieux. Permits moi de t'adresser tous mes remerciements.

A Mademoiselle le Professeur Geneviève SPIK

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre équipe et de m'avoir permis de réaliser ce travail. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Günther SAWATZKI

Je suis très honoré de votre présence dans ce jury. Ce travail n'a pu être réalisé que grâce à votre collaboration et je tiens à vous adresser mes plus vifs remerciements. Soyez assuré de mon profond respect.

Que tous ceux qui à des titres divers m'ont accordé leur aide et leur amitié soient ici remerciés.

ABREVIATIONS

LTF :	Lactotransferrine
STF :	Sérotransferrine
BSA :	Sérum albumine bovine
Fuc :	L-fucose
Gal :	D-galactose
Man :	D-mannose
Glc :	D-glucose
GlcNAc :	N-acétyl-D-glucosamine
NeuAc :	Acide-5-N-acétyl-neuraminique
EDTA :	Acide éthylène diamine tétra-acétique
HEPES :	Acide N-2-hydroxyéthylpiperazine-N'-2-éthanesulfonique
MOPS :	Acide N-3- morpholinopropane sulfonique
TRIS :	Tris-hydroxyméthyl-aminométhane
SDS :	Sodium dodécyl sulphate
CPM :	Coups par minute

SOMMAIRE

INTRODUCTION

GENERALITES

LE FER DANS L'ORGANISME HUMAIN

- I - LA REPARTITION ET L'IMPORTANCE DU FER DANS L'ORGANISME p 4
- II - LE CYCLE DU FER p 4
- III - LES PROTEINES DE STOCKAGE ET DE TRANSPORT DU FER p 6
 - A - LA FERRITINE p 6
 - B - LES TRANSFERRINES p 8
 - 1 - La sérotransferrine
 - 2 - La lactotransferrine

GENERALITES SUR LES LACTOTRANSFERRINES

- I - ETUDES STRUCTURALES ET CONFORMATIONNELLES DES LACTOTRANSFERRINES p 11
 - A - LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE p 11
 - 1 - La séquence primaire
 - 2 - Structure tertiaire et conformation
 - a - Lobes N et C-terminaux
 - b - Diffraction aux rayons X
 - c - Emplacement des ponts disulfures
 - 3 - Structure et conformation des glycannes
 - a - Localisation des glycannes sur la chaîne peptidique
 - b - Structure des glycannes
 - c - Conformation des glycannes
 - 4 - Les sites de fixation du fer

B - <u>LA LACTOTRANSFERRINE DE VACHE</u>	p 19
1 - Structure de la partie protéique	
2 - Structure de la partie glycanique	
a - Localisation des glycanes sur la chaîne peptidique	
b - Structure des glycanes	
C - <u>LA LACTOTRANSFERRINE DE SOURIS</u>	P 22
D - <u>LES LACTOTRANSFERRINES D'ORIGINES DIVERSES</u>	p 25
1 - Structure de la partie protéique	
2 - Structure de la partie glycanique	
II - <u>ROLES BIOLOGIQUES DE LA LACTOTRANSFERRINE</u>	p 26
A - <u>ROLE DANS LA NUTRITION MARTIALE DU NOURRISSON ET DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER</u>	p 26
B - <u>ROLE DANS LES MECANISMES DE DEFENSE ANTI-INFECTIEUSE</u>	p 28
1 - Rôle dans l'immunité humorale	
2 - Rôle dans l'immunité à médiation cellulaire	
a - Régulation de la myélopoïèse	
b - Contrôle de la production et de l'action des radicaux libres	
c - Contrôle de la migration des cellules immunocompétentes sur le lieu de l'inflammation	
d - Contrôle de l'hyposidérémie inflammatoire	
D - <u>CONCLUSION</u>	p 36
GENERALITES SUR LES MACROPHAGES	
I - <u>CARACTERISTIQUES GENERALES DES MACROPHAGES</u>	p 38
A - <u>ULTRASTRUCTURE ET CYTOCHIMIE DES MACROPHAGES</u>	p 38
1 - Ultrastructure	
2 - Cytochimie	
B - <u>ORIGINE ET LOCALISATION DES MACROPHAGES</u>	p 39

<u>II - FONCTIONS IMMUNITAIRES DU MACROPHAGE</u>	p 43
A - <u>LA DESTRUCTION DES MICROORGANISMES : LA PHAGOCYTOSE</u>	p 44
B - <u>ROLE DANS LA REPOSE IMMUNE : INTERACTION MACROPHAGE- LYMPHOCYTE</u>	p 46
C - <u>DESTRUCTION DES CELLULES TUMORALES</u>	p 46
<u>III - ETUDE DES RECEPTEURS MEMBRANAIRES DU MACROPHAGE</u>	p 48
A - <u>LES RECEPTEURS A Fc</u>	p 48
B - <u>LE RECEPTEUR DU COMPLEMENT C3</u>	p 49
C - <u>LES RECEPTEURS DES FACTEURS DE MIGRATION</u>	p 49
D - <u>LE RECEPTEUR DE LA SEROTRANSFERRINE</u>	p 50
E - <u>LES RECEPTEURS LECTINIQUES</u>	p 52
1 - Le récepteur à galactose	
2 - Le récepteur à mannose	
3 - Le récepteur à mannose-6-phosphate	
4 - Les récepteurs à fucose	
 INTERACTION LACTOTRANSFERRINE - MACROPHAGE : ROLE DANS LE METABOLISME DU FER	
I - <u>ROLE DU MACROPHAGE DANS LE METABOLISME DU FER</u>	p 58
A - <u>ROLE DU MACROPHAGE DANS LE CATABOLISME DE L'HEMOGLOBINE</u>	p 58
B - <u>ROLE DU MACROPHAGE DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER</u>	p 58
II - <u>INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC LE METABOLISME DU FER</u>	p 59
A - <u>LACTOTRANSFERRINE ET DEFICIENCE EN FER : L'INFLAMMATION</u>	p 59

B - <u>LACTOTRANSFERRINE ET SURCHARGE EN FER : L'HEMOCHROMATOSE</u>	p 60
III - <u>INTERACTION LACTOTRANSFERRINE - MACROPHAGE</u>	p 61
A - <u>CAPTURE DE LA LACTOTRANSFERRINE IN VIVO</u>	p 61
1 - Capture par les hépatocytes	
2 - Capture par le système réticulo-endothélial	
B - <u>INTERACTION LACTOTRANSFERRINE - MACROPHAGE IN VITRO</u>	p 63
1 - Sites de fixation et affinité	
a - Fixation sur les monocytes	
b - Fixation sur les macrophages	
2 - Nature des sites de fixation	
a - Fixation non spécifique	
b - Fixation spécifique	
IV - <u>CONCLUSION</u>	

TRAVAUX PERSONNELS

PREPARATION DES LACTOTRANSFERRINES

I - <u>PREPARATION DES LACTOTRANSFERRINES NATIVES</u>	p 67
A - <u>PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE</u>	p 67
1 - Matériels et méthodes	
a - Isolement à partir du lait humain	
b - Isolement à partir de leucocytes humains	
2 - Résultats	p 68
B - <u>PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE DE SOURIS</u>	p 70
C - <u>PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE DE VACHE</u>	p 70
1 - <u>Matériels et méthodes</u>	p 70
2 - <u>Résultats</u>	p 71
3 - <u>Discussion</u>	p 71

II - <u>SATURATION ET DESATURATION DES LACTOTRANSFERRINES</u>	p 72
A - <u>PREPARATION DES LACTOTRANSFERRINES SATUREES EN FER</u>	p 72
B - <u>PREPARATION DE L'APOLACTOTRANSFERRINE</u>	p 72
1 - <u>Mise au point du tampon de désaturation</u>	
a - Matériels et méthodes	
b - Résultats	
c - Discussion	
2 - <u>Désaturation de la lactotransferrine</u>	
a - Matériels et méthodes	
b - Résultats	
c - Discussion	
III - <u>PREPARATION DES LACTOTRANSFERRINES MARQUEES</u>	p 78
A - <u>MARQUAGE A L'¹²⁵I</u>	p 78
1 - Réactifs	
2 - Mode opératoire	
B - <u>MARQUAGE AU ⁵⁹Fe</u>	p 78
IV - <u>PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE DEFUCOSYLEE</u>	p 79
A - <u>MATERIELS ET METHODES</u>	p 79
1 - Méthodes d'étude de la structure des glycanes	
a - Hydrazinolyse	
b - Chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire	
c - Microméthylation	
2 - Défucosylation de la lactotransferrine humaine	
B - <u>RESULTATS</u>	p 81
C - <u>DISCUSSION</u>	p 84

DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES GLYCANNES DES TRANSFERRINES DU LAIT ET DU SANG DE SOURIS

I - <u>INTRODUCTION</u>	p 87
II - <u>MATERIELS ET METHODES</u>	p 87
A - <u>MATERIELS</u>	p 87
B - <u>METHODES</u>	p 87
1 - Isolement des transferrines	
2 - Techniques immunologiques et électrophorétiques	
3 - Préparation des oligosaccharides par hydrolyse alcaline	
4 - Composition en sucre	
5 - Analyses des oligosaccharides après méthylation	
6 - Spectroscopie RMN	
III - <u>RESULTATS</u>	p 89
A - <u>ISOLEMENT DES TRANSFERRINES</u>	p 89
B - <u>ANALYSES DE LA CHAINE POLYPEPTIDIQUE DES TRANSFERRINES</u>	p 89
C - <u>DETERMINATION DES STRUCTURES PRIMAIRES DES OLIGOSACCHARI DES-ALDITOLS</u>	p 90
1 - Composition en sucre	
2 - Analyse après méthylation	
3 - Analyse par spectroscopie RMN à 400-MHz	
IV - <u>DISCUSSION</u>	p 93
V - <u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	

MISE EN EVIDENCE DES RECEPTEURS DE TRANSFERRINES SUR LES
MACROPHAGES PERITONEAUX DE SOURIS

I - <u>INTRODUCTION</u>	p 96
II - <u>MATERIELS ET METHODES</u>	p 96
A - <u>MATERIEL CELLULAIRE</u>	p 96
1 - Milieu de culture et tampons	
a - Milieu de culture	
b - Tampon de Hank's	
2 - Isolement des macrophages péritonéaux de souris	
3 - Test de viabilité au bleu trypan	
B - <u>LES TRANSFERRINES</u>	p 98
1 - Les lactotransferrines	
2 - Les sérotransferrines	
C - <u>METHODES D'ETUDE DE L'INTERACTION TRANSFERRINE - MACROPHAGES</u>	p 98
1 - Fixation des transferrines sur le macrophage	
2 - Dosage des protéines membranaires	
3 - Expression des résultats	
III - <u>RESULTATS</u>	p 100
A - <u>MISE EN EVIDENCE DE LA PRESENCE DU RECEPTEUR DE LA SEROTRANSFERRINE DES MACROPHAGES PERITONEAUX DE SOURIS</u>	p 100
1 - Fixation de la sérotransferrine du sang de souris sur les macrophages	
a - Macrophages péritonéaux fraîchement isolés	
b - Macrophages après 5 jours de culture <u>in vitro</u>	
2 - Fixation de la sérotransferrine du lait de souris sur les macrophages	
a - Macrophages péritonéaux fraîchement isolés	
b - Macrophages après 5 jours de culture <u>in vitro</u>	

B - MISE EN EVIDENCE DE LA PRESENCE DE DEUX RECEPTEURS DE LA LACTOTRANSFERRINE DES MACROPHAGES PERITONEAUX DE SOURIS p 106

- 1 - Fixation de la lactotransferrine de souris sur les macrophages
- 2 - Fixation de la lactotransferrine humaine sur les macrophages
- 3 - Fixation de l'apolactotransferrine humaine sur les macrophages
- 4 - Fixation de la lactotransferrine humaine défucosylée sur les macrophages

IV - CONCLUSION p 112

A - LE RECEPTEUR DE LA SEROTRANSFERRINE p 112

B - LES RECEPTEURS DE LA LACTOTRANSFERRINE p 112

ISOLEMENT D'UN RECEPTEUR LECTINIQUE DES MACROPHAGES PERITONEAUX DE SOURIS

I - INTRODUCTION p 114

II - ISOLEMENT DES MEMBRANES DU MACROPHAGE p 114

A - MATERIELS ET METHODES p 114

- 1 - Matériel cellulaire
- 2 - Solubilisation de la fraction membranaire
- 3 - Les lactotransferrines
- 4 - Incubation des membranes avec la lactotransferrine
 - a - En fonction du pH
 - b - Expériences d'inhibition

B - RESULTATS p 116

- 1 - Fixation de la lactotransferrine en fonction du pH
 - a - La lactotransferrine de souris
 - b - La lactotransferrine humaine
- 2 - Spécificité de fixation des lactotransferrines à pH 4,5
 - a - La lactotransferrine de souris
 - b - La lactotransferrine humaine
- 3 - Spécificité de fixation des lactotransferrines à pH 7
 - a - La lactotransferrine de souris
 - b - La lactotransferrine humaine

C - CONCLUSION p 121

III - ISOLEMENT ET PROPRIETES DU RECEPTEUR p 122

A - MATERIELS ET METHODES p 122

- 1 - Couplage de la lactotransferrine humaine au Sépharose 4B
 - a - Activation du Sépharose 4B par le bromure de cyanogène
 - b - Couplage de la lactotransferrine humaine
- 2 - Chromatographie d'affinité
- 3 - Incubation du récepteur avec la lactotransferrine humaine
 - a - Influence du pH et du calcium, cinétique de fixation
 - b - Réversibilité de la fixation
 - c - Affinité du récepteur pour la lactotransferrine humaine
- 4 - Analyses électrophorétiques
 - a - Préparation des échantillons
 - b - Electrophorèse en gel de polyacrylamide
 - c - Electrotransfert sur nitrocellulose
 - d - Révélation

B - RESULTATS p 125

- 1 - Isolement du récepteur
- 2 - Etude des principales propriétés du récepteur
 - a - Masse moléculaire
 - b - Fixation de la lactotransferrine humaine en fonction du pH
 - c - Cinétique de fixation de la lactotransferrine humaine
 - d - Réversibilité de la fixation de la lactotransferrine humaine
 - e - Affinité du récepteur pour la lactotransferrine humaine
 - f - Effet du calcium sur la fixation de la lactotransferrine humaine

C - CONCLUSION p 132

IV - SPECIFICITE DE RECONNAISSANCE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE PAR LE RECEPTEUR p 132

A - MATERIELS ET METHODES P 132

- 1 - Les glycoprotéines
 - a - Les transferrines

- b - Les néoglycoprotéines
 - c - Autres glycoprotéines
- 2 - Expériences d'inhibition

B - RESULTATS

p 135

- 1 - Inhibition par les néoglycoprotéines
- 2 - Inhibition par les sérotransferrines de souris
- 3 - Inhibition par les lactotransferrines
 - a - Inhibition par les lactotransferrines du lait
 - b - Inhibition par la lactotransferrine isolée de leucocytes humains
 - c - Inhibition par la lactotransferrine humaine défucosylée
- 4 - Inhibition par l'orosomucoïde et l'ovalbumine

C - CONCLUSION

p 141

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Depuis son isolement à partir du lait humain en 1960 par MONTREUIL et al. (MONTREUIL et MULLET, 1960; MONTREUIL et al., 1960), la lactotransferrine a fait l'objet de nombreuses recherches, en particulier au Laboratoire. Si la structure de la lactotransferrine humaine est actuellement bien connue, les fonctions biologiques qui lui sont attribuées restent encore très controversées.

La lactotransferrine, seule ou en association avec d'autres produits de sécrétion comme les IgA et le lysozyme, joue un rôle important dans la protection contre l'infection des muqueuses. En revanche, le rôle éventuel de la lactotransferrine dans la régulation du métabolisme du fer et dans l'immunité à médiation cellulaire reste mal connu.

Le mécanisme actuellement proposé pour le contrôle de l'hyposidérémie inflammatoire, lors d'une agression bactérienne, fait intervenir l'existence d'un récepteur de la lactotransferrine à la surface du macrophage (VAN SNICK et al., 1974; SPIK et MONTREUIL, 1983).

En 1978, PRIEELS et al. ont montré que la clairance de la lactotransferrine humaine par le foie se faisait par l'intermédiaire d'un récepteur lectinique reconnaissant le fucose lié en $\alpha(1,3)$. De plus, la fixation de la lactotransferrine humaine sur le macrophage alvéolaire humain est inhibée par des néoglycoprotéines à mannose et à fucose, suggérant ainsi l'existence sur le macrophage alvéolaire humain d'un récepteur de type lectinique capable de reconnaître des glycanes renfermant des résidus de fucose ou de mannose en position externe (GOAVEC et al., 1985). Ce récepteur lectinique pourrait être impliqué dans la reconnaissance de la lactotransferrine par le macrophage lors d'une inflammation.

L'hypothèse de la participation de la lactotransferrine à l'hyposidérémie de l'inflammation repose sur la supposition que la lactotransferrine des neutrophiles se comporte de façon identique à celle du lait, et se fixe aux macrophages où elle est capable de céder son fer à la ferritine (VAN SNICK et MASSON, 1976; VAN SNICK et al., 1977). En 1987, MOGUILVSKY a montré que les lactotransferrines humaines du lait et des leucocytes possédaient des propriétés physico-chimiques similaires quant à leur masse moléculaire, leur point isoélectrique et leur interaction avec le fer. En revanche, des

études réalisées au Laboratoire ont montré que la partie glycanique différait suivant l'origine de la lactotransferrine humaine. En effet, la lactotransferrine leucocytaire ne possède pas de fucose lié en $\alpha(1,3)$ sur un résidu de N-acétyl-D-glucosamine (DERISBOURG, 1987; DERISBOURG et al., 1987). Cette différence pouvant jouer un rôle capital dans l'interaction des lactotransferrines avec le récepteur du macrophage, nous nous sommes particulièrement intéressé à l'implication que pouvait avoir les différences structurales des glycanes de différentes transferrines dans les mécanismes de reconnaissance des récepteurs du macrophage.

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la thématique du Laboratoire : "relation structure-fonction des transferrines" et fait suite aux travaux réalisés par GOAVEC (1983). L'obtention de macrophages alvéolaires humains en quantité suffisante nous ayant posé quelques problèmes, nous nous sommes orienté vers un modèle animal plus accessible d'une part et permettant d'autre part, d'envisager des expériences de clairance in vivo. C'est le modèle d'interaction lactotransferrine de souris avec les macrophages péritonéaux de souris qui a été choisi, en raison de la possibilité d'obtenir aisément, grâce à une collaboration avec le Docteur G.SAWATZKI, de la lactotransferrine à partir du lait de souris.

Néanmoins, avant d'étudier la nature et la spécificité du récepteur responsable de la fixation de la lactotransferrine sur le macrophage, nous avons effectué la structure des glycanes de la sérotransferrine du sang de souris, de la lactotransferrine et d'une transferrine immunologiquement identique à la sérotransferrine du sang de souris et présente dans le lait de souris en quantité trois fois supérieure à celle de la lactotransferrine de souris.

Nous avons, par la suite, préciser les principaux paramètres de l'interaction lactotransferrine-récepteur en nous intéressant plus particulièrement au rôle joué par le fucose dans le mécanisme de reconnaissance. Enfin, nous avons isolé le récepteur lectinique des macrophages péritonéaux de souris reconnaissant la lactotransferrine et étudié sa spécificité de reconnaissance.

L'ensemble des travaux que nous avons réalisé a fait l'objet des communications et publications suivantes :

Communications

- 1 - "Heterogeneity of transferrin glycans : tissues specificity and importance of the polypeptide chain."
SPIK, G., CODDEVILLE, B., LECLERCQ, Y., WIERUSZESKI, J.M.,
SAWATZKI, G., STRATIL, A. et MONTREUIL, J.
VIII Colloque International sur les Protéines de Transport et
d'Emmagasinage du Fer. (QUEBEC, CANADA, 10 au 14 mai 1987).

- 2 - "Species specificity of lactotransferrin glycans."
SPIK, G., CODDEVILLE, B., LECLERCQ, Y., WIERUSZESKI, J.M., EGGE,
H. et MONTREUIL, J.
IX International Symposium on Glycoconjugates. (LILLE, FRANCE, 6
au 11 juillet 1987).

- 3 - "Analysis of the implication of the glycan moiety of mouse
lactotransferrin in the interaction with mouse enterocyte
receptor."
HU, W.L., LECLERCQ, Y., MAZURIER, J., MONTREUIL, J. et SPIK G.
Iron Club. (GLASGOW, SCOTLAND, 19 au 21 septembre 1987).

Publications

- 1 - "Primary structure of the glycans from mouse milk and serum
transferrins."
LECLERCQ, Y., SAWATZKI, G., WIERUSZESKI, J.M., MONTREUIL, J. et
SPIK, G. Biochemical Journal (1987) 247, 571-573.

- 2 - "Isolation of a glycoprotein binding lectin from mouse peritoneal
macrophages : role of fucose in lactotransferrin recognition."
LECLERCQ, Y., GOAVEC, M., SAWATZKI, G., MONTREUIL, J. et SPIK, G.
(en préparation).

GENERALITES

LE FER DANS L'ORGANISME HUMAIN

I - LA REPARTITION ET L'IMPORTANCE DU FER DANS L'ORGANISME

Le fer est un élément essentiel à la vie et à la croissance de tous les organismes eucaryotes ou procaryotes. Il joue un rôle important dans le transport physiologique et le stockage de l'oxygène moléculaire, dans le métabolisme oxydatif d'un très grand nombre de composés, dans l'hydroxylation de nombreux métabolites, dans le processus de transfert des électrons et dans la décomposition ou l'utilisation de l'eau oxygénée.

Le fer est pondéralement le plus important des métaux lourds dans l'organisme. Plus des deux tiers du fer servent à transporter l'oxygène dans les tissus par l'intermédiaire de l'hémoglobine ou à le stocker par l'intermédiaire de la myoglobine.

Une part importante du fer est stockée dans les cellules réticulo-endothéliales de la rate, du foie et de la moëlle osseuse mais aussi dans les cellules parenchymateuses du foie, sous forme de ferritine. Les deux autres molécules capables de séquestrer spécifiquement le fer et de le maintenir sous forme soluble et biodisponible sont la lactotransferrine et la sérotransferrine qui jouent un rôle important dans la répartition du fer entre les différents tissus.

II - LE CYCLE DU FER

Le cycle du fer dans l'organisme humain est décrit dans la figure 1 p.5. Dans les conditions normales, le métabolisme du fer fonctionne en circuit fermé grâce à une réutilisation très efficace des différentes

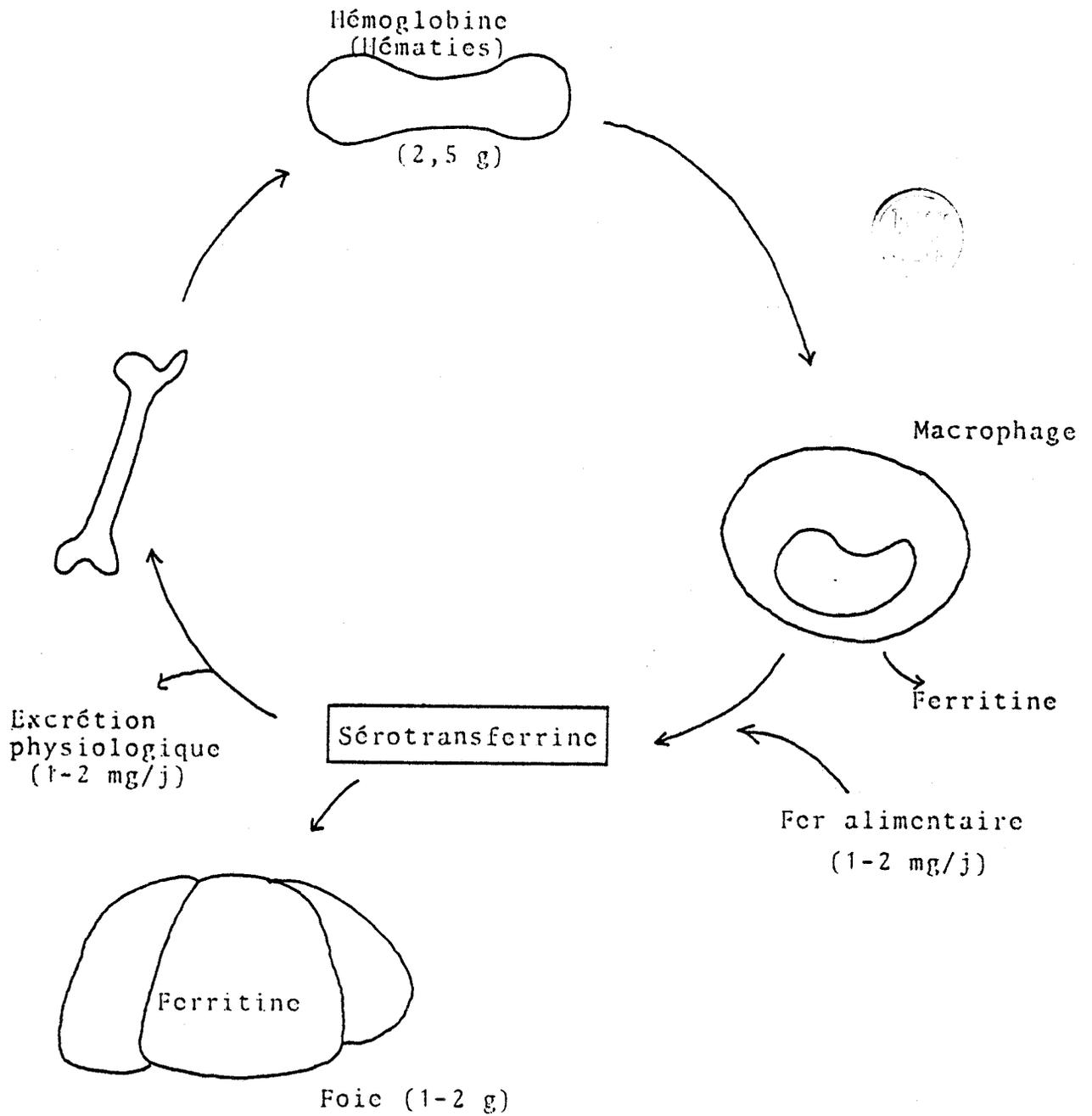


Figure 1 : Le cycle du fer dans l'organisme humain,
d'après RYMER (1981)

sources de fer.

La sérotransferrine cède le fer, prélevé dans les sites d'absorption (les cellules muqueuses intestinales), dans les sites de réserve (le parenchyme hépatique) et dans les sites de catabolisme de l'hémoglobine (les cellules réticulo-endothéliales du foie, de la rate et de la moëlle osseuse) aux sites d'utilisation, dans la moëlle osseuse où le fer participe à la synthèse d'hémoglobine lors du développement des cellules de la lignée érythropoïétique, mais aussi à toutes les autres cellules de l'organisme qui ont besoin de fer.

Le foie constitue un organe important de réserve en fer qui se répartit pour deux tiers dans la ferritine et pour un tiers dans l'hémosidérine. La répartition du fer dans les différentes formes de réserve, de transport ou fonctionnelle est représentée dans la figure 2 p. 7.

III - LES PROTEINES DE STOCKAGE ET DE TRANSPORT DU FER

Nous ne parlerons pas ici des protéines de transport et de stockage d'oxygène.

A - LA FERRITINE

La ferritine, avec l'hémosidérine qui est produite par la dégradation et l'agrégation intralysosomique de la ferritine, assure le stockage du quart du fer total chez l'homme.

La molécule de ferritine est formé de deux parties : un noyau minéral d'hydroxyde de fer ferreux et une coquille protéique creuse, d'environ 12 nm de diamètre externe, constituée de 24 sous-unités équivalentes. Chaque sous-unité est composée de 174 acides aminés (HEUSTERSPREUTE et CRICHTON, 1981). En ce qui concerne l'apoferritine de rate humaine, on reconnaît l'existence de deux classes de sous-unités différentes.

Les séquences primaires de nombreuses ferritines d'origines diverses sont actuellement connues ainsi que leur structure tridimensionnelle grâce aux études de diffraction aux rayons X après

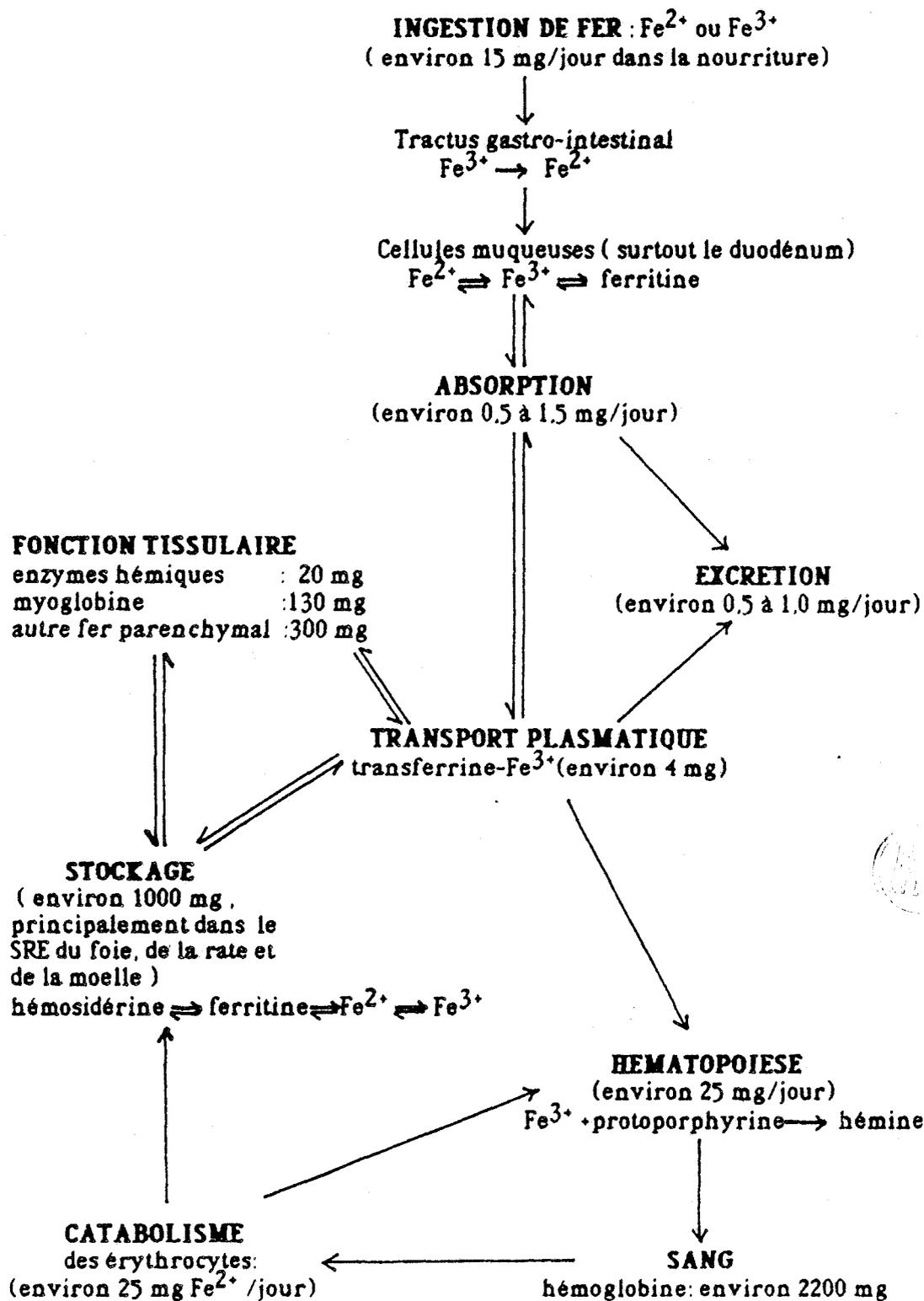


Figure 2 : La répartition du fer dans les différentes formes de réserve, d'après HERBERT (1971)

crystallisation (revues générales : HARRISON et al., 1985; CRICHTON et CHARLOTEAUX-WAUTERS, 1987).

Dans la coquille protéique, il existe deux sortes de canaux à travers lesquels de petites molécules ou ions peuvent s'échanger avec la cavité centrale. Six canaux sont très hydrophobes et peuvent servir d'accès au Fe^{2+} . Huit autres canaux hydrophiles peuvent aussi être impliqués dans la capture et la mobilisation de fer (CRICHTON et CHARLOTEAUX-WAUTERS, 1987).

La ferritine est présente dans toutes les cellules de l'organisme ainsi que dans le sérum. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'incorporation du fer dans la molécule d'apoferritine. Il est cependant admis que le fer pénètre à l'intérieur de la coquille d'apoferritine sous forme ferreux et qu'il y est oxydé puis incorporé dans la micelle (MACARA et al., 1972; BRYCE et CRICHTON, 1973).

De même que pour son incorporation, la mobilisation du fer à partir de la ferritine reste encore mal connue. Un compartiment cellulaire acide pourrait être impliqué. En effet, les lysosomes contiennent souvent du matériel de morphologie identique à la ferritine. On suppose que la ferritine soluble du cytosol est transformée progressivement en hémossidérine (RICHTER, 1983)

B - LES TRANSFERRINES

La famille des transferrines, glycoprotéines fixant le fer, est composée de quatre groupes :

- l'ovotransferrine se trouvant dans le blanc d'oeuf d'oiseaux.
- la mélanotransferrine, protéine membranaire isolée de cellules de mélanome humain.
- la sérotransferrine présente dans le sérum de tous les vertébrés (AISEN et LISTOWSKY, 1980) et de quelques invertébrés (HUEBERS et al., 1982; MARTIN et al., 1983).
- la lactotransferrine caractérisée dans les leucocytes, le lait des mammifères ainsi que dans de nombreux autres liquides de sécrétion.

Toutes ces transferrines possèdent en commun, outre la propriété de fixer réversiblement deux ions Fe^{3+} en deux sites spécifiques, un certain nombre de propriétés : ce sont des glycoprotéines

monocaténaires de masse moléculaire 80 000, elles sont constituées de deux domaines structuraux possédant chacun un site de fixation du fer.

Leurs structures primaires présentent de nombreuses homologies et toutes les transferrines possèdent une activité bactériostatique.

De nombreuses revues générales ont été consacrées à la structure et à la fonction des transferrines. Les plus récentes sont celles de BROCK (1985), de MONTREUIL et al. (1985), de CRICHTON et CHARLOTEAUX-WAUTERS (1987) et de HUEBERS et FINCH (1987).

De ces quatre groupes de transferrine, seules la sérotransferrine et la lactotransferrine sont présentes dans l'organisme humain.

1 - La sérotransferrine

La sérotransferrine, isolée et purifiée par SCHADE et CAROLINE en 1946, assure le transport du fer dans le plasma, la lymphe et les espaces extra-circulants.

Les concentrations en sérotransferrine du plasma varient peu en fonction de la taille de l'espèce (REGOECZI et HATTON, 1980). Chez l'homme, la concentration moyenne est de l'ordre de 3 g/l. Le taux de renouvellement de la sérotransferrine est de 10% par jour et sa demi-vie de 8 jours. La plus grande partie de la sérotransferrine est synthétisée par le foie (MORGAN, 1981) mais de nombreux tissus sont aussi capables de la synthétiser, tels que la rate (PHILLIPS et THORBECKE, 1966), les cellules de la glande mammaire (MORGAN, 1981), le muscle, les lymphocytes, le cerveau (LEVIN et al., 1984) et le macrophage péritonéal (HAURANI et al., 1973; CUSTER et al., 1982).

Selon HAURANI et al. (1973), le fer de l'érythrophagocytose va se fixer préférentiellement à la transferrine du macrophage plutôt qu'à l'apoferritine.

Le catabolisme de la sérotransferrine s'effectue principalement au niveau du foie.

2 - La lactotransferrine

La lactotransferrine humaine, isolée à partir du lait de femme et décrite pour la première fois par MONTREUIL et MULLET (1960), MONTREUIL et al. (1960) puis par JOHANSSON (1960), a ensuite été caractérisée dans de nombreux liquides et milieux biologiques tels que les larmes (BROEKHUYSE, 1974), la salive (MASSON, 1970), le liquide

synovial (BENNET et al., 1973), le plasma séminal (HECKMAN et RUKME, 1969), le suc pancréatique (CLEMENTE et al., 1971), le liquide céphalo-rachidien (TERENT et al., 1981), la bile (VAN GUT et al., 1975), le sang (RUKME et al., 1971), les sécrétions bronchiques (BISERTE et al., 1963) ainsi que le mucus cervical et gastro-intestinal (MASSON et al., 1969).

En dehors de sa présence à la surface de différents épithélia, la lactotransferrine existe également au niveau des tissus hématopoïétiques. En effet, la lactotransferrine est un marqueur des leucocytes neutrophiles et de leurs précurseurs où elle est associée avec d'autres protéines cationiques dans les granules secondaires (MASSON et al., 1969).

Les propriétés de la lactotransferrine, qui est immunologiquement différentes des trois autres familles de transferrine, sont décrites plus en détail dans le chapitre suivant.

GENERALITES SUR LES LACTOTRANSFERRINES

Nous avons essentiellement travaillé sur les lactotransferrines isolées du lait humain et du lait de souris. Les notions de structure concernant la lactotransferrine murine sont à l'heure actuelle encore assez fragmentaire, par contre nous possédons beaucoup plus de renseignements sur la lactotransferrine humaine. Aussi, nous allons décrire plus en détail les propriétés de la lactotransferrine humaine et comparer celles-ci à celles, récemment acquises, de la lactotransferrine de souris.

I - ETUDES STRUCTURALES ET CONFORMATIONNELLES DES LACTOTRANSFERRINES

A - LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

La lactotransferrine humaine est une glycoprotéine composée d'une seule chaîne polypeptidique de masse moléculaire 80 000 sur laquelle deux groupements glycaniques sont attachés par une liaison de type N-glycosidique.

1 - La séquence primaire

L'étude de la séquence primaire de la lactotransferrine humaine a été réalisée au Laboratoire en collaboration avec le groupe du Professeur JOLLES. Dès 1974, BLUARD-DECONINCK et al. isolèrent des peptides contenant de l'acide cystéique et SPIK et al. (1974) isolèrent des glycopeptides tryptiques et chymotryptiques.

La séquence N-terminale de la lactotransferrine humaine fut déterminée par JOLLES et al. (1976) et des études portant sur deux glycopeptides furent réalisées par METZ-BOUTIGUE et al. (1980).

La coupure de la lactotransferrine humaine au bromure de cyanogène a permis d'isoler, de caractériser et d'aligner sept fragments appelés

FI à FVII (MAZURIER et al., 1974). Plusieurs de ces fragments ont été séquencés (METZ-BOUTIGUE et al., 1981; 1982).

La séquence polypeptidique complète de la lactotransferrine humaine, ainsi que la position des ponts disulfures sont connues depuis peu de temps (METZ-BOUTIGUE et al., 1984). Elle comporte 703 acides aminés et montre une grande homologie avec celles de la sérotransferrine humaine (59%) et de l'ovotransferrine de poule (49%).

L'étude comparée des séquences des différentes transferrines a été faite par METZ-BOUTIGUE et al. (1984) et par LEGRAND (1984).

Les parties C-terminales de ces protéines sont les mieux conservées. De plus, la séquence a révélé une homologie interne entre les deux lobes de la lactotransferrine humaine, en particulier au niveau de leurs sites de glycosylation et de fixation du fer. La comparaison des séquences des fragments N et C-terminaux montre que 125 acides aminés sont en position identique, correspondant à 37% d'homologie. L'homologie concerne essentiellement les acides aminés liés directement à la conformation de la protéine, les acides aminés basiques et surtout les acides aminés hydrophobes ou aromatiques dont certains sont impliqués dans la fixation des métaux.

2 - Structure tertiaire et conformation

a - Lobes N et C terminaux

Comme pour la sérotransferrine humaine (MAC GILLIVRAY et al., 1982; 1983) et l'ovotransferrine (JELTSCH et CHAMBON, 1982; WILLIAMS et al., 1982), la lactotransferrine est organisée en deux lobes similaires. Chaque lobe porte un glycanne et un site de fixation du fer (BLUARD-DECONINCK et al., 1978; MAZURIER et al., 1983).

L'hydrolyse ménagée par la pepsine libère un fragment capable de fixer le fer et dont la masse moléculaire est de 39 500 (LINE et al., 1976). Ce fragment correspond à la moitié C-terminale de la molécule (BLUARD-DECONINCK et al., 1978).

En 1984, LEGRAND et al. ont isolé, avec un bon rendement, un fragment C-terminal (50 kDa) et un fragment N-terminal (30 kDa) en soumettant la lactotransferrine humaine diférique à une digestion tryptique ménagée à pH 8,2. Cependant, le site de coupure à la trypsine ne se trouve pas entre les deux lobes, mais se localise au niveau de l'acide aminé n°280 du fragment N-terminal. Chacun des deux fragments obtenus porte un glycanne et conserve la propriété de fixer

réversiblement un ion Fe^{3+} . Le fragment N-trypsique a été soumis à une seconde digestion dans les mêmes conditions, ce qui a conduit à l'isolement d'un glycopeptide d'une masse moléculaire 18 500 fixant le fer (LEGRAND et al., 1984).

Lorsque les fragments N et C-terminaux sont saturés en fer et mélangés à pH neutre en proportion équimolaire, ils forment un complexe de 80 kDa avec un rendement de 90%. De plus, si la somme des structures alpha-hélicoïdales des deux fragments dissociés, mesurés par dichroïsme circulaire, est d'environ 30% inférieur à celle de la lactotransferrine diférique, les structures hélicoïdales sont restaurées après la formation du complexe. Il semble donc exister de fortes interactions non covalentes entre les deux lobes de la lactotransferrine humaine (LEGRAND et al., 1986).

b - Diffraction aux rayons X

En 1981, METZ-BOUTIGUE et al. émettaient l'hypothèse de l'hexaplication d'un gène ancestral codant pour les transferrines, sur la base d'homologies internes de séquences retrouvées dans trois zones de chaque moitié N et C-terminales des transferrines.

L'hypothèse de l'hexaplication a été infirmée récemment au profit de l'hypothèse d'une tétraplication par les résultats obtenus par diffraction aux rayons X après cristallisation de la lactotransferrine humaine (ANDERSON et al., 1987). En effet, les études de diffraction ont montré l'existence d'une structure bilobée. Le lobe N-terminal comprend les acides aminés 1 à 332 et le lobe C-terminal les acides aminés 344 à 703. Chaque lobe comprend un site de fixation du fer distant entre eux d'environ 42 Å.

De plus, chaque lobe est organisé en deux domaines d'environ 160 résidus chacun. Le site de fixation du fer est situé à la frontière des deux domaines. Les quatre domaines possèdent une structure secondaire similaire (Fig.3 p.14).

c - Emplacement des ponts disulfures

Les ponts disulfures jouent un rôle important dans la conformation de la protéine. La lactotransferrine humaine possède 32 résidus de demi-cystine; 12 sont situés dans la moitié N-terminale et 20 dans la moitié C-terminale : tous les résidus sont impliqués dans la constitution de ponts disulfures.

Le fragment N-terminal contient six ponts disulfures dont cinq sont

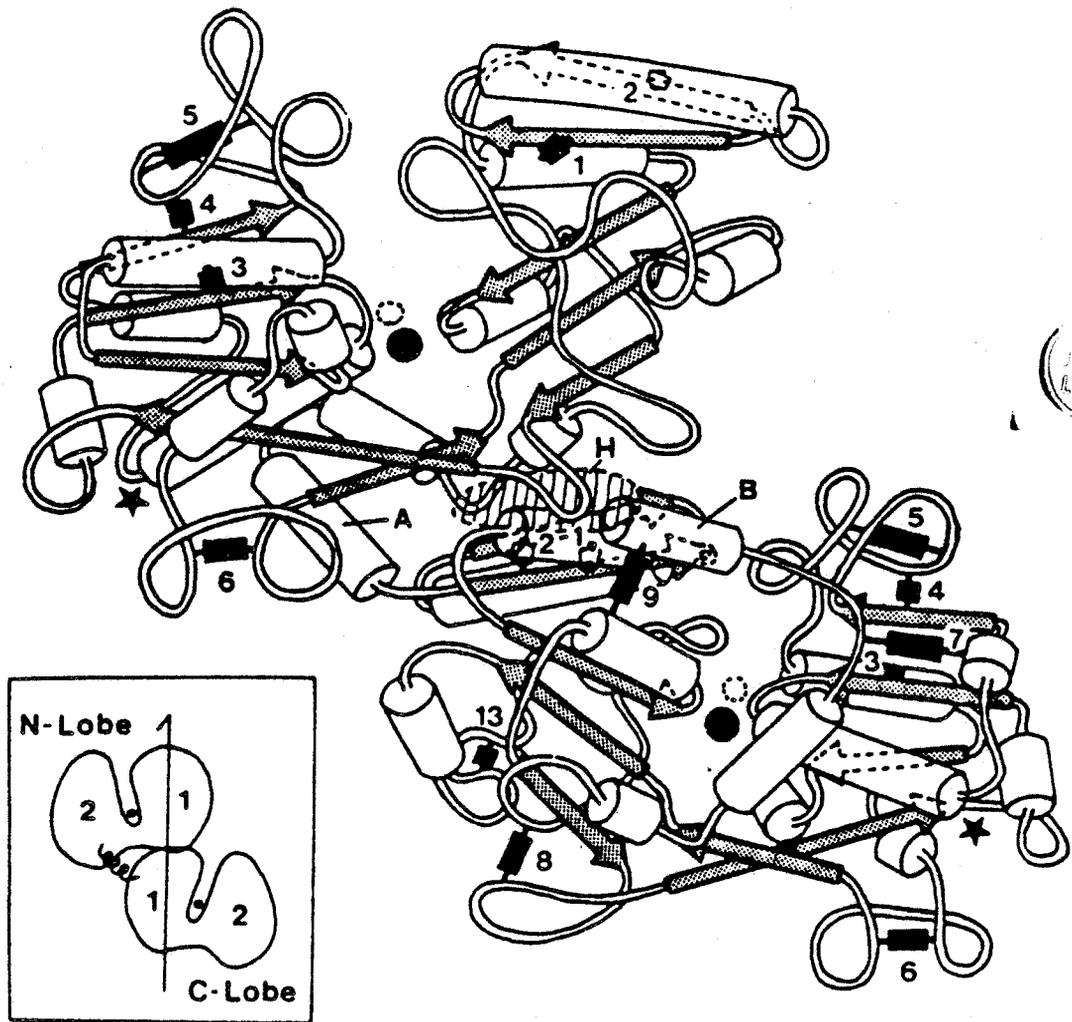


Figure 3 : Conformation de la molécule de lactotransferrine humaine, d'après ANDERSON et al. (1987)

- : atome de fer
- : pont dissulfure
- ★ : site de glycosylation

"locaux", c'est à dire qu'ils joignent des points distants de moins de 45 résidus. Un seul pont joint deux points distants de 80 résidus. Ce dernier semble particulièrement important dans la conformation compacte de la molécule.

La présence de 10 ponts disulfures dans le fragment C-terminal pourrait expliquer la plus grande résistance de ce fragment à la dénaturation et à la protéolyse.

Aucun pont disulfure ne relie les deux lobes entre eux.

3 - Structure et conformation des glycanes

a - Localisation des glycanes sur la chaîne peptidique

La présence de deux glycanes situés à deux endroits différents de la chaîne peptidique a été mise en évidence par SPIK et al. (1974) et confirmée par les travaux de METZ-BOUTIGUE et al. (1980).

Les deux groupements glycaniques fixés par une liaison asparaginy-N-glycosidique aux deux sites de glycosylation se situent l'un dans le fragment N-terminal et l'autre dans le fragment C-terminal.

Le tripeptide Asn-X-Thr/Ser représente la séquence code pour la glycosylation. L'acide aminé X peut être de type basique ou aliphatique. Le résidu d'asparagine portant le glycanne est situé généralement dans une région de conformation particulière de la molécule appelée "coude bêta" (AUBERT et al., 1976) ainsi que dans un environnement hydrophobe. Répondant à ces critères, seule la séquence Asn-Trp-Thr (résidus 137-139) peut être glycosylée dans le fragment N-terminal. Dans le fragment C-terminal trois séquences sont possibles : Asn-Ala-Ser (389-391), Asn-Gly-Thr (490-492) et Asn-Gly-Ser (635-637). Il s'est avéré que seul le résidu Asn 490 est, en fait, glycosylé (METZ-BOUTIGUE et al., 1984).

b - Structure des glycanes

La nature glycoprotéinique de la lactotransferrine humaine a été démontrée par MONTREUIL et MULLET en 1960. La détermination de la structure glycanique a été plus complexe car les glycanes présentent une grande micro-hétérogénéité liée, en particulier, à l'existence de résidus de fucose en nombre variable.

l'existence de deux glycanes liés N-glycosidiquement fut confirmée en 1973 et la structure de l'un d'entre eux fut proposée (SPIK et al., 1973).

Enfin, en 1982 SPIK et al. décrivent l'isolement des glycopeptides porteurs de structures glycaniques différentes. Parmi ces structures, trois sont présentes en quantités importantes et sont représentées dans la figure 4 p.17.

Les autres structures, de nature polyfucosylée, sont plus complexes et sont trouvées en très petites quantités (MATSUMOTO et al., 1982).

Les glycannes présentés dans la figure 4 p 17 montrent une structure disialylée ainsi que des structures monosialylées porteuses d'un ou deux résidus de fucose. L'un des fucoses est lié en $\alpha(1,6)$ sur la N-acétyl-D-glucosamine 1, l'autre fucose est lié en $\alpha(1,3)$ sur la N-acétyl-D-glucosamine 5'. Ces trois structures sont trouvées indifféremment sur l'un ou l'autre des deux sites de glycosylation des régions N et C-terminales de la lactotransferrine humaine.

La structure des glycannes de la lactotransferrine isolée de leucocytes humains vient d'être déterminée au Laboratoire. L'absence de fucose $\alpha(1,3)$ dans le glycanne de la lactotransferrine leucocytaire constitue une des principales différences entre les structures glycaniques des lactotransferrines humaines isolées du lait et des leucocytes (DERISBOURG, 1987; DERISBOURG et al., 1987).

c - Conformation des glycannes

Les études concernant la conformation des glycannes sont récentes. Jusqu'ici, elles pouvaient être considérées comme spéculatives car seuls les modèles moléculaires étaient employés pour donner une image spatiale des glycannes.

En 1975, MONTREUIL donnait la première image du glycanne biantenné de la sérotransferrine humaine. En tenant compte des ponts hydrogènes pouvant exister dans la molécule, une conformation en Y fut retenue. Puis des études par diffraction aux rayons X ont permis d'adopter une conformation en T (MONTREUIL et al., 1978; MONTREUIL, 1980a). Ces études de modèles moléculaires ont également permis de définir quelques paramètres :

- le noyau pentasaccharidique est compact. Le trisaccharide Man $\beta(1,4)$ GlcNAc $\beta(1,4)$ GlcNAc $\beta(1,N)$ Asn est disposé dans un plan et est stabilisé par au moins deux liaisons hydrogènes.
- les antennes constituées par l'enchaînement sialyl-N-acétyl-lactosaminique s'enroulent en hélice dans l'espace.
- le résidu de mannose 4 peut se disposer de deux manières par rapport au plan défini par le trisaccharide cité précédemment et donner

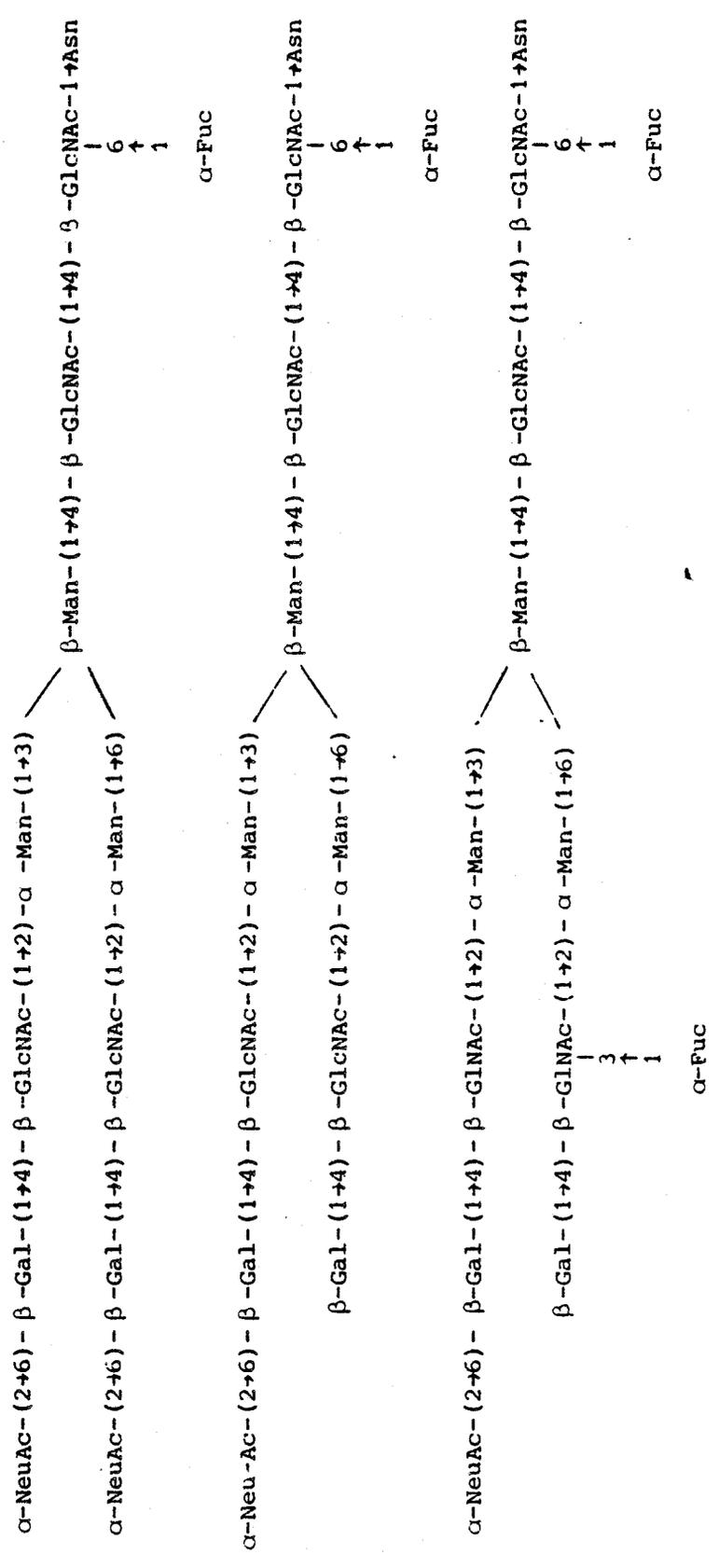


Figure 4 : Structure des glycanes de la lactotransferrine humaine, d'après SPIK et al. (1982)

ainsi une conformation en Y ou en T. Les données cristallographiques obtenues par WARIN et al. (1979) laissent supposer que le modèle en T serait le modèle correspondant le mieux à la réalité.

La conformation en "oiseau" suggérée par MONTREUIL (1980b; 1982; 1983) est obtenue par une large rotation autour du résidu de mannose lié en $\alpha(1,6)$. Cette conformation serait énergiquement la plus stable.

Les trois formes en Y, T et "oiseau" sont interconvertibles et ne doivent pas être considérées comme fixes ou rigides (DOUY et GALLOT, 1980).

Le rôle fondamental du noyau mannotriosidique dans la conformation des glycanes a été mis en évidence par BRISSON et CARVER (1983). Grâce à l'utilisation de la résonance magnétique nucléaire, ils ont montré que le trisaccharide avait deux conformations idéales : l'une linéaire, donnant l'image structurale en "oiseau", et l'autre repliée, conduisant à une conformation en "aile brisée" dans laquelle l'antenne liée en $\alpha(1,6)$ est rabattue le long du résidu di-N-acétylchitobiose. Récemment, CACHE (1986) a montré, grâce à des études sur différents fucosides isolés d'urines de patients atteints de fucosidose, que le fucose lié en $\alpha(1,6)$ sur la N-acétyl-D-glucosamine n°1 interagissait avec la N-acétyl-D-glucosamine n°2 mais aussi avec le mannose 4', arrimant ainsi l'antenne inférieure comme l'avait suggéré MONTREUIL (1980b).

4 - Les sites 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 (LAURELL et INGELMAN, 1947).

La fixation de chaque ion métallique nécessite celle simultanée d'un ion bicarbonate ou carbonate lié électrostatiquement au fer et à un acide aminé chargé positivement.

On sait depuis longtemps que la lactotransferrine conserve particulièrement bien son fer à pH acide. La dissociation du fer en milieu acide est due à la protonation d'un site anionique. La meilleure rétention du fer de la lactotransferrine à pH acide, comparée à celle de la sérotransferrine ou de l'ovotransferrine, est attribuée à une plus grande stabilité de ces sites anioniques.

Les deux sites de fixation du fer peuvent ainsi être différenciés

en un site "acido-labile" situé sur le fragment N-terminal et un site "acido-stable" situé dans la moitié C-terminale (MAZURIER et SPIK, 1980). Cette différence de stabilité peut être rapprochée du plus grand nombre de ponts disulfures dans la partie C-terminale de la lactotransferrine (METZ-BOUTIGUE et al., 1981).

Des expériences de carbéthoxylation par le diéthylpyrocarbonate (MAZURIER et al., 1977) ont montré que les résidus d'histidine du site "acido-stable" étaient plus difficiles à modifier de par leur enfouissement dans le lobe C-terminal.

Enfin, récemment, la structure tridimensionnelle de la lactotransferrine humaine, déterminée par cristallographie aux rayons X à 3,2 Å (ANDERSON et al., 1987) a permis de proposer un nouveau modèle de la cage de fixation du fer (Fig. 5 p.20).

Les sites de fixation du fer sont positionnés de façon similaire dans chaque lobe, c'est à dire entre les deux domaines de chaque lobe. La cage du fer est fortement anionique. Cela pourrait expliquer le fait que le fer ferrique Fe^{3+} se fixe plus fortement que le fer ferreux Fe^{2+} ($K_a = 10^{20} M^{-1}$ pour Fe^{3+} et $K_a = 10^3 M^{-1}$ pour Fe^{2+}).

Les ligands du fer, qui sont les mêmes dans les deux sites, sont trois atomes d'oxygène anionique (les groupements phénols de deux tyrosines et un groupement carboxylique d'un acide aspartique) et un atome d'azote du noyau imidazole d'une histidine.

Les acides aminés participant à la fixation du fer dans la lactotransferrine humaine sont les suivants : Asp 61, Tyr 93, Tyr 191 et His 252 dans le lobe N-terminal et Asp 407, Tyr 447, Tyr 540 et His 609 dans le lobe C-terminal.

Le rôle de l'arginine dans la fixation avec l'ion bicarbonate n'a pas pu être vérifié par les études de diffraction aux rayons X réalisées par ANDERSON et al. (1987).

B - LA LACTOTRANSFERRINE DE VACHE

Le taux de lactotransferrine dans le lait de vache est nettement inférieur à celui du lait humain. De l'ordre de 50 à 60 mg/l dans le lactosérum issu du lait de vache, le taux de lactotransferrine varie en fonction de la lactation (CODDEVILLE, 1986). Ainsi, un taux de lactotransferrine trois fois plus élevé que dans le lait a été mis en évidence dans la sécrétion sèche (SMITH et al., 1971; CODDEVILLE, 1986)

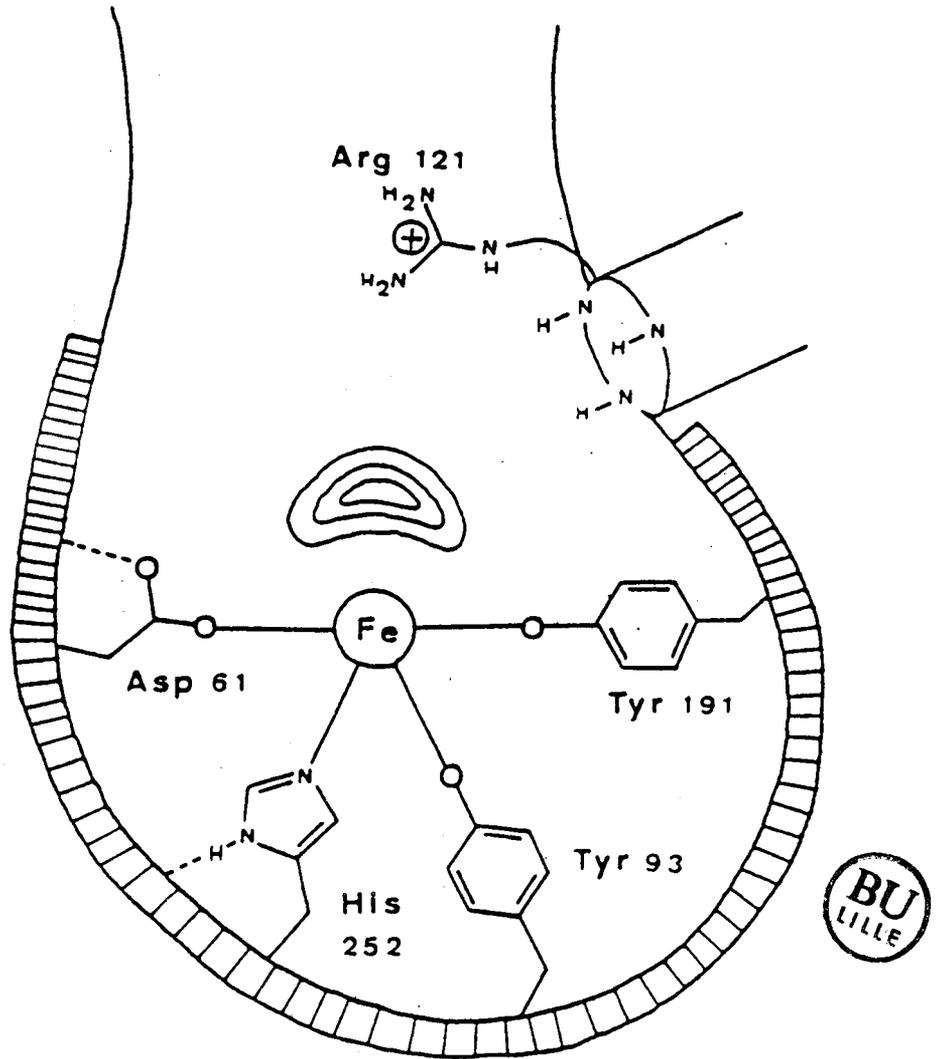


Figure 5 : Conformation de la "cage du fer" de la lactotransferrine humaine, d'après ANDERSON et al. (1987)

1 - Structure de la partie protéique

Egalement monocaténaire, la lactotransferrine bovine possède une masse moléculaire légèrement supérieure à la lactotransferrine humaine. Cependant, elle n'a jamais été déterminée avec précision et les valeurs données varient suivant les auteurs et les techniques utilisées. La lactotransferrine de vache possède un pourcentage de sucre plus important ; cela pourrait expliquer la différence de masse moléculaire entre ces deux lactotransferrines.

La valeur du point isoélectrique varie également suivant les auteurs et oscille entre 8 (GROVES, 1960) et 9,5 (CHERON, 1975).

Les études réalisées jusqu'à présent n'ont permis que d'obtenir des résultats partiels sur la structure de la chaîne peptidique. GROVES (1960), GORDON et al. (1962), CASTELLINO et al. et CHERON (1975) ont tous identifié un résidu d'alanine en position N-terminale. En 1985, la séquence N-terminale a été déterminée par l'équipe du Professeur SAUTIERE par identification des P.T.H. acides aminés et séparation en chromatographie liquide haute pression.

MALIET et PLANTEY (1977), après hydrolyse par la carboxypeptidase A, ont libéré de la leucine et de la phénylalanine en position C-terminale.

Récemment, des essais de cristallographie de la lactotransferrine bovine ont été entrepris par NORRIS et al. (1986) mais les résultats obtenus n'ont pas permis d'obtenir des renseignements supplémentaires quant à la conformation et à la structure de la protéine.

2 - Structure de la partie glycanique

a - Localisation des glycannes sur la chaîne peptidique

La structure de la chaîne peptidique de la lactotransferrine de vache n'étant pas déterminée, il est difficile de localiser les glycannes sur cette chaîne. Cependant, les travaux réalisés par CHERON en 1975 ont permis d'apporter quelques précisions. Par hydrolyse pronasique, tryptique et chymotrypsique, il a isolé deux glycopeptides. Les séquences peptidiques au voisinage des glycannes ont été déterminées à partir de ces hydrolysats. Un des glycopeptides isolés se trouve dans la partie C-terminale et la séquence code Asn - Gln - Ser est retrouvée au point d'attache du glycanne.

b - Structure des glycannes

La composition en glucides, le nombre et la nature des groupements glycaniques ont été essentiellement déterminés au Laboratoire par CHERON (1975), SPIK et al. (1985) et CODDEVILLE (1986).

En effet, l'étude par résonance magnétique nucléaire des glycopeptides obtenus par hydrolyse pronasique a permis de montrer l'existence de différents types glycaniques liés N-glycosidiquement à la protéine (CODDEVILLE, 1986).

Les glycannes de type N-acétyllactosaminique biantenné, plus ou moins fucosylé, où un résidu de galactose est remplacé par de la N-acétyl galactosamine, ne représentent que 3% du mélange total des glycopeptides et ne se retrouvent que dans le lait stabilisé.

Contrairement à la lactotransferrine humaine, la lactotransferrine de vache contient des glycannes de type oligomannosidique avec de trois à neuf résidus de mannose pour deux résidus de N-acétylglucosamine (Fig.6 p. 23). Les glycannes de type oligomannosidique représentent plus de 50% des glycannes de la lactotransferrine bovine isolée à partir de lait stabilisé et plus de 80% des glycannes de la lactotransferrine de colostrum ou de sécrétion sèche (CODDEVILLE, 1986).

De même, un glycanne de type N-acétyllactosaminique non fucosylé et monosialylé a été caractérisé.

C - LA LACTOTRANSFERRINE DE SOURIS

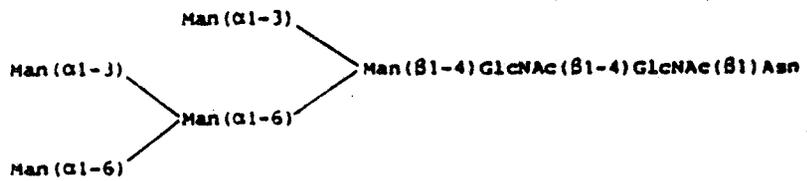
PENTECOST et TENG (1987) ont isolé une protéine de 70 kDa dont la synthèse, au niveau de l'utérus de souris, est induite après un traitement par les oestrogènes. Cette protéine monocaténaire, portant un seul glycanne et de $pI > 9,5$ s'est avérée être la lactotransferrine.

Le taux de synthèse du mRNA de la lactotransferrine de l'utérus de souris augmente de 300 fois après une stimulation hormonale (oestrogène). En revanche, de même que la glande mammaire, l'utérus de ratte ne synthétise pas de lactotransferrine même après un traitement aux oestrogènes.

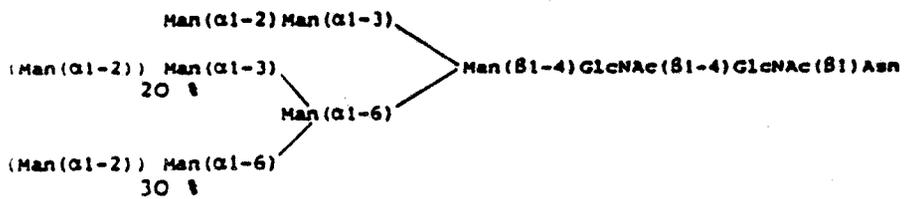
Ces auteurs ont déterminé la structure primaire de la

Man (α1-2) Man (α1-2) Man (α1-3) Man (β1-4) GlcNAc (β1-4) GlcNAc (β1) Asn

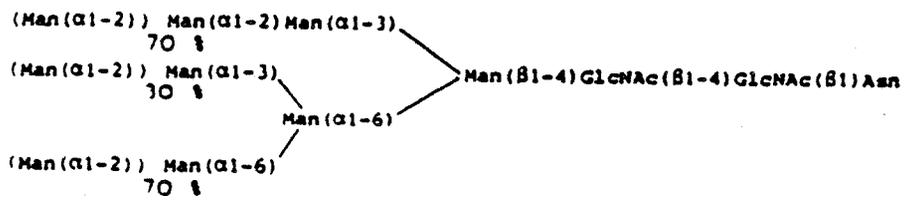
Oligomannoside 1



Oligomannoside 2



Oligomannoside 3



Oligomannoside 4

Figure 6 : Structure des glycanes de type oligomannosidique de la lactotransferrine de vache, d'après CODDEVILLE (1986)

A: LLIPSLIFLEALGLCLA-KATTVRWCAVSNSEEEKCLRWNEMRKVGGPPLSCVKKSSSTROQCIQAVTNR
B: GRRRRSVQWCAVSOPEATKCFQWQRMNRKVRGPPVSCIQRDSPKICIOAIAENR
C: APRKSVRWCTISPAFAAKCAKFORMKK

ADAMITLDGGIMFDAGKPPYKLRPVAAEVYGTKEQPRTHYYAVAVVKNSSNFHLNQLQGLRSCHTGIGRSA
ADAVITLDGGFIYEAGLAPYKLRPVAAEVYGTTEROPRTHYYAVAVVKGGGSFQLNQLQGLKRSCHTGL-RTA

GWKIPIGTLRPYLNWNGPPASIEEAVSKFFSKSCVPGACKDRFPNLCSSCAGTGANKCASSPEEPYSGYA
GWNVPIGTLRPFLNWTGPPEPEAAVR-FVMSASCVPGADKGFNLCRLCAGTGENKCAFLSKEPKFSYS

GALRCLRDNAGDVAFTRGSTVFEELPNKAERDQYKLLCPDNTWKPVTEYKECHLAQVPSHAVVSRSTINDA
GAFKCLRDGAGDVAFIRESTVFEDLSDEAERDEYELLCPDNTRKPVDFKDKCHLARVP SHAVVARSVNGK

EKIWEILLRQSQEKFGKKQASGFKLFASPSGQKDLLFKESAIGFVRVPQKVDVGLYLTFSYITTSIQNLNK
EDALWNLRLQAQEKFGKDKSPKFOLEGSFSGQKDLLFKESAIGFSRVPPRIDSGLYLGSYFTAIQNLRK

KQQ-DVIAASKARVITWCAVGSEKRRKCDOWNRDSRGRVTCISFPITTEDCIVAIMKGDADA---MSLDGGYI
SEE-EVAARRARVITWCAVGEQELRKNQWSGLSQGSVTCWSASTTEDCIALVLRKGEANASVLMMSLDGGYI

YTAGKCGLPVLAENQKSSKSNGLD--CVNRPVEGYLAVAAVRRDAGFTWSSLRGGKKSCHTAVDRTAGW
YTAGKCGLPVLAENYKSOQSDFDPNCVDRPVEGYLAVAVRRSDISLITWNSVKGKKSCHTAVDRTAGW

NIPMGLLIANQTRSCKFNEFFSQCSCAPGADPKSNLALCALCIGDEKGENKCAPNSKERYOQYTGALRCLAEKA
NIPMGLLIFNOTGSCCKFDEYFSQCSCAPGSDPRSNLALCALCIGDEKGENKCVFNSNERYYYGTTGAFRCLAENA

GNVAFKDSITVLQNTDGNITEEWARNLKLKDFELLCLDDTRKPVTEAKNCHLAIAPNHAVVSRIDKVEVL
GDVAFVKDVIIVLQNTDGNNEAWAKDLKLADFALLCLDGKRKPVTEARSCHLAMAPNHAVVSRMDKVERL

QQVVLDOQVQFGRNGORCPGEFCLFQSKTKNLLFNDNTECLAKIPGKTTSEKYLKKEYVIATERLKQCSS
KOVILLHQAKFGRNGSICPDFKFLFQSETKNLLFNDNTECLARLHGKTTYEKYLGPOYVAGITNLRKCSIT

SPLLEACAFLIQ
SPLLEACEFLRK



Figure 7 : Comparaison des structures primaires de la lactotransferrine de souris (A), de la lactotransferrine humaine (B) et de la lactotransferrine de jument (C), d'après PENTECOST et TENG (1987)

lactotransferrine secrétée par l'utérus de souris (Fig.7 p.24) et ont constaté de nombreuses homologies de séquence avec la lactotransferrine humaine (70% d'homologie) et la sérotransferrine humaine (56%).

L'homologie entre la lactotransferrine et la sérotransferrine de souris n'est que de 50%.

De nombreuses homologies internes entre les lobes N et C-terminaux ont également été constatées.

D - LES LACTOTRANSFERRINES D'ORIGINES DIVERSES

En 1971, MASSON et HEREMANS ont identifié la lactotransferrine dans le lait de diverses espèces animales telles que la truie, la jument et le cobaye par électrophorèse sur acétate de cellulose et par des techniques immunologiques.

La lactotransferrine a également été mise en évidence dans les laits de chèvre (ORAM et REITER, 1968) et de souris (KINKADE et al., 1976; SAWATZKI et KUBANEK, 1983).

Les lactosérums de lapine, de rate et de chienne semblent dépourvus de lactotransferrine (BAKER et al., 1968; MASSON et HEREMANS, 1971). BAKER et al (1968) ont caractérisé une glycoprotéine, dans le lait de lapine, correspondant à la sérotransferrine désialylée.

Les lactosérums de cobaye et de souris contiennent à la fois de la lactotransferrine et de la sérotransferrine (MASSON et HEREMANS, 1971).

1 - Structure de la partie protéique

Les lactotransferrines d'origines diverses étant beaucoup moins étudiées, peu de résultats sont connus concernant la chaîne peptidique.

JOLLES et al. (1984) attribuent à la lactotransferrine de jument une masse moléculaire de 81 000. Ces auteurs ont étudié sa composition en acides aminés et les 28 premiers de la séquence N-terminale ont pu être déterminés.

2 - Structure de la partie glycanique

Assez peu d'études ont été faites sur les structures glycaniques des lactotransferrines d'autres mammifères.

CODDEVILLE (1987) a montré que les structures des glycanes de la lactotransferrine de chèvre sont identiques à celles isolées à partir de la lactotransferrine de vache.

L'étude des structures glycaniques de différentes lactotransferrines est actuellement en cours au Laboratoire.

II - ROLES BIOLOGIQUES DE LA LACTOTRANSFERRINE

A - ROLE DANS LA NUTRITION MARTIALE DU NOURRISSON ET DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER

Le mécanisme d'absorption intestinale du fer n'a pas encore été élucidé à ce jour. En effet, plusieurs mécanismes faisant intervenir les transferrines ont été proposés. En 1983, HUEBERS et al. suggéraient un mécanisme selon lequel l'aosérotansferrine de rat, présente dans la lumière intestinale, capterait le fer puis serait internalisée par l'entérocyte. Cependant, l'absence de récepteur pour la sérotransferrine humaine à la surface de la bordure en brosse des entérocytes humains ou de lapin (MARX et al., 1984; MAZURIER et al., 1984, 1985) ainsi que l'absence de fixation de la sérotransferrine murine sur les microvillosités des entérocytes de souris (HU et al., 1987) tendent à infirmer cette hypothèse.

Le mécanisme le moins controversé fait intervenir la lactotransferrine comme étant la principale source de fer et en particulier chez le nourrisson. En effet, les travaux de SIIMES et al. (1979) montrent que lorsque le fer est lié à la lactotransferrine, sa vitesse d'absorption intestinale est supérieure à celle de sels de fer.

Chez le nouveau-né, l'absorption du fer est, en général, plus efficace que chez l'adulte. Il est actuellement admis que chez l'adulte le fer apporté par l'alimentation est libéré dans l'estomac

sous l'effet du pH et sous l'action de la pepsine. Dans le cas de l'estomac du nourrisson, un pH voisin de 4 et une protéolyse très faible vis-à-vis de la lactotransferrine permettent à celle-ci de conserver son fer (SPIK et al., 1971). De plus, une étude in vitro sur l'effet de la trypsine et de la pepsine sur l'activité bactériostatique du colostrum de vache, a montré que la lactotransferrine saturée en fer était relativement résistante à la digestion tryptique et que la pepsine donnait une héli-molécule toujours capable de fixer un atome de fer (BROCK et al., 1978).

La lactotransferrine a également été retrouvée, plus ou moins dégradée, au niveau des fécés de nourrissons alimentés au sein ou au lait artificiel supplémenté en lactotransferrine (SPIK et al., 1982). Cette copro-lactotransferrine a gardé son activité antibactérienne et sa capacité de fixer le fer.

L'hypothèse de la lactotransferrine comme transporteur du fer à travers la muqueuse intestinale a été renforcée par la démonstration de la présence de récepteurs à la surface de la bordure en brosse des cellules de jéjunum de lapin (MAZURIER et al., 1984, 1985). DAVIDSON et LONNERDAL (1985) ont caractérisé un récepteur spécifique de la lactotransferrine de singe sur la bordure en brosse des cellules intestinales de singe. COX et al. (1979) ont montré que la lactotransferrine était capable de céder son fer aux entérocytes humains. Enfin, la lactotransferrine murine se fixe spécifiquement sur des vésicules de la bordure en brosse du duodénum de souris (HU et al., 1987).

Cependant, d'autres auteurs pensent que la lactotransferrine inhibe l'absorption intestinale du fer. DE LAEY et al. (1968) ont montré que l'apolactotransferrine était capable d'inhiber la capture du fer par des sacs duodénaux, tandis que la lactotransferrine saturée en fer était sans effet.

DE VET et VAN GOOL (1974) ont établi une relation inverse entre la concentration duodénale en lactotransferrine et l'absorption du fer chez l'adulte. Pour ces auteurs, la lactotransferrine protégerait les muqueuses contre l'absorption excessive de cations de métaux lourds.

B - ROLE DANS LES MECANISMES DE DEFENSE ANTI-INFECTIEUSE

La lactotransferrine, présente dans les différents milieux biologiques et à la surface des muqueuses, est synthétisée par les cellules des épithélia glandulaires et par les leucocytes neutrophiles. La concentration plasmatique en lactotransferrine est très faible et ne dépasse jamais 1 µg/ml. Sa demi-vie est très brève (MOGUILEVSKY, 1987).

On attribue de nombreuses fonctions à la lactotransferrine dans les mécanisme de défense dont certaines sont généralement admises alors que d'autres restent l'objet de controverses.

1 - Rôle dans l'immunité humorale

En 1961, BLANC et ISLIKER posaient en hypothèse que la lactotransferrine de vache possédait une activité bactériostatique et antitoxique. Cette hypothèse est confirmée pour la lactotransferrine humaine en 1966 par BLANC. La lactotransferrine humaine possède une activité bactériostatique in vitro pour Staphylococcus aureus, Staphylococcus albus et pour Pseudomonas aeruginosa (MASSON et HEREMANS, 1966). Les expériences sur les lactotransferrines de vache et de chèvre (ORAM et REITER, 1968) montrent qu'elles possèdent une activité bactériostatique sur Bacillus stearothermophilus et Bacillus subtilis si elles ne sont que partiellement ou pas saturées en fer. L'addition de sels ferreux au milieu d'incubation supprime l'inhibition de croissance bactérienne par les lactotransferrines.

De nombreux travaux ont été consacrés à l'effet de la lactotransferrine sur les souches entéropathogènes d'Escherichia coli (BULLEN et al., 1972; REITER et al., 1975; SPIK et al., 1978; STEPHENS et al., 1980).

Une liste détaillée de l'effet bactériostatique de la lactotransferrine sur différents types de microorganismes a été établie par ARNOLD et al., 1980). Parmi les microorganismes sensibles, on trouve des bactéries gram-négatives et gram-positives, des bacilles et des cocci, des germes aérobies et anaérobies.

L'effet bactériostatique de la lactotransferrine a été attribué à la séquestration du fer, élément essentiel à la croissance des bactéries. Cette interprétation a été confirmée par le fait que l'addition, aux cultures des souches bactériennes sensibles, d'une

quantité de fer suffisante pour saturer la lactotransferrine en abolissait l'effet bactériostatique.

Par ailleurs, la résistance de certaines souches, telle que E. coli O 126 (ARNOLD et al., 1977), est probablement due à la production d'un sidérophore bactérien, l'entérochiline, capable de séquestrer directement le fer dans le milieu extérieur et de l'apporter à la bactérie.

Cependant, un certain nombre de faits tend à prouver que l'activité antibactérienne de la lactotransferrine pouvait être plus complexe qu'une simple ferriprivation. ARNOLD et al. (1980) ont montré que Streptococcus mutans et Vibrio cholerae mais non E. coli étaient tués par l'incubation en présence de lactotransferrine humaine. Les mêmes auteurs en 1982, comparant les effets bactéricide et bactériostatique de la lactotransferrine ont insisté sur la nécessité de considérer l'interaction directe de la lactotransferrine avec la surface de la bactérie.

Dans la plupart des sécrétions, la lactotransferrine est accompagnée d'immunoglobulines, en particulier les sIgA, et de lysozyme. Or l'activité bactériostatique de la lactotransferrine augmente en présence d'IgA sécrétoires ou d'IgG spécifiques des bactéries (BULLEN et al., 1972; ROGERS et SYNGE, 1978; SPIK et al., 1978). Cette synergie ne s'exerce que sur des bactéries pathogènes et ne se manifeste pas avec des bactéries commensales (STEPHENS et al., 1980).

Selon BULLEN et al. (1974), les immunoglobulines spécifiques, en se fixant sur le récepteur des sidérophores bactériens, inhiberaient le passage du fer du complexe fer-sidérophore à l'intérieur de la bactérie.

In vitro, le lysozyme associe son activité lytique vis-à-vis des parois des bactéries gram-positives et sur la membrane interne des bactéries gram-négatives, à l'action bactériostatique de la lactotransferrine. L'action directe du lysozyme humain ou bovin sur Micrococcus luteus conduit à la formation de protoplastes qui sont alors agglutinés par la lactotransferrine ajoutée au milieu (PERRAUDIN et PRIEELS, 1982). La lactotransferrine se fixerait aux protoplastes par interaction ionique. Ces auteurs ont observé que ni la charge en fer, ni le contenu en glycanne de la lactotransferrine n'intervenaient dans la liaison aux protoplastes.

2 - Rôle dans l'immunité à médiation cellulaire

a - Régulation de la myélopoïèse

L'intervention de la lactotransferrine dans la régulation de la myélopoïèse est très controversée. D'après BROXMEYER et al. (1978; 1986), la lactotransferrine serait le facteur granulocytaire régulant, par rétroaction négative, la production des colonies de granulocytes-macrophages. La régulation de la production granulo-monocytaire est sous la dépendance de deux séries de facteurs antagonistes (Fig. 8 P.31).

Les facteurs stimulant la production de colonies, les C.S.F. ou "Colony Stimulating Factor", sont responsables de la prolifération et de la différenciation des cellules progénitrices formant des colonies de granulocytes-macrophages (SHADDUCK et al., 1980; BAGBY et al., 1983).

Ces facteurs sont principalement produits par les monocytes et les macrophages (GOLDE et CLINE, 1972; SULLIVAN et al., 1983).

L'inhibition de la granulopoïèse par la lactotransferrine a été décrite chez la souris normale et en activité myélopoïétique intense (GENTILE et BROXMEYER, 1983). Pour ces auteurs, la lactotransferrine jouerait un rôle physiologique dans la régulation de la myélopoïèse. La lactotransferrine saturée en fer inhibe la production de C.S.F. à de très faibles concentrations (BROXMEYER et al., 1978) mais n'a aucun effet sur la croissance des colonies de granulocytes-macrophages (ZUCALI et al., 1979). Cette inhibition s'effectuerait sur la production d'une monokine produite par le monocyte et stimulant la production de C.S.F. par le lymphocyte T (BAGBY et al., 1981; 1983).

Enfin, récemment, BROXMEYER et al. (1985) ont émis l'hypothèse que la régulation de la myélopoïèse s'effectuerait par le biais d'isoferritines acides produites par les macrophages. La synthèse d'isoferritines acides serait induite par le C.S.F. et inhibée par la lactotransferrine.

b - Contrôle de la production et de l'action des radicaux libres

Les trois principaux types de cellules du système immunitaire sont les leucocytes neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes.

Les leucocytes polymorphonucléaires synthétisent la lactotransferrine qui se retrouve stockée dans les granules

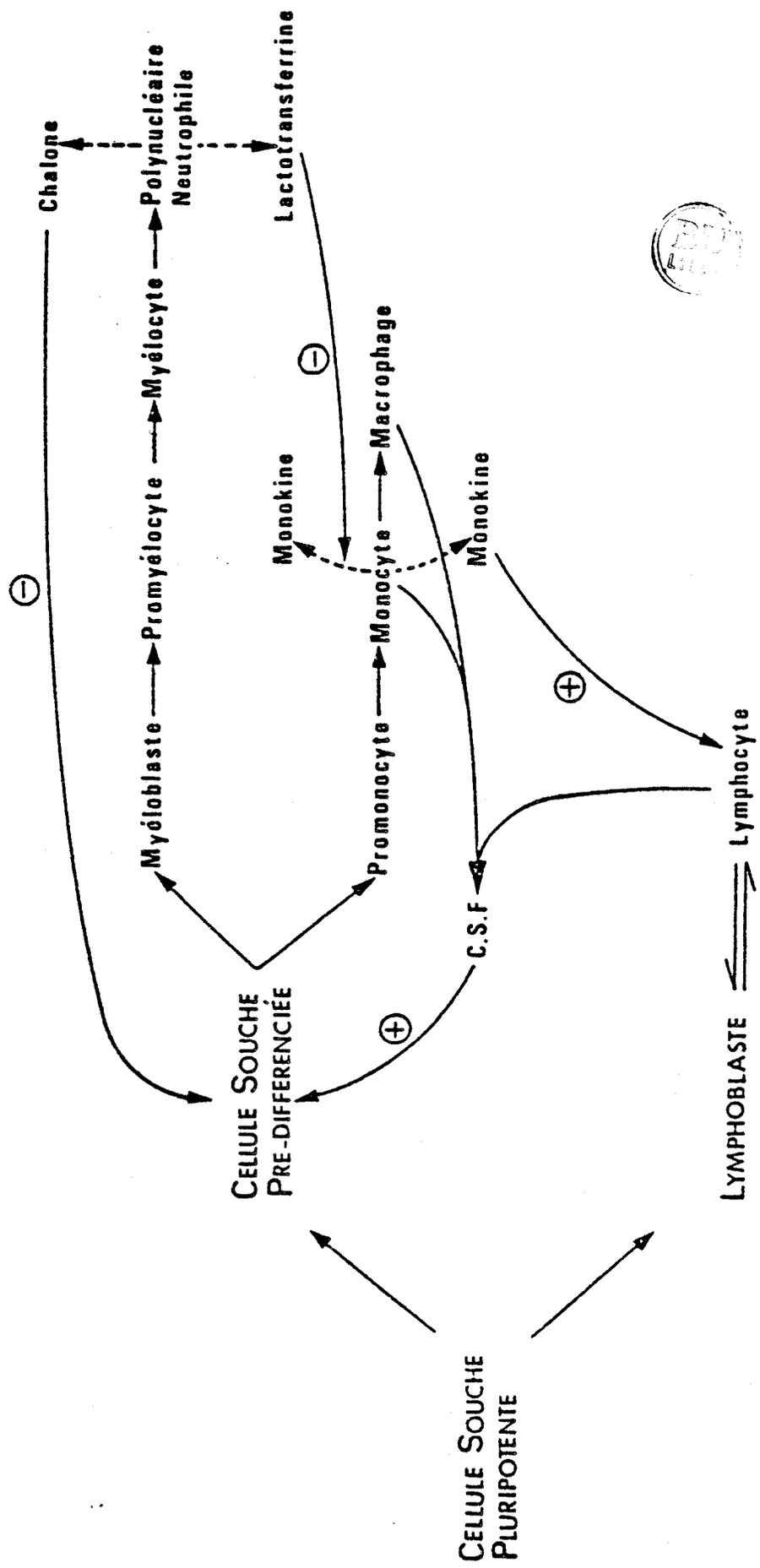
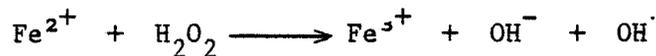


Figure 8 : Régulation de la myélopoïèse, d'après GOLDE et CLINE (1972)

- : inhibition
- + : activation
- ... : libération

secondaires de ces cellules. Lors de la phagocytose d'une bactérie, l'essentiel de la lactotransferrine contenue dans ces granules secondaires est libéré dans le milieu extérieur; le reste de la lactotransferrine des granules non dégradés est déversé dans les phagolysosomes (LEFELL et SPITZNAGEL, 1975).

Au cours de la phagocytose, les neutrophiles consomment une quantité accrue d'oxygène et le convertissent en anion superoxyde O_2^- et en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . L'association de ces deux composés conduit à la formation de radicaux libres qui constituent de puissants agents oxydants capables d'endommager presque toutes les molécules et d'induire une peroxydation des lipides. L'ion ferrique intervient comme catalyseur de la réaction :



en augmentant la vitesse de conversion de $l'O_2$ en O_2^- (HABER et WEISS, 1934).

La lactotransferrine libérée sous forme d'apolactotransferrine pourrait se réadsorber sur la membrane péricellulaire, fixer le fer du milieu et ainsi participer à la régulation de la production de radicaux libres par l'intermédiaire de son fer.

AMBRUSO et JOHNTON (1981) ont montré que la lactotransferrine pouvait augmenter la production de radicaux libres par les neutrophiles humains grâce à l'apport du fer lié à la protéine et ainsi amplifier la réponse inflammatoire et la peroxydation des lipides. Ces résultats, confirmés en 1982 par BANNISTER et al. sont cependant très controversés. En effet, GUTTERIDGE et al. (1981) ont observé que l'apolactotransferrine pouvait exercer un effet antagoniste en captant le fer et en évitant ainsi des dommages occasionnés aux leucocytes par ces radicaux hydroxydes.

La lactotransferrine saturée en fer n'augmenterait pas la production de radicaux libres (WINTERBOURN, 1983) et seule l'addition d'agents complexant le fer, comme l'E.D.T.A., permettrait à la lactotransferrine d'être un catalyseur de la production de ces radicaux.

SPEER et al., (1984) ont montré que l'augmentation de la production d'anions superoxydes et de peroxyde d'hydrogène par les macrophages en

culture pouvait être reproduite par la cathepsine G ou l'élastase des neutrophiles.

La lactotransferrine pourrait protéger les membranes cellulaires des leucocytes en focalisant les radicaux libres sur la membrane de la bactérie à lyser (WARD et al., 1983).

De plus, chez les patients déficients en granules spécifiques des neutrophiles, de nombreux troubles ont été rapportés tels que des infections bactériennes récurrentes, une diminution du chimiotactisme et surtout une diminution de la production de radicaux libres (BRETON-GORIUS et al., 1980; GALLIN, 1985).

c - Contrôle de la migration des cellules immunocompétentes sur le lieu de l'inflammation

L'un des premiers phénomènes locaux de la réaction inflammatoire est l'adhérence des granulocytes aux cellules endothéliales des petits vaisseaux.

Dans les conditions normales, les granulocytes circulent librement et n'adhèrent pas durablement à la surface de l'endothélium.

Plusieurs facteurs chimiotactiques peuvent induire une accumulation de granulocytes le long des vaisseaux. Il existe une relation entre le relarguage des granules spécifiques par les granulocytes exposés à ces facteurs et l'augmentation de leur adhésivité sur les cellules endothéliales (OSEAS et al., 1981).

D'après BOXER et al. (1982a; 1982b) la lactotransferrine provoquerait une modification des propriétés de surface des leucocytes en particulier, en abolissant la répulsion électrostatique des membranes permettant aux leucocytes de rester en suspension. Elle permettrait ainsi l'adhésion de ces cellules sur les vaisseaux.

La lactotransferrine, provenant de la dégranulation des granules secondaires des leucocytes, premières cellules à arriver sur le lieu de l'inflammation (DE SOUSA, 1978), attirerait les macrophages et les lymphocytes par l'intermédiaire de récepteurs membranaires. De plus, les macrophages attireraient les lymphocytes sur le lieu de l'inflammation par la synthèse de ferritine et de sérotransferrine qu'ils synthétisent.

d - Contrôle de l'hyposidérémie inflammatoire

Lors d'une infection, la sidérémie baisse brutalement (WEINBERG, 1974) et l'absorption intestinale du fer diminue (DUBACH et al., 1948;

BERESFORD et al., 1971) au profit de l'augmentation du fer de réserve dans le foie et les macrophages (PEKAREK et al., 1969). L'ensemble de ces phénomènes a pour but de diminuer, par ferriprivation, la croissance des bactéries, lesquelles libèrent des sidérophores qui vont entrer en compétition avec les protéines ferrifixatrices de l'hôte.

Ce mécanisme de l'hyposidérémie inflammatoire est représenté dans la figure 9 p.35.

Dans un premier temps, les leucocytes activés libèrent dans le sang un "leukocytic endogenous mediator" ou LEM (KAMPSCHMIDT et PULLIAM, 1975), qui a été identifié au "leukocytic pyrogen" ou LP, une protéine de faible masse moléculaire (MERRIMAN et al., 1977). Ce facteur possède un double rôle : d'une part il diminue la production des sidérophores bactériens en provoquant la fièvre (GARIBALDI, 1972; KLUGER et ROTHENBURG, 1979), d'autre part il interagit avec les neutrophiles pour entraîner une dégranulation des granules secondaires et, par voie de conséquence, une libération de la lactotransferrine dans le milieu extracellulaire.

Selon VAN SNICK et al. (1977), l'apolactotransferrine, libérée par les leucocytes, capterait le fer de la sérotransferrine et le transférerait à la ferritine du macrophage. L'acide ascorbique, un autre composé présent dans les granules secondaires, interviendrait dans la capture du fer de la sérotransferrine par la lactotransferrine. La lactotransferrine ainsi chargée en fer serait éliminée par les macrophages hépatiques. A cette ferriprivation, s'ajoute un effet antibactérien du complexe fer-lactotransferrine : ce complexe intervient dans la formation des radicaux hydroxyl qui jouent un rôle important dans l'action antibactérienne des leucocytes activés. La lactotransferrine pourrait avoir un effet bactéricide en plus de son effet bactériostatique (revue générale : SAWATZKI, 1987).

La nécessité, pour l'organisme, de créer une hyposidérémie au cours des états inflammatoires souligne l'importance que peut avoir le taux de "fer disponible" dans l'organisme. Des expériences de surcharge en fer réalisées sur des rats infectés et entraînant un taux de mortalité important (BARRY et REEVE, 1977), ont confirmé que, dans les affections bactériennes et virales, l'hyposidérémie est préférable à l'hypersidérémie.

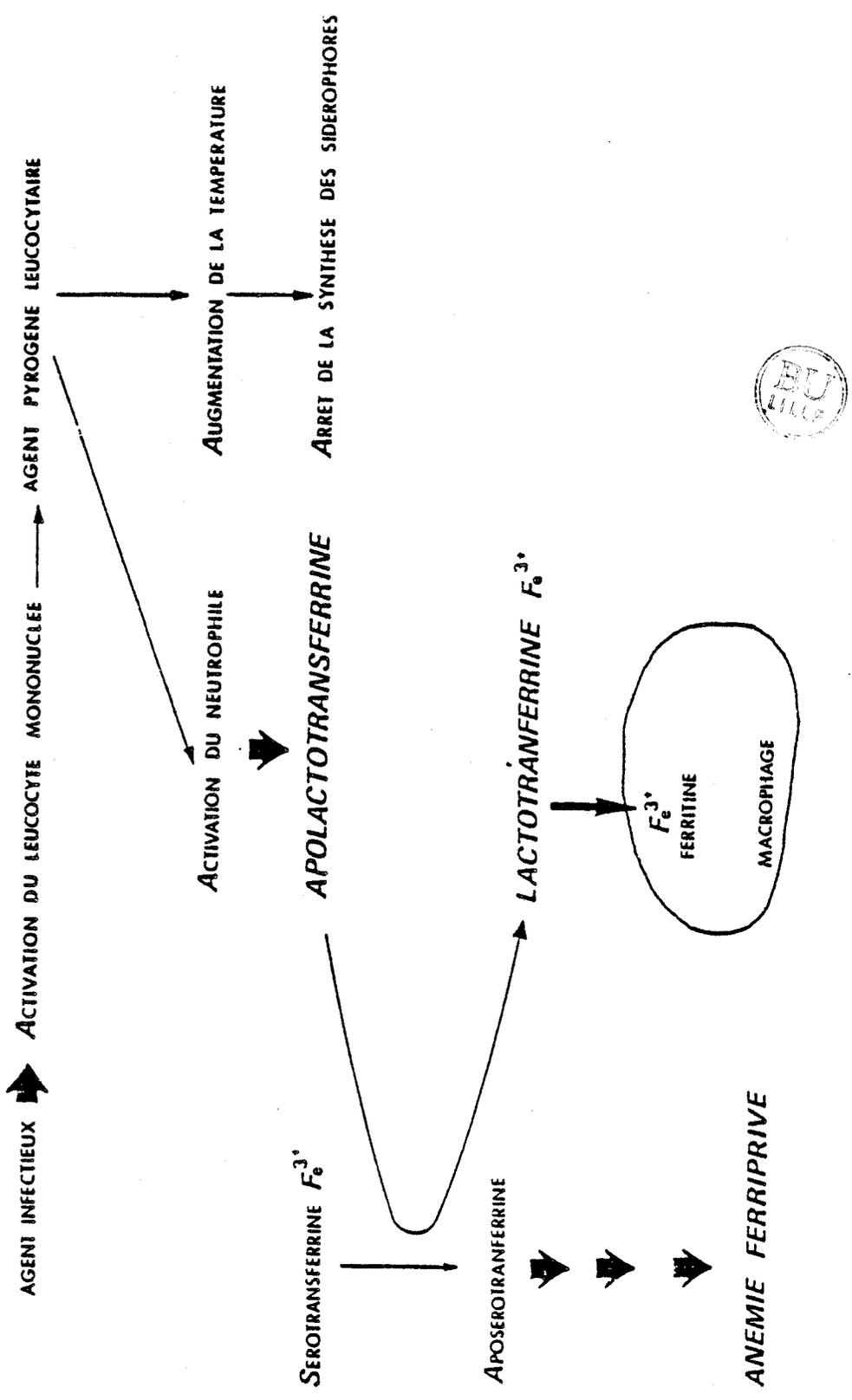


Figure 9 : Schéma récapitulatif de l'intervention des transferrines lors d'une agression microbienne, d'après SPIK et MONTREUIL (1983)

D - CONCLUSION

Les rôles biologiques de la lactotransferrine sont nombreux mais la plupart sont encore controversés. La lactotransferrine semble jouer un rôle important dans l'absorption intestinale du fer et dans tous les mécanismes immunitaires mis en jeu lors d'une agression bactérienne.

Enfin, d'autres fonctions sont également attribuées à la lactotransferrine : elle constituerait un facteur de croissance essentiel pour les lignées de lymphocytes B et T (HASHIZUME et al., 1983; MAZURIER et al., 1987) et elle augmenterait la cytotoxicité des monocytes vis-à-vis de certaines lignées cellulaires (HORWITZ et al., 1984).

GENERALITES SUR LES MACROPHAGES
ET SUR LEURS RECEPTEURS

Les monocytes et les macrophages participent à un même ensemble fonctionnel, défini par sa capacité de phagocytose extrêmement développée et par son aptitude à fixer les colloïdes et à ingérer des particules étrangères vivantes : c'est le système des phagocytes mononucléaires, encore appelé système réticulo-endothélial, système réticulo-histiocytaire ou système macrophagique.

METCHNIKOFF (1892, 1905) fut le premier à reconnaître l'importance d'un groupe de cellules, réparti dans tout l'organisme et en grande partie responsable de sa défense contre les agressions extérieures. Il les appela "macrophages" pour les distinguer des leucocytes circulants ou microphages.

Ce sont les travaux de KIYONO (1914) et d'ASCHOFF (1924) qui ont permis de déterminer la nature des cellules appartenant au système réticulo-endothélial d'ASCHOFF. C'est en 1972 que VAN FURTH et al. proposent le nom de système phagocytaire mononucléé. Cette nouvelle classification tient compte des cellules précurseurs.

Dans l'organisme, les macrophages existent soit à l'état libre dans les cavités séreuses, les alvéoles pulmonaires, les espaces conjonctifs, soit à l'état fixe, immobilisés dans le réticulum de la moëlle osseuse et des organes lymphoïdes secondaires (cellules dendritiques des nodules lymphoïdes), dans les espaces conjonctifs (histiocytes) ou appliqués contre les parois des capillaires sanguins (cellules de Küpffer du foie) ou lymphatiques (macrophages bordants), postés sur les voies de passage des antigènes.

Les macrophages contribuent à la défense contre les agents infectieux (METCHNIKOFF, 1905), à l'inflammation et à la réparation des tissus (FLOREY et al., 1962), à la destruction des erythrocytes séniles (DOAN, 1939), aux réactions immunologiques (THORBECKE et al., 1962) et au métabolisme des lipides (BYERS, 1960). Les revues générales sur ce sujet sont nombreuses, les plus récentes sont les suivantes : VAN FURTH (1985); GORDON (1986); HAMILTON et ADAMS (1987) ainsi que les ouvrages : "Cellular Immunology" vol. 2 (1986) WEIR ed. et "Biochemistry of macrophages" (1986) EVERED, NUGENT et O'CONNOR eds..

I - CARACTERISTIQUES GENERALES DES MACROPHAGES

A - ULTRASTRUCTURE ET CYTOCHIMIE DES MACROPHAGES

1 - Ultrastructure

Les macrophages alvéolaires ont une taille variant de 15 à 50 μm de diamètre. Le rapport noyau/cytoplasme, bien que variable, est d'environ 1/3.

Les macrophages sont très mobiles. Ils adhèrent aux supports solides. Leurs contours sont découpés par des pseudopodes et par des figures d'endocytoses (captation de substances solides ou liquides). Les macrophages possèdent un noyau homogène, ovale ou réniforme mais non fragmenté; leur cytoplasme est riche en organites variés : des mitochondries en quantité importante, un réticulum endoplasmique dense, un appareil de Golgi développé, de nombreux lysosomes, des tubules et des filaments dont le rôle dans la motilité de la cellule est déterminant, des vacuoles de tailles variables et enfin des phagosomes. Les macrophages activés possèdent le nombre maximal d'organites.

2 - Cytochimie

COHN et collaborateurs (1963, 1965) ont montré que trois types de phagocytes mononucléaires (monocytes, macrophages alvéolaires et péricytaires) obtenus chez le lapin différaient fortement par leur contenu en enzymes hydrolytiques. Cela suggère que le macrophage peut modifier son contenu enzymatique ou sa morphologie selon le degré de stimulation de son environnement. Par exemple, les activités de la - D glucuronidase, de la phosphatase acide, des cathepsines, de la ribonucléase acide, du lysozyme, de l'estérase et de la lipase des macrophages alvéolaires sont beaucoup plus importantes que celles des macrophages péricytaires (ALLEN et al., 1980). De même EBERT et FLOREY (1939) puis WEISS et FAWCETT (1953) ont montré que le contenu en phosphatase acide du monocyte augmentait lors de sa maturation en macrophage après plusieurs jours de culture.

B - ORIGINE ET LOCALISATION DES MACROPHAGES

Les macrophages ont pour origine des précurseurs médullaires, les monoblastes et les promonocytes, dérivant eux-mêmes du "pool" des cellules souches hématopoïétiques (VAN FURTH, 1970) (Fig. 10 p.40). Après le temps de génération médullaire (rat : 24 heures, souris : 10 heures) le monocyte passe dans le sang où il circule pendant plusieurs jours. Les monocytes quittent le compartiment circulant par diapédèse pour migrer dans les tissus. Au niveau des tissus, le remplacement des macrophages est lent et peu de divisions sont à noter (VAN FURTH, 1970). Dans des conditions pathologiques, le nombre de divisions augmente et les monocytes sanguins se transforment massivement en macrophages.

L'origine des macrophages fixés au niveau d'organes tels que la rate, la moëlle osseuse ou les ganglions lymphatiques semble également être monocyttaire (VAN FURTH, 1970; SHAND et BELL, 1972).

1 - Le macrophage alvéolaire

L'origine du macrophage alvéolaire a été beaucoup plus discutée (HOCKING et GOLDE, 1979). A présent, un consensus est apparu : il existe au moins deux sources pour ce macrophage, le monocyte sanguin qui migre vers le poumon, et des phagocytes mononucléaires locaux qui se divisent dans les alvéoles ou dans les espaces interstitiels du parenchyme du poumon (LEHNERT et al., 1985) (Fig. 11 p.41)

D'après BOWDEN et ADAMSON (1972), les macrophages présents dans les espaces interstitiels du poumon seraient les précurseurs directs des macrophages alvéolaires, mais en 1979 BLUSSE VAN OUD ALBLAS et al. (1979, 1983) démontrent que dans un état normal comme dans le cas d'inflammation aigüe, la grande majorité des macrophages alvéolaires dérive des monocytes sanguins. Récemment, les travaux de HANCE et al. (1985) ont permis de confirmer la théorie de la migration des monocytes vers le poumon. En effet, certains antigènes de surface des monocytes, ne sont plus exprimés après maturation in vitro; ces antigènes sont également absents de la surface des macrophages de sujets normaux. Cependant, les patients atteints de sarcoïdose montrent une augmentation du nombre de cellules alvéolaires exprimant ces antigènes parmi la population macrophagique. Les cellules sont morphologiquement similaires aux

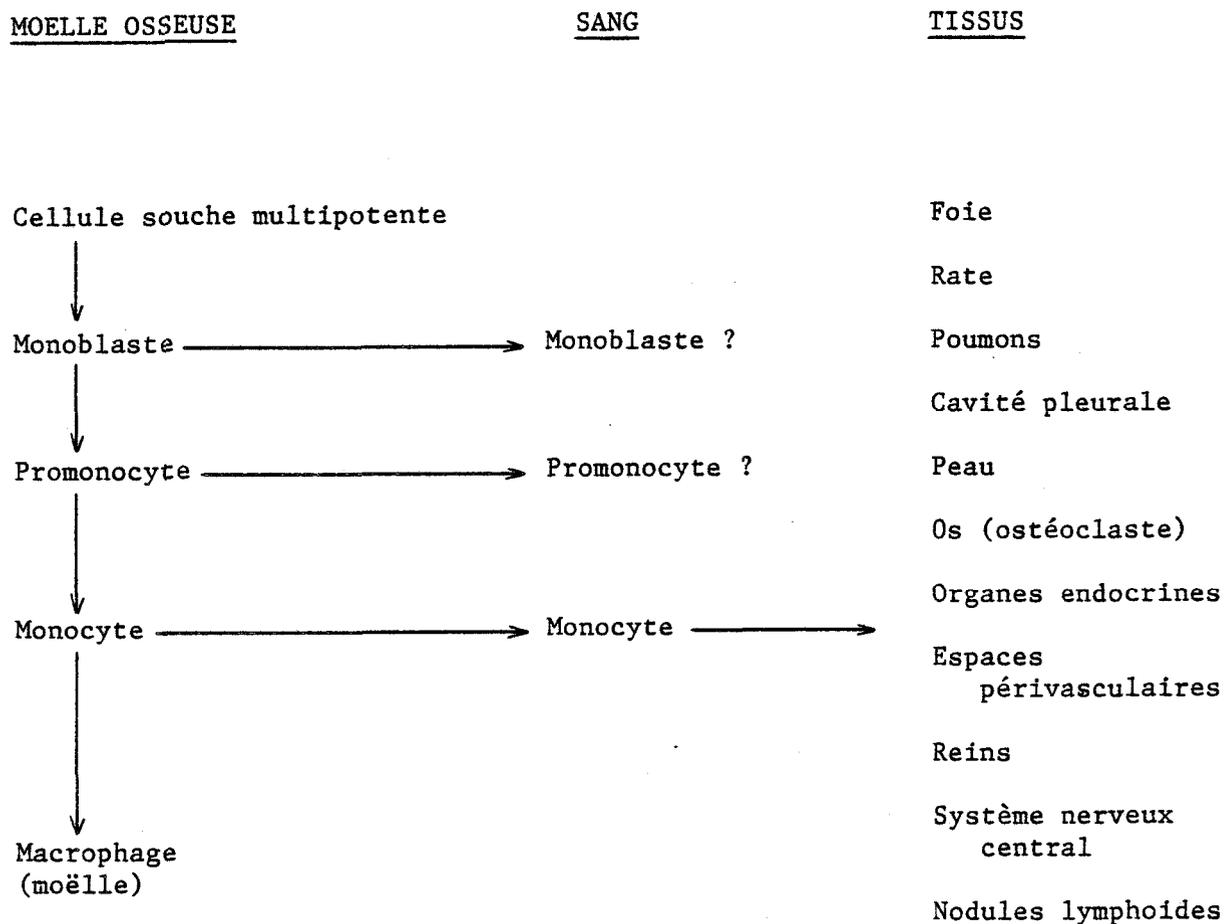


Figure 10 : Origine et localisation des macrophages,
d'après FELS et COHN (1986)

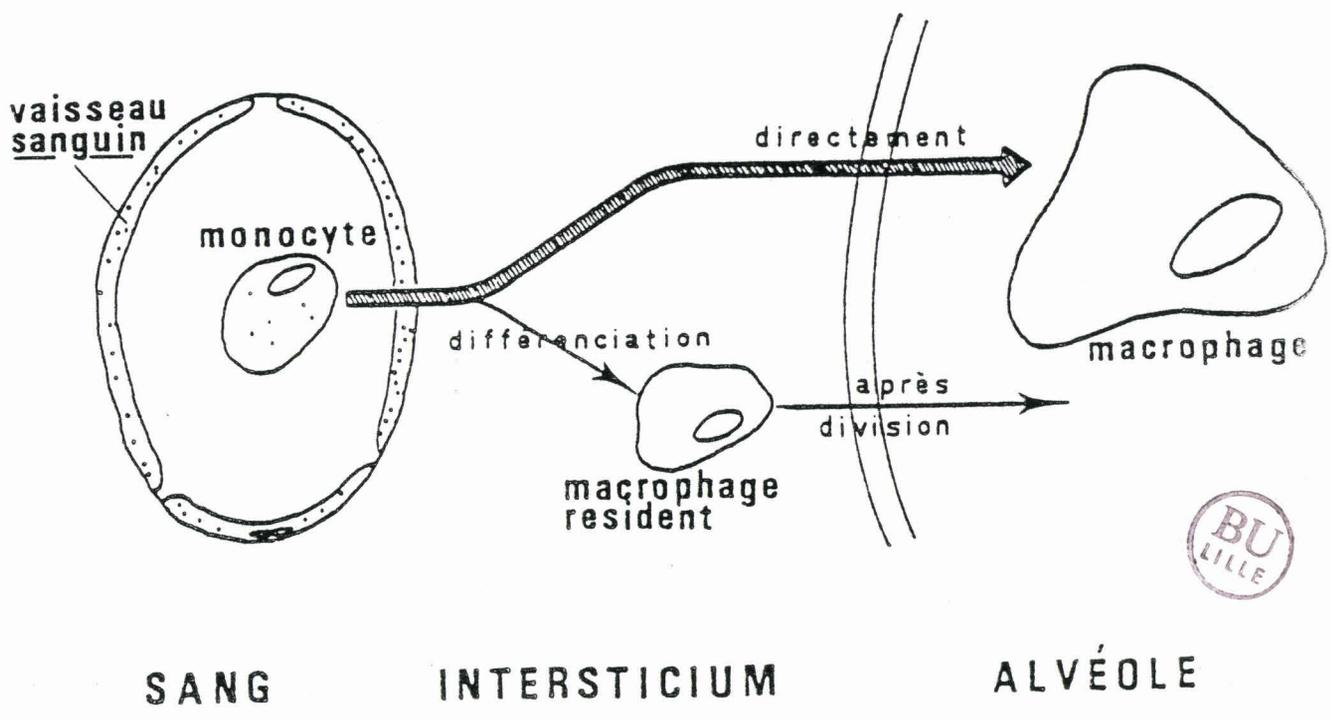


Figure 11 : Origine du macrophage alvéolaire, d'après BOWDEN et al. (1972)

monocytes sanguins, suggérant l'influx de ces derniers vers le poumon lors d'un état inflammatoire (FELS et COHN, 1986).

Seuls 0,5% des macrophages alvéolaires sont capables de se diviser (BITTERMAN et al., 1984). En 1982, VAN FURTH et al. montrent que les phagocytes mononucléaires se divisant dans le compartiment extravasculaire sont, en fait, des cellules ayant migré depuis la moëlle osseuse vers le poumon dans les 48 heures précédentes. La population totale de macrophages pulmonaires chez la souris est de 2×10^6 , répartie entre macrophages alvéolaires et intersticiels, respectivement 93% et 7% des macrophages du poumon, qui présentent les caractéristiques fonctionnelles, cytochimiques et morphologiques identiques à celles du macrophage mature, sauf pour la présence du récepteur à C_3 (BLUSSE VAN OUD ALBLAS et VAN FURTH, 1979).

Les macrophages alvéolaires présentent un contenu enzymatique lysosomique élevé, un métabolisme oxydatif important et une activité bactéricide faible. Enfin, CHANDLER et al. (1986) ont mis en évidence l'hétérogénéité de la population macrophagique du poumon : les différentes sous-populations de macrophages, obtenues par centrifugation sur un gradient continu de percoll, présentent des caractéristiques morphologiques, cytochimiques, biochimiques et fonctionnelles différentes.

2 - Le macrophage péritonéal

L'origine du macrophage péritonéal a surtout été étudiée chez la souris (VAN FURTH et COHN, 1968; VAN FURTH et al., 1973). 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. Des expériences de marquage à la thymidine tritiée ont confirmé que cette augmentation locale de macrophages péritonéaux n'était pas due à une activité mitotique de ces cellules.

Possédant un contenu enzymatique lysosomique moins élevé que celui des macrophages alvéolaires, les macrophages péritonéaux présentent cependant une activité bactéricide élevée.

3 - Les cellules de Küpffer

Les cellules de Küpffer, présentes au niveau du foie, dérivent

également de précurseurs de la moëlle osseuse (KINSKY et al., 1969). En 1971, KELLY et DOBSON suggèrent la possibilité d'une division locale des cellules de Küpffer. En effet, après une irradiation locale du foie la prolifération des cellules de Küpffer, induite après stimulation par des oestrogènes, est fortement inhibée. Chez la souris 56,4% des monocytes quittant la circulation sanguine se dirigent vers le foie (BLUSSE VAN OUD ALBLAS et VAN FURTH, 1979). Les cellules de Küpffer constituent la plus importante barrière phagocytaire de l'hôte. Elles jouent également un rôle dans le stockage du fer sous forme de ferritine.

4 - Autres macrophages

Au niveau de la rate, des macrophages libres se trouvent dans les interstices du réseau de cellules réticulées et des macrophages fixes adhèrent aux prolongements cytoplasmiques de ces mêmes cellules. Ces cellules jouent un rôle dans l'induction de la réponse immunitaire.

Parmi ce système phagocytaire mononucléé, il faut encore mentionner les macrophages thymiques, présents au niveau des ganglions lymphatiques, les histiocytes de la moëlle osseuse et du tissu conjonctif ainsi que les macrophages villositaires jouant un rôle très important dans l'absorption intestinale du fer (CATTAN, 1979; REFSUM et SCHREINER, 1980) et dans son stockage (POWELL et al., 1970). Les ostéoclastes, les cellules de la microglie, les fibrocytes et les cellules endothéliales en sont exclus ainsi que les cellules dendritiques de la rate ou des ganglions à cause de leur faible pouvoir phagocytaire (VAN FURTH, 1970).

II - FONCTIONS IMMUNITAIRES DU MACROPHAGE

Le concept de l'activation du macrophage date de METCHNIKOFF (1905) qui avait noté que les phagocytes mononucléaires d'animaux résistants aux attaques bactériennes avaient un pouvoir augmenté de phagocytose et de destruction des microorganismes. De nombreux auteurs ont montré que les lymphocytes T sensibilisés étaient capables d'augmenter la capacité antimicrobienne du macrophage. Celui-ci, appelé macrophage

activé par MACKANESS (1972), possède également la propriété de lyser les cellules tumorales (ALEXANDER et EVANS, 1971; HIBBS et al., 1972)

A - LA DESTRUCTION DES MICROORGANISMES : LA PHAGOCYTOSE

L'ingestion par le macrophage de microorganismes ou de particules inorganiques constitue une importante première ligne dans la défense de l'organisme (GOLDSTEIN et al., 1974; GREEN et KASS, 1964). L'opsonisation des bactéries par les immunoglobulines est le facteur le plus important pour promouvoir leur phagocytose (HOIDAL et al., 1981; GOLDSTEIN et al., 1974). En effet, par l'intermédiaire du récepteur Fc, les macrophages sont alors capables de phagocyter les bactéries en utilisant le système de reconnaissance des immunoglobulines (revue générale : FELS et COHN, 1986).

La fixation du complexe antigène-anticorps sur le macrophage est fortement augmentée par la présence du complément C₃. D'autres substances régulent également l'activité phagocytaire du macrophage : l'interféron, certains produits des lymphocytes B et T, des hormones polypeptidiques (insuline) ou la fibronectine (COLEMAN, 1986). Les antigènes fixés à la membrane du macrophage sont internalisés dans de petites vésicules ou endosomes. Ce processus d'endocytose nécessite de l'énergie. Les endosomes fusionnent ensuite avec des lysosomes primaires contenant les enzymes nécessaires à la dégradation de l'antigène. L'endocytose est une fonction importante par laquelle la cellule acquiert également ces nutriments mais aussi régule l'expression des différents récepteurs membranaires ou transporte des substances d'un compartiment extracellulaire à un autre (revues générales : WILEMAN et al., 1985; GEISOW, 1980; STAHL et SCHWARTZ, 1986; PASTAN et WILLINGHAM, 1985) (Fig. 12 p.45).

La plupart des agents pathogènes phagocytés sont détruits; cependant certaines bactéries survivent après leur ingestion par le macrophage.

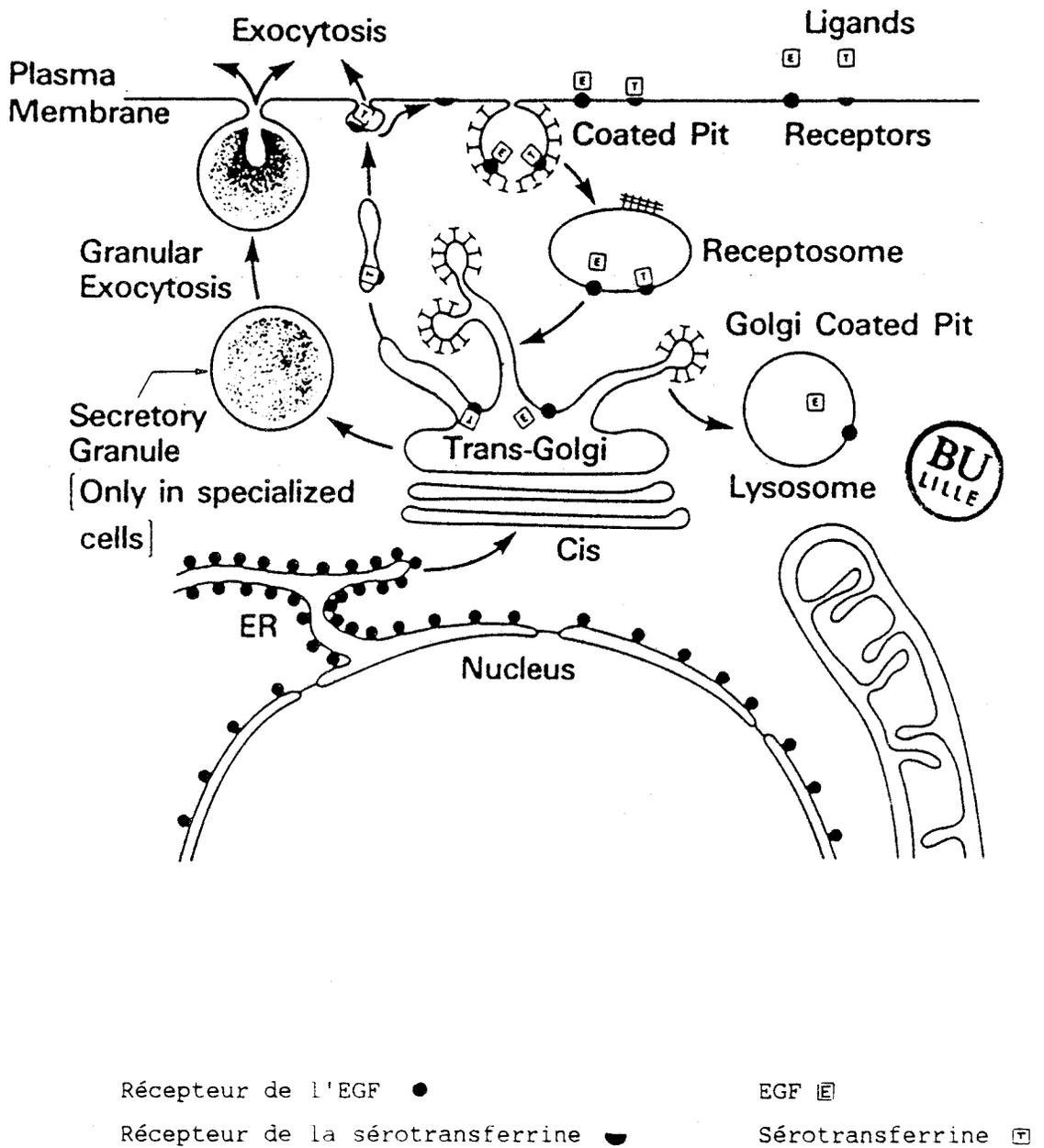


Figure 12 : Schéma hypothétique résumant les différentes voies d'endocytose et d'exocytose dans la cellule, d'après WILLINGHAM et al. (1984).

B - ROLE DANS LA REPOSE IMMUNE : INTERACTION MACROPHAGE - LYMPHOCYTE

Dans leur réponse aux stimuli immunologiques, les macrophages et les lymphocytes interagissent par des séries complexes de signaux de stimulation et d'inhibition. L'activation des lymphocytes nécessite la libération par le macrophage de médiateurs et l'activation du macrophage dépend de lymphokines spécifiques (SHARMA, 1986) (Fig. 13 p.47).

GERY et WAKSMAN (1972) ont montré que les macrophages produisaient un facteur, le "lymphocyte activating factor" ou L.A.F., ayant le même effet activateur que la PHA (phytohéماغglutinine) ou la concanavoline A. Ce facteur agit sur les lymphocytes T mais ne stimule pas les cellules B. Les macrophages produisent également une substance capable de restaurer la réponse IgM de la rate de souris athymique (WOOD et GAUL, 1974). Cette substance, le B.A.F. ou "B cell activating factor", agit sur les cellules produisant les anticorps.

Récemment, le nom d'interleukine 1 a été attribué à ces différents facteurs, ainsi que le nom d'interleukine 2 aux lymphokines.

Les lymphocytes T sont impliqués dans la production d'interféron qui est le mieux connu des facteurs d'activation du macrophage. L'interféron protège le macrophage contre les infections virales en créant un "état antiviral" chez celui-ci et contre la réplication d'autres parasites intracellulaires (revue générale : WILKINSON et MORRIS, 1985).

C - DESTRUCTION DES CELLULES TUMORALES

Les macrophages activés reconnaissent sélectivement et lysent les cellules tumorales par des mécanismes différents de la phagocytose. Il y a d'abord attachement de la cellule au macrophage activé et libération par celui-ci de composés lytiques.

La lyse induite par le macrophage est plus tardive que celle provoquée par le lymphocyte T. Le macrophage activé ou cytotoxique, capable de tuer la cellule-cible au site de rejet de la tumeur, peut présenter à sa surface des déterminants antigéniques de la cellule tuée et déclencher une réponse des lymphocytes.

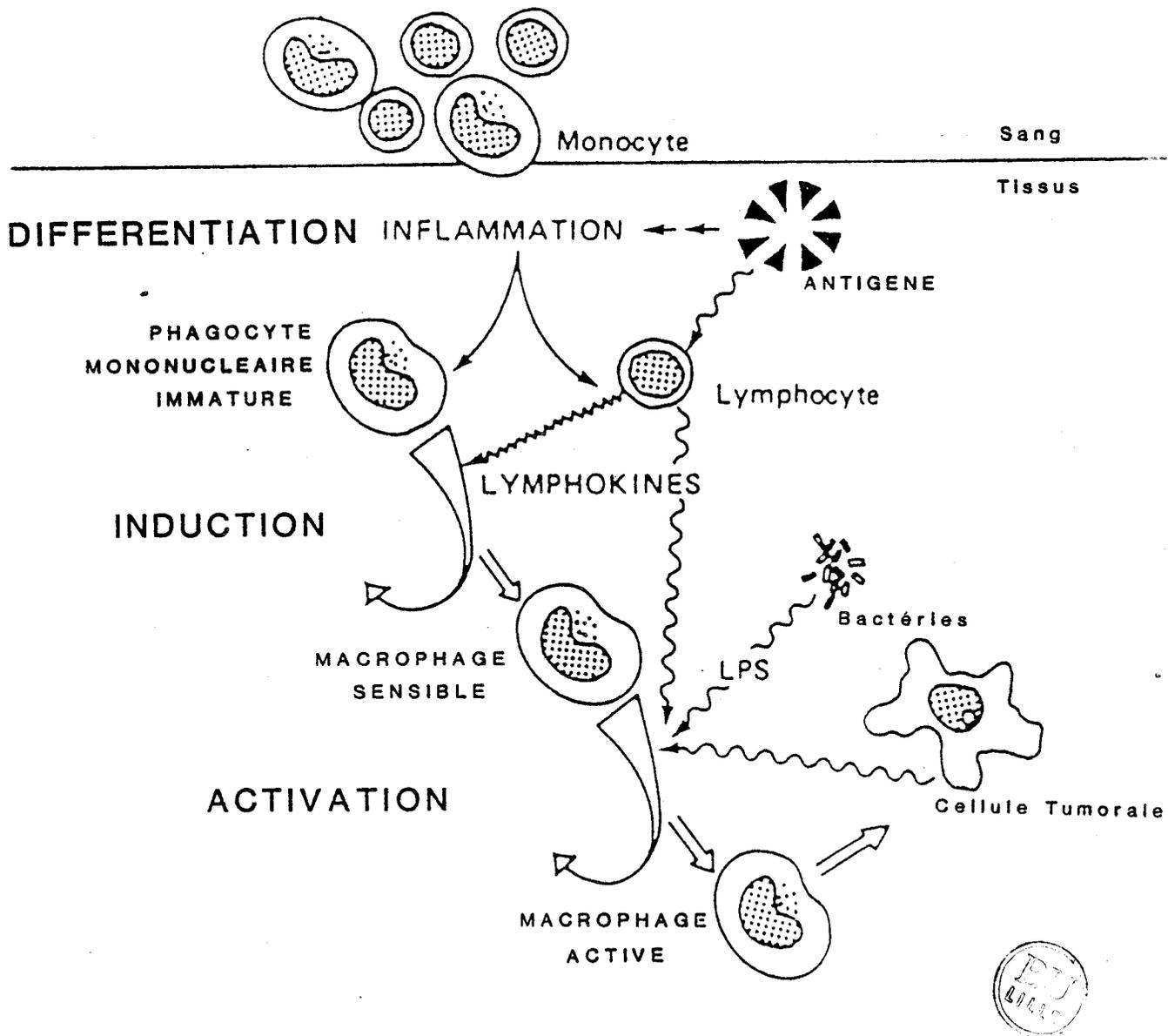


Figure 13 : Activation du macrophage, d'après SHARMA (1986)

III - ETUDE DES RECEPTEURS MEMBRANAIRES DU MACROPHAGE

Parmi les nombreux récepteurs existants sur les membranes des macrophages, nous ne verrons que les plus importants, et seuls les récepteurs de type lectinique seront détaillés.

A - LES RECEPTEURS A Fc

Les phagocytes mononucléaires possèdent des récepteurs membranaires capables de reconnaître la portion Fc des molécules d'IgG. Les études de WALKER (1976) et de UNKELESS (1977) sur les macrophages de souris ont permis de distinguer au moins deux classes distinctes de récepteurs à Fc. Le récepteur Fc2a reconnaît les molécules d'IgG 2a, soit sous forme de monomère soit sous forme d'agrégat et le récepteur Fc2b reconnaît les agrégats d'IgG 1 ainsi que les IgG 2b monomériques ou agrégées. Une troisième classe de récepteur à Fc reconnaissant les agrégats d'IgG 3 semble exister (UNKELESS et al., 1981; DIAMOND et YELTON, 1981). Cependant l'aggrégation des IgG est importante pour promouvoir la fixation sur le récepteur.

Après fixation du ligand, les récepteurs sont internalisés et rapidement dégradés à la différence de nombreux récepteurs d'autres molécules qui sont recyclés. Cependant, le récepteur à Fc peut être recyclé vers la surface membranaire s'il n'est lié qu'avec des IgG monomériques (MELLMANN et PLUTNER, 1984; REYNOLDS et al., 1975).

Après stimulation in vivo ou in vitro, le nombre de récepteurs à Fc chez la souris ou chez le lapin augmente sans changement de l'affinité pour leur ligand (UNKELESS et EISEN, 1975).

Certaines cellules mononucléées possèdent un récepteur pour les IgA, c'est le cas pour les monocytes humains (FANGER et al., 1983) et pour les macrophages alvéolaires de souris (GAULDIE et al., 1983) mais pas pour les macrophages alvéolaires de rat (BOLTZ-NITULESCU et al., 1981).

B - LE RECEPTEUR DU COMPLEMENT C3

Le système du complément est composé de 18 protéines qui peuvent être activées par des complexes immuns et des particules. Le troisième composant du complément, le C3, joue un rôle essentiel dans la défense contre les infections (WINKELSTEIN et al., 1975).

De même que pour le récepteur à Fc, il existerait plusieurs classes de récepteurs du C3 (REYNOLDS et al., 1975). Présent sur toute la surface du macrophage, le récepteur à C3 ne semble pas avoir la même possibilité de migration que les récepteurs à Fc (KAPLAN, 1977). Chez les macrophages non stimulés la fixation de particules recouvertes de complément n'aboutit pas à une internalisation (BIANCO et al., 1975). Cependant les fonctions de ce récepteur changent suivant l'état d'activation de la cellule. En effet, les macrophages activés peuvent ingérer ces particules. Le rôle du récepteur Fc serait d'induire l'absorption et la dégradation des particules par le macrophage alors que le rôle du récepteur C3 serait de promouvoir la fixation de la particule et agirait en synergie avec le récepteur Fc, en assurant la stabilité de la liaison entre la particule et le macrophage.

C - LES RECEPTEURS DES FACTEURS DE MIGRATION

Les macrophages jouent un rôle fondamental dans les réactions d'immunité cellulaire et d'hypersensibilité. Leur activité dans ces processus est intimement liée et même dirigée par les lymphocytes. Lorsqu'ils sont stimulés, les lymphocytes produisent certains facteurs solubles, en particulier le M.I.F. ou "migration inhibitory factor" (FOX et al., 1974; HOMMA et al., 1981) et le M.S.F. ou "migration stimulatory factor" (FOX et al., 1974), qui modifient le comportement des macrophages.

Les deux récepteurs macrophagiques de ces facteurs semblent être des glycoprotéines. La fixation du M.I.F. sur le macrophage est inhibée par le L-fucose (REMOLD, 1973), alors que celle du M.S.F. est inhibée par la N-acétyl-D-galactosamine (FOX et al., 1974).

D - LE RECEPTEUR DE LA SEROTRANSFERRINE

La fixation de la sérotransferrine a été étudiée sur le macrophage péritonéal de rat (NISHISATO et AISEN, 1982) et sur le macrophage alvéolaire de rat (WYLLIE, 1977). Ces études ont montré que le taux de saturation en fer de la sérotransferrine influait sur l'affinité de la cellule pour le ligand. L'expression du récepteur de la sérotransferrine est fonction de l'état de maturation de la cellule. En effet, le récepteur de la sérotransferrine n'existe pas dans le monocyte et très peu dans le macrophage péritonéal, mais il apparaît après plusieurs jours de culture in vitro (ANDREESEN et al., 1984; COSTABEL et al., 1984; HIRATA et al., 1985).

Contrairement aux autres ligands, la sérotransferrine n'est ni dégradée ni stockée après sa pénétration dans la cellule. Elle libère des ions ferriques puis est relâchée dans le milieu extracellulaire sous forme d'apotransferrine (DAUTRY-VARSAT et al., 1983; DAUTRY-VARSAT et LODISH, 1984; WILLINGHAM et al., 1984).

La sérotransferrine, transportée dans une vésicule prélysosomique acide (VAN RENSWOUDE et al., 1982) libère son fer mais reste fixée à son récepteur lorsque le pH est égal à 5. En revanche, en milieu neutre, l'aposérotransferrine a très peu d'affinité pour son récepteur et peut donc être relâchée dans le milieu extracellulaire. (Fig. 14 p.51).

L'expression et la synthèse du récepteur de la sérotransferrine sont dépendantes du taux de fer extra et intracellulaire : PELOS-TESTA et al. (1987) ont montré que l'addition de fer au milieu de culture entraînait une augmentation importante du nombre de récepteurs à la surface du macrophage et le taux de mRNA du récepteur de la sérotransferrine est multiplié par deux ou trois. En revanche, le taux de fer intracellulaire régule par un contrôle négatif le nombre de récepteurs membranaires.

L'état d'activation du macrophage joue également un rôle dans l'expression de ce récepteur : celui-ci est présent chez les macrophages péritonéaux activés mais pas chez les macrophages péritonéaux résidents (NISHISATO et AISEN, 1982; HAMILTON et al., 1984a). Partant de cette constatation, HAMILTON et al. (1984b) ont montré que l'interféron, un agent induisant l'activation du macrophage, pouvait in vitro réguler l'expression du récepteur de la sérotransferrine chez les macrophages péritonéaux de souris.

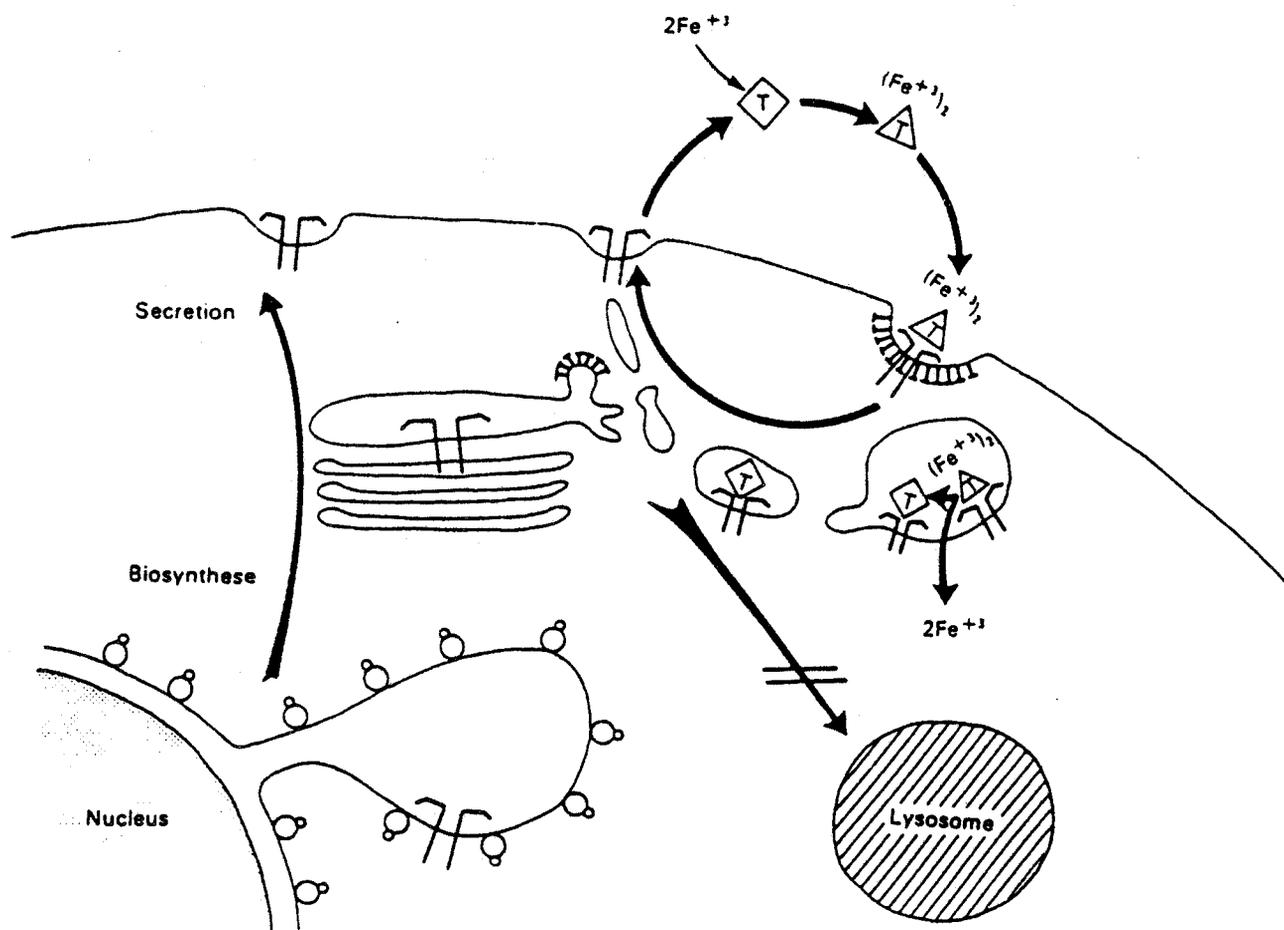


Figure 14 : Le cycle de la sérotransferrine, d'après HANOVER et DICKSON (1985)

De la même façon, le nombre de récepteurs augmente sensiblement à la surface des macrophages alvéolaires de patients atteints de sarcoïdose (HIRATA et al., 1984).

L'hypothèse de l'universalité du récepteur de la sérotransferrine a été émise par HAMILTON et al. (1979) et WADA et al. (1979), qui par l'utilisation d'anticorps dirigés contre le récepteur placentaire de la sérotransferrine humaine, ont caractérisé le récepteur sur différentes lignées cellulaires humaines.

La séquence nucléotidique complète du mRNA du récepteur humain de la sérotransferrine a été décrite par MAC CLELLAND et al. (1984) et par SCHNEIDER et WILLIAMS (1985). Ce récepteur est une glycoprotéine dimérique de 180 000 daltons, composée de deux sous-unités identiques de masse moléculaire 90 000 reliées entre elles par un pont disulfure. Deux des trois oligosaccharides liés N-glycosidiquement au récepteur sont de type polymannosidique, l'autre glycanne est de type N-acétyllactosaminique. Le récepteur humain de la sérotransferrine contient également un acide gras lié de façon covalente ainsi que des résidus de phosphosérine (OMARY et TROWBRIDGE, 1981) (Fig. 15 p.53).

Récemment, des études similaires sur le récepteur murin de la sérotransferrine ont permis d'établir certaines homologues avec le récepteur humain. C'est également une glycoprotéine dimérique de 200 000 de masse moléculaire (VAN AGTHOVEN et al., 1984). La séquence de ce récepteur a été partiellement établie (STEARNE et al., 1985).

E - LES RECEPTEURS LECTINIQUES

Les cellules possèdent sur leur surface membranaire de nombreux récepteurs lectiniques (SHARON, 1984). Le plus étudié de ces récepteurs est celui, spécifique du galactose, responsable de la clairance des glycoprotéines désialylées et caractérisé sur les hépatocytes par ASHWELL et collaborateurs (ASHWELL et MORELL, 1974; ASHWELL et HARFORD, 1982). Depuis, de nombreuses lectines membranaires ont été caractérisées et isolées, en particulier sur le macrophage.

1 - Le récepteur à galactose

L'accumulation, dans le foie, d'érythrocytes ou de lymphocytes traités à la neuraminidase est due à la présence d'un récepteur

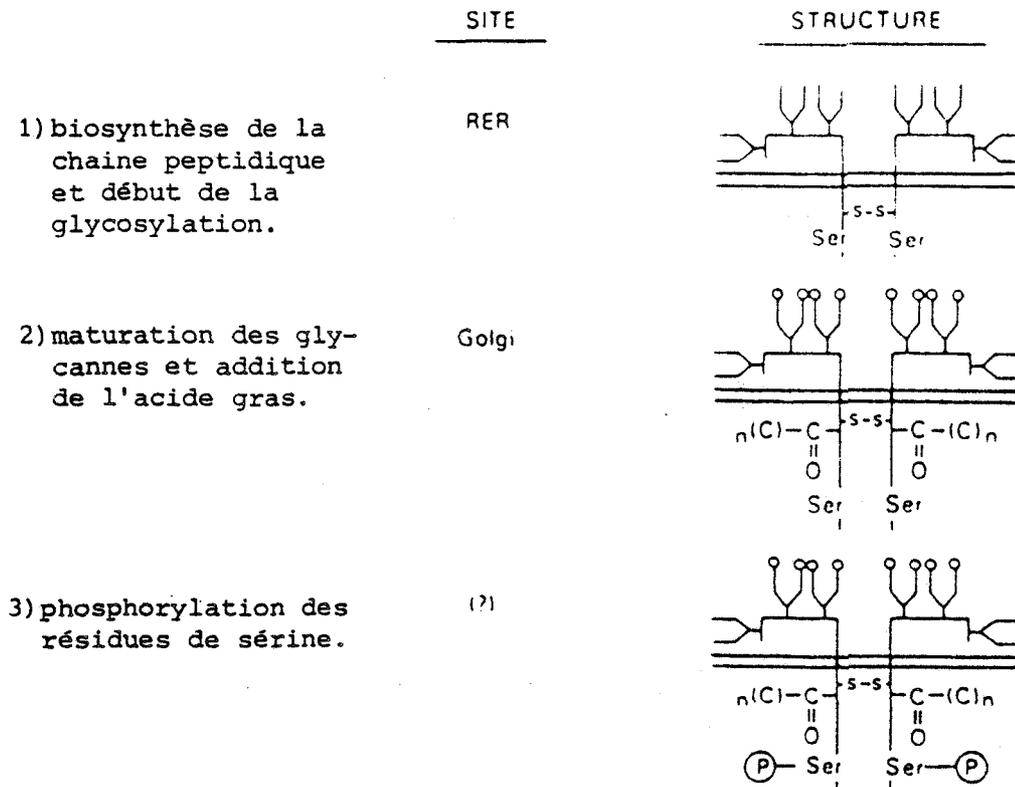


Figure 15 : Structure et biosynthèse du récepteur de la sérotransferrine, d'après HANOVER et DICKSON (1985)

spécifique du galactose à la surface des macrophages hépatiques (KOLB et al., 1978, 1981; MULLER et al., 1981). Ce récepteur différent du récepteur hépatique d'ASHWELL a récemment été isolé (ROOS et al., 1985).

Les glycoprotéines à galactose terminal sont également reconnues par ce récepteur au niveau des cellules de Kupffer (KOLB et al., 1978; SCHLEPPER-SCHAFFER et al., 1986) et des macrophages péritonéaux (KUSTER et al., 1981; KELM et al., 1986; KELM et al., 1987; LEE et al., 1987).

2 - le récepteur à mannose

L'existence d'un récepteur à mannose a été déduite à partir d'expériences de clairance chez le rat où il a été observé que les glycoprotéines à D-mannose ou à N-acétyl-D-glucosamine localisé en position terminale non réductrice étaient rapidement éliminées de la circulation sanguine (STAHL et al., 1976; STOCKERT et al., 1976; ACHORD et al., 1977). L'élimination de ces glycoprotéines par le foie ne se fait pas par les hépatocytes via le récepteur d'ASHWELL mais par les cellules de Kupffer via un récepteur à mannose (ACHORD et al., 1978; SCHLESINGER et al., 1978).

La plupart des macrophages, notamment les macrophages alvéolaires (STAHL et al., 1978) et péritonéaux (STAHL et al., 1982; TENU et al., 1982), exprime à leur surface ce récepteur lectinique. Cependant, les monocytes circulants ne possèdent pas ce récepteur (SHEPHERD et al., 1982). Ce dernier apparaît à la surface des monocytes ou des macrophages de la moëlle osseuse qu'après plusieurs jours de culture (SHEPHERD et al., 1982; KATAOKA et al., 1985). Ce récepteur pourrait être un marqueur de la maturation du monocyte en macrophage.

Le récepteur à mannose possède une large spécificité : il fixe des néoglycoprotéines à D-mannose, à N-acétyl-D-glucosamine, à L-fucose et à D-glucose ainsi que les glycoprotéines à D-mannose ou à L-fucose terminal (TOWNSEND et al., 1981; KONISHI et al., 1983; LANG et al., 1985). Ce récepteur sert d'intermédiaire au transfert rapide du ligand de la surface cellulaire vers le lysosome (KONISHI et al., 1983). La séparation du complexe ligand-récepteur dépend du pH. En effet, l'affinité pour le ligand diminue fortement lorsque l'on passe de pH 7 à pH 5 (STAHL et al., 1984). Le ligand est dégradé dans

le lysosome alors que le récepteur est recyclé vers la surface membranaire (STAHL et al., 1980; 1984).

IMBER et al. (1982) ont constaté que l'activation des macrophages entraîne une diminution du nombre de récepteur à mannose sur la surface cellulaire.

En 1984, STAHL et al. identifient une protéine de masse moléculaire 175 000 comme étant le récepteur à mannose du macrophage alors que le récepteur à mannose de l'hépatocyte possède une masse moléculaire de 32 000 (WILEMAN et al., 1984; STAHL et al., 1984).

Le rôle physiologique de ce récepteur macrophagique n'est pas encore bien défini mais il semble impliqué dans l'élimination d'enzymes lysosomiques et la régulation de leurs taux extracellulaires dans les cas d'inflammation, dans l'élimination de complexes antigène-anticorps et de microorganismes, levures ou bactéries (SUNG et al., 1981).

3 - le récepteur à mannose-6-phosphate

Récemment mis en évidence chez le macrophage, le récepteur à mannose-6-phosphate joue un rôle important dans le transport d'enzymes lysosomiques nouvellement synthétisés du réticulum endoplasmique vers le lysosome (SHEPHERD et al., 1984). Ce récepteur à mannose-6-phosphate paraît être similaire à celui exprimé par les fibroblastes. Contrairement au récepteur à mannose qui n'apparaît qu'après la maturation des monocytes en macrophages, le récepteur à mannose-6-phosphate est présent chez les monocytes humains fraîchement isolés (ROCHE et al., 1985). D'après SHEPHERD et al., (1984), 80 à 90% des récepteurs à mannose-6-phosphate seraient intracellulaires. Après endocytose, le récepteur est recyclé vers la surface membranaire.

4 - Les récepteurs à fucose

Beaucoup de glycoprotéines contiennent du L-fucose en position non réductrice, lié sur un galactose pénultième ou sur un résidu de N-acétyl-D-glucosamine.

Le fucose joue un rôle important dans la spécificité des groupes sanguins (WATKINS, 1966). PRIEELS et al. (1978) ont montré qu'une lectine hépatique, spécifique du L-fucose, était responsable de la clairance rapide du plasma de glycoprotéines contenant du fucose

terminal lié en $\alpha(1-3)$, en particulier de la lactotransferrine humaine, qui se retrouvent en majorité dans les hépatocytes mais également dans les cellules de Küpffer. Ce récepteur ne reconnaît pas le fucose lié en $\alpha(1,6)$ ou en $\alpha(1,2)$ (LEHRMANN et al., 1980). En 1979, GRANT et al. montrent que l'entérokinase est également très rapidement éliminée de la circulation sanguine.

Les travaux de SHEPHERD et al. (1981) tendent à montrer que le récepteur à fucose du macrophage alvéolaire de rat est identique au récepteur à mannose décrit par STAHL (STAHL et al., 1978). Ces auteurs ont établi une classification des sucres ayant un pouvoir inhibiteur sur la fixation de glycoprotéines à fucose par ce récepteur. Celui-ci fixerait les glycoconjugués dans l'ordre suivant:

L-Fuc = D-Man > D-GlcNac = D-Glc > D-Xyl >> D-Gal = L-Ara = D-Fuc

Récemment, HILL et collaborateurs ont montré l'existence d'une autre lectine à L-fucose présente au niveau du foie (LEHRMAN et HILL, 1983; LEHRMAN et al., 1986a). En effet, les cellules de Küpffer possèdent une lectine membranaire avec une haute spécificité de fixation pour les oligosaccharides ayant du L-fucose ou du D-galactose en position terminale non réductrice (LEHRMAN et HILL, 1986; LEHRMAN et al., 1986b). Cette lectine, présente uniquement dans les membranes plasmiques des macrophages du foie, contient deux sous-unités de masse moléculaire 88 000 et 77 000. Cette lectine est absente dans les macrophages d'autres tissus (HALTWANGER et al., 1986).

Cependant, une lectine membranaire reconnaissant le fucose a été isolée à partir de macrophages alvéolaires de rat (WILEMAN et al., 1986; HALTIWANGER et HILL, 1986a; 1986b). Cette lectine de masse moléculaire de 180 000 possède une spécificité proche de la lectine à mannose et est également présente chez les cellules endothéliales et les cellules de Küpffer.

Les récepteurs de type lectinique sont recyclés vers la membrane après l'endocytose alors que leurs ligands sont généralement dégradés dans le lysosome. Les principaux récepteurs lectiniques et leur localisation sont donnés dans le tableau 1 p. 57.

TABLEAU I

Localisations et propriétés des principales lectines du macrophage

LECTINES	LOCALISATION	PM (KDa)	PROPRIETES	REFERENCES
Man 6 P.	Fibroblastes Hépatocytes Macrophages alvéolaires Cellules ovariennes de hamster Autres tissus de rat	215	liaison indépendante des cations divalents	
Man 6 P.	Macrophages de souris Foie de boeuf	46	cations divalents nécessaires à la liaison	
Gal	Cellules de Küpffer Macrophages péritonéaux	43	ions Ca^{2+} nécessaires différent du récepteur hépatique	ROOS <u>et al.</u> (1985)
Man/GlcNAC/Fuc	Cellules de Küpffer Macrophages alvéolaires péritonéaux Cellules du système réticulo-endothélial	180	ions Ca^{2+} nécessaires pH max. : 7 - 9	STAHL <u>et al.</u> (1984)
Man/GlcNAC/Fuc	Hépatocytes Sérum	32	ions Ca^{2+} nécessaires	WILEMAN <u>et STAHL</u> (1984)
Fuc/Gal	Cellules de Küpffer	88-77	ions Ca^{2+} nécessaires	HALTIWANGER <u>et al.</u> (1986)



INTERACTION LACTOTRANSFERRINE - MACROPHAGE
ROLE DANS LE METABOLISME DU FER

I - ROLE DU MACROPHAGE DANS LE METABOLISME DU FER

A - ROLE DU MACROPHAGE DANS LE CATABOLISME DE L'HEMOGLOBINE

Les phagocytes mononucléaires du système réticulo-endothélial jouent un rôle important dans le métabolisme du fer. Ils sont, en effet, responsables du catabolisme des érythrocytes séniles (DOAN et al., 1939).

Une part importante du fer provenant de la dégradation de l'hémoglobine est libérée par le macrophage. Le fer se fixe alors à la sérotransferrine (CUSTER et al., 1980; BROCK et al., 1984; SAITO et al., 1986) qui le transporte jusque dans la moëlle osseuse pour l'érythropoïèse.

Le fer de l'érythrophagocytose se fixe préférentiellement à la transferrine du macrophage plutôt qu'à l'apoferritine (HAURANI et al., 1973) mais selon CUSTER et al. (1980) le fer intracellulaire serait transféré à la ferritine. En effet, HAURANI et al. (1973) puis CUSTER et al. (1982) ont montré l'existence d'une synthèse de sérotransferrine par le macrophage péritonéal de souris.

L'incorporation du fer par le macrophage activé est plus importante que celle du macrophage résident (SAITO et al., 1986).

Si le taux d'érythropoïèse augmente, une libération du fer des cellules réticulo-endothéliales vers la sérotransferrine du milieu se produit (ESPARZA et BROCK, 1981).

B - ROLE DU MACROPHAGE DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER

Les macrophages interviennent également dans l'absorption intestinale du fer (REFSUM et SCHREINER, 1980; CATTAN, 1983).

En effet, la barrière intestinale est composée de trois membranes : l'épithélium où se trouvent les entérocytes, puis ensuite la lamina propria composée de cellules intersticielles, de macrophages et de capillaires, et enfin, la muqueuse musculaire.

Le fer alimentaire passe à travers l'entérocyte, par l'intermédiaire de chélateur, puis une partie de ce fer passe dans la circulation sanguine. Le reste du fer est stocké par le macrophage qui constitue la réserve de fer la plus importante de la villosité. Chez le sujet normal, le transfert ne porte que sur 25% de la quantité captée (POWELL et al., 1970). Le fer macrophagique peut être soit libéré vers la circulation sanguine en fonction des besoins, soit excrété via les cellules à mucus.

II - INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC LE METABOLISME DU FER

A - LACTOTRANSFERRINE ET DEFICIENCE EN FER : L'INFLAMMATION

Lors de syndrômes inflammatoires prolongés dûs aux maladies infectieuses, à l'arthrite rhumatoïde ou associés aux cancers, la sidérémie baisse et entraîne à la longue une anémie ferriprive.

Cette réponse pourrait protéger l'organisme au prise avec des agents infectieux (WEINBERG, 1984). Inversement, lorsque l'hôte présente une surcharge en fer, l'inflammation n'entraîne pas d'hyposidérémie et la sévérité des infections s'en trouve accrue (WEINBERG, 1984).

Cependant, lors d'un état inflammatoire, la libération du fer par le macrophage activé diminue (DEISS, 1983; SAITO et al., 1986). L'inflammation augmente l'activité catabolique du macrophage et la synthèse de ferritine, mais diminue la libération du fer des macrophages (ESPARZA et BROCK, 1981).

O'SHEA et al. (1973) ont montré que l'inflammation provoque une hyperactivité des macrophages qui se traduit par une augmentation de la destruction des globules rouges et une augmentation du stockage du fer ainsi que de l'incorporation de la sérotransferrine saturée.

Plusieurs auteurs ont proposé que la lactotransferrine pouvait être responsable de l'hyposidérémie de l'inflammation (MASSON, 1970; VAN

SNICK et al., 1974; SPIK et MONTREUIL, 1983). La lactotransferrine libérée par les leucocytes neutrophiles au site de l'inflammation serait capable de prendre le fer de la sérotransferrine puis serait, ensuite, rapidement captée par les macrophages où le fer serait ainsi stocké (Fig.9 p 35). Il y aurait une ponction du fer du compartiment plasmatique vers le compartiment de réserve en cas d'inflammation.

Si dans les conditions normales, une partie du fer provenant de l'hème est rapidement relarguée dans le "pool" plasmatique, le reste du fer est d'abord associé à la ferritine du macrophage puis relargué tardivement. Dans l'inflammation, tout le fer provenant du catabolisme de l'hémoglobine reste associé aux cellules macrophagiques du foie (KAMPSCHMIDT et al., 1965, LETENDRE et HOLBEIN, 1984).

Pour rendre compte de l'hyposidérémie de l'inflammation, on peut émettre l'hypothèse que la lactotransferrine, relarguée sous forme d'apolactotransferrine lors de la dégranulation des leucocytes et rapidement captée par les macrophages, peut être un intermédiaire modifiant le transfert du fer du "pool" soluble vers la ferritine. Le fer provenant du catabolisme de l'hème et se trouvant au contact de la lactotransferrine dans l'appareil endocyttaire acide du macrophage pourrait ainsi être séquestré puis transféré sur la ferritine (MOGUILEVSKY, 1987).

B - LACTOTRANSFERRINE ET SURCHARGE EN FER : L'HEMOCHROMATOSE

L'hémochromatose 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 (SIMON et al., 1981).

Dans l'hémochromatose on observe le dépôt progressif de 15 à 60 g de fer dans l'organisme. L'augmentation du fer sérique précède l'augmentation du fer de réserve, qui se fait principalement dans le parenchyme hépatique. Alors que la concentration tissulaire de fer hépatique est multipliée par 100 par rapport à la normale, celle des macrophages n'est multipliée que par 5.

La relative pauvreté des dépôts de fer dans le système macrophagique, et la possibilité d'une hypersidérémie sans augmentation du fer de réserve suggère un trouble de la cinétique interne du fer.

Le monocyte sanguin ne semble pas être défectueux au niveau de l'incorporation du fer puisque celle-ci, la synthèse de ferritine et la quantité de fer incorporée dans la ferritine ne diffèrent pas de celles observées chez les patients normaux (JACOBS et SUMMERS, 1981). Seul le taux de ferritine augmente, mais une anomalie dans la libération du fer du macrophage vers le plasma peut exister. En effet, le fer hémoglobinémique n'est plus retenu normalement dans les réserves du macrophage et s'accumule dans le plasma (FILLET et MARSAGLIA, 1975).

L'anomalie au niveau du système macrophagique se caractérise par une capacité réduite de mettre en réserve le fer des hématies sénescents et de contrôler le niveau de la sidérémie. L'hémochromatose réalise le tableau inverse de celui de l'inflammation.

Une autre anomalie importante de l'hémochromatose est l'augmentation anormale de l'incorporation du fer par le lumen gastro-intestinal (SIMON et al., 1981). Les macrophages des villosités intestinales présentent une concentration élevée en fer (CATTAN, 1983).

Si lors de réactions inflammatoires, la lactotransferrine peut être l'intermédiaire responsable de la séquestration du fer dans le macrophage, on peut émettre l'hypothèse qu'une anomalie de l'action de la lactotransferrine dans l'hémochromatose pourrait au contraire supprimer cette rétention du fer qui serait alors libéré du macrophage vers la circulation sanguine.

III - INTERACTION LACTOTRANSFERRINE - MACROPHAGE

Les résultats sur l'interaction de la lactotransferrine avec le système macrophagique ont été obtenus à la suite d'expériences soit de clairance in vivo soit d'études in vitro à partir de macrophages isolés en culture.

Les résultats sont assez controversés surtout en ce qui concerne les rôles respectifs des parties protéique et glycanique de la lactotransferrine.

A - CAPTURE DE LA LACTOTRANSFERRINE IN VIVO

Tous les auteurs s'accordent à reconnaître que la lactotransferrine injectée dans la circulation sanguine d'un animal, est avidement captée par le foie de ce dernier. Cependant, la nature du type cellulaire responsable de cette clairance très rapide reste l'objet de controverses. En effet, le parenchyme hépatique comprend au moins deux populations cellulaires principales : les hépatocytes et les cellules du système réticulo-endothélial.

1 - Capture par les hépatocytes

En 1978, PRIEELS et al. ont rapporté que les hépatocytes possédaient, à leur surface membranaire, un récepteur fixant les glycoprotéines par l'intermédiaire du fucose lié en $\alpha(1,3)$ sur une N-acétylglucosamine, le fucose en $\alpha(1,2)$ ou en $\alpha(1,6)$ n'étant pas reconnu. Ce récepteur a depuis été caractérisé par LEHRMAN et HILL en 1986 mais au niveau des cellules de Küpffer. D'après PRIEELS et al. (1978), les hépatocytes seraient responsables de la clairance de 90% de la lactotransferrine injectée.

Cependant, les travaux de LEHRMAN et al. en 1986 suggèrent que les glycoprotéines à fucose en $\alpha(1,3)$, comme l'asialotransferrine fucosylée par une fucosyltransférase, se fixeraient plutôt sur le récepteur à galactose que sur un récepteur spécifique du fucose. Leurs résultats restent, cependant, contradictoires puisque la clairance d'une néoglycoprotéine à fucose, la fucosyl sérum albumine ou Fuc-BSA, n'est pas inhibée par l'asialoorosomucoïde mais l'est par la lactotransferrine humaine. La lactotransferrine n'inhibe pas la fixation du Fuc-BSA sur les membranes isolées d'hépatocytes (LEHRMAN et al., 1986).

2 - Capture par le système réticulo-endothélial

En 1974, VAN SNICK et al. ont montré que le blocage préalable du système réticulo-endothélial par l'injection intraveineuse d'encre de chine diminuait la clairance de la lactotransferrine humaine.

L'injection de sulfate de dextran inhibe la capture hépatique de la lactotransferrine mais est sans effet sur celle de l'asialoorosomucoïde (MOGUILVSKY, 1987). Le sulfate de dextran est un

agent bloquant du système réticulo-endothélial, ce qui tend à prouver que la lactotransferrine est éliminée de la circulation sanguine par les cellules de Küpffer et non par les hépatocytes.

De plus, des expériences d'immunofluorescence ont montré que la lactotransferrine se retrouvait le long de la paroi des sinusoides. Par autoradiographie, la lactotransferrine a été localisée dans les cellules de Küpffer et dans les cellules endothéliales mais pas au niveau des hépatocytes (MOGUILEVSKY, 1987).

Plusieurs études ont été réalisées afin de déterminer l'importance de la partie glycanique, en particulier celle du fucose, dans l'élimination de la lactotransferrine par les cellules de Küpffer. Aucune différence n'a été observée entre la clairance de la lactotransferrine humaine et celle de la lactotransferrine défucosylée (IMBER et PIZZO, 1983). Des résultats similaires ont été rapportés par MOGUILEVSKY (1987) qui ne précise pas, cependant, la nature de la liaison du fucose résiduel : la lactotransferrine humaine utilisée n'étant défucosylée qu'au deux tiers.

Des expériences ont montré que la lactotransferrine carbamylée, succinylée ou citraconylée est reconnue par le même mécanisme que la molécule non modifiée mais avec une affinité plus faible (PRIEELS et al., 1982; MOGUILEVSKY, 1987).

Enfin, la clairance de la lactotransferrine de souris est identique à celle de la lactotransferrine humaine à deux différences près : une proportion significative de la lactotransferrine de souris est captée par les reins et la disparition à partir du foie est deux fois plus rapide que pour la lactotransferrine humaine (MOGUILEVSKY, 1987).

B - INTERACTION LACTOTRANSFERRINE - MACROPHAGE IN VITRO

1 - Sites de fixation et affinité

De nombreux auteurs ont étudié le nombre et l'affinité des sites de fixation pour la lactotransferrine à la surface des macrophages. Les résultats obtenus varient beaucoup, principalement en ce qui concerne le nombre de sites de fixation. La capacité de fixation de la lactotransferrine par les macrophages est très élevée : le nombre de sites par cellules est toujours supérieur à 10^6 .

a - Fixation sur les monocytes

En 1981, BENNETT et DAVIS, étudiant la fixation de la lactotransferrine humaine en système homologue, ont déterminé la présence de 200×10^6 sites par macrophage dérivant de la maturation de monocytes in vitro. Cette fixation est dépendante du calcium.

Les mêmes auteurs ont montré que la fixation de la lactotransferrine humaine sur le monocyte se faisait au niveau de l'ADN membranaire de surface. Après traitement des cellules à la DNase, la lactotransferrine ne se fixe plus (BENNETT et al., 1983).

En 1983, BIRGENS et al. ont montré que la fixation de la lactotransferrine humaine sur le monocyte est saturable et réversible. Le nombre de sites de fixation est de $1,6 \times 10^6$ par cellule avec une affinité de $4,5 \times 10^{-9}$ M pour la lactotransferrine native (20% de saturation en fer).

Ces auteurs ont montré que la fixation de la lactotransferrine dépendait du système d'étude utilisé. L'affinité est cent fois plus faible si les monocytes adhèrent sur un support ($Kd = 4 \times 10^{-7}$ M) que s'ils sont en suspension.

En 1987, MOGUILVSKY compare les fixations des lactotransferrines humaines isolées du lait et des granules de leucocytes sur les monocytes humains. Aucune différence entre les fixations de ces deux lactotransferrines n'a été notée. Le nombre de sites est de 10×10^6 par cellule avec une affinité de 4×10^{-7} M.

b - Fixation sur les macrophages

D'après MASSON et coll., la fixation de la lactotransferrine humaine sur les macrophages alvéolaires (MARKOWETZ et al., 1979) et péritonéaux de souris (VAN SNICK et MASSON, 1976) dépendrait de son taux de saturation en fer : la lactotransferrine saturée se fixerait plus que l'apolactotransferrine.

Le nombre de sites de fixation par macrophage (20×10^6) est trois fois supérieur à celui des lymphocytes. Ces mêmes auteurs ont montré que la lactotransferrine ne se fixait pas sur les hématies.

L'affinité de la lactotransferrine humaine pour le macrophage péritonéal de souris est assez faible, de l'ordre de 10^{-6} M.

L'intégrité de la structure de la lactotransferrine est nécessaire à sa fixation sur la cellule.

En 1982, CAMPBELL étudie la fixation de trois glycoprotéines des granules de leucocyte sur le macrophage alvéolaire humain. Les résultats obtenus laisseraient à penser que la lactotransferrine, l'élastase et la cathepsine G se fixeraient sur le même récepteur. La lactotransferrine se fixe sur le macrophage avec une affinité de $1,7 \times 10^{-6}$ M et un nombre de sites de 54×10^6 par cellule. Cette fixation est inhibée par la fucoïdine.

En 1985, GOAVEC et al. montrent que la fixation de la lactotransferrine humaine sur le macrophage alvéolaire humain est réversible et saturable. Elle ne dépend pas de la saturation en fer. Le nombre de sites de fixation par cellule est de 10×10^6 avec une affinité de 2×10^{-7} M.

De toutes ces études, il ressort que la lactotransferrine se fixe spécifiquement sur le macrophage d'une façon réversible et saturable. Le nombre de sites de fixation est très variable suivant les auteurs. Il est généralement élevé et se situe entre 1 à 200×10^6 sites par cellules.

En revanche, l'affinité est faible : les constantes d'association sont comprises entre 10^{-6} et 10^{-7} M.

2 - Nature des sites de fixation

a - Fixation non spécifique

Les résultats décrits précédemment ont conduit certains auteurs à suspecter une interaction non spécifique de la lactotransferrine avec les cellules macrophagiques. La lactotransferrine est une glycoprotéine possédant un pHi très basique et pourrait de ce fait interagir avec des groupements anioniques présents à la surface membranaire tels que les acides sialiques des glycoprotéines intégrées dans la membrane, les phospholipides ou encore les acides nucléiques attachés ou associés aux membranes (MOYER, 1979).

Les études réalisées par BENNETT et al. (1983) et par MOGUILVSKY (1987) ont montré que des constituants anioniques seul l'ADN membranaire était capable de fixer la lactotransferrine de façon non spécifique. Après le traitement des monocytes par des endonucléases, la fixation de la lactotransferrine à la surface de la cellule est réduite de plus de 50%.

La fixation non spécifique de la lactotransferrine sur les monocytes semble très importante.

b - Fixation spécifique

D'autres auteurs ont signalé l'importance du groupement glycanique de la lactotransferrine humaine dans sa fixation sur les macrophages matures comme les macrophages alvéolaires.

La fixation de la lactotransferrine humaine sur le macrophage alvéolaire humain est inhibée par les néoglycoprotéines à fucose et à mannose (GOAVEC et al., 1985). Ces auteurs concluent à la possibilité d'une reconnaissance de la lactotransferrine humaine par le récepteur à mannose/fucose/N-acétylglucosamine du macrophage décrit par STAHL et collaborateurs (1978, 1982).

SHEPHERD et al. (1981) avaient déjà décrit le rôle du fucose dans la reconnaissance de la β glucuronidase par le macrophage alvéolaire et avaient abouti alors à la même conclusion.

HALTIWANGER et HILL (1986) ont montré que la lectine à mannose du macrophage était capable de fixer les glycoprotéines à mannose en position terminale comme l'asialo-agalacto-ahexosaminosomucoïde et l'asialo-agalacto-ahexosaminotransferrine. Ces résultats obtenus sur la lectine isolée et purifiée sont en contradiction avec ceux de IMBER et PIZZO (1983) qui n'ont observé aucune différence de fixation entre la lactotransferrine humaine et la lactotransferrine défucosylée sur le macrophage péritonéal de souris.

IV - CONCLUSION

Le mécanisme de reconnaissance de la lactotransferrine par le macrophage est complexe et dépend, en particulier, de l'origine de la cellule : la fixation ne semble pas se faire sur les mêmes sites chez les monocytes et chez les macrophages matures.

La présence d'un récepteur spécifique de la lactotransferrine à la surface des macrophages reste controversée. En effet, les récepteurs de la lactotransferrine ont été isolés à partir des lymphocytes activés (MAZURIER et al., 1987) et des entérocytes (MAZURIER et al., 1984; DAVIDSON et LONNERDAL, 1985) mais pas encore au niveau des macrophages.

TRAVAUX PERSONNELS

PREPARATION DES LACTOTRANSFERRINES

I - PREPARATION DES LACTOTRANSFERRINES NATIVES

A - PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

1 - Matériels et méthodes

a - Isolement à partir du lait humain

La méthode utilisée pour préparer la lactotransferrine humaine est une méthode dérivée de celle mise au point par CHERON et al. (1975) pour la lactotransferrine de vache.

- Chromatographie du lactosérum

Le lait est délipidé par centrifugation pendant 45 mn à 2000 g et à + 4°C. Il est ensuite décaséiné par précipitation de la caséine à pH 4,6 avec de l'HCl 3N. Après dialyse trois jours contre de l'eau permutée, le précipité est éliminé par centrifugation à 2000 g à + 4°C pendant 30 mn.

Le lactosérum est chromatographié à + 4°C sur une colonne de SP-Séphadex C-50 stabilisée dans de l'acétate de sodium 0,22 M.

Après lavage de la colonne par de l'acétate de sodium 0,22 M puis 0,4 M, la lactotransferrine est éluée par de l'acétate de sodium 1 M. La lactotransferrine est dialysée trois jours contre de l'eau permutée puis lyophilisée.

- Purification de la lactotransferrine

La lactotransferrine est purifiée par une deuxième chromatographie d'échange d'ions sur SP-Séphadex C-50. L'éluion se fait par un gradient discontinu en acétate de sodium.

La lactotransferrine humaine est éluée par de l'acétate de sodium 1 M.

b - Isolement à partir de leucocytes humains *

- Isolement des leucocytes humains

Le sang, recueilli sur héparine est centrifugé à 800 g pendant 15 mn. Le plasma est éliminé et les hématies sont détruites en resuspendant les cellules dans 2 volumes d'eau. L'isotonicité est restaurée, après 45 sec., par addition de tampon PBS dix fois concentré (tampon 100 mM phosphate de sodium, NaCl 1,5 M, pH 7,4). Les cellules sont sédimentées et lavées par le PBS. Ce protocole est inspiré de celui proposé par MOGUILEVSKY et al. (1985).

- Purification de la lactotransferrine

Le culot de cellules est repris par du PBS puis soniqué. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 16 000 g 30 mn. Le surnageant est injecté sur une colonne d'anticorps anti-lactotransferrine humaine immobilisés sur du Sépharose 4B. La méthode de couplage sera décrite ultérieurement p.122.

La colonne est rincée par du PBS puis par du PBS contenant du NaCl 1 M et enfin par du PBS seul. L'éluat est réalisée par un tampon glycolle 0,1 M/HCl à pH 2,8. L'éluat est recueilli dans du Tris 1 M de façon à ce que le pH soit proche de la neutralité. L'éluat est dialysé puis lyophilisé.

2 - Résultats

Les quantités de lactotransferrines obtenues sont de 1 g par litre de lait humain et de 3,6 mg pour 10^9 cellules polymorphonucléaires.

Les préparations de lactotransferrines humaines ne donnent qu'une bande en électrophorèse en gel d'acrylamide et sont considérées comme pures (Fig.16 p.69).

* : Nous remercions vivement Monsieur P. DERISBOURG pour les préparations de lactotransferrine leucocytaire humaine.

1 2 3 4



205 000

116 000

94 000

68 000

43 000

30 000

Figure 16 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS des échantillons de lactotransferrines

- 1 : lactotransferrine isolée du lait de vache
- 2 : lactotransferrine isolée du lait de souris
- 3 : lactotransferrine isolée du lait humain
- 4 : lactotransferrine isolée des leucocytes humains

B - PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE DE SOURIS

La lactotransferrine de souris est préparée par la méthode mise au point et décrite par SAWATZKI et KUBANEK (1983) *.

Après délipidation par centrifugation, le lait est saturé en fer et soumis à une précipitation par le sulfate d'ammonium à 45% de saturation. Le surnageant est dessalé par chromatographie sur Séphadex G-25 puis est appliqué sur une colonne d'échange d'ions CM-Sépharose CL-4B. L'élution est réalisée par un gradient de NaCl de 50 à 600 mM dans un tampon MOPS 20 mM pH 6,5. La fraction contenant la lactotransferrine est soumise à une nouvelle chromatographie sur colonne d'Héparine-Sépharose. L'élution est faite par un gradient de NaCl comme précédemment. Une dernière purification est réalisée sur une colonne de Séphacryl S-300 dans un tampon MOPS 20 mM, NaCl 300 mM pH 6,5.

C - PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE DE VACHE

1 - Matériels et méthodes

Le lait de vache est délipidé par centrifugation à 2000g pendant 45 mn à 4°C dans les mêmes conditions que pour le lait humain. Après délipidation, le lait est additionné de résine échangeuse d'ions (SP-Séphadex C 50) équilibrée dans de l'acétate de sodium 0,22 M à raison de 0,5 l pour 10 l de lait. L'ensemble est laissé sous agitation mécanique douce à 4°C pendant au moins 2 heures.

Le mélange lait-résine est ensuite filtré sous vide sur büchner et

* : Nous remercions vivement Monsieur le Docteur G. SAWATZKI pour les préparations de lactotransferrine et de transferrines de souris qu'il nous a aimablement fournies.

la résine abondamment rincée à l'eau permutée. Lorsque l'éluat est limpide, la résine est lavée par de l'acétate de sodium 0,22 M puis 0,35 M afin d'éliminer la lactopéroxydase. L'élution peut s'effectuer soit directement sur büchner, soit après avoir transvasé la résine dans une colonne. L'élution de la lactotransferrine sur büchner par de l'acétate de sodium 1 M est la plus rapide.

L'éluat 1 M contenant la lactotransferrine est dilué à 0,35 M par de l'eau permutée puis chromatographié sur une cartouche d'échange d'ions SP-ZETAPREP 250 (Pharmacia, Suède). Le débit d'utilisation de ces cartouches est d'environ 100 ml/mn. La cartouche est rincée par de l'acétate de sodium 0,35 M puis la lactotransferrine est éluee par une solution d'acétate de sodium 1 M.

L'éluat 1 M est mis en dialyse trois jours contre de l'eau permutée puis lyophilisé.

2 - Résultats

La lactotransferrine bovine ainsi obtenue ne présente pas de contaminant majeur et la pureté des échantillons est comparable à celle obtenue suivant le protocole décrit par CHERON (1975) et utilisé pour la préparation de la lactotransferrine humaine (Fig.16 p.69). Les quantités de lactotransferrine bovine généralement obtenues après les deux chromatographies oscillent entre 80 et 120 mg/l.

Hormis les étapes de dialyse et de lyophilisation, l'ensemble de ces opérations peut être mené en moins de deux jours.

3 - Discussion

Contrairement au lait humain, le lait de vache contient des quantités de lactotransferrine assez faible. Afin d'augmenter les rendements de préparation, l'étape de précipitation de la caséine a été supprimée, GROVES (1960) ayant montré que la fraction caséinique contenait des quantités importantes de lactotransferrine.

La technique de "batch-adsorption" et l'utilisation de cartouche ZETAPREP permettent, outre un gain de temps très important, de traiter des volumes conséquents de lait et donc de préparer des quantités importantes de lactotransferrine.

II - SATURATION ET DESATURATION EN FER DES LACTOTRANSFERRINES

A - PREPARATION DES LACTOTRANSFERRINES SATUREES EN FER

La protéine native est dissoute, à raison de 0,5 à 20 mg/ml, dans un tampon citrate/bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 8,6 selon la méthode d'AZARI et BAUGH (1967). Le fer est additionné sous forme de citrate ferrique préparé en dissolvant 260 mg de chlorure ferrique ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) dans 100 ml de tampon citrate/bicarbonate de sodium 0,1 M pH 8,6.

La fixation du fer est réalisée en additionnant de 1,25 à 50 μl de solution de citrate ferrique par ml de la solution de protéine.

Après au moins 3 heures d'incubation à température ambiante, la solution est dialysée contre de l'eau permutée puis lyophilisée.

B - PREPARATION D'APOLACTOTRANSFERRINES

1 - Mise au point du tampon de désaturation

a - Matériels et méthodes

La lactotransferrine, préalablement marquée au ^{59}Fe (p. 78), est fixée sur de la SP-Séphadex dans le tampon approprié.

L'influence de la force ionique du tampon sur la désaturation de la lactotransferrine immobilisée sur le support d'échange d'ions a été étudiée à température ambiante et avec un pH fixe de 4,2. Le temps de désaturation est de 16 heures. La molarité du tampon citrate/phosphate de sodium choisi varie respectivement de 1 à 100 mM et de 2 à 200 mM en acide citrique et en phosphate de sodium (Na_2HPO_4).

Le pH optimum de désaturation a été déterminé en faisant varier le pH du tampon citrate/phosphate de 2,5 à 6. Les conditions de temps et de température sont les mêmes que précédemment.

Les cinétiques de désaturation de la lactotransferrine à température ambiante et à 4°C ont permis de déterminer le temps d'incubation nécessaire pour une désaturation totale.

La mesure de la radioactivité libérée en fonction des conditions de pH, de force ionique et de temps est exprimée en pourcentage de la radioactivité totale initiale et correspond donc au pourcentage de

désaturation.

Nous avons vérifié par dosage des protéines selon la méthode de LOWRY et al. (1951) que la lactotransferrine n'était pas éluee aux forces ioniques utilisées.

b - Résultats

Un tampon acide citrique 30 mM, phosphate de sodium 60 mM est suffisant pour obtenir une désaturation totale et le pH optimum de désaturation est de 4,0 (Fig.17 p.74). Avec un tampon répondant à ces critères, la désaturation de la lactotransferrine immobilisée sur la résine d'échange d'ions est totale après 18 heures d'incubation à température ambiante (Fig.18 p.75). La désaturation est beaucoup plus lente lorsqu'elle s'effectue à 4°C et nécessite alors plus de 40 heures d'incubation.

c - Discussion

Pour étudier la fixation de l'apolactotransferrine sur les macrophages en culture, il nous est apparu indispensable d'établir un nouveau protocole de désaturation de la lactotransferrine. En effet, la méthode décrite par MAZURIER et SPIK (1980) utilisant de l'EDTA comme chélateur du fer à des concentrations de 1%, nous semble incompatible avec l'étude de la fixation d'un ligand sur un récepteur membranaire.

Le tampon acide citrique 50 mM, phosphate de sodium 100 mM à pH 4,0 permet une désaturation complète de la lactotransferrine sans utiliser d'EDTA.

2 - Désaturation de la lactotransferrine

a - Matériels et méthodes

Le protocole de préparation de l'apolactotransferrine est le même que celui de la lactotransferrine native. Seule l'étape de désaturation a été ajoutée. Lors de la purification de la lactotransferrine par chromatographie d'échange d'ions sur SP-Séphadex, la colonne est rincée par une solution d'acétate de sodium 0,22 M puis équilibrée dans un tampon acide citrique 50 mM, phosphate de sodium 100 mM à pH 4,0. La désaturation en fer s'effectue à température ambiante pendant au moins 18 heures. Le tampon de

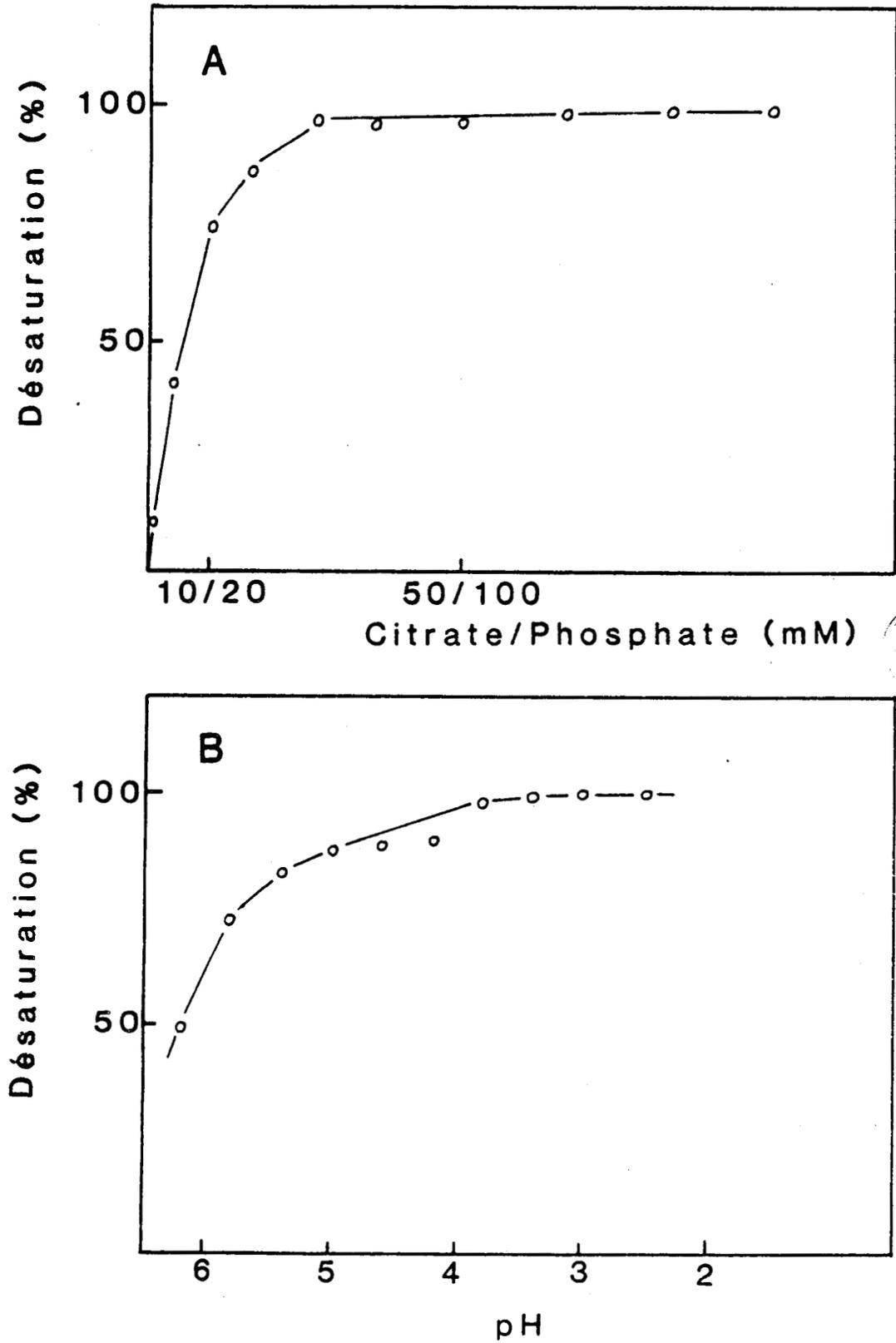


Figure 17 : Désaturation de la lactotransferrine humaine immobilisée sur colonne de SP-Séphadex

A : en fonction de la force ionique du tampon

B : en fonction du pH du tampon

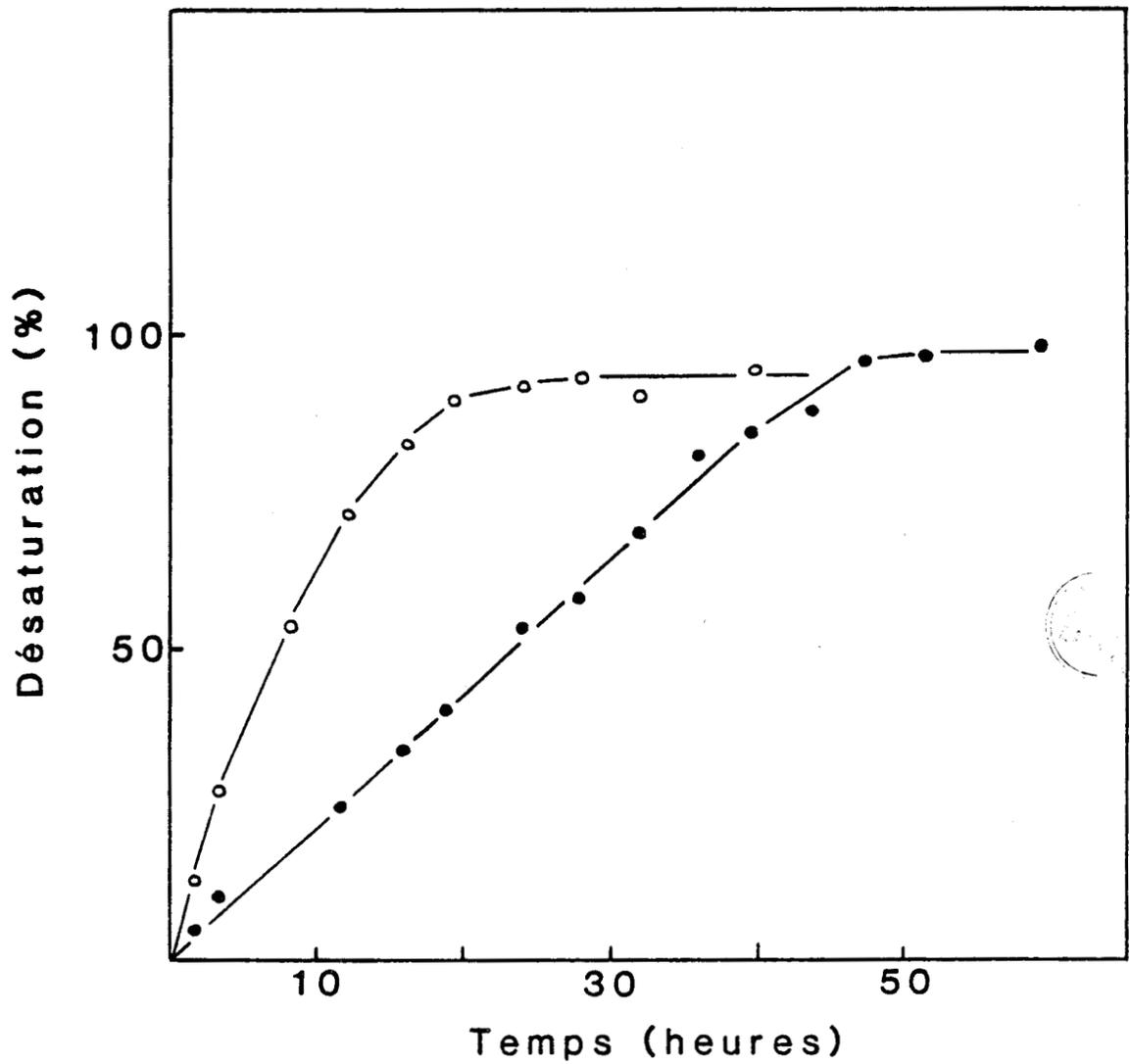


Figure 18 : Cinétique de désaturation de la lactotransferrine humaine immobilisée sur colonne de SP-Séphadex

- : désaturation à 20°C
- : désaturation à 4°C

désaturation est recyclé en continu sur la colonne.

Celle-ci est ensuite rééquilibrée dans une solution d'acétate de sodium 0,22 M. L'éluion de l'apolactotransferrine se fait dans les conditions décrites pour la préparation de la lactotransferrine humaine.

La capacité de refixation du fer de l'apolactotransferrine ainsi préparée a été dosée en mesurant l'incorporation de fer radioactif par la protéine en fonction de quantité croissante en ^{59}Fe .

b - Résultats

La lactotransferrine désaturée suivant ce protocole possède une capacité de fixation du fer voisine de 95% en prenant comme référence la valeur de 1,46 μg de fer par mg de lactotransferrine soit deux atomes de fer par molécule (Fig.19 p. 77). La saturation de la lactotransferrine est atteinte pour un rapport fer (μg)/mg de protéine de 1,5.

c - Discussion

La désaturation de la lactotransferrine immobilisée sur la colonne d'échange d'ions lors de la purification offre de nombreux avantages. La préparation d'apolactotransferrine selon ce protocole permet d'éviter l'utilisation de chélateur du fer comme l'EDTA mais supprime également une étape de dialyse et de lyophilisation et permet donc un gain de temps appréciable.

III - PREPARATION DES LACTOTRANSFERRINES MARQUEES

A - MARQUAGE A L' ^{125}I

La méthode que nous utilisons est celle à l'Iodogen, selon la technique décrite par la firme PIERCE.

1 - Réactif

L'iodogen ou 1,3,4,6-tétrachloro 3a,6a-diphénylglycoluril (PIERCE) est dissous à raison de 1 mg/ml dans du chloroforme. Des fractions de

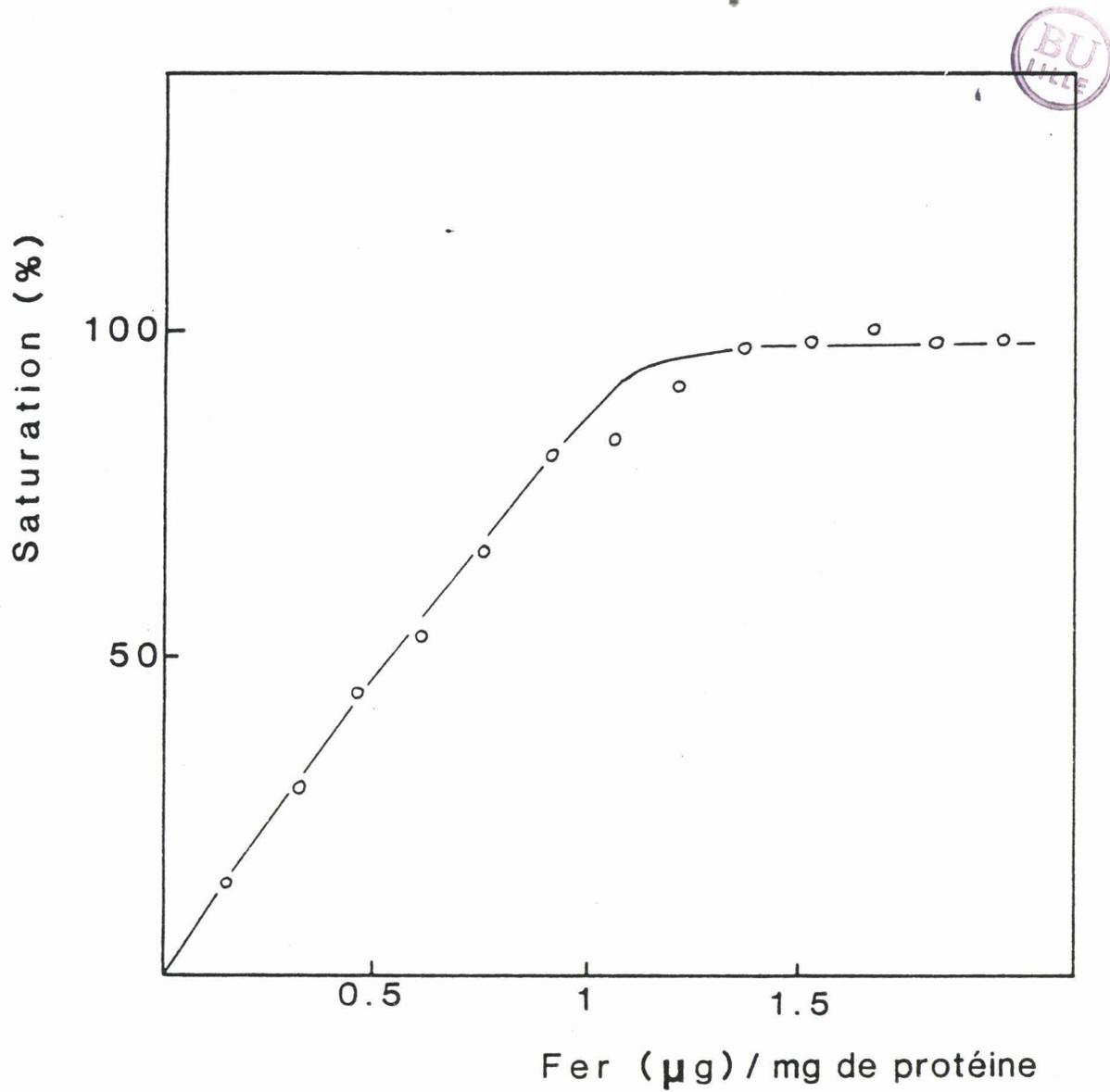


Figure 19 : Saturation en fer de l'apolactotransferrine humaine immobilisée sur colonne de SP-Séphadex

0,2 ml sont réparties dans des microtubes en verre et le chloroforme est éliminé par évaporation sous azote. L'Iodogen, insoluble en milieu aqueux, reste absorbé sur les parois du tube.

. L'iode radioactif (Na^{125}I) sans entraîneur (IMS 30, $3,7 \times 10^9$ Bq/ml, 100 mCi/ml, Amersham) est utilisé.

. La protéine à marquer est dissoute dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,3.

2 - Mode opératoire

La solution de protéine (0,4 mg dans 0,2 ml) est additionnée de 2 μl de Na^{125}I dans le tube contenant l'Iodogen. La réaction est effectuée à 4°C sous agitation.

Au bout de 20 mn, la solution est chromatographiée sur une colonne de Séphadex G-25 (2x15 cm) stabilisée dans le tampon d'incubation. Des fractions de 0,5 ml sont recueillies et leur radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur gamma (compugamma LKB). Les rendements de marquage sont de l'ordre de 90%.

B - MARQUAGE AU ^{59}Fe

Le marquage au ^{59}Fe se fait en introduisant extemporanément, lors de la saturation en fer, dans la solution de chlorure ferrique d'AZARI et BAUGH (1967) 2% de $^{59}\text{FeCl}_3$ (HCl 0,1 N, 1 mCi/ml, 74 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Amersham).

L'excès de ^{59}Fe est éliminé par chromatographie sur colonne de Séphadex G-25.

IV - PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE DEFUCOSYLEE

A - MATERIELS ET METHODES

1 - Méthodes d'étude de la structure des glycannes

a - Hydrazinolyse

Les oligosaccharides sont préparés par hydrazinolyse selon la méthode de BAYARD et FOURNET (1975) puis N-réacétylés selon la méthode de READING et al.(1978).

2 à 3 mg de lactotransferrine humaine sont dissous dans 0,3 ml d'hydrazine anhydre. Le tube bouché est placé 24 h dans une étuve à 100°C. A la fin de la réaction, l'hydrazine est évaporée sous courant d'azote. Le culot est repris 2 fois par 1 ml de toluène et évaporé sous azote puis repris par 0,5 ml d'eau et dessalé sur Biogel P2. Après lyophilisation, la fraction oligosaccharidique est reprise par 0,3 ml de NaHCO₃ saturé et N-Réacétylé par addition de 5 fois 10 µl d'anhydride acétique toutes les 20mn à 20°C. La réaction est arrêtée par acidification avec de la Dowex 50x8, 25-50 mesh. La résine est lavée par 10 ml d'eau et l'éluat est concentré à l'évaporateur rotatif. Les oligosaccharides sont réduits par addition de 1 mg de BH₄K après avoir ajusté le pH à 9 avec NH₄OH.

La réaction est arrêtée après 2 h par dessalage sur Biogel P2 et la solution contenant les oligosaccharides est lyophilisée.

b - Chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire

La composition molaire en monosaccharides a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire OV 201 après méthanolyse et triméthylsilylation suivant la méthode décrite par KAMERLING et al.(1975). Cette technique permet de doser des quantités de l'ordre de 1 à 5 µg de monosaccharides.

Aux échantillons à doser est ajouté 1 µg de mésoinositol (témoin interne). Après lyophilisation, la méthanolyse est réalisée, dans un tube hermétiquement fermé, par 250 µl de CH₃OH/HCl 0,5 N pendant 24 h à 80°C. La solution est ensuite neutralisée par du carbonate d'argent ajouté grain par grain, puis N-réacétylée par 10 µl d'anhydride acétique. Après une nuit de repos à température ambiante et à l'obscurité, le tube est centrifugé. Le surnageant introduit dans une pipette pasteur scellée à une extrémité, est délipidé 3 fois par 200 µl d'heptane puis évaporé sous azote. le résidu sec est repris par 25 µl de pyridine et 25 µl de BSTFA (Bis Silyl Trifluoro Acétamide). Après 3 h de réaction, les monosaccharides silylés sont analysés en chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire (0,2 mm x 25 m) remplie de silicone OV 201. La température est programmée de 120°C à 240°C à raison de 2°C/mn. Le débit du gaz vecteur (He) est de 1ml, la pression d'entrée étant de 0,6 bars.

c - Microméthylation

La méthylation est réalisée selon le protocole décrit par FINNE et al. (1980) et adaptée au laboratoire par FOURNET et al. (1981).

Le produit à méthyler (100 µg d'oligosaccharides) est lyophilisé dans un tube à méthanolyses. On y ajoute sous azote 100 µl de diméthyl sulfoxyde et la solution est soniquée pendant 30 mn. On ajoute alors sous azote 50 µl de base de méthylation (méthyl sulfinyl potassium carbanion ou lithium méthyl sulfinyl carbanion) (PAZ PARENTE et al. (1985)) préalablement chauffée à 37°C. Le tube bouché est soumis aux ultra-sons pendant 1h. Les extractions sont réalisées par l'addition dans un premier temps de 500 µl d'eau mQ froide, de un à deux cristaux de thiosulfate de sodium et de 300 µl de chloroforme distillé. La phase chloroformique est prélevée tandis que la phase aqueuse est conservée pour deux nouvelles extractions par 500 µl de chloroforme distillé.

Les phases chloroformiques sont lavées 5 fois par 1 ml d'eau mQ. L'addition de sulfate de sodium permet d'absorber l'excès d'eau. La solution filtrée sur laine de verre est évaporée sous azote, puis lyophilisée pour éliminer le diméthyl sulfoxyde.

Les composés méthylés sont méthanolysés par l'addition de 500 µl de CH₃OH/HCl 0,5 N pendant 24 h à 80°C. Après évaporation à sec, la peracétylation est effectuée par l'addition de 10 µl de pyridine et 50 µl d'anhydride acétique pendant une nuit à 37°C. Le produit méthylé, méthanolysé est enfin évaporé sous azote et repris par une quantité déterminé de méthanol distillé.

Les glycanes méthylés sont analysés en spectrométrie de masse après chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire. Les analyses ont été effectuées sur un appareil Riber Mag GCMS R 10-10 à filtre quadripolaire.

2 - Défucosylation de la lactotransferrine humaine

La défucosylation de la lactotransferrine humaine a été effectuée par une préparation enzymatique isolée de Bifidobacterium bifidum.*

La préparation enzymatique renferme une α-L-fucosidase, une β-D-galactosidase et une β-D-hexosaminidase.

L'incubation se fait à 45°C dans un tampon citrate de sodium 0,1 M à pH 5,5 selon une cinétique de 0 à 24 h. Ces conditions d'incubation

favorisent l'activité fucosidasique par rapport à l'activité galactosidasique (LEROUGE, 1984).

Après incubation, la réaction est arrêtée par un abaissement rapide de la température en ajoutant deux volumes d'eau à 4°C. Le mélange est chromatographié sur une colonne de SP-Séphadex. L'enzyme non retenue sur la colonne est éliminée. La lactotransferrine fixée sur l'échangeur d'ions est éluée par une solution d'acétate de sodium 1 M.

Le dosage des sucres résiduels de la lactotransferrine se fait par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse.

La spécificité de l' α -L-fucosidase de la préparation a été étudiée par LEROUGE (1984). Cette enzyme hydrolyse le fucose lié en $\alpha(1,2)$, en $\alpha(1,3)$ et en $\alpha(1,4)$ mais pas le fucose en $\alpha(1,6)$. L'enzyme semble posséder également une activité galactosidasique (LEROUGE, 1984).

L'absence de fucose lié en $\alpha(1,3)$ est vérifié par méthylation après hydrazinolyse et analyse en chromatographie de phase gazeuse couplée à un spectrophotomètre de masse.

B - RESULTATS

La préparation d' α -L-fucosidase utilisée possédant également d'autres activités enzymatiques, une cinétique de libération des monosaccharides a été effectuée afin de déterminer la durée d'incubation optimale.

1 - Cinétique de libération des monosaccharides

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau II p.82.

La figure 20 p.83 représente la variation, en fonction du temps d'incubation, du pourcentage de chaque monosaccharide résiduel en prenant comme référence le taux présent dans la lactotransferrine de départ.

La disparition du fucose est rapide et s'effectue en premier. Au

* : la préparation enzymatique renfermant l' α -L-fucosidase a été fournie par Monsieur le Professeur S. BOUQUELET, auquel nous adressons tous nos remerciements.

TABLEAU II

Cinétique de défucosylation de la lactotransferrine humaine



Echantillons	1	2	3	4	5	6	7	8
Monosacchari- des	Temps d'incubation							
	0	15 mn	30 mn	1 h	2 h	5 h	15 h	24 h
<u>A</u>								
Man	3	3	3	3	3	3	3	3
GlcNAc	3,9	4,01	3,41	3,69	3,19	3,07	2,5	2,27
Gal	1,57	1,43	1,51	1,35	1,12	1,0	0,72	0,18
Fuc	1,41	1,09	0,98	0,98	0,89	0,93	0,96	0,93
NeuAc	1,2	1,07	1,04	0,68	0,69	0,47	0,26	0,06
<u>B</u>								
Man	100	100	100	100	100	100	100	100
GlcNAc	100	100	87	94	82	78	64	58
Gal	100	92	96	86	71	64	46	11
Fuc	100	77	70	70	64	66	68	66
NeuAc	100	92	90	59	59	40	22	5

A : Composition molaire en glucides

les rapports molaires ont été calculés sur la base de trois résidus de mannose

B : Composition en glucides exprimée en pourcent par rapport à la composition molaire de l'échantillon 0

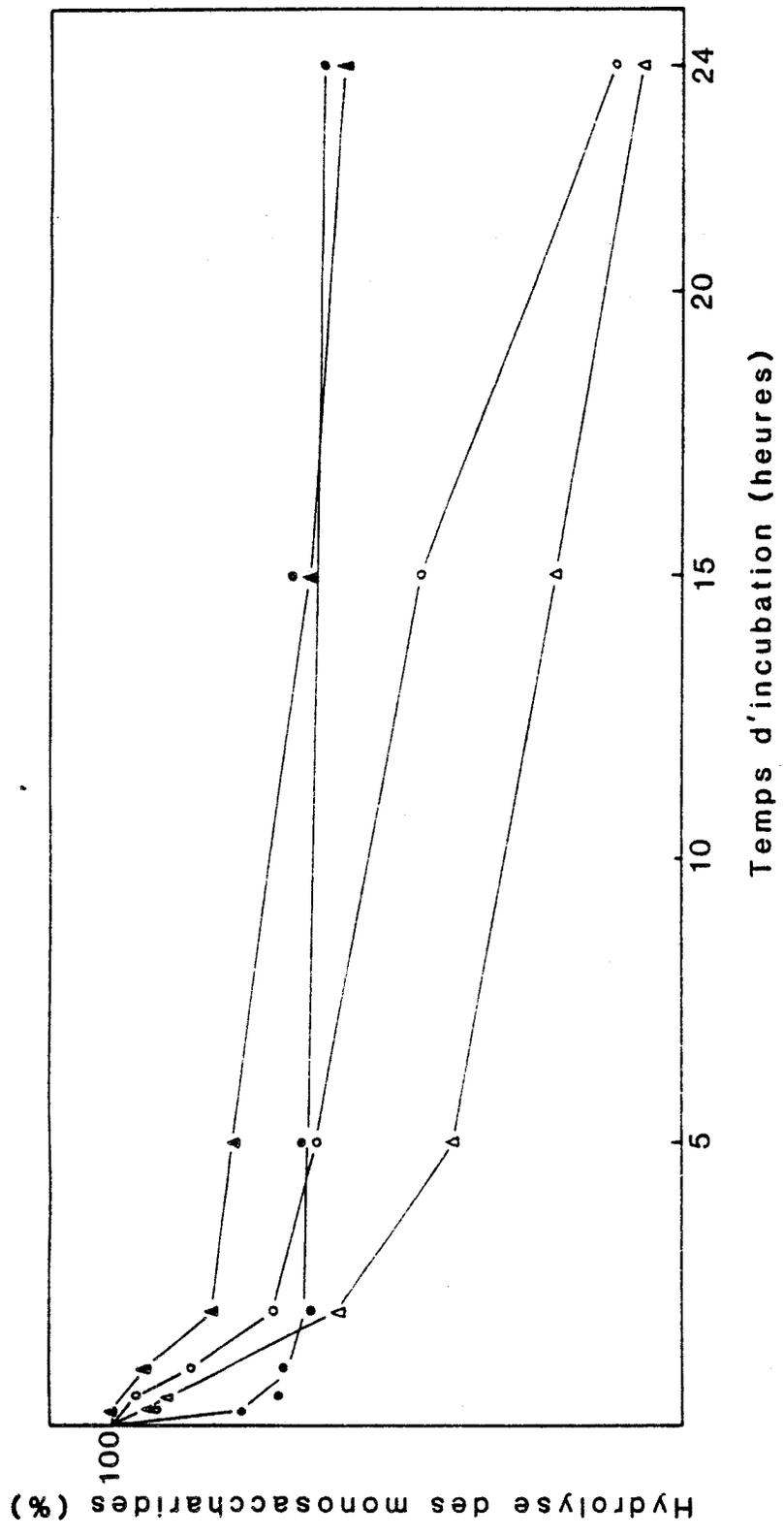


Figure 20 : Cinétique de défucosylation de la lactotransferrine humaine isolée du lait

● : fucose ○ : galactose ▲ : N-acétylglucosamine △ : acide sialique

bout de 15 mn d'incubation (échantillon n°2) il ne reste que 77% du fucose et environ 70% au temps 30 mn (échantillon n°3). Le taux de fucose reste ensuite stationnaire car l'enzyme n'hydrolyse pas le fucose lié en $\alpha(1,6)$.

Au temps 30 mn (échantillon n°3), le taux de galactose commence à diminuer d'abord lentement pour disparaître presque complètement au bout de 24 heures d'incubation (échantillon n°8).

Le taux d'acide sialique diminue d'une façon presque linéaire avec le temps d'incubation.

L'enzyme utilisée était contaminée par une hexosaminidase puisque, en effet, les résidus de N-acétylglucosamine sont hydrolysés lorsqu'ils sont en position terminale non réductrice.

2 - Structure du glycanne après hydrolyse partielle

L'échantillon n°3, renfermant 70% de fucose résiduel, a été utilisé pour effectuer les expériences de fixation sur les macrophages. Le pourcentage de fucose résiduel étant identique à celui de l'échantillon n°4, l'hydrazinolyse puis la méthylation ont été réalisés sur l'échantillon n°4. Les rapports en méthylether glycosides obtenus sont donnés dans le tableau III p.85.

L'absence de 6 monométhyl-N-acétyl-O-méthylglucosamine prouve que le fucose en $\alpha(1,3)$ a été entièrement hydrolysé. L'existence de perméthyl-N-acétylglucosamine et de perméthyl-mannose montre la présence de résidus de N-acétylglucosamine et de mannose en position terminale non réductrice. En revanche, il n'existe presque pas de perméthyl-galactose, l'enzyme hydrolysant le galactose dès que celui-ci se trouve en position terminale.

C - DISCUSSION

La préparation enzymatique est spécifique du fucose en $\alpha(1,3)$ mais elle hydrolyse aussi très rapidement le galactose dès que celui-ci est accessible.

Les échantillons de lactotransferrine obtenus montrent des compositions différentes en monosaccharides et seront utilisés lors des expériences d'inhibition de la fixation de la lactotransferrine humaine sur le récepteur isolé afin de déterminer sa spécificité de reconnaissance.

TABLEAU III

Identification et détermination des rapports molaires des dérivés
méthylés des monosaccharides de la lactotransferrine
humaine défucosylée (échantillon n°4)

Dérivés méthylés	Rapports molaires
2,3,4 Me ₃ Fuc	0,7
2,4 Me ₂ Man	1
3,4,6 Me ₃ Man	1,4
2,3,4,6 Me ₄ Man	0,3
6 Me GlcNAc Me	0
3,6 Me ₂ GlcNAc Me	1,98
3,4,6 Me ₃ GlcNAc Me	0,77
1,3,5 Me ₃ GlcNAc Me-ol	0,87
2,4,6 Me ₃ Gal	1,18
2,3,4,6 Me ₄ Gal	0,1
4,7,8,9 Me ₄ NeuAc Me	0,85

Les rapports molaires ont été calculés sur la base de 1 résidu de
(2,4) Me₂ Man.

DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES GLYCANNES
DES TRANSFERRINES DU SANG ET DU LAIT DE SOURIS

Le but de ce travail a été d'étudier la structure primaire des glycanes de la lactotransferrine de souris afin de pouvoir déterminer leur influence dans le mécanisme de fixation de la lactotransferrine par les macrophages péritonéaux de souris.

La connaissance de la structure glycanique de la lactotransferrine de souris nous permettra en effet de travailler en système homologue et de comparer les fixations de lactotransferrines d'origines diverses sur les macrophages de souris.

La présence d'une protéine immunologiquement identique à la sérotransferrine dans le lait de souris a été décrite par KINKADE et al. (1976). Cette transferrine existe dans le lait de souris à une concentration de 3 mg/ml soit trois fois plus élevée que la concentration de la lactotransferrine. Le rôle de cette transferrine, isolée du lait de souris, dans le métabolisme du fer n'a pas encore été déterminé.

Nous décrivons ici l'isolement de la transferrine ("serotransferrin-like" protein) à partir du lait de souris et nous comparerons les structures primaires des glycanes de cette protéine avec celles de la lactotransferrine et de la sérotransferrine de souris afin d'établir une corrélation entre la structure primaire des glycanes et leur lieu de biosynthèse.

Primary structure of the glycans from mouse serum and milk transferrins

Yves LECLERCQ,* Günther SAWATZKI,† Jean-Michel WIERUSZESKI,* Jean MONTREUIL* and Geneviève SPIK**

*Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, Laboratoire National et Unité Associée au C.N.R.S. N° 217, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France, and †Abteilung für Transfusions Medizin der Universität, D-79000 Ulm, Donau, Federal Republic of Germany

A 'serotransferrin-like' protein was purified from mouse milk. This serotransferrin immunologically cross-reacts with the serotransferrin isolated from mouse plasma and not with the mouse lactotransferrin (or lactoferrin). Sugar analysis of the three transferrins, i.e. serotransferrin, milk 'serotransferrin-like' protein and lactotransferrin, revealed that the major difference between the glycan primary structure of mouse serotransferrin and those of mouse milk 'serotransferrin-like' protein and lactotransferrin concerns essentially the presence of one fucose residue in the two last proteins. For structure determination, the *N*-glycosidically linked glycans were released from the protein by a reductive cleavage of the oligosaccharide-protein linkage under strong alkaline conditions. The primary structure of the released oligosaccharide alditols was determined by methylation analysis and 400 MHz ¹H-n.m.r. spectroscopy. The oligosaccharide alditols released from milk 'serotransferrin-like' protein and lactotransferrin were identical and were identified as disialylated biantennary glycans of the *N*-acetyl-lactosamine type with a fucose residue α -1,6-linked to the *N*-acetylglucosamine residue conjugated to the peptide chain and having the following primary structure: NeuAc(α -2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3){NeuAc(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-6)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4){Fuc(α 1-6)GlcNAc(β 1-N)Asn. The serotransferrin glycan has the same primary structure but is not fucosylated.



INTRODUCTION

The family of transferrins, which are defined as iron-binding glycoproteins, is composed of four groups of components that are immunologically and structurally different: those of ovotransferrins from bird egg-white, of lactotransferrins present in most mammalian milks and in leucocytes, of melanotransferrins characterized in human melanoma cells and of serotransferrins from serum of all vertebrates and of some invertebrates (for reviews see Williams, 1985; Montreuil *et al.*, 1985).

In addition, proteins immunologically identical with serotransferrins have been characterized in different biological fluids. As their chemical identity with the serotransferrins has not yet been proved, we propose to call these proteins 'serotransferrin-like' proteins.

Variable proportions of a 'serotransferrin-like' protein and of lactotransferrin (also called lactoferrin) have been found in mammalian milk wheys (Masson *et al.*, 1965). For instance, in human and cow wheys the major iron-binding protein has been identified as lactotransferrin (Montreuil *et al.*, 1960; Groves, 1960), whereas in rabbit milk whey the major iron-binding protein has been identified as a 'serotransferrin-like' protein (Baker *et al.*, 1968). In the milk whey of other animal species, such as the guinea pig and the mouse, lactotransferrin and 'serotransferrin-like' protein have been characterized (Masson *et al.*, 1971; Kinkade *et al.*, 1976).

A lactotransferrin has been highly purified by Kinkade *et al.* (1976) and by Sawatzki *et al.* (1983) from mouse milk, and no immunological cross-reaction was observed

between mouse lactotransferrin and serotransferrin (Kinkade *et al.*, 1976).

In the present paper we describe the isolation of the 'serotransferrin-like' protein from mouse milk and we compare the glycan primary structure of this protein with those of mouse lactotransferrin and serotransferrin. This analysis was performed in order to relate the glycan structure of the transferrins and their site of biosynthesis.

EXPERIMENTAL

Materials

Mouse plasma was collected by cardiac puncture from N.M.R.I. mice (specific-pathogen-free), Süddeutsche Versuchstierfarm, Tuttlingen, Germany. The heparinized samples were pooled. Mouse milk was obtained from anaesthetized mice by using the milking device described by Hoffmann *et al.* (1982). The mouse milk samples were pooled and stored frozen.

Antibodies to mouse serotransferrin and to mouse milk lactotransferrin were either obtained from Cappel Laboratories (Cochranville, U.S.A.) or raised in rabbits and goats by the method previously described (Sawatzki *et al.*, 1981).

Bio-Gel P-2 was from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, U.S.A.). Sephadex G-25, CM-Sephacrose CL-6B, DEAE-Sephacrose CL-6B, Sephacryl S-300, Heparin-Sephacrose, the Sephadex G-25 (medium grade) PD-10 column as well as the Mono Q HR5/5 and the Superose 12 columns for fast protein liquid chromatography

‡ To whom correspondence should be addressed.

graphy were obtained from Pharmacia (Uppsala, Sweden).

$^2\text{H}_2\text{O}$ (99.95 atom % ^2H) was from Commissariat à l'Énergie Atomique (Saclay, France). All reagents were of the highest purity and all solvents were redistilled before use.

Isolation of transferrins

'Serotransferrin-like' protein and lactotransferrin were isolated from mouse milk. The whey was prepared by delipidation and casein precipitation at pH 4.6. In a typical experiment, after centrifugation at 3000 g for 30 min, 100 ml of whey was saturated with iron by using Fe^{3+} -nitriiotriacetate reagent (Sawatzki *et al.*, 1981). The supernatant was desalted on a Sephadex G-25 column (73 cm \times 5 cm). The effluent (350 ml) was applied to a CM-Sepharose CL-6B column (9.5 cm \times 5 cm), which was further eluted with 50 mM-NaCl/20 mM-Mops/NaOH buffer, pH 6.5, and then with a salt gradient (50–700 mM-NaCl) in 20 mM-Mops buffer, pH 6.5, as described previously by Sawatzki *et al.* (1983). The non-adsorbed fraction (320 ml) containing the 'serotransferrin-like' protein was further purified on a DEAE-Sepharose CL-6B column (15.5 cm \times 5 cm) equilibrated with 25 mM-Tris/HCl buffer, pH 7.8. Elution of this column was performed by a salt gradient (50–500 mM-NaCl) in the same buffer. The pool (170 ml) from the CM-Sepharose CL-6B column containing the lactotransferrin, starting at 455 ml of the gradient, was desalted on a Sephadex G-25 column (73 cm \times 5 cm) and purified on a heparin-Sepharose column (14 cm \times 1.6 cm) in 50 mM-NaCl/25 mM-Mops/NaOH buffer, pH 6.5. Elution was performed by an NaCl gradient (50–500 mM) in 25 mM-Mops buffer, pH 6.5.

Mouse 'serotransferrin-like' protein and lactotransferrin were concentrated by freeze-drying and further purified by gel chromatography on a Sephacryl S-300 column (95 cm \times 2.5 cm) in 200 mM-Tris/HCl buffer, pH 7.8, and finally desalted on a Sephadex G-25 column in 10 mM-ammonium acetate, pH 7.8. The eluates were freeze-dried for storage.

Mouse serotransferrin was isolated by the method described by Sawatzki *et al.* (1981) or by fast protein liquid chromatography on Mono Q HR 5/5 and Superose 12 columns as follows. Mouse plasma was desalted on a Sephadex G-25 (medium grade) PD-10 column equilibrated with 50 mM-Tris/HCl buffer, pH 8.6, and frozen until use. Before injection on to the Mono Q HR 5/5 column, the mouse plasma was dialysed overnight at 4 °C against 50 mM-Tris/HCl buffer, pH 8.6 (buffer A), centrifuged and filtered on a 0.22 μm -pore-size Millipore filter. Chromatography was developed with buffer A containing increasing concentrations of NaCl. The NaCl gradients were obtained by mixing buffer A with buffer B (500 mM-NaCl in buffer A). Serotransferrin was eluted at a flow rate of 1 ml/min in a major peak at a concentration of 75 mM-NaCl.

The serotransferrin fractions collected from several identical runs were pooled and concentrated on an immersible CX-10 Millipore unit and submitted to gel-filtration chromatography on a Superose 12 column equilibrated with 500 mM-NaCl/50 mM-Tris/HCl buffer, pH 8.6, at a flow rate of 0.2 ml/min. The fractions containing the serotransferrin were pooled, dialysed against distilled water and freeze-dried.

Immunological and electrophoretical techniques

The purity of the three mouse transferrins was checked by SDS/polyacrylamide-gel electrophoresis with the Phast-system and Phast-gels (gradient 10–15) under the conditions given in the technique files nos. 110 and 200 published by Pharmacia.

Rabbit or goat antibodies to serotransferrin and lactotransferrin were prepared by the procedure of Harboe & Ingild (1973). The presence of identical epitopes in the three transferrins was analysed by the immunodiffusion technique of Ouchterlony (1949).

Transferrins and lactotransferrin were determined by rocket immunoelectrophoresis as described by Laurell (1966) and modified by Weeke (1973).

Reductive cleavage of the glycan-protein linkage

The glycans of the three transferrins were cleaved from the protein core under strong alkaline conditions in the presence of NaBH_4 (Lee & Scocca, 1972). Briefly, the cleavage was performed by treating 0.2 μmol of each transferrin with 0.5 ml of a solution containing 1 M- NaBH_4 /1 M-NaOH at 100 °C for 6 h. The reaction was stopped by addition of conc. acetic acid to neutralize the solutions, which were then applied to a Bio-Gel P-2 column (0.8 cm \times 40 cm) and eluted with distilled water. The oligosaccharide alditols were monitored by dotting each collected fraction on a silica-gel thin-layer sheet and by staining with an orcinol/ H_2SO_4 reagent. The oligosaccharide alditols were re-*N*-acetylated by treatment with pyridine/acetic anhydride according to the procedure of Reading *et al.* (1978) and purified by gel filtration on a Bio-Gel P-2 column (0.8 cm \times 40 cm). The oligosaccharide alditols were eluted with distilled water and freeze-dried.

Carbohydrate composition

Percentage composition in neutral sugars, hexosamines and sialic acids was determined by colorimetric micro-procedures described by Spik & Montreuil (1963). The monosaccharide molar proportions present in the glycan moiety of the three transferrins and in the oligosaccharide alditols were determined after methanolysis (Zanetta *et al.*, 1972) and g.l.c. of the trimethylsilylated methylglycosides on a capillary CP SIL 5 CB column (25 m \times 0.25 mm) in accordance with Kamerling *et al.* (1975). The reduced-end residues were characterized as alditols. The *N*-acetylneuraminic acid residue was identified by g.l.c.-m.s.

Methylation analysis of the oligosaccharides

The oligosaccharide alditols were permethylated by the method of Hakomori (1964) with the lithium methane-sulphinyl carbanion reagent (Paz Parente *et al.*, 1985). The permethylated oligosaccharides were subjected to methanolysis, and the partially methylated methylglycosides were peracetylated with pyridine/acetic anhydride (1:1, v/v) at 37 °C for 24 h. The peracetylated and permethylated methylglycosides were then separated by g.l.c. in a capillary column (25 m \times 0.3 mm) coated with OV-101 under the conditions described by Fournet *et al.* (1981). The monosaccharide derivatives were also identified by g.l.c.-m.s. in a RIBERMAG R 10.10 mass spectrometer (RIBER, Rueil-Malmaison, France) coupled to the data system Sydar 121.

Table 1. Summary of the purification procedure for mouse milk 'serotransferrin-like' protein

For details see the text.

Fraction	Volume (ml)	Protein		Transferrin		Purity (%)	Recovery (%)
		(mg/ml)	(g)	(mg/ml)	(g)		
Whey	100	61	6.10	5.1	0.51	8.4	100
Desalted whey	245	19	4.65	2.0	0.49	10.5	96
CM-Sepharose fraction	450	7	3.15	1.1	0.49	15.7	96
DEAE-Sepharose fraction	130	3.5	0.46	2.8	0.36	80	71
Sephacryl S-300 fraction	56	5.4	0.30	5.3	0.29	98	58

¹H-n.m.r. spectroscopy

The reduced oligosaccharides were repeatedly dissolved in ²H₂O at room temperature and at pD 7 with intermediate freeze-drying (Vliegthart *et al.*, 1983). The deuterium-exchanged oligosaccharide alditols were submitted to ¹H-n.m.r. spectroscopy performed at 400 MHz on a Bruker AM 400-WB spectrometer operating in the pulsed Fourier-transform mode and equipped with a Bruker Aspect 3000 computer at a probe temperature of 300 K (Centre Commun de Mesures, Université de Lille Flandres-Artois). Resolution enhancement of the spectra was achieved by Lorentzian-Gaussian transformation by the procedure of Ernst (1968). Chemical shifts (δ) are expressed in p.p.m. downfield from the signal for internal sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulphonate, but were actually measured by reference to internal acetone ($\delta = 2.225$ p.p.m.) with an accuracy of 0.002 p.p.m.

RESULTS**Isolation of transferrins**

Milk 'serotransferrin-like' protein was easily separated from lactotransferrin on the CM-Sepharose CL-6B column. In fact, the 'serotransferrin-like' protein, which possesses an acidic isoelectric point, like serotransferrin isolated from serum of various species, does not bind to the cation-exchange column and was eluted from the column with other non-retained proteins by the starting buffer, i.e. 50 mM-NaCl/Mops buffer, pH 6.5. The lactotransferrin, a basic protein, like lactotransferrins isolated from milk of different species, was retained on the CM-Sepharose column and was eluted from the column with an NaCl gradient. Purification of the 'serotransferrin-like' protein was achieved by DEAE-Sepharose CL-6B ion-exchange chromatography and gel chromatography on Sephacryl S-300. The complete isolation procedure is summarized in Table 1, giving the purity and recovery for each step. Recovery of 'serotransferrin-like' protein was about 60%, as calculated from the content in the milk, the amounts of lactotransferrin and 'serotransferrin-like' protein present in mouse milk were determined to be 1 mg/ml and 3 mg/ml respectively. Both transferrins were characterized by their ability to bind two iron ions.

Fast protein liquid chromatography provides a fast, highly reproducible, fractionation of serotransferrin with a recovery of more than 70%. Moreover, this procedure can be scaled up.

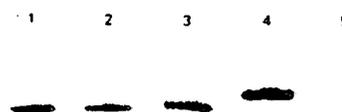


Fig. 1. SDS/polyacrylamide-gradient-gel electrophoresis of transferrins: Coomassie Blue staining patterns

Lane 1, mouse milk 'serotransferrin-like' protein; lane 2, mouse serotransferrin; lane 3, mouse milk lactotransferrin; lane 4, human milk lactotransferrin; lane 5, marker proteins phosphorylase *b* (M_r 94000), bovine serum albumin (M_r 67000), ovalbumin (M_r 43000), carbonic anhydrase (M_r 30000), soya-bean trypsin inhibitor (M_r 21000) and α -lactalbumin (M_r 14400).

The isolated mouse transferrins were homogeneous, as assessed by SDS/polyacrylamide-gel electrophoresis (Fig. 1). The M_r values of the three mouse transferrins deduced from their electrophoretic migration were about 78000 (Sawatzki *et al.*, 1981). The human lactotransferrin has a higher M_r than those of all mouse transferrins.

Analysis of the polypeptide chain of transferrins

Serotransferrin and milk 'serotransferrin-like' protein totally cross-react with antibodies raised against the serotransferrin. In contrast, lactotransferrin and serotransferrin or 'serotransferrin-like' protein did not cross-react with anti-lactotransferrin or anti-serotransferrin antibodies (Fig. 2). This result suggests that the antigenic

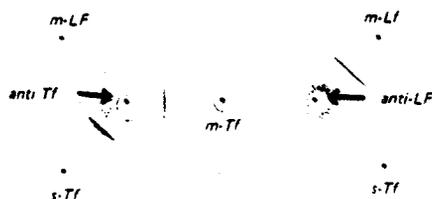


Fig. 2. Radial immunodiffusion pattern of mouse milk lactotransferrin (m-Lf), mouse serotransferrin (s-Tf) and mouse milk 'serotransferrin-like' protein (m-Tf) against the antibodies to mouse serotransferrin (anti-Tf) from rabbit and to mouse milk lactotransferrin (anti-Lf) from goat

determinants of the polypeptide chain from serotransferrin and milk 'serotransferrin-like' protein are identical or very similar and that they differ from those of lactotransferrin. Preliminary results concerning the amino acid sequences of serotransferrin and milk 'serotransferrin-like' protein have shown that the *N*-terminal parts of both proteins are identical and differ from the *N*-terminal amino acid sequence of mouse lactotransferrin (Y. Leclercq, G. Sawatzki, Maes & G. Spik, unpublished work).

Determination of the primary structure of oligosaccharide alditols

Carbohydrate composition. When the native transferrins were examined for their percentage carbohydrate compositions, similar values (3.2–3.5%) were obtained. The pure oligosaccharide alditols released by the alkaline-reductive treatment from the three transferrins were obtained in a good yield (75%) by gel filtration on a Bio-Gel P-2 column, and fully re-*N*-acetylated. Their molar carbohydrate content, given in Table 2, shows that the proportions of sialic acid, galactose, mannose

occurred during the alkaline treatment. Under g.l.c.

analysis conditions, the trimethylsilylated derivative of *N*-acetylglucosaminitol was separated from the trimethylsilylated derivative of methyl *N*-acetylglucosaminide. The results reported in Table 2 also show that the major difference between the carbohydrate molar proportions of the three transferrins concerns the number of fucose residues. In fact, serotransferrin glycan was characterized by the lack of one fucose residue compared with the milk 'serotransferrin-like' glycan.

Methylation analysis. The relative proportions of the methylated derivatives of sialic acid, neutral sugars and *N*-acetylhexosamine taken from the mass fragmentography scans and combined by using the data of the sugar compositions are given in Table 3. The presence (i) of one residue of 2,4-di-*O*-methyl mannoside for two residues of 3,4,6-tri-*O*-methyl mannoside, (ii) of two residues of 2,3,4-tri-*O*-methyl galactoside for two residues of 4,7,8,9-tetra-*O*-methyl derivative of *N*-acetyl-*N*-methylneuraminic acid and (iii) of three residues of the 3,6-di-*O*-methyl derivative of *N*-acetylglucosamine in the oligosaccharide alditols is interpreted in terms of the presence of glycans possessing a biantennary structure of the disialylated *N*-acetyl-lactosamine type in the three transferrins.

Occurrence of methyl derivatives of *N*-acetylglucosaminitol in the three oligosaccharide alditols indicates that the *N*-acetylglucosamine residue is located at the reducing-end position in the cleaved oligosaccharides and that this amino sugar is involved in the *N*-linkage to the protein core of the three transferrins. The characterization of 0.5 residue of 1,3,5,6-tetra-*O*-methyl-*N*-methylacetylglucosaminitol derivative in the oligosaccharide alditol from serotransferrin and of 0.4 residue of 1,3,5-tri-*O*-methyl-*N*-methylacetylglucosaminitol derivative in the oligosaccharide alditols from 'serotransferrin-like' protein and lactotransferrin shows that the *N*-acetylglucosamine linked to the protein is substituted at the C-6 position in 'serotransferrin-like' protein and in lactotransferrin.

400 MHz ¹H-n.m.r. spectroscopic analysis. The 400 MHz ¹H-n.m.r. spectra of the three oligosaccharide alditols were recorded for neutral ²H₂O solutions at a probe temperature of 27 °C. Relevant n.m.r. parameters are listed in Table 4. Analysis of the spectrum of the oligosaccharide alditol released from serotransferrin shows that a structure of the biantennary type can be

Table 2. Molar carbohydrate composition of the mouse serotransferrin, 'serotransferrin-like' protein and lactotransferrin and of the oligosaccharide alditols released by reductive alkaline cleavage of the glycan-protein linkage

The molar proportions were calculated on the basis of 3 mannose residues.

Compound	Molar carbohydrate composition					
	NeuAc	Fuc	Gal	Man	GlcNAc	GlcNAc-ol
Serotransferrin	1.8	0	2.5	3.0	4.0	0
Serotransferrin oligosaccharide alditol	1.5	0	2.2	3.0	2.8	Traces
'Serotransferrin-like' protein	1.7	1.3	2.5	3.0	4.1	0
'Serotransferrin-like' protein oligosaccharide alditol	1.7	1.2	2.1	3.0	2.8	Traces
Lactotransferrin	1.8	1.3	2.4	3.0	3.6	0
Lactotransferrin oligosaccharide alditol	1.7	1.1	2.4	3.0	2.5	Traces

Primary structure of the glycans from transferrins

000

Table 3. Molar proportions of monosaccharide methyl ethers present in the methanolysates of permethylated oligosaccharide alditols released by reductive alkaline cleavage from the protein of mouse serotransferrin, 'serotransferrin-like' protein and lactotransferrin

The molar proportions were calculated on the basis of 2 residues of (3,4,6-)Me₂Man per molecule of oligosaccharide alditol.

Monosaccharide methyl ether	Molar proportions in reduced oligosaccharides isolated from		
	Serotransferrin	Milk 'Serotransferrin-like' protein	Milk lactotransferrin
(3,4,6-)Me ₂ Man	2	2	2
(4,7,8,9-)Me ₂ NeuAcMe	2.4	2.1	2.1
(2,3,4-)Me ₂ Fuc	0.1	0.9	0.8
(2,3,4-)Me ₂ Gal	1.7	2.1	2.0
(2,4-)Me ₂ Man	1.1	1.1	1.0
(3,6-)Me ₂ GlcNAcMe	3.4	2.8	2.8
(1,3,5,6-)Me ₂ GlcNAcMe-ol	0.5 (1)	0	0
(1,3,5-)Me ₂ GlcNAcMe-ol	0	0.4 (1)	0.4 (1)

Table 4. ¹H chemical shifts of structural reporter groups of constituent monosaccharides for the oligosaccharide alditols released from the three mouse transferrins

Compounds are represented by schematic structures (cf. Vliegthart *et al.*, 1983): ●---, GlcNAc; ◆---, Man; ■---, Gal; □---, Fuc; ○---, NeuAc. The numbering of sugar residues follows that shown in Fig. 4. Abbreviation: N.D., not determined.

Reporter group	Residue	Chemical shift (p.p.m.)		
		Serotransferrin	Milk 'serotransferrin-like' protein	Lactotransferrin
1	GlcNAc	4.642	N.D.	N.D.
	Man-3	4.782	4.785	4.777
	Man-4	5.134	5.134	5.134
	Man-4'	4.946	4.939	4.938
	GlcNAc-5	4.605	4.603	4.603
	GlcNAc-5'	4.605	4.603	4.603
	Gal-6	4.443	4.443	4.442
	Gal-6'	4.443	4.443	4.442
	Fuc	-	4.895	4.895
	2	Man-3	4.256	4.257
Man-3		4.256	4.257	4.255
Man-4		4.198	4.198	4.197
Man-4'		4.119	4.111	4.111
3 _u	NeuAc(2-6)	1.717	1.718	1.717
	NeuAc(2-6)	2.671	2.678	2.676
5	Fuc	-	4.071	4.072
H3	Fuc	-	1.225*	1.226*
	Ac	GlcNAc-1-ol	2.056	2.057
Ac	GlcNAc-2	2.083	2.090	2.093
			2.094	2.090
	GlcNAc-5	2.071	2.071	2.071
	GlcNAc-5'	2.065	2.066	2.066
	NeuAc	2.030	2.030	2.030

* A doubling of this doublet ($\delta = 1.225$ and 1.221 p.p.m.) was observed upon resolution-enhancement of the spectrum. As yet this feature could not be explained.

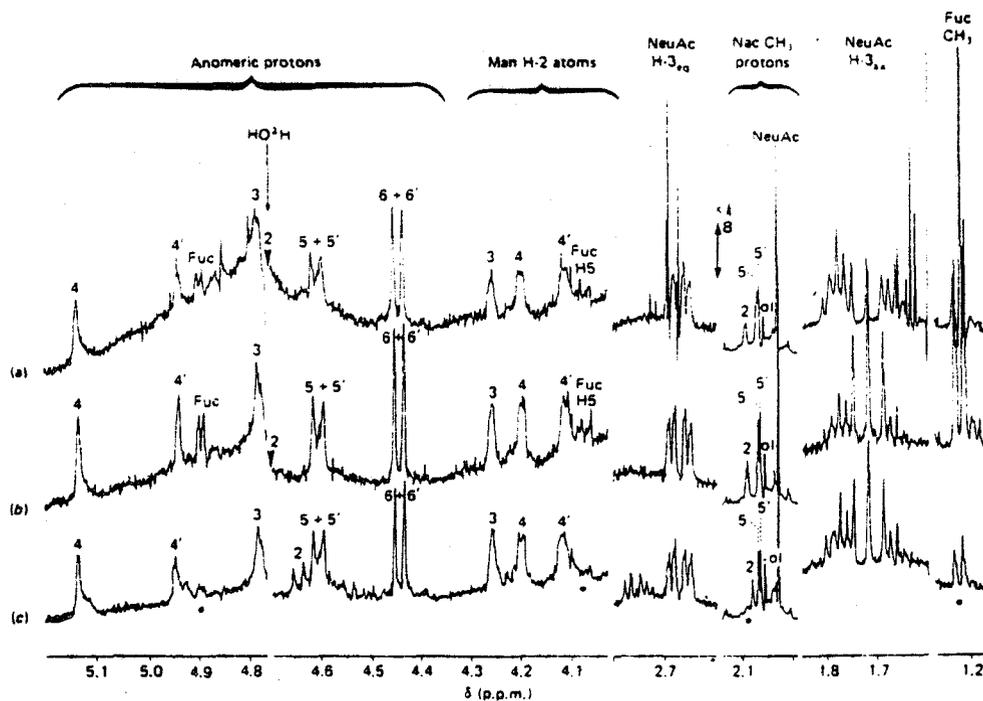


Fig. 3. Resolution-enhanced 400 MHz ^1H -n.m.r. spectra ($^2\text{H}_2\text{O}$, 27 $^\circ\text{C}$) of oligosaccharide alditols isolated from mouse lactotransferrin (a), 'serotransferrin-like' protein (b) and serotransferrin (c)

The relative-intensity scale of the *N*-acetyl proton region differs from that of the other parts of the spectrum, as indicated. From the signals marked by asterisks (*), especially from the intensity of CH_3 of fucose at 1.225, of *N*-acetyl proton singlet of GlcNAc-2 at 2.090, of H-5 of fucose at 4.071 and of anomeric proton of fucose at 4.895, it can be inferred that sample (c) contained a small proportion of fucose.

deduced from the chemical-shift values of the H-2 atoms of the three mannose residues (for Man-3 $\delta = 4.256$ p.p.m., for Man-4 $\delta = 4.198$ p.p.m. and for Man-4' $\delta = 4.119$ p.p.m.) (Vliegthart *et al.*, 1983; Cahour *et al.*, 1984) (Fig. 3).

The spectrum indicates the occurrence of two *N*-acetylneuraminic acid residues, as shown by the intensity of their *N*-acetyl signals. By the set of chemical-shift values of their structural reporter groups (H-3_{ax}, $\delta = 1.717$ p.p.m., H-3_{eq}, $\delta = 2.671$ p.p.m. and *N*-acetyl protons $\delta = 2.030$ p.p.m.), the linkage of *N*-acetylneuraminic acid is characterized as (α 2-6)Gal. The chemical shift values of H-1 of Man-4 $\delta = 5.134$ p.p.m. and Man-4' $\delta = 4.946$ p.p.m. demonstrate the sialylation of the two antennae on Gal-6 and Gal-6'. The *N*-acetyl signals of GlcNAc-5 and GlcNAc-5', resonating at $\delta = 2.071$ p.p.m. and at $\delta = 2.065$ p.p.m. respectively, are typical of sialylated antennae. The chemical shift values of the H-1 atom of GlcNAc-2 and the *N*-acetyl signals of GlcNAc-2 and *N*-acetylglucosaminitol are at $\delta = 4.642$ p.p.m., $\delta = 2.083$ p.p.m. and $\delta = 2.056$ p.p.m. respectively. The low-intensity structural reporter group signals for fucose (H-2 $\delta = 4.895$ p.p.m. and CH-3 $\delta = 1.225$ p.p.m.) are typical for fucose α -1,6-linked to *N*-

acetylglucosaminitol and show that some heterogeneity exists (about 10-15%).

In summary, the main component of this oligosaccharide alditol fraction is a classic biantennary structure having *N*-acetylneuraminic acid α -2,6-linked to Gal-6 and Gal-6' without fucose α -1,6-linked to *N*-acetylglucosaminitol.

Analysis of the spectra of the oligosaccharide alditols released from 'serotransferrin-like' protein and lactotransferrin demonstrates the presence of disialyl biantennary oligosaccharide alditol of the *N*-acetyl-lactosamine type (Table 4). The spectra show a very close resemblance with those already reported (Fig. 3). The only difference is the presence of one residue of fucose α -1,6-linked to *N*-acetylglucosaminitol; this is confirmed by the set of chemical-shift values for the fucose reporter group (H-1 $\delta = 4.895$ p.p.m., H-5 $\delta = 4.071$ p.p.m. and CH-3 $\delta = 1.225$ p.p.m.). It may be noticed that these values are considerably altered when compared with those of glycopeptides. This is due to the presence of GlcNAc-ol instead of GlcNAc(β 1-N)Asn.

The *N*-acetyl singlet at $\delta = 2.056$ or 2.057 p.p.m. is ascribed to the GlcNAc-1-ol residue. The *N*-acetyl methyl protons of GlcNAc-2, β -1,4-linked to GlcNAc-

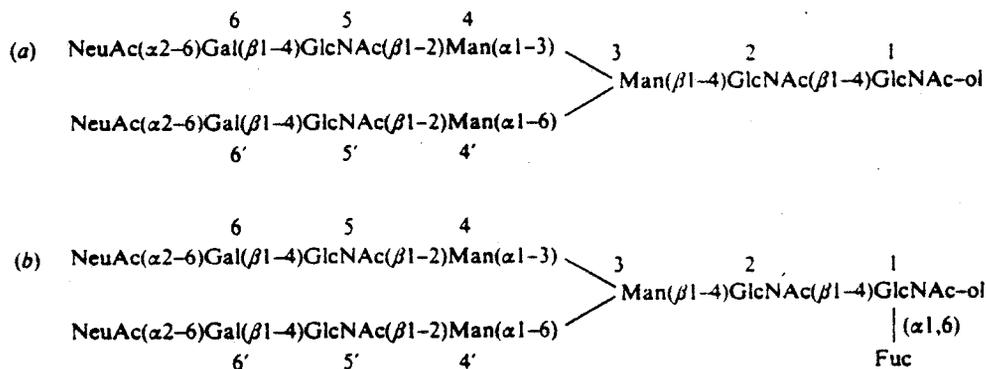


Fig. 4. Primary structure of the oligosaccharide alditols released by reductive alkaline cleavage of the glycan-protein linkage of mouse serotransferrin (a) and of mouse milk 'serotransferrin-like' protein and lactotransferrin (b)

ol, were found to resonate at $\delta = 2.090$ p.p.m. and 2.094 p.p.m. (the value of H-1 atom of GlcNAc-2 could not be determined because the doublet is hidden under the $^1\text{HO}^1\text{H}$ line). The deviations of these values are attributed to the presence of fucose α -1,6-linked to GlcNAc-1-ol.

In summary, the oligosaccharide alditols isolated from 'serotransferrin-like' protein and lactotransferrin are identical and possess a fucosylated biantennary structure have *N*-acetylneuraminic acid α -2,6-linked to Gal-6 and Gal-6' and fucose α -1,6-linked to *N*-acetylglucosaminitol.

DISCUSSION

Kinkade *et al.* (1976) first observed that mouse milk whey contains two immunologically distinct iron-binding proteins. In the present work the 'serotransferrin-like' protein was found to be present in the milk at a concentration 3-fold higher than the lactotransferrin. The biological significance of this high concentration, as well as the presence of 'serotransferrin-like' protein only in rabbit milk (Baker *et al.*, 1968), is, at the moment, not well understood. These observations are curious, especially as mouse 'serotransferrin-like' protein, in contrast with mouse milk lactotransferrin, seems to play no role in the iron transfer on the mouse brush-border-membrane vesicles (Hu, Mazurier, G. Sawatzki, J. Montreuil & G. Spik, unpublished work).

The mouse 'serotransferrin-like' protein was purified to homogeneity as judged by the polyacrylamide-gel electrophoresis under denaturing conditions. Moreover, from its electrophoretic mobility, the M_r of the monocatennary polypeptide chain has been estimated to be 78000 ± 2000 , a value similar to those of mouse serotransferrin and lactotransferrin (Fig. 1). On the basis of the M_r value and of the sugar content, we can assume that the three transferrins possess a single glycan of M_r 2500.

Under the strong alkaline-reductive conditions of cleavage of the GlcNAc-Asn linkage in accordance with Lee & Scoocca (1972), the oligosaccharides were completely released from the protein of the three transferrins.

As indicated in Table 2, the recovery of trimethylsilylated derivative of *N*-acetylglucosaminitol was very low. The decrease in the amount of *N*-acetylglucosaminitol was not due to complete degradation of the *N*-acetylglucosamine linked to asparagine, since by methylation 0.5 and 0.4 residue of methylated derivatives of *N*-acetylglucosaminitol were identified.

On the basis of methylation data and of $^1\text{H-n.m.r.}$ analysis the complete primary structure of the three reduced oligosaccharides has been established as a disialylated biantennary *N*-acetyl-lactosaminic structure (Fig. 4). However, this structure contains in the oligosaccharide alditol released from lactotransferrin and 'serotransferrin-like' protein one fucose residue α -1,6-linked to the *N*-acetylglucosamine reduced to *N*-acetylglucosaminitol. Characterization by $^1\text{H-n.m.r.}$ analysis, in the oligosaccharide alditol fraction released from mouse serotransferrin, of 10-15% oligosaccharide alditol containing an α -1,6-linked fucose residue indicates that fucosylation of serotransferrin glycan may occur in liver. This fucosylation is, however, less important than that in the mammary gland.

These results show that the carbohydrate structure of mouse serotransferrin is identical with that of human (Spik *et al.*, 1975) and of rabbit (Leger *et al.*, 1978) serotransferrins, and mouse lactotransferrin possesses the same glycan structure as that of human lactotransferrin (Spik *et al.*, 1982). However, it has to be noted that human lactotransferrin also contains glycans with two fucose residues, the one α -1,6-linked and the other α -1,3-linked to an *N*-acetylglucosamine residue. In addition, human serotransferrin and lactotransferrin contain two glycans linked to the polypeptide chain compared with one glycan for mouse serotransferrin and lactotransferrin. This can be observed as an apparent higher M_r of the human lactotransferrin in the SDS/polyacrylamide-gel electrophoresis (Fig. 1).

The site of biosynthesis of mouse milk 'serotransferrin-like' protein is not yet known. It could be either the liver or the mammary gland. Taking into account the specificity of the glycosyltransferases and particularly that of the fucosyltransferase, we suggest that most probably the biosynthesis of the milk 'serotransferrin-



like' glycan occurs in the mammary gland. Indeed, the fucosyltransferase, also named GDP-L-fucose:2-acetamido-2-deoxy- β -glucoside6- α -L-fucosyltransferase (Longmore & Schachter, 1982), transfers fucose residues to substrates with biantennary glycans containing the GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3) sequence at the non-reducing position. Elongation of antennae by addition of Gal(β 1-4) or NeuAc(α 2-6)Gal(β 1-4) sequences prevents enzyme action (Schachter *et al.*, 1982). According to these observations, the serotransferrin glycan would have either to be desialylated and degalactosylated during the transfer from the plasma to the mammary gland before being fucosylated, and then re-galactosylated and re-sialylated or, more probably, to be completely biosynthesized, as well as the polypeptide chain, by the mammary gland.

This suggestion disagrees with the findings reported by Laurell & Morgan (1965) and Ezekiel (1965), which imply that the mammary gland of the rat partially works as a molecular sieve for plasma proteins, particularly as lactation progresses. Further studies are necessary to identify the site of biosynthesis of serum proteins found in mammalian milk. The biological role of the iron-binding proteins 'serotransferrin-like' protein and lactotransferrin, both present in the milk, has to be elucidated, since so far only lactotransferrin seems to be involved in iron nutrition.

This work was supported in part by the Ministère de l'Éducation Nationale and by the Centre National de la Recherche Scientifique (Laboratoire National et Unité Associée au C.N.R.S. n° 217, Relations Structure-Fonctions des Constituants Membranaires; Directeur: Professeur J. Montreuil. We thank Dr. G. Strecker for his helpful discussions on ¹H-n.m.r. analysis and Professor J. F. G. Vliegthart for his valuable criticism of the manuscript. We are also grateful to Mrs. G. Hraby, Mrs. W. Riedel, Mr. Y. Leroy and Mrs. A. Honvault for their skilful technical assistance. We are grateful to the Conseil Régional de la Région Nord-Pas de Calais, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Ministère de la Recherche et de la Technologie and the Ministère de l'Éducation Nationale for their contribution in the acquisition of the 400 MHz n.m.r. apparatus.

REFERENCES

- Baker, E., Shaw, D. C. & Morgan, E. H. (1968) *Biochemistry* **7**, 1371-1378
- Cahour, A., Debeire, P., Hartmann, L., Montreuil, J., Van Halbeek, H. & Vliegthart, J. F. G. (1984) *FEBS Lett.* **170**, 343-349
- Ernst, R. R. (1966) *Adv. Magn. Reson.* **2**, 1-135
- Ezekiel, E. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* **107**, 511-518
- Fournet, B., Strecker, G., Leroy, Y. & Montreuil, J. (1981) *Anal. Biochem.* **116**, 489-502
- Groves, M. L. (1960) *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 3345-3350
- Hakomori, S. (1964) *J. Biochem. (Tokyo)* **55**, 205-208
- Harboe, N. & Ingild, A. (1973) *Scand. J. Immunol.* **2**, Suppl. 1, 161-164
- Hoffmann, F. A., Sawatzki, G., Schmitt, H. & Kubanek, B. (1982) *Lab. Anim. Sci.* **32**, 387-389
- Kamerling, J. P., Gerwig, G. J., Vliegthart, J. F. G. & Clamp, J. R. (1975) *Biochem. J.* **151**, 491-495
- Kinkade, J. M., Miller, W. W. K. & Segars, F. M. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **446**, 407-418
- Laurell, C. B. (1966) *Anal. Biochem.* **15**, 45-52
- Laurell, C. B. & Morgan, E. H. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* **100**, 128-135
- Lee, Y. C. & Scoocca, J. R. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 5753-5758
- Leger, D., Tordera, V., Spik, G., Dorland, L., Haverkamp, J. & Vliegthart, J. F. G. (1978) *FEBS Lett.* **93**, 255-260
- Longmore, G. D. & Schachter, H. (1982) *Carbohydr. Res.* **100**, 365-392
- Masson, P. L. & Heremans, J. F. (1971) *Comp. Biochem. Physiol. B* **29**, 119-129
- Masson, P. L., Heremans, J. F. & Prignot, J. (1965) *Experientia* **21**, 604-605
- Montreuil, J. & Mullet, S. (1960) *C. R. Séances Acad. Sci. Ser. D* **250**, 1736-1737
- Montreuil, J., Tonnelat, J. & Mullet, S. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 413-421
- Montreuil, J., Mazurier, J., Legrand, D. & Spik, G. (1985) in *Proteins of Iron Storage and Transport* (Spik, G., eds.), pp. 25-38. Elsevier, Amsterdam
- Ouchterlony, Ö. (1949) *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **26**, 507-515
- Paz Parente, J., Cardon, P., Leroy, Y., Montreuil, J. & Fournet, B. (1985) *Carbohydr. Res.* **141**, 41-47
- Reading, C. L., Penhoet, E. & Ballow, C. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 5600-5612
- Sawatzki, G. & Kubanek, B. (1983) in *Structure and Function of Iron Storage and Transport Proteins* (Urushizaki, eds.), pp. 441-443. Elsevier, Amsterdam
- Sawatzki, G., Anselstetter, V. & Kubanek, B. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **667**, 132-138
- Schachter, H., Narasimhan, S., Gleeson, P. & Vella, G. (1982) *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **61**, 1049-1066
- Spik, G. & Montreuil, J. (1963) *Méthodes Colorimétriques de Dosage des Glucides Totaux*. Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences, Lille
- Spik, G., Bayard, B., Fournet, B., Strecker, G., Bouquelet, S. & Montreuil, J. (1975) *FEBS Lett.* **50**, 296-299
- Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dorland, L., Van Halbeek, H. & Vliegthart, J. F. G. (1982) *Eur. J. Biochem.* **121**, 413-419
- Vliegthart, J. F. G., Dorland, L. & Van Halbeek, H. (1983) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **41**, 209-374
- Weeke, B. (1973) *Scand. J. Immunol.* **2**, 37-46
- Williams, J. (1985) in *Proteins of Iron Storage and Transport* (Spik, G., eds.), pp. 13-23. Elsevier, Amsterdam
- Zanetta, Z. P., Breckenridge, W. C. & Vincenton, G. (1972) *J. Chromatogr.* **69**, 291-304



Une transferrine, immunologiquement identique à la sérotransferrine présente dans le sang de souris et différente de la lactotransferrine, a été isolée à partir du lait de souris.

La détermination de la structure primaire des glycanes des trois transferrines de souris (la lactotransferrine et la transferrine isolées du lait et la sérotransferrine isolée du sang) a été réalisée par analyse des dérivés méthylés et par résonance magnétique nucléaire, après hydrolyse alcaline douce des oligosaccharides.

Les oligosaccharide-alditols isolés à partir de la lactotransferrine et de la transferrine du lait sont identiques : les structures sont de type N-acétyllactosaminique, biantennés, disialylés et fucosylés en $\alpha(1,6)$ sur la N-acétylglucosamine du point d'attache : ces structures sont identiques à celle isolée à partir de la lactotransferrine humaine (SPIK et al., 1982). Cependant, la lactotransferrine humaine possède également des glycanes avec du fucose lié en $\alpha(1,3)$ sur une N-acétylglucosamine.

En revanche, le glycanne isolé à partir de la sérotransferrine du sang de souris possède une structure primaire identique mais n'est pas, ou presque, fucosylé. La structure glycanique de la sérotransferrine de souris est identique à celle de la sérotransferrine humaine (SPIK et al., 1975) et de la sérotransferrine de lapin (LEGER et al., 1978). Seulement 10 à 15% des glycanes de la sérotransferrine de souris possèdent du fucose lié en $\alpha(1,6)$.

La sérotransferrine chromatographiée sur colonne de LCA-Sépharose (lens culinaris agglutinin) est séparée en 2 pics : le pic retenu sur la colonne et possédant du fucose en $\alpha(1,6)$ ne représente que 20% de la sérotransferrine (REGOECZI, communication personnelle).

La fucosylation semble donc dépendre du lieu de synthèse de la glycoprotéine puisque la sérotransferrine synthétisée par la glande mammaire est fucosylée alors que, au niveau du foie, elle ne l'est pas.

Les transferrines de souris ne possèdent qu'un glycanne en comparaison des transferrines humaines qui contiennent deux glycanes.

De plus, les résultats de séquençage de la lactotransferrine de

souris, acquis récemment par PENTECOST et TENG (1987), ont permis d'identifier deux résidus d'asparagine (Asp 99 et Asp 475) comme étant des sites de glycosylation potentiels. Cependant, la lactotransferrine de souris ne possède qu'un glycanne et seule la séquence code comprenant l'asparagine 475, présente également dans la lactotransferrine humaine et dans l'ovotransferrine, semble glycosylée.

La connaissance des structures glycaniques de ces trois transferrines de souris permettra de déterminer l'importance des glycannes, et en particulier du fucose, dans l'interaction des transferrines avec le macrophage. En effet, nous disposons maintenant de lactotransferrines d'origines diverses possédant des glycannes de structures différentes : la lactotransferrine de souris avec du fucose lié en $\alpha(1,6)$, la lactotransferrine humaine avec du fucose lié en $\alpha(1,6)$ et en $\alpha(1,3)$ et la lactotransferrine de vache possédant des glycannes de type oligomannosidique.

A ces trois lactotransferrines isolées à partir du lait, il faut également ajouter la lactotransferrine isolée de leucocytes humains dont la détermination de la structures primaire des glycannes vient d'être réalisé au Laboratoire (DERISBOURG et al., 1987) et qui ne présente pas de résidus de fucose lié en $\alpha(1,3)$.

MISE EN EVIDENCE DES RECEPTEURS DE TRANSFERRINES
SUR LES MACROPHAGES PERITONEAUX DE SOURIS

I - INTRODUCTION

Le but de ce travail a été de mettre en évidence l'existence de récepteurs distincts pour la sérotransferrine et la lactotransferrine sur le macrophage péritonéal de souris et de déterminer, en particulier, l'importance de la partie glycanique de ces glycoprotéines dans leur interaction sur les macrophages.

Le rôle du fucose dans le mécanisme de reconnaissance de la lactotransferrine par son récepteur membranaire a été étudié en comparant les fixations de la lactotransferrine humaine partiellement fucosylée en $\alpha(1,3)$, de la lactotransferrine de souris dont les structures glycaniques décrites précédemment p 93 ne renferment pas de fucose en $\alpha(1,3)$ et de la lactotransferrine humaine défucosylée.

II - MATERIELS ET METHODES

A - MATERIEL CELLULAIRE

1 - Milieu de culture et tampons

a - Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est du RPMI-1640 (Florio). Il est complétement avec 0,3% de L-glutamine et 25 mM Hépès. Son pH est ajusté à pH 7,0 avec une solution d'HCl 1 N .

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

b - Tampon de Hank's

NaCl	16 g	Na ₂ HPO ₄ anhydre	0,096 g
KCl	0,8 g	KH ₂ PO ₄	0,12 g
MgSO ₄ ,7 H ₂ O	0,4 g	Glucose	2 g
Eau distillée qsp 200 ml			

A 50 ml de cette solution sont ajoutés 175 mg de NaHCO₃. Cette solution est amenée à un volume final de 500 ml avec de l'eau mQ (millipore). Le pH de la solution est de 7,0.

2 - Isolement des macrophages péritonéaux de souris

Les souris sont anesthésiées et les macrophages sont prélevés par une injection intrapéritonéale de 4 à 5 ml de tampon de Hank's. Après un massage léger de la cavité péritonéale, le milieu est récupéré puis centrifugé à 800 g 15 mn.

Les culots cellulaires sont rassemblés et ajustés à un volume final de 10 à 20 ml avec du milieu de culture suivant le nombre de souris sacrifiées. Une numération cellulaire et un test de viabilité au bleu trypan sont réalisés.

Les cellules sont ensuite mises en culture en boîte Nunc-Delta 24 cupules de 2 cm² (Polylabo). La densité de mise en culture est de 2,5 x 10⁵ cellules/cm². Le nombre exact de cellules par puits de culture est déterminé à la fin de l'expérience par dosage des protéines selon la méthode de LOWRY et al. (1951).

Les cellules sont incubées durant 2 heures à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Puis le milieu de culture est changé, permettant ainsi l'élimination des lymphocytes et autres cellules non adhérentes au support plastique.

Les macrophages sont laissés en culture suivant des temps variant selon la nécessité de l'expérience. Le milieu de culture est changé toutes les 24 heures lorsque le temps de culture est de plusieurs jours.

3 - Test de viabilité au bleu Trypan

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

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

Le pourcentage de viabilité est déterminé après observation au microscope optique. Il est toujours supérieur à 90%.

B - LES TRANSFERRINES

1 - Les lactotransferrines

Les lactotransferrines, saturées en fer, utilisées ont été isolées du lait humain et du lait de souris suivant les protocoles décrits p. 67 et p.70.

L'apolactotransferrine et la lactotransferrine défucosylée (échantillon n°3) ont été préparées à partir de lactotransferrine humaine selon les protocoles décrits respectivement p.73 et p.81.

2 - Les transferrines

Les transferrines murines utilisées ont été isolées à partir du sang et du lait de souris. Les protocoles sont décrits p.89.

C - METHODES D'ETUDE DE L'INTERACTION TRANSFERRINE-MACROPHAGES

1 - Fixation des transferrines sur le macrophage

Les cellules, mises en culture suivant les conditions décrites précédemment, sont pré-incubées 2 heures à 37°C en présence de 5% de CO₂ dans du milieu de culture RPMI-1640 sans sérum de veau foetal afin d'éliminer la transferrine endogène.

Les boîtes de culture Nunc-Delta 24 cupules sont alors placées à 4°C et le milieu de culture est éliminé. Les transferrines marquées à ¹²⁵I et diluées dans le milieu de culture sont ajoutées aux cellules. Le volume final de réaction est de 0,4 ml par puits. Les incubations s'effectuent pendant 2 heures à 4°C à raison de 2 puits de culture par concentration en transferrine. Une estimation de la fixation non spécifique est réalisée en ajoutant de la transferrine

non marquée 100 fois en excès molaire. Un aliquote du surnageant de chaque puits est prélevé afin de déterminer la quantité de transferrine libre. Les incubations se font en présence de BSA à 1% dans le cas des sérotransferrines. Comme GOAVEC et al. (1985) ont montré que la fixation non spécifique de la lactotransferrine augmentait en présence de BSA, celle-ci n'est pas utilisée lors des expériences avec la lactotransferrine.

La réaction est arrêtée par élimination du milieu de culture radioactif. Les cellules sont lavées 3 fois avec du tampon Hank's complété avec du CaCl_2 2mM. Les cellules sont récupérées dans 0,5 ml de soude 0,1 N et la radioactivité de chaque puits est ainsi compée au compteur gamma.

2 - Dosage des protéines membranaires



La concentration en protéine est déterminée par la méthode de LOWRY et al. (1951).

5 à 100 μg de protéines en solution sont ajustés à 1 ml avec de l'eau distillée. Après addition de 0,1 ml de déoxycholate de sodium 0,15%, les tubes sont agités et laissés à température ambiante pendant 10 mn. Les protéines sont ensuite précipitées par 0,1 ml d'une solution d'acide trichloracétique à 72%. Après agitation et centrifugation à 3000 g pendant 20 mn, le surnageant est éliminé par aspiration.

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

Réactif A : 25 ml de $(\text{CuSO}_4, 5 \text{H}_2\text{O})$ à 0,4% et 25 ml de tartrate de potassium à 0,8% sont mélangés lentement à 50 ml de carbonate de sodium à 20%. Le réactif A est préparé par le mélange d'un volume de la solution précédente, d'un volume de NaOH 0,8 N, d'un volume de dodecyl sulfate de sodium 10% et d'un volume d'eau. Il se conserve 2 semaines à 20°C.

Réactif B : un volume de réactif au phénol de Folin-Ciocalteus (Merck) et 5 volumes d'eau.

Le dosage des protéines membranaires permet, après l'incubation avec la protéine marquée, de déterminer le nombre exact de cellules par puit de culture. La réalisation d'une gamme étalon a permis de déterminer que 1 mg de protéine correspondait à $6,5 \times 10^6$ cellules.

3 - Expression des résultats

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 ng de transferrine fixée en fonction de la concentration en transferrine ajoutée et d'autre part selon la technique de SCATCHARD (1949).

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

III - RESULTATS

A - MISE EN EVIDENCE DE LA PRESENCE DU RECEPTEUR DE LA SEROTRANSFERRINE SUR LES MEMBRANES PLASMIQUES DES MACROPHAGES PERITONEAUX DE SOURIS

1 - Fixation de la transferrine du sang de souris sur les macrophages

a - Macrophages péritonéaux fraîchement isolés

Nous avons dans un premier temps étudié la fixation de la transferrine du sang de souris sur les macrophages péritonéaux

fraîchement isolés : l'incubation avec la protéine marquée à ^{125}I se fait immédiatement après les phases d'adhésion des macrophages sur le support plastique et de lavage visant à éliminer les cellules contaminantes et la transferrine du sérum de veau foetal.

L'incubation est faite en présence de BSA 1% afin de diminuer la fixation non spécifique.

Les résultats obtenus sont exprimés selon la représentation de Scatchard dans la figure 21 p.102.

La fixation de la sérotransferrine sur le macrophage péritonéal est très faible. Le nombre de site de fixation par cellule est de 7000 (Tableau II).

La fixation est saturable et atteint un plateau pour des concentrations très faibles en sérotransferrine de l'ordre de 0,01 à 0,02 μ molaire (0,8 à 1,6 $\mu\text{g/ml}$).

La constante d'association est de $3,8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$.

b - Macrophages après 5 jours de culture in vitro

Pour maintenir les macrophages péritonéaux en culture, le milieu est renouvelé toutes les 24 heures.

Les résultats représentés dans la figure 22 p.103, montre que le nombre de sites de fixation par macrophage mature pour la sérotransferrine de souris est de 300 000 avec une constante d'affinité de $1,15 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Tableau IV p.104).

2 - Fixation de la transferrine du lait de souris sur les macrophages

a - Macrophages péritonéaux fraîchement isolés

Une étude similaire a été menée avec la sérotransferrine isolée à partir du lait de souris. Les résultats sont les mêmes que ceux obtenus avec la sérotransferrine isolée du sang de souris. Les sérotransferrines murines, isolées à partir du sang ou du lait ne se fixent pratiquement pas sur les macrophages péritonéaux.

b - Macrophages après 5 jours de culture in vitro

Après 5 jours de culture in vitro, le nombre de sites de fixation de la transferrine du lait de souris par macrophage est de 340 000 (Tableau IV p.104), soit environ 50 fois plus que sur les macrophages immatures, avec une constante d'affinité de $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Fig. 23 p. 105). Le récepteur de la transferrine ne semble exister que sur les

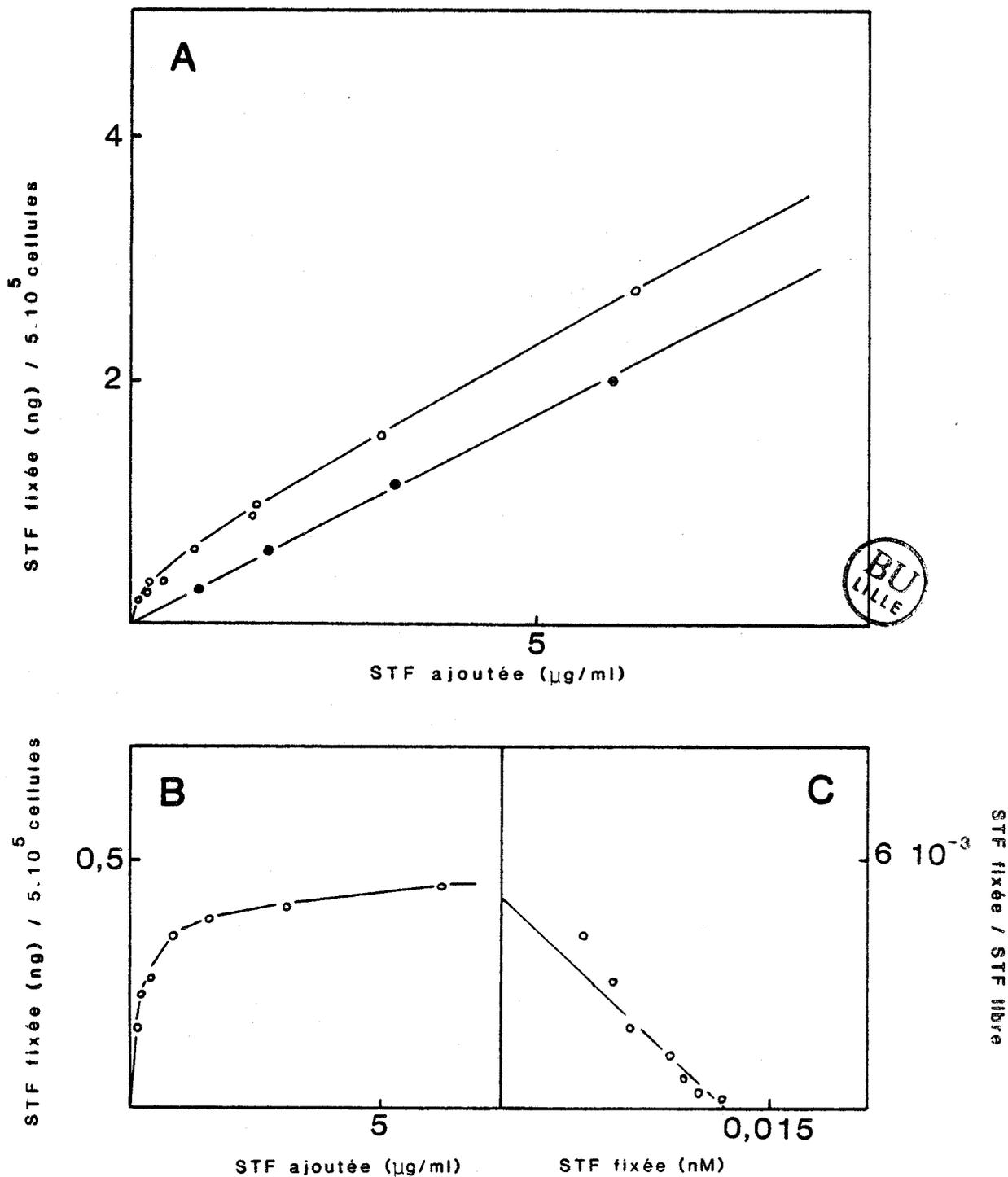


Figure 21 : Fixation de la sérotransferrine isolée du sang de souris sur les macrophages péritonéaux de souris

- A : courbe de saturation (○: fixation totale; ●: fixation non spécifique)
- B : courbe de saturation (○: fixation spécifique)
- C : représentation de Scatchard

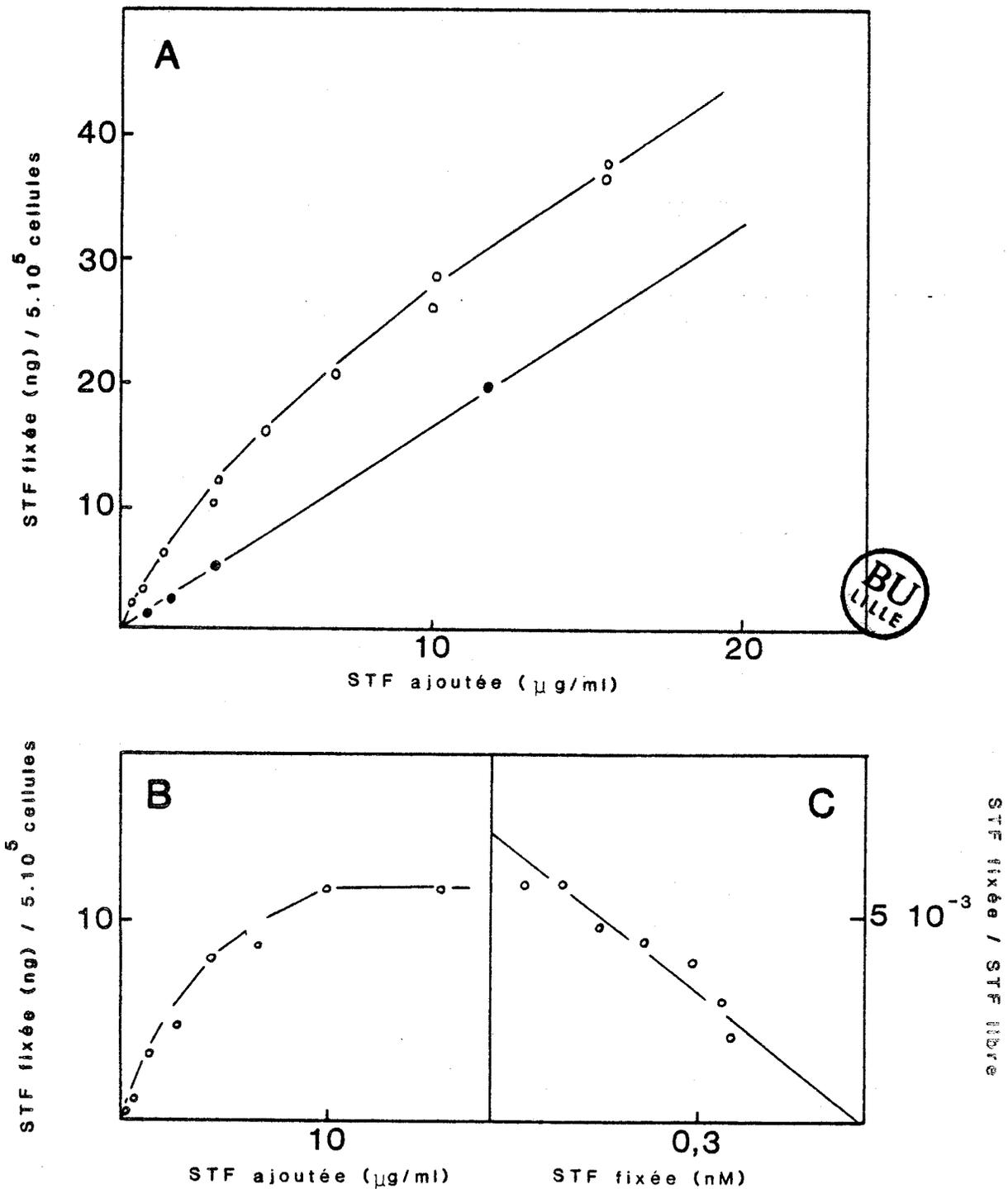


Figure 22 : Fixation de la sérotransferrine isolée du sang de souris sur les macrophages péritonéaux de souris après 5 jours de culture

- A : courbe de saturation (O : fixation totale; ● : fixation non spécifique)
- B : courbe de saturation (O : fixation spécifique)
- C : représentation de Scatchard

TABLEAU IV

Constantes d'affinité et nombres de sites de fixation des différentes transferrines sur le macrophage péritonéal de souris

Transferrines	Nombre de jours de culture	Constantes d'affinité	Nombres de sites de fixation
transferrine du sang de souris	0	$3,8 \times 10^8$	7 000
	5	$1,15 \times 10^7$	300 000
transferrine du lait de souris	0	-	-
	5	$1,0 \times 10^7$	340 000
Lactotransferrine saturée du lait de souris	1	$1,5 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$
	5	$2,5 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$
Lactotransferrine saturée du lait humain	1	$1,7 \times 10^8$	170 000
		$3,7 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$
Apolactotransferrine du lait humain	1	$1,2 \times 10^8$	200 000
		$3,2 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$
Lactotransferrine du lait humain défucosylée	1	$3,1 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$

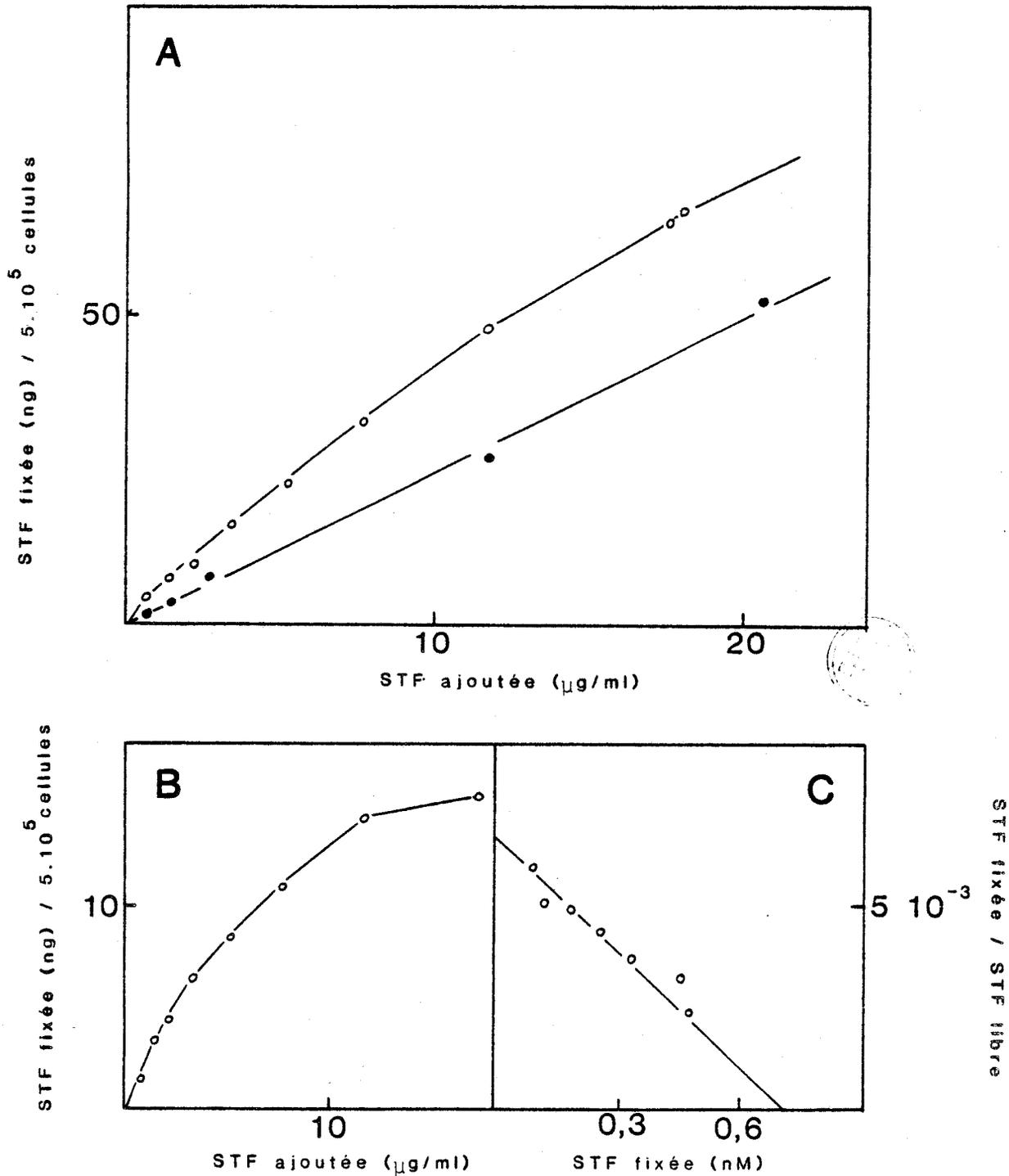


Figure 23 : Fixation de la sérotransferrine isolée du lait de souris sur les macrophages péritonéaux de souris après 5 jours de culture

- A : courbe de saturation (O : fixation totale; ● : fixation non spécifique)
- B : courbe de saturation (O : fixation spécifique)
- C : représentation de Scatchard

macrophages matures. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment par ANDREESEN et al.(1984), COSTABEL et al. (1984) et HIRATA et al. (1985).

B - MISE EN EVIDENCE DE LA PRESENCE DE DEUX RECEPTEURS DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LES MACROPHAGES PERITONEAUX DE SOURIS

1 - Fixation de la lactotransferrine de souris saturée en fer sur les macrophages

Le temps de culture in vitro des macrophages péritonéaux est de 24 heures après leur isolement. Les incubations avec les lactotransferrines sont faites en absence de BSA. Les courbes de fixation de la lactotransferrine de souris sur le macrophage péritonéal de souris sont représentées dans la figure 24 p.107.

Le nombre de sites de fixation est de $1,8 \times 10^6$ par cellule et la constante d'affinité de $1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (Tableau IV p.104).

La fixation de la lactotransferrine de souris est difficilement saturable et n'atteint un plateau qu'avec des concentrations très élevées de l'ordre de $1 \mu\text{M}$ ($80 \mu\text{g/ml}$). Aux faibles concentrations, la fixation varie d'une façon presque linéaire avec la quantité de lactotransferrine marquée.

Les valeurs de nombre de sites de fixation par cellule et de constante d'association ne varient pas avec le temps de culture : des valeurs similaires sont trouvées lorsque les macrophages sont maintenus en culture pendant 5 jours (Tableau IV p.104).

2 - Fixation de la lactotransferrine humaine saturée en fer sur les macrophages

Les macrophages sont maintenus en culture 24 heures avant leur utilisation.

La représentation de Scatchard (Fig. 25 p.108) indique la présence de deux classes de sites de fixation. Les valeurs des constantes d'affinité et des nombres de sites sont respectivement : $K_a = 1,7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ et $n = 170\ 000$ sites/cellule pour la fixation de haute affinité et $K_a = 3,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ et $n = 3,2 \times 10^6$ sites/cellule pour la fixation de faible affinité (Tableau IV p.104).

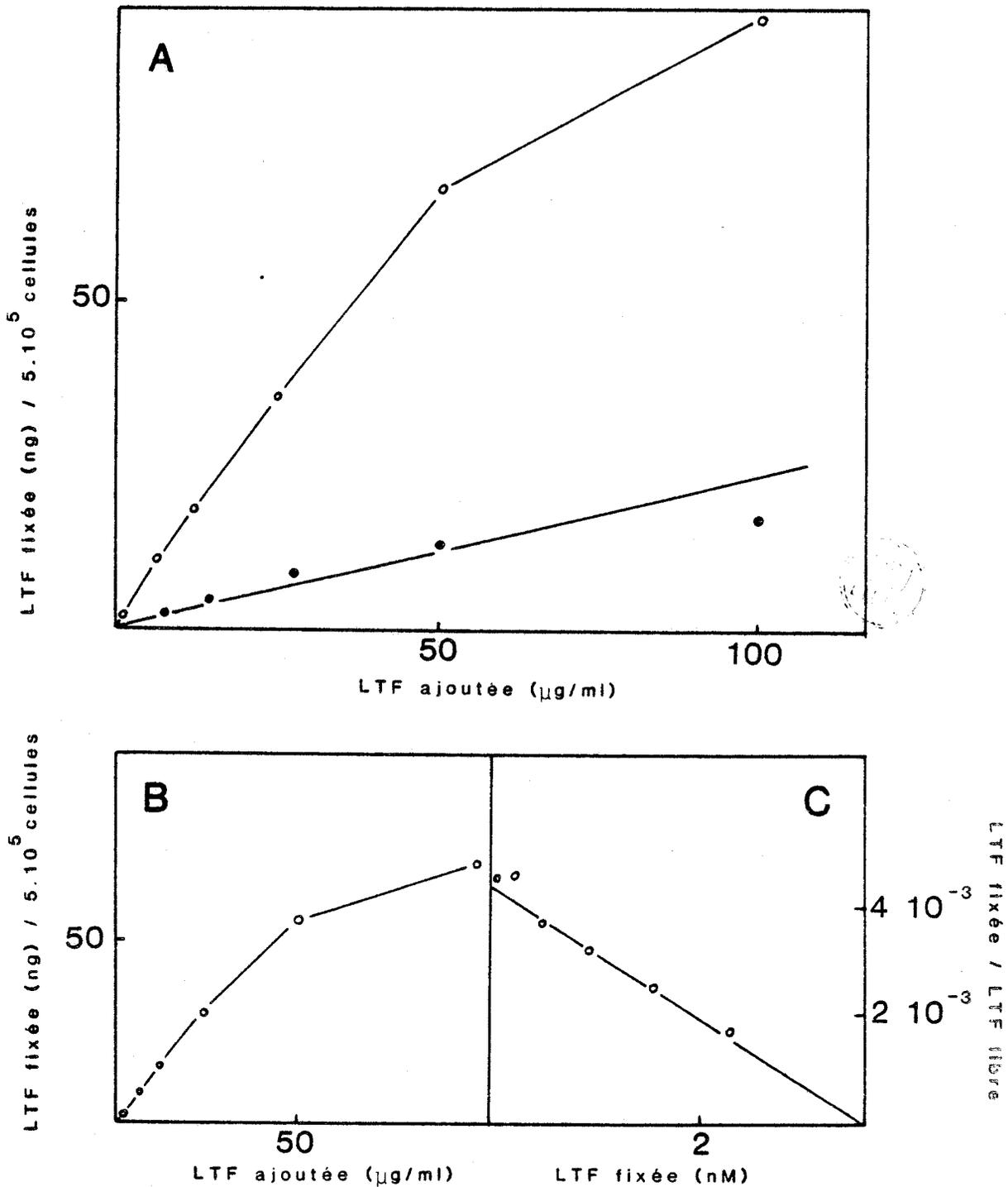


Figure 24 : Fixation de la lactotransferrine isolée du lait de souris sur les macrophages péritonéaux de souris

- A : courbe de saturation (○ : fixation totale; ● : fixation non spécifique)
- B : courbe de saturation (○ : fixation spécifique)
- C : représentation de Scatchard

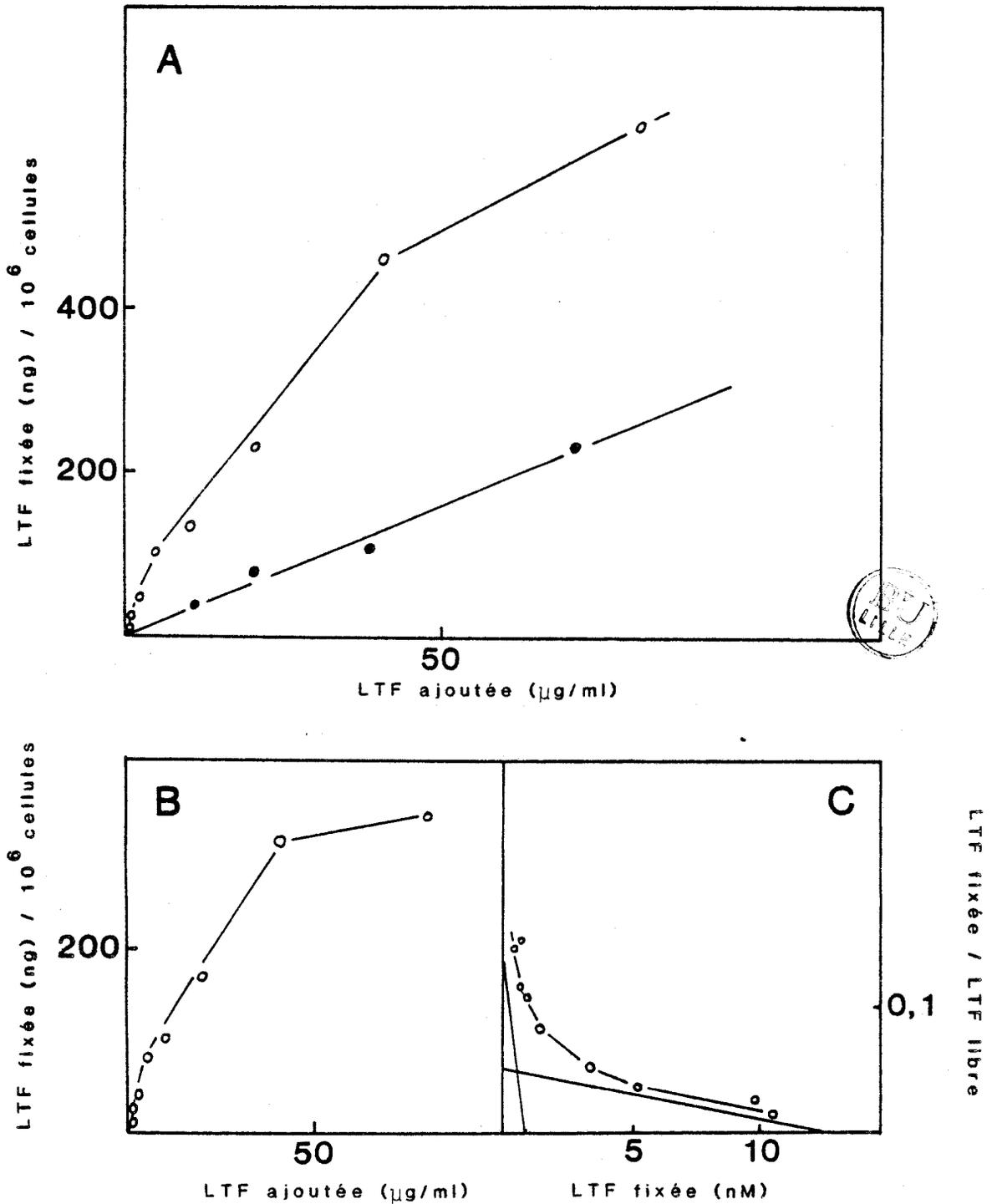


Figure 25 : Fixation de la lactotransferrine humaine saturée en fer sur les macrophages péritonéaux de souris

- A : courbe de saturation (O : fixation totale; ● : fixation non spécifique)
- B : courbe de saturation (O : fixation spécifique)
- C : représentation de Scatchard

La valeur de constante d'affinité de la lactotransferrine de souris est comparable à celle obtenue pour la fixation de faible affinité de la lactotransferrine humaine. En revanche, la fixation de haute affinité n'existe pas avec la lactotransferrine de souris.

Il apparaît que la lactotransferrine humaine, contrairement à la lactotransferrine de souris, se fixe sur deux types de sites distincts à la surface du macrophage. La fixation de faible affinité peut expliquer les résultats obtenus par la plupart des auteurs qui trouvent un nombre de sites de fixation très important parfois supérieur à 10 ou 20×10^6 sites/cellule.

3 - Fixation de l'apolactotransferrine humaine sur les macrophages

L'expérience de fixation de l'apolactotransferrine humaine sur les macrophages péritonéaux de souris a été menée dans les mêmes conditions que pour les lactotransferrines saturées en fer.

La représentation de Scatchard indique la présence de deux sites de fixation de l'apolactotransferrine humaine sur le macrophage (Fig. 26 p.110). Les résultats sont similaires à ceux obtenus pour la lactotransferrine humaine saturée en fer puisque le premier site de fixation est de haute affinité avec une constante d'association de $1,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ et un nombre de sites par cellule de 200 000 et que le deuxième site de faible affinité possède une constante d'association de $3,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ et un nombre de sites de fixation de $2,4 \times 10^6$ par cellules (tableau IV p.104).

4 - Fixation de la lactotransferrine humaine partiellement défucosylée sur les macrophages

La fixation de la lactotransferrine défucosylée a été faite dans les mêmes conditions que celle de la lactotransferrine humaine saturée non défucosylée.

La courbe de saturation en fonction de la concentration en lactotransferrine partiellement défucosylée montre que la fixation aux faibles concentrations est moins importante qu'avec la lactotransferrine non défucosylée. En revanche, aux fortes concentrations en lactotransferrine, les fixations sont similaires (Fig. 27 p.111).

La représentation de Scatchard ne donne qu'une seule classe de

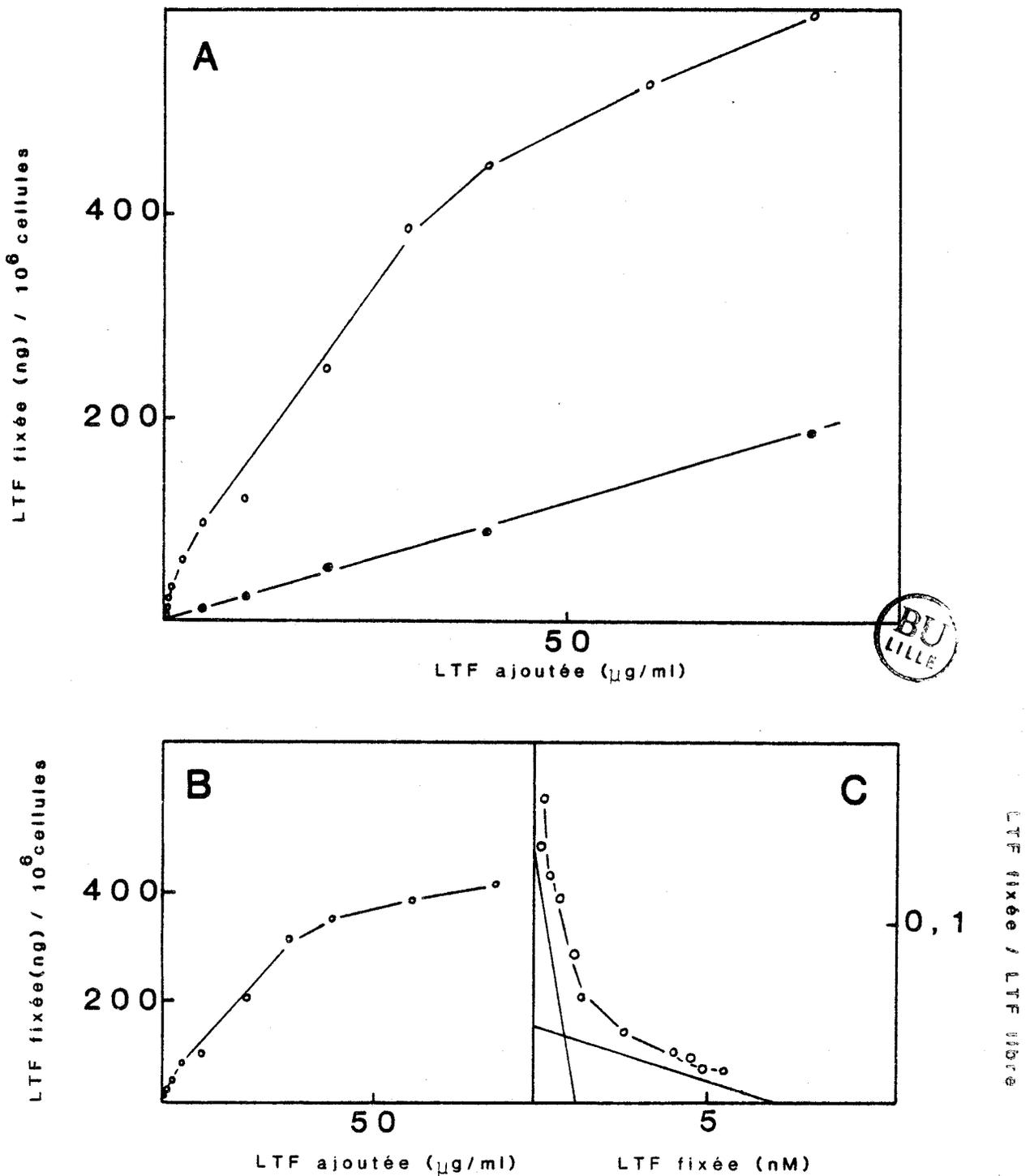


Figure 26 : Fixation de l'apolactotransferrine humaine sur les macrophages péritonéaux de souris

- A : courbe de saturation (O : fixation totale; ● : fixation non spécifique)
- B : courbe de saturation (O : fixation spécifique)
- C : représentation de Scatchard

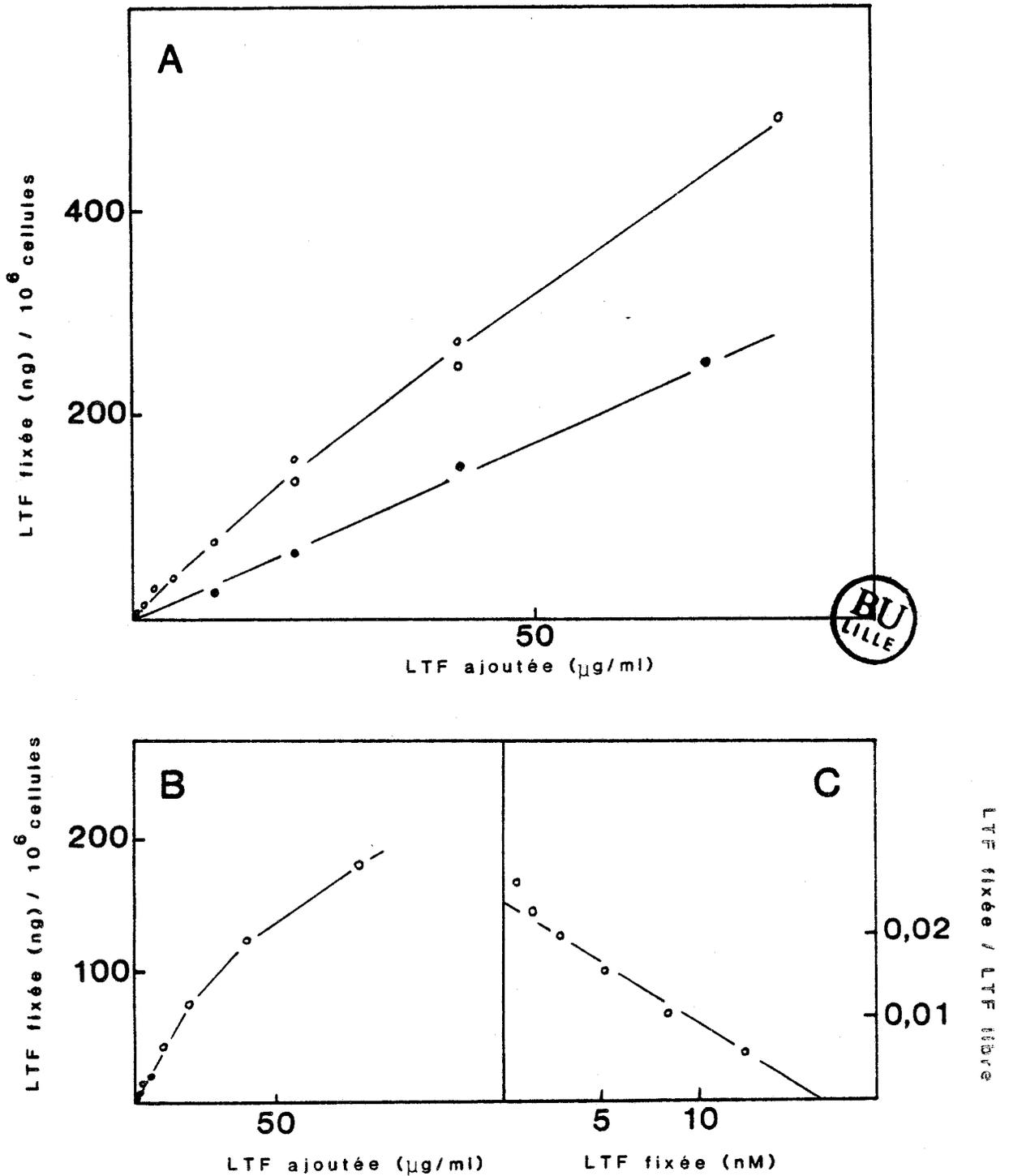


Figure 27 : Fixation de la lactotransferrine humaine défucosylée sur les macrophages péritonéaux de souris

- A : courbe de saturation (○ : fixation totale; ● : fixation non spécifique)
- B : courbe de saturation (○ : fixation spécifique)
- C : représentation de Scatchard

sites de fixation de faible affinité. La constante d'association est de $3,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Le nombre de sites par macrophage est de $1,9 \times 10^6$. Les valeurs de fixation de la lactotransferrine humaine partiellement défucosylée sont proches de celles obtenues avec la lactotransferrine de souris.

La fixation de haute affinité n'est plus présente après défucosylation de la lactotransferrine humaine.

IV - CONCLUSION

A - LE RECEPTEUR DE LA SEROTRANSFERRINE

Les deux transferrines murines isolées du sang et du lait diffèrent l'une de l'autre par la présence ou non d'un résidu de fucose lié en $\alpha(1,6)$ sur la N-acétylglucosamine 1 (Fig.4 p. 93). Les fixations similaires de ces deux sérotransferrines prouvent que le fucose lié en $\alpha(1,6)$ n'intervient pas dans le mécanisme de reconnaissance de la glycoprotéine par le macrophage.

Cette reconnaissance semble être due plutôt à la partie protéique de la sérotransferrine.

La fixation de la sérotransferrine dépend de l'état de maturation du macrophage, le récepteur ne semble être présent qu'à la surface des cellules matures.

Puisque les transferrines du sang et du lait de souris se fixent avec la même affinité et un nombre de sites identique, on peut conclure que le récepteur lectinique à fucose présent à la surface des macrophages ne reconnaît pas les glycoprotéines à fucose lié en $\alpha(1,6)$ sur la N-acétylglucosamine 1 des structures biantennée de type N-acétyllactosaminique.

B - LES RECEPTEURS DES LACTOTRANSFERRINES

La détermination récente de la séquence primaire de la chaîne peptidique de la lactotransferrine de souris (PENTECOST et TENG, 1987) a permis d'établir que le pourcentage d'homologie avec la

lactotransferrine humaine était très important (70%). Cependant, comme nous l'avons vu p.106, la fixation de ces deux lactotransferrines sur le macrophage péritonéal de souris est différente.

La lactotransferrine humaine se fixe, en effet, sur deux types de sites différents : un site de haute affinité et un site de faible affinité. Quant à la lactotransferrine de souris, elle ne se fixe que sur les sites de faible affinité.

La principale différence entre ces deux lactotransferrines semble être la présence de résidus de fucose liés en $\alpha(1,3)$ sur la N-acétylglucosamine 4' des structures glycaniques biantennées de la lactotransferrine humaine. Afin de vérifier la spécificité de reconnaissance du site de haute affinité de la lactotransferrine humaine, le fucose lié en $\alpha(1,3)$ a été libéré. L'interaction de la lactotransferrine humaine ainsi défucosylée avec le macrophage péritonéal de souris montre que le fucose lié en $\alpha(1,3)$ intervient dans le mécanisme de reconnaissance de la lactotransferrine humaine.

Le degré de saturation en fer de la lactotransferrine humaine ne semble pas influencer sur sa fixation. Les valeurs de nombre de sites de fixation et surtout de constante d'association de la lactotransferrine humaine saturée en fer ou sous forme d'apolactotransferrine sont très voisines.

La lactotransferrine de souris se fixerait sur le macrophage par l'intermédiaire de sa partie protéique. La fixation de la lactotransferrine murine peut être due à l'existence d'un récepteur spécifique comme le suggèrent plusieurs auteurs (VAN SNICK et MASSON, 1976; MARKOWETZ et al., 1979; BIRGENS et al., 1983) ou peut être non spécifique en se fixant en particulier sur de l'ADN membranaire (BENNETT et DAVIS, 1981; MOGUILLEVSKY, 1987). Les constantes d'affinité de la lactotransferrine de souris sont 8 à 10 fois plus faible que celles des transferrines isolées du sang et du lait de souris.

La lactotransferrine humaine se fixerait sur le même type de site que la lactotransferrine de souris mais serait également reconnue par un récepteur lectinique spécifique du fucose lié en $\alpha(1,3)$.

La suite de nos travaux a consisté à isoler ce récepteur et à déterminer sa spécificité de reconnaissance.

ISOLEMENT D'UN RECEPTEUR LECTINIQUE
DES MACROPHAGES PERITONEAUX DE SOURIS

I - INTRODUCTION

Dans ce chapitre nous décrivons l'isolement par chromatographie d'affinité d'un récepteur responsable de la fixation de haute affinité de la lactotransferrine humaine sur le macrophage péritonéal de souris.

Avant d'isoler ce récepteur macrophagique et d'étudier les propriétés et les conditions de fixation de la lactotransferrine humaine, nous avons isolé et solubilisé la fraction membranaire puis déterminé le pH optimum de fixation des lactotransferrines murine et humaine sur les membranes du macrophage.

II - ISOLEMENT DES MEMBRANES DU MACROPHAGE

A - MATERIELS ET METHODES

1 - Matériel cellulaire

Les macrophages péritonéaux sont prélevés par injection intrapéritonéale de tampon de Hank's comme décrit à la p. 97. Les cellules, resuspendues dans du milieu de culture RPMI-1640, sont réparties dans des boîtes de culture NUNC (5 cm de diamètre). Après 2 heures à 37°C en présence de 5% CO₂, les macrophages adhèrent au support plastique et les cellules contaminantes sont éliminées. Les macrophages sont laissés 48 heures en culture. Le milieu de culture est changé au bout de 24 heures.

Les cellules sont détachées par grattage mécanique et conservées à -70°C jusqu'à leur utilisation. Celle-ci intervient au maximum dans les 2 mois.

2 - Solubilisation de la fraction membranaire

Les cellules sont décongelées et la fraction membranaire totale est obtenue en homogénéisant les macrophages dans un tampon Tris/HCl 20 mM pH 7,8 contenant du $MgCl_2$ 10 mM, de l'EDTA 2 mM et les inhibiteurs de protéases suivant : aprotinine 2 $\mu g/ml$, pepstatine 10 $\mu g/ml$, NaN_3 0,02%, DDT (dithiothréitol) 1 mM, PMSF (phénylméthylsulfonyl fluorure) 0,02 mM et O-phénanthroline 1 mM

Après l'éclatement des cellules par l'intermédiaire d'une sonde à ultra-son, l'homogénat est centrifugé à 16 000 g pendant 30 mn à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans un tampon MOPS 25 mM, NaCl 0,25 M, $CaCl_2$ 5 mM pH 7.

Du Triton-X 100 est ajouté jusqu'à l'obtention d'une concentration finale en Triton de 1%. Le culot est solubilisé dans ce tampon par ultrason puis agitation mécanique douce pendant une heure.

La fraction insoluble est éliminée par centrifugation à 16 000 g 30 mn.

Toutes les opérations se font à 4°C et en présence d'inhibiteurs de protéases.

3 - Les lactotransferrines

Les lactotransferrines de souris, de vache et humaine ont été isolées à partir du lait suivant les protocoles décrits p.70 et p.67. Les lactotransferrines utilisées sont saturées en fer. L'apolactotransferrine a été préparée à partir de lactotransferrine humaine selon le protocole décrit p.73.

4 - Incubation des membranes avec la lactotransferrine

La fraction membranaire solubilisée est déposée sur membrane de nitrocellulose (10 x 10 mm) (membrane filters BA 85, 0,45 μm , Schleicher et Schüll, W-Germany).

Les membranes de nitrocellulose sont lavées par les tampons appropriés puis incubées avec de la lactotransferrine marquée à l' ^{125}I pendant 2 heures à température ambiante. Les membranes de

nitrocellulose sont ensuite lavées 3 fois 1 mn par le même tampon sans lactotransferrine. La radioactivité est mesurée au compteur gamma.

La concentration en lactotransferrine marquée lors de l'incubation est de 2 µg/ml. La fixation non spécifique de la lactotransferrine sur la nitrocellulose est déterminée en incubant dans les mêmes conditions des membranes de nitrocellulose seules. La fixation non spécifique est soustraite de la fixation totale.

a - En fonction du pH

La fixation de la lactotransferrine sur les protéines membranaires en fonction du pH a été entreprise dans les conditions décrites précédemment. L'étude a été faite entre pH 3,5 et 9.

Les tampons suivants ont été utilisés :

- entre pH 3,5 et 5 : acétate de sodium 25 mM
- entre pH 5,5 et 6,5 : MES 25 mM
- entre pH 6,5 et 7,5 : MOPS 25 mM
- entre pH 7,5 et 9 : Tris 25 mM

Tous les tampons contiennent également du Triton-X 100 à 0,1%, du CaCl_2 5 mM et du NaCl 0,25 M.

b - Expériences d'inhibition

Les inhibitions sont faites dans les conditions suivantes : les membranes de nitrocellulose sont incubées avec de la lactotransferrine marquée à l' ^{125}I (2 µg/ml) en présence d'inhibiteurs non marqués en quantités croissantes. La concentration en inhibiteur est exprimée en excès molaire par rapport à la lactotransferrine.

Nous avons choisi comme témoin non spécifique, l'inhibition produite par la BSA.

B - RESULTATS

1 - Fixation de la lactotransferrine en fonction du pH

Nous avons entrepris cette étude afin de déterminer quel était le pH optimum de fixation de la lactotransferrine sur les membranes solubilisées du macrophage.

a - La lactotransferrine murine

Les études de fixation ont été réalisées entre pH 3,5 et 9. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 28 p. 118. La fixation de la lactotransferrine de souris sur la fraction membranaire immobilisée sur membrane de nitrocellulose est maximale à pH 4,5 puis diminue rapidement lorsque le pH augmente. Elle est pratiquement nulle à pH physiologique.

b - La lactotransferrine humaine

Dans les mêmes conditions opératoires, la fixation de la lactotransferrine humaine en fonction du pH représentée figure 28 p. 118, possède un profil différent.

La fixation de la lactotransferrine humaine présente deux maxima : un maximum compris également entre pH 4,5 et 5 et un deuxième maximum à pH physiologique, entre 7 et 8.

Le profil de fixation de l'apolactotransferrine humaine en fonction du pH est identique à celui de la fixation de la lactotransferrine humaine saturée en fer.

2 - Spécificité de fixation des lactotransferrines à pH 4,5

La spécificité de fixation des lactotransferrines humaine et murine sur les membranes solubilisées a été établie par des expériences d'inhibition en utilisant comme inhibiteurs des lactotransferrines d'origines différentes et dont les structures glycaniques sont connues.

a - La lactotransferrine de souris

Les résultats obtenus montrent que la fixation à pH 4,5, dans un tampon acétate de sodium 25 mM, NaCl 0,25 M, CaCl₂ 5 mM, Triton-X 100 0,1%, de la lactotransferrine de souris sur les membranes solubilisées du macrophage est inhibée de la même façon quelque soit l'origine de la lactotransferrine froide ajoutée comme inhibiteur (Fig.29 p.119). En effet, les lactotransferrines de souris, de vache et humaine, dont les structures glycaniques sont différentes, provoquent le même effet inhibiteur. Les transferrines murines isolées du lait ou du sang n'inhibent absolument pas la fixation de la lactotransferrine à pH 4,5.

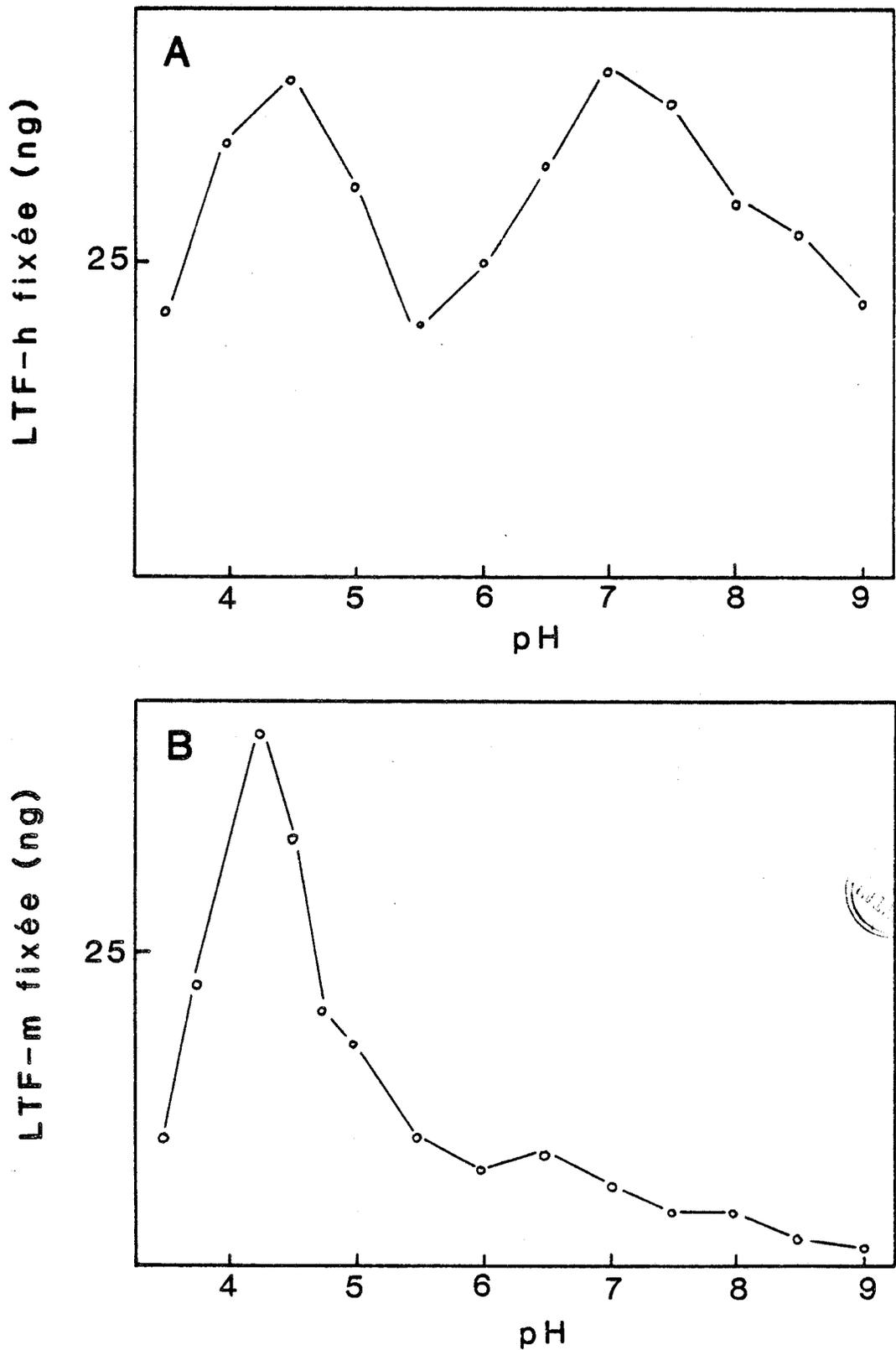


Figure 28 : Fixation de la lactotransferrine sur les membranes solubilisées du macrophage péritonéal de souris en fonction du pH

A : fixation de la lactotransferrine humaine

B : fixation de la lactotransferrine de souris

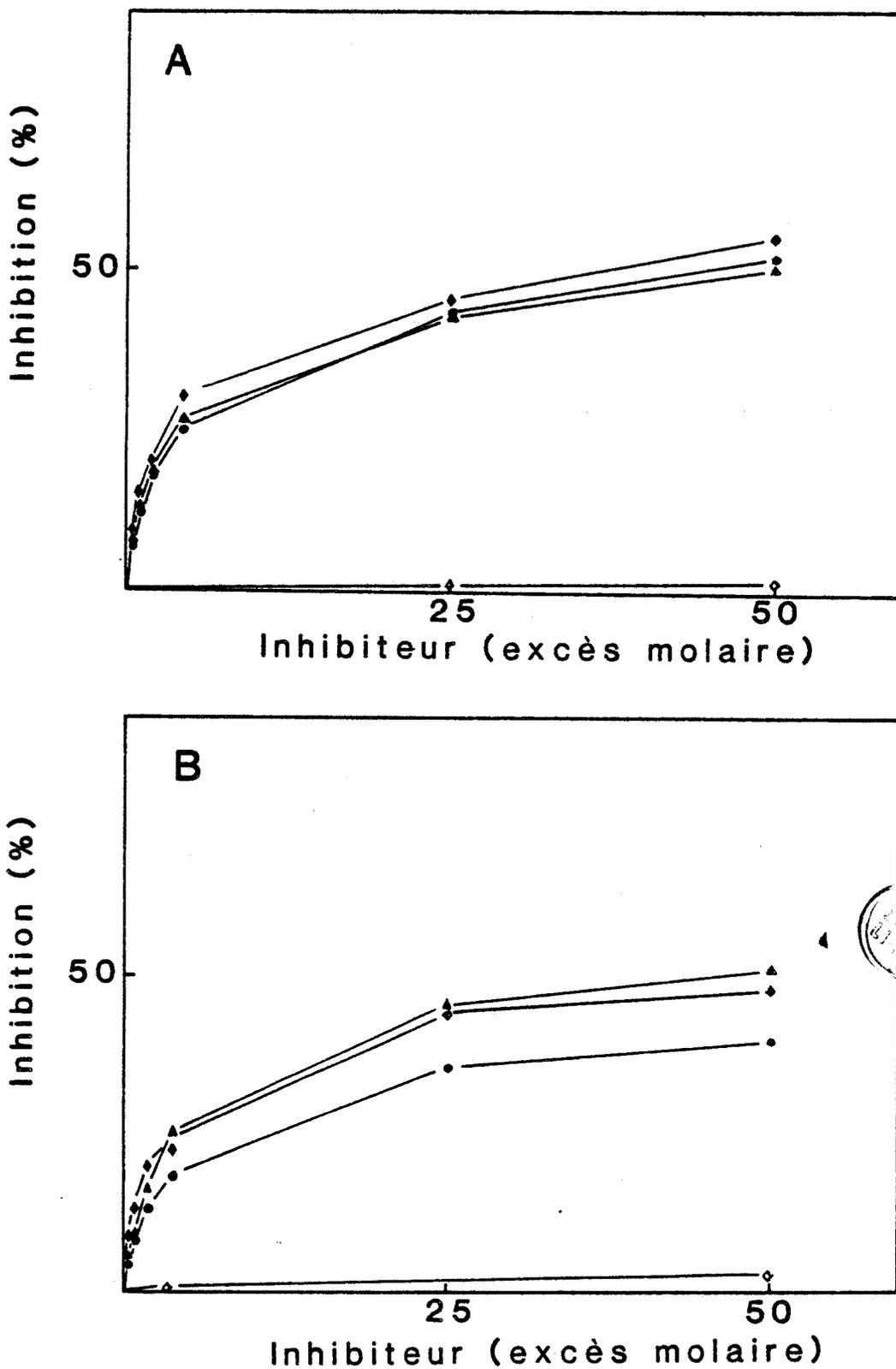


Figure 29 : Inhibition de la fixation de la lactotransferrine humaine (A) et de la lactotransferrine de souris (B) sur les membranes solubilisées du macrophage péritonéal de souris par les lactotransferrines humaine (◆), de souris (▲) et bovine (●)

b - La lactotransferrine humaine

La même étude a été faite à pH 4,5 avec la lactotransferrine humaine et les résultats obtenus sont identiques (Fig.29 p.119).

Une part importante de la lactotransferrine marquée se fixe de façon non réversible et n'est pas déplacée même avec des concentrations élevées en lactotransferrine froide. La fixation non spécifique et non réversible de la lactotransferrine humaine, mais également de la lactotransferrine de souris, sur les membranes est importante.

3 - Spécificité de fixation des lactotransferrines à pH 7

L'incubation se fait dans un tampon MOPS 25 mM, NaCl 0,25 M, CaCl₂ 5 mM, Triton-X 100 0,1% pH 7.

a - La lactotransferrine murine

La fixation de la lactotransferrine de souris sur les membranes est du même ordre de grandeur que la fixation non spécifique.

La lactotransferrine de souris ne se fixe pas sur les membranes à pH 7.

b - La lactotransferrine humaine

La fixation de la lactotransferrine humaine à pH 7 sur les membranes n'est pas inhibée par la BSA ni par les transferrines de souris. La lactotransferrine de souris n'inhibe pas non plus la fixation de la lactotransferrine humaine : l'inhibition par ces différentes protéines 50 fois en excès molaire par rapport à la lactotransferrine humaine marquée est inférieure à 10%.

La fixation de la lactotransferrine humaine est réversible puisque nous obtenons 42% d'inhibition avec de la lactotransferrine humaine froide 50 fois en excès molaire. La lactotransferrine bovine inhibe également la fixation de la lactotransferrine humaine : le pourcentage d'inhibition est de 60% dans les mêmes conditions.

Cependant, une part importante de la lactotransferrine humaine n'est pas déplacée par l'addition de lactotransferrine froide.

C - CONCLUSION

A pH 4,5 les lactotransferrines humaine et murine se fixent sur les membranes solubilisées du macrophage. Cette fixation est inhibée de la même façon par les lactotransferrines de souris, de vache et humaine.

La fixation à pH acide semble se faire par l'intermédiaire de la partie protéique de la lactotransferrine. Elle peut être due à l'existence d'un récepteur spécifique, HU et al.(1987) trouvent un pH optimum de fixation de la lactotransferrine de souris sur les vésicules de microvillosités intestinales en système homologue compris entre 5 et 5,5. Cette fixation peut également être non spécifique du fait du caractère extrêmement basique de la protéine.

La lactotransferrine de souris, qui ne possède pas de sites de fixation de haute affinité sur le macrophage péritonéal en culture, ne se fixe pas, dans notre système d'étude, à pH physiologique sur la fraction membranaire solubilisée. Par contre, la lactotransferrine humaine se fixe spécifiquement à pH 7.

Le degré de saturation en fer de la lactotransferrine humaine se semble pas influencer sur l'interaction de la protéine avec les membranes du macrophage.

L'ensemble des résultats obtenus jusqu'à présent tend à montrer que la lactotransferrine humaine est reconnue par un récepteur de type lectinique reconnaissant le fucose mais aussi le mannose puisque la lactotransferrine de vache inhibe la fixation de la lactotransferrine humaine sur les membranes du macrophage. Le récepteur à mannose/fucose /N-acétylglucosamine présent à la surface des cellules du système phagocytaire mononucléé pourrait être responsable de la fixation de la lactotransferrine humaine.

Le récepteur serait spécifique du fucose lié en $\alpha(1,3)$ et ne reconnaîtrait pas le fucose lié en $\alpha(1,6)$.

La suite de notre travail consistera à isoler ce récepteur et à vérifier sa spécificité de reconnaissance.

III - ISOLEMENT ET PROPRIETES DU RECEPTEUR LECTINIQUE DU MACROPHAGE PERITONEAL DE SOURIS

Le récepteur lectinique du macrophage péritonéal de souris a été isolé par chromatographie d'affinité sur colonne de lactotransferrine humaine couplée sur Sépharose 4B.

A - MATERIELS ET METHODES

1 - Couplage de la lactotransferrine humaine au Sepharose 4B

La lactotransferrine humaine est couplée au Sépharose 4B (Pharmacia) selon la méthode de CUATRECASAS et al. (1968) et MARCH et al. (1974).

a - Activation du Sépharose 4B par le bromure de cyanogène

100 ml de Sépharose 4B sont lavés sur un filtre en verre fritté par de grands volumes d'eau distillée froide. Le gel séché est transvasé dans un bécher contenant 100 ml de K_2CO_3 2 M pH 11,8 placé dans la glace. Le gel est activé par addition de 4 ml de BrCN dans l'acétonitrile (0,25 g de BrCN dans 1 ml d'acétonitrile) et agitation douce pendant 2 mn. Le gel activé est ensuite transvasé dans un filtre en verre fritté, lavé abondamment par de l'eau à 4°C et séché.

b - Couplage de la lactotransferrine humaine

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

Le gel est ensuite transvasé dans un filtre en verre fritté et lavé par 500 ml de $NaHCO_3$ pour éliminer l'excès de protéine non couplée. Un dosage de protéine (LOWRY et al., 1951) est réalisé sur le premier filtrat afin de déterminer le rendement de couplage. Le gel est resuspendu dans 50 ml d'éthanolamine 1 M et agité 2 heures à 20°C.

Le gel est ensuite successivement lavé par 500 ml d'eau, 500 ml d'acétate de sodium 0,1 M, $NaCl$ 1 M pH 4,5, 500 ml de Na_2HPO_4 0,1 M, $NaCl$ 1 M pH 8,2 et par 500 ml de PBS.

2 - Chromatographie d'affinité

La fraction membranaire solubilisée par du Triton-X 100 à une concentration finale de 1% est diluée 10 fois par un tampon MOPS 25 mM, NaCl 0,25 M, CaCl₂ 5 mM pH 7. La dilution de la concentration en Triton-X 100 a pour but de faciliter l'interaction récepteur-ligand.

Toutes les études ont été faites en partant d'environ 60 à 80 x 10⁶ cellules.

Après dilution, la fraction membranaire (de 4 à 8 ml) est additionnée de 2 ml de lactotransferrine humaine couplée au Sépharose 4B. Le mélange est laissé sous agitation mécanique douce à 4°C pendant 2 heures. Toutes ces opérations s'effectuent en présence d'inhibiteurs de protéases (voir p.115).

La suspension est ensuite transvasée dans une colonne de type HR 5/5 (Pharmacia). La colonne est rincée par le tampon suivant : MOPS 25 mM, NaCl 0,25 M, CaCl₂ 5 mM, Triton-X 100 0,1% pH 7.

L'élution se fait par un gradient de force ionique en NaCl.

La fraction contenant le récepteur est déposée sur membrane de nitrocellulose (10 x 10 mm).

3 - Incubation du récepteur avec la lactotransferrine humaine

a - Influence du pH et cinétique de fixation

L'interaction de la lactotransferrine humaine avec le récepteur en fonction du pH a été déterminée de la même façon que la fixation sur les membranes (p.116).

Une cinétique de fixation de la lactotransferrine humaine a été réalisée à pH 7 dans les mêmes conditions opératoires.

b - Influence du calcium

L'influence du calcium sur la fixation de la lactotransferrine humaine a été mesurée en faisant l'incubation avec des quantités croissantes en CaCl₂ (de 0 à 10 mM). La fixation témoin sans CaCl₂ a été faite en présence d'EDTA 5 mM.

La concentration en lactotransferrine humaine est de 2 µg/ml.

c - Réversibilité de la fixation

La lactotransferrine humaine marquée à 1¹²⁵I est incubée à pH 7 à une concentration de 2 µg/ml pendant 2 heures avec le récepteur

immobilisé sur feuille de nitrocellulose .

De la lactotransferrine humaine non marquée est alors ajoutée en quantité croissante (de 0 à 100 µg/ml). Après 2 heures d'incubation et trois lavages de 1mn, la radioactivité associée au récepteur est mesurée au compteur gamma.

d - Affinité du récepteur pour la lactotransferrine humaine

Le récepteur est incubé avec des concentrations croissantes en lactotransferrine humaine marquée. Les résultats sont exprimés selon la représentation de Scatchard. La fixation non spécifique est déterminée en ajoutant de la lactotransferrine humaine froide 100 fois en excès molaire.

4 - Analyses électrophorétiques

a - Préparation des échantillons

Les membranes sont solubilisées par ultrason dans le tampon Tris, glycolle pH 6,8 SDS 1% contenant des inhibiteurs de protéases. Les échantillons sont centrifugés 10 mn à 100 000 g (airfuge Beckman) avant leur dépôt en électrophorèse.

b - Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Les électrophorèses en gradient de gel de polyacrylamide ont été réalisées dans un appareil d'électrophorèse vertical en plaques (1,5 x 140 x 180 mm) de marque Biorad, dans le système tampon préconisé par LAEMLI (1970).

Le gel de séparation est constitué d'un gradient en acrylamide de 5 à 15% dans un tampon Tris, glycolle de pH 8,6. Le gel de concentration est à 5% en acrylamide dans un tampon Tris, glycolle de pH 6,8.

Le tampon et les gels renferment 0,1% de SDS. L'électrophorèse est réalisée à 150 V et est arrêtée quand le témoin de migration se trouve à 1 cm du bas de la plaque.

c - Electrotransfert sur nitrocellulose

Les échantillons séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS sont transférés par électrophorèse (cellule de transfert Biorad), pendant 6 heures à 150 mA à 4°C, sur membrane de nitrocellulose de la taille du gel, selon la technique

décrite par TOWBIN et al. (1979).

d - Révélation

Après électrotransfert, la membrane de nitrocellulose est lavée par un tampon MOPS 25 mM, NaCl 0,25 M, CaCl₂ 5 mM, Triton-X 100 0,1% pH 7 puis incubée pendant 2 heures dans le même tampon en présence de lactotransferrine humaine marquée à l'¹²⁵I à une concentration de 1 µg/ml.

Après plusieurs lavages, la membrane de nitrocellulose est révélée par autoradiographie sur film X-Omat AR (Kodak).

B - RESULTATS

1 - Isolement du récepteur

La technique de chromatographie d'affinité utilisée augmente sensiblement les rendements par rapport à la chromatographie d'affinité sur colonne.

Le profil d'éluion obtenu est représenté dans la figure 30 p.126.

Une fraction très importante des protéines retenues sur la colonne est éluee à une concentration en NaCl de 0,5 M.

La fraction contenant le récepteur est éluee par le tampon contenant du NaCl 1 M.

Cette fraction très enrichie n'a pas été purifiée davantage, le but de notre travail étant principalement d'étudier la spécificité de reconnaissance de la lactotransferrine humaine par ce récepteur.

2 - Etude des principales propriétés du récepteur

a - Masse moléculaire

La figure 31 p.127 montre qu'après électrophorèse des membranes de macrophage et incubation avec de la lactotransferrine humaine marquée, une bande est révélée par autoradiographie. La protéine membranaire ainsi révélée possède une masse moléculaire de 160 000. Plusieurs protéines de plus faibles masses moléculaires (90 000, 60 000 et 55 000 kDa) sont aussi révélées. Cependant, ces protéines fixent également la lactotransferrine humaine quand l'incubation est faite en

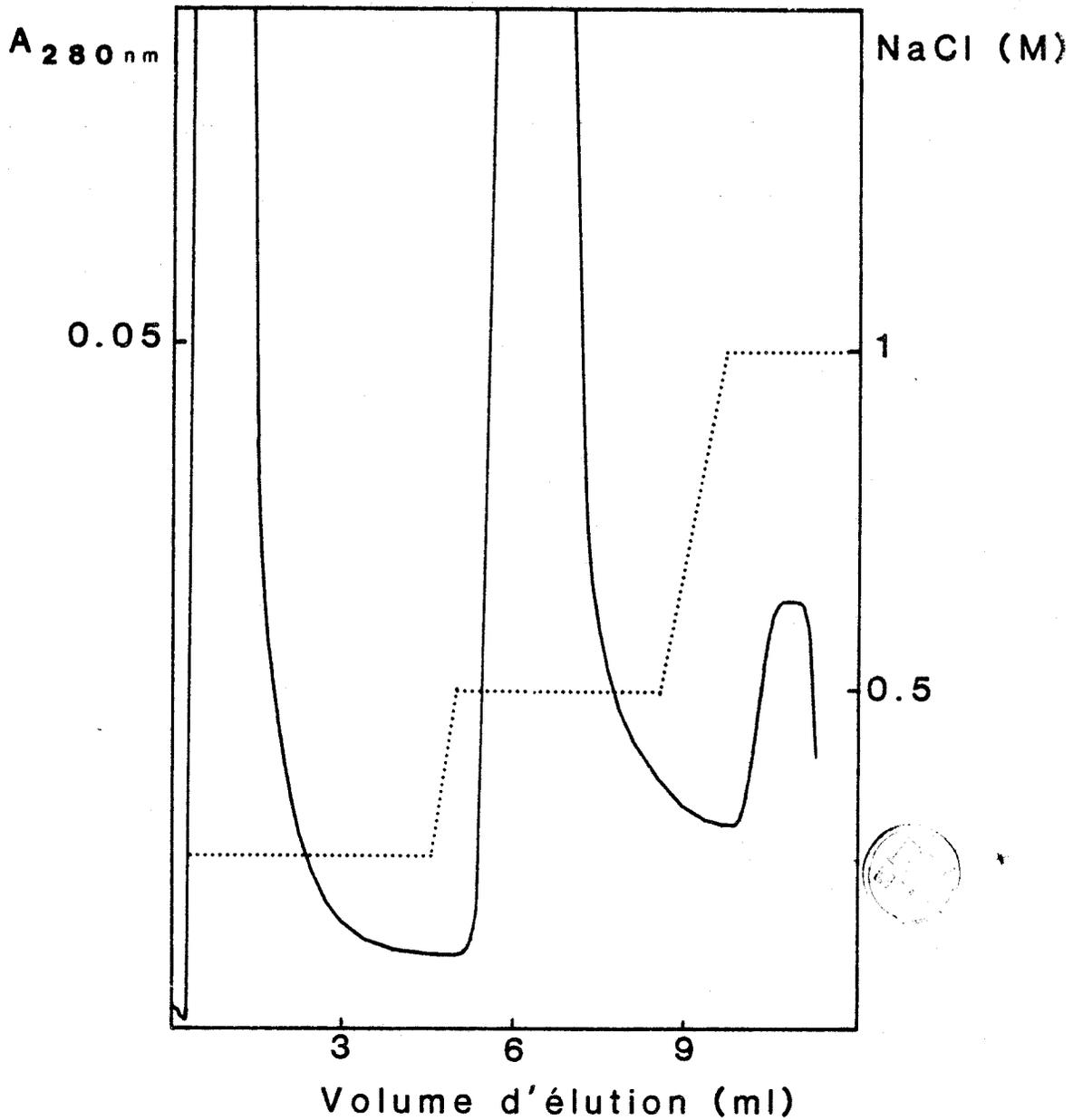


Figure 30 : Profil d'élution de la chromatographie d'affinité sur colonne de lactotransferrine humaine immobilisée sur Sépharose 4B de la fraction membranaire solubilisée du macrophage

1 2

← 160 000
← 90 000
← 60 000
← 55 000



Figure 31 : Electrotransfert sur nitrocellulose après électrophorèse en gel de polyacrylamide de la fraction membranaire du macrophage

1 : témoins de masse moléculaire

2 : incubation avec la lactotransferrine humaine marquée à $1,^{125}\text{I}$ en présence de Triton-X 100

présence de SDS 1%. Seule la protéine de 160 000 kDa semble fixer spécifiquement la lactotransferrine humaine. La lactotransferrine de souris ne se fixe que sur les protéines de 60 000 et 55 000 kDa.

b - Fixation de la lactotransferrine humaine en fonction du pH

La fixation maximale a lieu entre pH 7 et 8 (Fig.32 p.129). Elle est pratiquement nulle en dessous de pH 6,5 alors qu'elle subsiste encore à pH 8. La fixation de la lactotransferrine humaine à pH acide observée avec les membranes solubilisées n'existe plus lorsque le récepteur est purifié. Ce récepteur ne fixe pas la lactotransferrine de souris ni les sérotransferrines isolées du lait ou du sang de souris.

c - Cinétique de fixation de la lactotransferrine humaine

L'étude a été faite afin de déterminer le temps nécessaire d'incubation du récepteur avec la lactotransferrine humaine pour avoir une fixation maximale.

La figure 33 p.130 indique que la fixation est presque linéaire en fonction du temps jusqu'à 45 mn d'incubation puis s'infléchit fortement pour atteindre un plateau après 1 h 30 d'incubation.

Dans toutes nos expériences, le temps d'incubation est de 2 h.

d - Réversibilité de la fixation de la lactotransferrine humaine

Une caractéristique essentielle de la fixation d'un ligand sur un récepteur est la réversibilité. La fixation de la lactotransferrine humaine sur le récepteur est réversible (Fig.34 p.130) : 50% de la lactotransferrine humaine marquée est déplacée par de la lactotransferrine humaine froide lorsque celle-ci est ajoutée 25 fois en excès molaire.

e - Affinité du récepteur pour la lactotransferrine humaine

L'affinité du récepteur à mannose/fucose a toujours été mesurée pour des néoglycoprotéines à fucose ou à mannose. SHEPHERD et al. (1981) ont trouvé une constante d'affinité pour la α - L-Fuc-BSA de $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$.

La figure 35 p.131 montre que la fixation de la lactotransferrine humaine sur le récepteur est saturable. Le plateau est atteint pour des concentrations en lactotransferrine de l'ordre de 6 $\mu\text{g/ml}$ (0,08 μM).

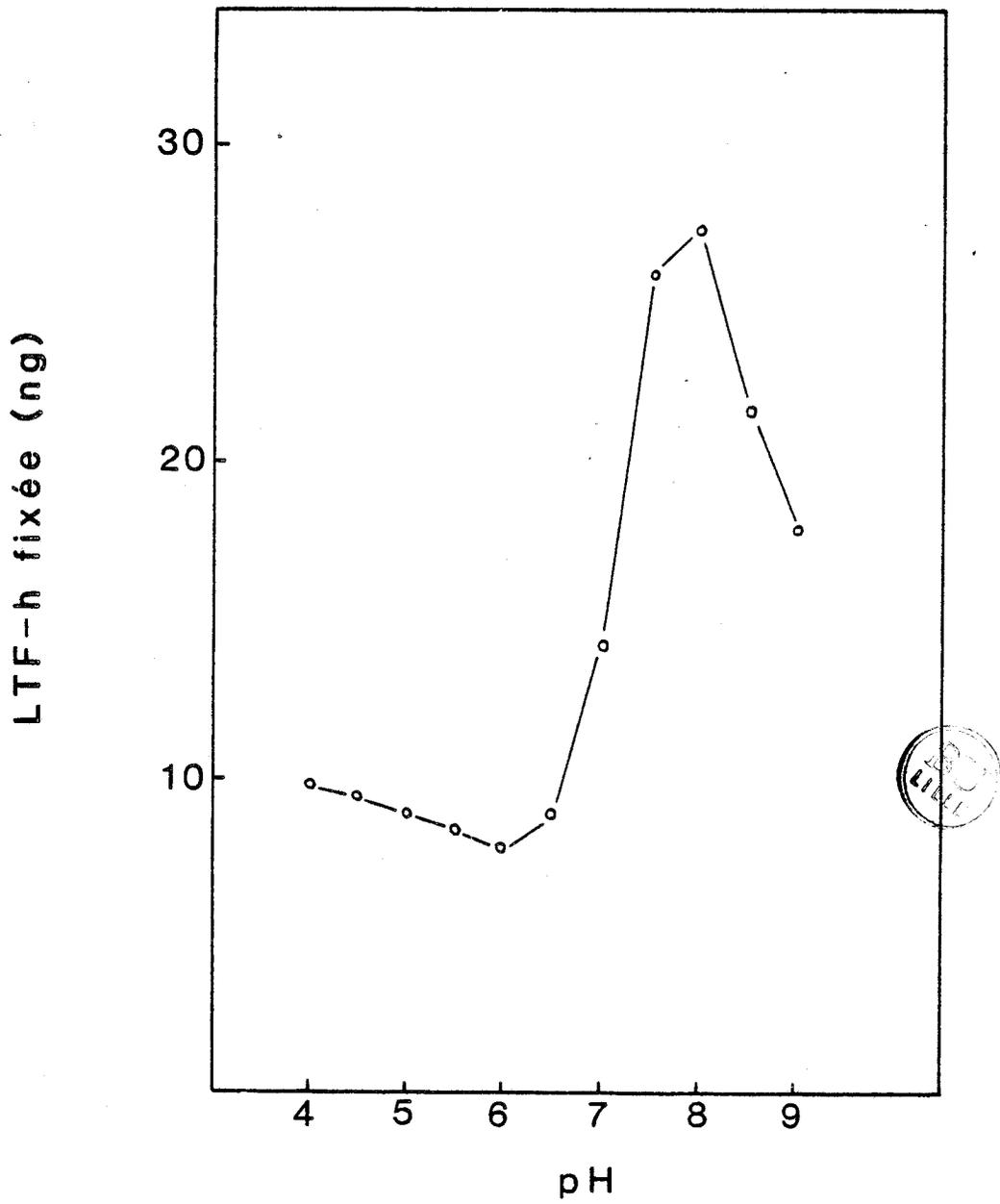


Figure 32 : Fixation de la lactotransferrine humaine sur le récepteur en fonction du pH

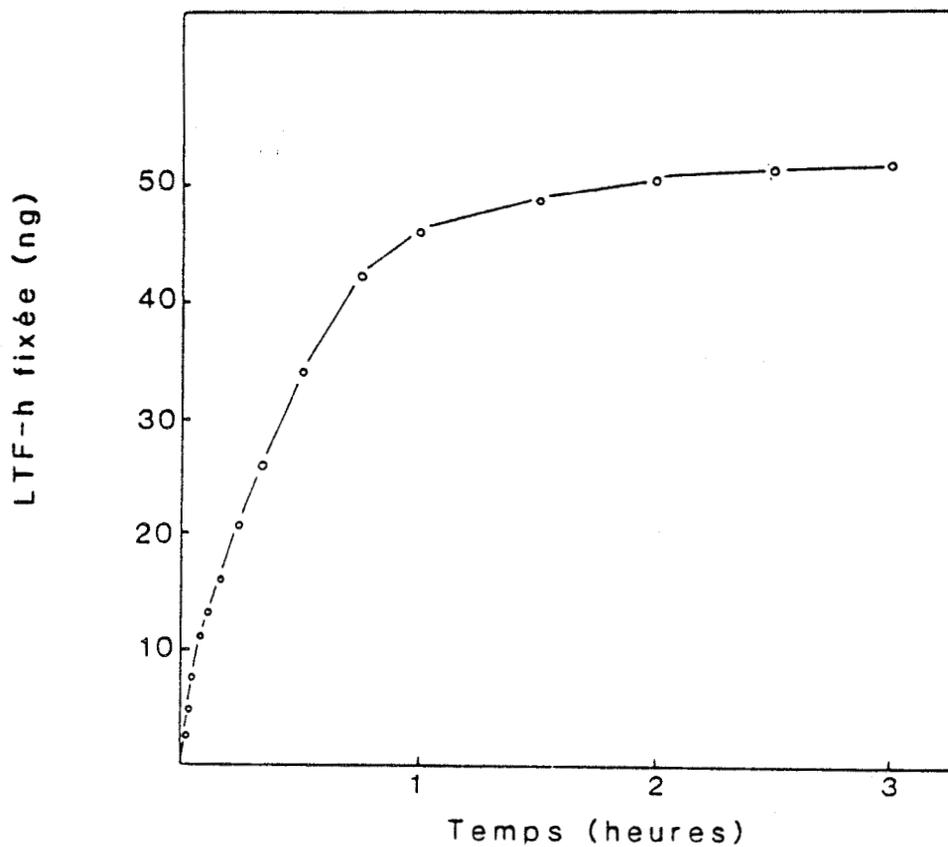


Figure 33 : Cinétique de fixation de la lactotransferrine humaine sur le récepteur lectinique

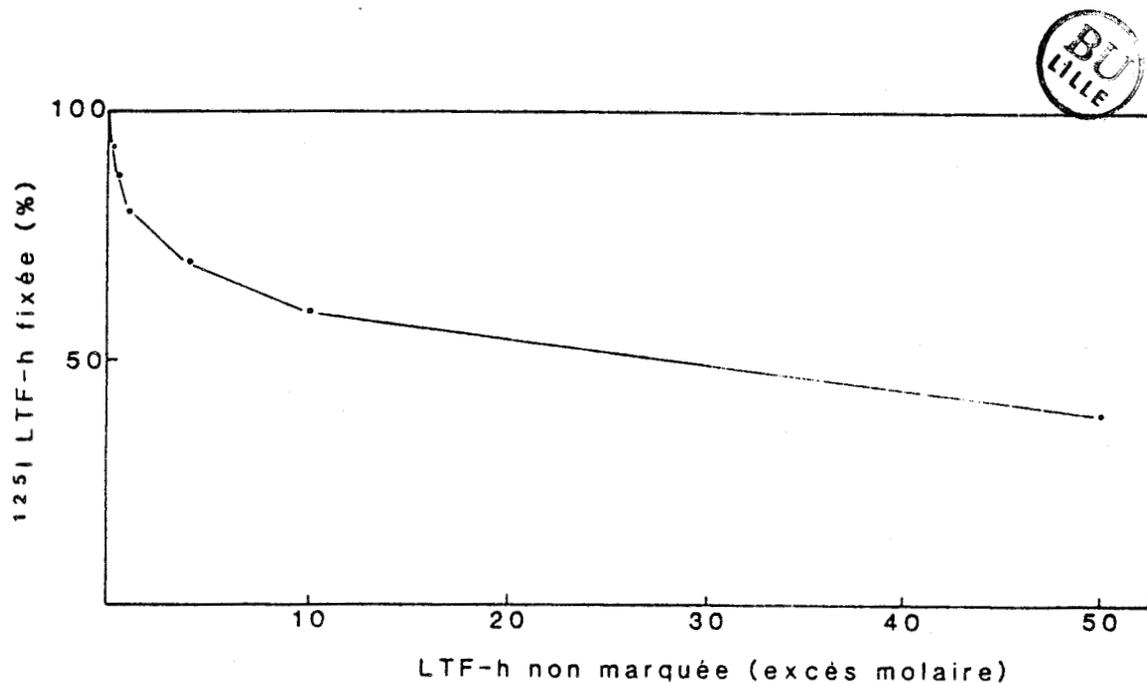


Figure 34 : Réversibilité de la fixation de la lactotransferrine humaine sur le récepteur lectinique

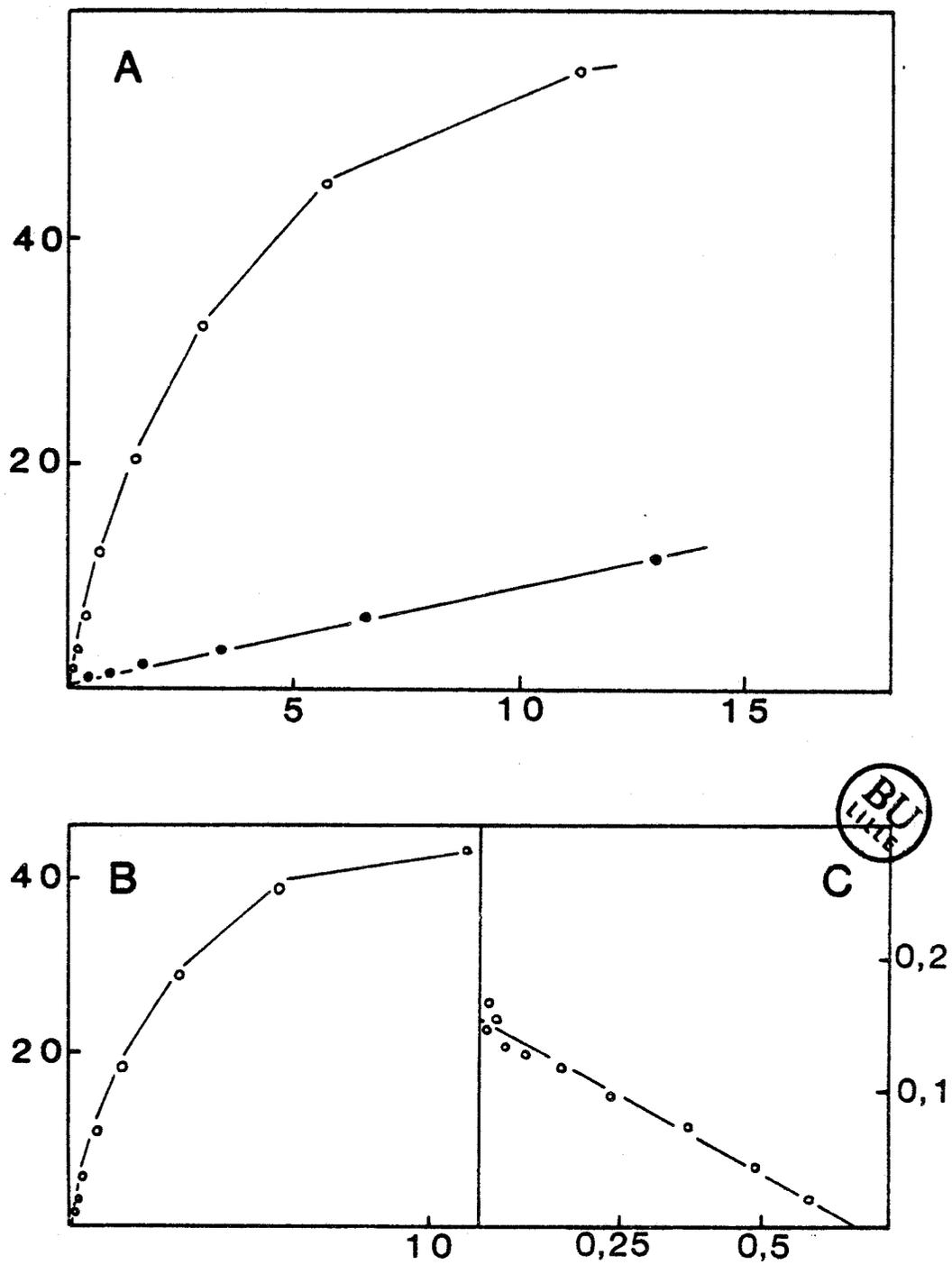


Figure 35 : Fixation de la lactotransferrine humaine sur le récepteur

A : courbe de saturation (O : fixation totale; ● : fixation non spécifique)

B : courbe de saturation (O : fixation spécifique)

C : représentation de Scatchard

La représentation de Scatchard donne une constante d'association de $2,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. La constante est similaire à celle obtenue par SHEPHERD et al.

f - Effet du calcium sur la fixation de la lactotransferrine humaine

La figure 36 p.133 montre que la fixation de la lactotransferrine humaine sur le récepteur est calcium dépendante. La fixation est maximale avec des concentrations en CaCl_2 supérieures à 1 mM.

Dans toutes nos expériences, la concentration en CaCl_2 était de 5 mM.

C - CONCLUSION

Nous avons isolé, par chromatographie d'affinité, le récepteur membranaire responsable de la fixation de la lactotransferrine humaine sur le macrophage péritonéal de souris. Ce récepteur, calcium dépendant, possède un maximum de fixation à pH 7 et une constante d'affinité pour la lactotransferrine humaine de $2,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$.

La masse moléculaire de ce récepteur semble être de 160 000. La spécificité de reconnaissance de la lactotransferrine humaine par le récepteur lectinique ainsi isolé sera déterminée en étudiant la fixation de différentes glycoprotéines.

IV - SPECIFICITE DE RECONNAISSANCE DU RECEPTUR LECTINIQUE

A - MATERIELS ET METHODES

1 - Les glycoprotéines

a - Les transferrines

Les techniques d'isolement des lactotransferrines utilisées sont décrites dans le chapitre I des résultats : lactotransferrines humaines isolées du lait (p.67) et des leucocytes (p.68),

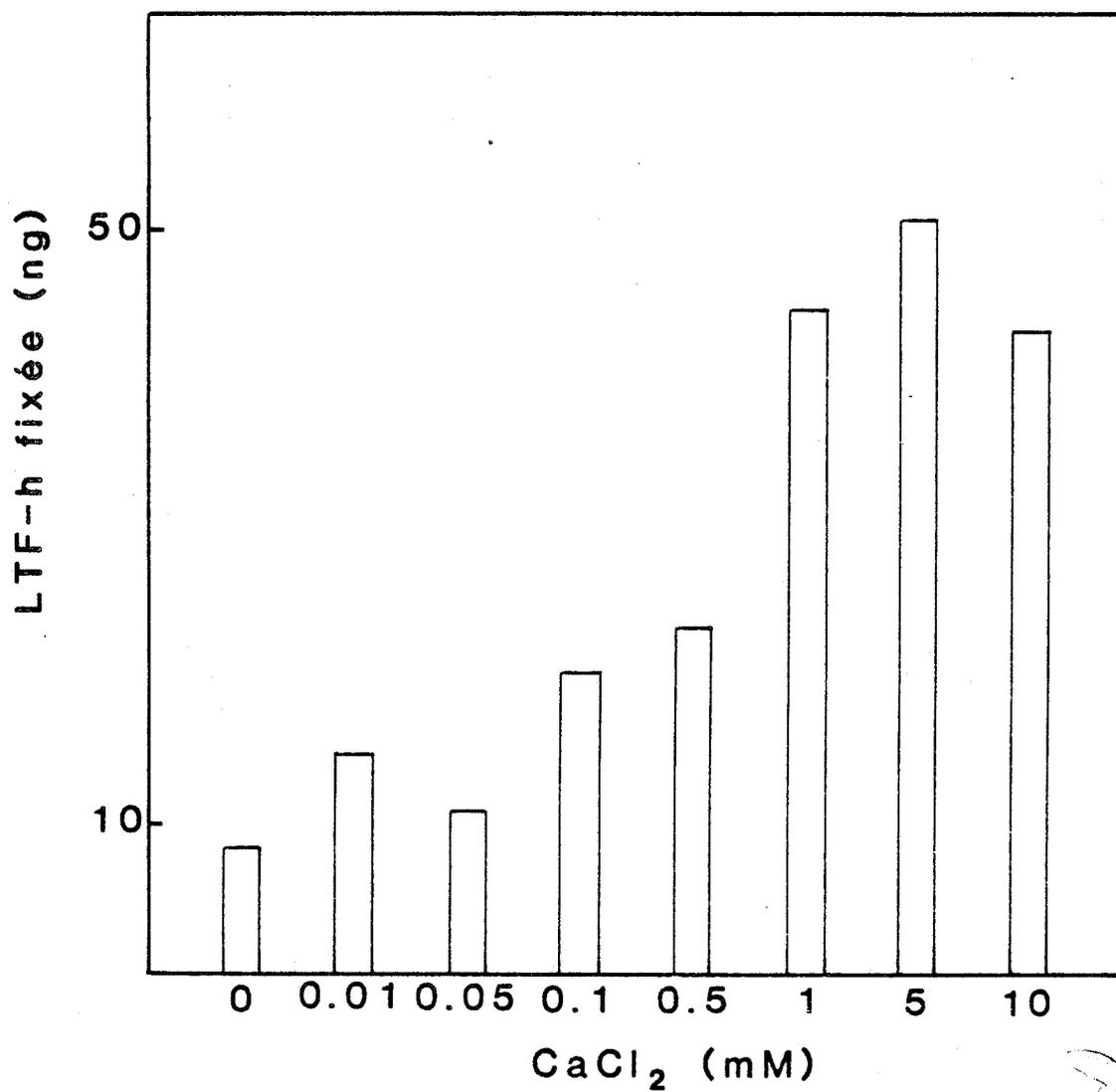


Figure 36 : Fixation de la lactotransferrine humaine sur le récepteur en fonction de la concentration en calcium

lactotransferrine de souris (p.70) et lactotransferrine de vache (p.70).

Les lactotransferrines humaines partiellement déglycosylées ont été obtenues par hydrolyse enzymatique selon le protocole décrit p.81. Leurs compositions en monosaccharides sont données dans le tableau II p.82.

Les transferrines du sang et du lait de souris sont préparées suivant le protocole décrit p.88.

b - Les néoglycoprotéines

Les néoglycoprotéines résultent du couplage de résidus de phénylisothiocyanate glycosides sur de la sérum albumine bovine (BSA) (MONSIGNY et al., 1984)*.

Les néoglycoprotéines utilisées sont les suivantes :

- α -L-Fucose-BSA renfermant 20 résidus de fucose par molécule de BSA
- α -D-Mannose-BSA renfermant 28 résidus de mannose par molécule de BSA (SIGMA)
- α -D-Galactose-BSA renfermant 17 résidus de galactose par molécule de BSA

La néoglycoprotéine suivante est obtenue par couplage au $\text{Na}_2\text{BH}_4\text{CN}$, d'oligosaccharides isolés du lait humain sur de la sérum albumine bovine :

Fuc α (1,2)Gal β (1,3)GlcNAc β (1,3)Gal β (1,4)Glc-BSA renfermant 23 résidus de ce pentasaccharide par molécule de BSA * *.

c - Autres glycoprotéines

L'orosomucoïde et l'ovalbumine (firme Sigma) ont également été utilisées.

2 - Expériences d'inhibition

La spécificité de la fixation de la lactotransferrine humaine sur

* : Nous remercions Monsieur le Professeur M. MONSIGNY pour la Fuc-BSA et le Gal-BSA qu'il nous a aimablement fournis.

* * : la néoglycoprotéine nous a été donnée par Monsieur le Docteur G. STRECKER que nous remercions.

le récepteur a été déterminée par des inhibitions de fixation utilisant différentes glycoprotéines comme inhibiteurs.

Les expériences d'inhibition ont été faites dans les conditions optimales de fixation de la lactotransferrine humaine sur le récepteur : le récepteur déposé sur membrane de nitrocellulose est incubé 2 h à température ambiante en présence de lactotransferrine humaine marquée à $1,^{125}\text{I}$ (2 $\mu\text{g/ml}$) et d'inhibiteur non marqué en concentration croissante (de 0 à 100 fois excès molaire) dans un tampon MOPS 25 mM, NaCl 0,25 M, CaCl_2 5 mM, Triton-X 100 0,1% pH 7.

Les membranes de nitrocellulose sont lavées trois fois 1 mn et la radioactivité est mesurée au compteur gamma.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport à la fixation de la lactotransferrine humaine sans inhibiteur.

B - RESULTATS

1 - Inhibition par les néoglycoprotéines

Afin de déterminer la nature des sucres responsables de la fixation des glycoprotéines sur le récepteur lectinique, des expériences d'inhibition utilisant des néoglycoprotéines ont été réalisées.

La figure 37 p. 136 montre que seules les néoglycoprotéines à mannose et à fucose inhibent la fixation de la lactotransferrine humaine sur le récepteur. Le α -D-Gal-BSA est sans effet inhibiteur. La néoglycoprotéine contenant des pentasaccharides avec du fucose lié en $\alpha(1,2)$ n'est pas reconnu. D'après ces résultats le récepteur serait spécifique du fucose lié en $\alpha(1,3)$. Nous n'avons pas, cependant, regardé si le récepteur reconnaissait le fucose lié en $\alpha(1,4)$.

Des concentrations en α -D-Man-BSA et en α -L-Fuc-BSA de 1,4 μM sont nécessaires pour obtenir 50% d'inhibition de la fixation de la lactotransferrine humaine.

2 - Inhibition par les sérotransferrines de souris

L'absence d'effet inhibiteur des sérotransferrines isolées du lait et du sang de souris a été vérifiée. La figure 38 p.136 montre que les

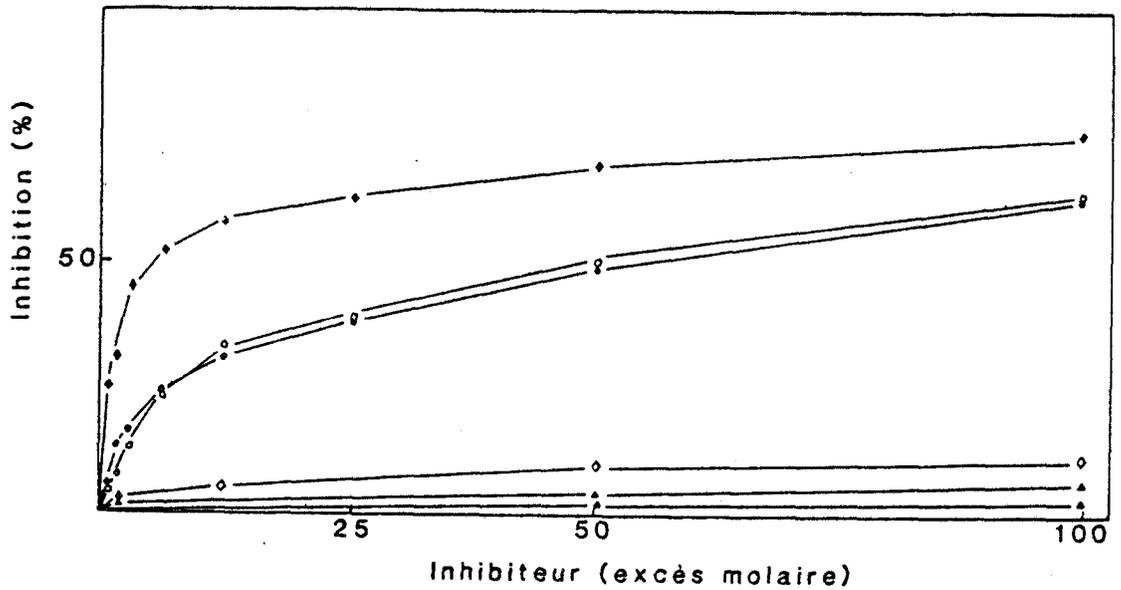


Figure 37 : Inhibition de la fixation de la lactotransferrine humaine sur le récepteur lectinique par différentes néoglycoprotéines :

α -D-Man-BSA (\circ), α -L-Fuc-BSA (\bullet), α -D-Gal-BSA (\blacktriangle), Fuc α (1,2)-X-BSA (Δ)

Les inhibitions par la lactotransferrine humaine (\blacklozenge) et par la BSA (\circ) servent de références

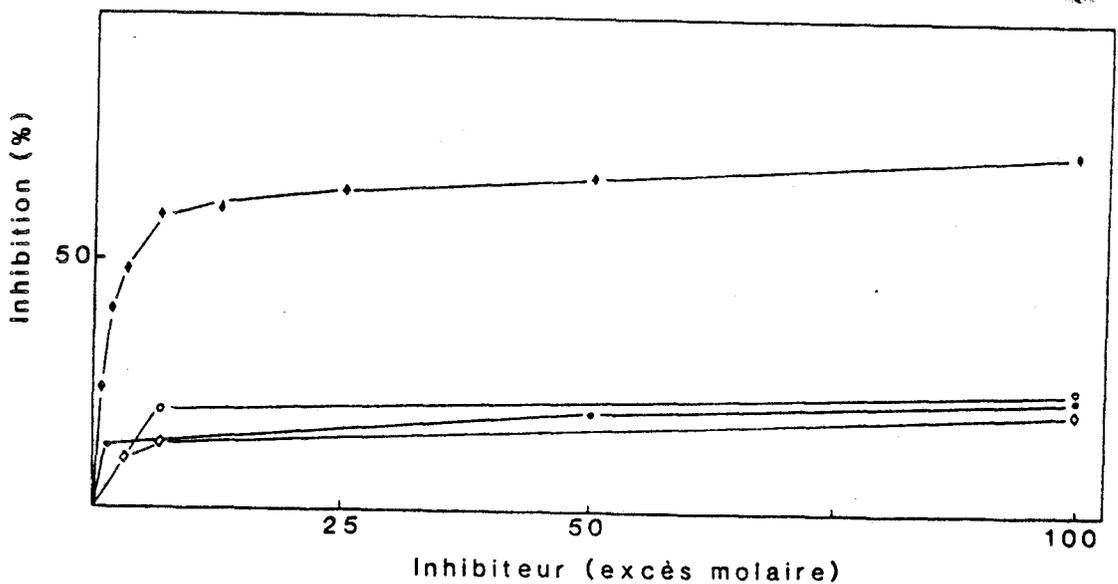


Figure 38 : Inhibition de la fixation de la lactotransferrine humaine sur le récepteur lectinique par les transferrines de souris isolées du lait (\bullet) et du sang (\circ)

Les inhibitions par la lactotransferrine humaine (\blacklozenge) et par la BSA (\circ) servent de références

taux d'inhibition sont pratiquement identiques à celui de la BSA servant de référence. L'inhibition ne dépasse pas 20% lorsque les transferrines isolées du sang et du lait de souris sont ajoutées 100 fois en excès molaire par rapport à la lactotransferrine humaine marquée. Le récepteur lectinique ne reconnaît pas le fucose lié en α (1,6) sur la N-acétylglucosamine du point d'attache.

3 - Inhibition par les lactotransferrines

a - Inhibition par les lactotransferrines du lait

Les résultats représentés figure 39 p.138 sont similaires à ceux obtenus lors de l'inhibition de la fixation de la lactotransferrine humaine sur la fraction membranaire au même pH.

Seules les lactotransferrines humaine et bovine sont des inhibiteurs. Les concentrations nécessaires à l'obtention de 50% d'inhibition sont respectivement de 0,14 μ M (5,7 fois en excès molaire) pour la lactotransferrine humaine et 0,33 μ M (13 fois en excès molaire) pour la lactotransferrine bovine.

La lactotransferrine de souris n'inhibe pas plus la fixation de la lactotransferrine humaine sur le récepteur que la BSA : l'inhibition n'est que de 8 à 10% lorsque ces protéines sont ajoutées 100 fois en excès molaire.

L'inhibition de la fixation de la lactotransferrine humaine par la BSA a été choisies, par la suite, comme témoin d'inhibition non spécifique.

b - Inhibition par la lactotransferrine isolée de leucocytes humains

Il nous a semblé intéressant de regarder si le récepteur lectinique fixait la lactotransferrine isolée de leucocytes humains. En effet, celle-ci possède des structures glycaniques différentes de celles de la lactotransferrine isolée du lait humain et en particulier, ne renferme pas de résidus de fucose liés en α (1,3) (DERISBOURG, 1987; DERISBOURG et al, 1987).

Les résultats exprimés dans la figure 40 p.138 montre que la lactotransferrine humaine isolée de leucocytes n'inhibe pas la fixation de la lactotransferrine du lait humain sur le récepteur.

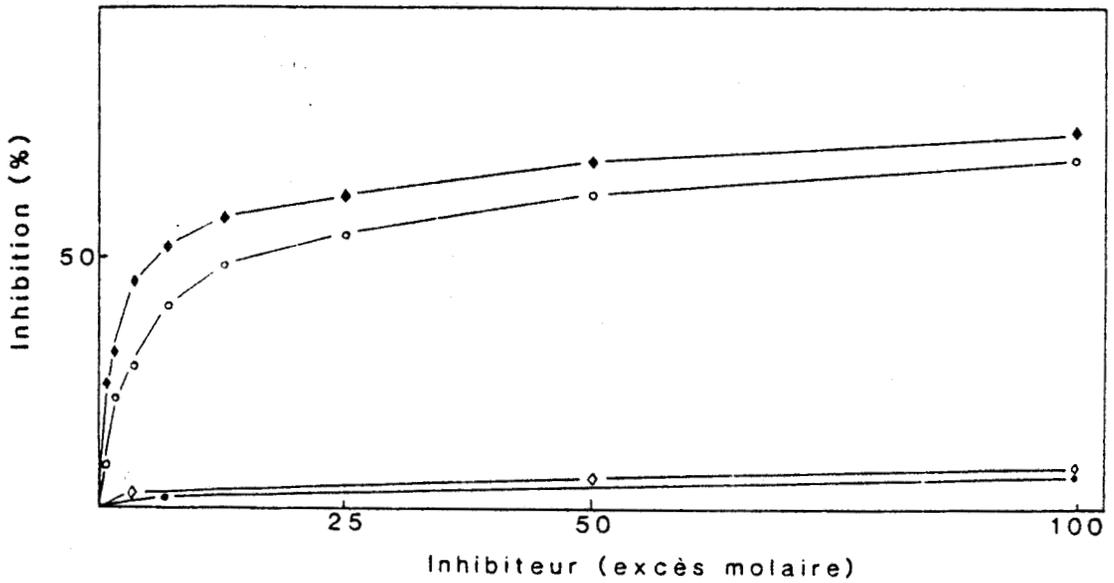


Figure 39 : Inhibition de la fixation de la lactotransferrine humaine sur le récepteur lectinique par les lactotransferrines humaine (◆), bovine (○) et de souris (●)

L'inhibition par la BSA (◇) sert de référence

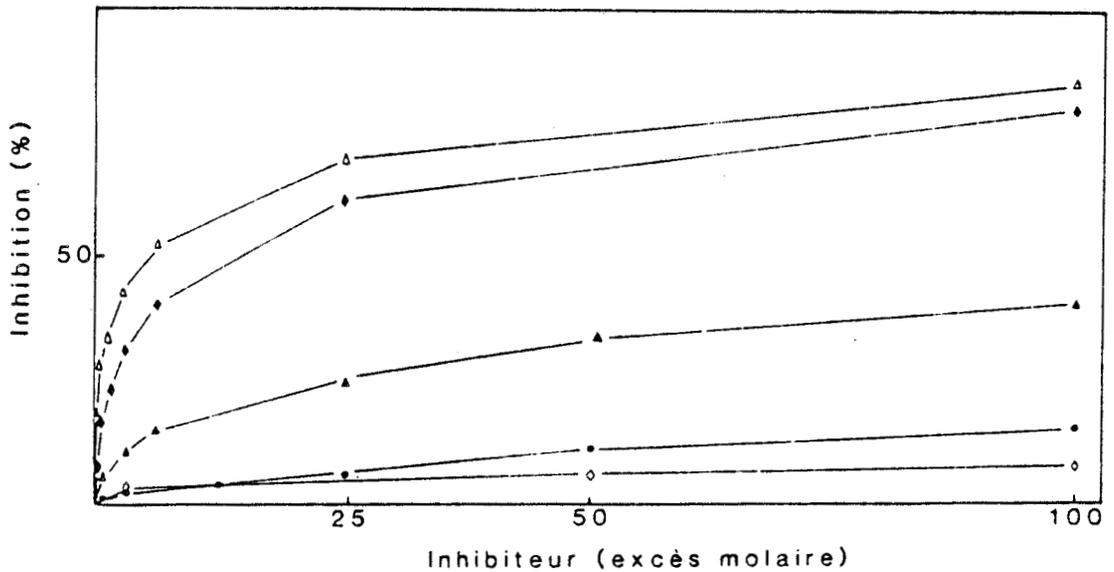


Figure 40 : Inhibition de la fixation de la lactotransferrine humaine sur le récepteur lectinique par les lactotransferrines humaines isolées du lait (◆) et des leucocytes (●), par l'ovalbumine (Δ) et par l'orosomucoïde (▲)

L'inhibition par la BSA (◇) sert de référence

c - Inhibition par la lactotransferrine humaine défucosylée

Pour vérifier que la reconnaissance de la lactotransferrine humaine par le récepteur se faisait par l'intermédiaire des résidus de fucose $\alpha(1,3)$, nous avons comparé les effets inhibiteurs de la lactotransferrine humaine et de la lactotransferrine humaine partiellement défucosylée.

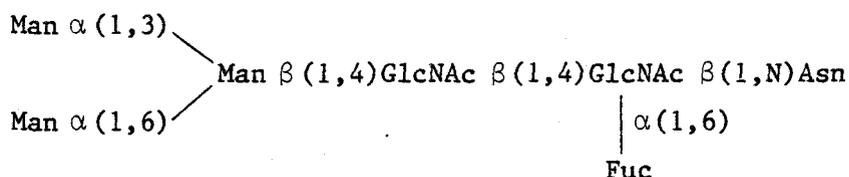
La figure 41 p.140 représente les courbes d'inhibition obtenues par l'utilisation de lactotransferrines humaines partiellement déglycosylées (tableau II p.82).

La lactotransferrine humaine correspondant à 15 mn d'incubation (échantillon n°2, 77% de fucose résiduel) avec la fucosidase inhibe beaucoup moins la fixation que la lactotransferrine humaine "native". L'inhibition n'est, en effet, que de 45% lorsqu'elle est ajoutée 100 fois en excès molaire contre 75% pour la lactotransferrine non défucosylée et 24% pour la BSA représentant l'inhibition non spécifique.

Le pourcentage d'inhibition par la lactotransferrine totalement défucosylée en $\alpha(1,3)$ 100 fois en excès molaire (échantillon n°3, 30 mn d'incubation, 70% de fucose résiduel uniquement lié en $\alpha(1,6)$) est de 33%. L'inhibition est supérieure de 9% à celle de la BSA, certainement à cause de l'apparition de résidus de N-acétylglucosamine ou de mannose en position terminale non réductrice (tableau III p.85).

L'inhibition de la fixation de la lactotransferrine humaine sur le récepteur diminue avec le pourcentage de fucose résiduel de la lactotransferrine partiellement défucosylée.

Dans un deuxième temps, après 24 heures d'incubation avec la fucosidase, la lactotransferrine (échantillon n°8, 66% de fucose résiduel) inhibe de la même façon que la lactotransferrine "native". La lactotransferrine correspondant à ce temps d'incubation possède des résidus de mannose en position terminale réductrice : les rapports molaires en oligosaccharides (tableau II p.82) des glycanes résiduels de cette lactotransferrine correspondent au "core" pentasaccharidique fucosylé en $\alpha(1,6)$ sur la N-acétylglucosamine 1. La structure glycanique suivante semble être reconnue par le récepteur lectinique:



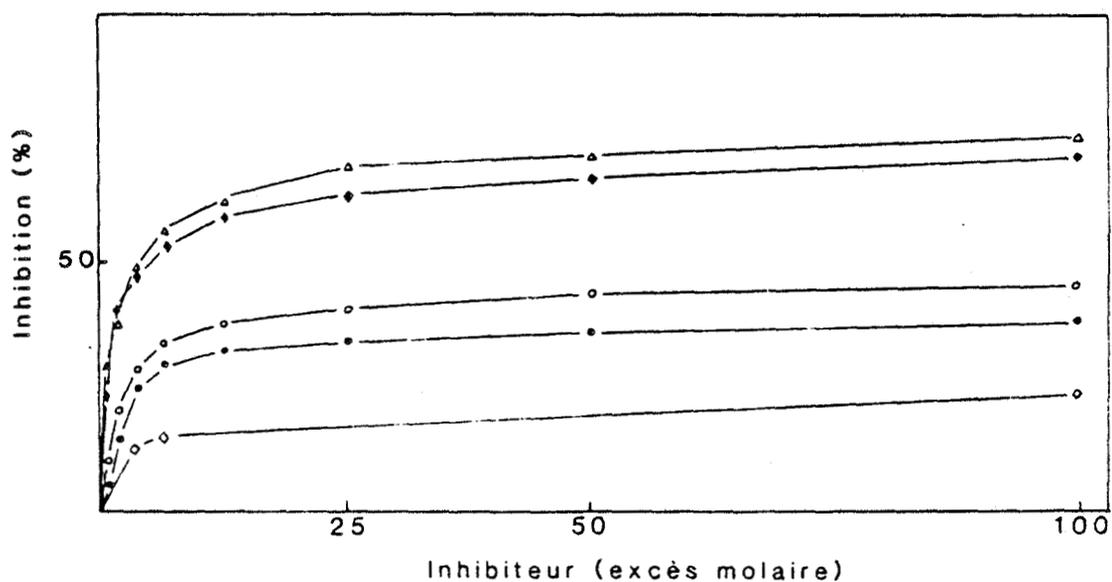


Figure 41 : Inhibition de la fixation de la lactotransferrine humaine sur le récepteur lectinique par la lactotransferrine humaine partiellement défucostlée :

- (◆) : échantillon n°1 (temps 0, 100% de fucose)
- (○) : échantillon n°2 (15 mn d'incubation, 77% de fucose résiduel)
- (●) : échantillon n°3 (30 mn d'incubation, 70% de fucose résiduel)
- (△) : échantillon n°8 (24 h d'incubation, 66% de fucose résiduel)

L'inhibition par la BSA (◇) sert de référence

4 - Inhibition par l'orosomucoïde et l'ovalbumine

L'orosomucoïde, glycoprotéine possédant du fucose lié en $\alpha(1,3)$ (FOURNET et al., 1978; SCHMID et al., 1979), inhibe légèrement la fixation de la lactotransferrine humaine sur le récepteur (Fig.40 p. 138).

A 100 excès molaire (400 $\mu\text{g/ml}$), l'orosomucoïde inhibe de 40%. L'inhibition non spécifique de la BSA est de 10%.

En revanche, une glycoprotéine riche en mannose, l'ovalbumine (YAMASHITA et al., 1984), se fixe sur le récepteur et provoque 50% d'inhibition à des concentrations très faibles (5 excès molaire) (Fig. 40 p.138).

C - CONCLUSION

Le récepteur lectinique, isolé par chromatographie d'affinité sur colonne de lactotransferrine humaine, reconnaît les glycoprotéines possédant du fucose lié en $\alpha(1,3)$ ou du mannose en position terminale non réductrice.

D'après les caractéristiques et la spécificité de reconnaissance, il est probable que le récepteur lectinique isolé soit identique au récepteur à mannose/fucose/N-acétylglucosamine décrit par STAHL et al. (1976).

Le récepteur lectinique reconnaît la lactotransferrine humaine par l'intermédiaire de son fucose lié en $\alpha(1,3)$. La lactotransferrine humaine partiellement défucosylée ne se fixe plus sur le récepteur sauf si les temps d'hydrolyse sont prolongés et que des résidus de mannose apparaissent en position terminale.

Le fucose lié en $\alpha(1,2)$ ou en $\alpha(1,6)$ n'est pas reconnu par ce récepteur.

La lactotransferrine isolée des leucocytes humains n'interagit pas avec le récepteur lectinique. Etant donné que le récepteur lectinique des macrophages de souris possède les mêmes propriétés que le récepteur présent à la surface des macrophages humains, il semblerait qu'in vivo et en particulier dans le mécanisme de l'hyposidérémie inflammatoire la reconnaissance de la lactotransferrine relâchée par les granules secondaires des leucocytes ne se fasse pas par l'intermédiaire du récepteur à mannose/fucose des macrophages.

Cependant, d'autres récepteurs à fucose, absents des macrophages alvéolaires et péritonéaux, ont été caractérisés à la surface des cellules de Küpffer (HALTIWANGER et al., 1986) mais d'après LEHRMAN et HILL (1986) ces récepteurs ne reconnaissent pas non plus le fucose en $\alpha(1,6)$.

CONCLUSION

Les travaux que nous avons effectués au Laboratoire font suite aux travaux préliminaires réalisés par GOAVEC et al. (1985). Ces auteurs avaient montré que la fixation de la lactotransferrine humaine sur les macrophages alvéolaires était inhibée par les néoglycoprotéines à fucose et à mannose. Sur la base de ces résultats, ils avaient posé comme hypothèse que la lactotransferrine, relâchée par les granules secondaires des leucocytes, était reconnue par un récepteur lectinique présent à la surface des macrophages sur le lieu de l'inflammation.

Nous avons donc entrepris nos travaux dans le but d'éclaircir le mécanisme de reconnaissance de la lactotransferrine par les cellules du système phagocytaire mononucléé.

Les conclusions générales que nous pouvons tirer de l'ensemble de nos résultats sont les suivantes :

1 - La détermination des structures des glycanes des transferrines de souris a été réalisée grâce à l'application des techniques suivantes : méthanolyse, méthylation couplée à la spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire.

La lactotransferrine et la sérotransferrine isolées du lait de souris contiennent un seul glycanne de type N-acétyllactosaminique dépourvu de N-acétylglucosamine intercalaire mais fucosylé en $\alpha(1,6)$ sur la N-acétylglucosamine 1 du point d'attache.

La sérotransferrine isolée du sang de souris, immunologiquement identique à celle isolée à partir du lait, renferme également un seul glycanne de type N-acétyllactosaminique biantenné. Cependant seulement 10 à 15% des glycanes sont fucosylés en $\alpha(1,6)$. Ainsi, la fucosylation semble dépendre du lieu de synthèse de la glycoprotéine puisque la transferrine synthétisée au niveau du foie n'est presque pas fucosylée alors que la transferrine présente au niveau de la glande mammaire est fucosylée en $\alpha(1,6)$ sur la N-acétylglucosamine 1.

2 - La détermination de la structure des glycanes des transferrines de souris a permis d'étudier leur rôle dans la reconnaissance des transferrines par le macrophage péritonéal de souris in vitro.

Les sérotransferrines de souris se fixent spécifiquement sur le

macrophage péritonéal lorsque celui-ci est maintenu plusieurs jours en culture. Les macrophages immatures n'expriment pas à leur surface membranaire le récepteur de la sérotransferrine. Celui-ci reconnaît spécifiquement la partie protéique de la sérotransferrine. Les valeurs de constantes d'affinité et de nombres de sites de fixation par cellules sont similaires à celles décrites dans la littérature (WYLLIE, 1977; NISHISATO et AISEN, 1982).

La sérotransferrine ne se fixe que sur un seul type de sites de fixation spécifique de la partie protéique. Le glycanne n'intervient pas dans le mécanisme de reconnaissance de la sérotransferrine par le macrophage.

L'étude de la fixation des deux sérotransferrines de souris sur le macrophage a montré également que le récepteur à mannose/fucose présent à la surface des macrophages ne reconnaît pas le fucose lié en $\alpha(1,6)$.

3 - La lactotransferrine humaine se fixe sur deux types de sites différents présents à la surface du macrophage alors que la lactotransferrine de souris n'est reconnue que par une seule classe de sites de fixation.

En effet, les lactotransferrines humaine et de souris se fixent sur le macrophage péritonéal de souris avec des constantes d'affinité assez faible, de l'ordre de 10^6 M^{-1} , mais avec un nombre de sites par cellules très important ($2 \text{ à } 4 \times 10^6$). La fixation ne dépend pas de l'état de maturation du macrophage.

Après avoir mis au point un protocole de désaturation de la lactotransferrine n'utilisant pas d'EDTA et permettant de gagner une étape dans la préparation de l'apolactotransferrine, nous avons montré que le degré de saturation en fer n'intervenait pas dans la fixation de la lactotransferrine humaine sur le macrophage en culture. En effet, les différences obtenues entre les valeurs de constantes d'association et de nombres de sites par cellules de la lactotransferrine humaine sous forme apo- et saturée ne permettent pas de conclure quant au rôle du fer. Une étude plus approfondie serait nécessaire pour déterminer le rôle de la lactotransferrine dans le métabolisme du fer du macrophage.

Cette fixation de faible affinité peut se faire par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique de la lactotransferrine ou d'une manière non spécifique. En effet, plusieurs auteurs ont montré que la

lactotransferrine pouvait se fixer par interactions ioniques sur le macrophage grâce aux acides nucléiques présents à la surface des cellules (BENNETT et DAVIS, 1981; MOGUILEVSKY, 1987).

Cependant, la lactotransferrine humaine possède une deuxième classe de sites de fixation de haute affinité (10^8 M^{-1}) qui n'existe pas avec la lactotransferrine de souris et qui disparaît lorsque le fucose lié en $\alpha(1,3)$ de la lactotransferrine humaine est hydrolysé. Ce deuxième type de sites de fixation semble être dû à la présence d'un récepteur lectinique reconnaissant le fucose lié en $\alpha(1,3)$.

4 - Afin de déterminer les paramètres de la fixation de la lactotransferrine humaine sur le site de haute affinité du macrophage, nous avons, par chromatographie d'affinité sur colonne de lactotransferrine humaine couplée au Sépharose 4B, isolé le récepteur lectinique responsable de cette fixation.

Le récepteur, ainsi isolé, est calcium dépendant, son pH maximum de fixation est compris entre 7 et 8 et possède une masse moléculaire de 160 000. Les propriétés et la spécificité de reconnaissance semblent identiques à celles du récepteur à mannose/fucose présent au niveau de la plupart des macrophages. En effet, seules les néoglycoprotéines et les glycoprotéines contenant du mannose en position terminale non réductrice ou du fucose lié en $\alpha(1,3)$ inhibent la fixation de la lactotransferrine humaine sur le récepteur.

5 - La lactotransferrine isolée à partir des leucocytes humains, dont la détermination récente au Laboratoire des structures glycaniques a montré l'absence de fucose en $\alpha(1,3)$, n'est pas reconnue par le récepteur lectinique. Cela tend à montrer que la lactotransferrine leucocytaire n'est pas reconnue, in vivo, par le macrophage via le récepteur à mannose/fucose. Il semble donc que, dans le mécanisme de l'hyposidérémie inflammatoire, la lactotransferrine libérée des granules secondaires des leucocytes ne soit pas captée par l'intermédiaire d'un récepteur lectinique mais certainement par un récepteur spécifique de la partie protéique de la lactotransferrine présent à la surface du macrophage.

Le récepteur à mannose/fucose servirait à éliminer les glycoprotéines dont les glycannes sont immatures (de type oligomannosidique) ou hyperfucosylés (en particulier en $\alpha(1,3)$). Il interviendrait également, comme l'ont signalé plusieurs auteurs, dans

la reconnaissance par le macrophage des bactéries, des levures ou des cellules cancéreuses hyperfucosylées.

L'ensemble de ces résultats montre que la reconnaissance de la lactotransferrine par le macrophage ne se fait pas par l'intermédiaire d'un récepteur lectinique.

Des travaux complémentaires sont actuellement en cours au Laboratoire et visent à déterminer la nature de la fixation de faible affinité de la lactotransferrine sur les macrophages. L'isolement d'un récepteur spécifique de la partie protéique de la lactotransferrine pourrait, en effet, confirmer l'hypothèse émise par VAN SNICK et al. (1974) et par SPIK et MONTREUIL (1983) afin d'expliquer le rôle de la lactotransferrine dans l'hyposidérémie inflammatoire.



BIBLIOGRAPHIE

- ACHORD, D.T., BROT, F.E., BELL, L.E. et SLY, W.S. (1978) *Cell* 15, 269-278.
- ACHORD, D.T., BROT, F.E. et SLY, W.S. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77, 409-415.
- AISEN, P. et LISTOWSKY, I. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* 49, 357-393.
- ALEXANDER, P. et EVANS, R. (1971) *Nature* 232, 76.
- ALLEN, R.C., SANNES, P.L., SPICER, S.S. et HONG, C.C. (1980) *J. Histochem. Cytochem.* 28, 947-952.
- AMBRUSO, D.R. et JOHNSTON, R.B. (1981) *J. Clin. Invest.* 67, 352-360.
- ANDERSON, B.F., BAKER, H.M., DODSON, E.J., NORRIS, G.E., RUMBALL, S.V., WATERS, J.M. et BAKER, E.N. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1769-1773.
- ANDREESEN, R., OSTERHOLZ, J., BODEMANN, H., BROSS, K.J., COSTABEL, U. et LOEHR, G.W. (1984) *Blut (West Germany)* 49, 195-202.
- ARNOLD, R., BREWER, M. et GAUTHIER, J. (1980) *Infect. Immun.* 28, 893-898.
- ARNOLD, R., COLE, M.F. et MAC GHEE, J.R. (1977) *Science* 197, 263-265.
- ARNOLD, R., RUSSELL, J., CHAMPION, W., BREWER, M. et GAUTHIER, J. (1982) *Infect. Immun.* 35, 702-799.
- ASCHOFF, L. (1924) HOEBER P.B., Inc. New-York, 1-33.
- ASHWELL, G. et HARFORD, J. (1982) *Ann. Rev. Biochem.* 51, 531.
- ASHWELL, G. et MORELL, A.G. (1974) *Adv. Enzymol.* 41, 99.
- AUBERT, J.B., BISERTE, G. et LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 175, 410-418.
- AZARI, P. et BAUGH, R.F. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* 118, 138-144.
- BAGBY, G.C., MAC CALL, E. et LAYMAN, D.L. (1983) *J. Clin. Invest.* 71, 340-344.
- BAGBY, G.C., VASILIKI, D.R., BENNETT, R.M., VANDENBARK, A.A. et GAREWAL, H.S. (1981) *J. Clin. Invest.* 68, 56-63.
- BAKER, E.N., RUMBALL, S.V. et ANDERSON, B.F. (1987) *Trends in Biochemical Science* 141.
- BAKER, E.N., SHAW, D.C. et MORGAN, E.H. (1968) *Biochemistry* 7, 1371-1378.
- BANNISTER, J.V., BANNISTER, W.H., HILL, H. et THORNALLEY, P.J. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 715, 116-120.
- BARRY, D.M.J. et REEVE, A.W. (1977) *Pediatrics.* 60, 908-912.
- BAYARD, B. et FOURNET, B. (1975) *Carbohydr. Res.* 46, 75-86.
- BENNETT, R.M. et DAVIS, J. (1981) *J. Immunol.* 127, 1211-1216.

- BENNETT, R.M., DAVIS, J., CAMPBELL, S. et PORTNOFF, S. (1983) *J. Clin. Invest.* 71, 611-618.
- BENNETT, R.M., EDDIE-QUATEY, A.C. et HOLT, P.J.L. (1973) *Arthr. Rheum.* 16, 186.
- BERESFORD, C.H., NEALE, R.J. et BROOKS, O.G. (1971) *Lancet* 1, 568-572.
- BIANCO, C., GRIFFIN, F. et SILVERSTEIN, S. (1975) *J. Exp. Med.* 141, 1278.
- BISERTE, G., HAVEZ, R. et CUVELIER, R. (1963) *Exp. Annu. Bioch. Med.* 25, 85.
- BIRGENS, H.S., HANSEN, N.E., KARLE, H. et KRISTENSEN, L.O. (1983) *British J. Haematol.* 54, 383-391.
- BITTERMAN, P.B., SALTZMAN, L.E., ADELBERG, S., FERRANS, V.J. et CRYSTAL, R.G. (1984) *J. Clin. Invest.* 74, 460-469.
- BLANC, B. (1966) In Peeterch, "In protides of biological fluids", Elsevier, Amsterdam 14, 125.
- BLANC, B. et ISLIKER, H. (1961) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 43, 929.
- BLUARD-DECONINCK, J.M., MASSON, P.L., OSINSKI, P.A. et HEREMANS, J.F. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 365, 311-317.
- BLUARD-DECONINK, J.M., WILLIAMS, J., EVANS, R.W., VAN SNICK, J., OSINSKI, P.A. et MASSON, P.L. (1978) *Biochem. J.* 171, 321-327.
- BLUSSE VAN OUD ALBLAS, A., VAN DER LINDEN-SCHREVER, B. et VAN FURTH, R. (1983) *Am. Rev. Respir. Dis.* 128, 276-281.
- BLUSSE VAN OUD ALBLAS, A. et VAN FURTH, R. (1979) *J. Exp. Med.* 149, 1504-1518.
- BOLTZ-NITULESCU, G., BAZIN, H. et SPIEGELBERG, H.L. (1981) *J. Exp. Med.* 154, 374-384.
- BOXER, L.A., BJORKSTEN, B., BJORK, J., YANG, H.H., ALLEN, J.M. et BAEHNER, R.L. (1982a) *J. Lab. Clin. Med.* 99, 866.
- BOXER, L.A., HAAK, R.A., MSIN-MSIN, Y., WOLACH, J.B., WHITCOMB, J.A., BUTTERICK, C.J. et BAEHNER, R.L. (1982b) *J. Clin. Invest.* 70, 1049-1057.
- BOWDEN, D.H. et ADAMSON, Y.R. (1972) *Am. J. Pathol.* 68, 521-528.
- BRETON-GORIUS, J., MASON, D.Y., BURIOT, D., VILDE, J.L. et GRISCELLI, C. (1980) *Am. J. Pathol.* 99, 413-428.
- BRISSON, J.R. et CARVER, J.P. (1983) *Biochemistry* 22, 1362-1368.
- BROCK, J.H. (1985) *Metalloproteins Part 2 : Metal proteins with non-redox roles.* (Pauline Harrison ed.) *Topics in molecular and structural biology.*

- BROCK, J.H., ESPARZA, I. et LOGIE, A.C. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 797, 105-111.
- BROCK, J.H., PINEIRO, A. et LAMPREAVE, F. (1978) *Ann. Rech. Vet.* 9, 287-294.
- BROEKHUYSE, R.N. (1974) *Invert. Ophtamol.* 13, 550.
- BROXMEYER, H.E., BICKNELL, D.C., GILLIS, S., HARRIS, E.L., PELUS, L.M. et SLEDGE, G.W. (1986) *Blood Cells* 11, 429-446.
- BROXMEYER, H.E., JULIANO, L., WAHEED, A. et SHADDUCK, R.K. (1985) *J. Immunol.* 135, 3224-3231.
- BROXMEYER, H.E., SMITHYMAN, A., EGER, R.R., MEYERS, P.A. et DE SOUSA, M. (1978) *J. Exp. Med.* 148, 1052-1068.
- BRYCE, C.F.A. et CRICHTON, R.R. (1973) *Biochem. J.* 133, 301-309.
- BULLEN, J.J., ROGERS, H.J. et GRIFFITHS, E. (1974) In "Microbial iron metabolism" (J.B. Nielsands ed.) Academic Press, New-York, p 517.
- BULLEN, J.J., ROGERS, H.J. et LEIGH, L. (1972) *Brit. Med. J.* 1, 69-75.
- BYERS, S.O. (1960) *Ann. New-York Acad. Sc.* 88, 240.
- CACHE, P. (1986) Thèse de 3^{ème} cycle, Lille.
- CAMPBELL, E.J. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6941-6945.
- CASTELLINO, F.J., FISH, W.W. et MANN, K.G. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 4269.
- CATTAN, D. (1979) *Gastroenterol. Clin. Biol.* 3, 59-66.
- CATTAN, D. (1983) *The Lancet* 9, 106.
- CHANDLER, D.B., FULLER, W.C., JACKSON, R.M. et FULMER, J.D. (1986) *J. Leukocyte Biol.* 39, 371-383.
- CHERON, A. (1975) Thèse Doctorat ès Science, Lille.
- CHERON, A., MAZURIER, J. et FOURNET, B. (1977) *C. R. Acad. Sci. Paris* 284, 585-588.
- CLEMENTE, F., RIBEIRO, T., COLOMB, E., FIGARELLA, C. et SALES, H. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 251, 456.
- CODDEVILLE, B. (1986) Thèse de Doctorat en Biochimie, Lille.
- COHN, Z.A. et BENSON, B. (1965) *J. Exp. Med.* 121, 153-170.
- COHN, Z.A. et WIENER, E. (1963) *J. Exp. Med.* 118, 991.
- COLEMAN, D.L. (1986) *Eur. J. Clin. Microbiol.* 5, 1-5.
- COSTABEL, U., OSTERHOTZ, J., BODEMANN, H., BROSS, K.J., MATTHYS, H. et ANDREESEN, R. (1984) *Ann. Rev. Resp. Dis.* 129,.

- COX, T.M., MAZURIER, J., SPIK, G., MONTREUIL, J. et PETERS, T.F. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 588, 120-128.
- CRICHTON, R.R. et CHARLOTEAUX-WAUTERS, M. (1987) *Eur. J. Biochem.* 164, 485-506.
- CUATRECASAS, P., WILCHEK, M. et ANFINSEN, C.B. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61, 636-643.
- CUSTER, G., BALCERZAK, S. et RINEHART, J. (1980) *Clin. Res.* 28, 307.
- CUSTER, G., BALCERZAK, S. et RINEHART, J. (1982) *Am. J. Haematol.* 13, 23-26.
- DAUTRY-VARSAT, A., CIECHANOVER, A. et LODISH, H.F. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2258-2262.
- DAUTRY-VARSAT, A. et LODISH, H.F. (1984) *Pour la Science*, juillet.
- DAVIDSON, L.A. et LONNERDAL, B. (1985) In "Proteins of iron storage and transport" (G. Spik, J. Montreuil, R.R. Crichton and J. Mazurier eds.) Elsevier, Amsterdam, pp 275-278.
- DEISS, A. (1983) *Semin. Hematol.* 20, 81-90.
- DELAEY, P., MASSON, P.L. et HEREMANS, J.F. (1968) *Protides Biol. Fluids* 16, 627-632.
- DERISBOURG, P. (1987) D.E.A., Lille
- DERISBOURG, P., STRECKER, G., MONTREUIL, J. et SPIK, G. (1987) *Biochem. J.* (soumis à publication).
- DE SOUSA, M. (1978) *Symp. Soc. Exp. Biol.* 32, 393-409.
- DE VET, B.J.L.M. et VAN GOOL, J. (1974) *Acta Med. Scand.* 196, 393-402.
- DIAMOND, B. et YELTON, D.E. (1981) *J. Exp. Med.* 153, 514-519.
- DOAN, C.A. (1939) In a symposium on the blood, Madison, University of Wisconsin Press, 167.
- DOUY, A et GALLOT, B. (1980) *Biopolymers* 19, 493.
- DUBACH, R., CALLENDER, S.T.E. et MOORE, C.V. (1948) *Blood* 3, 526-542.
- EBERT, R.H. et FLOREY, H.W. (1939) *Brit. J. Exp. Path.* 20, 342.
- ESPARZA, I. et BROCK, I. (1981) *Brit. J. Haematol.* 49, 603-614.
- FANGER, M.W., GOLDSTEINE, S.N. et SHEN, L. (1983) *Mol. Immunol.* 20, 1019-1027.
- FELS, A.O.S. et COHN, Z.A. (1986) *J. Appl. Physiol.* 60, 353-369.
- FILLET, G. et MARSAGLIA, G. (1975) *Blood* 46, 1007.
- FINNE, J., KRUSIUS, T. et RAUVALA, T. (1980) *Carbohydr. Res.* 80, 336-339.

- FLOREY, H. et JENNINGS, M.A. (1962) Healing, in General Pathology (H. Florey ed.), Philadelphia, W.B. Saunders Compagny, 449.
- FOURNET, B., MONTREUIL, J., STRECKER, G., DORLAND, L., HAVERKAMP, J., Vliegenthart, J.F.G., BINETTE, J.P. et SCHMID, K. (1978) *Biochemistry* 17, 5206-5214.
- FOURNET, B., STRECKER, G., LEROY, Y. et MONTREUIL, J. (1981) *Anal. Biochem.* 116, 489-502.
- FOX, R.A., GREGORY, D.S. et FELDMAN, J.D. (1974) *J. Immunol.* 112, 1867-1872.
- GALLIN, J.I. (1985) *Ann. Rev. Med.* 36, 263-274.
- GARIBALDI, J.A. (1972) *J. Bact.* 110, 262-265.
- GAULDIE, J., RICHARDS, C. et LAMONTAGNE, L. (1983) *Mol. Immunol.* 20, 1029-1037.
- GEISOW, M. (1980) *Nature* 288, 434-436.
- GENTILE, P. et BROXMEYER, H.E. (1983) *Blood* 61, 982-994.
- GERY, I. et WAKSMAN, B.H. (1972) *J. Exp. Med.* 136, 128-155.
- GOAVEC, M. (1983) Thèse de 3^{ème} cycle, Lille.
- GOAVEC, M., MAZURIER, J., MONTREUIL, J. et SPIK, G. (1985) *C. R. Acad. Sci. Sér.III, Paris* 301 (16), 689-694.
- GOLDE, D.W. et CLINE, M.J. (1972) *J. Clin. Invest.* 51, 2981-2983.
- GOLDSTEIN, E., LIPPERT, W. et WARSHAUER, D. (1974) *J. Clin. Invest.* 54, 519-528.
- GORDON, S. (1986) In "Ann. Inst. Pasteur Immunol.", Elsevier, Paris, 137 C, 191-249.
- GORDON, W.G., ZIEGLER, J. et BASCH, J.J. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* 60, 410.
- GRANT, D.A.W., MAGEE, A.I., MEEKS, D., REGAN, C., BAINBRIDGE, D.R. et HERMON, T.J. (1979) *Biochem. J.* 184, 619-626.
- GREEN, G.M. et KASS, E.H. (1964) *J. Exp. Med.* 119, 167-176.
- GROVES, M.L. (1960) *J. Amer. Chem. Soc.* 82, 3345-3350.
- GUTTERIDGE, J., PATERSON, S., SEGAL, A. et HALLIWELL, B. (1981) *Biochem. J.* 199, 259-261.
- HABER, F. et WEISS, J. (1934) *Proc. R. Soc. Edinb.* 147, 332-351.
- HAMILTON, T.A., GRAY, P.W. et ADAMS, D.O. (1984b) *Cell. Immunol.* 89, 478-488.
- HAMILTON, T.A., WADA, H.G. et SUSSMAN, H.H. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 6404-6410.

- HAMILTON, T.A., WEIEL, J.E. et ADAMS, D.O. (1984a) *J. Immunol.* 132, 2285-2290.
- HALTIWANGER, R.S. et HILL, R.L. (1986a) *J. Biol. Chem.* 261, 7440-7444.
- HALTIWANGER, R.S. et HILL, R.L. (1986b) *J. Biol. Chem.* 261, 15696-15702.
- HALTIWANGER, R.S., LEHRMAN, M.A., ECKHARDT, A.E. et HILL, R.L. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 7433-7439.
- HAMILTON, T.A. et ADAMS, D.O. (1987) *Immunology Today* 8, 151-158.
- HANCE, A.J., DOUCHES, S., WINCHESTER, R.J., FERRANS, V.J. et CRYSTAL, R.G. (1985) *J. Immunol.* 134, 284-292.
- HANOVER, J.A. et DICKSON, R.B. (1985) In "Endocytosis" (I. Pastan and M.C. Willingham eds.), Plenum Press, New-York, pp 131-161.
- HARRISON, P.M., WHITE, J.L., SMITH, J.M.A., FARRANTS, G.W., FORD, G.C., RICE, D.W., ADDISON, J.M. et TREFFRY, A. (1985) In "Proteins of iron storage and transport" (G. Spik, J. Montreuil, R.R. Crichton et J. Mazurier eds.) Elsevier, Amsterdam, pp 67-79.
- HASHIZUME, S., KURODA, K. et MURAKAMI, H. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 763, 377-382.
- HAURANI, F.I., MEYER, A. et O'BRIEN, R. (1973) *J. Ret. Soc.* 14, 309-316.
- HECKMAN, A.M. et RUKME, P. (1969) *Fert. Steril.* 20, 312.
- HERBERT, V. (1971) In "The pharmacological basis of therapeutics" (L.S. Goodman, A. Gilman eds.) Mc Millan, New-York, pp 1397-1413.
- HEUSTERSPREUTE, M. et CRICHTON, R.R. (1981) *FEBS Lett.* 129, 322-327.
- HIBBS, J.B., LAMBERT, L.H. et REMINGTON, J.S. (1972) *Nature* 235, 48.
- HIRATA, T., BRANTLY, M., MORNEX, J.F., BITTERMAN, P. et CRYSTAL, R.G. (1985) *Clin. Res.* 33, 379.
- HIRATA, T., PINKSTON, P., BITTERMAN, P., HANCE, A. et CRYSTAL, R. (1984) *Allergy and Clinical Immunologie Assembly*.
- HOCKING, W.G. et GOLDE, D.W. (1979) *N. Engl. J. Med.* 301, 580-587.
- HOIDAL, J.R., SCHMELING, D. et PETERSON, P.K. (1981) *J. Infect. Dis.* 144, 61-71.
- HOMMA, Y., ONOZAKI, K., MASHIMOTO, T., MIURA, K., NAGAO, S. et TANAKA, A. (1981) *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 65, 27-33.
- HORWITZ, D.A., BAKKE, A.C., ABO, W. et NISHIYA, K. (1984) *J. Immunol.* 132, 2370-2374.
- HOWARD, J.G. (1973) In "Mononuclear phagocytes" (Van Furth ed.) Blackwell, Oxford, 178.
- HU, W.L., MAZURIER, J., SAWATZKI, G., MONTREUIL, J. et SPIK, G. (1987) *Biochem. J.* (soumis à publication).

- HUEBERS, H.A. et FINCH, C.A. (1987) *Physiol. Rev.* 67, 520-581.
- HUEBERS, H.A., HUEBERS, E., CSIBA, E., RUMMEL, W. et FINCH, C.A. (1983) *Blood* 61, 283-290.
- HUEBERS, H.A., HUEBERS, E., FINCH, C.A. et MARTIN, A.W. (1982) *J. Comp. Physiol.* 148, 101-109.
- IMBER, M.J. et PIZZO, S.V. (1983) *Biochem. J.* 212, 249-258.
- IMBER, M.J., PIZZO, S.V., JOHNSON, W.J. et ADAMS, D.O. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 5129-5135.
- JACOBS, A. et SUMMERS, M.R. (1981) *Brit. J. Haematol.* 49, 649-652.
- JELTSCH, J.M. et CHAMBON, P. (1982) *Eur. J. Biochem.* 122, 291-295.
- JOHANSSON, B. (1960) *Acta Chem. Scand.* 14, 510.
- JOLLES, J., DONDA, A., AMIGUET, P. et JOLLES, P. (1984) *FEBS Lett.* 176, 185-188.
- JOLLES, J., MAZURIER, J., BOUTIGUE, M.H., SPIK, G., MONTREUIL, J. et JOLLES, P. (1976) *FEBS Lett.* 69, 27-31.
- KAMERLING, J.P., GERWIG, G.J., VLIEGENTHART, J.F.G. et CLAMP, J.R. (1975) *Biochem. J.* 151, 491-495.
- KAMPSCHMIDT, R.F. et PULLIAM, L.A. (1975) *Res. J. Reticuloendoth. Soc.* 17, 162-169.
- KAMPSCHMIDT, R.F., UPCHURCH, H.F. et JOHNSON, H.L. (1965) *Am. J. Physiol.* 208, 68-72.
- KAPLAN, G. (1977) *Scand. J. Immunol.* 6, 797-807.
- KATAOKA, M. et TAVASSOLI, M. (1985) *Exp. Haematol.* 13, 44-50.
- KELLY, L.S. et DOBSON, E.L. (1971) *Brit. J. Exp. Pathol.* 52, 88-99.
- KELM, S. et SCHAUER, R. (1986) *J. Biol. Chem.* 367, 989-998.
- KELM, S. et SCHAUER, R. (1987) In "Glycoconjugates proceeding of the IXth international symposium" (J. Montreuil, A. Verbert, G. Spik et B. Fournet eds.) Lille, France, G 68.
- KINKADE, J.M., MILLER, W.W.K. et SEGARS, F.M. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 446, 407-418.
- KINSKY, R.G., CHRISTIE, G.H., ELSON, J. et HOWARD, J.G. (1969) *Brit. J. Exp. Pathol.* 50, 438-447.
- KIYONO, K. (1914) Fischer Verlag, Jena.
- KLUGER, M.J. et ROTHENBURG, B.A. (1979) *Science* 203, 374-376.
- KOLB, H., FRIEDRICH, E. et SUSS, R. (1981) *Hoppe-Seyler's Physiol. Chem.* 362, 1609.
- KOLB, H. et KOLB-BACHOFEN, V. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85, 678.

- KONISH, M., SHEPHERD, V., HOLT, G. et STAHL, P.D. (1983) *Meth. Enzymol.* 98, 301-304.
- KUSTER, J.M. et SCHAUER, R. (1981) *Hoppe-Seyler's Physiol. Chem.* 362, 1507-1514.
- LAEMMLI, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
- LANG, T. et DE CHASTELLIER, C. (1985) *Biol. Cell.* 53, 149-154.
- LAURELL, C.B. et INGELMAN, B. (1947) *Acta Chem. Scand.* 1, 770.
- LEE, H., KELM, S. et SCHAUER, R. (1987) In "Glycoconjugates proceeding of the IXth international symposium" (J. Montreuil, A. Verbert, G. Spik et B. Fournet eds.) Lille, France, G 69.
- LEFELL, M.S. et SPITZNAGEL, J.K. (1975) *Infec. Immunity* 12, 813-820.
- LEGRAND, D., MAZURIER, J., AUBERT, J.P., LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H., MONTREUIL, J. et SPIK, G. (1986) *Biochem. J.* 236, 839-844.
- LEGRAND, D., MAZURIER, J., METZ-BOUTIGUE, M.H., JOLLES, J., JOLLES, P., MONTREUIL, J. et SPIK, G. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 787, 90-96.
- LEHNERT, B.E., VALDEZ, Y.E. et HOLLAND, L.M. (1985) *Exp. Lung Res.* 9, 177-190.
- LEHRMAN, M.A., HALTIWANGER, R.S. et HILL, R.L. (1986b) *J. Biol. Chem.* 261, 7426-7432.
- LEHRMAN, M.A. et HILL, R.L. (1983) *Meth. Enzymol.* 98, 309-320.
- LEHRMAN, M.A. et HILL, R.L. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 7419-7425.
- LEHRMAN, M.A., IMBER, M.J., PIZZO, S.V. et HILL, R.L. (1980) *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 39, 1909.
- LEHRMAN, M.A., PIZZO, S.V., IMBER, M.J. et HILL, R.L. (1986a) *J. Biol. Chem.* 261, 7412-7418.
- LEROUGE, L. (1984) D.E.A., Lille
- LETENDRE, E.D. et HOLBEIN, B.E. (1984) *Infec. Immunity* 44, 320-325.
- LEVIN, M.J., TUIL, D. et UZAN, G. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 212-217.
- LINE, W.F., SLY, D.A. et BEZKORDVAINY, A. (1976) *Int. J. Biochem.* 7, 203-208.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. et RANDALL, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- MACARA, I.G., HOY, T.G. et HARRISON, P.M. (1972) *Biochemistry* 126, 151-162.
- MAC CLELLAND, A., KUHN, L.C. et RUDDLE, F.H. (1984) *Cell* 39, 267-274.

- MAC GILLIVRAY, R.T.A., MENDEZ, E., SHEWALE, J.G., SINHA, C.K., LINEBACK-ZINS, J. et BREW, K. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 3543-3553.
- MAC GILLIVRAY, R.T.A., MENDEZ, E., SINHA, J.K., SUTTON, M.R., LINEBACK-ZINS, J. et BREW, K. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2504-2508.
- MACKANESS, G.B. (1972) In "Infectious agents and host reactions" (S. Mudd ed.) W.B. Saunders, Philadelphia, p 61.
- MALIET, A.M. et PLANTEY, M.C. (1977) *D.E.A.*, Lille
- MARCH, S.C., PARIKH, I. et CUATRECASAS, P. (1974) *Anal. Biochem.* 60, 149-152.
- MARKOWETZ, B., VAN SNICK, J.L. et MASSON, P.L. (1979) *Thorax* 34, 209-212.
- MARTIN, A.W., HUEBERS, E. et WEBBS, J.M. (1983) In "Structure and function of iron storage and transport proteins" (I. Urushizaki, P. Aisen, I. Listowsky et J.W. Drysdale eds.) Elsevier Biomedical, New-York, pp 259-260.
- MARX, J.J.M., LIGDEUR, M.C., GEERTSEMA, J. et SCHUURMAN, H.J. (1984) Abstract of the iron club meeting, Rennes, France.
- MASSON, P.L. (1970) "La lactotransferrine", collection medico-monographies d'agrégés (S.A. Arscia ed.) Bruxelles, p 93.
- MASSON, P.L. et HEREMANS, J.F. (1966) In Peeterch, "In protides of biological fluids", Elsevier, Amsterdam, 14., p 115.
- MASSON, P.L. et HEREMANS, J.F. (1971) *Comp. Biochem. Physiol.* 39, 119-129.
- MASSON, P.L., HEREMANS, J.F. et SCHONNE, E. (1969) *J. Exp. Med.* 130, 643.
- MATSUMOTO, A., YOSHIMA, H., TAKASAKI, S. et KOBATA, A. (1982) *J. Biochem.* 91, 143.
- MAZURIER, J., LHOSTE, J.M., SPIK, G. et MONTREUIL, J. (1977) *FEBS Lett.* 81, 371-375.
- MAZURIER, J., METZ-BOUTIGUE, M.H., JOLLES, J., SPIK, G., MONTREUIL, J. et JOLLES, P. (1983) *Experientia* 39, 135-141.
- MAZURIER, J., MONTREUIL, J. et SPIK, G. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 821, 453-460.
- MAZURIER, J. et SPIK, G. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 629, 399-408.
- MAZURIER, J., SPIK, G. et MONTREUIL, J. (1974) *FEBS Lett.* 48, 262-265.
- MAZURIER, J., SPIK, G. et MONTREUIL, J. (1984) Abstracts of the iron club meeting, Rennes, France.
- MAZURIER, J., SPIK, G. et MONTREUIL, J. (1987) *J. Biol. Cell.* (soumis à publication).

- MELLMANN, I.S. (1984) "In membrane recycling, C.I.B.A. Foundation symposium 92" (D. Evered et G.M. Collins eds.) Pittman Press, London, pp 35-58.
- MELLMAN, I.S. et PLUTNER, H. (1984) J. Cell Biol. 98, 1170-1177.
- MERRIMAN, C.R., PULLIAM, L.A. et KAMPSCHMIDT, R.F. (1977) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 154, 224-227.
- METCHNIKOFF, E. (1892) Masson, Paris.
- METCHNIKOFF, E. (1905) Cambridge, Cambridge University Press.
- METZ-BOUTIGUE, M.H., JOLLES, J., JOLLES, P., MAZURIER, J., SPIK, G. et MONTREUIL, J. (1980) Biochim. Biophys. Acta 622, 308-314.
- METZ-BOUTIGUE, M.H., JOLLES, J., MAZURIER, J., SCHOENTGEN, F., LEGRAND, D., SPIK, G., MONTREUIL, J. et JOLLES, P. (1984) Eur. J. Biochem. 145, 659-676.
- METZ-BOUTIGUE, M.H., JOLLES, J., MAZURIER, J., SPIK, G., MONTREUIL, J. et JOLLES, P. (1982) FEBS Lett. 142, 107-110.
- METZ-BOUTIGUE, M.H., MAZURIER, J., JOLLES, J., SPIK, G., MONTREUIL, J. et JOLLES, P. (1981) Biochim. Biophys. Acta 670, 243-254.
- MOGUILVSKY, N. (1987) Thèse de Doctorat en Biochimie, Lille.
- MOGUILVSKY, N., RETEGUI, L.A. et MASSON, P.L. (1985) 229, 353-359.
- MONSIGNY, M., ROCHE, A.C. et MIDOUX, P. (1984) Biol. Cell. 51, 187-196.
- MONTREUIL, J. (1975) Pure App. Chem. 42, 431-477.
- MONTREUIL, J. (1980a) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 37, 157-223.
- MONTREUIL, J. (1980b) Proc. Sharon Katzir-Katchalsky, conference on Carbohydrate-Protein interactions, Kibbutz Kiryat Anavim 9th, 3-4.
- MONTREUIL, J. (1982) Comp. Biochem. 19 B/II, 1-188.
- MONTREUIL, J. (1983) Biochem. Soc. Transactions 11, 134-136.
- MONTREUIL, J., FOURNET, B., SPIK, G. et STRECKER, G. (1978) C. R. Acad. Sci. Paris 287 D, 837-840.
- MONTREUIL, J., MAZURIER, J., LEGRAND, D. et SPIK, G. (1985) In "Proteins of iron storage and transport" (G. Spik, J. Montreuil, R.R. Crichton et J. Mazurier eds.) Elsevier, Amsterdam, pp 25-38.
- MONTREUIL, J. et MULLET, S. (1960) C. R. Acad. Sci. Paris 250, 1736-1737.
- MONTREUIL, J., TONNELAT, J. et MULLET, S. (1960) Biochim. Biophys. Acta 45, 413-421.
- MORGAN, E.H. (1981) Molec. Aspects Med. 4, 1-123.

- MOYER, M.P. (1979) *Int. Rev. Cyt.* 61, 1-61.
- MULLER, E., FRANCO, M.W. et SCHAUER, R. (1981) *Hoppe-Seyler's z Physiol. Chem.* 362, 1615.
- NISHISATO, T. et AISEN, P. (1982) *Brit. J. Haematol.* 52, 631-640.
- NORRIS, G.E., ANDERSON, B.F., BAKER, E.N., BAKER, H.M., GARTNER, A.L., WARD, J. et RUMBALL, S.V. (1986) *J. Mol. Biol.* 191, 143-145.
- OMARY, M.B. et TROWBRIDGE, I.S. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 4715.
- ORAM, J.D. et REITER, B. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 170, 351.
- OSEAS, R., YANG, H.H., BAEHNER, R.L. et BOXER, L.A. (1981) *Blood* 57, 939-945.
- O'SHEA, M.J., KERSHENOBICH, D. et TAVILL, A.S. (1973) *Brit. J. Haematol.* 25, 707-714.
- PASTAN, I. et WILLINGHAM, M.C. (1985) In "Endocytosis" (I. Pastan et M.C. Willingham eds.)
- PAZ-PARENTE, J., CARDON, P., LEROY, Y., MONTREUIL, J. et FOURNET, B. (1985) *Carbohydr. Res.* 141, 41-47.
- PEKAREK, R.S., BOSTIAN, K.A., BARTELONY, P.J., CALIA, F.M. et BEISEL, W.R. (1969) *Amer. J. Med. Sci.* 258, 14-25.
- PELOSI-TESTA, E., TESTA, U., PETTI, S., GIANNELLA, G., CAMAGNA, A., BOCCOLI, G., SPOSI, N.M., PETRINI, M., ISACCHI, G., SALVO, G. et PESCHLE, C. (1987) In "VIII colloque international sur les protéines de transport et d'emmagasinage du fer" Montréal, Canada.
- PENTECOST, B.T. et TENG, C.T. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 10134-10139.
- PERRAUDIN, J.P. et PRIEELS, J.P. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 718, 42-48.
- PHILLIPS, M.E. et THORBECKE, G.J. (1966) *Int. Arch. Allergy* 29, 553.
- POWELL, L.W., CAMPBELL, J. et WILSON, H. (1970) *Gut* 11, 727-738.
- PRIEELS, J.P., DESCHUYTENER, M. et PERRAUDIN, J.P. (1982) *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 90, 143.
- PRIEELS, J.P., PIZZO, S.V., GLASGOW, L.R., PAULSON, J.C. et HILL, R.L. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2215-2219.
- READING, C.L., PENHOET, E. et BALLOU, C. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 5600-5612.
- REFSUM, S.B. et SCHREINER, B. (1980) *Scand. J. Gastroent.* 15, 1013-1020.
- REGOECZI, E. et HATTON, M.W.C. (1980) *J. Am. Physiol. Soc.* R306-R310.
- REITER, B., BROCK, J.H. et STEEL, E.D. (1975) *Immunology* 28, 83-95.

- REMOLD, H.G. (1973) *J. Exp. Med.* 138, 1065-1076.
- REYNOLDS, H.Y., ATKINSON, J.P., NEUBALL, H.M. et FRANK, M.M. (1975) *J. Immunol.* 114, 1813.
- RICHTER, G.W. (1983) In "Structure and function of iron storage and transport proteins" (I. Urushizaki, P. AISEN, I. Listowsky et J.W. Drisdale eds.) Elsevier Biomedical, New-York.
- ROCHE, A.C., MIDOUX, P., BOUCHARD, P. et MONSIGNY, M. (1985) *FEBS Lett.* 193, 63-68.
- ROGERS, H.J. et SYNGE, C. (1978) *Immunology* 34, 19-28.
- ROOS, P., HARTMANN, H.J., SCHLEPPER-SCHÄFER, J., KOLB, H. et KOLB-BACHOFEN, V. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 847, 115.
- RUKME, P., VISSER, D., KWA, H.G. et HART, A.A.M. (1971) *Folia. Med. Neerl.* 14, 156.
- RYMER, J.C. (1981) *Path. Biol.* 29, 301-304.
- SAITO, K., NISHISATO, T., GRASSO, J.A. et AISEN, P. (1986) *Brit. J. Haematol.* 62, 275-286.
- SAWATZKI, G. (1987) In "Iron Transport in Microbes, Plants and Animals" (Winkelmann, Van Der Helm et Neilands eds.)
- SAWATZKI, G. et KUBANEK, B. (1983) In "Structure and function of iron storage and transport proteins" (I. Urushizaki, P. Aisen, I. Listowsky et J.W. Drisdale eds.) Elsevier Biomedical, New-York, pp 441-443.
- SCATCHARD, G. (1949) *Ann. New-York Acad. Sci.* 51, 660-672.
- SCHADE, A.L. et CAROLINE, L. (1946) *Science* 104, 340-341.
- SCHLEPPER-SCHÄFER, J., HULSMANN, D., DJOVKAR, A., MEYER, H.E., HERBERTZ, L., KOLB, H. et KOLB-BACHOFEN, V. (1986) *Exp. Cell Res.* 165, 494-506.
- SCHLESINGER, P.H., DOEBBER, T., MANDELL, B., DESCHRYVER, C., MILLER, J. et STAHL, P. (1978) *Biochem. J.* 176, 103-109.
- SCHMID, K., BINETTE, J.P., DORLAND, L., Vliegenthart, J.F.G., FOURNET, B. et MONTREUIL, J. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 581, 356-359.
- SCHNEIDER, C. et WILLIAMS, J.G. (1985) *J. Cell Sci.* 3, 139.
- SHADDUCK, R.K., PIGOLI, G., WAHEED, A. et BOEGEC, F. (1980) *J. Supramol. Struct.* 14, 423-429.
- SHAND, F.L. et BELL, E.B. (1972) *Immunology* 22, 549-556.
- SHARMA, S.D. (1986) *Clin. Immunol. Allergy* 6, 1-28.
- SHARON, N. (1984) *Immunol. Today* 5, 143-147.
- SHEPHERD, V.L., CAMPBELL, E.J., SENIOR, R.M. et STAHL, P.D. (1982) *J. Ret. Soc.* 32, 423-431.

- SHEPHERD, V.L., FREEZE, H.H., MILLER, A.L. et STAHL, P.D. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 2257-2261.
- SHEPHERD, V.L., LEE, Y.C., SCHLESINGER, P.H. et STAHL, P.D. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1019-1022.
- SIIMES, M.A., VVORI, E. et KUITUNEN, P. (1979) *Acta Paediatr. Scand.* 68, 29-31.
- SIMON, M., HESPEL, J.P., BRISSOT, P., FAUCHET, R., EDAN, G., LE REUN, M., LE MIGNON, L., GENETET, B. et BOUREL, M. (1981) *Ann. Med. Interne* 132, 413-433.
- SMITH, K.L., CONRAD, H.R. et PORTER, R.M. (1971) *J. Dairy Sci.* 54, 1427.
- SPEER, C.P., PABST, M.J., HEDEGAARD, H.B., REST, R.F. et JOHNSTON, R.B. (1984) *J. Immunol.* 133, 2151-2156.
- SPIK, G. (1971) *Ann. Nutr. Alim.* 25, A81-A134.
- SPIK, G., BRUNET, B., MAZURIER-DEHAINE, C., FONTAINE, G. et MONTREUIL, J. (1982b) *Acta Paediatr.* 71, 979.
- SPIK, G., CHERON, A., MONTREUIL, J. et DOLBY, J.M. (1978) *Immunology* 35, 663-671.
- SPIK, G., CODDEVILLE, B., LEGRAND, D., MAZURIER, J., LEGER, D., GOAVEC, M. et MONTREUIL, J. (1985) In "Proteins of iron storage and transport" (G. Spik, J. Montreuil, R.R. Crichton and J. Mazurier eds.) Elsevier, Amsterdam, pp 47-51.
- SPIK, G. et MONTREUIL, J. (1983) *Bull. Eur. Physiopathol. Resp.* 19, 123-130.
- SPIK, G., STRECKER, G., FOURNET, B., BOUQUELET, S., MONTREUIL, J., DORLAND, L., VAN HALBEEK et VLIEGENTHART, J.F.G. (1982a) *Eur. J. Biochem.* 121, 413-419.
- SPIK, G., VANDERSYPPE, R., FOURNET, B., BAYARD, B., CHARET, P., BOUQUELET, S., STRECKER, G. et MONTREUIL, J. (1973) In "Actes du colloque n°221 sur les glycoconjugués", CNRS, Paris, pp 111-130.
- SPIK, G., VANDERSYPPE, R., FOURNET, B., CHARET, P. et BOUQUELET, S. (1974a) *Actes Coll. Intern.* 221, 483-500.
- SPIK, G., VANDERSYPPE, R., MONTREUIL, J., TETAERT, D. et HAN, K.K. (1974b) *FEBS Lett.* 38, 213-216.
- STAHL, P.D. et GORDON, S. (1982) *J. Cell Biol.* 93, 49-56.
- STAHL, P.D., RODMAN, J.S., MILLER, M.J. et SCHLESINGER, P.H. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1399-1403.
- STAHL, P.D., SCHLESINGER, P.H., RODMAN, J.S. et DOEBBER, T. (1976) *Nature* 264, 86-88.

- STAHL, P.D., SCHLESINGER, P.H., SIGARDSON, E., RODMAN, J.S. et LEE, Y.C. (1980) *Cell* 19, 207-215.
- STAHL, P.D. et SCHWARTZ, A.L. (1986) *J. Clin. Invest.* 77, 657-662.
- STAHL, P.D., WILEMAN, T.E., DIMENT, S. et SHEPHERD, V.L. (1984) *Biol. Cell* 51, 215-218.
- STEARNE, P.A., PIETERSZ, G.A. et GODING, J.W. (1985) *J. Immunol.* 134,
- STEPHENS, S., DOLBY, J., MONTREUIL, J. et SPIK, G. (1980) *Immunology* 41, 597-603.
- STOCKERT, R.J., MORELL, A.G. et SCHEINBERG, I.H. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 988-993.
- SULLIVAN, R., GANS, P.J. et MAC CARROLL, L.A. (1983) *J. Immunol.* 130, 800-807.
- SUNG, S.S.J., NELSON, R.S. et SILVERSTEIN, S.C. (1981) *J. Cell Biol.* 91, 112a.
- TENU, J.P., ROCHE, A.C., YAPO, A., KIEDA, C., MONSIGNY, M. et PETIT, J.F. (1982) *Biol. Cell* 44, 157-164.
- TERENT, A., HALL, R., GREN, R., VENGE, P. et BERGSTROM, K. (1981) *Stroke* 12, 40.
- THORBECKE, G.J. et BENACERRAF, B. (1962) *Progr. Allergy* 6, 559.
- TOWBIN, H., STAEHELIN, T. et GORDON, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- TOWNSEND, R. et STAHL, P.D. (1981) *Biochem. J.* 194, 209-214.
- UNKELESS, J.C. (1977) *J. Exp. Med.* 145, 931.
- UNKELESS, J.C. et EISEN, H.N. (1975) *J. Exp. Med.* 142, 1520-1532.
- UNKELESS, J.C., FLEIT, H. et MELLMAN, I. (1981) *Adv. Immunol.* 31, 247.
- VAN AGTHOVEN, A., GORIDIS, C., NAQUET, P. PIERRES, A. et PIERRES, M. (1984) *Eur. J. Biochem.* 140, 433-440.
- VAN FURTH, R. (1970) In "Mononuclear phagocytes" (R. Van Furth ed.) Blackwell, Oxford, p 151.
- VAN FURTH, R. et COHN, Z.A. (1968) *J. Exp. Med.* 128, 415-433.
- VAN FURTH, R., COHN, Z.A., HIRSCH, J.G., HUMPHREY, J.H., SPECTOR, W.G. et LANGEVOORT, H.L. (1972) *Bull. O.M.S.* 46, 845-852.
- VAN FURTH, R., DIESELHOFF DEN DULK, M. et MATTIE, H. (1973) *J. Exp. Med.* 138, 1314-1330.
- VAN FURTH, R., VAN DER MEER, J.W.M., BLUSSE VAN OUD ALBLAS, A. et SLUITER, W. (1982) In "Self-defense mechanisms : role of macrophages" (D. Mizuno, Z.A. Cohn, K. Takeya et N. Ishida eds.) Tokyo, Univ. Tokyo Press, pp 25-43.

- VAN FURTH, R (1985) *Int. Archs Allergy Appl. Immun.* 76, 21-27.
- VAN GUT, H., VAN GOOL, J., LADIGES, N.C.J.J. et BOERS, W. (1975) *Quat. J. Exp. Physiol.* 60, 79.
- VAN RENSWOUDE, J., BRIDGES, K.R., HARFORD, J.B. et KLAUSNER, R.D. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6186-6190.
- VAN SNICK, J.L., MARKOWETZ, B. et MASSON, P.L. (1977) *J. Exp. Med.* 146, 817-827.
- VAN SNICK, J.L., MASSON, P.L. et HEREMANS, J.F. (1974) *J. Exp. Med.* 140, 1068-1084.
- WADA, H.G., HASS, P.E. et SUSSMAN, H.H. (1979) *J. Supramol. Struct.* 10, 12629-12635.
- WALKER, W. (1976) *J. Immunol.* 116, 911.
- WARD, P.A., TILL, G.O., KUNKELL, R. et BEAUCHAMP, C. (1983) *J. Clin. Invest.* 72, 789-801.
- WARIN, V., BAERT, F., FOURET, R., STRECKER, G., SPIK, G., FOURNET, B. et MONTREUIL, J. (1979) *Carbohydr. Res.* 76, 11-22.
- WATKINS, W. (1966) *Science* 152, 172-181.
- WEINBERG, E.D. (1974) *Science* 184, 952-956.
- WEINBERG, E.D. (1984) *Physiol. Rev.* 64, 65-93.
- WEISS, L. et FAWCETT, D.W. (1953) *J. Histochem. Cytochem.* 1, 47-65.
- WILEMAN, T., HARDING, C. et STAHL, P.D. (1985) *Biochem. J.* 232, 1-14.
- WILEMAN, T., LENNARTZ, M.R. et STAHL, P.D. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2501-2505.
- WILEMAN, T. et STAHL, P.D. (1984) *Fed. Proc.* 43, 3653.
- WILKINSON, M. et MORRIS, A.G. (1985) In "Mononuclear phagocytes : physiology and pathology" (R.T. Dean et W. Jessup eds.) Elsevier, Amsterdam, pp 161-179.
- WILLIAMS, J., ELLEMAN, T.C., KINGSTON, J.B., WILKINS, A.G. et KUHN, K.A. (1982) *Eur. J. Biochem.* 122, 297-303.
- WILLINGHAM, M.C., HANOVER, J.A., DICKSON, R.B. et PASTAN, I. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 175-189.
- WINKELSTEIN, J.A., SMITH, M.R. et SHIN, H.S. (1975) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 149, 397.
- WINTERBOURN, C.C. (1983) *Biochem. J.* 210, 15-19.
- WOOD, D.D. et GAUL, S.L. (1974) *J. Immunol.* 43, 925-933.
- WYLLIE, J.C. (1977) *Brit. J. Haematol.* 37, 16-24.

YAMASHITA, K., TACHIBANA, Y. et HITOI, A. (1984) Carbohyd. Res. 130, 271-288.

ZUCALI, J.R., BROXMEYER, H.E. et ULATOWSKY, J.A. (1979) Blood 54, 951-954.