

N° d'ordre : 285

50376
1988
237



50376
1988
237

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

par

Wei-Li HU

**ETUDE DU ROLE DE LA LACTOTRANSFERRINE
DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER**

**MODELE MURIN :
ISOLEMENT ET DESCRIPTION DU RECEPTEUR DE LA
LACTOTRANSFERRINE DE SOURIS**

Présentée le 21 Décembre 1988 devant la Commission d'Examen

Président :	J.	MONTREUIL (Rapporteur)
Rapporteur :	G.	SAWATZKI
Examineur :	D.	LOUVARD
Examineur :	J.P.	ROUSSEAU
Examineur :	G.	SPIK

Ce travail a été réalisé sous la direction de Madame le Professeur Geneviève Spik et de Monsieur le Docteur Joël Mazurier dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois (Unité Associée au CNRS n°217, Directeur: Professeur Jean Montreuil)

A mes parents et mes amis

A Monsieur le Professeur J. Montreuil,

Vous avez bien voulu m'accueillir dans votre Laboratoire et me confier ce travail que j'ai réalisé avec le plus grand plaisir. Vous m'avez permis de partager la vie du C9 et de bénéficier de votre dynamisme et de votre haute compétence scientifique. Je voudrais vous exprimer ma plus vive gratitude pour la confiance que vous m'avez témoignée. Permettez-moi de joindre à ma profonde reconnaissance mon respectueux attachement.

A Madame le Professeur G. Spik,

Je te remercie de m'avoir accueilli dans ton groupe et d'avoir guidé mes premiers pas dans le "iron field". Tes grandes connaissances et ton ardeur au travail en tant que "french iron lady" m'ont profondément marqué. J'ai beaucoup bénéficié de ton expérience et de ta compétence scientifique. J'ai toujours trouvé auprès de toi beaucoup de gentillesse, de disponibilité et de compréhension. Sois assurée de ma profonde reconnaissance et de mon amitié.

Sehr geehrter Herr Doktor G. Sawatzki,

Ihre Anwesenheit in dieser Jury betrachte ich als große Ehre. Für die Überlassung von Lactotransferrin der Maus und die wertvollen Diskussionen möchte ich Ihnen hiermit meinen aufrichtigen Dank sagen.

A Monsieur le Professeur J.P. Rousseau,

Malgré vos nombreuses occupations, vous avez bien voulu vous intéresser à notre travail et nous faire l'honneur de juger notre mémoire de DEA ainsi que cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements et soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur D. Louvard,

Je tiens à vous exprimer mes plus vifs remerciements pour avoir accepté de me faire l'honneur de juger ce travail et pour l'intérêt que vous avez bien voulu lui porter.

A Monsieur le Docteur J. Mazurier,

Tu as bien voulu me guider tout au long de ce travail en me faisant bénéficier de ton expérience et de ta compétence scientifique. Par tes conseils et par ta constante sollicitude, par ta patience et par ta gentillesse, tu m'as permis de mener à bien cette étude. Soit assuré de ma sincère reconnaissance et de mon amitié.

Je remercie très sincèrement Didier-Breton, Bernadette, Annick et Jean-Pierre. Leurs conseils et leur aide, prodigués avec une grande gentillesse, m'ont été très bénéfiques. Qu'ils soient assurés de toute mon amitié.

Mes remerciements s'adressent à Bruno, Didier-Cocoboy, Dominique et tous les occupants du 103 dont l'aide et les conseils m'ont toujours été très précieux et qui ont su donner au groupe l'ambiance chaleureuse et amicale dans laquelle ce travail a été réalisé. Qu'ils trouvent ici l'expression de mon amitié.

Je tiens à remercier Jo, Michèle et Christine pour leur dévouement et leur aide qui m'ont permis de réaliser ce mémoire dans de bonnes conditions.

Par ailleurs, que ce mémoire soit pour moi l'occasion d'exprimer ma plus profonde reconnaissance à tout ceux qui par leur aide et leur gentillesse ont contribué à sa réalisation.

J'exprime ma reconnaissance au gouvernement de mon pays pour l'aide précieuse qu'il m'a accordée en finançant mon séjour de 4 années en France, ainsi qu'au Centre National de la Recherche Scientifique qui, en me faisant bénéficier d'un poste rouge, me permet de prolonger de 6 mois mon séjour.

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

ASD	: 2-(p-azido-salicylamido)-1,3'-dithiopropionate
cDNA	: acide désoxyribonucléique complémentaire
Con A	: concanavaline A
cpm	: coups par minute
DFP	: diisopropyl fluorophosphate
DOC	: désoxycholate
DTT	: dithiotréitol
EDTA	: acide éthylène diamine tétraacétique
Hepes	: acide (N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique)
IgG	: immunoglobuline G
kDa	: kilodalton
PHA-L	: phytohémagglutinine (leucoagglutinine)
LTFh	: lactotransferrine humaine
LTFm	: lactotransferrine murine
Mes	: acide N-2 morpholino-éthanesulfonique
Mops	: Acide N-3 morpholinopropane sulfonique
mRNA	: acide ribonucléique messenger
OG	: octyl- β -D-glucoside
PAGE	: électrophorèse en gel de polyacrylamide
PBS	: tampon phosphate mono/disodique 10 mM, chlorure de sodium 145 mM, pH 7,4
PMSF	: phénylméthylsulfofluorure
PVP-40	: polyvinylpyrrolidone de masse moléculaire 40 kDa
SASD	: sulfosuccinimidyl 2-(p-azido-salicylamido)-1,3'-dithiopropionate
SDS	: sodium dodécylsulfate
Tris	: tris-(hydroxyméthyl) aminométhane
TBS	: tampon Tris/HCl 50 mM, chlorure de sodium 150 mM, pH 7,4

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

GENERALITES

MORPHOLOGIE FONCTIONNELLE DE L'INTESTIN GRELE

I. CONSIDERATIONS ANATOMIQUES	6
II. CONSIDERATIONS HISTOLOGIQUES	7
A - <u>Epithélium cryptique</u>	7
B - <u>Epithélium villositaire</u>	9
III. ARCHITECTURE DE L'ENTEROCYTE	9
A - <u>Bordure en brosse</u>	9
B - <u>Membrane basolatérale</u>	17
C - <u>Autres particularités de l'entérocyte</u>	17
D - <u>Prolifération et régénération de l'entérocyte</u>	18
CONCLUSIONS	19

STRUCTURE ET CONFORMATION DES LACTOTRANSFERRINES

I. ETUDE DE LA PARTIE PROTEIQUE	20
A - <u>Séquence peptidique</u>	20
1 - Lactotransferrine humaine	20
2 - Lactotransferrine bovine	20
3 - Lactotransferrine murine	20
B - <u>Lobes N- et C-terminaux</u>	21
C - <u>Emplacement des ponts disulfures</u>	21
D - <u>Site de fixation du fer</u>	24

II. ETUDE DE LA PARTIE GLYCANNIQUE	26
A - <u>Localisation des glycanes sur la chaîne peptidique</u>	26
1 - <i>Lactotransferrine humaine</i>	26
2 - <i>Lactotransferrine bovine</i>	26
3 - <i>Lactotransferrine murine</i>	26
B - <u>Structure des glycanes</u>	27
1 - <i>Lactotransferrine humaine</i>	27
2 - <i>Lactotransferrine bovine</i>	27
3 - <i>Lactotransferrine murine</i>	29
C - <u>Conformation des glycanes</u>	29
CONCLUSIONS	33

ROLE BIOLOGIQUE DES LACTOTRANSFERRINES

I. LOCALISATION DE LA LACTOTRANSFERRINE	34
A - <u>Localisation dans le lait</u>	34
B - <u>Localisation au niveau du tractus digestif</u>	35
C - <u>Autres localisations</u>	35
II. ROLE DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS LE TRACTUS GASTRO-INTESTINAL DES NOURRISSONS	36
A - <u>Survie de la lactotransferrine dans le tractus gastro-intestinal des nourrissons</u>	36
B - <u>Rôle dans la protection de la muqueuse intestinale</u>	36
C - <u>Rôle dans le développement du tractus gastro-intestinal</u>	37
D - <u>Rôle dans la nutrition martiale des nourrissons</u>	38
III. ROLE DANS L'IMMUNITE A MEDIATION CELLULAIRE	39
CONCLUSIONS	45

METABOLISME GENERAL DU FER

I. PROPRIETES DES IONS FERREUX ET FERRIQUES	46
II. LE FER DANS L'ORGANISME DES MAMMIFERES	47
A - <u>Forme fonctionnelle du fer</u>	47
B - <u>Forme de réserve du fer</u>	47
C - <u>Forme de transport du fer</u>	49
III. RECEPTEURS DES TRANSFERRINES	50
A - <u>Récepteur de la sérotransferrine</u>	50
1 - <i>Structure et propriétés du récepteur de la sérotransferrine</i>	50
2 - <i>Mécanisme d'incorporation du fer par les cellules</i>	51
3 - <i>Localisation du récepteur de la sérotransferrine</i>	53
B - <u>Récepteur de la lactotransferrine</u>	53
CONCLUSION	56

ABSORPTION INTESTINALE DU FER

I. FACTEURS LIES A L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER	57
II. MECANISME DE L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER	64
A - <u>Phase intraluminale</u>	64
B - <u>Passage à travers la muqueuse</u>	64
C - <u>Fixation et incorporation par l'épithélium</u>	65
1 - <i>Rôle de la sérotransferrine</i>	66
2 - <i>Rôle de la lactotransferrine</i>	68
D - <u>Transfert du fer à travers la cellule mucosale</u>	69
E - <u>Libération du fer dans le plasma</u>	70
III. REGULATION DE L'ABSORPTION DU FER	71
A - <u>Sécrétions gastro-intestinales</u>	71
B - <u>Rôle des cellules épithéliales</u>	71
C - <u>Rôle des macrophages du chorion villositaire</u>	72
D - <u>Facteurs humoraux</u>	74

TRAVAUX PERSONNELS

MISE EN EVIDENCE in vivo DU ROLE DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER

I. INTRODUCTION	76
II. MATERIELS ET METHODES	77
A - <u>Matériels</u>	77
B - <u>Méthodes</u>	77
1 - Etude <i>in vivo</i> de l'absorption intestinale du fer de la lactotransferrine	77
2 - Chromatographie de tamisage moléculaire	78
III. RESULTATS	78
A - <u>Mise en évidence de la non-dégradation du complexe fer-lactotransferrine au cours de la mesure de l'absorption intestinale</u>	79
B - <u>Absorption du fer à partir de la lactotransferrine de Souris</u>	79
IV. CONCLUSION ET DISCUSSION	82

MISE EN EVIDENCE D'UN RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LA BORDURE EN BROsse DES ENTEROCYTES DE SOURIS

INTRODUCTION	84
--------------	----

LACTOTRANSFERRIN RECEPTOR OF MOUSE SMALL-INTESTINAL BRUSH BORDER
BINDING CHARACTERISTICS OF MEMBRANE-BOUND AND Triton X-100
SOLUBLIZED FORMS

Tirage à part du mémoire paru dans Biochem. J. (1988) 249, 435-441

**VISUALISATION DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE PAR LA
METHODE DE L'ELECTROTRANSFERT ET DE FIXATION DU LIGAND**

I. INTRODUCTION	94
II. MATERIELS ET METHODES	94
A - <u>Electrophorèse en présence de détergents non-dénaturants</u>	94
B - <u>Electrotransfert sur feuille de nitrocellulose</u>	95
C - <u>Visualisation du récepteur de la lactotransferrine</u>	95
III. RESULTATS	95
A - <u>Séparation des protéines membranaires par OG-DOC-PAGE</u>	95
B - <u>Visualisation du récepteur</u>	97
IV. CONCLUSIONS ET DISCUSSION	97

**ETUDE DE L'INTERACTION LACTOTRANSFERRINE-RECEPTEUR
A L'AIDE D'UN REACTIF BIFONCTIONNEL**

I. INTRODUCTION	99
II. MATERIELS ET METHODES	101
A - <u>Synthèse de [¹²⁵I]-ASD-LTFm</u>	101
B - <u>Pontage de [¹²⁵I]-ASD-LTFm avec le récepteur membranaire</u>	101
C - <u>Electrophorèse en gel de polyacrylamide</u>	102
III. RESULTATS	102
A - <u>Photolyse du complexe ASD-LTFm</u>	102
B - <u>Pontage de la lactotransferrine avec son récepteur</u>	104
IV. CONCLUSION ET DISCUSSION	104

ISOLEMENT DU RECEPTEUR INTESTINAL DE LA LACTOTRANSFERRINE

I. INTRODUCTION	107
II. MATERIELS ET METHODES	108
A - <u>Préparation de la membrane de la bordure en brosse</u>	108
B - <u>Préparation de la lactotransferrine immobilisée sur gel d'agarose</u>	108
C - <u>Marquage des protéines membranaires à l' [¹²⁵I]</u>	108
D - <u>Inactivation des protéases</u>	109
E - <u>Traitement par EDTA</u>	109
F - <u>Solubilisation des protéines membranaires</u>	109
G - <u>Chromatographie d'affinité sur LTFh-Reacti-Gel</u>	109
H - <u>Préparation de l'antisérum anti-récepteur de la lactotransferrine</u>	110
I - <u>Préparation de la colonne d'immuno-absorbant</u>	110
J - <u>Isolement du récepteur par immuno-absorption</u>	111
K - <u>Dosage des protéines membranaires</u>	111
L - <u>Mesure de l'activité du récepteur solubilisé</u>	111
III. RESULTATS	111
A - <u>Purification du récepteur par chromatographie sur LTFh-Reacti-Gel</u>	111
B - <u>Activité du récepteur purifié par chromatographie sur LTFh-Reacti-Gel</u>	113
C - <u>Purification du récepteur par immuno-absorption</u>	113
IV. CONCLUSION ET DISCUSSION	113

ETUDE DES PROPRIETES DU RECEPTEUR INTESTINAL DE LA LACTOTRANSFERRINE

I. INTRODUCTION	117
II. MATERIELS ET METHODES	118
A - <u>Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide</u>	118
B - <u>Iso-électrofocalisation (IEF)</u>	118

C - <u>Interaction avec des lectines après électrotransfert</u>	118
D - <u>Déglycosylation par des</u> <u>endo-N-acétyl-β-D-glucosaminidases</u>	119
E - <u>Déglycosylation par la N-glycanase</u>	119
III. RESULTATS	119
A - <u>Masse moléculaire du récepteur</u>	119
B - <u>Point isoélectrique du récepteur</u>	121
C - <u>Nature glycoprotéinique du récepteur</u>	121
D - <u>Déglycosylation par les endoglycosidases</u>	121
IV. CONCLUSION ET DISCUSSION	125

CONCLUSIONS GENERALES

APPENDICE TECHNIQUE

I. PREPARATION DES PROTEINES	131
A - <u>Préparation de la lactotransferrine de Souris</u>	131
B - <u>Préparation de la lactotransferrine humaine et bovine</u>	131
C - <u>Saturation en fer des transferrines</u>	132
D - <u>Préparation de l'apo-lactotransferrine</u>	130
II. PREPARATION DES VESICULES DE LA BORDURE EN BROSSE DE L'INTESTIN DE SOURIS	132
III. METHODE DE DOSAGE	133
A - <u>Mesure de la fixation de la lactotransferrine sur le</u> <u>récepteur solubilisé</u>	133
B - <u>Dosage de protéines</u>	135
IV. MARQUAGE RADIOACTIF DES PROTEINES	136
A - <u>Marquage des transferrines à l' [¹²⁵I]</u>	136
B - <u>Marquage des protéines membranaires à l' [¹²⁵I]</u>	136
C - <u>Marquage de la lactotransferrine au [⁵⁹Fe]</u>	136

V. METHODES ELECTROPHORETIQUES	137
A - <u>Electrophorèse en gradient de gel polyacrylamide</u> <u>en présence de SDS</u>	137
B - <u>Electrotransfert sur feuille de nitrocellulose</u> <u>(Western blot)</u>	137
VI. COLORATION DES PROTEINES DANS LE GEL DE POLYACRYLAMIDE PAR LE NITRATE D'ARGENT	138

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Le fer est l'un des éléments inorganiques indispensables aux organismes vivants. Il entre dans la constitution de protéines impliquées dans des processus métaboliques fondamentaux : le transport des gaz O_2 et CO_2 et la production d'ATP par la mitochondrie (transport d'électrons). Ces molécules protéiques sont de deux types : les protéines héminiques qui présentent du fer lié à un groupement prosthétique (hémoglobine, myoglobine et cytochromes) et les protéines non héminiques dont le fer est lié directement aux protéines (ferritine, sérotransferrine, lactotransferrine, NADH déshydrogénase...). Chez les Mammifères, la concentration en fer reste relativement constante tout au long de la vie. Cela est réalisé en maintenant un bilan de fer positif pendant la croissance et en établissant un équilibre entre l'absorption et la perte du fer chez l'adulte. L'absence de régulation de la sécrétion martiale implique l'importance de l'absorption dans l'homéostasie du fer.

La découverte de la lactotransferrine humaine dans le lait de Femme (MONTREUIL et al., 1960a,b) a ouvert la voie, au Laboratoire, à un ensemble de recherches qui portent sur l'étude structurale des lactotransferrines ainsi que sur l'étude de leur rôle biologique, en particulier leur rôle dans l'absorption intestinale du fer.

En effet, dès 1960, MONTREUIL et al. (1960) ont émis l'hypothèse selon laquelle la lactotransferrine jouerait un rôle dans l'apport du fer au nourrisson, étant donné que cette protéine est le principal chélateur du fer présent dans le lactosérum de Femme. Plus tard, MONTREUIL (1971) et SPIK (1981), en analysant les différents constituants du lait de Femme et de Vache, ont proposé la lactotransferrine comme le meilleur candidat pour expliquer l'importante bio-disponibilité du fer du lait et la régulation de l'absorption du fer. Cette idée a conduit à de nombreuses études in vitro ou in vivo et fut pendant longtemps le sujet de nombreuses controverses, d'une part, car il n'existe aucun lien entre le taux de fer et le taux de la lactotransferrine dans le lait des différentes espèces animales (MASSON et al.,

1970), d'autre part, car la lactotransferrine inhibe, sous sa forme "apo", in vitro et in vivo, l'absorption des sels de fer (DE LAEY et al., 1968; De VET et Van GOOL, 1974).

Les résultats obtenus au Laboratoire ont marqué une nouvelle étape dans l'étude du rôle de la lactotransferrine dans l'absorption du fer. SPIK et al. (1982) ont mis en évidence la présence de lactotransferrine partiellement dégradée dans les fecès de nourrisson, mais toujours capable de fixer le fer. Ce résultat suggère que la lactotransferrine pourrait assumer son rôle de transporteur jusqu'au bout du tractus digestif du nourrisson. D'autre part, en collaboration avec le groupe du Professeur PETERS, MAZURIER a montré que la lactotransferrine était capable de céder son fer à des biopsies intestinales humaines (COX et al., 1979). Par la suite, MAZURIER et al. (1985), par des essais de fixation et par la technique d'électro-transfert, ont mis en évidence un récepteur de la lactotransferrine sur la membrane apicale de l'entérocyte de Lapin.

Nos travaux s'inscrivent dans le cadre général de la thématique du Laboratoire: "Relations structure-fonction des transferrines" et font suite aux travaux de MAZURIER et al. (1985). La volonté de travailler dans un système homologue nous a conduit à abandonner le Lapin comme modèle, l'obtention de la lactotransferrine de Lapin en quantité suffisante nous ayant posé de nombreux problèmes. Nous nous sommes orienté vers un modèle animal plus accessible, nous permettant, en particulier, d'étudier l'effet de la teneur en fer de l'organisme sur le récepteur de la lactotransferrine. C'est le modèle murin 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.

Face à des données apparemment discordantes obtenues chez différentes espèces (COX et al., 1979; HUEBERS et al., 1983; MAZURIER et al., 1985), il nous a semblé raisonnable de ne pas extrapoler les résultats expérimentaux d'un animal à l'autre. Nous avons ainsi, dans un premier temps, entrepris une étude in vivo visant à vérifier si, chez la Souris, l'absorption du fer pouvait s'effectuer à partir de la lactotransferrine murine.

Nous avons, dans un deuxième temps, mis en évidence un récepteur spécifique de la lactotransferrine et précisé les principaux paramètres des interactions de la lactotransferrine avec son récepteur, soit intégré dans la membrane, soit solubilisé par le Triton X-100.

Après avoir visualisé et ainsi confirmé la présence de ce récepteur, par fixation covalente de la lactotransferrine à l'aide d'un réactif bifonctionnel, nous avons mis au point un protocole nous permettant de purifier le récepteur actif en quantité importante. Nous avons enfin poursuivi notre étude visant à la caractérisation de ce récepteur purifié.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus ont fait l'objet des communications et publications suivantes :

Communications

- 1 - Involvement of lactotransferrin in the intestinal iron absorption : evidence for a specific receptor in mouse mucosa brush-border.
HU W.L., MAZURIER J., MONTREUIL J. & SPIK G.
Eighth International Conference on Proteins of Iron Transport and Storage, May 10-14, 1987, Le Château Montebello, Québec, Canada.
- 2 - Expression of human lactotransferrin receptor on phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes - Isolation of the receptor by antiligand-affinity chromatography.
MAZURIER J., HU W.L., MONTREUIL J. & SPIK G.
Eighth International Conference on Proteins of Iron Transport and Storage, May 10-14, 1987, Le Château Montebello, Québec, Canada.
- 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. & SPIK G.
European Iron Club, September 19-22, 1987, Glasgow, United Kingdom.

Publications

- 1 - Lactotransferrin receptor of mouse small-intestinal brush border.
Binding characteristics of membrane-bound and Triton X-100
solubilized forms.
HU W.L., MAZURIER J., SAWATZKI G., MONTREUIL J. & SPIK G.
Biochem. J. (1988) 249, 435-441.
- 2 - Expression of human lactotransferrin receptor on
phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood
lymphocytes-Isolation of the receptor by antiligand-affinity
chromatography.
MAZURIER J., LEGRAND D., HU W.L., MONTREUIL J. & SPIK G.
Eur. J. Biochem. (1988) sous presse.
- 3 - Isolation and characterization of the lactotransferrin receptor
from mouse intestinal cells.
HU W.L., MAZURIER J., MONTREUIL J. & SPIK G.
J. Biol. Chem. soumis à publication.

GENERALITES

Chez les Mammifères, le fer est toujours conjugué à des protéines, principalement sous trois formes différentes : la forme fonctionnelle, la forme de transport et la forme de stockage.

La lactotransferrine, avec la sérotransferrine, l'ovotransferrine et la mélanomatransferrine, constitue la famille des transferrines, dont le rôle principal est de transporter le fer.

Le fer, élément essentiel aux processus de la vie, est absorbé, chez les Mammifères, par l'entérocyte au niveau de l'intestin grêle.

Notre étude porte essentiellement sur le rôle de la lactotransferrine dans l'absorption intestinale du fer et nous décrirons, dans nos généralités, les principales caractéristiques de l'intestin grêle, en particulier celles de l'entérocyte, la structure et les rôles biologiques de la lactotransferrine et enfin l'absorption intestinale du fer.

MORPHOLOGIE FONCTIONNELLE DE L'INTESTIN GRELE

La plupart des substances alimentaires utilisées par les animaux sont des composants peu solubles et de masse moléculaire élevée. Avant que ces substances puissent être entraînées par la circulation sanguine pour être utilisées par différents tissus, elles doivent subir des changements tels que la réduction de masse moléculaire et l'augmentation de leur solubilité dans l'eau ou au moins de leur miscibilité avec l'eau. Ces changements, appelés digestion, sont essentiellement réalisés dans l'estomac et l'intestin grêle.

Dans ce chapitre, nous nous limitons à décrire quelques aspects importants de la muqueuse intestinale et, en particulier, les caractéristiques structurales et fonctionnelles des cellules épithéliales. Pour plus de détails, nous renvoyons aux revues générales de LOUVARD et al. (1986) et de MADARA et TRIER (1987).

I - CONSIDERATIONS ANATOMIQUES

Le duodénum, le jéjunum et l'iléon possèdent, du point de vue physiologique, de nombreux points communs et peuvent être considérés comme des constituants de l'intestin grêle. Chacune de ces trois portions diffère cependant, des deux autres par sa structure anatomique et histologique, aussi bien que par les caractéristiques de ses fonctions de sécrétion et d'absorption.

La surface luminale est très grande, grâce partiellement au plis concentriques visiblement spirales ou circulaires, appelés "plica circularis". De nombreuses villosités augmentent de 7 à 14 fois la surface de l'absorption (WILSON, 1962). La hauteur et la forme de la villosité peuvent changer en fonction de l'état physiologique et pathologique de l'organisme. Les maladies qui affectent la fonction de la muqueuse perturbent l'architecture de la villosité, réduisant la surface de l'absorption (TIER, 1977), tandis que la lactation et une résection partielle de l'intestin augmentent la hauteur de la villosité et la

surface de l'absorption (HARDING et CAIRNIE, 1975; LICHTENBERGER et TIER, 1979; HANSON et al., 1977; WILLIAMSON, 1978).

II. CONSIDERATIONS HISTOLOGIQUES

La muqueuse intestinale est constituée de trois couches distinctes (Fig.1 p.8), de l'extérieur à l'intérieur : muscularis mucosa, la lamina propria et l'épithélium.

La couche de muscularis mucosa qui sépare la muqueuse de la sous-muqueuse, est formée des cellules musculaires lisses d'une épaisseur de 3 à 10 cellules.

La lamina propria, encadrée au dessus par l'épithélium et au-dessous par la muscularis mucosa, forme le noyau de la villosité et surmonte l'épithélium des cryptes. Les cellules les plus abondantes dans la lamina propria sont les cellules mononucléées du système immunitaire: plasmocytes, lymphocytes et macrophages. En outre, la lamina contient quelques éosinophiles, mastocytes, fibroblastes, fibres nerveuses, vaisseaux sanguins, lymphe et cellules musculaires lisses.

La troisième couche de la muqueuse, la couche en contact direct avec le contenu luminal est l'épithélium. L'épaisseur de cette couche est d'une seule cellule. L'épithélium est séparé de la lamina propria par une membrane fine continue. Selon sa localisation, l'épithélium se divise en deux parties : l'épithélium cryptique et l'épithélium villositaire.

A - ÉPITHÉLIUM CRYPTIQUE

L'épithélium cryptique est formé de cellules non différenciées dont la plupart sont en prolifération, de cellules cupuliformes qui sécrètent le mucus, de cellules endocrines et, dans certaines espèces animales, de cellules de Paneth.

Les fonctions connues de l'épithélium cryptique, sont le renouvellement des cellules épithéliales (cellules non différenciées et jeunes cellules cupuliformes), la sécrétion exocrine dans la lumière intestinale et la sécrétion endocrine.

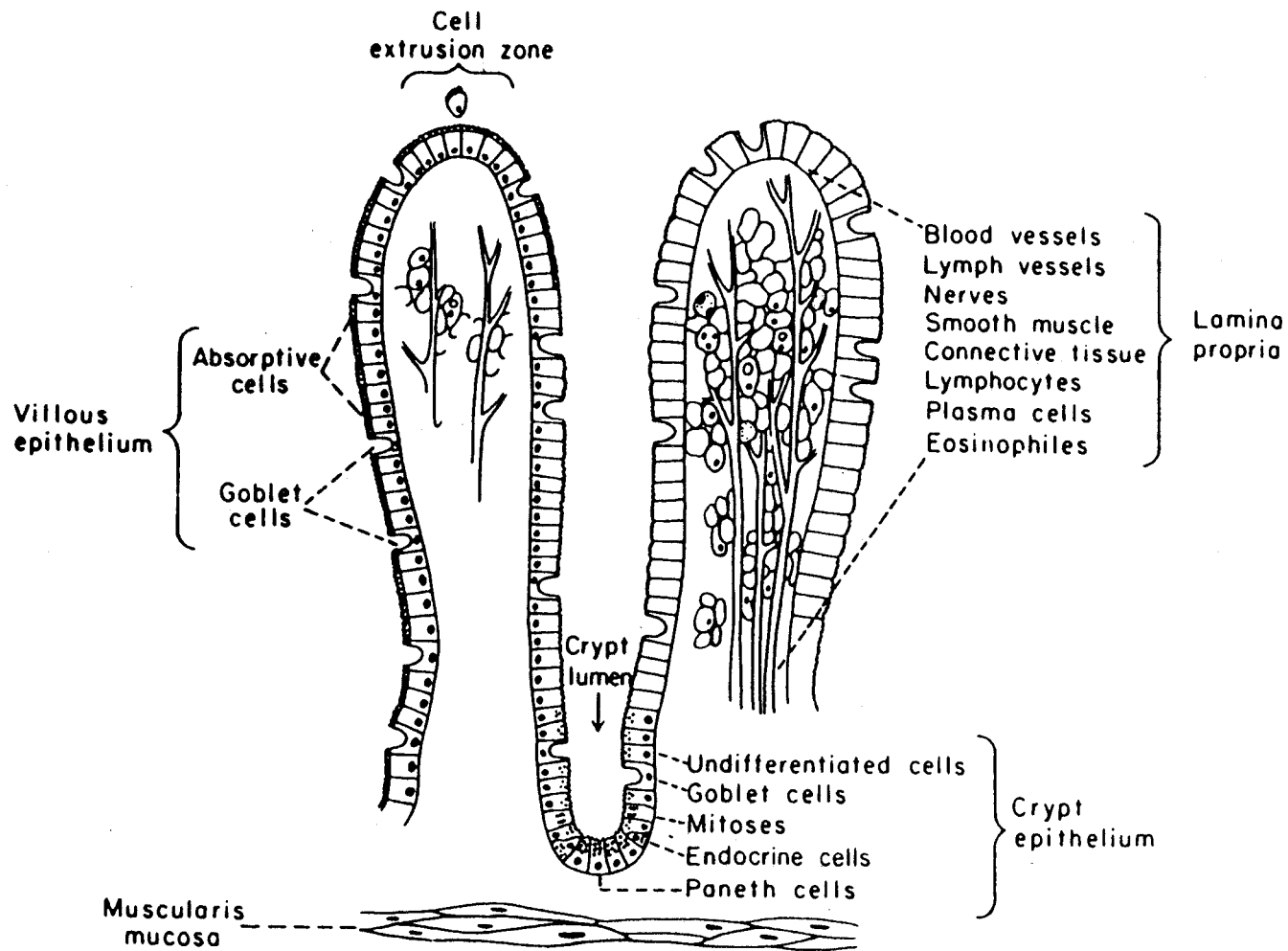


Fig. 1. Schéma de l'organisation histologique de la muqueuse de l'intestin grêle

(D'après MASARA & TRIER, 1987)

B - EPITHELIUM VILLOSAIRE

L'épithélium villositaire contient de nombreuses cellules d'absorption appelées quelquefois les entérocytes, des cellules à mucus et quelques cellules endocrines.

La fonction majeure connue de l'épithélium villositaire est l'absorption. L'exfoliation de l'épithélium intestinal entraîne une perte importante des substances, tel que le fer, et pourrait ainsi constituer un mécanisme homéostatique.

III - ARCHITECTURE DE L'ENTEROCYTE

Les entérocytes sont des cellules très polarisées de forme cylindrique (Fig.2 p.10). Le sommet (face apicale) est hérissée de microvillosités dont l'ensemble forme la bordure en brosse. Les faces latérales portent, à leur extrémité apicale, un dispositif de bandes obturantes qui ferment par en haut les espaces intercellulaires latéraux, ce qui présente une architecture spéciale, caractérisée par des sortes d'engrènements entre faces opposées. L'extrémité basale est en rapport avec le tissu conjonctif, support de l'épithélium et, par là-même, avec le tissu conjonctif général, avec ses vaisseaux sanguins et ses canaux lymphatiques. A ce niveau les entérocytes sont en rapport immédiat avec une membrane basale. Cet ensemble structural conditionne la fonction capitale qui est l'absorption alimentaire et il représente, en outre, une barrière efficace pour l'organisme.

A - BORDURE EN BROSSE

La bordure en brosse (Fig.3 p.11) est constituée par une quantité de microvillosités serrées parallèlement et particulièrement à la surface apicale de la cellule. La forme de ces microvillosités sont assurée par le cytosquelette bien organisé (MOOSEKER, 1985). Un entérocyte possède quelque milliers de microvillosités, ce qui augmente la surface d'absorption par un facteur de 14 à 40 (BROWN, 1962).

Les microvillosités sont recouvertes par une membrane plasmique, émanation de celle de la cellule même. L'espace libre qui les sépare est d'une centaine d'Å environ. Elles ne sont jamais soudées.

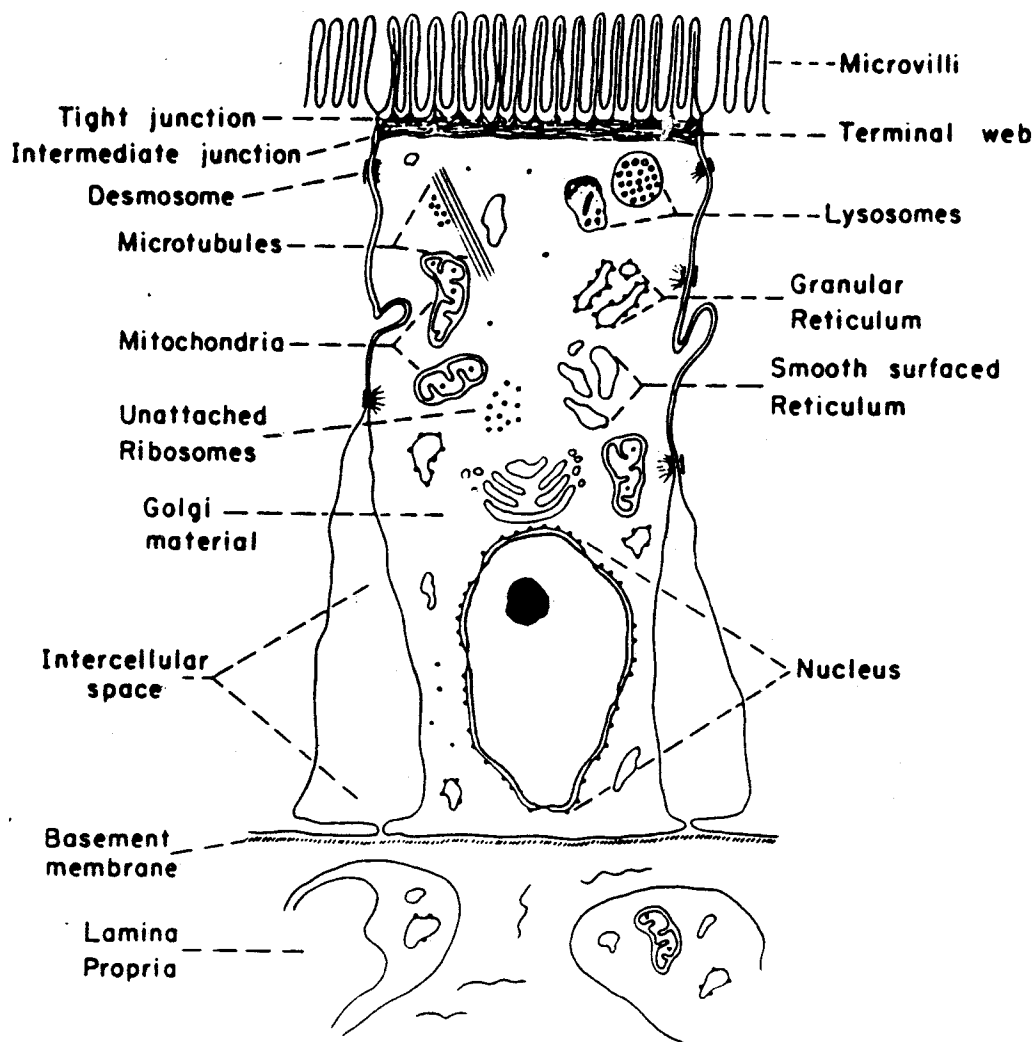
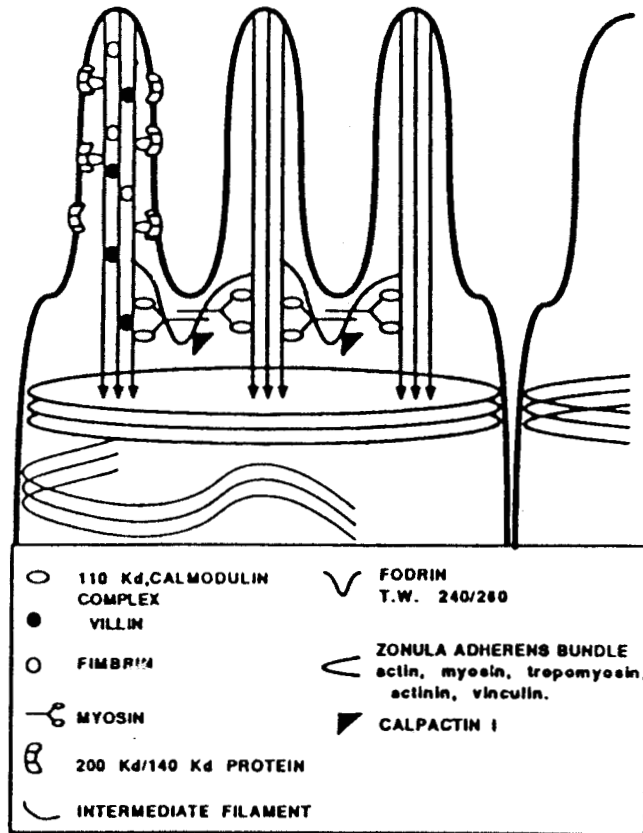


Fig. 2. Diagramme schématique d'un entérocyte

(Selon MASARA & TRIER, 1987)

A



B

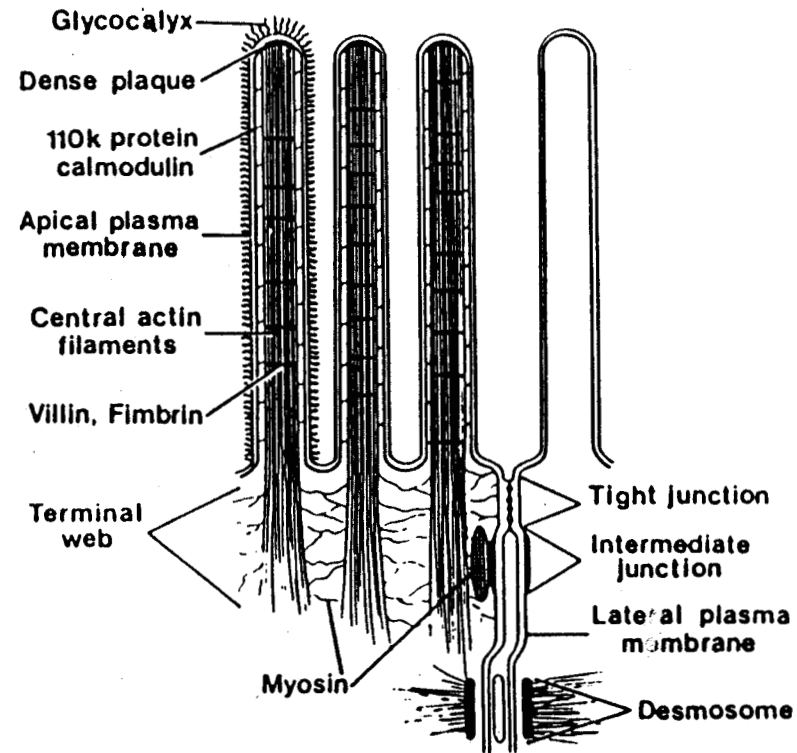


Fig. 3. Diagramme schématique (A) de l'organisation moléculaire du cytosquelette et (B) des structures de la membrane plasmique apicale, du cytoplasme apical et des complexes de jonction de l'entérocyte

(Selon MADARA & TRIER, 1987 et MAROUX et al., 1988)

Au niveau de leur insertion sur le corps cellulaire, la membrane plasmique s'enfonce dans le corps cellulaire en sillons, parfois en courts tubules. Chez les animaux maintenus en état d'inanition, ces sillons se terminent souvent par des vésicules de pinocytose.

La membrane plasmique des microvillosités de la bordure en brosse se présente au microscope électronique comme constituée de deux lignes denses de 40 Å séparées par un espace clair de 25 Å.

La membrane de la bordure en brosse est très riche en protéines et en glycoprotéines (EICHHOLZ, 1968; FORSTNER et WHERRETT, 1973). Son contenu en cholestérol et en glycolipides est relativement important (BOUHOURS et GLICKMAN, 1977; FORSTNER et al., 1968), ce qui pourrait contribuer à la faible fluidité de la membrane de la bordure en brosse (SCHACHTER et SCHINITZKY, 1977).

L'hétérogénéité des protéines microvillositaires a été démontrée par SDS-PAGE : plus de 20 bandes distinctes possédant une masse moléculaire apparente entre 17 kDa et 380 kDa ont été identifiées (ALPERS, 1972; HAURI et GREENE, 1978; QUARONI et al., 1979).

1 - Cytosquelette

Cinq protéines majeures du cytosquelette microvillositaire ont été identifiées et partiellement caractérisées (l'actine, la fimbrine, la villine, la calmoduline et la 110 kDa protéine)(MADARA et TRIER, 1987; MAROUX et al., 1988). Les filaments centraux qui occupent le centre de chaque microvillosité sont constitués d'environ 20 à 30 microfilaments parallèles organisés en hélice (Fig.3 p.11)(BRUNSER et LUFT, 1970; MUKHERJEE et STAEHELIN, 1971; BRESTCHER et WEBER, 1978). Au sommet de la microvillosité, les filaments centraux s'insèrent dans une plaque dense. Ces filaments sont constitués d'actine qui fixe le fragment S_1 de la méromyosine (BRESTCHER et WEBER, 1978). Ces filaments d'actine associés avec le fragment S_1 montre une polarité uniforme (ISHIKAWA et al., 1969; MOOSEKER et TILNEY, 1975; BEGG et al., 1978). Les filaments centraux sont stabilisés par des filaments perpendiculaires de villine (95 kDa) et de fimbrine (68 kDa)(MOOSEKER et TILNEY, 1975).

La fimbrine est actuellement considérée comme la protéine majeure qui maintient la polarité des filaments dans le corps de la microvillosité (MADARA, 1982). Cette protéine peut restreindre la longueur du filament. Les filaments centraux sont associés à la membrane microvillo-

sitaire à l'aide de bras latéraux constitués, en plus des protéines trouvées dans les filaments centraux, d'une protéine de 110 kDa associée avec la calmoduline dans un rapport de 1 : 2 (HOWE et MOOSEKER, 1983; MATSUDIRA et BURGESS, 1979). Le lien entre cette 110 kDa protéine et la calmoduline qui pourrait affecter la stabilité de l'association bras latéral-membrane, est dépendant du calcium (GLENNEY et WEBER, 1980; HOWER et al., 1982). Les travaux récents ont montré que cette 110 kDa protéine possède une activité d'ATPase (MADARA et TRIER, 1987).

Les filaments centraux se continuant dans le cytoplasme en-dessous de la microvillosité forment une racine qui s'associe avec la barre terminale. Les protéines présentes dans cette racine sont partiellement différentes de celles présentes dans les filaments centraux. En plus de la villine, une autre protéine, la tropomyosine, y est présente et la 110 kDa protéine en est absente (BRESTCHER et WEBER, 1978; DRENCKHAHN et GROSHEL-STEWART, 1980). Les racines sont liées entre elles par un pont de myosine (HIROKAWA et al., 1982).

La barre terminale contient une protéine analogue à la spectrine, actuellement identifiée à la TW 260/240 (GLENNEY et al., 1982), qui peut se fixer sur l'actine et la calmoduline. L'actine α et la filamine ont été également identifiées dans la barre terminale.

La barre terminale est stabilisée latéralement par l'insertion de ses filaments dans la membrane latérale au niveau du complexe jonctionnel apical. Un anneau périphérique dense de filaments d'actine entoure la barre terminale (HIROKAWA et al., 1983). Outre les microfilaments, des tonofilaments sont attachés au desmosome sur la membrane latérale et traversent la barre terminale, créant un support qui limite le mouvement vertical de la barre terminale.

Les fonctions du cytosquelette de l'entérocyte sont encore mal connues. Le fait que la bordure en brosse reste intacte après utilisation de techniques d'homogénéisation (MOOSEKER et TILNEY, 1975) suggère que la barre terminale et le cytosquelette microvillositaire stabiliseraient les sommets de l'entérocyte. La motilité de la bordure en brosse pourrait fournir un mécanisme d'agitation mettant en contact permanent le contenu luminal et la surface microvillositaire (SANDSTRÖM, 1971). La barre terminale pourrait servir de piste, guidant les vésicules de l'endocytose issues des cryptes de la microvillosité et les vésicules provenant du Golgi vers leurs destinations (MOOSEKER, 1983).

2 - Glycocalyx

Une particularité de la membrane apicale de l'entérocyte est de posséder une enveloppe relativement épaisse de glycoprotéines sur la surface luminale, appelée glycocalyx (ITO, 1969). Les microvillosités apparaissent comme recouvertes d'un réseau de filaments (fuzzy coat) particulièrement développé chez l'Homme.

Différentes colorations indiquent que le glycocalyx est formé de mucopolysaccharides contenant des groupements carboxyliques et/ou sulfatés. Cette couche ne correspond pas à du mucus adsorbé, mais constitue une structure de la membrane apicale.

Chez l'Homme le glycocalyx est fortement ramifié et forme un réseau dont la taille des mailles a été estimée à 80 Å (ITO, 1969). Il contient de nombreuses charges négatives qui sont capables d'attirer ou de repousser certaines molécules vers la lumière intestinale. Par exemple, des enzymes pancréatiques telles que la trypsine et la chymotrypsine ont été trouvées adsorbées dans le glycocalyx des entérocytes humains. L'immobilisation de ces enzymes dans ce réseau modifie certaines de leurs propriétés. En particulier, leur activité spécifique et leur stabilité sont augmentées.

3 - Enzymes de la bordure en brosse

Le processus de digestion a été localisé au niveau de la membrane de la bordure en brosse des cellules d'absorption. Les trois principales d'enzymes associés à la bordure en brosse sont des hydrolases : des peptidases telles que l'endopeptidase neutre et l'aminopeptidase A, M, P; des glycosidases telles que l'invertase, la maltase, l'isomaltase, la tréhalase et la glucoamylase et, enfin, des phosphatases telles que les phosphatases alcalines. Le rôle de ces enzymes hydrolytiques est de compléter la digestion des nutriments. Certaines d'entre elles transportent leurs substrats ce qui facilite l'absorption, comme c'est le cas de la γ -glutamyltranspeptidase. Ces hydrolases sont des protéines intrinsèques fortement glycosylées (20 % de sucre) et sont les protéines majeures des microvillosités (certaines représentent 5-10 % des protéines microvillositaires) (LOUVARD et al., 1986).

4 - Recepteurs de la bordure en brosse

Plusieurs récepteurs ont été décrits dans la membrane de la bordure en brosse dont certains sont bien caractérisés.

a - *Récepteur des IgG*

L'absorption des IgG présent dans le colostrum et le lait par les nouveau-nés a été intensivement étudiée chez les animaux tels que le Rat, la Souris et la Vache, qui acquièrent une immunité passive partiellement ou entièrement par le passage des anticorps maternels à travers l'intestin grêle (WALKER et ISSELBACHER, 1982). Chez l'Homme, l'immunité passive est dérivée essentiellement du transport intra-utérin des anticorps maternels, l'absorption des IgG à travers l'intestin étant négligable.

L'absorption des IgG chez le Rat et la Souris suit un mécanisme de type transcytose, faisant intervenir un récepteur des IgG, localisé dans les entérocytes logés au sommet des villosités du duodénum et du jéjunum. Le récepteur est spécifique des IgG et reconnaît la région Fc de ces IgG. Son pH optimal pour le ligand est de 6,0. A pH neutre, il est inactif. Chez le Rat, WALLACE et REES (1980) ont mis en évidence 2 types de site de fixation dont l'affinité pour le ligand est de $10^8 M^{-1}$ et $10^6 M^{-1}$, respectivement. L'affinité peut varier également selon les différentes sous-classes d'IgG (HOBBS et JACKSON, 1987). Le nombre de sites par cellule semble important. JAKOI et al. (1985) ont isolé 44 μg de récepteur à partir d'un mg de protéines membranaires. Ce récepteur est constitué de deux sous-unités de 52 et 48 kDa (JAKOI et al., 1985).

b - *Récepteur du facteur intrinsèque*

L'absorption intestinale de la vitamine B₁₂ nécessite l'intervention du facteur intrinsèque, une protéine de masse moléculaire de 50-60 kDa, sécrétée dans l'estomac et qui, en fixant la vitamine B₁₂, est très résistante à la dégradation protéolytique gastro-intestinale (JOCOB et al., 1980).

Le récepteur du facteur intrinsèque a été localisé dans la membrane microvillositaire de l'entérocyte iléal (DONALDSON et al., 1967). L'interaction du complexe facteur intrinsèque-vitamine B₁₂ avec le

récepteur est Ca^{++} et pH dépendante (DONALDSON et al., 1967; HOOPER et al., 1973) avec un optimum autour de pH 7,4 (HOOPER et al., 1973; KATZ et COOPER, 1974).

Le récepteur a été isolé à partir de plusieurs espèces animales. Il est constitué de deux sous-unités dont l'une de 70-90 kDa et l'autre de 130-140 kDa (KOUVONEN et GRASBEECK, 1979). Cependant, le mécanisme moléculaire d'action de ce récepteur est de nos jours encore mal connu.

c - Récepteur de l'hème

Chez l'Homme et chez certains animaux, l'absorption du fer héminique est meilleure que celle des sels de fer et varie très peu quelque soit les autres composants alimentaires (HALLBERG et SÖLVELL, 1964). En effet, l'absorption du fer héminique suit un mécanisme faisant intervenir un récepteur membranaire de la bordure en brosse de l'entérocyte au niveau du duodénum et du jéjunum. Chez le Porc, ce récepteur est constitué d'une seule chaîne peptidique de masse moléculaire de 16 kDa (MAJURI et al., 1983) qui possède une affinité pour l'hème de l'ordre de 10^6 - 10^7 M^{-1} (GRÄSBECK et al., 1979). Le fer internalisé est libéré du cycle porphyrinique sous l'effet d'un enzyme : l'hème oxygénase (TENHUNEN et al., 1964).

c - Récepteur du calcium

En 1980, KOWARSKI et SCHACHTER (1980) ont isolé une protéine fixatrice du calcium : l'"Intestinal Membrane Calcium-binding Protein" ou IMCal, à partir de la membrane de la bordure en brosse de l'intestin de Rat. En présence de désoxycholate ou de n-butanol, IMCal est associée au complexe Ca^{++} -phosphatase alcaline ATPase. La masse moléculaire de cette protéine est de 200 kDa par gel-filtration en présence de Triton X-100 et de 20,5 kDa en SDS-PAGE. L'affinité de cette protéine pour le calcium est estimée à $2,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

KOWARSKI et SCHACHTER (1980) ont constaté que la quantité de cette protéine dépend du degré d'absorption du calcium. Ils ont ainsi suggéré que cette protéine pourrait être impliquée dans l'entrée du calcium en formant un canal calcique composé par les sous-unités de 20,5 kDa.

d - Récepteur de l'insuline et de l'EGF

BERGERON et al.(1980), par autoradiographie quantitative, et GALLO-PAYET et HUGON (1984), par des essais de fixation, ont mis en évidence la fixation de l'insuline sur la bordure en brosse de l'intestin de Rat et de Souris, suggérant ainsi la présence d'un récepteur.

La présence du récepteur de l'EGF (epidermal growth factor) sur la bordure en brosse de l'intestin a été suggéré par des essais analogues (GALLO-PAYET et HUGON, 1985).

B - MEMBRANE BASOLATERALE

La membrane basolatérale diffère de la membrane apicale du point de vue morphologique, biochimique et fonctionnel. La composition biochimique de la membrane basolatérale de l'entérocyte est en relation avec les fonctions spécialisées de cette dernière dans les processus de transport intestinal. Il est bien connu actuellement que la membrane basolatérale possède une activité spécifique très élevée de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - ATPase (DOUGLAS et al., 1972), ce qui accentue l'importance de cette membrane dans le transport de l'eau et des électrolytes.

Récemment, BANERJEE et al.(1986) ont localisé par des méthodes immunocytochimiques un récepteur de la sérotransferrine sur la membrane basolatérale de l'épithélium cryptique et de la villosité. Le rôle de ce récepteur dans le transport du fer est encore mal connu. BANERJEE et al.(1986) pensent qu'il joue un rôle dans l'acquisition du fer par l'entérocyte, alors que JOHNSON et al.(1983) optent pour une libération dans le plasma, du fer absorbé.

C - AUTRES PARTICULARITES DE L'ENTEROCYTE

Les mitochondries sont très abondantes dans l'entérocyte. Il a été montré que, chez le Rat, le nombre de mitochondries est deux fois plus important que dans les cellules cryptiques non différenciées (JEYNES et ALTMANN, 1975). Ce phénomène est lié, d'une part, à l'absorption et, d'autre part, au renouvellement important des protéines.

Le cytoplasme de l'entérocyte contient un nombre considérable de lysosomes. Ces lysosomes renferment plusieurs hydrolases acides telle que la phosphatase acide (HUGON et BORGERS, 1968). Les lysosomes primaires nouvellement formés sont apparemment issus de l'appareil de Golgi (MOE, et al., 1965) d'où ils migrent vers d'autres endroits de la cellule, plus particulièrement vers le cytoplasme sub-apical juste au-dessous de la bordure en brosse. CARDELL et al. (1967) et RHODES et KARNOVSKY (1971) ont observé que des macromolécules comme la ferritine ou la peroxydase entrent dans l'entérocyte par endocytose via la membrane apicale entre les microvillosités. Ces endosomes traversent le "terminal web" et arrivent au cytoplasme sub-apical où ils fusionnent avec les lysosomes.

Une autre particularité de l'entérocyte est la vitesse avec laquelle la cellule renouvelle ses protéines membranaires.

L'autoradiographie, après mise en présence de l'entérocyte avec des précurseurs de glycoprotéines comme [^3H] glucose, [^3H] mannose, [^{35}S] sulfate, [^3H] galactose ou [^3H] glucosamine a révélé l'apparition des macromolécules radioactives dans la région du réticulum endoplasmique et du Golgi au cours des 10 premières minutes d'exposition. Le marquage est abondant dans la région de la bordure en brosse en 20 à 60 min chez les Rongeurs (BENETT et LEBLOND, 1970) et en 90 min chez l'Homme (GINSEL et al., 1979). Le renouvellement des protéines de la membrane basolatérale est également très rapide (QUARONI et al., 1979).

D - PROLIFERATION ET REGENERATION DE L'ENTEROCYTE

Les entérocytes, les cellules cupuliformes, les cellules entérochromaffines et les cellules de Paneth sont issues de la même cellule souche.

Après la mitose, les cellules épithéliales des glandes de Lieberkühn migrent progressivement du fond des glandes vers le sommet des villosités. Au cours de ce trajet, elles repoussent dans la lumière intestinale les cellules qui se trouvent au sommet des villosités. Une différenciation morphologique et fonctionnelle a lieu graduellement au cours de la migration.

La vitesse de la migration des cellules vers le sommet de la villosité est telle que le remplacement complet des cellules

villositaires est réalisé en approximativement 2 à 3 jours. Chez l'Homme, le temps de renouvellement est estimé à 4-6 jours (WEINSTEIN, 1974).

La vitesse normale de la production des cellules dans l'intestin grêle de Rat et de Souris, dans des conditions normales, a été estimée à 10^8 cellules par jour (ALTMANN et ENESCO, 1967; HAGEMANN et al., 1970).

Des facteurs très variés, exogènes ou endogènes, peuvent influencer la cinétique de formation des cellules intestinales. Différents facteurs trophiques contrôlent aussi bien le développement que l'atrophie de la muqueuse (DIAMOND et KARASOV, 1983).

La grossesse et la lactation sont associées à une augmentation de la surface de l'absorption résultant de l'augmentation de la longueur de l'intestin et de la hauteur de la villosité. L'intestin répond de la même manière au diabète sucré. Au contraire, le jeûne conduit à son atrophie.

La plupart des réponses trophiques résultent des effets directs du contenu luminal sur les entérocytes. Il y a aussi des effets indirects causés, d'une part, par des hormones comme la gastrine, le glucagon, l'entérogucagon, la cholecystokine, la sécrétine, l'insuline et la prolactine et d'autre part, par les sécrétions pancréatiques et biliaires et aussi, fort probablement, par le système nerveux périphérique (DIAMOND et KARASOV, 1983).

La flore bactérienne a également un effet sur la régénération des cellules villositaires. En absence de la flore, la surface d'absorption se réduit de 10 à 30 pour cent et le renouvellement de l'épithélium est remarquablement retardé (ABRAMS et al., 1963).

CONCLUSIONS

Ainsi que nous avons pu le remarquer au cours de ce chapitre, l'intestin grêle et, en particulier les entérocytes, possèdent des propriétés particulières, ce qui a pour but de faciliter les processus divers qui accompagnent la digestion et l'absorption.

STRUCTURE ET CONFORMATION DES LACTOTRANSFERRINES

I - ETUDE DE LA PARTIE PROTEIQUE

A - SEQUENCE PEPTIDIQUE

1 - La lactotransferrine humaine

La séquence primaire de la lactotransferrine humaine a été déterminée au Laboratoire en collaboration avec le groupe du Professeur P. JOLLES (METZ-BOUTIGUE et al., 1984). La chaîne peptidique de la lactotransferrine comporte 703 acides aminés et présente une grande homologie de séquence avec celle de la sérotransferrine humaine (59 %) et celle de l'ovotransferrine de poule (49 %) (METZ-BOUTIGUE et al., 1984). L'homologie concerne plus particulièrement les acides aminés basiques, et, plus encore, les acides aminés hydrophobes ou aromatiques dont certains sont impliqués dans les sites de fixation des métaux.

2 - La lactotransferrine bovine

En ce qui concerne la lactotransferrine bovine, les études réalisées jusqu'à présent n'ont permis d'obtenir que des renseignements partiels. GROVES (1960), GORDON et al. (1962), CASTELLINO et al. (1975) et CHERON (1975) ont tous identifié un résidu d'alanine en position N-terminale. MALLET et PLANTEY (1977) ont identifié de la leucine et de la phénylalanine en position C-terminale après hydrolyse par la carboxypeptidase. La détermination de la séquence qui est actuellement réalisée au Laboratoire par séquençage du cDNA a révélée de fortes analogies avec la séquence de la lactotransferrine humaine.

3 - La lactotransferrine murine

En 1986, TENG et al. ont isolé une protéine à partir de l'utérus de souris, dont la synthèse est induite par les oestrogènes. Cette protéine

monocaténaire, portant un seul glycanne et de pI supérieur à 9.5 s'est avérée être la lactotransferrine (PENTECOST et TENG, 1987).

PENTECOST et TENG (1987) ont déterminé la structure primaire de la lactotransferrine de l'utérus de souris et ont mis en évidence que cette séquence présentait 70 % d'homologie avec celle de la lactotransferrine humaine et 56 % avec celle de la sérotransferrine humaine. L'homologie entre la lactotransferrine murine et la sérotransferrine murine n'est que de 50 % (Fig.4 p.22)

B - LOBES N- ET C-TERMINAUX

La lactotransferrine humaine (BLUARD-DECONINCK et al., 1978; MAZURIER et al., 1983), tout comme la sérotransferrine humaine (MAC GILLIVRAY et al., 1982, 1983) et l'ovotransferrine de poule (JELTSCH et CHAMBON, 1982; WILLIAMS et al., 1982), est organisée en deux lobes similaires. La diffraction aux rayons X, après cristallisation de la lactotransferrine humaine (ANDERSON et al., 1987), a confirmé l'existence d'une structure bilobale de la molécule et a montré que le lobe N-terminal comprend les acides animés 1 à 332 et le lobe C-terminal les acides animés 344 à 703. Chaque lobe renferme un glycanne et un site de fixation du fer distant d'environ 42 Å. Les deux lobes sont reliés entre eux, par une hélice contenant dix résidus d'acides aminés. Chaque lobe est divisé en deux domaines de taille égale, N₁ et N₂ pour le lobe N-terminal, C₁ et C₂ pour le lobe C-terminal, ayant des structures secondaires identiques et comprenant chacun environ 160 résidus d'acides aminés (Fig.5 p.23).

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 cystéine dont 12 sont situés dans le lobe N-terminal et 20 dans le lobe C-terminal. Tous les résidus de cystéine sont impliqués dans la construction de ponts disulfures. Le lobe N-terminal contient six ponts disulfures, cinq joignent des résidus de cystéine distants de moins de 45 résidus, alors qu'un seul pont assure la liaison entre deux résidus de cystéine distants de 80 résidus. Ce dernier semble particulièrement important dans la conformation compacte de la molécule. La présence de

A: LLIPSLIFLEALGLCLA-KATTVRWCAVNSSEEEKOLRWQNEMRKVGGPPLSCVKSSSTROCIQATVTR
B: GRRRSVQWCAVSOPEATKCFQWORMRKVRGPVSCIKRDSPIKCIQATAENR

ADAMILDGGIMFDAGKPYKLRPVAAEVYGTKEQPRTHYYAVAVVKNSNFHLNQLQGLRSCHTIGRSA
ADAVILDGGFIYEAGLAPYKLRPVAAEVYGTIERQPRTHYYAVAVVKGGSFOLNELOGLKSCHTGL-RTA

GWKIPIGTLRPFNLWNGPPASLEAVSKIFFSKSCVPGAKDRFPNLSSCAGTGANKCASSPEEFYSGYA
GWNVPIGTLRPFNLWNGPPEPTEAAVR-FVSSASCVPGADKGQFPNLRLCAGTGANKCAFLSKERKFSYS

GALRCLRDNAGDVAFTRGSTVFEELPNKAERDQYKLLCPDNITKPVITEYKECHLAQWPSHAVVSRSINDA
GAFKCLRDGAGDVAFTRESTVFEOLSDAERDEYELLCPDNITKPVDFKFDCHLARVPSHAVVARSVNGK

EETIWELLRQSQEKFGKKQASGFKLFASPSGQKDLLFKESAIGFVRVPQKVDVGLYLTFSYITTSIQNLNK
EDAIWNLRLQSQEKFGKKQSPKFOLEFGSPSGQKDLLFKESAIGFSRVPPRIDSGLYLGSYFTAIQNLNK

KQQ-DVIAASKARVWCAVGSSEKKRKODQWNRDSRGRVTCISFPITTEDCIVAIMKGDADA-MSLDGGYI
SEE-EVAAARRARVWCAVGEOELRKONQWSGLSOGSVTCWSASITTEDCIAVLKGEANASVIMSLDGGYV

YTAGKCGLPVPLAENKSSKSNGLD-CVNRPVEGYLAVAAVRRREDAGFTWSSLRGKKSCHTAVDRTAGW
YTAGKCGLPVPLAENYKSQSSDPDPNCVDRPVEGYLAVAVRRSDITSLTWNSVKGKKSCHTAVDRTAGW

NIPMGLLANQTRSCKNFEFFSQSCAPGADPKSNLCALCIGDEKGENKCAPNSKERYOGYTGAIRCLAENKA
NIPMGLLENQTRSCKNFEFFSQSCAPGSDPRSNLCALCIGDEEKENKCVPSNERNERYOGYTGAIRCLAENA

GNVAFKLDSTVLQNTDGKNTEEWARNLKLKDFELLCLDDTRKPVTEAKNCHLAPNHAHVSRIDKVEVL
GDVAFKLDSTVLQNTDGNNTEAWAKDLKADFAELLCLDGKRKPVTEARSCHLAMAPNHAHVSRIDKVERL

QQVVLDDQVQFGRNGQRCFGEFCLFQSKTKNLLFNDNTECLAKIPGKTTSEKYLKEYVIATERLKQCSS
KQVILLHQAKFGRNGSDCHDKFCLFQSETKNLLFNDNTECLARLHGKTTYEKYLGPOYVAGITNLKCSIT

SPLLEACAFLIQ
SPLLEACEFLRK

Fig. 4. Comparaison des structures primaires de la lactotransferrine de Souris (A) et de la lactotransferrine humaine (B)

(D'après PENTECOST & TENG, 1987)

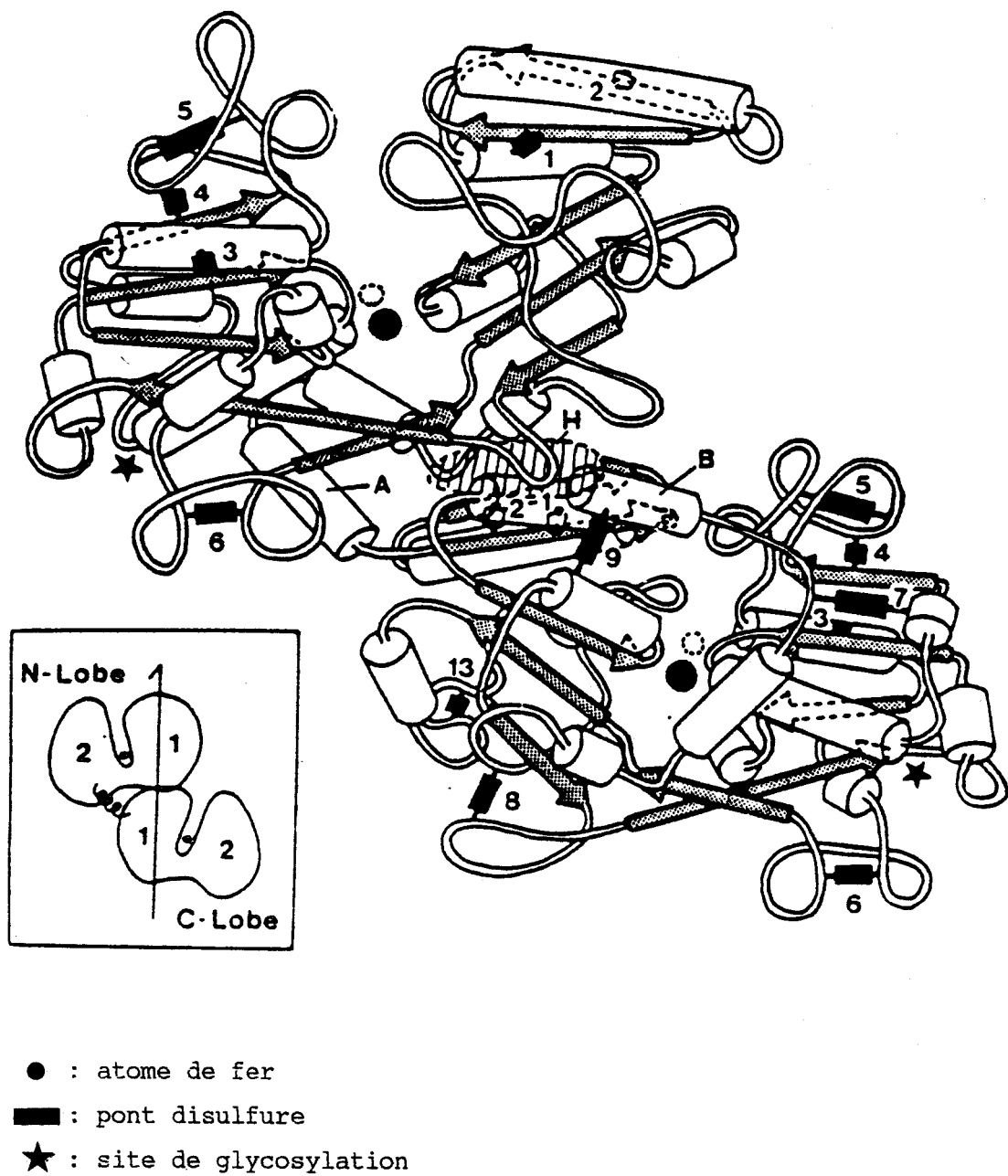


Fig. 5. Conformation spatiale de la molécule de lactotransferrine humaine (D'après ANDERSON et al., 1987)

10 ponts disulfures dans le lobe C-terminal pourrait expliquer la plus grande résistance de ce lobe à la dénaturation et à la protéolyse. Aucun pont disulfure ne relie les deux lobes entre eux.

D - SITE DE FIXATION DU FER

Les transferrines peuvent fixer réversiblement deux atomes de fer de manière réversible avec apparition d'une coloration rose saumon dont le maximum d'absorption est centré à 465 nm (LAURELL et INGELMAN, 1947).

La fixation de chaque ion ferrique nécessite celle 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 être différenciés en un site "acido-labile" situé dans le lobe N-terminal et un autre, "acido-stable", dans le lobe C-terminal (MAZURIER et SPIK, 1980). Cette différence de stabilité peut s'expliquer par la présence d'un plus grand nombre de ponts disulfures dans le lobe C-terminal 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 à cause de leur enfouissement à l'intérieur du lobe C-terminal.

Enfin, récemment, la structure tridimensionnelle de la lactotransferrine humaine, déterminée par diffraction des rayons X à 3,2 Å de cristaux de lactotransferrine humaine (ANDERSON et al., 1987) a permis de proposer un nouveau modèle de la "cage du fer" (Fig.6 p.25). 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+} ($K_a = 10^{20} \text{ M}^{-1}$ pour Fe^{3+} et $K_a = 10^{30} \text{ M}^{-1}$ pour Fe^{2+}) (BAKER et al., 1987).

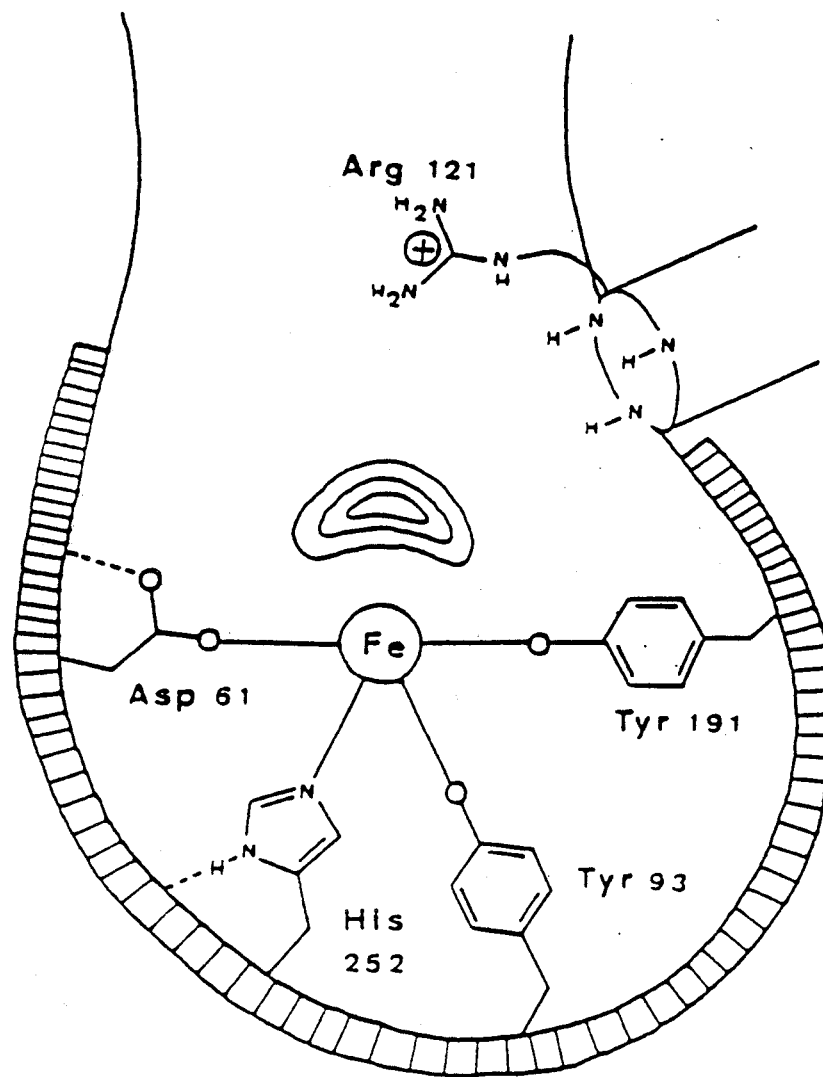


Fig. 6. Conformation de la "cage du fer" de la lactotransferrine humaine (D'après ANDERSON et al., 1987)

II - ETUDE DE LA PARTIE GLYCANNIQUE

A - LOCALISATION DES GLYCANNES SUR LA CHAÎNE PEPTIDIQUE

1 - La lactotransferrine humaine

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 lobe N-terminal (Asn-Trp-Thr 137-139) et l'autre dans le lobe C-terminal (Asn-Gly-Thr 490-492). Deux autres séquences glycosylables dans le lobe C-terminal (Asn-Ala-Ser 389-391 et Asn-Gly-Ser 635-637) ne possèdent pas de glycanne (METZ-BOUTIGUE et al., 1984).

2 - La lactotransferrine bovine

La structure de la chaîne peptidique de la lactotransferrine bovine n'étant pas déterminée, il est difficile de préciser le nombre et la localisation des sites de glycosylation sur cette chaîne. Cependant, les travaux de CHERON (1975) ont permis d'apporter quelques renseignements. Par hydrolyse pronasique, trypsique et chymotrypsique, il a isolé deux glycopeptides dont l'un se trouve dans le lobe C-terminal et renferme la séquence Asn-Gln-Ser.

3 - La lactotransferrine murine

La présence d'un seul glycanne dans la lactotransferrine de Souris a été décrit par LECLERCQ et al. (1987). Sa localisation n'a pas encore été précisée.

Récemment, le séquençage de la lactotransferrine sécrétée par l'utérus de Souris a permis à PENTECOST et TENG (1987) d'identifier deux résidues d'asparagine (Asp 99 et Asp 475) comme étant des sites de glycosylation potentiels. Selon ces auteurs, seule la séquence-code comprenant l'asparagine 475 - présente aussi dans la lactotransferrine humaine et dans l'ovotransferrine - serait glycosylée.

B - STRUCTURE DES GLYCANNES

1 - La lactotransferrine humaine

La nature glycoprotéique de la lactotransferrine humaine a été démontrée par MONTREUIL et MULLET (1960). En 1982, SPIK et al. décrivent l'isolement des glycopeptides porteurs de structures glycaniques différentes. Parmi celles-ci, trois sont présentes en quantités importantes et sont représentées dans la Fig.7 (p.28). Les autres structures, fucosylées, sont plus complexes et sont trouvées en très faible quantités (MAZUMOTO et al., 1982).

Les glycanes présentés dans la Fig.7 (p.28) montrent une structure disialylée ainsi que des structures monosialylées renfermant un ou deux résidus de fucose. L'un de ceux-ci est lié en α -1,6 sur la N-acétyl-D-glucosamine 1, alors que l'autre est lié en α -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 dans le lobe N- ou C-terminal de la lactotransferrine humaine.

La structure des glycanes de la lactotransferrine humaine isolée de leucocytes humains vient d'être déterminée au Laboratoire. L'absence de fucose α -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).

2 - La lactotransferrine bovine

La composition en glucides ainsi que 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 type de glycanes liés N-glycosidiquement à la protéine (CODDEVILLE, 1986).

Les glycanes de type N-acétyllactosaminique biantenné, plus ou moins fucosylés, où un résidu de galactose est remplacé par de la N-acétylgalactosamine, ne représentent que 3 % du mélange total des glycopeptides et ne se retrouvent que dans le lait mature. Contrairement

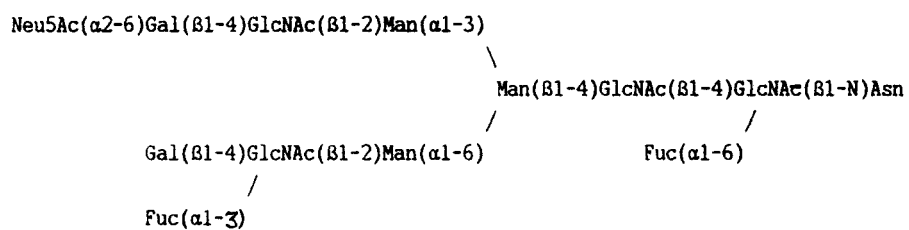
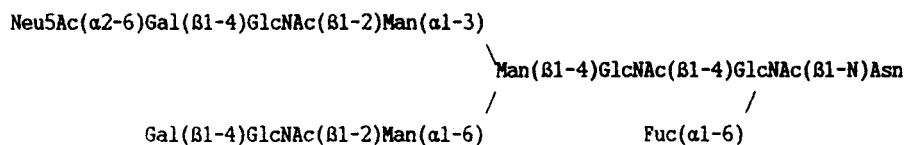
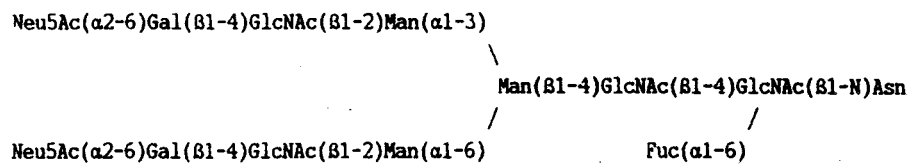


Fig. 7. Structure des glycanes de la lactotransferrine humaine
(D'après SPIK et al., 1982)

à la lactotransferrine humaine, la lactotransferrine bovine contient des glycanes de type oligomannosidique avec 3 à 9 résidus de mannose pour 2 résidus de N-acétylglucosamine (Fig.8 p.30). Les glycanes de type oligomannosidique représentent plus de 50 % des glycanes de la lactotransferrine bovine isolée à partir du colostrum ou de la sécrétion sèche (CODDEVILLE, 1986).

3 - La lactotransferrine murine

La structure du glycanne de la lactotransferrine de Souris a été récemment déterminée au Laboratoire par LECLERCQ et al. (1987). La lactotransferrine de Souris ne possède qu'un seul glycanne de type N-acétyllactosaminique, biantenné, disialylé et partiellement fucosylé en α -1,6 sur la N-acétylglucosamine du point d'attache. Cette structure est identique à celle de la lactotransferrine humaine (SPIK et al., 1982). Cependant, la lactotransferrine humaine possède également des glycanes avec du fucose lié en α -1,3 sur le résidu 5' de N-acétylglucosamine.

C - CONFORMATION DES GLYCANES

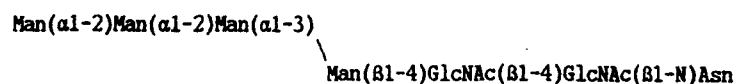
Les études concernant la conformation des glycanes sont récentes. Jusqu'à nos jours, elles pouvaient être considérées comme spéculatives car seuls les modèles moléculaires étaient employés pour donner une image spatiale des glycanes.

1 - Conformation en Y

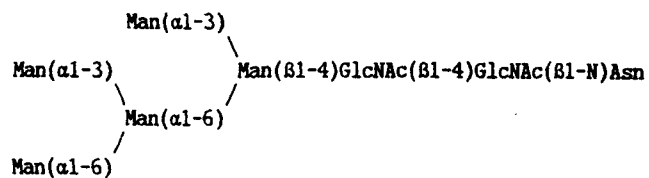
La première image d'un glycanne fut donnée par MONTREUIL en 1975, après construction du modèle moléculaire du glycanne biantenné de la sérotransferrine humaine. En tenant compte des ponts hydrogène susceptibles d'exister sur la molécule, la conformation en Y fut adoptée (Fig.9A p.31).

2 - Conformation en T

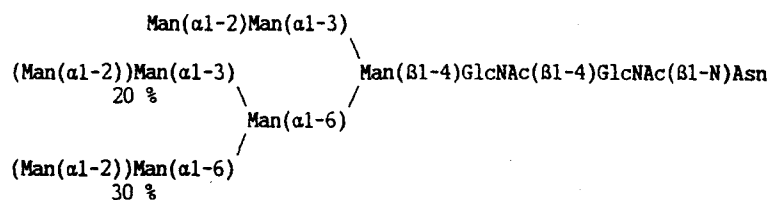
Sur la base d'études de diffraction aux rayons X de cristaux du trisaccharide Man (α 1-3) Man (β 1-4) GlcNAc, MONTREUIL et al. (1979) et



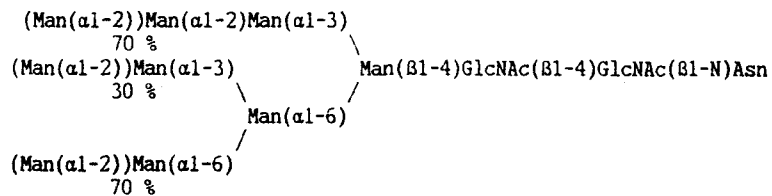
Oligomannoside 1



Oligomannoside 2



Oligomannoside 3



Oligomannoside 4

Fig. 8. Structures des glycanes de type oligomannosidique de la lactotransferrine de Vache (D'après CODDEVILLE, 1986)

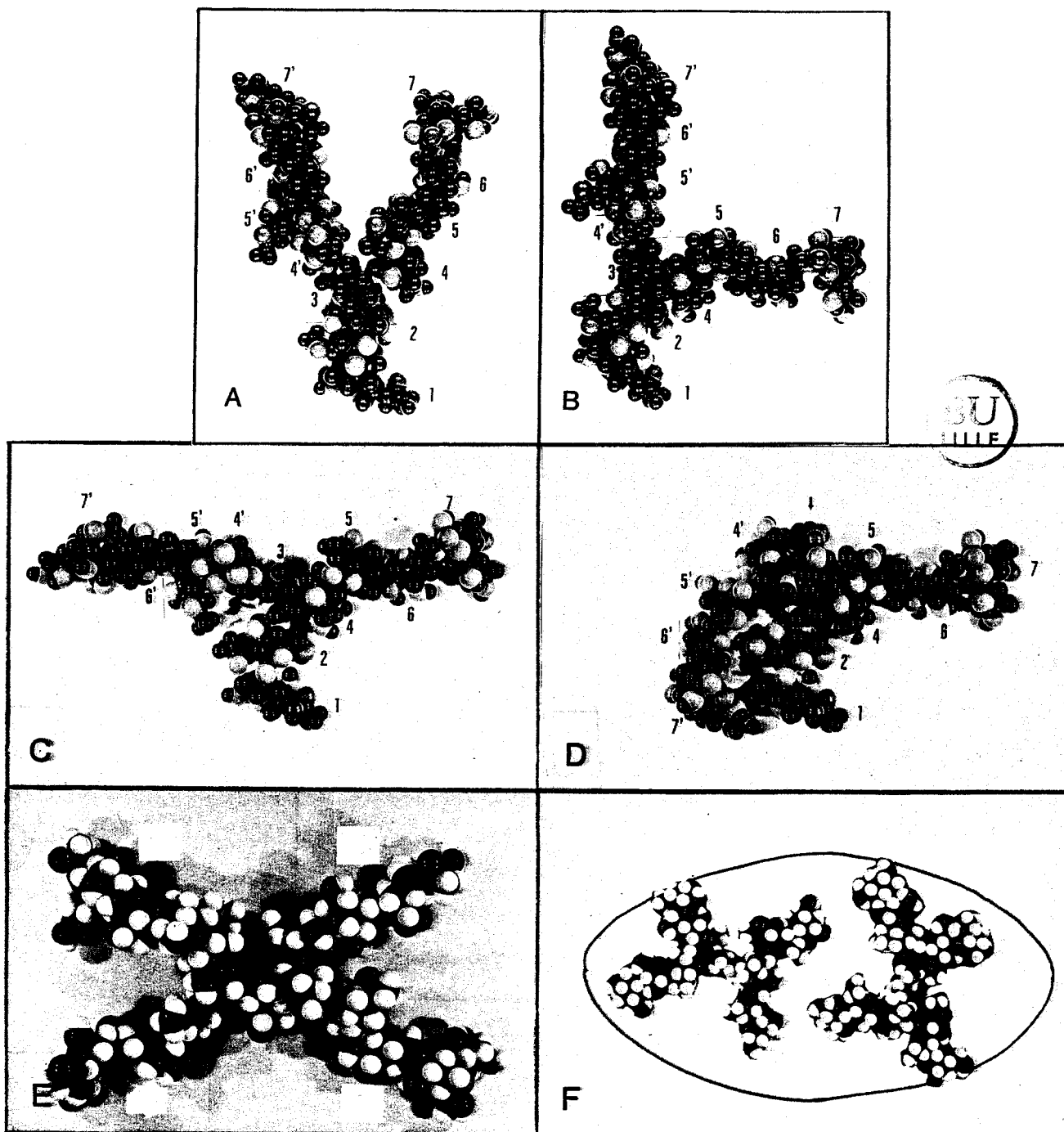


Fig. 9. Modèles moléculaires compacts des glycanes de type
N-acétyllactosaminiques

A : conformation en "Y"

B : conformation en "T"

C : conformation en "oiseau"

D : conformation en "aile brisée"

E : conformation en "parapluie"

F : comparaison de la dimension d'un glycanne biantenné et de la partie
protéique de la sérotransferrine

(D'après MONTREUIL, 1975; 1980a; 1980b; 1982; 1983; 1984; 1986)

WARIN et al. (1979) montrèrent que le mannose lié en α -1,3 était perpendiculaire au plan formé par le disaccharide Man (β 1-4) GlcNAc. L'antenne en α -1,3 est disposée perpendiculairement à l'antenne en α -1,6 d'où la conformation en T proposée par ces auteurs (Fig.9B p.31).

3 - Conformation en "oiseau"

La conformation en "oiseau" a été suggérée par MONTREUIL (1980; 1982; 1983), DEISENHOFER (1981), BOCK et al. (1982) et SUTTON et al. (1983). Cette conformation est obtenue par une large rotation de la branche autour de la liaison α -1,6 du mannose qui oblige les antennes à prendre deux directions opposées.

Ces trois conformations, Y, T et en "oiseau", sont interconvertibles en solution (DOUY et al., 1980a; 1980b). La flexibilité des antennes dans l'espace a été démontrée par DAVOUST et al. (1981). La conformation en "oiseau" est énergiquement la plus favorable (Fig.9C p.31).

4 - Conformation en "aile brisée"

Une conformation en "aile brisée" est proposée par MONTREUIL (1984), à la suite des travaux de BRISSON et CARVER (1983a; 1983b) et MEYER (1983) et dans laquelle la branche liée en α -1,6 subit une large rotation qui la rabat contre le noyau du glycanne (Fig.9D p.31).

5 - Conformation en "parapluie"

Finalement, sur la base de la conformation en "oiseau", MONTREUIL (1982; 1983) propose une structure en "parapluie" pour les glycanes portant une branche supplémentaire sur les mannoses α -1,6 et α -1,3. Toutes les antennes sont disposées perpendiculairement dans le même plan et sont parallèles à la surface de la protéine. Cette conformation a été confirmée par résonance magnétique nucléaire à haut-champ (BOCK et al., 1982) et par diffusion de neutrons aux petits angles (LI et al., 1983) (Fig.9E p.31).

CONCLUSION

Sur le plan structural, les lactotransferrines, en particulier la lactotransferrine humaine, ont fait l'objet de nombreuses études. La séquence peptidique, la structure secondaire, ainsi que la structure des glycanes qu'elles portent sont bien connues. L'analyse récente par la diffraction des rayons X des cristaux a permis d'envisager la conformation spatiale de la protéine. Le modèle moléculaire accompagné des données acquises par les méthodes de résonance magnétique nucléaire à haut-champ et de diffusion de neutrons au petits angles, a permis de prédire la conformation des glycanes.

ROLE BIOLOGIQUE DE LA LACTOTRANSFERRINE

Depuis son premier isolement à partir du lait de femme par MONTREUIL et al. en 1960, parallèlement aux travaux sur sa structure, de nombreux travaux ont été consacrés à la recherche des fonctions de la lactotransferrine. Celles-ci sont multiples (MONTREUIL et al., 1985), en particulier dans la régulation de la myélopoïèse (BIRGENS, 1984), dans les mécanismes de la défense antibactérienne (SPIK et MONTREUIL, 1983) et dans la nutrition martiale des nourrissons et dans l'absorption intestinale du fer (BROCK, 1980; SPIK, 1988).

I - LOCALISATION DE LA LACTOTRANSFERRINE

A - LOCALISATION DANS LE LAIT

La lactotransferrine a été isolée, pour la première fois, à partir du lait de Femme par MONTREUIL et al. (1960a,b), et à partir du lait de Vache par GROVE (1960). Elle est aussi présente dans le lait des autres Mammifères (MASSON et al., 1971).

La concentration de la lactotransferrine dans le lait de Femme est importante et, comme l'ont démontré MASSON et HEREMANS (1966), elle varie au cours de la lactation. Son taux atteint 6 mg / ml dans le colostrum, puis tombe rapidement pour se stabiliser, selon MONTREUIL et al. (1960), à 1 à 2 mg / ml. Dans le lait de Souris, son taux est de 1 mg / ml (KINKADE et al., 1976).

Par contre, la concentration de la lactotransferrine dans le colostrum de Vache est 10 fois inférieure à celle du colostrum de Femme. Dans le lait de Vache, le taux est de 0,2 à 0,3 mg / ml (MASSON, 1970).

B - LOCALISATION AU NIVEAU DU TRACTUS GASTRO-INTESTINAL

La lactotransferrine a été mise en évidence dans la salive (MASSON, 1970) et les sucs biliaire (Van VUGT et al., 1975) et pancréatique (CLEMENTE et al. 1971).

La concentration de la lactotransferrine dans la bile de Lapin est, selon Van VUGT et al.(1975), de 1,6 mg / ml. Lorsque le Lapin est anémique, elle est augmentée de 2 à 3 fois.

Cette concentration chez l'Homme est, cependant, plus faible, 10 µg / ml dans le liquide duodénal (De Vet et Van GOOL, 1974) et 0,7 µg / ml dans le liquide pancréatique (BRUGGE et BURKE, 1988). L'alcoolisme augmente cette concentration de 2 à 5 fois.

La présence de la lactotransferrine à la surface luminale des cellules épithéliales de la muqueuse est bien établie (MASSON et al., 1968; MASON et TAYLOR, 1979; ISOBE et al., 1979; TEDESCHI et al., 1987; LORIMIER, 1987).

Les techniques immunocytochimiques ont permis LORIMIER (1987) de définir la présence de la lactotransferrine sur toute la hauteur de la villosités de la muqueuse des biopsies duodénales humaines et de préciser également une localisation en contact direct avec la microvillosité sur toute la hauteur du plateau strié.

L'origine de cette lactotransferrine pourrait être, selon LORIMIER (1987), les cellules caliciformes, car cet auteur a mis en évidence sa présence dans les grains de sécrétion des cellules à mucus.

C - AUTRES LOCALISATIONS

La lactotransferrine est présente également dans de nombreux liquides et milieux biologiques (MASSON, 1970), principalement dans les liquides et milieux d'excrétions comme les larmes (BROEKHUYSE, 1974), le liquide synovial (BENNETT et al., 1973), le liquide séminal (HEKMAN et al., 1969), le liquide céphalo-rachidien (TERENT et al., 1981), le sang (RÜMKE et al., 1971), les sécrétions bronchiques (BISERTE et al., 1963) et le mucus cervical.

En dehors des cellules excrétrices des muqueuses, la lactotransferrine connaît une localisation cellulaire, en particulier dans les granules secondaires des leucocytes polymorphonucléaires (MASSON et al.,

1969). Elle est présente à l'état de traces dans les monocytes (BENNETT et KOKOCINSKI 1978).

II. ROLES DANS LE TRACTUS GASTRO-INTESTINAL DES NOUVEAU-NÉS

A - SURVIE DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS LE TRACTUS GASTRO-INTESTINAL DES NOURRISSONS

L'étude des fonctions de la lactotransferrine ingérée par les nourrissons serait difficile sans connaître la survie de la protéine au cours du transit gastro-intestinal.

Il est généralement admis que la production d'acide et de pepsine chez les nouveau-nés est faible (EVANS et MacKEITH, 1954). Cependant, ces derniers peuvent néanmoins digérer les protéines du lait, vraisemblablement grâce à leurs protéases pancréatiques.

Les résultats antérieurs (SPIK et MONTREUIL, 1966; BROCK et al., 1976; 1978; LINE et al., 1976) ont montré que l'apolactotransferrine était susceptible d'être dégradée par protéolyse gastrique ou pancréatique et que la lactotransferrine saturée en fer était relativement résistante.

Récemment, BRITTON et KOLDOVSKY (1987) ont comparé la dégradation in vitro de l'apolactotransferrine humaine par le liquide gastrique et intestinal de Rat allaité (12 jours) et de Rat sevré (31 jours). Ces auteurs ont montré que la dégradation gastrique de la lactotransferrine était 20 fois plus importante par le suc de Rat sevré que par le suc de Rat allaité et que la dégradation de la lactotransferrine par le liquide intestinal était minimale chez le Rat allaité.

La lactotransferrine partiellement dégradée a été retrouvée dans les fécès de nourrissons alimentés au sein ou au lait artificiel supplémenté en lactotransferrine (SPIK et al., 1982). Cette copro-lactotransferrine a gardé la capacité de fixer le fer ainsi que son activité bactériostatique.

B - ROLE DANS LA PROTECTION DE LA MUQUEUSE INTESTINALE

Il est bien connu actuellement que la lactotransferrine possède une activité inhibitrice de la croissance de certains micro-organismes. En particulier, elle inhibe la croissance des souches entéro-pathogènes

d'Escherichia coli (REITER et al., 1975; SPIK et al., 1978; BULLEN et al., 1980; STEPHENS et al., 1980) et de Staphylococcus aureus, Staphylococcus albus, Pseudomonas aeruginosa (MASSON et HEREMANS, 1966).

Un effet bactéricide de la lactotransferrine sur Vibrio cholerae et Streptococcus mutans a été également montré (ARNOLD et al., 1977). Une liste détaillée de l'effet bactériostatique de la lactotransferrine sur différents types de micro-organismes a été établie par ARNOLD et al. (1980). Une étude de l'activité antibactérienne a été réalisée dans le revue générale de SPIK et MONTREUIL (1983).

L'effet bactériostatique de la lactotransferrine a été attribué à la séquestration du fer, élément essentiel à la croissance des bactéries. Cependant, un certain nombre de faits tendent à prouver que l'activité antibactérienne de la lactotransferrine pourrait être plus complexe qu'une simple ferriprivation. ARNOLD et al. (1982) ont en effet montré la nécessité de l'interaction directe de la lactotransferrine avec la surface de la bactérie.

C - ROLE DANS LE DEVELOPPEMENT DU TRACTUS GASTRO-INTESTINAL

Les études réalisées chez le Porc, le Chien et le Rat ont montré que la maturation du tractus gastro-intestinal était beaucoup plus rapide lorsque l'animal est allaité (BERSETH et al., 1983; HEIRD et al., 1984; WIDDOWSON, 1985), impliquant que la structure des protéines du lait ingérées pourraient avoir une signification biologique autre que la simple fourniture des acides aminés. En se fondant sur ces observations, plusieurs groupes de chercheurs ont tenté de déterminer la nature des facteurs mitogènes présents dans le lait.

Une fraction importante de l'activité mitogénique du lait humain a été attribuée à l'"epidermal growth factor" ou EGF (BERSETH, 1987).

Récemment, NICHOLS et al. (1987) ont montré que la lactotransferrine humaine, à 4 mg / ml, augmentait de 30 % l'incorporation de thymidine dans l'ADN des cellules de crypte de l'intestin de Rat. Ces auteurs ont ainsi suggéré que la lactotransferrine pourrait jouer un rôle dans la maturation du tractus gastro-intestinal. Cependant, la concentration que ces auteurs ont utilisée peut apparaître très élevée comparée à la concentration de lactotransferrine présente dans le lait de Ratte (0,1 mg / ml). Il serait utile de confirmer ce résultat en utilisant des concentrations en lactotransferrine nettement plus faibles.

D - ROLE DANS LA NUTRITION MARTIALE DU NOURRISSON

Il est bien établi que chez le nourrisson alimenté au lait maternel, l'incidence de la carence en fer est très faible (SAARINEN et al., 1977). Cela pourrait être dû essentiellement à une haute bio-disponibilité du fer dans le lait de Femme. Il est bien clair que la quantité de fer réellement absorbée est 2 à 3 fois supérieure chez les enfants nourris au sein par rapport aux nourrissons alimentés au lait de Vache (McMILLAN et al., 1976; SAARINEN et al., 1977; GARRY et al., 1981).

Des auteurs ont attribué la haute bio-disponibilité du fer dans le lait de Femme à des facteurs favorables à l'absorption du métal tels que la faible teneur en protéines, en calcium et en phosphate, la forte concentration en acide ascorbique et en lactose (GROSSE, 1968; AMINE et HEGSTEAD, 1975; PETERS et al., 1971; PIRZIO-BIROLI et al., 1958).

D'autres auteurs ont attribué à la lactotransferrine le rôle principal de transporteur de fer dans le lait de Femme (MONTREUIL et al. 1960a,b; MONTREUIL, 1971; SPIK, 1981). Dans une étude comparée des taux de fer et de lactotransferrine dans les laits de Femme et de Vache, SPIK (1988) a montré que la lactotransferrine serait le meilleur candidat pour expliquer, d'une part, l'importante bio-disponibilité du fer du lait et, d'autre part, la régulation de son absorption.

Cependant, ce concept n'est pas accepté par certains auteurs en raison du fait que, d'une part, la lactotransferrine dans le lait était très peu saturée en fer (BULLEN et al., 1972), une saturation de 1-4 % seulement a été démontrée (FRANSSON et LONNERDAL, 1980; LONNERDAL, 1985) et, d'autre part, il n'existe aucun lien entre le taux de fer et la concentration en lactotransferrine (MASSON et al., 1970).

En se fondant sur l'effet inhibiteur de l'apo-lactotransferrine dans l'absorption du fer ionique (DE LAEY et al., 1968; De VET et Van GOOL, 1974) et le fait que pendant la première semaine de la vie, les nouveau-nés excrètent 10 fois plus de fer qu'ils n'en absorbent (CAVELL et WIDDOWSON, 1964), BROCK (1980) a pensé que la lactotransferrine du lait sert à inhiber la réabsorption du fer excrété.

Les études directes concernant le rôle de la lactotransferrine dans l'apport du fer sont très controversées.

Malgré leur conclusion différente, FRANSSON et al. (1983a, b) ainsi que FAIRWEATHER-TAIT et al. (1987) ont observé une absorption du fer identique à partir de la lactotransferrine ou à partir de sel ferreux

chez les nouveau-nés murins et humains. Récemment, au cours d'une étude in vivo, KAWAKAMI et al. (1988) ont montré que chez la Souris sevrée et déficiente en fer, l'absorption du fer est meilleure lorsque le fer est donné sous forme du complexe de Fe-lactotransferrine. Selon ces auteurs, la quantité de fer administrée ainsi que l'état de besoins en fer des sujets sont primordiaux dans la compréhension du rôle nutritionnel de la lactotransferrine.

III - ROLES DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS L'IMMUNITE A MEDIATION CELLULAIRE

A - REGULATION DE LA MYELOPOIESE

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 des colonies de granulo-monocytes est sous la dépendance de deux séries de facteurs antagonistes (Fig.10 p.40). Les facteurs stimulant la production de colonies, ou les C.S.F. (Colony Stimulating Factors), 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 "colony stimulating factor" ou C.S.F. à de très faibles concentrations (BROXMEYER et al., 1978; FLETCHER et WILLARS, 1986), mais n'a aucun effet sur la croissance des colonies de granulocytes-macrophages (ZUCALI et al., 1979). Cette inhibition porterait sur la production d'une monokine produite par les monocytes 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 selon laquelle la régulation de la myélopoïèse

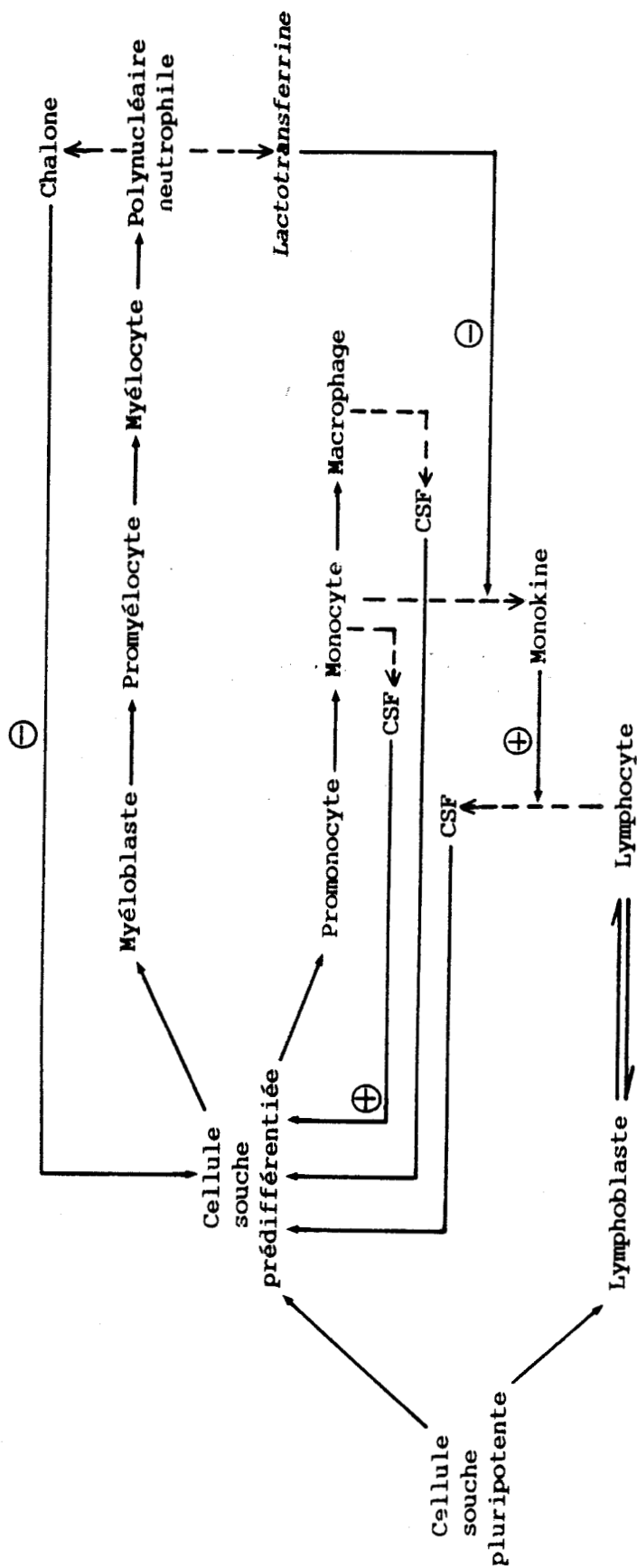


Fig. 10. Régulation de la myélopoïèse (D'après GOLDE & CLINE, 1972)

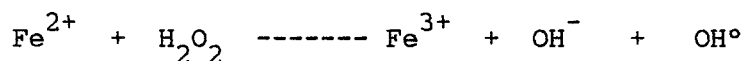
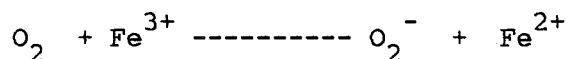
⊖ : inhibition; ⊕ : activation; --> : libération

CSF : "colony stimulating factor"

s'effectueraient 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 - CONTROLE 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 secondaires de ces cellules. Lors de la phagocytose d'une bactérie, l'essentiel de la lactotransferrine contenue dans ces granules secondaires est libérée dans le milieu extérieur tandis que 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 réabsorber 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 amplifier ainsi 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 hydroxyles. 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'EDTA, permettrait à la lactotransferrine d'être un catalyseur de la production de ces radicaux.

C - ROLE DANS LA MIGRATION DES CELLULES IMMUNOCOMPETENTES VERS LE LIEU DE L'INFLAMMATION

D'après DE SOUSA (1978), les leucocytes polymorphonucléaires sont les premiers à arriver sur le lieu de l'inflammation. Ainsi que nous l'avons vu précédemment, la phagocytose entraîne la dégranulation des granules secondaires et l'excrétion de lactotransferrine dans le milieu. Selon cet auteur, la lactotransferrine attirerait les macrophages et les lymphocytes qui possèdent des récepteurs membranaires pour cette molécule. Dans un second temps, les macrophages, grâce à la ferritine et à la sérotransferrine qu'ils synthétisent, amèneraient sur le lieu de l'inflammation les lymphocytes qui possèdent des récepteurs pour ces deux molécules. Ces phénomènes expliqueraient le rassemblement des cellules immuno-compétentes sur le lieu de l'inflammation. Par ailleurs, plusieurs auteurs confèrent à la lactotransferrine libérée par les leucocytes polymorphonucléaires la propriété de rendre ces derniers adhérents aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (OSEAS et al., 1981; BOXER et al., 1982a; b) et de permettre leur phagocytose par les macrophages (BOXER et al., 1982b). Cette immobilisation des leucocytes serait renforcée par l'effet de la lactotransferrine dans la production d'un facteur inhibiteur de la migration leucocytaire (LIF) (KIJLSTRA et BROERSMA, 1984).

D - ROLE DANS L'HYPOSIDEREMIE INFLAMMATOIRE

On sait actuellement que, lors d'une inflammation, la sidérémie baisse brutalement (WEINBERG, 1974), tandis que l'absorption intestinale du fer diminue (BERESFORD et al., 1971; DUBACH et al., 1984) au profit d'une 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 ou sidérochromes qui vont rentrer en compéti-

tion avec les protéines ferri-fixatrices de l'hôte. La Fig.11 (p.44), propose un schéma du mécanisme de l'hyposidérémie inflammatoire où, dans un premier temps, les leucocytes activés libèrent dans le sang une cytokine, appelée "leucocytic endogenous mediator" (LEM) (KAMPSCHMIDT et al., 1975) ou "leucocytic pyrogen" (LP) (DINARELLO et WOLFF, 1977), qui est actuellement identifié à l'interleukine 1 (IL-1) (OPPENHEIM et GERY, 1982; DINARELLO, 1984). Outre son pouvoir pyrogène, ce facteur entraîne une dégranulation des leucocytes et donc la libération de l'apolactotransferrine. Selon VAN SNICK et al., (1977), l'apolactotransferrine ainsi libérée capterait le fer de la sérotransferrine et le transférerait dans la ferritine des macrophages. En effet, une fixation de la lactotransferrine sur les macrophage démontré par plusieurs auteurs (CAMPBELL, 1982; VAN SNICK et al., 1976, 1977) serait en faveur de ce mécanisme. Au laboratoire, GOAVEC et al. (1985) ont montré que la lactotransferrine de lait pourrait se fixer sur les macrophages via une lectine membranaire à fucose. Cependant, DERISBOURG (1987) a montré que la lactotransferrine leucocytaire humaine ne possède pas de fucose lié en α -1,3 sur le résidu N-acétylglucosamique 5'. En effet, LECLERCQ (1987) a montré que la partie protéinique de la lactotransferrine peut également être impliquée dans la fixation sur les macrophages.

E - ROLE DANS LA CROISSANCE DES LIGNEES LYMPHOCYTAIRES

La plupart des cellules ont besoin de la sérotransferrine pour assurer leur croissance (BOTTENSTEIN et al., 1979; SELIGMAN 1983). Dans le cas des lymphocytes, BROCK et al. (1986) ont montré que le besoin en fer de ces cellules expliquait l'activité de facteur de croissance de la sérotransferrine.

Récemment, il fut démontré que la lactotransferrine agissait aussi comme facteur de croissance sur les lignées de lymphocytes B et T humains (HASHIZUME et al., 1983). Au laboratoire, MAZURIER et al. (1988) ont confirmé ces résultats en montrant que la lactotransferrine humaine possédait une activité facteur de croissance pour les lymphocytes humains stimulés par la phytohemagglutinine. Selon ces auteurs, des récepteurs de la lactotransferrine seraient exprimés lors de la stimulation par la phytohémagglutinine.

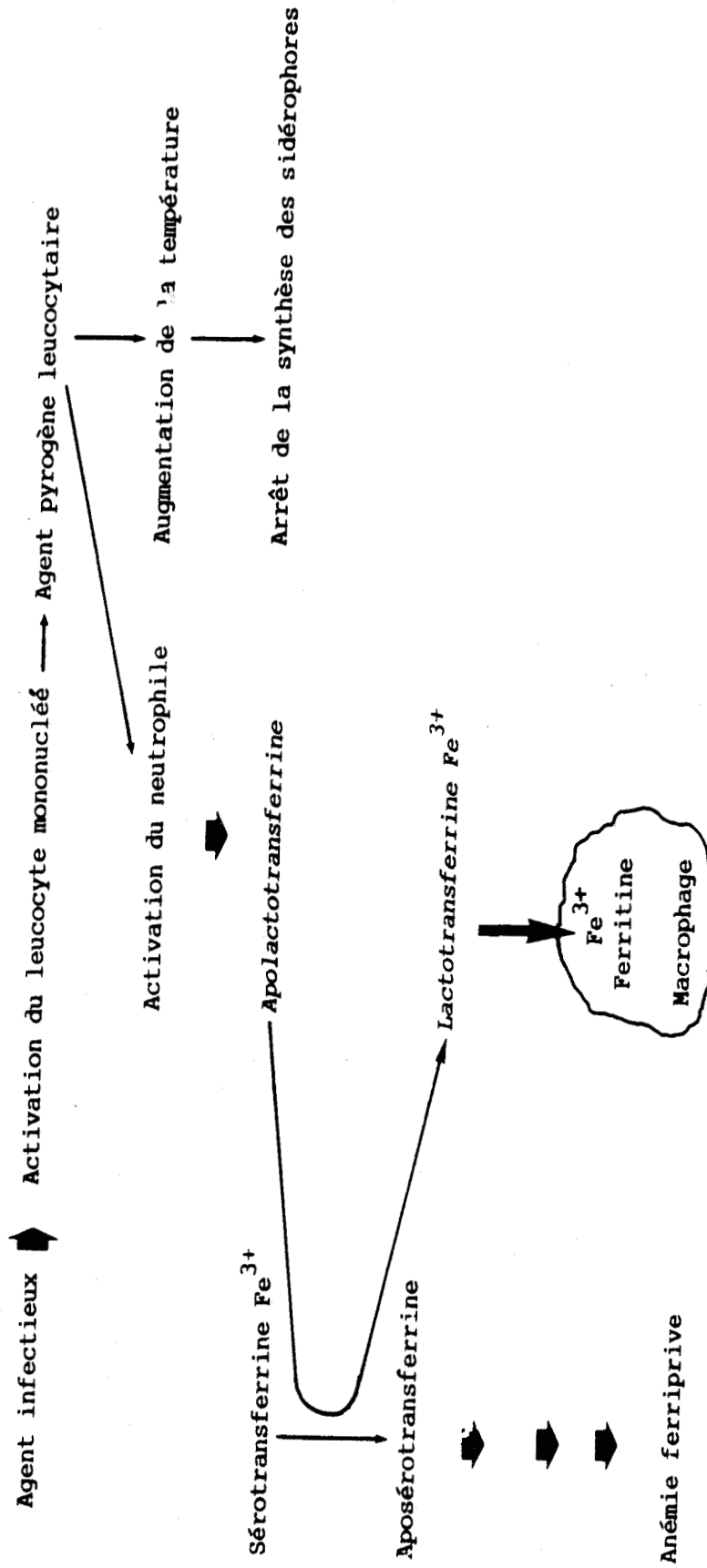


Fig. 11. Schéma récapitulatif de l'intervention des transferrines lors d'une agression microbienne

(D'après SPIK & MONTREUIL, 1983)

F - ROLE DANS L'ACTIVITE CYTOTOXIQUE DES MONOCYTES ET DES CELLULES NK

Il existe dans le sang au moins deux types de cellules capables de tuer des cellules cibles: les monocytes et les cellules NK (Natural Killer). La cytotoxicité de ces cellules est augmentée par la présence de l'interféron (MINATO et al., 1980) mais également, comme cela a été montré en 1984 par HORWITZ et al. (1984), par la lactotransferrine humaine. Ces auteurs montrent que la lactotransferrine augmente la cytotoxicité des monocytes vis-à-vis de certaines lignées cellulaires (CHANG et K562).

CONCLUSION

Ainsi que nous avons pu le constater au cours de ce chapitre, les fonctions biologiques des lactotransferrines sont nombreuses, certaines d'entre elles ont fait l'objet de controverse.

Les principales fonctions de la lactotransferrine concernent la régulation de la myélopoïèse, les mécanismes de la défense antibactérienne et la nutrition martiale des nourrissons et l'absorption intestinale du fer.

METABOLISME GENERAL DU FER

A l'exception des Lactobacilles, tous les autres organismes vivants nécessitent la présence de fer. Il n'est peut-être pas trop surprenant qu'un métal qui compose 5 % de la croûte terrestre et qui peut servir à la fois de donneur et d'accepteur d'électrons, occupe une place primordiale dans le processus de la vie. La nature a développé des systèmes sophistiqués de chélation et de transport du fer. Les micro-organismes ont inventé les sidérophores, un groupe de ligands de masse moléculaire faible, virtuellement spécifiques pour le fer ferrique, afin de séquestrer et de transporter le fer, tandis que les organismes supérieurs tendent à utiliser des protéines pour transporter et assimiler ce métal.

I - PROPRIETES DES IONS FERREUX ET FERRIQUES

Le fer est un métal de transition. Sa formule électronique est la suivante: $1s^2 2s^2 2p^2 3s^2 3p^6 4s^2 4d^6$. Le fer, tout comme les autres métaux de transition, possède deux propriétés d'une importance particulière en biologie: la capacité d'exister sous plusieurs états d'oxydation relativement stables et la possibilité de former de nombreux complexes. Principalement, le fer se trouve dans deux états d'oxydation, Fe^{2+} et Fe^{3+} . En milieu acide, ces deux états peuvent exister sous forme hydratée, les ions étant encadrés par six molécules d'eau. La neutralisation provoque progressivement une hydrolyse, et enfin la précipitation d'hydroxyde ferrique. Bien que Fe^{2+} soit beaucoup plus soluble que Fe^{3+} , l'oxydation de Fe^{2+} en Fe^{3+} se réalise très facilement à l'air. Si les molécules d'eau sont remplacées par des ligands convenables, le complexe est soluble et stable à pH neutre.

II - LE FER DANS L'ORGANISME DES MAMMIFERES

Il est bien établi que le fer, chez les Vertébrés, est presque toujours conjugué à des protéines. Il n'existe qu'une concentration extrêmement faible de fer libre. La raison est évidente: le fer ferrique dans les conditions physiologiques a tendance à s'hydrater et à se polymériser, en formant principalement un hydroxyde ferrique et des polymères ferriques insolubles (MAY et WILLIAMS, 1980).

Chez les Mammifères, le fer se présente sous trois formes différentes: la forme fonctionnelle, la forme de réserve et la forme de transport.

A - FORME FONCTIONNELLE DU FER

Les protéines, qui renferment le fer, héminique ou non, et jouent un rôle dans de nombreux processus biologiques, constituent la forme fonctionnelle du fer. Les protéines de ce type sont nombreuses. Le tableau 1 (p.48) donne des exemples de ces protéines et leurs fonctions. A titre d'exemple, l'hémoglobine sert à transporter l'oxygène capté dans les érythrocytes chez les Mammifères et la myoglobine agit comme une réserve d'oxygène dans le muscle squelettique. Les protéines héminiques participent à d'autres réactions biochimiques telles que le transfert d'électrons à l'oxygène moléculaire dans la respiration cellulaire, la réduction des peroxydes, l'oxygénation, l'hydroxylation et également le transfert des électrons entre les hydrogénases et les accepteurs d'électrons.

B - FORME DE RESERVE DU FER

La ferritine et, dans une moindre mesure, l'hémosidérine constituent les deux formes de réserve de fer dans l'organisme.

La ferritine est une protéine soluble de masse moléculaire 445 kDa, constituée de 24 sous-unités que DRYSDALE (1977) décrit comme différentes selon l'origine et la nature des tissus qui la contiennent. Les ferritines seraient composées de 2 types de sous-unités, L et H, qui existent en proportions différentes selon les tissus. Ainsi le type L est trouvé principalement dans le foie et la rate, le type H,

Tableau 1. Exemples des protéines contenant le fer fonctionnel chez le Mammifère

(D'après Worwood, 1977)

Protéines	MM	Fer/protéine	Distribution	Fonction
Héminique				
Hémoglobine	65000	4 protohème	Hématie	Transporteur d'O ₂
Myoglobine	17000	1 protohème	Muscle	Transporteur d'O ₂
Cytochrome aa ₃	18000	2 hème a	Mitochondrie	Oxydase terminale
b	18000-30000	1 protohème	Mitochondrie	Transporteur d'électrons
c ₁	37000	1 hème c	Mitochondrie	Transporteur d'électrons
c	12000	1 hème c	Mitochondrie	Transporteur d'électrons
b ₅	12000	1 protohème	Réticulum endoplasmique	Transporteur d'électrons
P-450	-	protohème	Réticulum endoplasmique	Hydroxylation de stéroïdes
Catalase	240000	4 protohème	Hématie, péroxysome	Dégradation de peroxides
Lactopéroxydase	93000	1 protohème	Lait	Dégradation de peroxides
Tryptophane pyrrolase		hème	Cytosol du foie	L-tryptophane - formylcynuénine
Non héminique				
Aconitase	66000	2 Fe	Coeur de Porc	Cycle citrique
Phénylalanine hydroxylase		2 Fe	Coeur de Rat	Phénylalanine - tyrosine
Adénodoxine	125000	2 Fe	Mitochondrie	Hydroxylation de stéroïdes
Complexe III Fe-S protéine		2 Fe	Mitochondrie	Transporteur d'électrons
NADH déhydrogénase		23-28 Fe	Mitochondrie	Transporteur d'électrons
Xanthine oxydase	275000	8 Fe	Lait, tissus	Hypoxanthine - acide urique

principalement dans le coeur. La ferritine peut fixer jusqu'à 4.500 atomes de fer ferrique par molécule (CRICHTON et CHARLOTEAUX-WAUTER, 1987).

L'hémosidérine est une protéine insoluble qui contient plus de fer que la ferritine mais ce fer est plus faiblement mobilisable que celui de la ferritine (WYLLIE et al., 1971). Cette protéine peut être considérée comme un constituant amorphe composé de débris cellulaires et de molécules de ferritine plus ou moins dégradées.

L'incorporation du fer et la mobilisation du fer à partir de la ferritine restent encore mal connues (CRICHTON et CHARLOTEAUX-WAUTER, 1987).

La ferritine est présente dans toute les cellules de l'organisme ainsi que dans le sérum. Chez les Mammifères, le foie constitue un organe important de réserve en fer.

Outre que son rôle dans le stockage du fer, la ferritine dans l'entérocyte pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'absorption intestinale (TURNBULL, 1977).

C - FORME DE TRANSPORT DU FER

Chez les Mammifères, une des protéines de transport du fer est la lactotransferrine qui jouerait un rôle dans l'apport du fer dans le lait de Femme (MONTREUIL et al., 1960a,b; MONTREUIL, 1971; SPIK, 1982, 1988) et dans le transport du fer de la lumière intestinale aux entérocytes (COX et al., 1979; MAZURIER et al., 1985).

Dans le plasma ainsi que dans des endroits comme le testicule, l'ovaire et le centre système nerveux où le plasma ne peut accéder, le transport du fer est assuré par la sérotransferrine, qui prélève le fer au niveau des sites d'absorption (cellules muqueuses intestinales), des sites de réserve (parenchyme hépatique) et des sites de catabolisme de l'hémoglobine (cellules réticulo-endothéliales), le transporte et le délivre aux sites d'utilisation : la moelle osseuse, le placenta et toutes les autres cellules de l'organisme. La sérotransferrine est une glycoprotéine possédant une très grande homologie structurale avec la lactotransferrine. Les deux glycoprotéines possèdent, en effet, des masses moléculaires de l'ordre de 80 kDa; Elles sont toutes deux constituées d'une seule chaîne présente 59 % d'homologie (METZ-BOUTIGUE et al., 1984); elles fixent toutes deux 2 ions ferriques au niveau d'un

site de fixation du fer constitué par 2 résidus de Tyr, un d'His et un d'Asp (BAKER et al., 1987; LEGRAND et al., 1988). La diffraction des rayons X des 2 protéines (ANDERSON et al., 1987; BAILEY et al., 1988) a révélé des analogies importantes dans la conformation des deux protéines comme nous l'avons vu page 22.

Le rôle de l'apport du fer de la sérotransferrine et de la lactotransferrine aux cellules s'effectue grâce à l'intermédiaire de récepteur membranaire. Celui de la sérotransferrine est à présent bien connu, alors que peu d'études ont été effectuées sur le récepteur de la lactotransferrine.

III. RECEPTEURS DES TRANSFERRINES

A - RECEPTEUR DE LA SEROTRANSFERRINE

Le récepteur de la sérotransferrine a fait l'objet de nombreuses études tant au plan structural qu'au plan fonctionnel (HUEBERS & FINCH, 1987; WARD, 1987).

1 - Structure et propriétés du récepteur de la sérotransferrine

Le récepteur de la sérotransferrine est une glycoprotéine de masse moléculaire 180 kDa, composé de 2 sous-unités de 90 kDa et pouvant fixer chacune une molécule de sérotransferrine (WADA et al., 1979; SCHNEIDER et al., 1982). Les 2 sous-unités sont réunies entre elles par un pont disulfure. Comme les autres récepteurs, le récepteur de la sérotransferrine est amphiphile, il possède deux régions hydrophiles de part et d'autre de la membrane et une région hydrophobe permettant l'ancrage du récepteur dans la membrane. Le traitement par trypsine donne deux fragments de masse moléculaire 70 kDa encore capables de fixer la sérotransferrine. La partie hydrophobe de chaque sous-unité possède un résidu d'acide gras, l'acide palmitique, covalentiellement lié, résultant d'une modification post-traductionnelle (OMARY et TROWBRIDGE, 1981a,b). Le récepteur est glycosylé : chaque sous-unité porte un glycanne de type N-acétyl lactosaminique et deux glycannes de type oligo-mannosidique. De plus, le récepteur est phosphorylé mais la

phosphorylation n'est pas indispensable à l'internalisation du récepteur (ROTHENBERGER et al., 1987)(Fig.12 p.52).

La séquence peptidique du récepteur de la sérotransferrine humaine a été déduite de la séquence du mRNA par SCHNEIDER et al. (1984) et du cDNA par MacCLELLAND et al. (1984). Chaque sous-unité polypeptidique est composée de 760 résidus d'acides aminés.

La biosynthèse du mRNA et sa transcription en récepteur de la sérotransferrine sont sous la dépendance de l'état physiologique de la cellule et de la quantité de fer présente dans le milieu.

2 - Mécanisme d'incorporation du fer par les cellules

La sérotransferrine transporte le fer à travers tout l'organisme . La présence de récepteur spécifique de la sérotransferrine a été mis en évidence sur un grand nombre de cellules. Le transfert du fer de la sérotransferrine vers la cellule se décompose en quatre étapes :

1) **Reconnaissance et interaction de la sérotransferrine avec son récepteur membranaire spécifique.** La sérotransferrine se fixe d'une manière spécifique sur son récepteur. L'affinité du récepteur pour la sérotransferrine dépend du pH et du degré de saturation en fer de cette dernière (HUEBERS et FINCH, 1987). Au pH 7,4, la sérotransferrine diferrique possède une grande affinité ($2-7 \times 10^9 M^{-1}$), la sérotransferrine monoferrique une affinité intermédiaire et l'aposérotransferrine n'a que peu d'affinité pour son récepteur. Par contre, au pH 5, l'aposérotransferrine forme un complexe très stable avec son récepteur.

2) **Internalisation du complexe récepteur-sérotransferrine par endocytose.** Le complexe est endocyté dans un puits recouvert ("coated pits") qui est une invagination de la membrane tapissée d'une protéine appelée clathrine. Ce puits recouvert se détache de la membrane pour former une vésicule recouverte ("coated vesicle") puis perd son revêtement de clathrine. La vésicule se transforme alors en endosome (HELENIUS et al., 1983) ou receptosome (PASTAN & WILLINGHAM, 1981).

3) **Libération du fer de la sérotransferrine dans l'endosome à l'intérieur de la cellule.** L'acidification de l'endosome provoque une baisse de pH jusqu'à 5,0-5,5. L'acidité entraîne la libération des deux atomes de fer de la sérotransferrine. Le fer est transporté à travers la membrane de l'endosome vers le cytoplasme par un mécanisme mal connu.

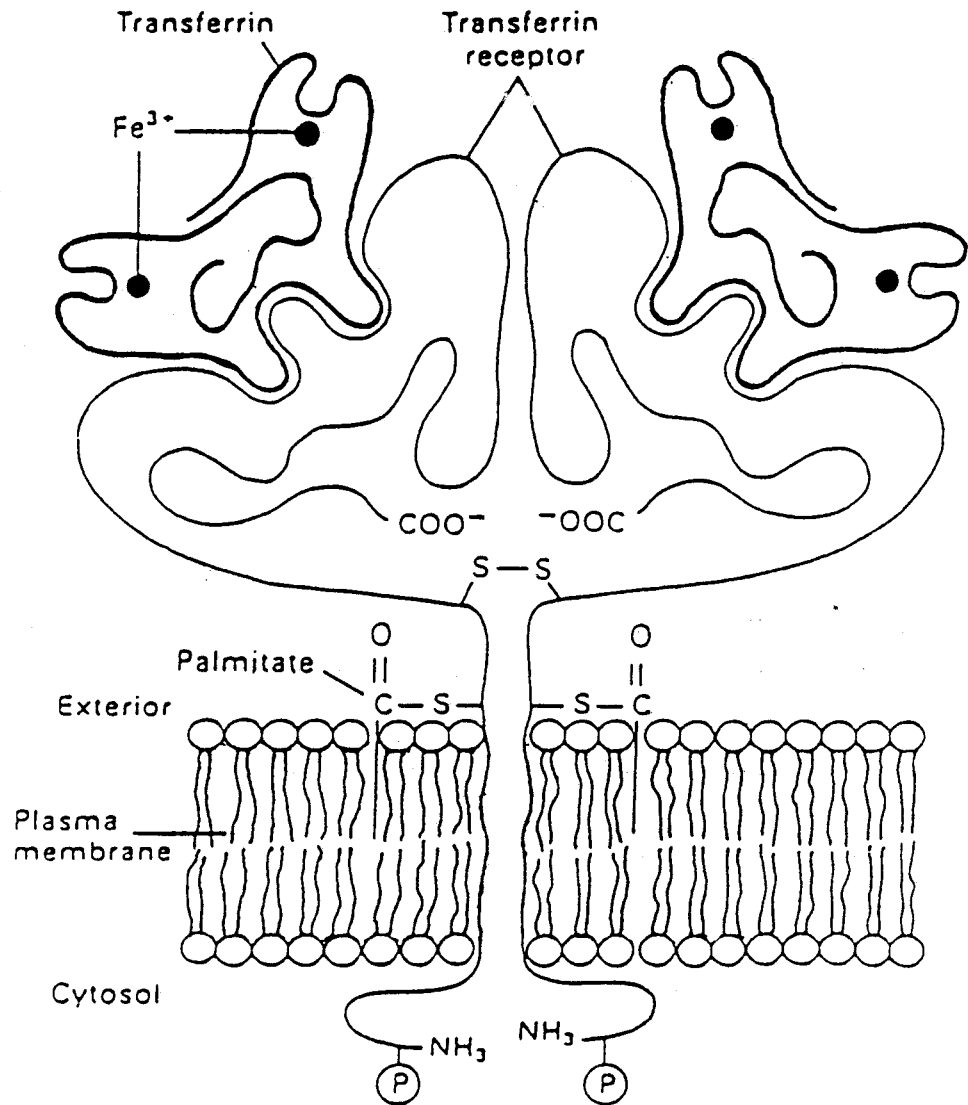


Fig. 12. Représentation schématique du récepteur de la sérotransferrine

(D'après DAUTRY-VARSAT & LODISH, 1984)

4) **Libération de l'apo-sérotansferrine hors de la cellule après exocytose.** Le complexe récepteur-sérotansferrine est recyclé vers la membrane plasmique. A la surface de la cellule, le pH neutre du milieu extracellulaire dissocie l'apo-sérotansferrine de son récepteur, celle-ci peut ainsi être réutilisée (Fig.13 p.54)

3 - Localisation du récepteur de la sérotansferrine

L'hypothèse de l'universalité du récepteur de la sérotansferrine a été émise par HAMILTON et al. (1979) et WADA et al. (1979a,b) qui par l'utilisation d'anticorps dirigés contre le récepteur placentaire de la sérotansferrine, ont caractérisé le récepteur sur différentes lignées cellulaires humaines. NEWMAN et al. (1982) ont isolé un seul type de récepteur de la sérotansferrine dans une grande variété de cellules : cellules de foie foetal, normoblastes, cellules leucémiques, neuroblastomes et cellules cancéreuses du pancréas. La présence de récepteur de la sérotansferrine au niveau des érythroblastes, des macrophages et des hépatocytes explique le rôle principal joué par la sérotansferrine dans les mécanismes d'échange interne du fer (Fig.14 p.55)

B - RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE

Alors que le récepteur de la sérotansferrine se présente dans un grand nombre de cellules eucaryotes (REGOECZI, 1984), le récepteur de la lactotransferrine semble se limiter à des cellules particulières telles que les monocytes (MARKOWETZ et al., 1979), les macrophages (Van SNICK et al., 1976; BIRGENS et al., 1983), les T-lymphocytes (HASHIZUME et al., 1983; MAZURIER et al., 1988) dans le système immunitaire et les entérocytes (MAZURIER et al., 1985; DAVIDSON et LÖNNERDAL, 1988; HU et al., 1988). L'affinité apparente du récepteur pour la lactotransferrine est relativement faible, 10^6 - 10^7 M⁻¹. A présent, la structure et la conformation du récepteur de la lactotransferrine ainsi que son rôle biologique restent à étudier. Seul le récepteur entérocytaire de Lapin (MAZURIER et al., 1985) et de Souris (HU et al., 1988) ainsi que le récepteur lymphocytaire humain (MAZURIER et al., 1988) ont été partiellement caractérisés, il s'agit de protéine membranaire de masse moléculaire variant de 100 kDa à 130 kDa.

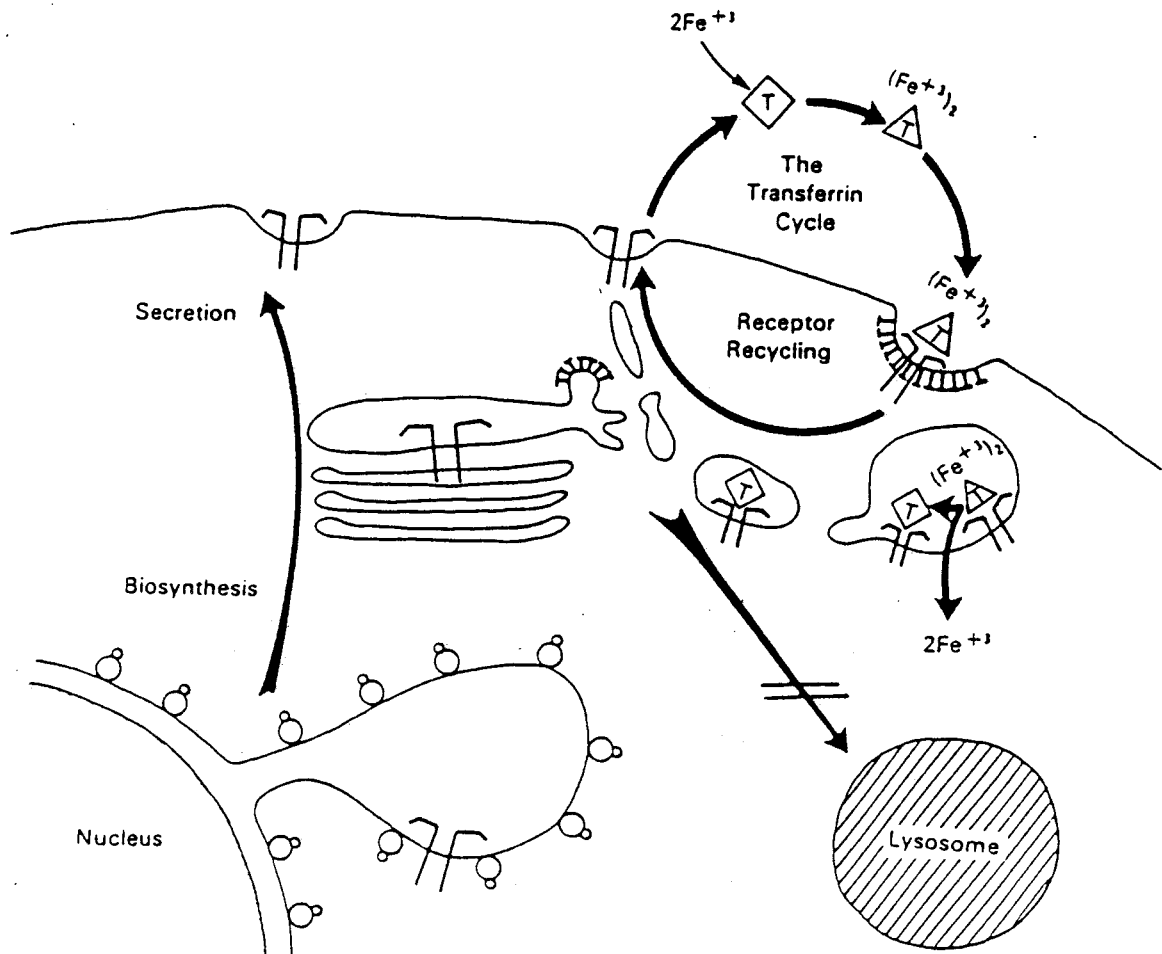


Fig. 13. Mécanisme de l'incorporation du fer par les cellules à partir de la sérotransferrine

(D'après HANOVER & DICKSON, 1985)

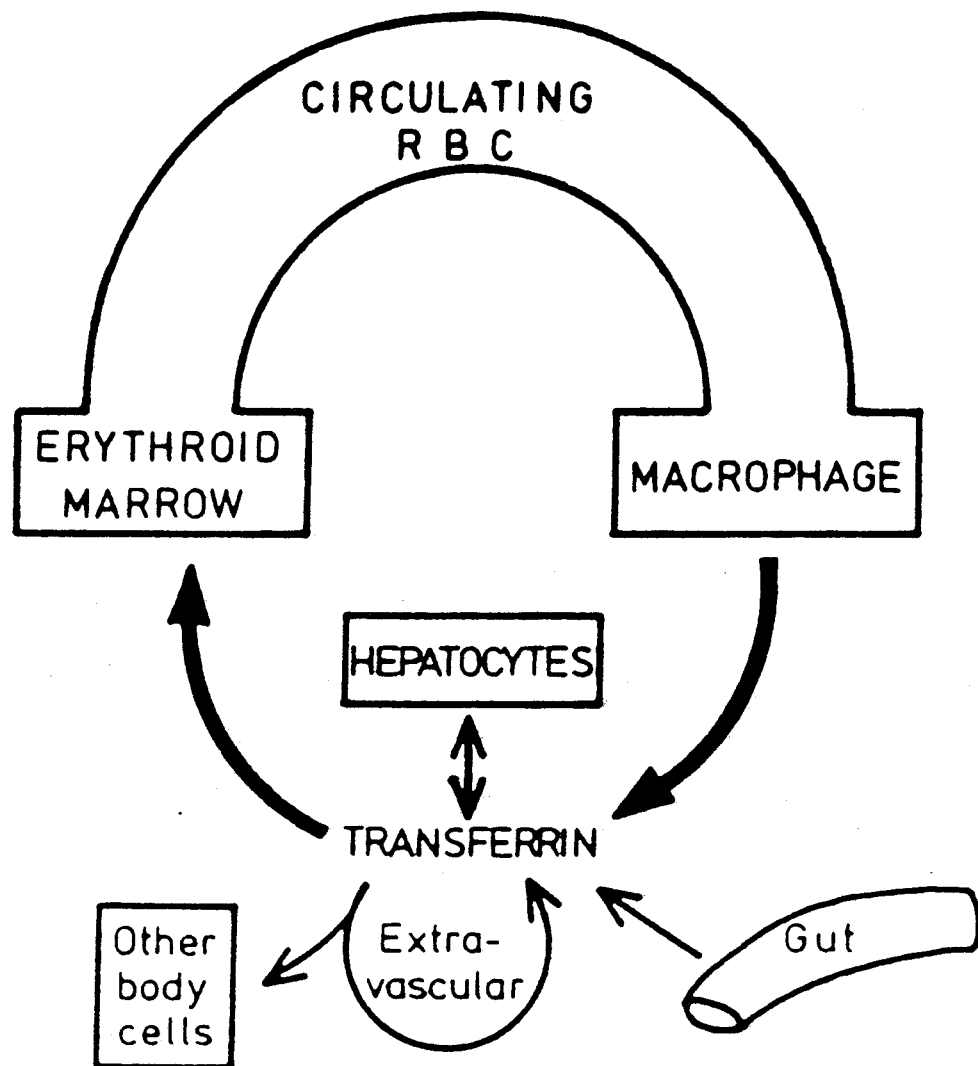


Fig. 14. Echange interne du fer dans l'organisme humain
(D'après FINCH & HUEBERS, 1982)

CONCLUSION

Ainsi que nous avons pu le constater au cours de ce chapitre, les récepteurs des transferrines jouent un rôle primordial dans le métabolisme du fer. Ils, avec les transferrines, assurent le lien entre les différentes formes de fer, d'une part, et conditionnent le taux de fer dans la cellule et en conséquent affectent la prolifération de la cellule, d'autre part. A présent, le récepteur de la sérotransferrine est bien connu, alors que celui de la lactotransferrine reste à étudier.

ABSORPTION INTESTINALE DU FER

Le besoin nutritionnel en fer provient du fait que ce métal joue un rôle important dans le métabolisme énergétique des cellules et que la perte est un phénomène obligatoire (FINCH, 1969).

Chez l'Homme et chez les autres Mammifères, la concentration en fer reste relativement constante tout au cours de la vie. Cela est réalisé en maintenant un bilan de fer positif pendant la croissance et en établissant un équilibre entre l'absorption et la perte du fer chez l'adulte. Une altération prolongée de cet équilibre provoque des troubles graves comme l'anémie, l'hémosidérose et l'hémochromatose idiopathique.

L'absorption intestinale du fer s'effectue suivant un mécanisme complexe qui commence par la digestion des aliments et se termine par l'accès du fer à la circulation sanguine. Il est généralement admis que l'absorption du fer s'effectue essentiellement au niveau de l'intestin grêle dont le nombre de cellules absorbantes dépend des besoins en fer de l'organisme (BROWN et JUSTUS, 1958; CONRAD et al., 1964; WHEBY et al., 1964). La Fig.15 (p.58), montre le schéma général du processus de l'absorption du fer. Bien que l'effet de nombreux facteurs intervenant dans l'absorption du fer ionique soit bien connu, le mécanisme de l'absorption reste quant à lui, très mal connu. Plusieurs revues générales ont été consacrées à ce sujet dont celles de CHARLTON et BOTHWELL (1983) et de CONRAD (1987).

I. FACTEURS LIES A L'ABSORPTION DU FER

Le modèle le plus simple de l'absorption du fer doit tenir compte de l'incorporation du fer présent dans la lumière intestinale et du transfert du fer incorporé par les cellules intestinales vers la circulation sanguine. Cela fournit trois sections anatomiques pour l'étude

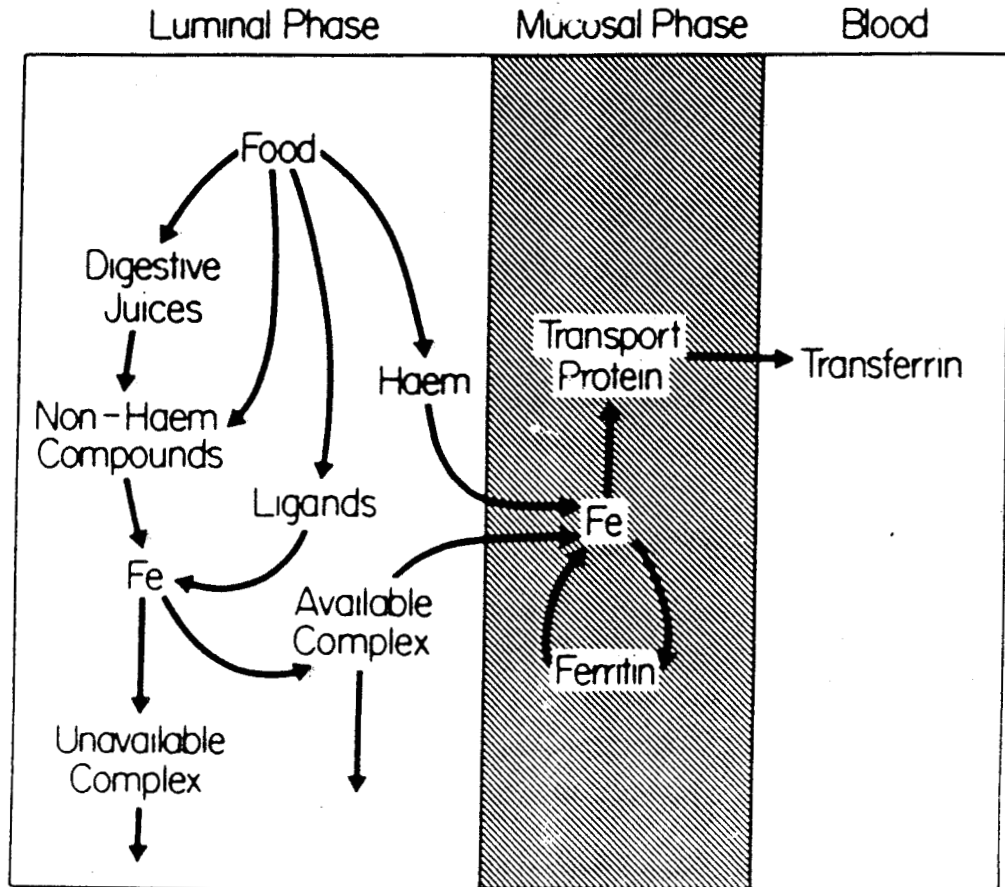


Fig. 15. Diagramme schématique de l'absorption intestinale du fer
(D'après BOTHWELL et al., 1979)

des facteurs liés à l'absorption du fer (Tableau 2 p.60): 1) la lumière intestinale; 2) les cellules intestinales; 3) les facteurs corporels (CONRAD et CROSBY 1963; CORNAD et al., 1964).

A - FACTEUR DE LA LUMIERE INTESTINALE

1 - Contenu en fer de l'alimentation

Il existe une relation entre la quantité totale du fer et la quantité absorbée (BOTHWELL et al., 1958; SMITH et PANNACCILLI, 1958). La sidérose a lieu avec une fréquence plus importante dans les populations qui consomment une quantité excessive de fer, particulièrement en association avec l'alcool (BOTHWELL et ISAACSON, 1962). Cependant, la relation entre la dose présente et la quantité absorbée n'est pas linéaire, une augmentation de 10 fois en dose provoque environ 4 fois plus d'absorption (SMITH et PANNACCILLI, 1958).

2 - Composition de l'alimentation

Si le fer est destiné à être absorbé, il doit se présenter sous forme adéquate quand il traverse la partie supérieure du tractus gastro-intestinal et seul le fer sous forme soluble est accessible. Un composant du fer très facile à absorber chez l'Homme est l'hème, souvent sous forme d'hémoglobine, de myoglobine et d'enzymes héminiques. Les autres formes de fer sont moins accessibles et dépendent largement de la nature des aliments. Il est bien établi que les ligands du fer sont responsables de cette différence. Les ligands qui, en fixant le fer et en le rendant soluble sous forme monomérique au pH alcalin de l'intestin grêle, favorisent son absorption. Les ligands qui forment avec le fer des précipités ou des macromolécules le rendent inaccessible à l'absorption.

L'absorption du fer à partir d'une source végétale est relativement moins efficace. Cela est dû à la présence d'oxalates, de phosphates et de phytates. Ces substances fixent le fer ionique et réduisent la solubilité de ce dernier (PETERS et al., 1971).

Le calcium, à faible concentration, augmente l'absorption du fer, mais, à forte concentration, la diminue (DUNN, 1968).

Tableau 2. Facteurs affectant l'absorption intestinale du fer

(D'après CONRAD, 1987)

Facteurs intraluminaux	Facteurs mucosaux	Facteurs humoraux
-Fer alimentaire	-Facteurs anatomiques	-Réserves en fer
<i>Quantité</i>	<i>Surface d'absorption réduite</i>	-Renouvellement du fer
<i>Formes chimiques</i>	<i>Epithélium défectueux</i>	<i>Erythropoïèse</i>
-pH	<i>Durée de vie mucosale</i>	<i>Anabolisme / catabolisme</i>
-Chélation et précipitation	-Motilité intestinale	<i>Dysfonctionnement réticulo-endothélial</i>
<i>Composition alimentaire</i>	-Fer mucosal	<i>Troubles sidéroblastiques</i>
<i>Sécrétions intestinales</i>	<i>Quantité</i>	-Hypoxie
	<i>Formes chimiques</i>	-Hémachromatose idiopathique
	-Certains métaux	-Troubles métaboliques rares
	-Synthèse de protéine	<i>Atransferrinémie congénitale</i>
		<i>Porphyrie cutanea tarda</i>
		<i>Déficiencia congénitale en ferrochélatase</i>

Les protéines animales augmentent l'absorption du fer ionique et végétal, grâce à des acides aminés comme l'histidine et la cystéine libérés par la digestion (BRODAN et al., 1968).

Des fruits, comme l'orange, améliorent l'absorption du fer probablement grâce à leur contenu en acide ascorbique, acide citrique, fructose et autres sucres.

3 - Sécrétions gastro-intestinales

Les sécrétions gastro-intestinales peuvent affecter l'absorption du fer en modifiant la solubilité du fer dans l'intestin.

L'acide chlorhydrique sécrété dans l'estomac solubilise le fer de la nourriture et entraîne sa chélation par des substances qui favorisent l'absorption (BENJAMIN et al., 1967).

Les sucs biliaires augmentent l'absorption du fer, probablement grâce à la quantité importante d'acide ascorbique et d'autres substances qui réduisent et chélatent le fer (CONRAD et SCHADE, 1968; JACOBS et MILES, 1970).

Le suc pancréatique contient une quantité très importante de bicarbonates et ces derniers diminuent l'absorption du fer. Chez les sujets atteints de fibrose kystique et de pancréatite chronique, la sécrétion du suc pancréatique est diminuée et, en conséquence, l'absorption du fer est augmentée (BENJAMIN et al., 1967; DAVIS et BADENOCH, 1962; TONZ et al., 1965).

Les enzymes intestinaux qui libèrent les sucres et les acides aminés des aliments favorisent indirectement l'absorption du fer (Van Der HEUL et al., 1978; Van DIJK et al., 1983).

B - FACTEURS MUCOSAUX

1 - Surface absorbante

Toute anomalie qui diminue la surface absorbante du duodénum et du jéjunum diminue l'absorption du fer (FAIRBANKS et al., 1971). Une ablation de l'intestin grêle ou une gastro-entérectomie est souvent associée à un déficit en fer.

La surface absorbante effective de l'intestin augmente chez le sujet déficient en fer, une quantité significative du fer peut être absorbée au niveau de l'iléum.

2 - Motilité intestinale

La motilité intestinale modifie l'absorption du fer en changeant la durée du temps où le fer est exposé à la surface absorbante. Ainsi une augmentation de la motilité intestinale est associée à une diminution de l'absorption du métal. Les médicaments qui ralentissent le transit intestinal augmentent l'absorption du fer (SCHADE et al., 1969).

3 - Quantité du fer épithélial

La nature du fer dans les entérocytes qui peut influencer l'absorption du fer est encore mal définie.

Une diminution de l'absorption du fer a été observée chez le Rat, après un jeûne ou l'administration d'une endotoxine. Ces traitements n'ont pas modifié le contenu total en fer des entérocytes, mais ils ont provoqué une augmentation de fer dialysable (CONRAD et al., 1967; CORTELL et CONRAD, 1967).

Le fractionnement subcellulaire de l'entérocyte a montré que la quantité de fer dans la fraction soluble était moins importante lorsque l'animal était déficient en fer (RICHMOND et al., 1972).

En utilisant la coloration spécifique des fers ferrique et ferreux au niveau ultrastructural, PARMLEY et al. (1978) ont montré une relation positive entre le fer non-ferritine dans les épithélia intestinaux et la teneur en fer chez le Rat.

4 - Protéines fixatrices du fer

Pendant de nombreuses années, on a cru que la ferritine était le régulateur mucosal de l'absorption du fer. Cependant, des études physiologiques ont montré que la ferritine était essentiellement une protéine de réserve du fer qui incorpore ce dernier afin de protéger les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres. Récemment, plusieurs protéines fixatrices du fer ont été isolées de l'intestin. Leur rôle

dans l'absorption intestinale du fer restent de nos jours encore mal défini. Il s'agit des protéines suivantes :

"Acetate-eluted ferroprotein" (AEP)

Cette protéine, initialement décrite par BOULARD et al. (1972), possède une masse moléculaire comprise entre 9 et 13 kDa. Elle semblerait, selon JACOBS (1977), jouer un rôle de transporteur intermédiaire.

"Gut iron-binding protein" (GIBP)

Cette protéine est un dimère de masse moléculaire 78 kDa (POLLACK et LASKY, 1976; van CAMPEN, 1974; WORWOOD et al., 1971). POLLACK et LASKY (1976) ont montré que cette protéine fixait deux atomes de fer et était différente immunologiquement de la ferritine, de la lactotransferrine et de la sérotransferrine. Elle peut transférer son fer à la sérotransferrine. Chez le Rat, sa concentration dans la muqueuse reste constante et indépendante de la teneur en fer de l'organisme.

"Vitamin-D-dependent calcium-binding protein"

Cette protéine, de masse moléculaire 8 à 28 kDa selon les espèces, peut être associée à l'absorption du fer. Le calcium des aliments diminue l'absorption du fer (BARTON et al., 1978) et la stimulation de la synthèse de cette protéine conduit à une augmentation de l'absorption du fer, du calcium, du zinc et du cobalt (WASSERMAN, 1962; WASSERMAN et TAYLOR, 1968).

"Mucosal metal-binding protein" (MMBP)

"Mucosal metal-binding protein" est une protéine d'une masse moléculaire de l'ordre de 37 kDa (BARTON et al., 1978). Elle est différente de la ferritine au plan immunologique et chromatographique. Elle peut fixer le fer, le plomb, le cobalt et le calcium, aussi bien in vivo que in vitro.

Transferrine de la muqueuse

La présence de la sérotransferrine dans la muqueuse de rat a été démontrée par plusieurs groupes de recherche (HUEBERS et al., 1976; El-SHOBAKI et RUMMEL, 1977; OSTERLOH et FORTH, 1981; JOHNSON et al., 1983). Cette protéine se présente tout au long de l'intestin grêle de Rat. Cette protéine, selon HUEBERS et al. (1976; 1983), jouerait un rôle dans l'absorption du fer .

Lactotransferrine

La présence de la lactotransferrine à la surface luminale des cellules épithéliales de la muqueuse a été bien établie (MASSON et al., 1968; MASON et TAYLOR, 1979; ISOBE et al., 1979; TEDESCHI et al., 1987; LORIMIER, 1987). De VET et Van GOOL (1974) ainsi que Van VUGT et al. (1975) ont observé que la concentration en lactotransferrine dans le suc biliaire et le liquide duodénal variait en sens inverse de la teneur en fer de l'organisme. Par sa propriété de chélater le fer, elle pourrait jouer un rôle dans l'absorption de ce métal.

II. MECANISME DE L'ABSORPTION DU FER

A - PHASE INTRALUMINALE

Sous l'effet de l'acidité gastrique et de la dégradation par les enzymes gastro-intestinaux, le fer alimentaire est libéré en deux groupes distincts : le fer héminique et le fer non-héminique.

La disponibilité du fer héminique n'est pas modifiée par les substances alimentaires et les sécrétions intestinales, tandis que celle du fer non-héminique dépend largement des chélateurs présents dans l'alimentation ou dans les sécrétions gastro-intestinales.

B - PASSAGE DU FER A TRAVERS LA MUQUEUSE

La vitesse d'absorption du fer est exceptionnellement rapide. Le fer radioactif placé dans le duodénum de Rat peut se retrouver dans

l'organisme en 15 secondes et 40 % de l'absorption, pour une étude de 30 minutes, se fait au cours de la première minute (TOMSON et al., 1971; WORWOOD, 1974).

Le mouvement du fer à travers la muqueuse intestinale se décompose en plusieurs étapes: a) fixation à la membrane de la bordure en brosse et incorporation; b) transport intracellulaire; c) transfert total ou partiel vers le plasma (MANIS et SCHACHTER, 1964; WHEBY et al., 1964).

Chez les sujets normaux, approximativement 10 % du fer incorporé par l'épithélium intestinal reste dans la cellule tandis que, chez les sujets déficients en fer, virtuellement la totalité du fer entré dans la muqueuse est transféré dans l'organisme (BOENDER et VERLOOP, 1969; MARX, 1979).

C - FIXATION ET INCORPORATION DU FER PAR L'EPITHELIUM

De nos jours, le mécanisme par lequel le fer est fixé et incorporé dans l'épithélium demeure obscur. De nombreux travaux ont été consacrés à ce sujet. Plusieurs récepteurs ont été suggérés et pourraient être responsables de l'internalisation du fer.

Il a été montré que la membrane préparée à partir de la bordure en brosse de l'intestin de plusieurs espèces était capable de fixer le fer. La fixation est dépendante du temps et sensible au changement de température et de pH. Elle est saturable et inhibée par le cobalt en excès (COX et O'DONNELL, 1980; 1981; KIMBER et al., 1973; SIMPSON et al., 1986).

MUIR et al. (1984) et MUIR et HOPFER (1985) ont observé que, chez la Souris, le site de fixation du fer ferreux était localisé préférentiellement dans la portion supérieure de l'intestin grêle. La densité de ces sites dépendrait du stock en fer de l'organisme.

MARX et AISEN (1981) ont montré que le fer ferreux pouvait être internalisé dans des vésicules formées à partir de la membrane microvilleuse de l'intestin de lapin. Récemment, SIMPSON et al. (1983, 1984, 1985) ont observé le même phénomène pour le fer ferrique chez la souris. Cependant, JOHNSON et al. (1985) par des expériences in vivo ont montré que l'incorporation de fer ferreux était inhibée par des inhibiteurs du cytosquelette tels que la colchicine, la vincristine et la cytochalasine B. Ces auteurs ont conclu que l'incorporation du fer nécessiterait le fonctionnement du cytosquelette.

1 - Rôle de la sérotransferrine

La sérotransferrine en tant qu'intermédiaire de l'absorption du fer a fait l'objet de nombreuses controverses.

HUEBERS et al. (1983) ont observé une absorption du fer à partir de la sérotransferrine quand ils plaçaient la protéine marquée au fer radioactif dans une anse du duodénum et du jéjunum de rat. Ces auteurs ont ainsi postulé que la transferrine fonctionnait comme un transporteur du fer (Fig.16 p.67): elle est sécrétée par l'épithélium dans la lumière intestinale; elle fixe le fer; le complexe fer-transferrine est ensuite internalisé par les cellules épithéliales; le fer est libéré de la sérotransferrine et la sérotransferrine sous forme apo- retournerait à la surface du côté apical pour être recyclée.

Cependant, cette hypothèse a fait l'objet de nombreuses controverses.

D'une part, l'origine de la sérotransferrine de la muqueuse (mucosal transferrin) est discutable. Sur la base de compositions différentes en acides aminés, HUEBERS et al. (1976) ont suggéré que la transferrine de la muqueuse était distincte de la transferrine du sérum. Or, OSTERLOH et al. (1987) ont pensé que cette différence était due à la dégradation partielle par les protéases intestinales très actives. IDZERDA et al. (1986) ont démontré que le gène de la sérotransferrine n'était pas exprimé dans la muqueuse où le mRNA n'était pas détectable. Donc, la transferrine serait importée. Le plasma semble, selon OSTERLOH et al. (1985) l'origine de la sérotransferrine présente dans la muqueuse. Ces auteurs ont observé que chez le Rat, le rapport transferrine versus albumine de la muqueuse intestinale était très proche de celui du plasma. Une petite quantité de cette protéine peut, selon SCHÜMANN et al. (1986), être issue du suc biliaire.

D'autre part, la présence du récepteur de la sérotransferrine sur la bordure en brosse de l'entérocyte n'a pas pu être confirmée. Le fractionnement subcellulaire de la muqueuse intestinale n'a pas pu montrer la présence de transferrine dans la fraction de la bordure en brosse (OSTERLOH et al., 1986). De plus, la membrane de la bordure en brosse de Lapin n'est pas capable de fixer la sérotransferrine humaine (MAZURIER et al., 1985). Par des méthodes immunocytochimiques, PARMLEY et al. (1985) et BANERJEE et al. (1986) n'ont pas pu caractériser le

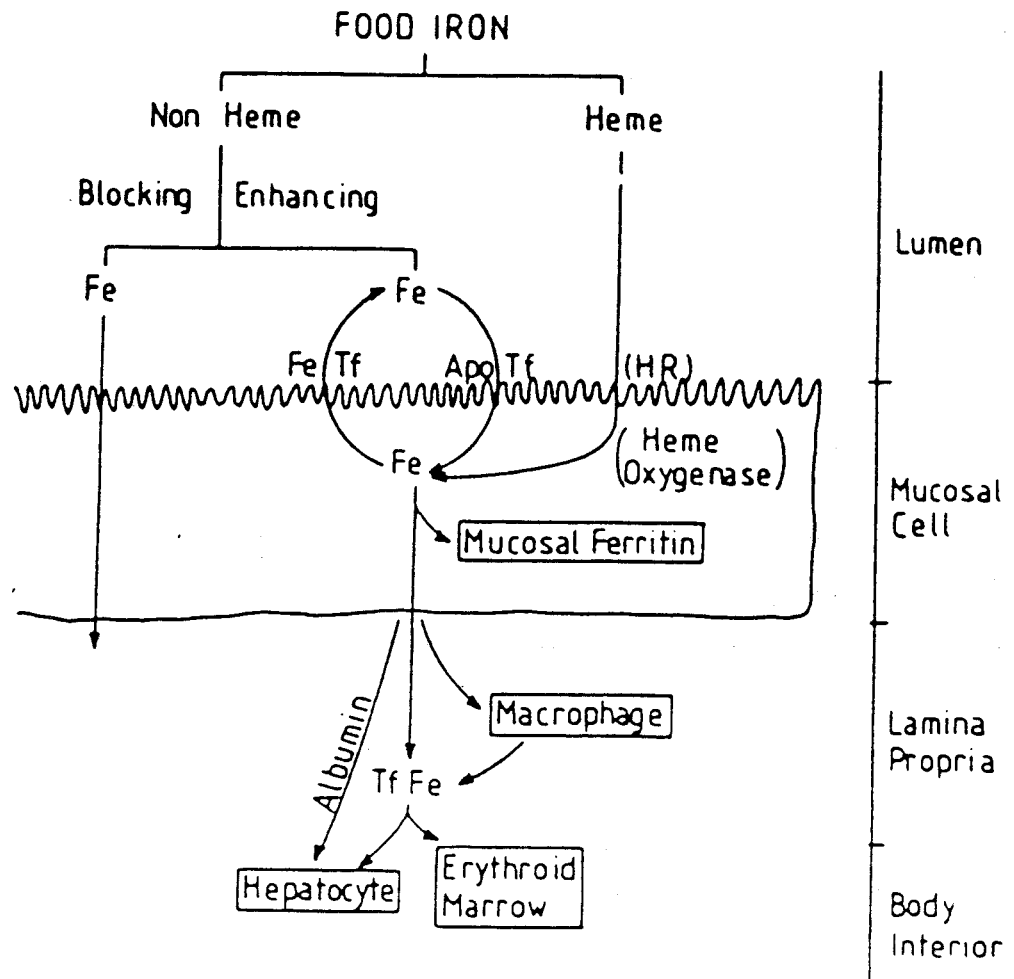


Fig. 16. Modèle de l'absorption intestinale du fer
(D'après HUBERS & FINCH, 1985)

récepteur de la transferrine dans la membrane apicale des entérocytes de Rat.

Et enfin, COX et al.(1979) ont montré que la sérotransferrine n'était pas capable de céder son fer à des biopsies intestinales humaines.

2 - Rôle de la lactotransferrine

Comme nous avons exprimé dans le chapitre "Localisation de la lactotransferrine", la présence de la lactotransferrine à la surface luminale des cellules épithéliales de la muqueuse est à présent bien établie (TEDESCHI et al., 1987; LORIMIER, 1987).

Les techniques immunocytochimiques ont permis à LORIMIER (1987) de montrer sa présence sur toute la hauteur de la villosités de la muqueuse des biopsies duodénales humaines et de préciser également sa localisation au contact direct avec la microvillosité sur toute la hauteur du plateau strié. L'origine de cette lactotransferrine est, selon LORIMIER (1987), les cellules caliciformes.

Cependant, le rôle de la lactotransferrine dans l'absorption intestinale du fer est encore mal défini.

L'effet inhibiteur de la lactotransferrine sous forme "apo" dans l'absorption de sels de fer a été démontré par deux groupes de chercheurs. De LAEY et al.(1968) ont constaté que l'apo-lactotransferrine humaine inhibait l'absorption du fer dans une anse inversée de l'intestin de Rat. De même, De VET et Van GOOL (1974), dans une étude réalisée in vivo, ont montré que l'apo-lactotransferrine humaine introduite dans le duodénum humain diminuait l'absorption du fer ferreux.

De VET et Van GOOL (1974), Van VUGT et al.(1975) ainsi que BROCK (1980) ont pensé que, dans des conditions anémiques, les autres contrôles de l'absorption des métaux sont ouverts et, par conséquent, une absorption excessive des métaux lourds serait en jeu. Ces auteurs ont ainsi conclu que la lactotransferrine dont la concentration est accrue dans le suc biliaire et le liquide duodénal chez le Lapin ou chez l'Homme lors d'une anémie, jouerait un rôle régulateur inhibant dans l'absorption intestinale du fer ayant pour but d'éviter une absorption excessive.

Paradoxalement, COX et al. (1979) ont démontré, dans une expérience in vitro, que la lactotransferrine était capable de donner son fer à des biopsies intestinales humaines.

Récemment, un récepteur de la lactotransferrine a été mis en évidence dans la membrane de la bordure en brosse de l'intestin du Lapin (MAZURIER et al. 1985) et du Singe (DAVIDSON et LÖNNERDAL, 1988).

Cependant, le mécanisme de l'absorption est encore inconnu. La présence intracellulaire de la lactotransferrine dans les entérocytes, plus précisément dans la zone apicale définie comme partie du cytoplasme riche en ribosomes libres, a été mis en évidence par LORIMIER (1987). Cela laisse penser qu'une endocytose par l'intermédiaire du récepteur pourrait en être le mécanisme. Cependant, COX et al. (1979), par leurs observations, ont conclu que la lactotransferrine n'était pas internalisée.

D - TRANSFERT DU FER A TRAVERS LA CELLULE MUCOSALE

Le transfert du fer nouvellement absorbé se divise en deux phases : une phase rapide et une phase lente. Chez le Rat, 15 secondes après l'introduction d'une dose de fer radioactif, la radioactivité commence à se retrouver dans la circulation portale. Après la phase rapide, le transfert continue jusqu'à 24 h après l'administration avec une vitesse beaucoup plus lente (WHEBY et al., 1964).

L'autoradiographie à très haute résolution a permis à BEDARD et al. (1971) de visualiser le passage du fer à travers la cellule. Ces auteurs ont montré que, pendant la phase rapide, le fer radioactif passait rapidement de la membrane de la bordure en brosse au réticulum endoplasmique rugueux et aux ribosomes libres, puis aux vaisseaux de la lamina propria en passant à travers la membrane latérale. Plusieurs heures après l'administration, la majeure partie de l'isotope résiduel est localisé au niveau du réticulum endoplasmique rugueux et des ribosomes libres et une radioactivité faible se retrouve dans les granules de ferritine lysosomale, dans le noyau ou dans l'appareil de Golgi. Des travaux récents ont indiqué que les mitochondries n'intervenaient pas dans le transfert du fer (HUMPHREYS et al., 1977).

Plusieurs auteurs ont montré que lorsque le fer est incorporé dans la cellule, il est lié à des porteurs dont l'identité demeure mal connue. Selon certains, la majorité du fer absorbé dans le cytosol se

présente sous forme de ferritine ou de certains acides aminés (HALLIDAY et al., 1975; SHEEHAN et FRENKEL, 1972). Selon d'autres, 95 % du fer est lié à une protéine "transferrin-like" et à la ferritine (HUEBERS et al., 1971). D'après TURNBULL (1977), la ferritine ne participerait pas à la phase rapide de transport. Au contraire, elle bloquerait le transfert en immobilisant le fer dont une partie serait libérée au cours de la phase lente, le reste étant perdu avec l'exfoliation des cellules.

E - LIBERATION DU FER AU NIVEAU BASOLATERAL

La dernière étape de l'absorption du fer est la libération du fer au niveau basolatéral de l'entérocyte. Le mécanisme de ce procédé demeure encore mal défini.

L'intervention de la sérotransferrine ainsi que de son récepteur dans ce procédé a fait l'objet de controverses.

En se fondant sur le fait que la membrane basolatérale des cellules épithéliales de l'intestin de Rat était capable de fixer la sérotransferrine et que cette dernière augmentait la libération de fer par l'entérocyte isolé (LEVINE et al., 1972; YOSHINO et MANIS, 1973; EVANS et GRACE, 1974), JOHNSON et al. (1983) ont suggéré que la sérotransferrine transporterait le fer hors de l'entérocyte par l'intermédiaire du récepteur de la membrane basolatérale.

Cependant, cette hypothèse ne peut expliquer de nombreux faits. POLLACK et al. (1963), ainsi que WHEBY et JONES (1963), ont par exemple montré qu'une perfusion veineuse de fer en quantité suffisante pour saturer la totalité de la sérotransferrine plasmatique n'avait qu'un effet mineur sur la libération du métal. BANERJEE et al. (1986) ont observé, au niveau de la membrane basolatérale de l'entérocyte de Rat, une densité plus importante du récepteur de la sérotransferrine lorsque le Rat est surchargé en fer, l'absorption du fer est alors moins importante.

Enfin, le pH du milieu interstitiel, qui est de pH 7,4, n'est pas favorable à une telle hypothèse car il bien connu que à pH neutre, la sérotransferrine se fixe très fortement à son récepteur.

III. REGULATION DE L'ABSORPTION DU FER

Les connaissances sur l'absorption du fer et sa régulation sont encore très limitées. Chacun des facteurs impliqués dans l'absorption du métal peut être considéré, pendant une période ou une autre, comme le facteur déterminant dans la régulation.

L'observation constante est que toutes les conditions qui stimulent l'érythropoïèse ou la réduction des réserves de fer (grossesse, hémorragie et déficience en fer) augmentent l'absorption alors que les conditions associées à une réserve élevée ou à une érythropoïèse réduite (surcharge en fer et irradiation grave) diminuent l'absorption.

A - SECRETIONS GASTRO-INTESTINALES

MURRAY et STEIN (1968), dans une étude réalisée in vitro, ont observé que l'absorption du fer était augmentée par une pré-incubation avec le liquide intestinal de Rat anémique. Une sécrétion accrue de la lactotransferrine dans le liquide duodénal de Lapin anémique (Van VUGT et al., 1975) et de l'Homme anémique (De VET et Van GOOL, 1974) laisse penser que la régulation de la sécrétion de cette protéine constituerait un mécanisme de régulation de l'absorption du fer.

B - ROLE DES CELLULES EPITHELIALES

Les hypothèses concernant la régulation martiale le plus fréquemment admises, malgré les nombreuses critiques dont elles font l'objet, restent les hypothèses qui attribuent à l'épithélium villositaire le rôle principal dans l'absorption du fer (LINDER et MUNRO, 1977).

L'hypothèse épithéliale attribue, en effet, au seul stock martial épithélial villositaire un rôle régulateur. Cette théorie épithéliale postule (CROSBY, 1965; WHEBY, 1966) que la quantité de fer incorporée dans les cellules épithéliales naissantes au fond des cryptes de Lieberkühn dépend du "turnover" du fer plasmatique et module, 3 jours plus tard, lorsque la cellule parvient au sommet de la villosité, soit le procédé de la captation du fer alimentaire soit le procédé du transfert au plasma.

Cependant, cette conception épithéliale, longtemps admise et encore citée dans la plupart des traités, mais déjà écartée pourtant par les

résultats des études histochimiques (CATTAN et al., 1967), ne peut répondre aux phénomènes observés suivants (CAVILL et al., 1975):

a) le délai qui sépare les variations des stimuli exogènes des variations de l'absorption peut être de quelques heures (BATEY et GALLAGHER, 1977), ce qui est insuffisant pour assurer le renouvellement des cellules épithéliales porteuses de nouvelles informations au sommet villositaire, siège de l'absorption ;

b) le fer radioactif administré par voie orale ou par voie intraveineuse ne se localise pas au niveau de la ferritine épithéliale (BATEY et GALLAGHER, 1977);

c) la captation du fer radioactif par des cellules épithéliales isolées n'est pas régulée par la teneur en fer de l'organisme et est un phénomène passif (SAVIN et COOK, 1978).

L'élucidation du rôle de la lactotransferrine dans l'absorption intestinale du fer (COX et al., 1979; MONTREUIL et al., 1985) et, plus particulièrement, la mise en évidence de la présence du récepteur de la lactotransferrine dans la membrane de la bordure en brosse de l'entérocyte (MAZURIER et al., 1985; DAVIDSON et LONNERDAL, 1985) pourrait fournir un nouveau mécanisme de régulation de l'absorption du métal (SPIK, 1988).

C - RÔLE DES MACROPHAGES DU CHORION VILLOSITAIRE

Le rôle des macrophages du chorion villositaire dans la régulation de l'absorption du fer a été, depuis longtemps, évoqué par les études histochimiques effectuées chez l'animal (GILLMAN et IVY, 1947; LILLIE et GEER, 1965) et chez l'Homme (CATTAN et al., 1967; REFSUM et SCHREINER, 1980).

Une augmentation du nombre de macrophages a été montrée dans le chorion villositaire après une ingestion du fer (ASTALDI et al., 1966; THERON et MEKEL, 1971).

Une accumulation du fer dans les macrophages du chorion villositaire a été révélée au cours d'une absorption du fer (CATTAN et al., 1967).

Un modèle du rôle des macrophages du chorion villositaire dans la régulation de l'absorption intestinale du fer a été proposé par REFSUM et SCHREINER (1980)(Fig.17, p.73) selon lequel les macrophages du chorion villositaire interviendrait au niveau du passage du fer de

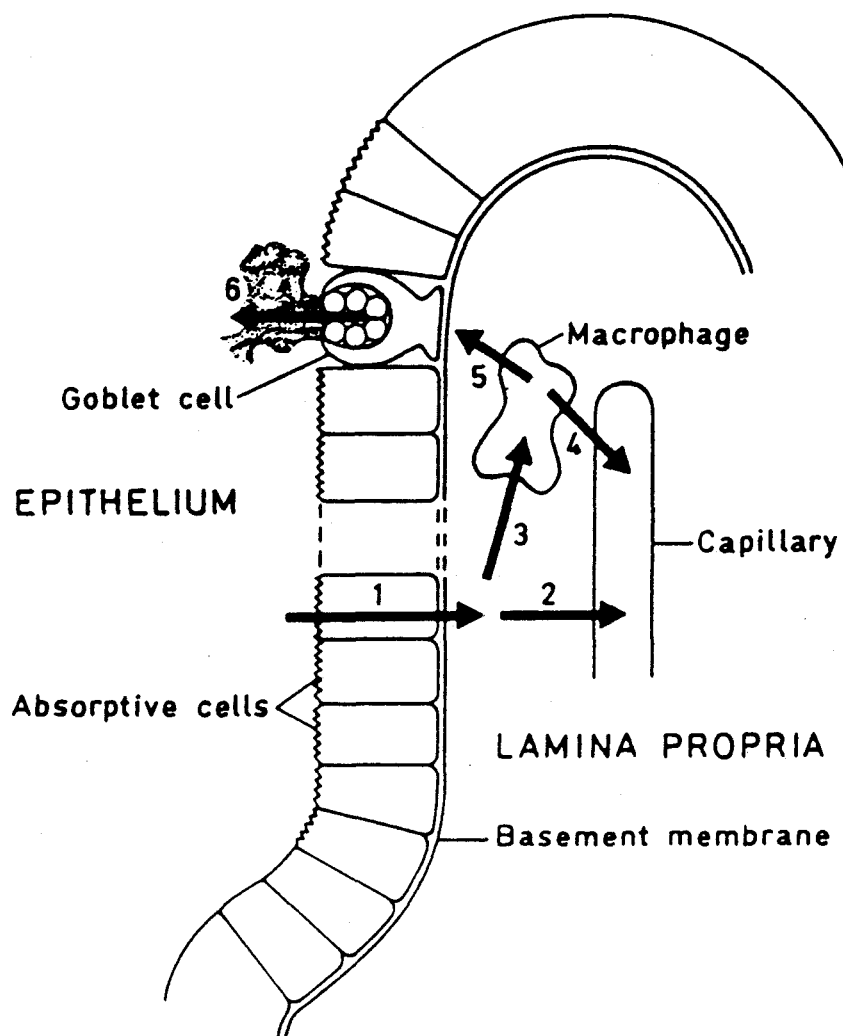


Fig. 17. Rôle des macrophages de chorion dans la régulation de l'absorption intestinale du fer

(Selon REFSUM & SCHREINER, 1980)

1) Absorption du fer à travers l'entérocyte; 2) Passage du fer dans le plasma; 3) Capture du fer par les macrophages; 4) Libération du fer des macrophages dans le plasma; 5) Transfert du fer des macrophages aux cellules à mucus; 6) Excrétion du fer par les cellules à mucus

l'entérocyte au plasma, par la compétition avec le plasma pour le fer. Le devenir du fer stocké dans les macrophages suivrait deux voies différentes : libération dans le plasma ou excrétion via les cellules caliciformes. La teneur en fer de l'organisme déterminerait l'importance de chacune de ces deux voies et régulerait ainsi la quantité du fer à absorber.

D - FACTEURS HUMORAUX

Les plus importants stimuli connus de l'absorption du fer sont l'érythropoïèse et l'importance de la réserve de fer (BOTHWELL et al., 1958). Une accélération de la production des cellules rouges est liée à une absorption accrue de fer quelle qu'en soit la cause: saignement, hémolyse ou hypoxie. Inversement, une diminution de l'érythropoïèse qui se produit au cours du jeûne, d'une transfusion de sang ou d'une descente au niveau de la mer après un séjour à haute altitude, provoque une diminution de l'absorption du fer (BOTHWELL et al., 1958; WEINSTRaub et al., 1964; CONRAD et al., 1967).

La plupart des facteurs humoraux qui modifient l'absorption n'exercent leurs effets qu'après quelques jours (HAHN et al., 1943; JACOBS et al., 1966). Ce délai ne serait pas dû à la formation de nouveaux entérocytes, car l'injection de l'endotoxine ou l'enlèvement de stimuli hypoxiques diminue immédiatement l'absorption du fer, alors qu'une transfusion des réticulocytes augmente rapidement l'absorption du fer (CORTELL et al., 1967; FINCH et al., 1982; PIRZIO-BIROLI et al., 1960; WEINSTRaub et al., 1965).

Plusieurs auteurs ont cherché sans succès un facteur plasmatique qui signalerait à l'intestin d'augmenter ou de diminuer l'absorption du fer (KRANTZ et al., 1959; BEUTLER et al., 1960). Des observations cliniques ont indiqué que la concentration en hémoglobine, la concentration en fer plasmatique et la sérotransferrine n'exerçaient pas cette fonction (BEUTLER et al., 1958; CONRAD et al., 1962), ni la ferritine circulante (GREEMAN et al., 1975).

Il a été postulé qu'un facteur stimulant de l'érythrocyte fonctionnerait comme messenger qui informe l'entérocyte de l'état de nos besoins en fer. Cependant, une absorption du fer accrue continue chez les sujets déficients en fer longtemps après la restauration de l'hémoglobine à un niveau normal (BEUTLER et al., 1958; BEZWODA et al., 1979). En outre,

chez certains patients atteints d'anémie sidéroblastique ou de cirrhose hépatique, l'absorption est augmentée sans que l'érythropoïèse ne soit accélérée (CONRAD et al., 1962; WEINSTRAUB et al., 1964).

APTE et BROWN (1969) ont décrit un facteur thermostable trouvé dans le plasma de femme enceinte qui augmentait l'absorption du fer, lorsque ce facteur est placé dans la lumière de l'intestin de Rat. Ce facteur n'avait pas d'effet lorsqu'il était injecté parentéralement. L'identité de ce facteur reste inconnue.

CONCLUSIONS

Ainsi que nous avons pu le remarquer au cours de ce chapitre, l'absorption intestinale du fer est un processus très complexe. De nombreux facteurs, intraluminaux, mucosaux ou humoraux, sont impliqués dans différentes étapes de ce processus. Une quantité considérable de travaux ont été consacrés à ce sujet durant ces trente dernières années. Si la physiologie de ce processus est bien élucidée, les mécanismes cellulaire et moléculaire sont, cependant, encore très mal connus. En particulier, le rôle des transferrines soulève de nombreuses controverses.

TRAVAUX PERSONNELS

**MISE EN EVIDENCE IN VIVO DU ROLE DE LA LACTOTRANSFERRINE
DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER**

INTRODUCTION

Comme nous l'avons montré dans le chapitre "Mécanisme de l'absorption intestinale du fer", le rôle de la lactotransferrine dans l'absorption intestinale du fer est encore mal défini, bien que la première hypothèse ait été émise dès 1960 par MONTREUIL et al.

Face à des données apparemment discordantes, obtenues chez différentes espèces animales (COX et al., 1979; HUEBERS et al., 1983; MAZURIER et al., 1985), il nous a semblé raisonnable de ne pas extrapoler les résultats expérimentaux d'un animal à l'autre. Nous avons ainsi, dans un premier temps, entrepris une étude in vivo visant à vérifier si, chez la Souris, l'absorption du fer pouvait s'effectuer à partir de la lactotransferrine murine.

Ces expériences ont été réalisées chez la Souris anesthésiée, en introduisant de la lactotransferrine de Souris préalablement marquée au [⁵⁹Fe] dans des anses duodénales, tout en gardant les vaisseaux sanguins intacts. Nous avons fixé la concentration en lactotransferrine de Souris à 1 mg / ml afin d'obtenir une précision de mesure satisfaisante tout en respectant une concentration physiologique. Si le fer de la lactotransferrine est absorbé par les entérocytes, une portion du métal se retrouvera dans la circulation sanguine et sera ainsi véhiculé au niveau des différents tissus. Car il est difficile de distinguer le fer absorbé par les entérocytes de celui qui est fixé sur les entérocytes à la surface, nous avons ainsi suivi l'absorption par la mesure de la radioactivité du [⁵⁹Fe] transférée dans l'animal après prélèvement des anses duodénales. La spécificité et la saturabilité du processus de l'absorption ont été testées par une étude parallèle, en présence d'un excès de son analogue, la lactotransferrine humaine. Nous avons choisi la séro-

transferrine humaine comme la protéine utilisée pour diminuer toutes les interactions non spécifique, car la sérum albumine bovine réagit avec la lactotransferrine alors que la sérotransferrine n'interagit ni avec la lactotransferrine ni avec son récepteur (MAZURIER et al., 1985).

MATERIELS ET METHODES

Matériels.

L'apo-lactotransferrine de Souris, préparée selon la méthode mise au point par SAWATZKI et KUBANEK (1983)(p.131), nous a été aimablement fournie par Monsieur le Dr. G. Sawatzki que nous tenons à remercier vivement. La lactotransferrine humaine a été préparée selon un protocole décrit par CHERON et al.(1977)(p.131).

Toutes les techniques de saturation et de désaturation des différentes transferrines sont détaillées page 132.

La solution d'essai se compose de 1 mg / ml de la lactotransferrine de Souris marquée au [^{59}Fe] en solution dans un tampon 125 mM NaCl / 3,5 mM KCl / 10 mM glucose / 1 mM CaCl_2 / 10 mM Mes (pH 6,0) et contenant 50 mg / ml de sérotransferrine humaine (Behringwerke AG), 1 mg / ml d'inhibiteur tryptique isolé des graines de Soja (Pierce). La spécificité et la saturabilité du processus de l'absorption sont testées dans une étude parallèle, en présence de 50 mg / ml de la lactotransferrine humaine saturée en fer, la sérotransferrine étant omise afin que la concentration en protéines du milieu soit constante.

Méthodes

Etude in vivo de l'absorption intestinale du fer de la lactotransferrine

Des souris (Swiss mice) âgées de 5 semaines (20-25 g) sont utilisées pour l'étude in vivo de l'absorption intestinale du fer de la lactotransferrine de Souris.

Après anesthésie de l'animal par injection intrapéritonéale de 0,3 ml d'Uréthane (éthyl carbamate)(10 % dans le sérum physiologique), la paroi abdominale est incisée horizontalement sur environ 3 cm, immédiatement au-dessous de la cavité thoracique. Le duodénum est incisé à

environ 2 cm en aval du canal cholédoque. 10 ml de sérum physiologique sont injectés au niveau de ce canal afin de rincer le duodénum. Après le rinçage, l'intestin est ligaturé au niveau du point d'injection et la solution de test renfermant la lactotransferrine de Souris marquée au [^{59}Fe] est administrée au niveau de l'incision. Une seconde ligature est alors pratiquée afin de maintenir pendant des temps variables la solution de lactotransferrine marquée au contact de la muqueuse intestinale.

L'animal est maintenu à température du Laboratoire, et après un temps variant de 10 à 60 min, il est sacrifié par dislocation cervicale. L'anse duodénale est prélevée au niveau de la ligature et rincée par 20 ml de sérum physiologique. Après l'élimination des tissus adipeux, conjonctifs et pancréatiques adhérents, l'anse est séchée puis pesée.

La radioactivité incorporée par l'animal entier, après excision de l'anse duodénale, est mesurée à l'aide d'une sonde MECASERTO à cristal épais, dans le service de Médecine Nucléaire du Professeur MARCHANDISE (Centre Hospitalier Régional de Lille) que nous tenons à remercier vivement. Les mesures sont effectuées dans des conditions géométriquement constantes. Le résultat est exprimé en pmol de fer trouvé dans l'animal entier / 100 mg d'anse duodénale ligaturée. Deux animaux sont utilisés pour une détermination et deux expérimentations sont réalisées indépendamment.

Pour étudier la non-dégradation du complexe fer-lactotransferrine au cours de l'expérimentation, une fraction aliquote de 100 μl de la solution injectée dans l'anse est prélevée après une durée de 60 min et analysée par chromatographie de tamisage moléculaire.

Chromatographie de tamisage moléculaire

La chromatographie de tamisage moléculaire est effectuée sur colonne Superose 12 (Pharmacia) avec un appareil de FPLC (Pharmacia).

Le fractionnement a été réalisé dans un tampon 150 mM NaCl / 10 mM Tris-HCl de pH 7,5 avec un débit de 24 ml / h. Des fractions de 0,5 ml sont recueillies et la radioactivité du [^{59}Fe] est mesurée par spectrométrie en scintillation solide (LKB Compugamma).

RESULTATS

Mise en évidence de la non-dégradation du complexe fer-lactotransferrine au cours de la mesure de l'absorption intestinale

Lors de l'étude du rôle de la lactotransferrine dans l'absorption intestinale du fer, il est primordial que le fer reste associé à la protéine même en présence des protéases intestinales. Dans le but de minimiser la dégradation luminale de la lactotransferrine, nous avons donc ajouté dans la solution de test une quantité importante de sérotransferrine humaine non marquée et d'un inhibiteur de protéases. Afin de vérifier la stabilité du complexe fer-lactotransferrine de Souris au cours de la mesure de l'absorption intestinale, le contenu luminal a été analysé après la manipulation par chromatographie de tamisage moléculaire.

Le profil d'élution (Fig.18 p.80) montre la présence d'un seul pic radioactif correspondant à une masse moléculaire de 80 kDa, témoignant de la non-dégradation protéolytique de la lactotransferrine et de la stabilité de la liaison avec le [^{59}Fe].

Absorption du fer à partir de la lactotransferrine de Souris

Nous avons étudié l'absorption du fer de la lactotransferrine in vivo dans des anses duodénales de Souris afin de démontrer que le [^{59}Fe] complexé à la lactotransferrine de Souris était incorporé par l'entérocyte de Souris.

La Fig.19 (p.81) qui montre l'augmentation de la radioactivité du [^{59}Fe] dans l'animal entier complexé à la lactotransferrine de Souris en fonction du temps, est le résultat représentatif de deux expérimentations dont chaque point présente la moyenne et l'écart.

Nous pouvons constater que la vitesse d'incorporation diminue en fonction du temps. Ceci pourrait être le reflet d'une perturbation physiologique au cours de l'anesthésie ou encore s'expliquer par un mécanisme de "down regulation" encore inconnu.

La présence d'un excès de lactotransferrine humaine saturée en fer diminue considérablement l'incorporation du [^{59}Fe] à partir de la lactotransferrine de Souris. Nous avons montré que l'absorption du fer n'était pas déclenchée par une dégradation du complexe [^{59}Fe]-lacto-

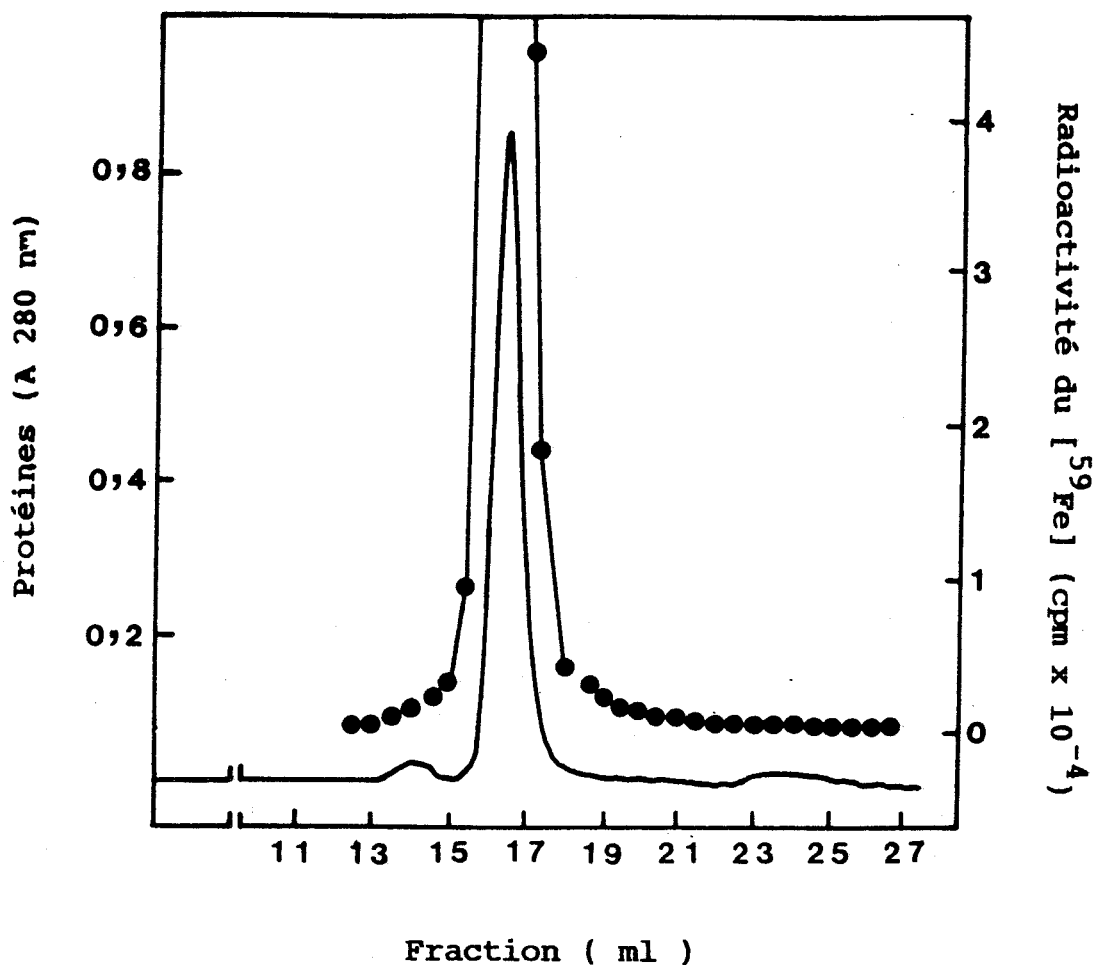


Fig. 18. Chromatographie de tamisage moléculaire sur colonne de Superose 12 du contenu luminal après incubation.

100 μ l du contenu du duodénum ligaturé sont fractionnés avec un débit de 24 ml / h sur une colonne de tamisage moléculaire Superose 12. La radioactivité de [⁵⁹Fe] (●) est mesurée par spectrométrie en scintillation solide (LKB Compugamma).

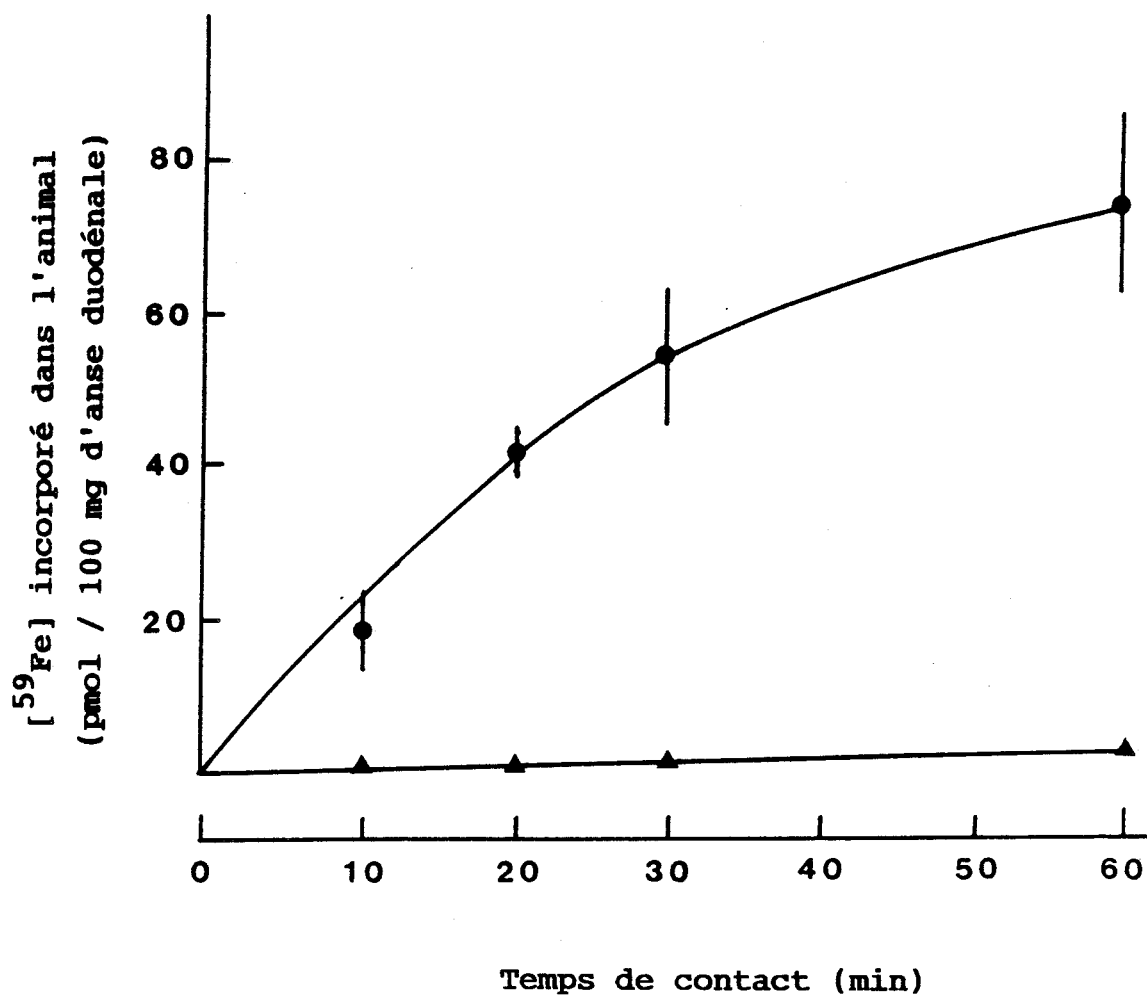


Fig. 19. Cinétique de l'incorporation du [^{59}Fe] par le duodénum ligaturé de Souris à partir de la lactotransferrine de Souris.

Sous anesthésie, 100 μg de la lactotransferrine de Souris marquée au [^{59}Fe] dans 100 μl de solution de test sont inclus dans le duodénum ligaturé de Souris. Après des temps de contact variés, la radioactivité du [^{59}Fe] incorporée dans le corps de l'animal est mesurée.

(●) Incorporation en absence de lactotransferrine humaine;

(▲) Incorporation en présence d'un excès de lactotransferrine humaine saturée en fer.

transferrine de souris, et donc cette diminution ne peut pas s'expliquer par un effet protecteur de la lactotransferrine humaine ajoutée en excès. Une explication plausible est que la lactotransferrine humaine est fonctionnellement similaire à celle de Souris et que l'absorption intestinale du fer de la lactotransferrine de Souris suit un mécanisme saturable.

CONCLUSION ET DISCUSSION

La lumière intestinale est le siège d'une importante activité protéolytique. Il nous a semblé primordial de minimiser cette activité, afin de protéger la lactotransferrine de toute dégradation. Sans tenir compte de cette activité protéolytique, une absorption du fer à partir de la sérotransferrine, mise en évidence lors d'une étude analogue chez le Rat, a conduit HUEBERS et al. (1983) à suggérer la présence d'un récepteur de la sérotransferrine. Par la suite, la présence de ce récepteur a été mise en doute par plusieurs auteurs (MAZURIER et al., 1985; PARMLEY et al., 1985; BANEJEE et al., 1986).

Nos résultats démontrent pour la première fois chez la Souris, par une étude in vivo, l'absorption intestinale du fer à partir de la lactotransferrine de Souris.

Ces résultats corroborent l'hypothèse de MONTREUIL (1960) selon laquelle la lactotransferrine, principal chélateur du fer dans le lait humain, serait le facteur alimentaire responsable de l'absorption de ce métal chez le nourrisson.

Nos résultats montrent que, chez la Souris, le fer conjugué à la lactotransferrine de Souris peut être absorbé sans nécessiter la libération préalable du fer dans la lumière intestinale et que l'absorption est un processus saturable, ce qui peut suggérer la présence d'un récepteur de la lactotransferrine au niveau entérocytaire.

La présence de lactotransferrine à la surface de l'entérocyte a été montrée (MASSON et al., 1968; TEDESCHI et al., 1987; LORIMIER, 1987). Il est vraisemblable que la lactotransferrine placée dans la lumière intestinale (lactotransferrine exogène) qui doit traverser la couche de mucus pour accéder à la surface de l'entérocyte soit moins accessible pour l'entérocyte que la lactotransferrine endogène, déjà associée à la surface cellulaire.

Sur la base de cette considération, il est possible d'expliquer l'effet inhibiteur de l'apo-lactotransferrine exogène dans l'absorption des sels de fer observé par De LAEY et al. (1968) et De VET et Van GOOL (1974). En fait, la lactotransferrine endogène à la surface de l'entérocyte constituerait une barrière pour les sels de fer. Le fer à dose physiologique serait, a priori, capté par cette lactotransferrine. L'apo-lactotransferrine exogène mise en jeu entrerait en compétition avec la lactotransferrine endogène et ainsi diminuerait l'absorption des sels de fer.

**MISE EN EVIDENCE D'UN RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE
SUR LA BORDURE EN BROsse DE L'INTESTIN DE SOURIS**

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que le fer lié à la lactotransferrine pouvait être absorbé sans libération préalable du fer dans la lumière intestinale. Nos résultats ont suggéré la présence d'un récepteur de la lactotransferrine sur la membrane apicale de l'entérocyte de Souris.

Le but de ce travail a été de mettre en évidence ce récepteur et de définir les principaux paramètres de l'interaction de la lactotransferrine avec ce récepteur membranaire. Nous avons également mis au point un protocole pour solubiliser le récepteur, étape préalable à sa purification.

Comme la présence d'une protéine immunologiquement identique à la transferrine sérique a été mise en évidence dans le lait de Souris

à une concentration de 3 mg / ml, soit 3 fois plus élevée que la concentration de la lactotransferrine (KINKADE et al., 1976), nous avons cherché à préciser le rôle de cette "serotransferrine-like" dans l'absorption intestinale au niveau de la bordure en brosse de l'intestin de Souris. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication parue dans le Biochemical Journal que nous avons fait figurer dans ce chapitre.

Lactotransferrin receptor of mouse small-intestinal brush border

Binding characteristics of membrane-bound and Triton X-100-solubilized forms

Wei-Li HU,* Joël MAZURIER,* Günther SAWATZKI,† Jean MONTREUIL* and Geneviève SPIK*†

*Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, Unité Associée au CNRS n° 217 et Laboratoire Pilote du Ministère de l'Éducation Nationale, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France, and †Abteilung für Transfusions Medizin der Universität, D-7900 Ulm, Donau, Federal Republic of Germany

A specific lactotransferrin receptor was identified in the mouse small-intestinal brush-border membrane and the binding features were investigated in homologous and heterologous systems. The receptor was found to be specific for lactotransferrins isolated from milk of various species, but the affinity was higher toward the homologous ligand ($K_d = 3.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ compared with $2.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ for both human and bovine lactotransferrins). However, the number of binding sites (n) was the same for the three lactotransferrins, namely $0.53 \times 10^{12}/\mu\text{g}$ of membrane protein. The binding of mouse lactotransferrin to its receptor was found to be pH-dependent, with an optimal binding at pH 5.5, and seemed unlikely to be carbohydrate-mediated. The receptor was demonstrated to be devoid of any affinity for human and mouse serotransferrins or for a 'serotransferrin-like' protein isolated from mouse milk. The receptor was solubilized with 1 % Triton X-100 with good yield. The solubilized receptor was found to retain lactotransferrin-binding activity and sensitivity to pH.

INTRODUCTION

Since the discovery of lactotransferrin (or lactoferrin) in human milk, Montreuil *et al.* (1960a,b) proposed a role of this glycoprotein in the iron-donating function of milk in newborns. This view was reinforced by the characterization of lactotransferrin in duodenal fluids as well as at the surface of intestinal mucosa (Masson *et al.*, 1966) and by the marked ability of human and bovine lactotransferrins to resist, in large part, proteolytic attack during the transit through the digestive gut in newborn humans (Spik *et al.*, 1982a; Davidson & Lönnardal, 1985a). The demonstration by Cox *et al.* (1979) and by Yoshino *et al.* (1983) that human and bovine lactotransferrins were capable of donating iron to intestinal mucosa, and the characterization by Mazurier *et al.* (1985) of a lactotransferrin receptor in the rabbit jejunal brush-border vesicles, provide more arguments for the possible role of lactotransferrin in intestinal iron absorption. Since it was previously reported that the binding of human lactotransferrin to human alveolar macrophages can be inhibited by fucoidin (Campbell, 1982) or by fucosylated bovine serum albumin (Goavec *et al.*, 1985), we thus investigated the role of carbohydrate in the binding of lactotransferrin to mouse intestinal brush-border-membrane vesicles. The presence in some mammalian milks, in addition to lactotransferrin, of a 'serotransferrin-like' protein led us to compare the role of both proteins in intestinal iron absorption. As mouse milk contains 3 mg of a 'serotransferrin-like protein'/ml as against 1 mg of lactotransferrin/ml (Leclercq *et al.*, 1987), the recognition by mouse intestinal brush-border membrane of both iron-binding proteins and of serotransferrin isolated from mouse serum was

analysed. Moreover, the solubilization of the lactotransferrin receptor was performed by using Triton X-100 as a detergent and the binding features of the solubilized receptor were compared with those of the membrane-bound receptor.

MATERIALS AND METHODS

Proteins

Iron-free human serotransferrin was obtained from Behring (Marburg, Germany) and hen's-egg lysozyme (grade I) from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.). Human and bovine lactotransferrins were prepared as described elsewhere (Chéron *et al.*, 1977; Spik *et al.*, 1982b). Mouse serotransferrin was isolated from mouse plasma as described by Sawatzki *et al.* (1981). Mouse 'serotransferrin-like' protein and lactotransferrin were isolated from mouse milk by the method of Sawatzki & Kubanek (1983) and Leclercq *et al.* (1987). The three mouse transferrins were homogeneous as assessed by SDS/polyacrylamide-gel electrophoresis, gel chromatography and immunoelectrophoresis. The iron-free and iron-saturated forms of transferrins were obtained as detailed previously (Mazurier & Spik, 1980). The α -L-fucosyl-(bovine serum albumin)(α -L-Fuc-BSA; 17 residues of fucose per molecule of bovine serum albumin) was kindly given by Dr. M. Monsigny (University of Orléans, Orléans, France) and prepared as described by Monsigny *et al.* (1984).

Other reagents

PMSF, aprotinin, pepstatin A, DTT, *o*-phenanthroline, L-leucine *p*-nitroanilide, disodium *p*-nitrophenyl

Abbreviations used: PBS, phosphate-buffered saline (0.02 M-sodium phosphate/0.15 M-NaCl, pH 7.4); α -L-Fuc-BSA, α -L-fucosyl-(bovine serum albumin); PMSF, phenylmethanesulphonyl fluoride; DTT, dithiothreitol.

† To whom correspondence and reprint requests should be addressed.

phosphate and Triton X-100 were purchased from Sigma. Iodogen was obtained from Pierce Chemical Co. (Rotterdam, The Netherlands) and Na¹²⁵I (carrier-free) (625 MBq of ¹²⁵I/ μ g of iodine) was purchased from Amersham International; the nitrocellulose membranes BA85 from Schleicher and Schüll (Dassel, Germany).

Protein iodination

Proteins were ¹²⁵I-labelled at 4 °C for 10 min by using Iodogen as a catalyst in PBS according to the manufacturer's instructions. The amount of added iodine (including non-radioactive iodine) was so calculated as to give an average of one iodine atom per molecule of protein. The specific radioactivity was about 100 000 c.p.m./ μ g of protein. The unbound iodine was removed by gel filtration on a Sephadex G-25 PD-10 column equilibrated with the incubation buffer. Iodinated proteins were used within 2 weeks to avoid radiation damage.

Preparation of brush-border-membrane vesicles

Swiss mice aged 4–5 weeks were used for each experiment. The animals were fed on a standard laboratory diet *ad libitum* and were starved overnight before being killed by cervical dislocation. The proximal third of the small intestine was removed and rinsed immediately with ice-cold 0.15 M-NaCl. Membrane vesicles were prepared as described by Kessler *et al.* (1978). The final vesicle suspension was used immediately or frozen and stored at –70 °C. The purification procedure was monitored by measuring aminopeptidase (EC 3.4.11.2) by the method of Benakiba & Maroux (1980) and (Na⁺+K⁺)-dependent ATPase (EC 3.6.1.3) as described by Murer *et al.* (1976). Protein content was determined by the method of Peterson (1977), with BSA as standard. The vesicles were routinely examined by electron microscopy using a JEOL 120 CX electron microscope.

Solubilization of membrane vesicles

Membrane vesicles corresponding to a protein concentration of 3 mg/ml were incubated for 30 min at 4 °C in a solution of 10 mM-NaOH/Mes (pH 5.5)/150 mM-NaCl, containing 0.1–5% (w/v) Triton X-100 as required, and 1 mM each of the following proteinase inhibitors: PMSF, aprotinin, pepstatin A, DTT and *o*-phenanthroline. After centrifugation at 120 000 *g* for 60 min at 4 °C, the supernatant (referred to hereafter as 'Triton X-100 extract') was used for protein-content determination and for binding assays.

Binding assay of membrane vesicles

The binding assays were conducted in a standard incubation solution containing, in a 140 μ l final volume, 10 mM-NaOH/Mes, pH 5.5, 50 mM-NaCl, 50 mM-D-mannitol, 1 mM-D-glucose and, when necessary, other compounds (see the Figures). ¹²⁵I-labelled lactotransferrin was normally at about 0.1 μ M, except for the saturation assay, in which the concentration was varied from 0.01 to 2 μ M. Reactions were initiated with addition of membrane vesicles (30 μ g of membrane proteins). Incubations were performed at 4 °C for 10 min in all cases, except for kinetic assays, and terminated by centrifugation at 100 000 *g* in a Beckman airfuge. The pellets were washed twice by repeated suspension-sedimentation and then transferred to haemolysis tubes

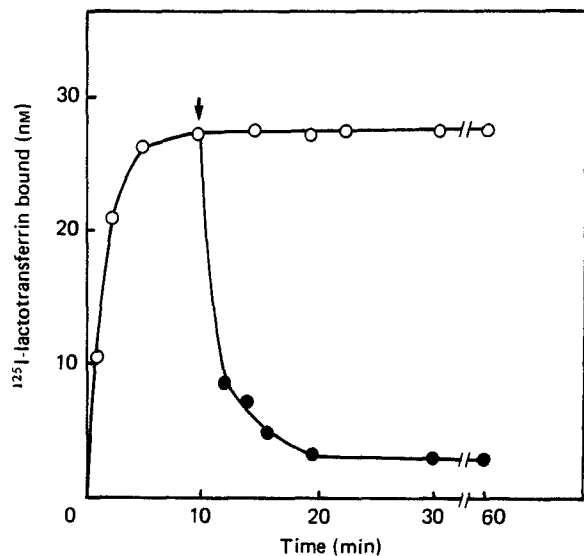


Fig. 1. Time course of binding (○) and depletion by unlabelled mouse lactotransferrin (●) of ¹²⁵I-labelled mouse lactotransferrin to mouse intestinal brush-border-membrane vesicles

¹²⁵I-labelled mouse lactotransferrin (0.01 μ M) was incubated with membrane vesicles as described in the Materials and methods section. At time shown by the arrow, unlabelled mouse lactotransferrin was added in a minimum volume to give a final concentration of 0.5 μ M. Assays were carried out by stopping the incubation after various intervals of time. Each value represents the average for duplicate determinations from two independent experiments.

for radioactivity counting in a LKB 1282 CompuGamma counter. Non-specific binding was estimated by performing parallel incubations to which a 100-fold excess of unlabelled analogue was added.

Binding assay of Triton X-100 extracts

Portions (5 μ l) of Triton X-100 extracts were spotted on to nitrocellulose strips and then incubated under gentle agitation with ¹²⁵I-labelled mouse lactotransferrin in 5 ml of an incubation buffer containing 0.1% Triton X-100, 10 mM-NaOH/Mes, pH 5.5, 150 mM-NaCl, for 1 h at 4 °C. After twice washing with the incubation buffer, the nitrocellulose strips were dried, cut into squares, and the retained radioactivity determined.

Competition binding assay

The competition between different transferrins, bovine serum albumin, α -L-Fuc-BSA, hen's-egg lysozyme and ¹²⁵I-labelled mouse lactotransferrin for receptor binding was assayed by introducing into the incubation medium increasing concentrations of each of the reagents, ranging from 0.1 to 2 μ M or more. Assays were carried out as described above.

Effect of bivalent ions and chelating agents on lactotransferrin binding

The effect of several bivalent ions was assayed on Triton X-100 extracts. The incubation was carried out as described above with or without various concentrations of CaCl₂ (0–50 mM), MgCl₂, MnCl₂ (10 mM), EGTA or EDTA (10 mM).

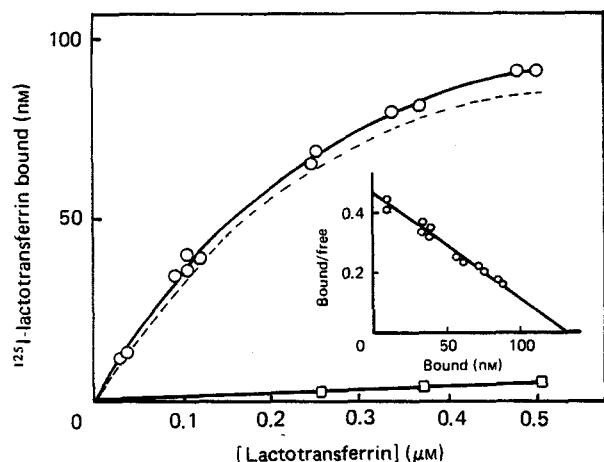


Fig. 2. Binding of ^{125}I -labelled mouse lactotransferrin to mouse intestinal brush-border-membrane vesicles as a function of lactotransferrin concentration

Assays were carried out by incubating 30 μg of membrane vesicle protein with an increasing amount of radiolabelled mouse lactotransferrin as outlined in the Materials and methods section. \circ , Total binding; \square , non-specific binding; —, specific binding. The inset shows a Scatchard (1949)-plot analysis of the specific binding data. Results are typical for three separate experiments.

RESULTS

Characterization of mouse intestinal brush-border-membrane vesicles

The mouse intestinal brush-border-membrane vesicles finally obtained were essentially sealed and free of any other contaminant organelles as checked by electron microscopy. The specific activity of the brush-border marker leucine aminopeptidase in the final membrane was increased about 15-fold over the homogenate of intestinal scrapings, at a yield of about 45%. The activity of basolateral marker ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase was not detectable.

Mouse lactotransferrin binding

As shown in Fig. 1, binding of ^{125}I -labelled iron-saturated mouse lactotransferrin to mouse intestinal brush-border membrane vesicles was rapid, an equilibrium being reached in less than 10 min and a plateau maintained over a period of 60 min. In subsequent experiments, incubations of membrane vesicles were performed for 10 min. The binding was found to be reversible, since the addition of 50 M excess of unlabelled mouse lactotransferrin to the equilibrium system displaced the bound ^{125}I -labelled mouse lactotransferrin. As shown by the results in Fig. 2, the binding of mouse lactotransferrin to brush-border-membrane vesicles was saturable at concentrations ranging from 0.01 to 0.5 μM , whereas the non-specific binding was low, representing less than 5% of the total binding. Scatchard (1949)-plot analysis of the specific binding data revealed an apparent unique category of binding sites with K_a (affinity constant) = $3.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ and n (number of binding sites) = $0.53 \times 10^{12} / \mu\text{g}$ of membrane protein. In the same experiment, iron-free mouse lactotransferrin showed a similar affinity ($K_a = 3.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, with an identical number of binding sites).

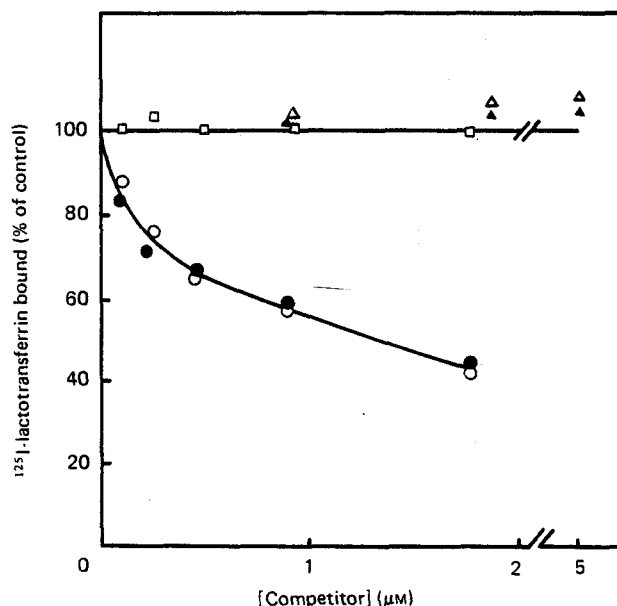


Fig. 3. Competitive binding to membrane vesicles of ^{125}I -labelled mouse lactotransferrin with human (\circ) and bovine (\bullet) lactotransferrins, hen's-egg lysozyme (\square), BSA (\triangle) and α -L-Fuc-BSA (\blacktriangle)

Assays were carried out by incubating 0.1 μM - ^{125}I -labelled mouse lactotransferrin with membrane vesicles in the presence of increasing concentrations of competitors as described in the Materials and methods section. Each point represents the average of duplicate measurements from two separate experiments.

Binding specificity

In order to illustrate the specificity of lactotransferrin binding, competitive assays were carried out with human and bovine lactotransferrins as inhibitors. The results obtained are shown in Fig. 3. Human and bovine lactotransferrins inhibited the binding of ^{125}I -labelled mouse lactotransferrin and exhibited the same inhibition profile. These results show that the three kinds of lactotransferrin bound to the same receptor sites. Further experiments with ^{125}I -labelled human and bovine lactotransferrins revealed that the two proteins possess a similar affinity for brush-border-membrane receptor ($K_a = 2.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$; c.f. mouse lactotransferrin: $K_a = 3.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). The number of binding sites remained identical. In the same experiment, hen's-egg lysozyme was also chosen as inhibitor, based on the fact that the hen's-egg lysozyme is a cationic protein just like lactotransferrins and would inhibit receptor binding if the lactotransferrin binding was electrostatic in nature. In fact, hen's-egg lysozyme did not compete with mouse lactotransferrin for receptor binding (Fig. 3), indicating that the lactotransferrin binding to mouse intestinal brush-border membrane vesicles cannot be explained by a non-specific ionic binding. When up to 50 M excess of α -L-Fuc-BSA was used as competitor, the binding of lactotransferrin to the membrane was not inhibited (Fig. 3), suggesting that lactotransferrin does not bind to membrane via a fucose receptor.

Absence of serotransferrin receptor

Binding of ^{125}I -labelled mouse milk 'serotransferrin-like' protein as well as of mouse serotransferrin to the

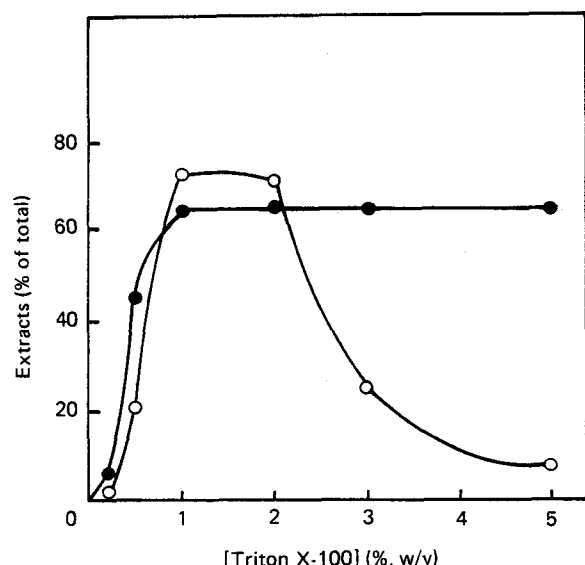


Fig. 4. Extraction with Triton X-100 of brush-border-membrane proteins (●) and mouse lactotransferrin-binding activity (○)

Assays were performed by incubating membrane vesicles (3 mg/ml) with increasing concentrations of Triton X-100 as described in the Materials and methods section. Protein and lactotransferrin-binding activity were assayed on the supernatant after 60 min centrifugation at 120 000 *g*. Results are the average of duplicate determinations from two separate experiments.

mouse intestinal brush-border-membrane vesicles was assayed at various pH values (5–8). No specific binding could be found at ligand concentrations ranging from 1 nM to 2 μ M. These results indicate that the mouse intestinal brush-border-membrane vesicles lack a specific receptor for the 'serotransferrin-like' protein isolated from mouse milk and for the mouse serotransferrin.

Extraction of membrane proteins

Successful receptor solubilization underlies receptor purification. In our experiments, about 65% of the membrane proteins were recovered in the supernatant after 60 min centrifugation at 120 000 *g* with 1% Triton X-100, at a protein concentration of about 3 mg/ml (Fig. 4). By using this concentration of detergent, about 70% of the lactotransferrin binding activity was extracted. Higher concentrations of Triton X-100 did not improve the extraction of proteins; moreover, at concentrations higher than 2%, the binding activity of the receptor was inhibited.

Effect of Triton X-100 concentration on the binding assay

The binding of 125 I-labelled mouse lactotransferrin to the extracts of membrane vesicles was assayed in the presence of various concentrations of Triton X-100. As an optimal binding was found with a detergent concentration of 0.1% (w/v) (Fig. 5), this concentration was used throughout this experiment.

Effect of pH on lactotransferrin binding

The pH-dependency of lactotransferrin binding was investigated for the brush-border membrane vesicles and

the Triton X-100 extracts. In both preparations the optimal binding was observed at about pH 5.5–6.0 (Fig. 6). In the case of membrane vesicles, the apo- and iron-saturated mouse lactotransferrins exhibited a rather similar profile, whereas with Triton X-100 extracts, interestingly, a shifted profile was observed. As a consequence, the binding of iron-saturated lactotransferrin was more diminished at pH values higher than 6.

Effect of bivalent cations on lactotransferrin binding

Since the membrane vesicles contained large amounts of bound Ca^{2+} , which are extremely difficult to remove with a chelator (Kessler *et al.*, 1978), only Triton X-100 extracts were used in our experiment for the study of the effect of bivalent cations. As depicted in Fig. 7(a), Ca^{2+} enhanced the mouse lactotransferrin binding with a linear correlation at concentrations lower than 8 mM; at higher concentrations a plateau was reached. Mg^{2+} and Mn^{2+} could also increase lactotransferrin binding, but at a concentration of 10 mM, their effect was only 40 and 30% respectively of the effect of Ca^{2+} . Without addition of bivalent cations, the binding amounted to about half of the maximal binding. Binding assays with or without addition of 10 mM- Ca^{2+} revealed, by the Scatchard (1949)-plot analysis, that Ca^{2+} increased the number of binding sites by 58% (1.12×10^{10} cf. $0.71 \times 10^{10}/\mu\text{g}$ of membrane protein), while only slightly altering the apparent affinity constants ($1.45 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ cf. $1.19 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$). These values are about 30-fold higher than that in the case of membrane-bound receptor. Furthermore the binding was not totally abolished by the addition of 10 mM-EGTA or -EDTA, although EDTA

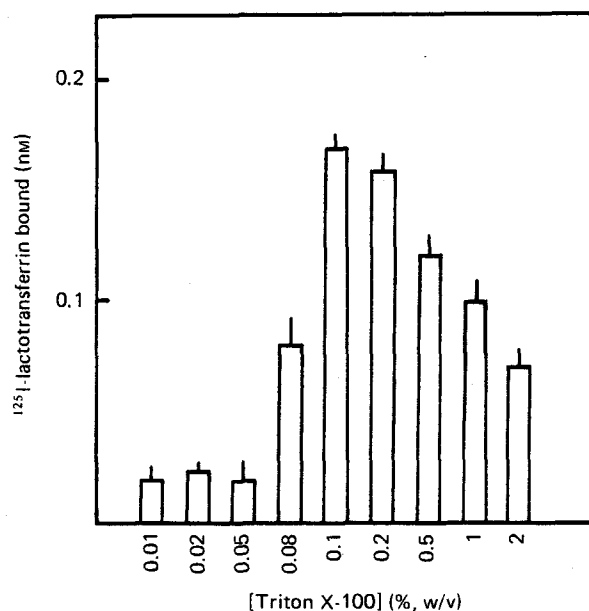


Fig. 5. Effect of Triton X-100 concentration on lactotransferrin-binding activity

Assays were carried out as described in the Materials and methods section with various concentrations of Triton X-100 in the incubation buffer. Results are the averages and ranges for duplicate determinations from two separate experiments.

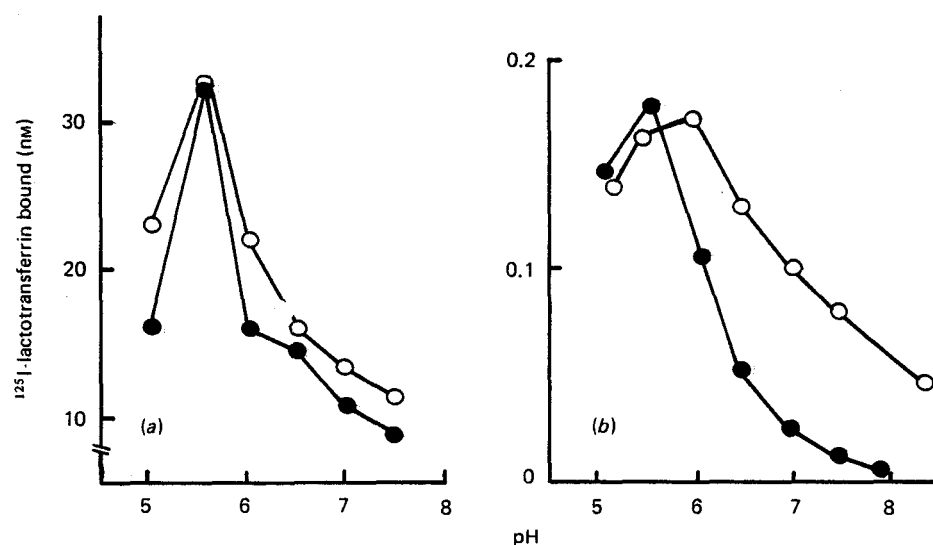


Fig. 6. ^{125}I -labelled apo-(○) and iron-saturated (●) mouse lactotransferrin binding to (a) membrane-bound and (b) Triton X-100-solubilized receptor as a function of pH

Assays were carried out as indicated in the Materials and methods section at various pH values. Each point represents the average of duplicate determinations from two separate experiments.

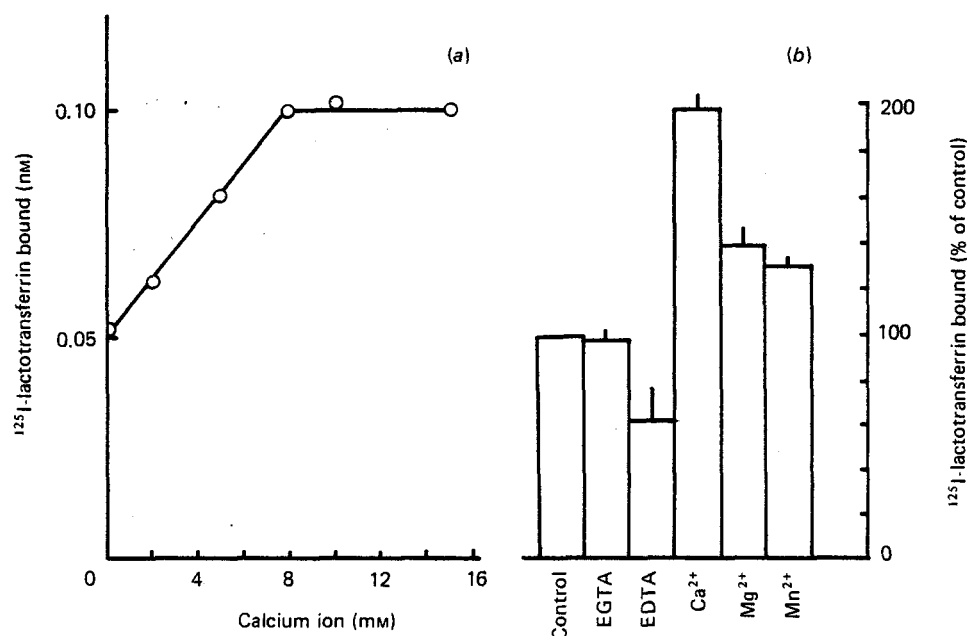


Fig. 7. Binding of ^{125}I -labelled mouse lactotransferrin to Triton X-100-solubilized receptor as a function of increasing concentrations of Ca^{2+} (a) and at a fixed concentration (10 mM) of Ca^{2+} , Mg^{2+} and Mn^{2+} ions, EGTA and EDTA

Assays were carried out as described in the Materials and methods section. Results are the averages and ranges for duplicate determinations from three separate experiments.

decreased the binding to a greater extent (Fig. 7B). One possible explanation is that two types of binding sites were concomitantly present, with one bivalent-cation-dependent and the other bivalent-cation-independent. An alternative explanation is that there is only one class of binding site, which is bivalent-cation dependent, although their affinity for the bivalent cation is different, being higher for Ca^{2+} than for Mg^{2+} or Mn^{2+} . The bivalent cations required for binding are, however, not

completely chelated in a complex detergent-containing system and, consequently, the binding is only partly diminished. Since lactotransferrin polymerizes in the presence of Ca^{2+} ions (Bennett *et al.*, 1981) and the effect of polymerization on receptor binding was unknown, we performed gel-filtration experiments (results not shown), which indicated that no polymerisation of mouse lactotransferrin occurred under our experimental conditions.

DISCUSSION

We have demonstrated that the lactotransferrins bind to mouse small-intestinal brush-border-membrane vesicles with an apparent affinity constant compatible with the values published for the brush-border-membrane receptor of other species (Mazurier *et al.*, 1985; Davidson & Lönnnerdal, 1985b). The finding that the homologous lactotransferrin possesses higher affinity constant for receptor may be relevant to the data obtained by Cox *et al.* (1979) indicating that the homologous lactotransferrin shows a relatively higher effectiveness in delivering the bound iron to human intestinal biopsies. The failure of cationic proteins, such as hen's-egg lysozyme, to inhibit lactotransferrin binding suggests that the interaction between the lactotransferrin and the mouse intestinal brush-border membrane is unlikely to be electrostatic in nature, contrary to the suggestion of Debanne *et al.* (1985) in the case of the human lactotransferrin-rat liver membrane interaction. Human and bovine lactotransferrins exhibited the same binding features and the same competition profile against mouse lactotransferrin for receptor binding. This behaviour seems to indicate that the receptor has no strict species specificity. In our previous experiments (Goavec *et al.*, 1985) the binding of human lactotransferrin to human alveolar macrophages was inhibited by α -L-Fuc-BSA and by α -D-mannosyl (Man)-BSA, suggesting that the interaction of the lactotransferrin may be mediated by Man/Fuc receptor possessing similar properties to the Man/Fuc rat alveolar macrophage receptor (Shepherd *et al.*, 1981). If such a fucose receptor were present in mouse enterocytes, human lactotransferrin containing Fuc(α 1-6)- and Fuc(α 1-3)-linked (Spik *et al.*, 1982b), mouse 'serotransferrin-like' protein and mouse lactotransferrin containing Fuc(α 1-6)-linked (Leclercq *et al.*, 1987) and bovine lactotransferrin containing oligomannosidic glycans (van Halbeek *et al.*, 1981) and fucosylated *N*-acetyl-lactosaminic glycans (Spik *et al.*, 1985) would interact with this receptor. In fact, the 'serotransferrin-like' protein did not bind to membrane vesicles, and the α -L-Fuc-BSA was not able to inhibit the binding of mouse lactotransferrin, indicating that, in mouse enterocytes, the lactotransferrin binding site was not the Man/Fuc receptor. These results suggest that the polypeptide chain rather than the glycan moiety in the molecule of lactotransferrins is implicated in the ligand-receptor interaction. The lactotransferrin binding was found to be dependent on pH, with an optimum at pH 5.5. For the moment, we question the physiological relevance of these data, since the pH at the cell surface remains unknown, although in rats the cell-surface microclimate pH of the proximal jejunum was measured by pH-microelectrode and found to be 5.5 (Lucas *et al.*, 1975).

Triton X-100 at 1% was used to solubilize brush-border membranes with good yield in protein and lactotransferrin-binding activity. Lower concentrations in detergent resulted in poor recovery of lactotransferrin-binding activity in the supernatant. This may suggest that the receptor is an integral, rather than an extrinsic, membrane protein. The Triton X-100-solubilized receptor retained lactotransferrin-binding activity and, more importantly, its sensitivity to pH. Obviously properties of the solubilized receptor cannot totally reflect those of its membrane-bound counterpart, since the binding affinity constant was increased by about 30-fold.

In agreement with early study in rabbit (Mazurier *et al.*, 1985), we were not able to demonstrate any specific binding activity in mouse intestinal brush-border membrane for 'serotransferrin-like' protein isolated from mouse milk and for human and mouse serotransferrins. Recent ultrastructural studies using electron microscopy and an immunoperoxidase assay also failed to identify serotransferrin receptor on the surface of enterocyte microvilli (Marx *et al.*, 1985; Parmley *et al.*, 1985; Banerjee *et al.*, 1986). It has been reported that the serotransferrin failed to give its iron to human intestinal tissue *in vitro* (Cox *et al.*, 1979) and that the iron absorption *in vitro* in rat jejunal and ileal segments was independent of its mucosal transferrin content (Schümann *et al.*, 1986). If a specific receptor for serotransferrin in the intestinal brush-border membrane is absent, it would be necessary to invoke a mechanism for iron uptake from the lumen involving another membrane component, which could participate in the internalization of iron into the mucosa cells. The lactotransferrin receptor could be one of several possible candidates. The results that we have obtained, in association with those previously obtained by Cox *et al.* (1979) and Mazurier *et al.* (1985) favour a role for lactotransferrins in intestinal iron absorption (Montreuil *et al.*, 1985). However, the exact role of lactotransferrin receptor in the mechanism of iron absorption awaits further study, and the unusually high concentration of 'serotransferrin-like' protein in mouse milk remains to be explained.

This work was supported in part by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, the Ministère de l'Éducation Nationale and by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Associée au CNRS n° 217, Director: Professor J. Montreuil). W.L.H. is a recipient of doctoral fellowship from the People's Republic of China. We thank Dr. E. Porchet for electron-microscopic analysis and Dr. S. Maroux, University of Marseilles, for helpful advice concerning the preparation of brush-border membrane vesicles. We are also grateful to Professor M. Monsigny, University of Orléans, for providing us with α -D-Fuc-BSA, and to Mrs. G. Hruby, Mrs. W. Riedel, and Miss B. Coddeville for their skilful technical assistance.

REFERENCES

- Banerjee, D., Flanagan, P. R., Cluett, J. & Valberg, L. S. (1986) *Gastroenterology* **91**, 861-869
- Benakiba, A. & Maroux, S. (1980) *Eur. J. Biochem.* **107**, 381-388
- Bennett, R. M., Bagby, G. C. & Davis, J. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**, 88-95
- Campbell, E. J. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**, 6941-6945
- Chéron, A., Mazurier, J. & Fournet, B. (1977) *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. Ser. D* **284**, 585-588
- Cox, T., Mazurier, J., Spik, G., Montreuil, J. & Peters, R. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **558**, 120-128
- Davidson, L. A. & Lönnnerdal, B. (1985a) *Am. J. Clin. Nutr.* **41**, 852-855
- Davidson, L. A. & Lönnnerdal, B. (1985b) in *Proteins of Iron Storage and Transport* (Spik, G., Montreuil, J., Crichton, R. R. & Mazurier, J., eds.), pp. 275-278, Elsevier, Amsterdam
- Debanne, M. T., Regoeczi, E., Sweeney, G. D. & Krestynski, F. (1985) *Am. J. Physiol.* **248**, G463-G469
- Goavec, M., Mazurier, J., Montreuil, J. & Spik, G. (1985) *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. Ser. III*, **16**, 689-694

- Kessler, M., Acuto, O., Storelli, H., Murer, H., Muller, M. & Semenza, G. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **506**, 136–154
- Leclercq, Y., Sawatzki, G., Wieruszeski, J. M., Montreuil, J. & Spik, G. (1987) *Biochem. J.* **247**, 571–578
- Lucas, M. L., Schneider, W., Haberich, F. J. & Blair, J. A. (1975) *Proc. R. Soc. London Ser. B* **192**, 39–48
- Marx, J. J. M. & van den Beld, B. (1985) *Abstr. Int. Conf. Proteins Iron Metab. VIIth, Villeneuve d'Ascq, 1985*, p. 58
- Masson, P. L., Heremans, J. F. & Dive, C. (1966) *Clin. Chim. Acta* **17**, 735–739
- Mazurier, J. & Spik, G. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **629**, 399–408
- Mazurier, J., Montreuil, J. & Spik, G. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **821**, 453–460
- Monsigny, M., Roche, A. C. & Bailly, P. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **121**, 579–584
- Montreuil, J. & Mullet, S. (1960a) *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.* **250**, 1736–1737
- Montreuil, J., Tonnelat, J. & Mullet, S. (1960b) *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 413–421
- Montreuil, J., Mazurier, J., Legrand, D. & Spik, G. (1985) in *Proteins of Iron Storage and Transport* (Spik, G., Montreuil, J., Crichton, R. R. & Mazurier, J., eds.), pp. 25–38, Elsevier, Amsterdam
- Murer, H., Amman, E., Biber, J. & Hopfer, U. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **433**, 509–519
- Parmley, R. T., Barton, J. C. & Conrad, M. E. (1985) *Br. J. Haematol.* **60**, 81–89
- Peterson, G. L. (1977) *Anal. Biochem.* **83**, 346–356
- Sawatzki, G. & Kubanek, B. (1983) in *Structure and Function of Iron Storage and Transport Proteins* (Urushizaki, I., Aisen, P., Listowsky, I. & Drysdale, J. W., eds.), pp. 441–443, Elsevier, Amsterdam
- Sawatzki, G., Anselstetter, V. & Kubanek, B. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **667**, 132–138
- Scatchard, G. (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**, 660–672
- Schümann, K., Osterloh, K. & Forth, W. (1986) *Blut* **53**, 391–400
- Shepherd, V. L., Lee, Y. C., Schlesinger, P. H. & Stahl, P. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 1019–1022
- Spik, G., Brunet, B., Mazurier-Dehaine, C., Fontaine, G. & Montreuil, J. (1982a) *Acta Paediatr. Scand.* **71**, 979–985
- Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Montreuil, J., Dorland, L., van Halbeek, H. & Vliegthart, J. F. G. (1982b) *Eur. J. Biochem.* **121**, 413–419
- Spik, G., Coddeville, B., Legrand, D., Mazurier, J., Léger, D., Goavec, M. & Montreuil, J. (1985) in *Proteins of Iron Storage and Transport* (Spik, G., Montreuil, J., Crichton, R. R. & Mazurier, J., eds.), pp. 47–52, Elsevier, Amsterdam
- Van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegthart, J. F. G., Spik, G., Chéron, A. & Montreuil, J. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **675**, 293–296
- Yoshino, Y., Hisayau, S., Orimo, M. & Hirai, Y. (1983) in *Structure and Functions of Iron Storage and Transport Proteins* (Urushizaki, I., Aisen, P., Listowsky, I. & Drysdale, J. W., eds.), pp. 419–422, Elsevier, Amsterdam

Received 24 March 1987/29 July 1987; accepted 22 September 1987

CONCLUSION ET DISCUSSION

Les résultats obtenus dans le présent mémoire peuvent se résumer de la manière suivante :

1 - Nous avons montré que la lactotransferrine de Souris se fixait à des vésicules membranaires de la bordure en brosse de l'intestin de Souris avec une affinité du même ordre de grandeur trouvées pour la lactotransferrine sur son récepteur entérocytaire de Lapin (MAZURIER et al., 1985) et de Singe (DAVIDSON et LONNERDAL, 1988) et pour l'hème sur son récepteur entérocytaire de Porc (GRÄSBECK et al., 1979). Cette faible affinité apparente pourrait s'expliquer par la présence de la lactotransferrine endogène déjà fixée sur le récepteur, comme l'ont montré des auteurs (WADA et al., 1979; LOH et al., 1981; LEGER et al., 1989) dans le cas de la fixation de la sérotransferrine sur le récepteur placentaire chez le Humain et chez le Rat. En effet, la présence de la sérotransferrine endogène provoque une baisse d'un facteur de 10 de l'affinité apparente. Nous avons montré que cette fixation n'est pas due à des interactions ioniques non spécifiques comme cela a été montré sur des préparation membranaires de foie de Rat (DEBANNE et al., 1985) puisque le lysozyme, protéine cationique comme la lactotransferrine, n'a pas d'effet inhibiteur sur la fixation de la lactotransferrine à la membrane de la bordure en brosse de l'intestin de Souris.

2 - Nous avons montré, par les essais de fixation et de compétition, que le récepteur n'avait pas de spécificité d'espèce. Ce résultat nous permet d'envisager l'utilisation d'une colonne d'affinité de lactotransferrine humaine pour purifier le récepteur entérocytaire de Souris.

3 - Nous avons montré que le récepteur de la lactotransferrine de l'entérocyte de Souris était spécifique de la partie protéique de la lactotransferrine, ce qui est différent du récepteur lectinique de spécificité Fuc/Man du macrophage humain (GOAVEC et al., 1985) et de l'entérocyte du Singe (DAVIDSON et LONNERDAL, 1988). En effet, la sérotransferrine de Souris isolée du lait possède un glycanne fucosylé de structure identique à celle du glycanne de la lactotransferrine de Souris, alors qu'elle ne se fixe pas sur la membrane de l'entérocyte de Souris. En outre, la néoglycoprotéine Fuc-BSA n'inhibe pas la fixation de la lactotransferrine.

4 - Nous avons montré que la fixation de la lactotransferrine à son récepteur était calcium- et pH-dépendante, avec un optimum à 10 mM Ca^{++} et à pH 5,5. Le pH optimal est à rapprocher de la valeur de 5,5 trouvée à la surface apicale de l'entérocyte de Rat mesuré par micro-pH-mètre (LUCAS et al., 1975).

5 - Nous avons mis au point un protocole de solubilisation du récepteur entérocytaire. A une concentration de 1 %, le Triton X-100 solubilise la membrane avec un rendement de 65 % pour les protéines et 70 % pour l'activité du récepteur.

6 - Nous avons montré que le récepteur de la sérotransferrine est absent de la membrane de la bordure en brosse de l'intestin de Souris. Ce résultat est en accord avec les résultats rapportés par COX et al. (1979), MAZURIER et al. (1985), PARMLEY et al., (1985) et BANERJEE et al. (1986) et en désaccord avec les résultats de HUEBERS et al. (1983). La signification physiologique de la "serotransferrin-like" présente dans le lait de Souris reste à définir.

VISUALISATION DU RECEPTEUR ENTEROCYTAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE DE SOURIS

INTRODUCTION

La méthode d'électro-transfert a été utilisée par plusieurs auteurs pour visualiser des composants membranaires responsable de la fixation des ligands. Cependant, la renaturation du récepteur après SDS-PAGE dépend largement de la protéine étudiée et n'est pas toujours possible. Nous avons donc mis au point une méthode de séparation électrophorétique non-dénaturante en présence de détergents octyl- β -D-glucoside (OG) et désoxycholate (DOC), ce qui nous a permis de visualiser la protéine membranaire responsable de la fixation de la lactotransferrine.

MATERIELS ET METHODES

Electrophorèse en présence de détergents non-dénaturants

Les membranes de la bordure en brosse de l'intestin de Souris préparées selon la méthode de KESSLER et al. (1978) (p.133) sont solubilisées à raison de 10 mg / ml dans le tampon : 10 mM Tris-HCl (pH 6,8) contenant 5 % d'octyl- β -glucoside et 0,25 % de désoxycholate de sodium. Environ 100 μ g de protéines sont chargés dans un puits. L'électrophorèse en gradient 5-15 % en présence d'octyl- β -D-glucoside et de désoxycholate (OG-DOC-PAGE) est réalisée selon le protocole décrit pour l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (LAEMMLI, 1970) (p.137), en remplaçant toutefois le SDS par 1 % d'OG et 0,05 % de DOC. La réduction des ponts disulfures des protéines est réalisée par 100 mM de β -mercaptoéthanol ajouté dans le tampon.

Electrotransfert sur feuille de nitrocellulose (Western blot)

Les protéines membranaires, réduites ou non, séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de détergents non dénaturants, sont ensuite transférées par électrophorèse (cellule de transfert Bio-Rad) sur une feuille de nitrocellulose (Schleicher et Schüll) dans le tampon Tris 25 mM / glycine 192 mM de pH 8.4, contenant 20 % (v/v) de méthanol selon la méthode décrite par TOWBIN et al. (1979) et par BURNETTE (1981)(p.137). L'électrotransfert est réalisée à 150 mA, à 4°C pendant 16 h.

Visualisation du récepteur de la lactotransferrine

Après électrotransfert, la membrane de nitrocellulose est incubée pendant 2 h dans un tampon NaCl 150 mM / Mes 10 mM de pH 5,5 contenant 5 % de polyvinylpyrrolidone (PVP-40) (Sigma, masse moléculaire moyenne 40 kDa) afin de saturer tous les sites de fixation non spécifiques. Sans rinçage préalable, la membrane de nitrocellulose est ensuite incubée pendant 1 h en présence de lactotransferrine de Souris marquée par ^{125}I à une concentration de 1 μg / ml dans un tampon NaCl 150 mM / Mes 10 mM (pH 5,5) ou Hepes (pH 7,4) / Triton X-100 0,1 %, contenant 10 mM CaCl_2 ou 10 mM EDTA. Après plusieurs lavages par le même tampon ne contenant pas de lactotransferrine, la membrane de nitrocellulose est séchée, et soumise à une autoradiographie sur film X-omat AR (Kodak).

RESULTATS

Séparation des protéines membranaires par OG-DOC-PAGE

La ligne (B) dans la Fig.20 (p.96) montre le profil des protéines membranaires séparées par OG-DOC-PAGE et transférées sur la membrane de nitrocellulose. Nous pouvons constater que les protéines sont bien distribuées le long du gel et que la résolution apparaît satisfaisante.

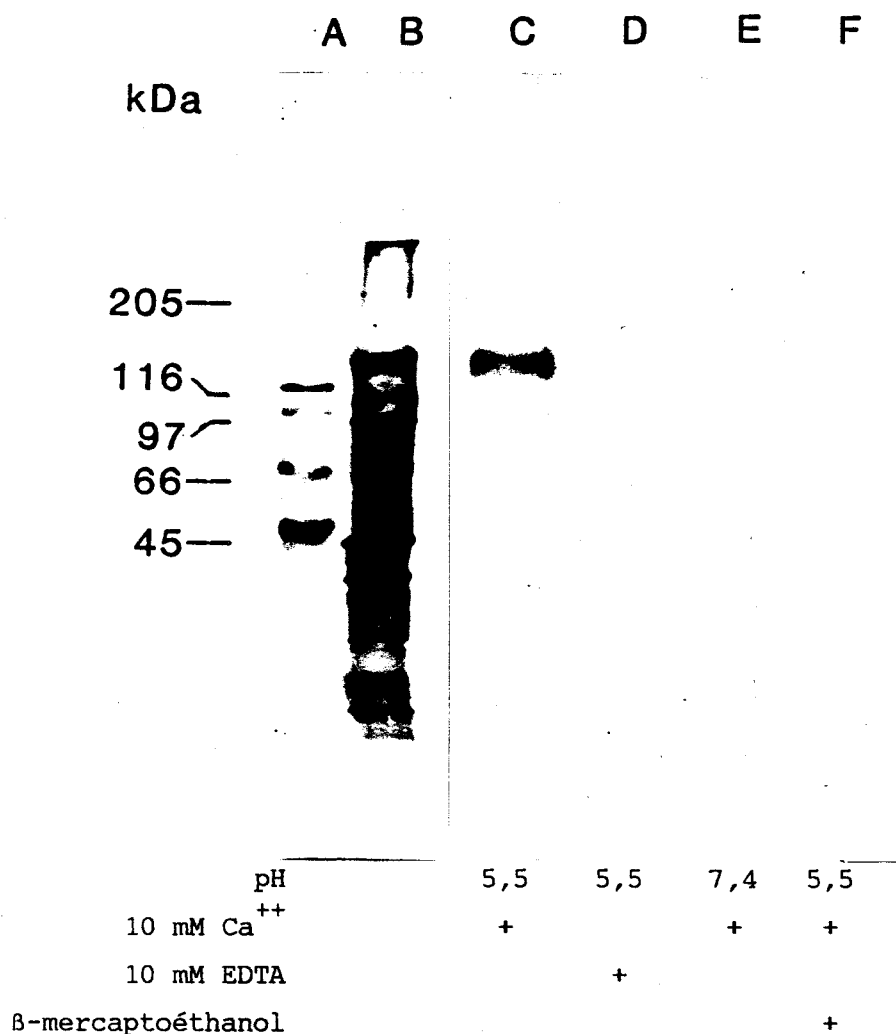


Fig. 20. Visualisation du récepteur de la lactotransferrine par la fixation de la lactotransferrine de Souris marquée à l' [¹²⁵I].

Les protéines membranaires de la bordure en brosse des entérocytes de souris, préalablement réduites (F) ou non (C-E), séparées par OG-DG-PAGE sont transférées par électrophorèse sur nitrocellulose. La feuille de nitrocellulose est ensuite colorée par l'Amido Schwartz (A, B) ou immergée dans des solution contenant 1 µg/ml de lactotransferrine de Souris marquée à [¹²⁵I] (C-F) en présence de 10 mM CaCl₂ (C,E,F) ou 10 mM EDTA (D) à pH 5,5 (C,D,F) ou à pH 7,4 (E). L'activité du récepteur est révélé par autoradiographie. Les protéines de masse moléculaires témoins sont : l'ovalbumine, la sérum albumine bovine, la phosphorylase B, la β-galactosidase et la myosine (Bio-Rad).

Visualisation du récepteur

L'autoradiogramme (Fig.20 p.96) montre qu'une bande correspondant à une masse moléculaire apparente de 130 ka est révélée à pH 5,5 en présence de 10 mM CaCl_2 (ligne C). Cette bande n'est décelable ni en présence de 10 mM EDTA (ligne D), ni à pH 7,4 (ligne E). Ces résultats indiquent donc qu'une seule protéine de la membrane de la bordure en brosse de l'intestin de Souris est capable de fixer la lactotransferrine. Cette fixation nécessite la présence des ions calcium et est sensible au pH. Nous pouvons noter également que lorsque les protéines sont réduites par le β -mercaptoéthanol (ligne F), la bande mise en évidence à la ligne (C) n'est plus visible, ce qui suggère que la fixation est inhibée par coupure de ponts disulfures, prouvant ainsi que l'interaction de la lactotransferrine avec la protéine membranaire est bien spécifique de la forme non réduite de cette protéine.

CONCLUSIONS ET DISCUSSION

La méthode d'électrotransfert est une des approches permettant la visualisation d'un récepteur lorsqu'un anticorps n'est pas disponible. Au Laboratoire, MAZURIER et al. (1985) ont, après séparation des protéines membranaires par SDS-PAGE et électrotransfert sur membrane de nitrocellulose, mis en évidence le récepteur de la lactotransferrine dans la membrane de la bordure en brosse de l'intestin de Lapin. Cependant, la renaturation des protéines après SDS-PAGE n'est pas possible pour toutes les protéines et, de ce fait, la séparation par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de détergents non dénaturants pourrait avoir sans doute une application plus générale.

La méthode d'électrotransfert suivi de la fixation du ligand nous a permis de montrer qu'une seule protéine de masse moléculaire voisine de 130 kDa était capable de fixer la lactotransferrine de Souris après la séparation par électrophorèse et immobilisation sur une membrane de nitrocellulose. L'interaction de la lactotransferrine de Souris avec cette protéine nécessite la présence des ions calcium et est sensible au pH. Ces résultats sont en accord avec nos observations décrites précédemment (p.83). Nous avons constaté que les cations bivalents augmentaient la fixation et que celle-ci était pH dépendante, avec un

maximum à pH 5,5. Nous avons réalisé une incubation dans les mêmes conditions avec les protéines réduites par le β -mercaptoéthanol dans le but de tester la spécificité de la fixation. Nos résultats montrent que les altérations de la conformation du récepteur après réduction abolissent son affinité pour la lactotransferrine.

**ETUDE DE L'INTERACTION LACTOTRANSFERRINE-RECEPTEUR
A L'AIDE D'UN REACTIF BIFONCTIONNEL**

INTRODUCTION



Le pontage covalent par un réactif bifonctionnel est devenu une méthode importante lors des études des interactions d'un ligand avec son récepteur membranaire (JI, 1979). Nous avons choisi le sulfosuccinimidyl 2-(p-azido-salicylamido)-1,3'-dithiopropionate (SASD) dans le but d'identifier le récepteur de la lactotransferrine par autoradiographie. Il s'agit d'un nouveau type de réactif bifonctionnel photosensible, clivable et iodisable (Label Transfer Crosslinking), qui permet d'apporter rapidement des renseignements sur le nombre de chaînes peptidiques du récepteur, d'une part, et sur le nombre de ligands fixés par celui-ci, d'autre part (JAFJE et al., 1980; SORESEN et al., 1986).

Le principe du pontage de la lactotransferrine avec son récepteur par le réactif bifonctionnel SASD est schématisée dans la Fig.21 (p100).

Le SASD est marqué à l' [125 I] sur le noyau phényle en position méta, entre le groupement azido et le groupement hydroxyle. Le SASD marqué par l' [125 I] est conjugué à la lactotransferrine de Souris par l'amidation de cette dernière en donnant le complexe [125 I]-ASD-lactotransferrine. La fixation ligand-récepteur se réalise lorsque le complexe [125 I]-ASD-lactotransferrine est mis en présence des membranes de la bordure en brosse de l'intestin de Souris. Les groupements d'arylnitrène régénérés par photolyse des groupements d'arylazides permettent le pontage covalent non spécifique du complexe [125 I]-ASD-lactotransferrine sur le récepteur. Après coupure des ponts disulfures, le marquage radioactif est transféré de la lactotransferrine au récepteur.

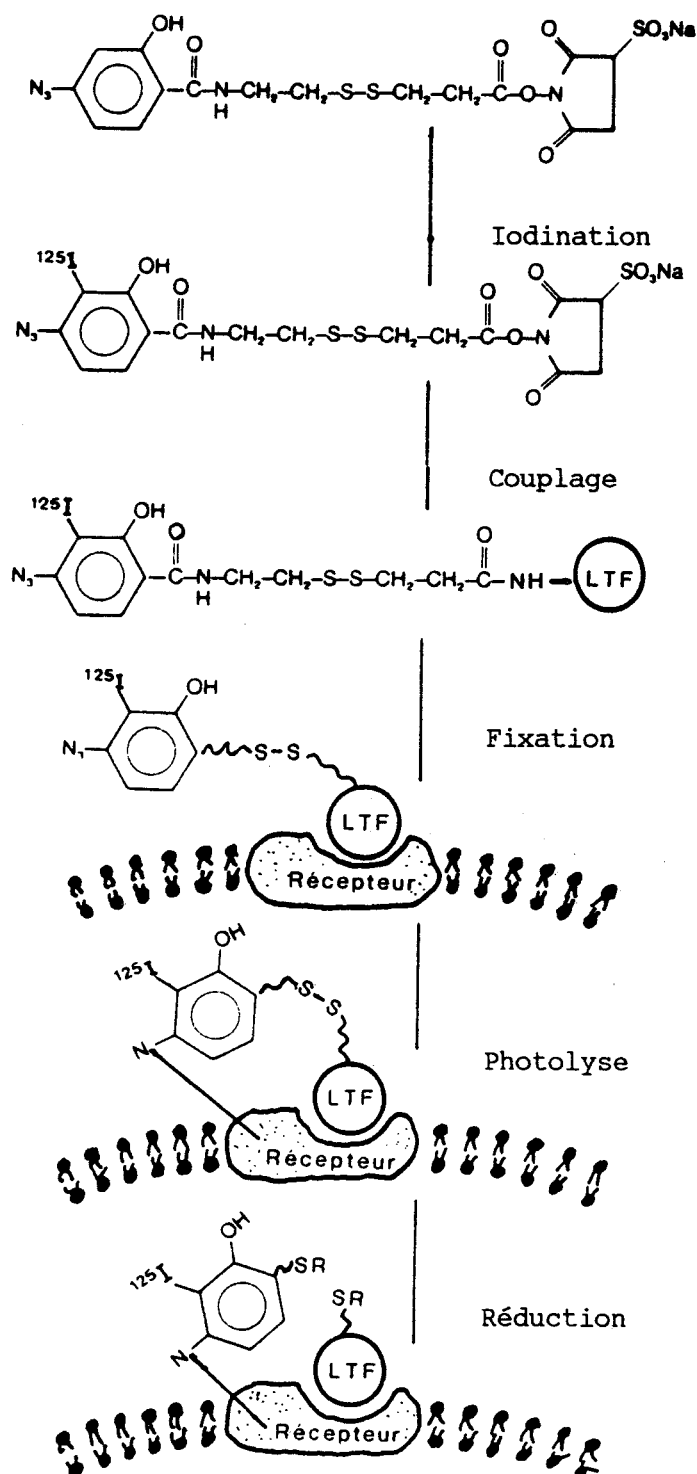


Fig. 21. Schéma du mécanisme du pontage covalent de la lactotransferrine avec son récepteur entérocytaire à l'aide du réactif bifonctionnel SASD (D'après le principe de réaction décrit par SORENSEN et al., 1985)

MATERIELS ET METHODES

Synthèse de [125 I]-ASD-LTFm

L'iodination du sulfosuccinimidyl 2-(p-azido-salicylamido)-1,3'-di-thiopropionate (SASD)(Pierce) par l' [125 I] est effectuée à l'obscurité sous lumière inactinique, selon le protocole préconisé par SHEPHARD et al.(1988). 100 µg de SASD sont dissous dans 50 µl de DMSO, puis additionné de 200 µl de phosphate de sodium 0,1 M de pH 7,4. L'ensemble est transvasé dans un tube à hémolyse en verre dont les parois sont recouvertes de 100 µg d'Iodo-Gen. 100 µCi Na[125 I] (17 mCi / µg, 100 mCi / ml, sans entraîneur, Amersham) y sont ajoutés. Après 15 min d'incubation à 4°C, le SASD ainsi iodé est transvasé dans un tube contenant 100 µg de la lactotransferrine de Souris dissoute dans 100 µl de borate de sodium 0,5 M de pH 9,0. Après une incubation d'une min à température ambiante, l'iode libre et le [125 I]-SASD non couplé sont éliminés par un dessalage sur une colonne de Sephadex (PD-10, Pharmacia) équilibrée dans un tampon NaCl 150 mM / octyl-β-D-glucoside 10 mM / Mes 10 mM de pH 5,5.

Pontage de [125 I]-ASD-LTFm au récepteur membranaire

Les membrane de la bordure en brosse de l'intestin de Souris préparée selon le protocole décrit page 133 sont placées dans une solution d'EDTA 10 mM / NaHCO₃ 50 mM de pH 9,0, pendant 15 min à 4°C. Le culot obtenu après centrifugation à 100.000 g pendant 10 min est lavé une fois par le tampon A : NaCl 150 mM / CaCl₂ 10 mM / Mes 10 mM de pH 5,5. Après addition de 1 µg / ml du complexe [125 I]-ASD-LTF dans le tampon A contenant 10 mg / ml de sérotransferrine humaine afin de limiter la fixation non spécifique, avec ou sans 100 µg / ml de lactotransferrine humaine afin de tester la spécificité, le tube est placé à 4°C pendant 15 min et les membranes sont sédimentées à 100.000 g pendant 2 min dans une centrifugeuse de type "Airfuge" (Beckman). Immédiatement après la remise en suspension dans le tampon d'incubation, la photolyse est réalisée dans une cuve en quartz à l'aide d'un réacteur photochimique (1250 W, émission centrée à 254 nm, RAYONET, Type RS, The SO New England Ultraviolet Co., Middletown Connecticut, USA). Après la photolyse, les membranes sont lavées deux fois avec la solution d'EDTA

10 mM / NaHCO_3 50 mM de pH 9, puis une fois par de l'eau distillée. Les membranes sont destinées à l'électrophorèse en polyacrylamide.

Electrophorèse en polyacrylamide

Analyse par électrophorèse en gradient 5-15 % en présence de SDS est effectué selon la méthode décrite à la page 135. Après l'électrophorèse, le gel est séché, puis soumis à une autoradiographie sur film X-omat AR (Kodak).

RESULTATS

Photolyse du complexe ASD-LTF

Afin d'estimer le nombre de molécules de SASD fixées par molécule de lactotransferrine dans la préparation de [^{125}I]-ASD-LTFm, ASD-LTFm est préparé à partir de 1 mg de la lactotransferrine de Souris dans les mêmes conditions utilisées pour la préparation du complexe [^{125}I]-ASD-LTFm. Aliquotés de ASD-LTFm sont soumis à une mesure de spectre d'absorbance avant et après une photolyse de 10 et 30 secondes respectivement.

Les résultats sont donnés dans la Fig.22 (p.103). Nous pouvons constater que la réaction de photolyse est rapide : au bout de 30 secondes, la photolyse est complètement terminée. Le coefficient d'extinction du SASD conjugué à la protéine n'étant pas connu, nous n'avons pas pu préciser le nombre de molécules de SASD fixées par molécule de lactotransferrine de Souris. Cependant, la valeur de SASD libre avant ($E_{267\text{nm}}=23000$) et après photolyse ($E_{267\text{nm}}=16000$) nous permet d'estimer, selon le spectre avant et après une photolyse complète, ce rapport à 14 mol de SASD / 1 mol de lactotransferrine. Ce spectre est obtenu dans le cas d'une photolyse en absence de membrane. Par contre, dans le cas du pontage du complexe [^{125}I]-ASD-lactotransferrine sur son récepteur membranaire, la durée de la photolyse a été fixée à 2 min.

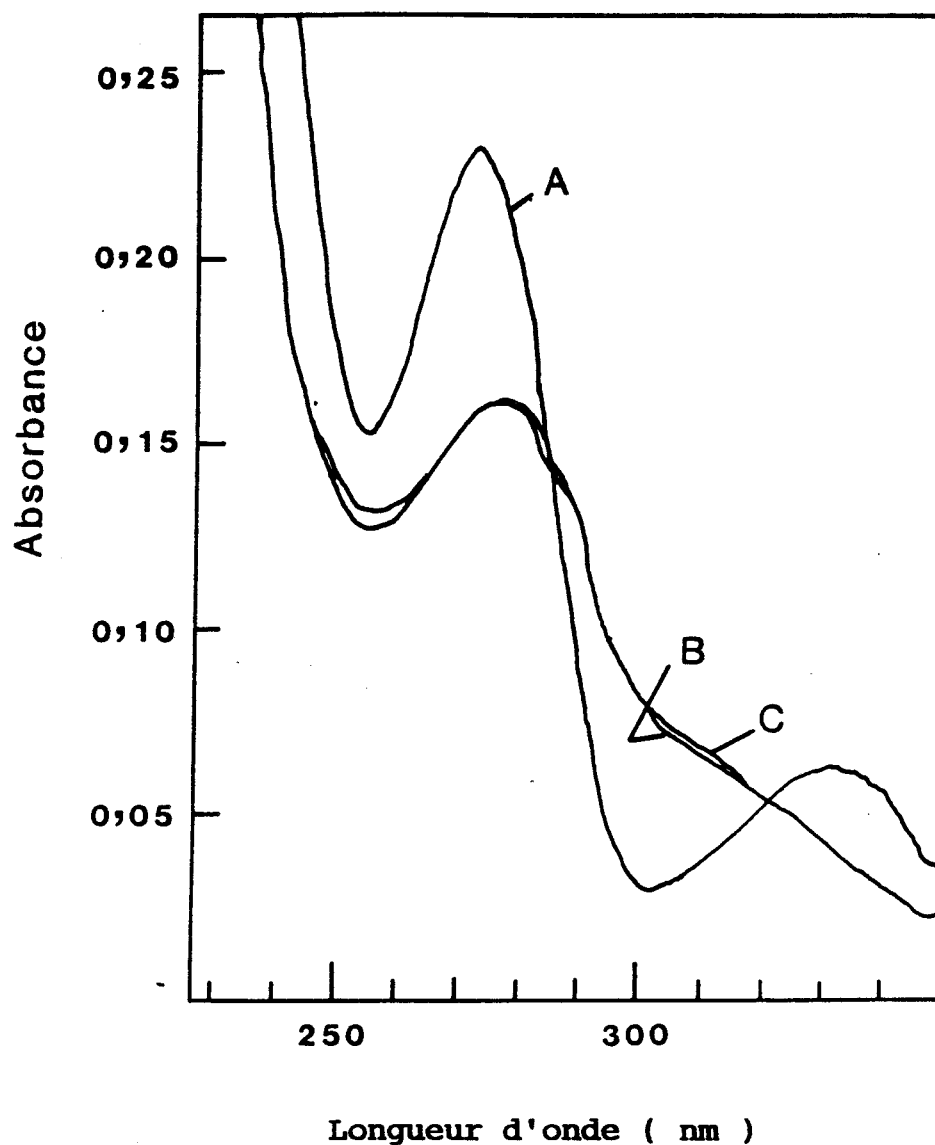


Fig. 22. Modifications des spectres d'absorbance du complexe ASD-LTFm en fonction du temps de photolyse.

Solution du complexe de ASD-LTFm est soumise à une photolyse de 0 sec (A), de 10 sec (B) et de 30 sec (C) respectivement dans un réacteur photochimique (1200 W, émission centrée à 245 nm).

Pontage de la lactotransferrine sur son récepteur

Les premiers essais que nous avons réalisés en utilisant des vésicules microvillositaires nous ont donné des autoradiogrammes ininterprétables en raison d'un très grand nombre de bandes obtenues. Ces premiers résultats semblent démontrer l'existence de pontages non-spécifiques avec des protéines autres que le récepteur. Pour cette raison, nous avons traité préalablement les vésicules par l'EDTA en milieu basique de manière à éliminer les protéines extrinsèques. Dans ces conditions (Fig.23 p.105), l'autoradiogramme obtenu après la séparation des protéines membranaires par SDS-PAGE montre une bande large qui possède une masse moléculaire apparente de 200 kDa (ligne A), en absence de réducteur. Après réduction par le β -mercaptoéthanol, une bande fine d'une masse moléculaire apparente de 130 kDa est révélée dans la ligne B. Par contre, en présence d'un excès de lactotransferrine humaine au cours de la photolyse, aucune bande n'est décelable (ligne C). L'ensemble des résultats indiquent que la lactotransferrine de Souris se lie à une protéine membranaire de masse moléculaire avoisinant 130 kDa, en donnant un complexe de masse moléculaire apparente de 200 kDa. La spécificité de cette réaction est révélée par le fait que le pontage de [125 I]-ASD-LTF avec le récepteur est inhibé considérablement par la lactotransferrine humaine ajoutée en excès. Aucune bande n'est visible au-dessus de 200 kDa dans la ligne A et au-dessous de 130 kDa dans la ligne B, montrant ainsi que le récepteur ne fixe qu'une seule molécule de la lactotransferrine.

CONCLUSION ET DISCUSSION

Le SASD a connu des applications diverses. Il a notamment été utilisé pour coupler le lipopolysaccharide bactérien sur la sérum albumine (WOLLENWEBER et MORRISON, 1986), pour identifier le récepteur de l'interleukine 1 (IL-3), le récepteur du N-formyl peptide (ALLEN et al., 1986) et pour identifier les glycoprotéines membranaires des cellules mononuclées reconnues par la phytohémagglutinine (SHEPHARD et al., 1988).

Les premiers essais que nous avons réalisés en utilisant les vésicules microvillositaires nous ont donné des autoradiogrammes

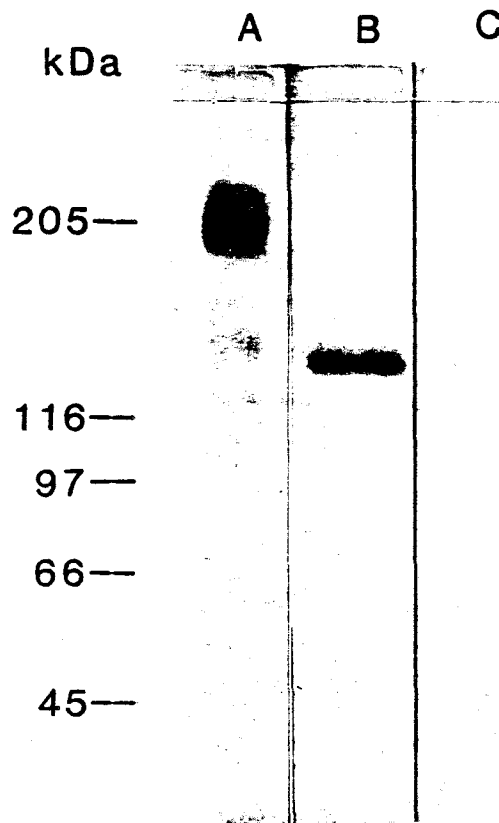


Fig. 23. Pontage covalent du récepteur de la lactotransferrine de Souris à son récepteur entérocytaire de Souris à l'aide de réactif bifonctionnel SASD.

Le complexe [^{125}I]-ASD-LTFm est soumis à un contact avec la membrane de la bordure en brosse de l'intestin de Souris en absence (A et B) ou en présence d'un excès de LTFm non radioactive (C). Le complexe [^{125}I]-ASD-LTFm fixé sur son récepteur entérocytaire de Souris est lié covalentielllement sur le récepteur après une photolyse complète. Le nouveau complexe [^{125}I]-ASD-LTFm-Récepteur est soumis à une SDS-PAGE en gel de gradient 5-10 % dans les conditions non réductives (A) ou réductives (B).

ininterprétables, dû probablement aux pontages non-spécifiques avec des protéines adjacentes au récepteur. En effet, le glycocalyx est particulièrement développé sur la membrane apicale de l'entérocyte (ITO, 1969). Il nous a semblé important de laver préalablement les vésicules par l'EDTA en milieu basique de manière à éliminer les protéines extrinsèques (DEBANNE et al., 1985).

**ISOLEMENT DU RECEPTEUR ENTEROCYTAIRE
DE LA LACTOTRANSFERRINE DE SOURIS**

INTRODUCTION

Comme nous l'avons décrit dans les chapitres précédents, nous avons mis en évidence un récepteur de la lactotransferrine dans la bordure en brosse de l'intestin de Souris. L'étude des interactions de la lactotransferrine avec son récepteur intégré dans la membrane ou solubilisé dans le Triton X-100, a montré (p.85) que ce récepteur reconnaissait la lactotransferrine d'autres espèces animales. ce résultat nous a permis d'envisager la purification du récepteur entérocytaire de Souris par chromatographie d'affinité sur une colonne de lactotransferrine humaine immobilisée.

Le protocole que nous avons utilisé pour isoler le récepteur de la lactotransferrine comporte plusieurs étapes. Les membranes de la bordure en brosse de l'intestin de Souris sont traitées par EDTA dans une solution basique, ce qui permet d'éliminer les protéines extrinsèques. Le récepteur solubilisé par le Triton X-100 est ensuite purifié par deux chromatographies d'affinité successives sur colonne de lactotransferrine immobilisée. La première chromatographie a pour but d'enrichir en récepteur et de diminuer le volume de la préparation. La deuxième chromatographie permet d'isoler le récepteur à l'état pur.

L'obtention du récepteur pur nous a ensuite permis de préparer un antisérum monospécifique. Nous avons enfin utilisé ce dernier pour isoler le récepteur par immuno-absorption.

MATERIELS ET METHODES

Préparation de la membrane de la bordure en brosse

La membrane de la bordure en brosse de l'intestin de Souris a été préparée à partir d'environ 1000 souris (Swiss mice), âgées de 5 à 6 semaines selon la méthode décrite par KESSLER et al. (1978) (p.133).

Préparation de lactotransferrine humaine immobilisée sur gel d'agarose

La lactotransferrine humaine est immobilisée sur le gel d'agarose Reacti-Gel 6X (Pierce) selon la méthode décrite par le fournisseur.

50 ml du gel conservé dans l'acétone sont transvasés sur un filtre en verre fritté, lavés abondamment par de l'eau froide et séchés. Le gel ainsi lavé est mélangé avec 250 mg de la lactotransferrine humaine saturée en fer dissoute dans 50 ml de NaHCO_3 0,2 M de pH 8,5. Après un repos de 48 h à 4°C sous agitation rotative, le gel est ensuite transféré sur un filtre en verre fritté et lavé avec 500 ml de NaHCO_3 pour éliminer l'excès de protéine non couplée. Le gel est ensuite remis en suspension dans 50 ml d'éthanolamine 1 M pour bloquer les groupements actifs encore libres et agité 2 h à 20°C. Le gel est ensuite lavé successivement par 500 ml d'eau, 500 ml d'acétate de sodium 0,1 M / NaCl 1 M de pH 4,5, 500 ml de Na_2HPO_4 0,1 M / NaCl 1 M de pH 8,15 et 500 ml de TBS. Le gel est ensuite conservé à 4°C dans le PBS contenant 0,02 % NaN_3 .

Marquage des protéines membranaires à l' [^{125}I]

Le marquage à l' [^{125}I] d'une fraction des protéines membranaires est réalisé selon la méthode à l'Iodo-Gen décrite dans l'appendice technique (p.136). 10 μl de $\text{Na}[^{125}\text{I}]$ sont utilisés pour une aliquote de 1 mg de protéines membranaires. L'iode libre est éliminé par deux centrifugations successives à 100.000 g pendant 10 min. Les membranes ainsi marquées sont additionnées de la préparation des membranes non marquées.

Inactivation des protéases

Afin d'inactiver les protéases à sérine, 1 mM de diisopropyl fluorophosphate (DFP), est ajouté à la suspension de membrane. Après un traitement de 15 min à 4°C, les membranes sont sédimentées par une centrifugation à 40.000 g pendant 30 min.

Traitement par EDTA

Avant la solubilisation par le Triton X-100, les membranes sont traitées par une solution de 10 mM d'EDTA dans 50 mM de Na_2CO_3 de pH 11 pour une durée de 15 min, à 4°C, selon DEBANNE et al. (1985). La fraction membranaire est récupérée par centrifugation.

Solubilisation des protéines membranaires

La solubilisation des protéines membranaires est effectuée par un sonnage de 2 min à faible énergie suivie d'un repos sous agitation de 30 min, à 4°C, dans le tampon de solubilisation contenant Triton X-100 1 % / NaCl 150 mM / MES 10 mM (pH 5,5) / glycérol 10 %. Des inhibiteurs de protéases sont simultanément ajoutés dans le tampon: 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 5 µg/ml pepstatine, 5 µg/ml leupeptine. L'ensemble est ensuite soumis à une centrifugation à 40.000 g, à 4°C, pendant 30 min et à une filtration sur un filtre de 0,22 µm. Le filtrat additionné de 10 mM CaCl_2 est destiné à réagir avec la lactotransferrine immobilisée.

Chromatographie d'affinité sur LTFh-Reacti-Gel

Environ 2 g de protéines membranaires solubilisées sont ajoutés à 40 ml de LTF-Reacti-Gel et le mélange est placé pendant 3 h, à 4°C, sous agitation. La suspension est ensuite transvasée dans une colonne (4 cm x 15 cm). Après un lavage par 100 ml d'une solution NaCl 150 mM / MES 10 mM / CaCl_2 10 mM / Triton X-100 0,1 % de pH 5,5 contenant les inhibiteurs de protéases, la colonne est éluée par 50 ml d'un tampon NaCl 150 mM / CaCl_2 10 mM / Mes 10 mM / Tris 20 mM / Triton X-100 0,1 % de pH 9,5 contenant les inhibiteurs de protéases. L'éluat dont le pH est ramené à 5,5 à l'aide d'une solution d'HCl est mélangé avec 5 ml de LTF-Reacti-Gel pendant 1 h, à 4°C, sous agitation. L'ensemble est ensuite transvasé

dans une colonne de 10 ml, lavé plusieurs fois successivement par 10 ml de tampon A : 300 mM NaCl / 10 mM Mes-NaOH (pH 5,5) / 10 mM CaCl_2 / Triton X-100 0,1 % et 10 ml de tampon B: 50 mM NaCl / 10 mM Mes-NaOH (pH 5,5) / 10 mM CaCl_2 / 2 M urée / 40 mM octyl- β -D-glucoside jusqu'à l'obtention de fractions dont la radioactivité est inférieure à 50 cpm / ml.

L'élution du récepteur est effectuée avec un tampon C contenant 150 mM NaCl / 5 mM EDTA / 10 mM Tris-HCl (pH 9,5) / 40 mM octyl- β -D-glucoside et des inhibiteurs de protéases.

Préparation de l'antisérum anti-récepteur de la lactotransferrine

100 μg du récepteur purifié par chromatographie d'affinité sur colonne de lactotransferrine humaine sont fixés sur 100 μg d'hémocyanine isolée de l'hémolymphe de Limulus polyphemus (Sigma) dissoute dans un ml de tampon 50 mM phosphate de sodium / 150 mM NaCl de pH 9,0, en présence de 10 mM de glutaraldéhyde et le mélange est placé sous agitation 2 h, à 37°C. Afin de bloquer les fonctions aldéhydique libres, 100 mM de glycine sont ajoutés et l'agitation est poursuivie pendant 2 h.

La solution est ensuite diluée à 2 ml, mélangée avec 2 ml d'adjuvant incomplet de Freund (Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA) et 2 ml sont injectés par voie sous-cutanée en 40 injections sur le dos de lapins (VAITUKAITIS et al., 1971). Les 2 ml restants sont répartis en 2 aliquotes de 1 ml et congelées à -20°C. Deux injections de rappel sont réalisées aux jours 30 et 40, par voie intra-musculaire. L'antisérum est prélevé après le jour 47.

Préparation de la colonne d'immuno-absorbant

La fraction d'IgG est purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de protéine A (Pierce).

2 ml de sérum de Lapin sont injectés sur 2 ml de gel de protéine A équilibré dans du PBS. Après un rinçage par 10 ml de PBS, la fraction IgG est éluée par 50 mM d'acide citrique. La fraction protéique est recueillie, neutralisée par une solution 500 mM phosphate de sodium (pH 9,5).

La préparation de la colonne d'anticorps anti-récepteur a été effectuée dans les mêmes conditions que celles décrites pour la préparation de la colonne LTF-Reacti-Gel (p.108).

Isolement du récepteur par immuno-absorption

Les protéines membranaires, solubilisées avec du Triton X-100 comme décrit p.107, sont ajoutés à 2 ml de l'anticorps-Reacti-Gel et placés sous agitation pendant 1 h, à 4°C, en présence du mélange d'inhibiteurs de protéases. L'ensemble est ensuite lavé par 100 ml de PBS contenant 1 M de NaCl et 1 % de Triton X-100, puis par 20 ml de PBS contenant 40 mM d'octyl- β -D-glucoside. Le récepteur est élué par 5 ml du tampon glycine-HCl 50 mM de pH 2,8, contenant 40 mM d'octyl- β -D-glucoside. Les fractions sont rassemblées et sont concentrées à l'aide d'un micro-concentrateur Centricon 10 (Amicon).

Dosage des protéines membranaires

Le dosage des protéines membranaires est effectué selon la méthode préconisée par PETERSON (1977)(appendice technique, p.135). La sérum albumine bovine est utilisée comme standard.

Mesures de l'activité du récepteur solubilisé

L'activité du récepteur de la lactotransferrine, purifié ou non, est mesurée selon une méthode "Dot-Spot" détaillée dans l'appendice technique (p.133).

RESULTATS

Purification du récepteur par chromatographie sur LTFh-Reacti-Gel

Le protocole de la purification du récepteur de la lactotransferrine que nous avons utilisé nous a permis d'obtenir à partir de 1000 souris, environ 110 μ g de récepteur à l'état pur.

Dans la Fig. 24 (p. 112), nous montrons le profil d'élution du

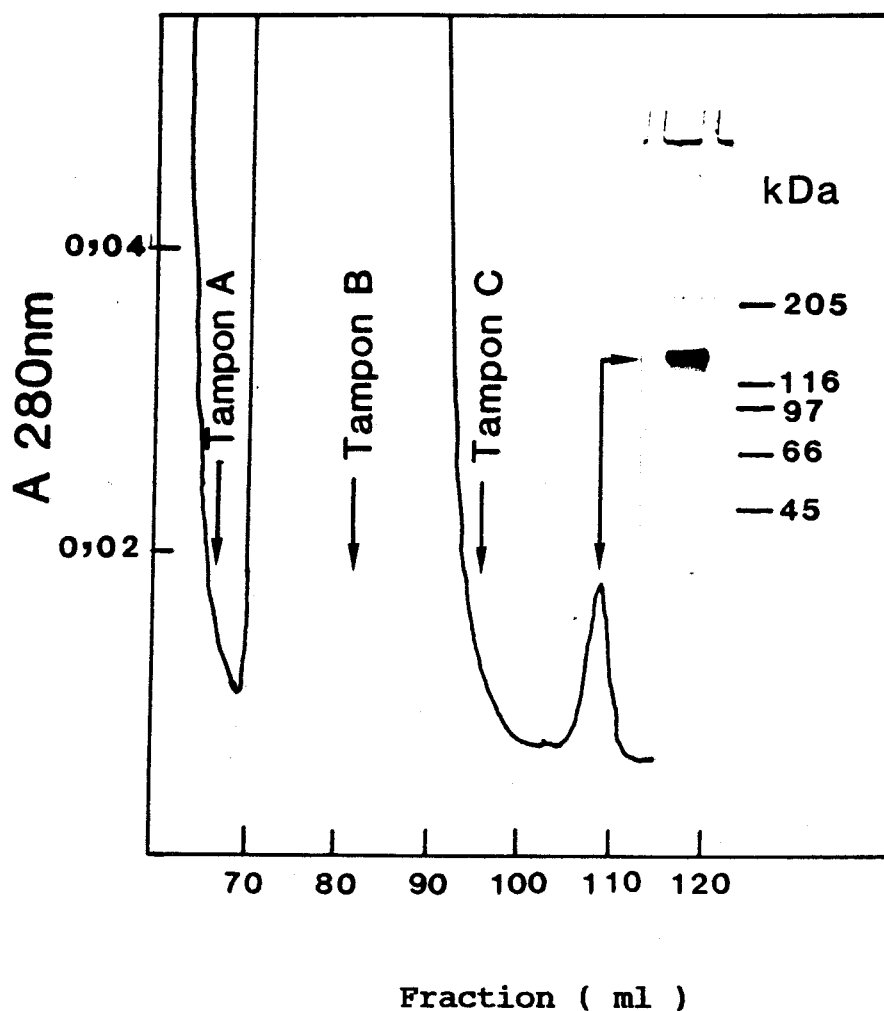


Fig. 24. Chromatographie d'affinité du récepteur de la lactotransferrine sur colonne de lactotransferrine humaine immobilisée.

L'éluat de première chromatographie sur colonne de LTF-Reacti-Gel est appliqué à une deuxième chromatographie d'affinité. La colonne est lavée plusieurs fois par 10 ml chacun de tampon A (300 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100) et de tampon B (50 mM NaCl, 1 % octyl- β -D-glucoside, 2 M urée). L'élution est réalisée par tampon C (10 mM EDTA, pH 9,5). L'encadré est la révélation par le nitrate d'argent du gel de polyacrylamide après électrophorèse de 2 μ g de récepteur.

récepteur, celui-ci étant élué en un seul pic après application du tampon d'élution.

Le récepteur que nous avons isolé est apparemment pur. La coloration par le nitrate d'argent après le SDS-PAGE n'a pas révélé de protéines contaminantes après séparation de 2 µg de la préparation (Fig.24 p.112).

Nous avons suivi la purification par le dosage de protéines et le dosage de la capacité de fixation de la lactotransferrine.

Les résultats de chaque étape sont rassemblés dans le tableau 3 (p.114).

Activité du récepteur purifié par chromatographie sur LTFh-Reacti-Gel

Par la méthode de "Dot-Spot", nous avons pu comparer l'affinité du récepteur purifié pour la lactotransferrine avec celle de son homologue solubilisé dans l'extrait de Triton X-100 (Fig.25 p.115). L'analyse par la méthode de SCATCHARD (1949) montre que le récepteur purifié possède une affinité de l'ordre de $K_a = 1,1 \times 10^7 M^{-1}$, comparable à celle de récepteur solubilisé non purifié, $K_a = 1,0 \times 10^7 M^{-1}$, ce qui suggère que la protéine purifiée est le récepteur présumé dans l'extrait de Triton X-100.

Purification du récepteur par immuno-absorption

Nous avons utilisé la colonne d'immuno-absorbant pour isoler le récepteur. Par ce protocole, nous avons amélioré le rendement de purification qui est passé de 1,2 % à 7 %, mesuré par la méthode "Dot-Spot" en utilisant l'anticorps anti-récepteur marqué à l' $[^{125}I]$. Cependant, avec les conditions permettant l'élution du récepteur (pH 2,8), nous n'avons pas pu obtenir un récepteur actif. Ainsi, cette méthode d'isolement ne nous permet d'isoler le récepteur que pour l'étude de ses propriétés physico-chimiques.

CONCLUSION ET DISCUSSION

L'activité protéolytique importante de nos préparations membranaires nous a posé de nombreux problèmes. Une inactivation des protéases

Tableau 3. Purification du récepteur entérocytaire de la lactotransferrine de Souris

Etapes de purification	Taux de protéines	Activité spécifique (ng LTF/ μ g)	Taux de purification (en %)	Rendement (en %)
Préparation de la bordure en brosse	4 g	1,3	1	100
Traitement par l'EDTA	1,9 g	2,7	2,1	98
1 ^e cycle de chromatographie d'affinité	19 mg	140	108	46
2 ^e cycle de chromatographie d'affinité	110 μ g	600	461	1,2

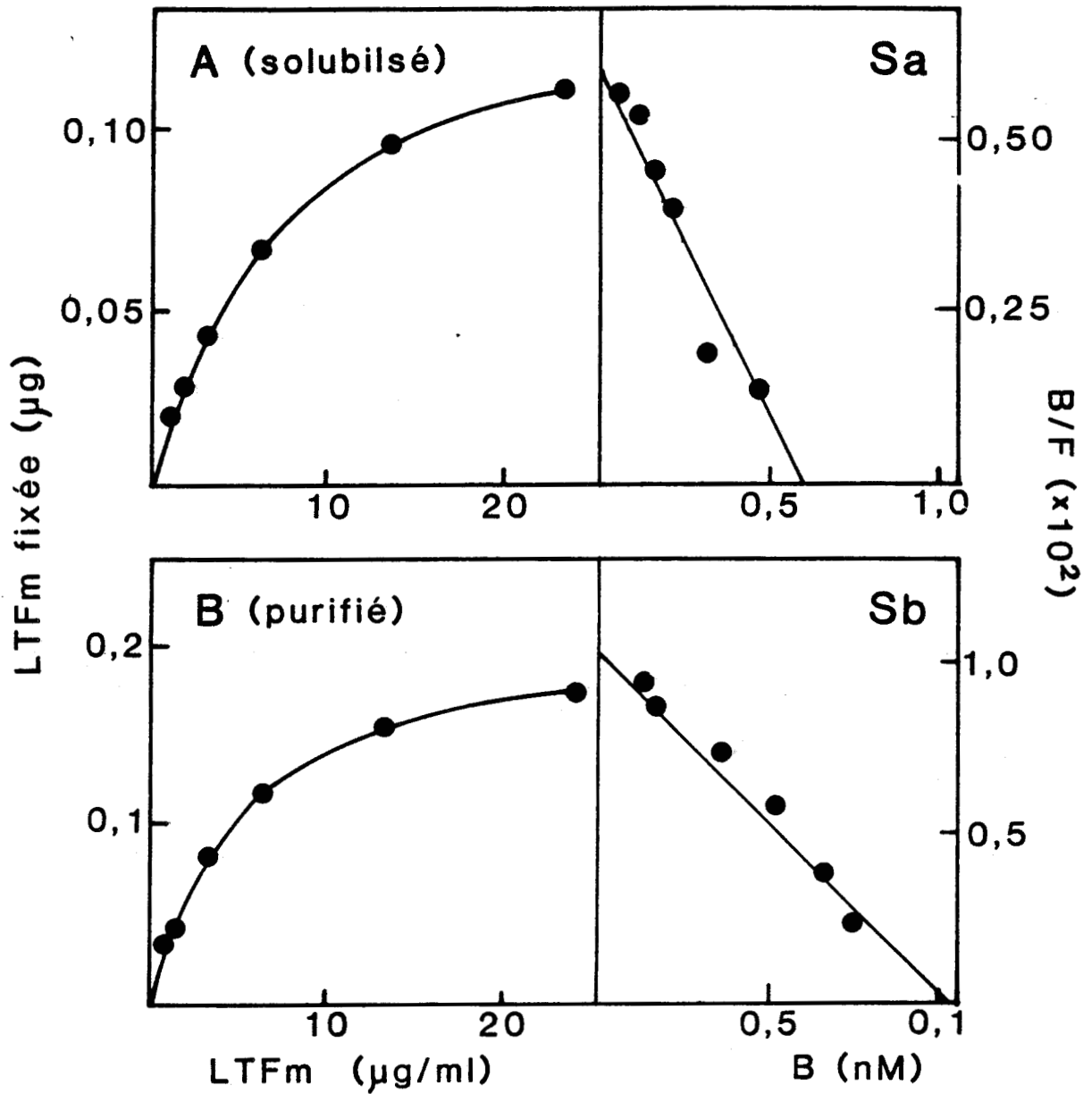


Fig. 25. Dosage du récepteur entérocytaire de Souris de la lactotransferrine.

5 µl de la solution contenant le récepteur solubilisé (A) ou purifié (B) déposés sur feuille de nitrocellulose sont immergés dans une solution contenant de lactotransferrine de Souris marquée à [¹²⁵I]. La radioactivité sur la nitrocellulose après le lavage est déterminée par le compteur Gamma. Les résultats sont analysés par la méthode de Scatchard (Sa et Sb).

à sérine par le DFP et l'addition d'inhibiteurs de protéases de différentes spécificités se sont révélées indispensables.

Nous avons obtenu, avec un rendement de 1,2 %, 110 µg de récepteur purifié à partir d'environ 1000 souris. Cependant, au vu de la faible affinité de la lactotransferrine pour son récepteur, il nous semble difficile d'envisager un meilleur rendement. Par ailleurs, nous n'avons pas cherché à améliorer ce dernier car notre but était d'obtenir une quantité suffisante de récepteur à l'état pur pour préparer un antisérum monospécifique.

Les conditions d'élution du récepteur de la colonne d'immuno-absorbant ne nous ont pas permis d'obtenir de récepteur actif lorsqu'on envisage la capacité de fixer la lactotransferrine. Cependant, nous avons amélioré le rendement de purification par cette approche. C'est cette méthode de purification que nous avons choisie pour isoler le récepteur destiné à l'étude de ses propriétés physico-chimiques.

**ETUDE DES PROPRIETES DU RECEPTEUR ENTEROCYTAIRE
DE LA LACTOTRANSFERRINE**

INTRODUCTION

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit deux protocoles d'isolement du récepteur. Dans ce chapitre, nous étudierons les principales propriétés de ce dernier que nous avons purifié par chromatographie d'immuno-absorption.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide réalisée dans des conditions dissociantes, en présence ou non de réducteur comme le β -mercaptoéthanol, permet de déterminer le nombre de sous-unités et le nombre de chaînes peptidiques du récepteur.

L'iso-électrofocalisation dans le Phastsystem (Pharmacia) est une approche simple et rapide pour une protéine soluble. Après avoir introduit un détergent approprié dans le gel IEF préconditionné, cette méthode peut être appliquée au récepteur.

L'électro-transfert, suivi d'une révélation par des lectines, est une méthode commode pour mettre en évidence la présence de glycannes chez un récepteur.

La N-glycanase (peptide: N-glycosidase F) est un enzyme qui libère les glycannes liés N-glycosidiquement à l'asparagine, générant ainsi un résidu d'acide aspartique au niveau de chaque site de glycosylation (ELDER et ALEXANDER, 1982; PLUMMER et al., 1984; TARENTINO et al., 1985). L'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase (EC 3.2.1.x) isolée d'un Basidiomycète est un enzyme qui libère les glycannes de type N-acétyl-lactosaminique biantenné mono- ou asialylé et de type oligomannosidique amputé du résidu de N-acétylglucosamine terminal (BOUQUELET et al., 1980). L'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase H (EC 3.2.1.96) est un enzyme qui hydrolyse uniquement les glycannes de type oligomannosidique liés N-glycosidiquement (KOBADA, 1979; TRIMBLE et MALEY, 1984). L'hydrolyse du récepteur purifié par ces endo-glycosidases peut donc apporter des renseignements précieux sur les fractions glycaniques qu'il contient.

MATERIELS ET METHODES

Analyse par l'électrophorèse en gel de polyacrylamide

L'analyse par SDS-PAGE est réalisée selon la méthode préconisée par LAEMMLI (1970)(p.137). Un gel en gradient de 5-15 % a été utilisé. La coloration au nitrate d'argent est réalisée selon le protocole décrit par MORRISSEY (1981)(appendice technique, p.138).

Iso-électrofocalisation (IEF)

Afin de déterminer le point iso-électrique du récepteur, nous avons utilisé des gels préconditionnés IEF 4-6,5, spécifiquement destinés au système d'électrophorèse Pharmacia "Phastsystem". Ces gels, dépourvus de détergent, ont dû être modifiés afin de permettre la migration du récepteur. Pour cela, après séchage à 37°C pendant une nuit, le gel est rehydraté avec 400 µl d'une solution aqueuse d'octyl-β-D-glucoside 40 mM. L'électrophorèse est réalisée essentiellement selon le protocole décrit par Pharmacia, le temps étant prolongé à 840 hV pour permettre à la protéine d'atteindre son point iso-électrique.

Après coloration au Bleu de Coomassie, le récepteur est révélé par autoradiographie sur film X-omat AR (Kodak).

Interactions avec des lectines après électrotransfert

Après séparation par SDS-PAGE en gradient de 5-15 %, les protéines membranaires ou le récepteur purifié sont électrotransférés sur membrane de nitrocellulose comme précédemment décrit. Après avoir saturé les sites de fixation non spécifiques par 5 % de polyvinylpyrrolidone, en solution dans le tampon d'incubation Tris 10 mM / NaCl 1 M / CaCl₂ 5 mM de pH 7,4, la membrane de nitrocellulose est incubée pendant une nuit en présence de Con A ou de PHA-L (fournies par Monsieur le Docteur H. DEBRAY que nous tenons à remercier vivement), préalablement marquées à 1' [¹²⁵I], à raison de 3 x 10⁶ cpm dans 20 ml dans le tampon d'incubation contenant 1 % de polyvinylpyrrolidone. La membrane de nitrocellulose est ensuite lavée 5 fois pendant 10 min par une solution à 0,05 % de Tween 20 dans le même tampon. Après le séchage, la membrane de nitrocellulose est soumise à une autoradiographie.

Déglycosylation par les endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidases

Le protocole que nous avons utilisé est celui recommandé par la firme Boehringer. Brièvement, 10 μ l de solution de récepteur marqué (10.000 cpm) sont chauffés à 100°C pendant 3 min en présence de 0,5 % SDS et de 0,1 M β -mercaptoéthanol. L'échantillon est dilué par addition de 10 μ l de tampon acétate de sodium 0,2 M de pH 5,5 contenant 1 mM de PMSF et 1 % de Nonidet P-40. 0,1 unité d'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase H ou d'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase B isolée de *Sporotrichum dimorphosporum* (fournie par Monsieur le Professeur S. BOUQUELET que nous tenons à remercier vivement) est alors ajoutée. Après 16 h d'hydrolyse, à 37°C, l'hydrolysate est soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide (p.135), puis à une autoradiographie.

Déglycosylation par la N-glycanase

Le protocole de déglycosylation est celui qui est préconisé par la firme Genzyme : 10 μ l de solution de récepteur marqué (10.000 cpm) sont chauffés à 100°C pendant 3 min en présence de 0,5 % SDS et de 0,1 M β -mercaptoéthanol. L'échantillon est dilué par addition de 10,8 μ l d'un tampon phosphate de sodium 0,55 M de pH 8,6, de 3 μ l de 100 mM de 1,10-phénanthroline dans le méthanol et de 5 μ l de Nonidet P-40 à 7,5 %. 0,1 unité de N-glycanase est alors ajoutée. Après 16 h d'hydrolyse, à 37°C, l'hydrolysate est soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide (p.135), puis à une autoradiographie.

RESULTATS

Masse moléculaire du récepteur

Le récepteur purifié par immuno-absorption sur une colonne d'anticorps anti-récepteur, analysé par électrophorèse de gel de polyacrylamide en gradient de 5-15 % en présence de SDS, se révèle sous forme d'une bande de masse moléculaire apparente égale à 130 KDa (Fig.26 p.120). Après réduction par 0,1 M de β -mercaptoéthanol, le récepteur apparaît sous forme d'une bande d'une masse moléculaire

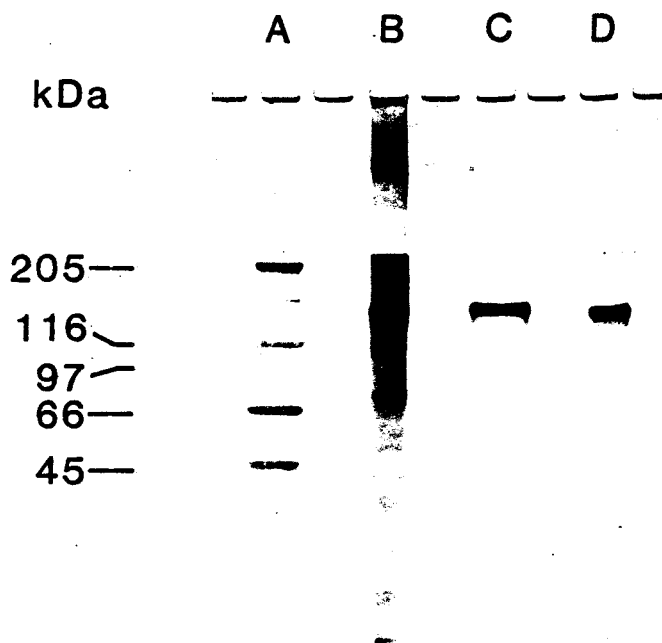


Fig. 26. Etude de la masse moléculaire du récepteur de la lactotransferrine.

Les protéines membranaires de la bordure en brosse de l'intestin de Souris (B) et le récepteur de la lactotransferrine purifié par la chromatographie d'immuno-absorption (C et D) sont soumis à une SDS-PAGE en gel de gradient 5-15%, en milieu réducteur (B et C) et non réducteur (D). Les protéines de masse moléculaire témoins utilisées (A) sont : l'ovalbumine, la sérum albumine bovine, la phosphorylase B, la β -galactosidase et la myosine (Bio-Rad).

avoisinant 130 kDa sans donner de bande supplémentaire, ce qui indique la nature monocaténaire du récepteur.

Point iso-électrique du récepteur

Le procédé d'addition du détergent octyl- β -D-glucoside dans le gel IEF (Pharmacia) nous a permis d'élargir l'utilisation de cette méthode à des protéines membranaires. Comme le montre la Fig.27 (p.122), le récepteur se révèle en une seule bande située à pH 5,8 entre la β -lactoglobuline A (Pi 5,20) et l'anhydrase carbonique B bovine (Pi 5,85).

Nature glycoprotéinique du récepteur

La nature glycoprotéinique du récepteur a été caractérisée par l'interaction de ce dernier avec deux lectines, la Concanavaline A et la phytohémagglutinine L (Fig.28 p.123).

La fixation par la Con A pourrait indiquer la présence de glycannes du type N-acétyllactosaminique bi-antenné ou de type oligomannosidique. La fixation de la PHA-L révèle la présence de glycannes de type N-acétyllactosaminique tri- ou tétra-antennés. L'ensemble des résultats semblent suggérer que le récepteur possède deux, voir plusieurs N-glycannes de structures hétérogènes.

Déglycosylation par les endo-glycosidases

L'effet des endo-glycosidases a été suivi sur le récepteur marqué à l' [125 I]. Comme le montre la Fig.29 (p.124), l'hydrolyse par la N-glycanase provoque une diminution de 25 kDa de la masse moléculaire apparente du récepteur (ligne B). La déglycosylation par l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase isolé de *Sporotricum dimorphosporum* conduit à un résultat similaire (ligne C). Cependant, l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase H n'a aucun effet sur la masse moléculaire apparente du récepteur (ligne D). L'ensemble de résultats indique que le récepteur renferme des glycannes de type N-acétylglucosaminique, et pas de glycannes de type oligomannosidique.

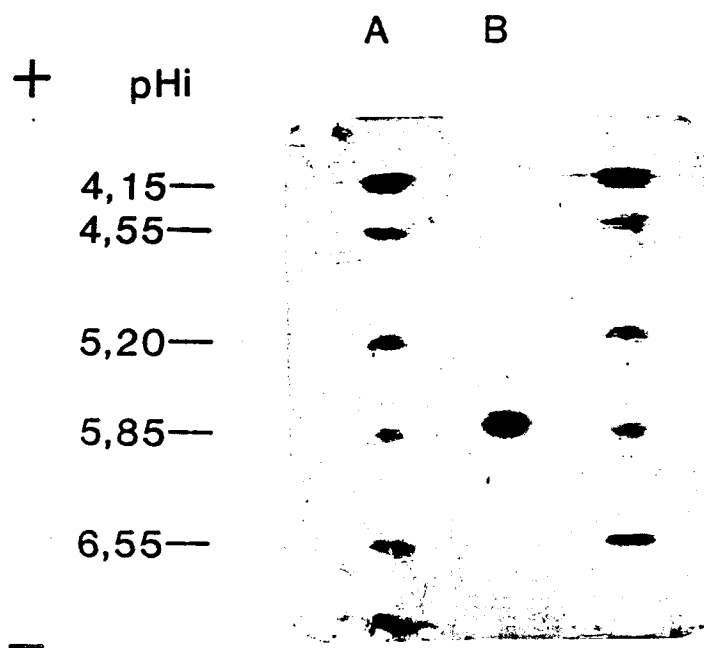


Fig. 27. Iso-électrofocalisation du récepteur de la lactotransferrine.

Le récepteur, purifié par la chromatographie d'immuno-absorption, est marqué à l' [^{125}I], puis soumis à une iso-électrofocalisation dans un gel IEF 4-6,5 (Pharmacia) préalablement additionné de 40 mM octyl- β -D-glucoside. La position du récepteur est révélée par autoradiographie (B). Les témoins de pHi (A) sont le kit de Pharmacia (pHi 2,5-6,5).

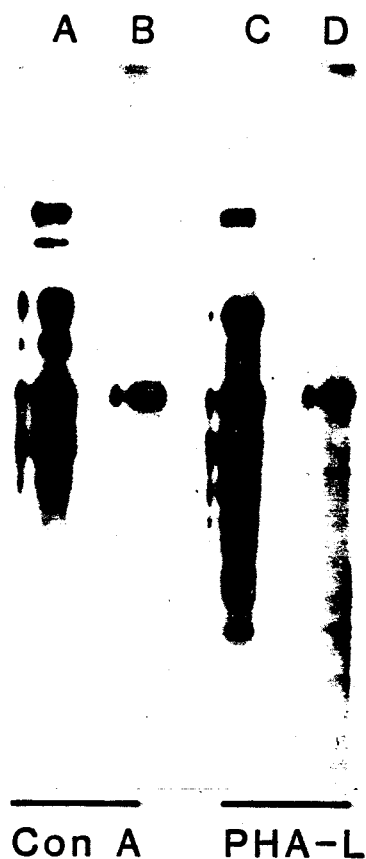


Fig. 28. Mise en évidence de la nature glycoprotéinique du récepteur de la lactotransferrine.

Les protéines membranaires de la bordure en brosse de l'intestin de Souris (A et C) et le récepteur purifié par chromatographie d'immuno-absorption (B et D), séparés par SDS-PAGE et électrotransférés sur feuille de nitrocellulose, sont mis en contact avec la Con A (A et B) et la L_4 -PHA (C et D) marquées à l' $[^{125}\text{I}]$. La positions des protéines reconnues par les lectines sont révélées par autoradiographie.

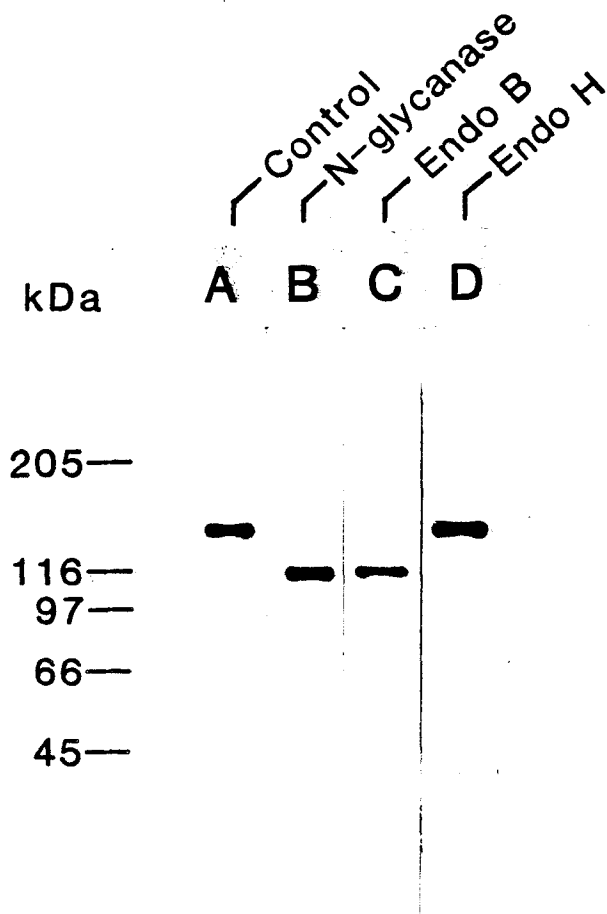


Fig. 29. Traitement du récepteur de la lactotransferrine par des endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidases.

Le récepteur purifié par chromatographie d'immuno-absorption, marqué à l' [125 I], a été traité par la N-glycanase (B), par l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase B (C) ou par l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase H. Le récepteur non traité (A) ou traité par les endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidases (B, C et D) sont analysés par SDS-PAGE en gel de gradient 5-15 % suivis d'autoradiographie.

CONCLUSIONS ET DISCUSSION

L'analyse par SDS-PAGE nous a conduit à démontrer la nature monocaténaire du récepteur et de fixer sa masse moléculaire apparente à 130 kDa. Ces résultats confirment ceux qu'ont fournis la méthode d'électrotransfert, de fixation du ligand et de pontage covalent par un réactif bifonctionnel.

L'adaptation de la technique d'iso-électrofocalisation (IEF) dans le Phastsystem (Pharmacia) aux protéines membranaires nous a permis de préciser que le point isoélectrique (Pi) du récepteur était de 5,8.

La reconnaissance par les lectines a révélé la nature glycoprotéinique de ce récepteur. La Con A et la PHA-L le reconnaissent toutes deux, suggérant ainsi que le récepteur porte un ou plusieurs glycannes de type N-acétyllactosaminique bi-antenné et un ou plusieurs glycannes tri- ou tétra-antenné, sans pouvoir exclure la présence de glycannes oligomannosidiques. La déglycosylation par des endo-glycosidases confirme ces résultats et révèle, en outre, l'absence de glycanne de type oligomannosidique. La déglycosylation par la N-glycanase et par l'endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase isolée de *Sporotricum dimorphosporum* provoque une diminution de masse moléculaire apparente de 20-25 kDa, suggérant l'existence d'environ une dizaine de glycannes.

Malgré de nombreuses homologies structurales, la lactotransferrine et la sérotransferrine se différencient considérablement sur le plan biologique. Il est bien connu que le rôle de la sérotransferrine est d'assurer le transport du fer, alors que celui de la lactotransferrine est de jouer un rôle dans la régulation de myélopoïèse (BIRGENS, 1980), dans la défense antibactérienne (SPIK et MONTREUIL, 1982), dans la croissance de certains types de cellules (HASHIZUME et al., 1983; MAZURIER et al., 1988; NICHOLS et al., 1987) et dans l'absorption intestinale du fer (MONTREUIL et al., 1960a,b; MONTREUIL, 1971; SPIK, 1981,1988). La distribution de récepteurs de ces deux protéines est aussi différente. Le récepteur de la sérotransferrine est présent dans la plupart des cellules eucaryotiques (REGOECZI, 1984), alors que celui de la lactotransferrine se limite à certaines cellules comme les lymphocytes (HASHIZUME et al., 1983; MAZURIER et al., 1988), les macrophages (Van SNICK et MASSON, 1976; BIRGENS et al., 1983) et les entérocytes (MAZURIER et al., 1985; DAVIDSON et LÖNNERDAL, 1988). Ces différences pourraient laisser prévoir l'existence de 2 récepteurs

différents pour les 2 transferrines. En fait, le récepteur entérocytaire de la lactotransferrine caractérisé dans la membrane de la bordure en brosse de l'intestin de Souris diffère notablement du récepteur réticulo-
cytaire de la sérotransferrine au niveau de la masse moléculaire, du nombre de chaînes peptidiques et du nombre de ligands fixés. Le récepteur de la sérotransferrine est une glycoprotéine de masse moléculaire 180 kDa, composé de deux sous-unités de 90 kDa liées par un pont disulfure et pouvant fixer chacune une molécule de sérotransferrine (WADA et al., 1979; SCHNEIDER et al., 1982; HUEBERS et FINCH, 1987).

CONCLUSIONS GENERALES

Les travaux dont nous rapportons les résultats dans ce mémoire, font suite à ceux réalisés au Laboratoire par MAZURIER et al. (1985) qui, par des essais de fixation, avaient montré que les vésicules membranaires de la bordure en brosse de l'intestin de Lapin étaient capables de fixer la lactotransferrine humaine. D'autre part, ces auteurs avaient pu, par la méthode d'électrotransfert et de fixation du ligand, visualiser le récepteur et estimer sa masse moléculaire à environ 100 kDa.

Dans le but de poursuivre ces études et, en particulier, dans le but d'élargir nos connaissances sur le rôle de la lactotransferrine et de son récepteur dans l'absorption intestinale du fer et sa régulation, nous avons entrepris nos travaux en choisissant la Souris comme modèle. Cet animal est, en effet, plus accessible et la possibilité d'utiliser la lactotransferrine de Souris, grâce à une collaboration avec le Dr. SAWATZKI, nous a permis d'effectuer une étude en système homologue.

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

1) L'application de la méthode d'"anse duodénale ligaturée in vivo" que nous avons mise au point au Laboratoire, nous a permis de mieux percevoir certains aspects de l'absorption intestinale du fer apporté par la lactotransferrine et d'apporter les démonstrations suivantes :

a - Le fer conjugué à la lactotransferrine de Souris peut être absorbé sans libération préalable du métal dans la lumière intestinale.

b - La vitesse d'absorption du fer diminue avec le temps, suggérant un mécanisme de régulation, bien qu'une perturbation physiologique associée à l'anesthésie ne puisse être à priori exclue.

c - L'absorption s'effectue selon un mécanisme saturable, car la radioactivité absorbée diminue considérablement en présence d'un excès de lactotransferrine non radioactive. Ce résultat est en faveur de la présence d'un récepteur.

2) Les essais de fixation nous ont permis de mettre en évidence la présence du récepteur de la lactotransferrine dans la bordure en brosse de l'intestin de Souris et de préciser quelques paramètres de ses interactions avec la lactotransferrine.

Nous avons montré que le récepteur fixait des lactotransferrines isolées de lait de différentes mammifères avec des affinités semblables et que l'interaction ligand-récepteur dépendait de la présence des cations bivalents et du pH du milieu.

3) Les essais de compétition nous ont permis de préciser la spécificité du récepteur, de montrer que celui-ci reconnaissait la partie protéique des lactotransferrines et d'exclure sa nature lectinique. Nous avons également montré que l'interaction de la lactotransferrine avec son récepteur n'était pas de nature électrostatique.

4) Afin de justifier la présence de la sérotransferrine et de la "serotransferrin-like" dans le lait de Souris, d'une part, et de préciser leur rôle dans l'absorption intestinale du fer, d'autre part, nous avons étudié la fixation de ces deux protéines sur les vésicules de la bordure en brosse de l'intestin de Souris. Nous avons montré que les deux transferrines ne se fixaient pas sur la membrane d'une manière spécifique. Nous avons donc conclu que le récepteur de la lactotransferrine était bien spécifique de cette dernière, d'une part, et que les récepteurs de la sérotransferrine et de la "serotransferrin-like" étaient absents de la bordure en brosse de l'intestin de Souris, d'autre part. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux qu'ont obtenus MAZURIER et al. (1985) chez le Lapin.

5) Nous avons mis au point un protocole de solubilisation de la membrane, étape préalable nécessaire pour purifier le récepteur. Nous avons montré que le récepteur solubilisé par une solution à 1 % de Triton X-100 conservait son activité. La méthode de "Dot-Spot" que nous

avons mise au point au Laboratoire a fourni une approche rapide et fiable pour le dosage du récepteur solubilisé.

6) L'électrophorèse en présence de détergents non dénaturants nous a permis de visualiser le récepteur et de confirmer sa spécificité vis-à-vis de la lactotransferrine. Par cette méthode, nous avons pu estimer sa masse moléculaire à environ 130 kDa.

7) L'utilisation du réactif bifonctionnel SASD a confirmé la présence du récepteur dans la membrane de la bordure en brosse de l'intestin de Souris. Par électrophorèse après la coupure des ponts disulfures qui unissent la lactotransferrine à son récepteur, nous avons pu estimer la masse moléculaire de ce dernier à 130 kDa. Par ailleurs, la caractérisation d'un seul complexe de lactotransferrine-récepteur d'une masse moléculaire de 200 kDa révélé par électrophorèse sans coupure préalable des ponts disulfures nous amène à la conclusion qu'une seule molécule de lactotransferrine se fixe par molécule de récepteur contrairement au récepteur réticulocytaire de la sérotransferrine qui fixe 2 molécules de cette dernière.

8) Par chromatographie d'affinité sur lactotransferrine immobilisée, nous avons purifié le récepteur actif et en quantité suffisante pour préparer des anticorps monospécifiques.

9) L'obtention d'un antisérum monospécifique nous a permis d'envisager une purification du récepteur par chromatographie d'immuno-absorption. Bien que le récepteur obtenu par cette approche soit dénaturé, nous avons pu améliorer le rendement et l'amener de 1,2 % à 7 %.

10) Par électrophorèse en gel de polyacrylamide, nous avons précisé la masse moléculaire et la nature monocaténaire du récepteur, ce qui le différencie, une fois encore, du récepteur réticulocytaire de la sérotransferrine dont la nature dimérique a été démontrée. Par une modification du gel d'électrofocalisation IEF de Pharmacia nous avons pu fixer à 5,8 le P_i du récepteur. L'utilisation de lectines après électrotransfert a révélé sa nature glycoprotéinique. La déglycosylation par des endoglycosidases, en abaissant de 20 à 25 kDa sa masse moléculaire conduit à la conclusion que le récepteur renferme de 20 à 25 glycannes

que l'utilisation d'endoglycosidases spécifiques identifie à des structures de type N-acétyllactosaminique.

Nos travaux ont contribué à démontrer que la lactotransferrine jouait bien un rôle fondamental dans l'absorption intestinale du fer et que ce résultat s'expliquait par la présence d'un récepteur spécifique de cette dernière dans la bordure en brosse de l'entérocyte. Ce récepteur a été isolé et quelques unes de ses caractéristiques ont été précisées. Cependant, son image conformationnelle est encore loin d'être établie. Par ailleurs, le mécanisme de passage du fer conjugué à la lactotransferrine à travers la membrane de la bordure en brosse des entérocytes demande à être précisé : comme dans le cas de la sérotransferrine, nécessite-il une internalisation de la protéine porteuse. Le récepteur que nous avons obtenu n'étant que le récepteur capable de fixer la lactotransferrine, la machinerie nécessaire permettant son fonctionnement est encore inconnue. Les événements induits par la fixation de la lactotransferrine à son récepteur entérocytaire restent à élucider ainsi que le rôle de ce récepteur dans la régulation de l'absorption intestinale du fer. Ces études vont sans doute conduire à l'illustration du mécanisme au niveau moléculaire de l'absorption du fer impliquant la lactotransferrine.

APPENDICE TECHNIQUE

PRAPARATION DES PROTEINES

Préparation de la lactotransferrine de Souris

La lactotransferrine de souris est préparée selon 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 colonne de Sephadex G-25, puis 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 de pH 6,5. La fraction contenant la lactotransferrine est soumise à une nouvelle chromatographie sur colonne d'héparine-Sepharose. L'élution est effectuée avec un gradient de NaCl comme précédemment. Une dernière purification est réalisée sur une colonne de Sephacryl S-300 dans un tampon Mops 20 mM / NaCl 300 mM de pH 6,5.

Préparation des lactotransferrines humaine et bovine

La méthode que nous utilisons est une méthode mise au point par CHERON et al. (1977).

Les laits sont délipidés par centrifugation pendant 45 min à 20.000 g, puis dialysés à 4 °C contre de l'eau distillée. Après trois jours de dialyse, le pH est amené à 4,6 par addition d'HCl 0,1 N. La caséine, précipitée après 24 h de repos, est éliminée par centrifugation à 20.000 g, pendant 45 min.

Le lactosérum ainsi obtenu est chromatographié à 4°C sur une colonne de SP-Sephadex stabilisé dans de l'acétate de sodium 0,22 M. La colonne est ensuite lavée successivement par des concentrations de 0,22

et 0,4 M de ce même sel, puis la lactotransferrine est éluée par de l'acétate de sodium 0,5 M. Une deuxième chromatographie sur SP-Sephadex est nécessaire pour assurer la purification de la lactotransferrine. Les conditions sont identiques à celles décrites pour la première chromatographie.

Saturation en fer des transferrines

La saturation en fer des transferrines est réalisée selon la méthode préconisée par AZARI et BAUGH (1967). La protéine est dissoute dans un tampon acétate de sodium / bicarbonate de sodium 0,1 M de pH 8,2. Le fer est ajouté sous forme de citrate ferrique (en dissolvant 260 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dans 10 ml de tampon citrate de sodium / bicarbonate de sodium 0,1 M de pH 8,2). La quantité de citrate ferrique ajoutée pour saturer totalement la protéine est de 1,6 μg de fer par mg de protéine, ce qui représente environ 110 % de la quantité théorique. Après 3 h de repos, le fer libre est éliminé par dessalage sur une colonne de Sephadex G-25 équilibrée dans le tampon d'utilisation.

Préparation de l'apolactotransferrine

L'apolactotransferrine est préparée selon la méthode mise au point et décrite par MAZURIER et SPIK (1980).

La lactotransferrine native est dissoute dans un tampon formiate de sodium 0,2 M / phosphate de sodium 0,2 M / EDTA 40 mM de pH 4 pour obtenir une concentration maximale de 0,5 %. Après un repos de 24 h, la solution est dialysée 3 jours contre de l'eau distillée.

PREPARATION DES VESICULES DE LA BORDURE EN BROsse DE L'INTESTIN DE SOURIS

La méthode utilisée est celle de KESSLER et al. (1978).

Des souris (Swiss mice) âgées de 5-6 semaines sont mises à jeun pendant 10 h avant d'être sacrifiées. Le 1/3 supérieur de l'intestin grêle est prélevé à 4°C, puis lavé avec du PBS froid. La muqueuse intestinale est récupérée par grattage à l'aide d'une lame de verre.

La muqueuse recueillie est ensuite suspendue dans un tampon d'homogénéisation constitué de D-mannitol 50 mM / Tris-HCl 2 mM de pH 7,1 à raison de 15 ml par gramme de muqueuse et l'ensemble est homogénéisé dans un broyeur de type "Warring blender" pendant 2 mn à vitesse maximale. Cet homogénat (H1) est additionné de CaCl_2 en poudre jusqu'à obtenir une concentration finale de 10 mM. Après 15 min sous agitation douce à 4°C, les noyaux, les mitochondries et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation pendant 15 min à 3000 g.

Le surnageant (S1) est recueilli et ensuite centrifugé à 27.000 g pendant 30 min, à 4°C. Le culot (C2) ainsi obtenu est récupéré dans le tampon d'homogénéisation à raison de 1 ml / g de muqueuse de départ et ensuite homogénéisé à l'aide d'un appareil de Potter-Elvehjem, à raison de 4 aller-retour à vitesse maximale.

Le culot (C2) ainsi homogénéisé est resuspendu dans du tampon d'homogénéisation et purifié une deuxième fois par centrifugation dans les mêmes conditions. Le culot (C3) est repris par le tampon d'homogénéisation, puis réparti par fractions et stocké à -70°C.

La procédure est schématisée dans la Fig.30 (p.134).

METHODES DE DOSAGES

Mesure de la fixation de la lactotransferrine sur le récepteur solubilisé

L'échantillon est déposé sur la membrane de nitrocellulose à raison de 5 µl dans un carré de 1 x 1 cm. Après 10 min de séchage à 4°C, la membrane de nitrocellulose est incubée avec 1 µg / ml ou avec 0,1-10 µg / ml de lactotransferrine de Souris marquée à l' [^{125}I] dans un tampon 150 mM NaCl / 10 mM MES-HCl (pH 5,5) / 10 mM CaCl_2 / 0,1 % Triton X-100. Après 1 h de repos à 4°C, la membrane est lavée avec le même tampon sans lactotransferrine, puis séchée. La radioactivité fixée sur la membrane de nitrocellulose est mesurée avec un compteur gamma (LKB CompuGamma). La fixation non spécifique sur la membrane est déterminée par une incubation parallèle en absence de l'échantillon.

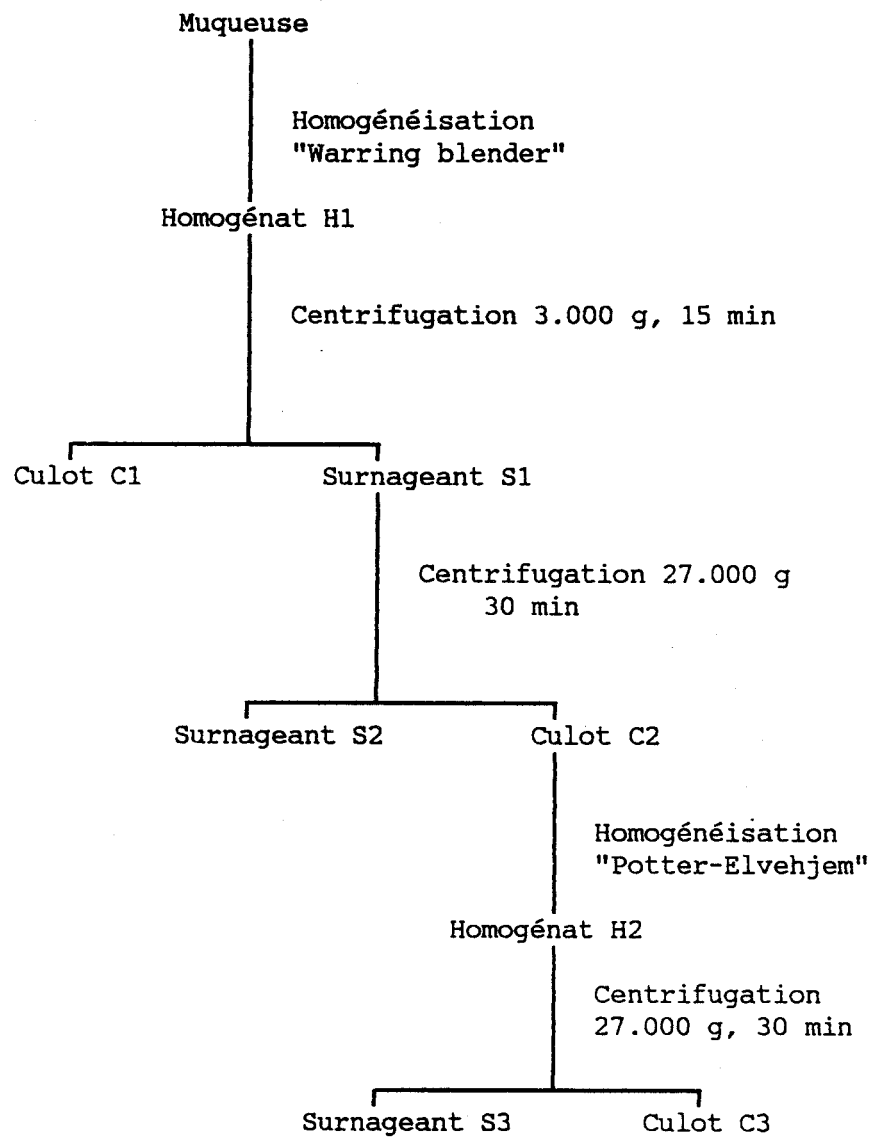


Fig. 30. Schéma de la préparation des vésicules membranaires de la bordure en brosse de l'intestin de Souris
(D'après KESSLER et al., 1978)

Dosage des protéines

La concentration en protéines dans notre étude est déterminée par la méthode de LOWRY et al. (1951) modifiée pour le dosage des protéines solubles et membranaires par PETERSON (1977).

5 à 100 µg de protéines en solution sont amenées à 1 ml par addition d'eau distillée. Après addition de 0,1 ml de désoxycholate de sodium 0,15 %, les tubes sont agités et laissés à température ambiante pendant 10 min. Les protéines sont ensuite précipitées par addition de 0,1 ml d'une solution d'acide trichloracétique à 72 %. Après agitation et centrifugation à 3.000 g pendant 20 min, le surnageant est éliminé par aspiration.

Après addition d'un ml d'eau, le culot protéique est solubilisé par 1 ml de réactif A, mélangé et laissé 10 min à température ambiante. 0,5 ml de réactif B sont ensuite ajoutés et la coloration est développée à l'obscurité pendant 30 min. La concentration en protéines est déterminée par lecture de l'absorbance à 750 nm contre une gamme-étalon de sérum albumine bovine variant de 5 à 100 µg.

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

Réactif B : Un volume de réactif au phénol de Folin-Ciocalteu (Merk, Darmstadt) et 5 volumes d'eau. Le garder à l'obscurité.

Pour des concentrations de 1 à 20 µg de protéines, le dosage peut être effectué en divisant par 5 la quantité de réactif A et de réactif B.

MARQUAGE RADIOACTIF DES PROTEINES

Marquage des transferrines à l' ^{125}I

Le marquage des transferrines à l' ^{125}I est réalisé par la méthode à l'Iodo-Gen (Pierce) décrite par FRACKER et SPECK (1978) et SALINSKY *et al.* (1981).

Des tubes à hémolyse en verre sont tapissés par 100 μg d'Iodo-Gen mis en solution dans le chloroforme à raison de 1 mg / ml. Après évaporation du chloroforme par un courant d'azote. La solution d'iode radioactive est composée de 2 μl d' ^{125}I (NaI, sans entraîneur; 5 mCi/50 μl ; Amersham) mélangés à 8 μl de NaI froid 20 mM dans un tampon phosphate 50 mM de pH 7,4.

La solution de lactotransferrine (500 μg / 100 μl de tampon phosphate 50 mM de pH 7,4) est placée dans le tube contenant l'Iodo-Gen. La solution d'iode radioactive est alors ajoutée et le tube est placé dans la glace, sous agitation douce, pendant 10 min.

La lactotransferrine marquée à l' ^{125}I est séparée de l'iode en excès par dessalage sur une colonne de Sephadex G-25 (Pharmacia) équilibrée dans le tampon d'utilisation.

Le rendement de marquage (supérieur à 90 %) et la radioactivité spécifique sont déterminés après mesure de la concentration en protéine (absorbance à 280 nm) et comptage de la radioactivité d'une fraction aliquote dans un compteur multigamma (Compugamma, LKB).

Marquage des protéines membranaires à l' ^{125}I

Le marquage à l' ^{125}I des protéines membranaires est réalisé par la méthode à l'Iodo-Gen décrite précédemment. 10 μl d' ^{125}I sont utilisés pour 1 mg de protéines membranaires. L'iode libre est éliminé par deux centrifugations successives et élimination des surnageants.

Marquage de la lactotransferrine au ^{59}Fe

Le marquage au ^{59}Fe est effectué en incubant de la lactotransferrine de Souris avec du $^{59}\text{FeCl}_3$ (51 mCi / mg, 1mCi / ml, Amersham, Grande-Bretagne) dans une solution de citrate de sodium bicarbonate de sodium 0,1 M de pH 8,2 (AZARI et BAUGH, 1967). Le rapport protéine / fer

est de 1/1,5 (mg/ μ g) afin d'avoir une radioactivité spécifique importante. Après un repos de 3 h à température ambiante, le fer libre est éliminé par dessalage sur colonne de Sephadex G-25 (2,5 cm x 80 cm).

METHODE ELECTROPHORETIQUE

Electrophorèse en gradient de gel de polyacrylamide en présence de SDS

Les électrophorèses en gradient de gel de polyacrylamide sont réalisées dans un appareil vertical en plaques (1,5 x 140 x 180 mm) (Bio-Rad) dans les conditions préconisées par LAEMMLI (1970).

Le gel de séparation est constitué par un gradient variant de 5 à 15 % en acrylamide dans un tampon Tris-HCl 10 mM de pH 8,9. Le gel de concentration est à 5 % en acrylamide dans un tampon Tris-HCl 10 mM de pH 6,8. Le tampon d'électrophorèse et les gels d'acrylamide contiennent 0,1 % de SDS.

Les échantillons (5 μ g de protéines par dépôt) sont solubilisés dans 100 μ l de tampon Tris-HCl 10 mM de pH 8,9 contenant 1 % de SDS et 10 % de glycérol et placés au bain-marie à 100°C pendant 3 min. 25 μ l de la solution renfermant les échantillons sont déposés sur le gel d'acrylamide.

L'électrophorèse est réalisée à 100 V pendant la nuit, sous réfrigération d'eau froide.

Electrotransfert sur feuille de nitrocellulose (Western blotting)

Les protéines, séparées par électrophorèse en gel d'acrylamide, sont ensuite transférées par électrophorèse (cellule de transfert Bio-Rad) sur une feuille de nitrocellulose (Schleicher et Schüll) dans le tampon Tris 25 mM / glycine 192 mM de pH 8,4, contenant 20 % (v/v) méthanol selon la méthode décrite par TOWBIN et al. (1979) et BURNETTE (1981). L'électrophorèse est réalisée à 150 mA, à 4°C pendant 15 h.

Après le transfert, les protéines fixées sur la nitrocellulose sont révélées soit par l'Amido Schwartz, soit par des ligands radioactifs.

COLORATION DES PROTEINES DANS LE GEL DE POLYACRYLAMIDE PAR LE NITRATE D'ARGENT

La coloration par le nitrate d'argent est effectuée selon la méthode décrite par MORRISSEY (1981).

Après électrophorèse, le gel est fixé pendant 1 h dans 50 % méthanol / 10 % acide acétique suivi d'un bain d'une heure dans 5 % méthanol / 7 % acide acétique. Le gel ainsi fixé est ensuite mis en contact avec 10 % de glutaraldéhyde pendant 1 h. Le glutaraldéhyde est éliminé du gel par plusieurs rinçages intensifs avec de l'eau permutée.

Le gel est immergé dans 5 µg/ml DTT pendant 30 min, suivi d'une incubation de 30 min avec 0,1 % de nitrate d'argent dans l'eau.

Après un rinçage dans l'eau, le développement de la coloration est effectuée par une solution qui consiste de 50 µl de 37 % formaldéhyde dans 100 ml 3 % Na_2CO_3 , jusqu'au niveau de développement désiré. La réaction de révélation est terminée par un lavage avec une solution aqueuse à 7 % d'acide acétique.

BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN R.A., TOLLEY J.O. & JESAITUS A.J. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, 882, 271-280
- ALPERS D.H. (1972) *J. Clin. Invest.*, 51, 2621-2630
- ALTMANN G.G. & ENESCO M. (1967) *Am. J. Anat.*, 121, 319-324
- AMBRUSO D.R. & JOHNSTON R.B. (1981) *J. Clin. Invest.*, 67, 352-360
- AMINE E.K. & HEGSTEAD D.M. (1975) *J. Agric. Food Chem.*, 23, 204
- ANDERSON B.F., BAKER H.M., DODSON E.J., NORRIS G.E., RUMBALL S.V., WATERS J.M. & BAKER E.N. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 1769-1773
- APTE S.V. & BROWN E.B. (1969) *Gastroenterology*, 57, 126-133
- ARNOLD R., COLE M.F. & MacGHEE J.R. (1977) *Science*, 197, 263-265
- ARNOLD R., BREWER M. & GAUTHIER J. (1980) *Infect. Immun.*, 28, 893-898
- ARNOLD R., RUSSELL J., CHAMPION W., BREWER M. & GAUTHIER J., (1982) *Infect. Immun.*, 35, 702-799
- ASTALDI G., MEARDI G. & LISINO T. (1966) *Blood*, 28, 70-82
- AUBERT J.B., BISERTE G. & LOUCHEUX-LEFEBVRE M.H. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.*, 175, 410-418
- AZARI P. & BAUGH R.F. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.*, 118, 138-144
- BAGBY G.C., VASILISKI D.R., BENNETT R.M., VANDENBARK A.A. & GAREWAL H.S. (1981) *J. Clin. Invest.*, 68, 56-63
- BAILEY S., EVANS R. W., GARRATT R.C., GORINSKY B., HASNAIN S., HORSBOUGH C., JHOTI H., LINDLEY P., MYDIN A., SARRA R. & WATSON J. (1988) *Biochemistry*, 27, 5804-5812
- BAKER E.N., RUMBALL S.V. & ANDERSON B.F. (1987) *Trends Biochem. Sci.*, 12, 350-353
- BANERJEE D., FLANAGAN P.R., CLUETT J. & VALBERG L.S. (1986) *Gastroenterology*, 91, 861-869
- BANNISTER J.V., BANNISTER W.H., HILL H. & THORNALLEY P.J. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, 715, 116-120
- BARTON J.C., CONRAD M.E. & NUBY S. (1978) *J. Lab. Clin. Med.*, 92, 536
- BATEY R.G. & GALLAGHER N.D. (1977) *Gastroenterology*, 73, 267-272
- BEDARD Y.C., PINKERTON P. & SIMON G.T. (1971) *Blood*, 38, 232
- BEGG D.A., RODEWALD R. & REBHUN L.I. (1978) *J. Cell Biol.*, 79, 846-852
- BENAKIBA A. & MAROUX S. (1980) *Eur. J. Biochem.*, 107, 381-388

- BENJAMIN E.L., CORTELL S. & CONRAD M.E. (1967) *Gastroenterology*, 53, 389
- BENNETT G. & LEBLOND C.P. (1970) *J. Cell Biol.*, 46, 409-416
- BENNETT R.M., EDDIE-QUATEY A.C. & HOLT P.J.L. (1973) *Arthr. Rheum.*, 16, 186
- BENNETT R.M. & KOKOCINSKI T. (1978) *Br. J. Haematol.*, 39, 509
- BENNETT R.M., BAGBY G.C. & DAVIS J. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 101, 88-95
- BERESFORD C.H., NEALE R.J. & BROOKS O.G. (1971) *Lancet*, 1, 568-572
- BERGERON J.J.M., BACHUBINSKI R., SEARLE N., BORTS D., SIKSTROM R. & POSNER B.I. (1980) *J. Histochem. Cytochem.*, 28, 824
- BERSETH C.L. (1987) *Biol. Neonate.*, 51, 53-59
- BERSETH C.L. (1987) *Am. J. Physiol.*, 253, G661-G665
- BERSETH C.L., LICHTENBERGER L.M. & MOURRISS F.H. (1983) *Am. J. Clin. Nutr.*, 37, 52-60
- BEUTLER E. & BUTTENWEISER E. (1958) *J. Lab. Clin. Med.*, 48, 60
- BEUTLER E. & BUTTENWEISER E. (1960) *J. Lab. Clin. Med.*, 55, 274-280
- BEZWODA W.R., BOTHWELL T.H. & TORRANCE J.D. (1979) *Scand. J. Haematol.*, 22, 113
- BIRGENS H.S. (1984) *Scand. J. Haematol.*, 33, 225-230
- BISERTE G., HAVEZ R. & CUVELIER R. (1963) *Exp. Annu. Biochem. Med.*, 25, 85
- BLANC B. & ISLIKER H. (1961) *Bull Soc. Chim. Biol.*, 43, 929
- BLUARD-DECONINCK J.M., MASSON P.L., OSINSKI P.A. & HEREMANS J.F. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, 365, 311-317
- BLUARD-DECONINCK J.M., WILLIAMS J., EVANS R.W., Van SNICK J., OSINSKI P.A. & MASSON P.L. (1978) *Biochem. J.*, 171, 321-327
- BOCK K., ARNAP J. & LÖNNGREN J. (1982) *Eur. J. Biochem.*, 129, 171-178
- BOENDER C.A. & VERLOOP M.C. (1969) *Br. J. Haematol.*, 17, 45-58
- BOTHWELL T.H., PIRZIO-BIROLI G. & FINCH C.A. (1958) *J. Lab. Clin. Med.*, 51, 24-36
- BOTHWELL T.H. & ISAACSON C. (1962) *Br. Med. J.*, 1, 522
- BOTHWELL T.H., CHARLTON R.W., COOK J.D. & FINCH C.A. (1979) in "Iron Metablism in Man" (BOTHWELL T.H., CHARLTON R.W., COOK J.D. & FINCH C.A. eds.), pp. 264, Blackwell Scientific Publications, London

- BOTTENSTEIN J., HAYASHI I., HUTEHING S., MASUI H., MATHER J., McCLURE D.B., OHASA S., RIZZINO A., STATO G., SERRERO G., WOLGE R. & WU R. (1979) *Methods Enzymol.*, 58, 94-109
- BOUHOURS J.F. & GLICKMAN R.M. (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, 487, 51-60
- BOULARD M., DELIN M. & NAJEAN Y. (1972) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 139, 1379
- BOUQUELET S. STRECKER G., MONTREUIL J. & SPIK G. (1980) *Biochimie*, 62, 43-49
- BOXER L.A., BJORKSTEN B., BJORK J., YANG H.H., ALLEN J.M. & 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., BRISSON J.R. & CARVER J.P. (1983) *Biochemistry*, 22, 1362-1368
- BRESTCHER A. & WEBER K. (1978) *J. Cell Biol.*, 79, 839-845
- BRISSON J.R. & CARVER J.P. (1983a) *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, 61, 1067-1078
- BRISSON J.R. & CARVER J.P. (1983b) *Biochemistry*, 129, 171-178
- BROCK J.H., ARZABE F., LAMPREAVE F. & PINEIRO A. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 446, 214-215
- BROCK J.H., PINEIRO A. & LAMPREAVE F. (1978) *Ann. Rech. Vet.*, 9, 287-294
- BROCK J.H. (1980) *Arch. Dis. Child.*, 55, 417-421
- BROCK J.H., MAINOU-FOWLER T. & WEBSTER L. (1986) *Immunology*, 57, 105-110
- BRODAN V., KUHN E., MASCK J., BRODANOVA M., KORDAC V & VALEK J. (1968) *Acta Biol. Med. Germ.*, 20, 597-605
- BROEKHUYSE R.N. (1974) *Invert. Ophtamol.*, 13, 550
- BROWN E.B. & JUSTUS B.W. (1958) *Am. J. Physiol.*, 194, 319
- BROWN A.L.J. (1962) *J. Cell Biol.*, 12, 623-627
- BROXMEYER H.E., BICKNELL D.C., GILLIS S., HARRIS E.L., PELUS L.M. & SLEDGE G.W. (1986) *Blood Cells*, 11, 429-446
- BROXMEYER H.E., SMITHYMAN A., EGER R.R., MEYERS P.A. & De SOUSA M. (1978) *J. Exp. Med.*, 148, 1052-1068
- BROXMEYER H.E., JULIANO L., WAHEED A. & SHADDUCK R.K. (1985) *J. Immunol.*, 135, 3224-3231
- BRUGGE W.R. & BURKE C.A. (1988) *Diges. Dis. Sci.*, 33, 178-184
- BRUNSER O. & LUFT J.H. (1970) *J. Ultrastruct. Res.*, 31, 291-311
- BULLEN J.J., ROGERS H.J. & LEIGH L. (1972) *Br. Med. J.*, 1, 69-75

- BULLEN J.J., ROGERS H.J. & GRIFFITHS E. (1974) in "Microbial Iron Metablism", (J.B. NIELANDS ed.) pp. 517, Acadmic Press, New York
- BURGESS D.R. (1982) J. Cell Biol., 95, 853-866
- BURNETTE M.N. (1981) Anal. Biochem., 112, 195-203
- BUTTERICK C.J. & BAEHNER R.L. (1982b) J. Clin. Invest., 70, 1049-1057
- CACHE P. (1986) Thèse de 3ème cycle, Lille
- CAMBELL E.J. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6941-6945
- CARDELL R.R.J., BADENHAUSEN S. & PORTER K.R. (1967) J. Cell Biol., 34, 123-155
- CASTELLINO F.J., FISH W.W. & MANN K.G. (1975) J. Biol. Chem., 245, 4269
- CATTAN D., DEBRAY C., JORI J.P. & MARCHE C. (1967) Nouv. Rev. Fr. Haematol., 7, 259-270
- CAVELL P.A. & WIDDOWSON E.M. (1964) Arch. Dis. Child., 39, 496-501
- CAVILL J., WORWOOD M. & JACOBS A. (1975) Nature, 256, 328-329
- CHARLTON R.W. & BOTHWELL T.H. (1983) Ann. Rev. Med., 34, 55-68
- CHERON A., MAZURIER J. & FOURNET B. (1977) C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. Ser. D 284, 585-588
- CLEMENTE F., RIBEIRO T., COLOMB E., FIGARELLA C. & SALES H. (1971) Biochim. Biophys. Acta, 251, 456
- CODDEVILLE B. (1986) Thèse de Doctorat en Biochimie, Lille
- CONRAD M.E. & CROSBY W.H. (1962) Blood., 20, 173
- CONRAD M.E., BERMAN A. & CROSBY W.H. (1962) Gastroenterology, 43, 358
- CONRAD M.E. & CROSBY W.H. (1963) Blood., 22, 406
- CONRAD M.E., WEINTERAUB L.R. & CROSBY W.H. (1964) J. Clin. Invest., 43, 963
- CONRAD M.E. FOY A.L. & WILLIAMS H.L. (1967) Am. J. Physiol., 213, 557
- CONRAD M.E. & SCHADE S.G. (1968) Gastroenterology, 55, 35
- CONRAD M.E. & BARTON J.C. (1981) Am. J. Hematol., 10, 199-225
- CONRAD M.E. (1987) in "Physiology of the Gastrointestinal Tract", 2nd ed., (JOHNSON L.R. ed.) pp. 1437-1453, Raven Press, New York,
- CORTELL S. & CONRAD M.E. (1967) Am. J. Physiol., 213, 43
- COX T.M., MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J. & PETERS T.F. (1979) Biochim. Biophys. Acta, 588, 120-128

- COX T. & O'DONNELL M. (1980) *Biochemistry International*, 1, 446-454
- COX T.M. & O'DONNELL M.W. (1981) *Biochem. J.*, 194, 753-759
- CRICHTON R.R. & CHARLOTEAU-WAUTERS M. (1987) *Eur. J. Biochem.*, 164, 485-506
- CROSBY W.H. (1965) in "Iron Metablism", *Series haematologica*, Munksgaard, Copenhagen, 6, 66-71
- DAUTRY-VERSAT A. & LODISH H.F. (1984) *Sci. Am.*, 250/5, 52
- DAVIDSON L.A. & LONNERDAL B. (1985a) *Am. J. Clin. Nutr.*, 41, 852-855
- DAVIDSON L.A. & LONNERDAL B. (1988) *Am. J. Physiol.*, 254, G580-G585
- DAVIS A.E. & BADENOCH J. (1962) *Lancet*, 2, 510
- DAVOUST J., MICHEL V., SPIK G., MONTREUIL J. & DEVAUX P.F. (1981) *FEBS Lett.*, 125, 271-276
- DEBANNE M.T., RECOECZI E., SWEENEY G.D. & KRESTYNSKI F. (1985) *Am. J. Physiol.*, 248, G463-G469
- De LAEY P., MASSON P. & HEREMANS J.F. (1968) in *Proteins of Biological Fluids* (Peters H. ed.), 16, 627-632
- DEISENHOFER J. (1981) *Biochemistry*, 20, 2361-2370
- DERISBOURG P. (1987) D.E.A., Lille
- De SOUSA M. (1978) *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 32, 393-409
- De VET B.J.C.M. & Van GOOL J. (1974) *Acta Med. Scand.*, 196, 393-402
- DINARELLO C.A. & WOLFF S.M. (1977) *Am. J. Med.*, 72, 799
- DINARELLO C.A. (1984) *Rev. Infect. Dis.*, 6, 51
- DONALDSON R.M., MACKENZIE I.L. & TRIER J.S. (1967) *J. Clin. Invest.*, 46, 1215-1228
- DOUGLAS A.P., KERLEY R. & ISSELBACHER K.J. (1972) *Biochem. J.*, 128, 1329-1338
- DOUY A. & GALLOT B. (1980) *Biopolymers*, 19, 493
- DOUY A., GERVAIS M. & GALLOT B. (1980) *Macromol. Chem.*, 181, 1199
- DRENCKHAHN D. & GROSHOL-STEWART U. (1980) *J. Cell Biol.*, 86, 475-482
- DRYSDALE J.M. (1977) *CIBA Symp.*, 51, 41-57
- DUBACH R., CALLENDER S.T.E. & MOORE C.V. (1948) *Blood*, 3, 526-542
- DUNN J.A. (1968) *S. Afr. J. Med. Sci.*, 33, 65-70

- EICHHOLZ A. (1968) *Biochim. Biophys. Acta*, 163, 101-107
- ELDER J.H. & ALEXANDER S. (1982) *Proc. Natl. Sci. USA*, 79, 4540-4544
- EL-SHOBAKI T.A. & RUMMEL W. (1977) *Res. Exp. Med.*, 171, 243-253
- EVANS G.W. & GRACE C.I. (1974) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 147, 687-689
- EVANS P.R. & MacKEITH R. (1954) *Infant feeding*. London: Churchill
- FAIREBANKS V.F. FAHEY J.L. & BEUTLER E. (1971) in "Clinical Disorders of Iron Metablism", 2nd ed., pp. 137-139, Grune and Stratton, New York
- FAIRWEATHER-TAI S.J., BALMER S.E., SCOTT P.H. & MINSKI M.J. (1987) *Pediatr. Res.*, 22, 651-654
- FINCH C.A. (1969) in "Iron Metablism and Anaemia", *Proc. Symp. 8th PAHO advisory Committee on Medical Research*, Washington D.C. June 1969, Pan American Health Organization, pp. 43-45
- FINCH C.A., HUEBERS H. & ENG M. (1982) *Blood*, 59, 364
- FLETCHER J. & WILLARS J. (1986) *Blood cells*, 11, 447-454
- FORSTNER G.G., TANAKA K. & ISSELBACHER K.J. (1968) *Biochem. J.*, 109, 51-59
- FORETNER G.G. & WHERRETT J.R. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, 306, 446-459
- FRANKE W.W., APPELHANS B., SCHMID E., FREUDESTEIN C., OSBORN M. & WEBER K. (1979) *Differenciacion*, 15, 7-15
- FRANKE W.W., WINTER S., GRUND C., SCHMID E., SCHILLER D.L. & JARASCH E.D. (1981) *J. Cell Biol.*, 90, 116-127
- FRANSSON G.B. & LÖNNERDAL B. (1980) *J. Pediatr.*, 96, 380-384
- GALLO-PAYET N. & HUGON J.S. (1984) *Endocrinology*, 114, 1885-1892
- GARRY P.J., OWEN G.M., HOOPER E.M. & GILBERT B.A. (1981) *Pediatr. Res.*, 15, 822-828
- GENTILE P. & BROXMEYER H.E. (1983) *Blood*, 61, 982-994
- GILLMAN J. & IVY A.C. (1947) *Gastroenterology*, 9, 162-169
- GINSEL L.A., ONDERWATER J.J.M. & DAEMS W.T. (1979) *Virchows Archiv. (Cell Pathol.)*, 30, 245-273
- GLENNEY J.R. & WEBER K. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 10551-10554
- GLENNEY J.R., GLENNEY M., OSBORN M. & WEBER K. (1982) *Cell*, 28, 843-854
- GOAVEC M., MAZURIER J., MONTREUIL J. & SPIK G. (1985) *C. R. Acad. Sci. série III*, Paris 301, 689-694

- GOLDE D.W. & CLINE M.J. (1972) J. Clin. Invest., 51, 2981-2983
- GORDON W.G., ZIEGLER J. & BASCH J.J. (1962) Biochim. Biophys. Acta, 60, 410
- GRÄSBECK P., KOUVONEN I., LUNDBERG M. & TENHUNEN R. (1979) Scand. J. Haematol., 23, 5-9
- GREEMAN J. & JACOBS A. (1975) Gut, 16, 613
- GROSS S. (1968) J. Pediatr., 73, 521
- GROVES M.L. (1960) J. Am. Chem. Soc., 82, 3345-3350
- GUTTERIDGE J., PATERSON S., SEGAL A. & HALLIWELL B. (1981) Biochem. J., 199, 259-261
- HABER F. & WEISS J. (1934) Proc. R. Soc. Edinb., 147, 332-351
- HAGEMANN R.F., SIGDESTAD C.P. & LESHER S. (1970) Am. J. Anat., 129, 41-49
- HAHN P.F., BALE W.F. & ROSS J.F. (1943) J. Exp. Med., 78, 169
- HALL R.A. & WIDDOWSON E.M. (1979) Biol. Neonate., 35, 131-139
- HALLBERG L. & SÖLVELL (1964) in "Abstracts, X International Congress on Haematology", Stockholm, F:5
- HALLIDAY J.W., POWELL L.W. & MACK U. (1975) in "Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine", R.R. Crichton (ed.), North-Holland, Amsterdam, pp. 405-410
- HAMILTON T.A., WADA H.G. & SUSSMAN H.H. (1979) Proc. Natl. Acad. sci. USA, 76, 6404-6410
- HANOVER J.A. & DICKSON R.B. (1985) in "Endocytosis" (I. Pastan & M.C. Willingham eds.) Plenum Press, London and New-York, pp. 131-161
- HANSON W.R., OSBORNE J.W. & SHARP J.G. (1977) Gastroenterology, 72, 692-700
- HARDING J.B. & CAIRNIE A.B. (1975) Cell Tissue Kinet., 8, 135-144
- HASHIZUME S., KURODA K; & MURAKAMI H. (1983) Biochim. Biophys. Acta, 763, 377-382
- HAURI H.P. & GREENE J.R. (1978) Biochem. J., 174, 61-66
- HECKMAN A.M. & RUKME P. (1969) Fert. Steril., 20, 312
- HEIRD W.C., SCHWARZ S.M. & HANSEN I.H. (1984) Pediatr. Res., 18, 512-515
- HELENIUS A., MELLMAN I., WALL D. & HUBBARD A. (1983) Trends Biochem. Sci., 8, 245-250

- HIROKAWA N., TILNEY L.G., FUJIWARA K. & HEUSER J.E. (1982) J. Cell Biol., 94, 425-443
- HIROKAWA N., KELLER T.C.S., CHASAN R. & MOOSEKER M.S. (1983) J. Cell Biol., 96, 1325-1336
- HOBBS S.M. & JACKSON L.E. (1987) J. Biol. Chem., 262, 8041-8046
- HOOPER D.C., ALPERS D.H., BURGER R.L., MEHLMAN C.S. & ALLEN R.H. (1973) J. Clin. Invest., 52, 3074-3083
- HORWITZ D.A., BAKER A.C., ABO W. & NISHIYA K. (1984) J. Immunol., 132, 2370-2374
- HOWE C.L. & MOOSEKER M.S. (1983) J. Cell Biol., 97, 974-985
- HOXER C.L., KELLER T.C.S., MOOSEKER M.S. & WASSERMAN R.H. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1134-1138
- HUEBERS H., HUEBERS E., FORTH W. & RUMMEL W. (1971) J. Med. Sci., 10, 1141-1144
- HUEBERS H., HUEBERS E. & RUMMEL W. (1976) Eur. J. Biochem., 66, 447
- HUEBERS H., HUEBERS E. & CSIBA E. (1983) Blood, 61, 283
- HUEBERS H. & FINCH C.A. (1985) in "Proteins of Iron Storage and Transport" (Spik G., Montreuil J., Crichton R.R. & Mazurier J. eds.), pp. 263-274, Elsevier, Amsterdam
- HUGON J.S. & BORGERS M. (1968) Gastroenterology, 55, 608-618
- HUMPHREYS J., WALPOLE B. & WORWOOD M. (1977) Br. J. Haematol., 36, 209-217
- IDZERDA R.L., HUEBERS H.E., FINCH C.A. & MCKNIGHT G.S. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 3723-3727
- ISHIKAWA H., BISCHOFF R. & HOLTZER H. (1969) J. Cell Biol., 43, 312-328
- ISOBE Y., ISOBE K. & TABE Y.T. (1979) Acta Histochem. Cytochem., 12, 554
- ITO S. (1965) J. Cell Biol., 27, 475-491
- ITO S. (1969) Fed. Proc., 28, 12
- JACOBS P., BOTHWELL T.H. & CHALTON R.W. (1966) Am. J. Pathol., 210, 694
- JACOBS A. & MILES P.M. (1970) Gut, 11, 723
- JACOBS A. (1977) Blood, 50, 433
- JACOBS E., BAKER S.J. & HERBERT V. (1980) Physiological Reviews, 60, 918-960
- JAFFE C.L., LIS H. & SHARON N. (1980) Biochemistry, 4423-4429

- JAKOI E.R., CAMBIER J. & SASLOW S. (1985) *J. Immunol.*, 135, 3360-3364
- JELTSCH J.M. & CHAMBON P. (1982) *Eur. J. Biochem.*, 112, 291-295
- JEYNES B.J. & ALTMANN G.G. (1975) *Anat. Res.*, 182, 289-296
- JI T.H. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, 559, 39-69
- JOLLES J., DONDA A., AMIGUET P. & JOLLES P. (1984) *FEBS Lett.*, 176, 185-188
- JOHANSON B. (1960) *Acta Chem. Scand.* 14, 510
- JOHNSON G., JACOBS P. & PURVES L.R. (1983) *J. Clin. Invest.*, 71, 1467-1476
- JOHNSON G., JACOBS P. & PURVES R. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, 843, 83-91
- KAMPSCHMIDT R.F. & PULLIAM L.A. (1975) *Res. J. Reticuloendoth. Soc.*, 17, 162-169
- KATZ M. & COOPER B.A. (1974) *Br. J. Haematol.*, 26, 569-579
- KAWAKAMI H., HIRATSUKA M. & DOSAKO S. (1988) *Agric. Biol. Chem.*, 52, 903-908
- KESSLER M., ACUTO O., STORELLI H., MURER H., MULLER M. & SEMENZA G. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, 506, 136-154
- KIJLSTRA A. & BROERSMA L. (1984) *Clin. Exp. Immunol.*, 55, 459-464
- KIMBER C.L., MUKHERJEE T. & DELLER D.L. (1973) *Dig. Dis. Sci.*, 18, 781-791
- KINKADE J.M., MILLER W.W.K. & SEGARS F.M. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 446, 407-418
- KOBADA A. (1979) *Anal. Biochem.*, 100, 1-14
- KOUVONEN I. & GRÄSBECK R. (1979) *Br. Biochem. Res. Commu.*, 86, 358-364
- KOWARSKI S. & SCHACHTER D. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 10834-10840
- KRANTZ S., GOLDWASSER E. & JACOBSON L.E. (1959) *Blood*, 14, 654
- LAEMMLI U.K. (1970) *Nature*, 227, 680-685
- LAURELL C.B. & INGELMAN B. (1947) *Acta Chem. Scand.*, 1, 770
- LECLERCQ Y., SAWATZKI G., WIERUSZESKI J.M., MONTREUIL J. & SPIK G. (1987) *Biochem. J.*, 247, 571-578
- LEGER D., CAMPION B., DECOTTIGNIES J.P., MONTREUIL J. & SPIK G. (1989) *Biochem. J.*, 257, 231-238
- LEFELL M.S. & SPITZNAGEL J.K. (1975) *Infec. Immunity*, 12, 813-820

- LEGRAND D., MAZURIER J., METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., JOLLES P.,
MONTREUIL J. & SPIK G. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*, 787, 90-96
- LEGRAND D., MAZURIER J., MONTREUIL J. & SPIK G. (1988) *Biochimie, sous
presse.*
- LEVINE P.H., LEVINE A.J. & WEINTRAUB L. (1972) *J. Lab. Clin. Med.*, 80,
33
- LI Z.Q., PERKINS S.J. & LOUCHEUX-LEFEBVRE M.H. (1983) *Eur. J. Biochem.*,
130, 275-279
- LICHTENBERGER L.M. & TRIER J.S. (1979) *Am. J. Physiol.*, 237, E98-E105
- LILLIE R.D. & GREEN J.C. (1965) *Am. J. Pathol.*, 47, 965-1009
- LINDER M.C. & MUNRO H.N. (1977) *Fed. Proc.*, 36, 2017-2023
- LINE W.F., SLY D.A. & BEZKORDVAINY A. (1976) *INT. J. Biochem.*, 7,
203-208
- LOH T.T., HIGUCHI D.A., VAN BROCKXMEER F.M., SMITH T.H. & BROWN E.B.
(1980) *J. Clin. Invest.*, 65, 1182-1191
- LONNERDAL B. (1985) *Am. J. Clin. Nutr.*, 42, 1299-1317
- LORIMIER P. (1987) Thèse de doctorat de 3ème cycle, Université de Pierre
et Marie CURIE, Paris VI
- LOUVARD D., REGGIO H. & COUDRIER E. (1986) in "Molecular and Cellular
Basis of Digestion", (Desnuelle P., Sjöström H. & Norén O eds.), pp.
25-42, Elsevier, Amsterdam
- LUCAS M.L., SCHNEIDER W., HABERICH F.J. & BLAIR J.A. (1975) *Proc. R.
Soc. London Ser. B* 192, 39-48
- MacCLELLAND A., KÜHN L.C. & RUDDLE F.H. (1984) *Cell*, 39, 257-274
- MacGILLIVRAY R.T.A., MENDEZ E., SINHA C.K., SUTTON M.R., LINEBACK-ZINS
J. & BREW K. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 2504-2508
- MacGILLIVRAY R.T.A., MENDEZ E., SHEWALE J.G., SINHA C.K., LINEBACK-ZINS
J. & BREW K. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 3543-3553
- MacMILLAN M.A., LANDAW S.A. & OSKI F.A. (1976) *Pediatrics*, 58, 686
- MADARA J.L. (1982) *Gastroenterology*, 83, 981-994
- MADARA J.L. & TRIER J.S. (1987) in "Physiology of the Gastrointestinal
Tract" Second Edition (L.R. Johnson ed.), Raven Press, New York
- MAJURI R., KOUVONEN I. & GRÄSBECK R. (1983) *Protides Biol. Fluids*, 31,
229-232
- MALIET A.M. & PLANTEY M.C. (1977) *D.E.A.*, Lille
- MANIS J. & SCHACHTER D. (1964) *Am. J. Physiol.*, 207, G893-G900

- MAROUX S., COUDRIER E., FERACCI H., GORVEL J.P. & LOUVARD D. (1988) Biochimie, 70, 1297-1306
- MARX J.J.M. (1979) Blood, 53, 204
- MARX J.J.M. & AISEN P. (1981) Biochim. Biophys. Acta, 649, 297-304
- MASON D.Y. & TAYLOR C.R. (1978) J. Clin. Pathol., 31, 316-327
- MASSON P.L., HEREMANS J.F. (1966) Protides Biol. Fluids, 14, 115
- MASSON P.L., HEREMANS J.F. & DAVE C. (1966) Clin. Chim. Acta, 14, 735-739
- MASSON P.L., HEREMANS J.F., SCHONNE E. & CRABBE P.A. (1968) Protides Biol. Fluids, 16, 633-638
- MASSON P.L., HEREMANS J.F. & SCHONNE E. (1969) J. Exp. Med., 130, 643-658
- MASSON P.L. (1970) "La lactotransferrine", collection medicomonographies d'agrégés (S.A. Arscia ed.), pp. 93, Bruxelles
- MASSON P. (1970) La lactoferrine, protéine des sécrétions externes et des leucocytes neutrophiles. Ed. Arscia, Bruxelles
- MASSON P.L. & HEREMAN J.F. (1971) Comp. Biochem. Physiol., 39, 119-129
- MATSUDAIRA P.T. & BURGESS D.R. (1979) J. Cell Biol., 83, 667-673
- MATSUMOTO A., YOSHIMA H., TAKASAKI S. & KOBATA A. (1982) J. Biochem., 91, 143
- MAZURIER J., LHOSTE J.M., SPIK G. & MONTREUIL J. (1977) FEBS Lett., 81, 371-375
- MAZURIER J. & SPIK G. (1980) Biochim. Biophys. Acta, 629, 399-408
- MAZURIER J., METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., SPIK G., MONTREUIL J. & JOLLES P. (1983) Experimentia, 39, 135-141
- MAZURIER J., MONTREUIL J. & SPIK G. (1985) Biochim. Biophys. Acta, 321, 453-460
- MAZURIER J., LEGRAND D., HU W.L., MONTREUIL J. & SPIK G. (1988) Eur. J. Biochem., (en presse)
- METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., JOLLES P., MAZURIER J., SPIK G. & MONTREUIL J. (1980) Biochim. Biophys. Acta, 622, 308-314
- METZ-BOUTIGUE M.H., MAZURIER J., JOLLES J., SPIK G., MONTREUIL J. & JOLLES P. (1982) Biochim. Biophys. Acta, 670, 243-254
- METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., MAZURIER J., SCHOENTGEN F., LEGRAND D., SPIK G., MONTREUIL J. & JOLLES P. (1984) Eur. J. Biochem., 145, 659-676

- MEYER J. (1983) Proc. 7th Intern. Symp. on Glycoconjugates (CHESTER A., HEINEGARD D., LUNDBLAD A. & SVENSON D. eds.), pp. 126, Rhams, Lund
- MINATO N.L., REID H., CANTOR H., LENGYL P. & BLOOM B. (1980) J. Exp. Med., 152, 126
- MOE H., ROSTGAARD J. & BEHNKE O. (1965) J. Ultrastruct. Res., 12, 396-403
- MONSIGNY M., ROCHE A.C. & BAILLY P. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun., 121, 579-584
- MONTREUIL J. & MULLET S. (1960a) C.R. Acad. Sci. Paris, 250, 1736-1737
- MONTREUIL J., TONNELAT J. & MULLET S. (1960b) Biochim. Biophys. Acta, 45, 413-421
- MONTREUIL J. (1971) Ann. Nutr. Alim., 25, A1-A37
- MONTREUIL J. (1975) Pure Appl. Biochem., 42, 431-477
- MONTREUIL J., FOURNET B., SPIK G. & STRECKER G. (1978) C.R. Acad. Sci. Paris, 287D, 837-840
- MONTREUIL J. (1980) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 37, 157-233
- MONTREUIL J. (1980) Proc. Sharon Katzir-Katchalsky, Conference on Carbohydrate-Protein Interactions, Kibbutz kiryat Anavim 9th, 3-4
- MONTREUIL J. (1982) Comp. Biochem., 19B/II, 1-188
- MONTREUIL J. (1983) Biochem. Soc. Transactions, 11, 134-136
- MONTREUIL J. (1984) Pure Appl. Biochem., 56, 859-877
- MONTREUIL J., MAZURIER J., LEGRAND D. & SPIK G. (1985) in "Proteins of Iron Storage and Transport" (Spik G., Montreuil J., Crichton R.R. & Mazurier J. eds.), pp. 25-38, Elsevier, Amsterdam
- MONTREUIL J. (1986) in "Molecular and cellular basis of digestion" (Desnuelle P. Sjöström H. & Norén O. eds.), pp. 3-23, Elsevier, Amsterdam
- MOOSEKER M.S. & TILNEY L.G. (1975) J. Cell. Biol., 67, 725-743
- MOOSEKER M.S. (1983) Cell, 35, 11-13
- MOUSEKER M.S. (1985) Annu. Rev. Cell Biol., 1, 209-241
- MORRISSEY J.H. (1981) Anal. Biochem., 117, 307-310
- MOURIQUAND C. (1960) Rev. Haematol., 15, 472
- MUIR W.A., HOPFER U. & KING M. (1984) J. Biol. Chem., 259, 4896-4903
- MUIR W.A. & HOPFER U. (1985) Am. J. Physiol., 248, G376-G379

- MUKEHERJEE T.M. & STAEHELIN L.A. (1971) J. Cell Sci., 8, 573-599
- MURER H., AMMAN E., BIBER J. & HOPFER U. (1976) Biochim. Biophys. Acta, 433, 509-519
- MURRAY M.J. & STEIN N. (1967) J. Lab. Clin. Med., 70, 361-364
- NEFFGEN J.F. & RAKUSAN K. (1975) Recent Adv. Stud. Cardiac. Struct. Metab., 10, 707-716
- NICHOLS B.L., MCKEE K.S., HENRY J.F. & PUTMAN M. (1987) Pediatr. Scand., 21, 563-567
- OMARY M.B. & TROWBRIDGE I.S. (1981a) J. Biol. Chem., 256, 4715
- OMARY M.B. & TROWBRIDGE I.S. (1981b) J. Biol. Chem., 256, 12888
- OPPENHEIM J.J. & GERY I. (1982) Immunol. Today, 3, 113
- OSEAS R., YANG H.H., BAEHNER R.L. & BOXER L.A. (1981) Blood, 57, 939-945
- OSTERLOH K. & FORTH W. (1981) Blut, 43, 227-235
- OSTERLOH K.R.S., SCHÜMANN K., EHTECHAMI C. & FORTH W. (1985) Blut, 51, 41-47
- OSTERLOH K.R.S., SCHÜMANN K., EHTECHAMI C., FORTH W., SNAPE S., SIMPSON R.J. & PETERS T.J. (1986) Biochem. Soc. Trans., 14, 118
- OSTERLOH K.R.S., SIMPSON R.J. & PETERS T.J. (1987) Br. J. Haematol., 65, 1-3
- PARMLEY R.T., BARTON J.C. & CONRAD M.E. (1978) Am. J. Pathol., 93, 707
- PARMLEY R.T., BARTON J.C. & CONRAD M.E. (1984) J. Histochem. Cytochem., 32, 724
- PARMLEY R.T., BARTON J.C. & CONRAD M.E. (1985) Br. J. Haematol., 60, 81-89
- PASTAN I. & WILLINGHAM M.C. (1981) Science, 214, 504-509
- PEKARKER R.S., BOSTIAN K.A., BARTELONY P.J., CALIA F.M. & BEISEL W.R. (1969) Am. J. Med. Sci., 258, 14-25
- PENTECOST B.T. & TENG C.T. (1987) J. Biol. Chem., 262, 10134-10139
- PERERA D.E., WEISTNEIN W.M. & RUBIN C.E. (1975) Hum. Pathol., 6, 157-217
- PERRAUDIN J.P. & PRIEELS J.P. (1982) Biochim. Biophys. Acta, 718, 42-48
- PETERS T., APT L. & ROSS J.F. (1971) Gastroenterology, 61, 315
- PETERSON G.L. (1977) Anal. Biochem., 83, 346-356
- PIRZIO-BIRIOLI G., BOTHWELL T.H. & FINCH C.A. (1958) J. Lab. Clin. Med., 51, 37

- PIRZIO-BIROLI G. & FINCH C.A. (1960) J. Lab. Clin. Med., 55, 216
- PLUMMER T.H., ELDER J.H., ALEXANDER S., PHELAN A.W. & TARENTINO A.L. (1984) J. Biol. Chem., 259, 10700-10704
- POLLACK S., BALCERZAK S.P. & CROSBY W.H. (1963) Blood, 21, 33-38
- POLLACK S. & LASKY F.D. (1976) J. Lab. Clin. Med., 87, 670
- QUARONI A., KIRSCH K. & WEISER M.W. (1979) Biochem. J., 182, 203-212
- RAJA K.B., SIMPSON R.J. & PETERS T.J. (1987) Biochim. Biophys. Acta, 923, 45-51
- REFSUM S.B. & SCHREINER (1980) Scand. J. Gastroenterol., 15, 1013-1020
- REGOECZI E. (1984) in "Pathophysiology of Plasma Protein Metabolism" (Mariani ed.), pp. 373-394, MacMillan, London
- REITER B., BROCK J.H. & STEEL E.D. (1975) Immunology, 28, 83-95
- RHODES R.S. & KARNOVSKY M.J. (1971) Lab. Invest., 25, 220-229
- RICHMOND V.S., WORWOOD M. & JACOBS A. (1972) Br. J. Haematol., 23, 650
- ROGERS H.J. & SYNGE C. (1978) Immunology, 34, 19-28
- ROTHENDERGER S., IACOPETTA, B.J. & KÜHN L.C. (1987) Cell, 49, 423-431
- RÜMKE P., VISSER D., KWA H.G. & HART A.A.M. (1971) Folia. Med. Neerl., 14, 156
- SAARINEN U.M., SIIMES M.A. & DALLMAN P.R. (1977) J. Pediatr., 91, 36-39
- SANDSTRÖM (1971) Cytobiologie, 3, 293-297
- SAVIN M.A. & COOK J.D. (1978) Gastroenterology, 75, 688-694
- SAWATZKI G., ANSELSTETTER V. & KUBANEK B. (1981) Biochim Biophys. Acta, 667, 132-138
- SAWATZKI G. & KUBANEK B. (1983) in "Structure and Function of Iron Storage and Transport Proteins" (Urushizaki I., Aisen P., Listowsky I. & Drysdale J.W., eds.), pp. 441-443, Elsevier, Amsterdam
- SCATCHARD G. (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci., 51, 660-672
- SCHACHTER D. & SCHINITZKY M. (1977) Gastroenterology, 59, 536-548
- SCHADE S.G., FELSHER B.F. & CONRAD M.E. (1969) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 130, 757
- SCHÜMMANN K., SCHÄFER S.G. & FORTH W. (1986) Res. Exp. Med. (Berl.), 186, 215
- SELIGMAN P.A. (1983) Progr. Haematol., 13, 131

- SHADDUCK R.K., PIGOLI G., WAHEED A. & BOEGEC F. (1980) J. Supramol. Struct., 14, 423-429
- SHEEHAN R.G. & FRENKEL E.P. (1972) J. Clin. Invest., 51, 224-231
- SHEPHARD E.G., De BEER F.C., Von HOLT C. & HAPGOOD J.P. (1988) Anal. Biochem., 168, 306-313
- SHEPHERD V.L., LEE Y.C., SCHLESINGER P.H. & STAHL P. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78, 1019-1022
- SHNEIDER G., SUTHERLAND R., NEWMAN R. & GREAVES M. (1982) J. Biol. Chem., 257, 8516-8522
- SHNEIDER G., OWEN M.J., BANVILL D. & WILLIAMS J.G. (1984) Nature, 311, 675-678
- SIMPSON R.J. & PETERS T.J. (1983) Biochim. Biophys. Acta, 772, 220-226
- SIMPSON R.J., WEIR M.P., GIBSON J.F. & PETERS T.J. (1984) Biochem. Soc. Trans., 12, 859
- SIMPSON R.J., RAJA K.B. & PETERS T.J. (1985) Biochim. Biophys. Acta, 814, 8-12
- SIMPSON R.J. & PETERS T.J. (1986) Biochim. Biophys. Acta, 856, 115-122
- SIMPSON R.J., OSTERLOH K.R.S., RAJA K.B., SNAPE S.D. & PETERS T.J. (1986) Biochim. Biophys. Acta, 884, 166-171
- SIMPSON R.J., RAJA K.B. & PETERS T.J. (1986) Biochim. Biophys. Acta, 860, 229-235
- SMITH M.D. & PANNACCIULLI I.M. (1958) Br. J. Haematol., 4, 428
- SORENSEN P., FZRBBER N.M. & KRYSTAL G. (1986) J. Biol. Chem., 261, 9094-9097
- SPIK G. & MONTREUIL J. (1966) C. R. Soc. Biol., 160, 94-98
- SPIK G., CHERON A., MONTREUIL J. & DOLBY J.M. (1978) Immunology, 35, 663-671
- SPIK G., VANDERSYPPE R., FOURNET B., BAYARD P. & BOUQUELET S. (1974) Acta Coll. Intern., 221, 483-500
- SPIK G., VANDERSYPPE R., MONTREUIL J., TETAERT D; & HAN K.K. (1974) FEBS Lett., 38, 213-216
- SPIK G. (1981) In: Alimentation du Nourrisson (Blanc B. ed.), pp. 315-347, Liebefeld, Berne,
- SPIK G., BRUNET B., MAZURIER-DEHAINE C., FONTAINE G; & MONTREUIL J. (1982a) Acta Pediatr. Scand., 71, 979-982

- SPIK G., STRECKER G., FOURNET B., BOUQUELET S., MONTREUIL J., DORLAND L., VAN HALBEEK & VLIEGENTHART J.F.G. (1982b) Eur. J. Biochem., 121, 413-419
- SPIK G. & MONTREUIL J. (1983) Bull. Europ. Physiopath. Resp., 19, 123-130
- SPIK G. (1988) Cah. Nutr. Diét., XXIII, 2, 121-125
- STEPHENS S., DOLBY J., MONTREUIL J. & SPIK G. (1980) Immunology, 41, 597-603
- STRAHM H.W. (1965) Lancet, 2, 1096
- SULLIVAN R., GANS P.J. & MacCARROLL L.A. (1983) J. Immunol., 130, 800-807
- SUTTON B.J. & PHILLIPS D.C. (1983) Biochem. Soc. Trans., 11, 130-132
- TARENTINO A.L., GOMEZ C.M. & PLUMMER T.H. (1985) Biochem. J., 24, 4665-4671
- TEDESCHI A., TUCCARI G., MAGAZZU G., ARENA F., RICCIARDI R. & BARRESI G. (1987) J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 6, 328-334
- TENG C.T., WALKER M.P., BHATTACHARYYA S.N., KLAPPER D.G., DIAUGUSTINE R.P. & McLACHLAN J.A. (1986) Biochem. J., 240, 413-422
- TERENT A., HALL R., GREN R., VENGE P. & BERGSTROM K. (1981) Stroke, 12, 40
- TOMSON A.B.R., SHAVER C., LEE D.J., JONES B.L. & VALBERG L.S. (1971) Am. J. Pathol., 220, 674-678
- TONZ O., WEISS S. & STRAHM H.W. (1965) Lancet, 2, 1096
- TOWBIN H., STAHELIN T. & GORDON J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350-4354
- TRIER J.S. (1977) Viewpoint in Digestive Diseases, 9, 1-4
- TRIMBLE R.B. & MALEY F. (1984) Anal. Biochem., 141, 515-522
- TURNBULL A. (1974) in "Iron in Biochemistry and Medicine" Eds. A. Jacobs & M. Worwood. Academic Press, London, pp 369-403
- VAITUKAITIS J., BOBBINS J.B., NIESCHLAG E. & ROSS G.T. (1971) J. Clin. Endocrinol., 33, 988-991
- Van COMPEN D. (1974) Fed. Proc., 33, 100
- Van der HEUL C., KROSS M.J. & Van EIJK H.G. (1978) Biochim. Biophys. Acta, 511, 430
- Van DIJK J.P., Van KREEL B.K. & HEEREN J.W. (1983) J. Dev. Physiol., 5, 195

- Van HALBEEK H., DORLAND L., Vliegenthart J.F.G., SPIK G., CHERON A. & MONTREUIL J. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, 675, 293-296
- Van SNICK J.L., MARKOWETZ B & MASSON P.L. (1977) *J. Exp. Med.*, 146, 817-827
- Van VUGT H., Van GOOL J., LADIGES N.C.J.J. & BOERS W. (1975) *Q. J. Exp. Physiol.*, 60, 79-88
- WADA H.G., HASS P.E. & SUSSMAN H.H. (1979a) *J. Biol. Chem.*, 254, 12629-12635
- WADA H.G., HASS P.E. & SUSSMAN H.H. (1979b) *J. Supramol. Struct.*, 10, 12629-12635
- WARIN V., BAERT F., FOURET R., STRECKER G, SPIK G., FOURNET B. & MONTREUIL J. (1979) *Carbohydr. Res.*, 76, 11-22
- WALLACE K.H. & REES A.R. (1980) *Biochem. J.*, 188, 9-16
- WASSERMAN R.H. (1962) *J. Nutr.*, 77, 69
- WASSERMAN R.H. & TAYLOR A.N. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 3987
- WEINBERG E.D. (1974) *Science*, 152, 172-181
- WEINBERG E.D. (1978) *Microbiol. Rev.*, 42, 45-66
- WEINSTEIN W.M. (1974) *Med. Clin. N. Am.*, 58, 1375, 1382
- WEINTRAUB L.R., CONRAD M.E. & CROSBY W.H. (1964) *Blood*, 24, 19-24
- WEINTRAUB L.R., CONRAD M.E. & CROSBY W.H. (1965) *Br. J. Haematol.*, 2, 432
- WHEBY M.S. & JONES L.R. (1963) *J. Clin. Invest.*, 42, 1007-1016
- WHEBY M.S., JONES L.G. & CROSBY W.H. (1964) *J. Clin. Invest.*, 43, 1433
- WHEBY M.S. (1966) *Gastroenterology*, 50, 888-892
- WIDDOWSON E.M., COLOMBO V.C. & ARTAVANIS C.A. (1976) *Biol. Neonate.*, 28, 272-281
- WIDDOWSON E.M. (1985) *Am. J. Clin. Nutr.*, 41, 384-390
- WILLIAMS J., ELLEMAN T.C., KINGSTON J.B., WILKINS A.G. & KUHN K.A. (1982) *Eur. J. Biochem.*, 122, 297-303
- WILLIAMSON R.C.N. (1978) *N. engl. J. Med.*, 298, 1393-1402
- WILSON T.H. (1962) in "Iron Absorption" W.B. Saunders Co., Philadelphia
- WINTERBOURN C.C. (1983) *Biochem. J.*, 210, 15-19
- WOLLENWEBER H. & MORRISON D.C. (1986) *J. Biol. Chem.*, 260, 15068-15075

WORWOOD M., EDWARDS A. & JACOBS A. (1971) *Nature*, 229, 409

WORWOOD M. (1977) in "Iron Excess" (MULLER-EBERHARD U., MIESCHER P.A. & JAFFE E.R. eds.), pp. 3-30, Grune & Stratton Inc., New York

WYLLIE J.L. & KAUFMAN N. (1971) *Brit. J. Haematol.*, 20, 312-327

YOSHINO Y. & MANIS J (1973) *Am. J. Physiol.*, 225, G1276-G1281

YOSHINO Y., HISAYAU S., ORIMO M. & HIRAI Y. (1983) in *Structure and Function of Iron Storage and Transport Proteins* (Urushizaki I., Aisen P., Listowsky I. & Drysdale J.W., eds.), pp. 419-422, Elsevier, Amsterdam

ZUCALI J.R., BROXMEYER H.E. & ULATOWSKY J.A. (1979) *Blood*, 54, 951-954

RESUME

Le rôle de la lactotransferrine (LTF) dans le mécanisme de l'absorption intestinale du fer étant encore controversé, notre travail a porté sur la mise en évidence, l'isolement et l'étude des propriétés d'un récepteur de la bordure en brosse des entérocytes de Souris. Les résultats que nous avons obtenus sont les suivants :

1) La LTF marquée à l' ^{125}I se fixe sur les vésicules de la bordure en brosse des entérocytes de Souris d'une manière spécifique, réversible, saturable avec une constante d'association de $3.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, suggérant la présence d'un récepteur.

2) La séparation des protéines membranaires par électrophorèse dans un système non dénaturant suivie de l'électrotransfert a permis de mettre en évidence une protéine de 130 kDa réagissant avec de la ^{125}I -LTF de Souris.

3) La LTF de Souris a été couplée à l'aide d'un nouveau type de réactif bifonctionnel, le SASD, à son récepteur en donnant un complexe d'environ 200 kDa, suggérant que le récepteur entérocytaire fixe une seule molécule de LTF.

4) L'isolement du récepteur a été réalisé par chromatographie d'affinité sur colonne de LTF humaine immobilisée. Le récepteur isolé à l'état pur est une glycoprotéine, monocaténaire d'environ 130 kDa, de pI 5,8, renfermant des glycanes de type N-acétyllactosaminique.

L'ensemble des résultats obtenus est en faveur de l'intervention de la LTF dans l'absorption intestinale du fer par un mécanisme faisant intervenir un récepteur membranaire de la bordure en brosse des entérocytes.