

N° d'ordre 659

50376
1990
333

50376
1990
333

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

pour l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

spécialité : BIOCHIMIE

par



PIERRE DERISBOURG

**ETUDE DES RECEPTEURS
ENTEROCYTAIRES DE LA
LACTOTRANSFERRINE HUMAINE**

- 1 - CARACTERISATION DES RECEPTEURS DES CELLULES
ENTEROCYTAIRES HUMAINES HT 29
- 2 - ETUDE DU MECANISME D'ENDOCYTOSE DE LA
LACTOTRANSFERRINE



030 030421 4

Soutenue le 11 Décembre 1990 devant la Commission d'examen:

Président:	Professeur J. MONTREUIL
Rapporteurs:	Docteur G. TRUGNAN Professeur A. VERBERT
Examineurs:	Docteur M. HEYMAN Professeur G.SPIK

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus depuis notre arrivée au Laboratoire a fait l'objet des communications et publications suivantes.

Communication

Comparaison de la répartition des récepteurs de la sérotransferrine et de la lactotransferrine des cellules HT 29 différenciées et non différenciées.

XVII^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs de la Société de Chimie Biologique, Villeneuve d'Ascq, juillet 1990

Publications

1 - *Determination of glycans isolated from human leucocyte lactotransferrin. Absence of fucose residue questions the proposed mechanism for hyposideremia.*

P. DERISBOURG, J.M. WIERUSZESKI, J. MONTREUIL & G. SPIK (1990)
Biochem. J. 269, 821-825.

2 - *Presence of specific receptors for lactotransferrin on HT 29 cells is an early marker of enterocytic differentiation.*

P. DERISBOURG, J. MONTREUIL & G. SPIK
Eur. J. Biochem. (soumis à publication)

Avec ce travail, je dois exprimer mes remerciements à :

Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL,

Vous m'avez accepté au laboratoire. Merci.

Mademoiselle le Professeur Geneviève SPIK,

Vous m'avez accepté dans votre groupe. Merci.

Monsieur le Professeur André VERBERT,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et d'avoir dû lire ce "pavé" dans un si court laps de temps. Veuillez trouver ici l'expression sincère de ma plus vive gratitude et de mes sentiments très respectueux.

Madame le Docteur Martine HEYMAN,

Lors du court stage que j'ai effectué dans votre Laboratoire, j'ai eu le temps d'apprécier votre réelle compétence et votre expérience. Je vous remercie d'avoir bien voulu juger ce travail.

Monsieur le Docteur Germain TRUGNAN,

Vous m'avez fourni les cellules et appris à les cultiver, ce travail a pu ainsi être réalisé. Soyez-en remercié. Merci d'être venu à Lille juger ce travail.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

8

GENERALITES

<p style="text-align: center;">CHAPITRE I GENERALITES SUR LES TRANSFERRINES</p>

I - INTRODUCTION	10
II - STRUCTURE ET CONFORMATION DES TRANSFERRINES	
A - ETUDE DE LA PARTIE PROTEIQUE	
B - SITES DE FIXATION DU FER	11
C - ETUDE DE LA PARTIE GLYCANNIQUE	13
III - ROLES BIOLOGIQUES DES TRANSFERRINES	14
A - ROLES DE LA LACTOTRANSFERRINE	
B - ROLES DE LA SEROTRANSFERRINE	16
C - RECEPTEURS DES TRANSFERRINES	17

<p style="text-align: center;">CHAPITRE II ROLE DES TRANSFERRINES DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER</p>
--

I - INTRODUCTION	19
II - ABSORPTION DU FER INORGANIQUE	20
III - ROLE DE LA SEROTRANSFERRINE DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER	21

	PAGES
A - ARGUMENTS EN FAVEUR DU ROLE DE LA SERO TRANSFERRINE AU NIVEAU MUCOSAL DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER	21
B - ARGUMENTS EN DEFAVEUR DU ROLE DE LA SERO TRANSFERRINE AU NIVEAU MUCOSAL DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER	22
C - CONCLUSION	23
 IV - ROLE DE LA LACTO TRANSFERRINE DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER	
A - ARGUMENTS EN DEFAVEUR D'UNE INTERVENTION DE LA LACTO TRANSFERRINE DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER	24
B - ARGUMENTS EN FAVEUR D'UNE INTERVENTION DE LA LACTO TRANSFERRINE DANS L'ABSORPTION DU FER PAR L'ENTEROCYTE	25
C - CONCLUSION	33
<p>CHAPITRE III LES CELLULES HT 29 : UN MODELE POUR L'ETUDE DU ROLE DES TRANSFERRINES DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER</p>	
I - INTRODUCTION	35
II - CELLULES HT 29 NON DIFFERENCIEES CULTIVEES DANS UN MILIEU CONTENANT DU GLUCOSE	36
A - METABOLISME GLUCIDIQUE DES CELLULES HT 29 NON DIFFERENCIEES	
B - PRINCIPAUX RECEPTEURS ETUDIES SUR LES CELLULES HT 29 NON DIFFERENCIEES	38
III -DIFFERENCIATION DES CELLULES HT 29 CULTIVEES DANS UN MILIEU SANS GLUCOSE	39
A - CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DE LA DIFFERENCIATION	
B - METABOLISME GLUCIDIQUE DES CELLULES HT 29 DIFFERENCIEES	42

	PAGES
IV - AUTRES MODIFICATIONS DU MILIEU DE CULTURE	43
V - CLONAGE DES CELLULES HT 29	44
VI - CONCLUSION	45

CHAPITRE IV GENERALITES SUR L'ENDOCYTOSE

I - INTRODUCTION	47
II - STRUCTURES CELLULAIRES IMPLIQUEES DANS L'ENDOCYTOSE	49
A - LE PUIITS RECOUVERT ET LA VESICULE RECOUVERTE	
B - L'ENDOSOME	
III - MECANISMES DE L'ENDOCYTOSE	50
A - FIXATION SUR LE RECEPTEUR	
B - FORMATION DU PUIITS RECOUVERT	
C - FORMATION DE L'ENDOSOME	53
D - DEVENIR DES COMPLEXES ENDOCYTES	
IV - CONCLUSION	61

	PAGES
RESULTATS PERSONNELS	
I - INTRODUCTION	62
II MATERIELS ET METHODES	63
A - MATERIEL CELLULAIRE	
B - PREPARATION DES TRANSFERRINES	67
C - INTERACTION DES TRANSFERRINES AVEC LES CELLULES HT 29	69
D - ETUDE DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE ET DE LA SEROTRANSFERRINE SUR LES EXTRAITS CELLULAIRES SOLUBILISES ET DEPOSES SUR MEMBRANE DE NITROCELLULOSE.	72
E - ETUDE CINETIQUE DE L'INTERNALISATION	74
F - ETUDE DE LA LOCALISATION CELLULAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE INTERNALISEE	75
G - ETUDE DE LA DEGRADATION DE LA LACTOTRANSFERRINE APRES INTERNALISATION	77
H - EFFETS DES INHIBITEURS SUR L'INTERNALISATION DE LA LACTOTRANSFERRINE	78
III RESULTATS	81
1 ère PARTIE : ETUDE DES RECEPTEURS DE LA LACTOTRANSFERRINE ET DE LA SEROTRANSFERRINE DES CELLULES HT 29 DIFFERENCIEES ET NON DIFFERENCIEES	
A - COMPARAISON DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERINE ET DE LA SEROTRANSFERRINE NON SATUREES EN FER SUR LES CELLULES HT 29 DIFFERENCIEES ET NON DIFFERENCIEES	
B - EVOLUTION DES CONSTANTES DE FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE EN FONCTION DE LA DIFFERENCIATION DES CELLULES HT 29 Glc(-)	93
C - ETUDE COMPAREE DE LA FIXATION DES FORMES SATUREES EN FER ET NON SATUREES DES TRANSFERRINES SUR LES CELLULES HT 29	99
D - FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LES EXTRAITS CELLULAIRES SOLUBILISES	104
E - FIXATION DE LA SEROTRANSFERRINE SUR LES EXTRAITS CELLULAIRES SOLUBILISES	113

	PAGES
2 ^{ème} PARTIE : MISE EN EVIDENCE DE L'ENDOCYTOSE DE LA LACTOTRANSFERRINE PAR LES CELLULES HT 29 Glc(-) DIFFERENCIEES EN ENTEROCYTES	
A - ETUDE CINETIQUE DE L'INCORPORATION DE LA LACTOTRANSFERRINE PAR LES CELLULES HT 29 GLC (-) DIFFERENCIEES	120
B - ETUDE DE LA LOCALISATION CELLULAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE INTERNALISEE	127
C - ETUDE DE LA DEGRADATION DE LA LACTOTRANSFERRINE INTERNALISEE	134
D - EFFETS DES INHIBITEURS SUR L'INTERNALISATION DE LA LACTOTRANSFERRINE	141
E - ETUDE DES EFFETS DE LA COLCHICINE, DU CCC ET DE LA MONENSINE SUR LA DEGRADATION DE LA LACTOTRANSFERRINE INTERNALISEE PAR LES CELLULES HT 29 Glc(-) DIFFERENCIEES	153
F - ETUDE DE L'INFLUENCE DES INHIBITEURS SUR LA LOCALISATION DE LA LACTOTRANSFERRINE INTERNALISEE PAR LES CELLULES HT 29 Glc(-)	156
IV CONCLUSION ET DISCUSSION	158
CONCLUSION	171
BIBLIOGRAPHIE	174

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La découverte de la lactotransferrine humaine dans le lait de Femme (MONTREUIL & MULLET, 1960; MONTREUIL *et al.*, 1960), a ouvert la voie au Laboratoire à toute une série de recherches structurales sur les fractions glycaniques et protéiques de différentes transferrines, sur les rôles biologiques de la lactotransferrine, sur les interactions de cette protéine avec différentes cellules et enfin sur l'étude des récepteurs de la lactotransferrine.

Parmi les rôles biologiques de la lactotransferrine, son rôle éventuel dans les mécanismes d'absorption intestinale du fer a fait l'objet d'une attention soutenue, depuis la première hypothèse, émise par MONTREUIL en 1960.

Les travaux préliminaires réalisés sur des biopsies intestinales humaines ont montré que la lactotransferrine était capable de céder son fer alors que la sérotransferrine ne le pouvait pas (COX *et al.*, 1979). Puis, SPIK *et al.* en 1982 ont montré la présence de lactotransferrine partiellement dégradée dans les fécès de nourrisson. Ce n'est qu'en 1985 qu'un récepteur de la lactotransferrine humaine a pu être mis en évidence par électrotransfert dans la bordure en brosse d'entérocytes de Lapin. Ce sont les travaux de HU *et al.* (1988, 1990) qui ont permis de véritablement caractériser la présence d'un récepteur de la lactotransferrine dans la bordure en brosse d'entérocytes de Souris. Ces auteurs ont isolé le récepteur, en ont présenté les principales caractéristiques physico-chimiques et structurales.

Nos travaux s'inscrivent donc dans la thématique du Laboratoire: "Relations structure-fonction des transferrines" et font suite à ceux de

HU *et al.* (1988, 1990). Les cellules HT 29, qui développent en culture une différenciation de type entérocytaire vont nous permettre d'avancer dans la compréhension du mécanisme de l'intervention de la lactotransferrine dans la nutrition martiale. Ces cellules étant d'origine humaine, l'étude pourra être effectuée dans un système homologue avec de la lactotransferrine humaine.

Nous avons dans un premier temps étudié la fixation de la lactotransferrine et de la sérotransferrine sur les cellules HT 29 différenciées en entérocytes puis comparé les résultats avec ceux obtenus sur les cellules indifférenciées.

La fixation des deux transferrines a également été étudiée sur les différentes fractions subcellulaires préparées à partir des cellules HT 29. La variation de la fixation des protéines a été analysée en fonction de l'âge et de la différenciation cellulaire.

Le modèle utilisé a permis d'autre part d'étudier les mécanismes d'internalisation de la lactotransferrine, travaux qui ne pouvaient être réalisés sur des vésicules préparées à partir de bordure en brosse ou sur des biopsies intestinales.

Nos résultats laissent donc présager que la lactotransferrine, qui est reconnue par des récepteurs spécifiques à la surface de la bordure en brosse des entérocytes et qui est internalisée par ces cellules, pourrait jouer un rôle important dans l'absorption intestinale du fer. Pour confirmer le rôle de la lactotransferrine, sur la base des résultats que nous avons obtenus, des études sur le transfert du fer à partir de la lactotransferrine peuvent être maintenant envisagées.

GENERALITES

GENERALITES

1°- LES TRANSFERRINES

I - INTRODUCTION

Chez les mammifères, le transport du fer est assuré par des protéines spécialisées dans cette fonction : les transferrines. Ces dernières sont dénommées en fonction de la localisation où elles ont été mises en évidence pour la première fois : l'ovotransferrine, découverte dans le blanc d'oeuf (SCHADE & CAROLINE, 1940), la sérotransferrine, protéine sérique circulante (SCHADE & CAROLINE, 1944), la mélanotransferrine, isolée de mélanomes humains (BROWN *et al.*, 1985) et la lactotransferrine, découverte dans le lait (MONTREUIL & MULLET, 1960; MONTREUIL *et al.*, 1960). Nous étudierons dans ce chapitre, la structure de ces deux glycoprotéines ainsi que leurs principaux rôles biologiques.

II - STRUCTURE ET CONFORMATION DES TRANSFERRINES

A - ETUDE DE LA PARTIE PROTEIQUE DES TRANSFERRINES

La séquence primaire de la lactotransferrine humaine a été déterminée au Laboratoire en collaboration avec le groupe du Professeur P. JOLLES (MAZURIER *et al.*, 1983 ; METZ-BOUTIGUE *et al.*, 1984). La chaîne peptidique de la lactotransferrine comporte 691 acides animés (ANDERSON *et al.*, 1989).

La séquence primaire de la sérotransferrine humaine a été réalisée par MAC GILLIVRAY *et al.* (1982, 1983). Cette structure a été confirmée par les études de séquençage du cDNA du foie humain, codant pour la sérotransferrine humaine, et isolé par UZAN *et al.* (1984) et YANG *et al.*

(1984). La sérotransferrine est constituée d'une seule chaîne peptidique comportant 679 résidus d'acides aminés.

Les deux glycoprotéines ont des masses moléculaires de l'ordre de 80 kDa et présentent un taux de 59 % d'homologie entre leurs chaînes peptidiques respectives (METZ-BOUTIGUE *et al.*, 1984).

La lactotransferrine (MAZURIER *et al.*, 1983; LEGRAND *et al.*, 1984), tout comme la sérotransferrine (MAC GILLIVRAY *et al.*, 1982, 1983), est organisée en deux lobes similaires. La diffraction aux rayons X à 3,2 puis à 2,8 Å, après cristallisation de la lactotransferrine humaine saturée en fer (ANDERSON *et al.*, 1987, 1989), a confirmé l'existence d'une structure bilobée et a montré que le lobe N-terminal comprend les acides aminés 1 à 332 et le lobe C-terminal les acides aminés 344 à 691. 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. 1).

B - SITES DE FIXATION DU FER

Les transferrines fixent réversiblement 2 atomes de fer avec apparition d'une coloration rose saumon dont le maximum d'absorption se situe à 465 nm. Les deux sites de fixation du fer peuvent être différenciés en un site acido-labile situé dans le lobe N-terminal et un site acido-stable, dans le lobe C-terminal (MAZURIER & SPIK, 1980).

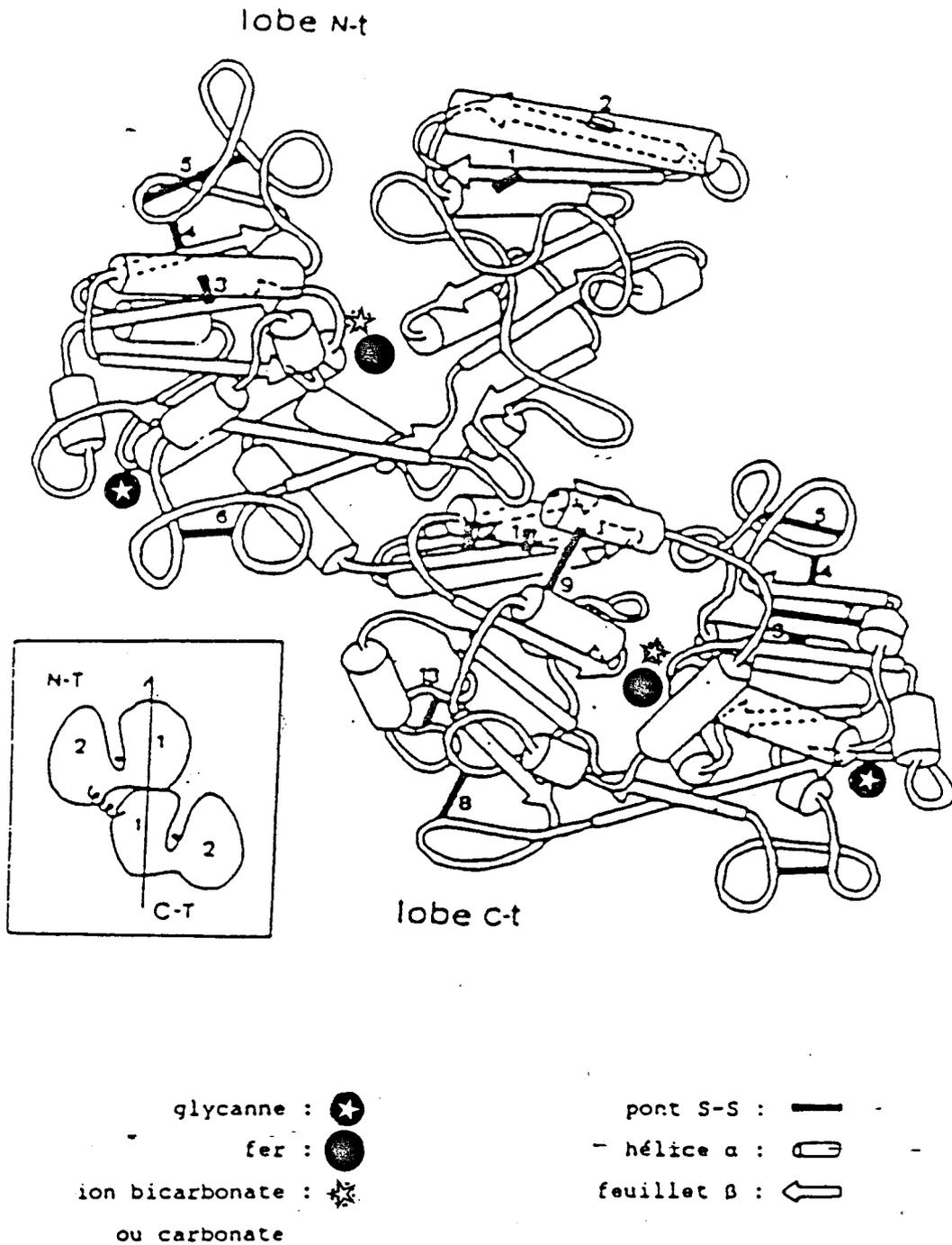


Fig. 1 : Représentation schématique de la molécule de lactotransferrine humaine (ANDERSON et al., 1987)

La structure tridimensionnelle de cristaux de lactotransferrine humaine, déterminée par diffraction des rayons X à 3,2 Å (ANDERSON *et al.*, 1987) a permis de déterminer que les sites de fixation du fer sont positionnés de façon similaire entre les deux domaines de chaque lobe. Les études de diffraction aux rayons X de la lactotransferrine à une résolution de 2,8 Å ont récemment confirmé que les deux sites sont identiques. La fixation de chaque ion ferrique est associée à celle d'un ion bicarbonate ou carbonate lié électrostatiquement au fer et à 4 acides aminés : 2 tyrosines, 1 acide aspartique et 1 histidine (ANDERSON *et al.*, 1989). Ces auteurs ont montré que les sites de fixation du fer étaient situés à la limite des deux domaines dans chaque lobe.

C - ETUDE DE LA PARTIE GLYCANNIQUE

1 - Glycannes de la lactotransferrine

La nature glycoprotéique de la lactotransferrine humaine a été démontrée par MONTREUIL & MULLET (1960). Des glycopeptides porteurs de structures glycaniques disialylées ainsi que des structures monosialylées renfermant un ou deux résidus de fucose liés en α -1,6 ou en α -1,3 ont été caractérisés (SPIK *et al.*, 1982). D'autres structures plus complexes ont été trouvées en très faible quantité (MATSUMOTO *et al.*, 1982).

2 - Glycannes de la sérotransferrine

La sérotransferrine humaine est également une glycoprotéine qui

porte deux glycanes qui lui sont associés par une liaison de type N-(β -aspartyl)-N-acétyl glucosaminique (SPIK *et al.*, 1965a, 1965b, 1969 ; SPIK 1968).

La séquence primaire de ces glycanes a été entreprise par MONTREUIL *et al.* en 1962. La structure du glycanne biantenné a été établie par SPIK *et al.* (1974a, 1974b, 1975) par des méthodes chimiques puis confirmée par l'analyse des spectres de résonance magnétique nucléaire à 360 MHz par DORLAND *et al.* en 1977. La structure complète des glycanes triantennés a été déterminée chimiquement au Laboratoire par DEBRUYNE *et al.* (1984) et confirmée par RMN à 500 MHz par SPIK *et al.* (1985). La présence d'un glycanne de structure tétraantennnée a été envisagée (MÄRZ *et al.*, 1982 ; SPIK *et al.*, 1985).

III - ROLES DES TRANSFERRINES

A - ROLES DE LA LACTOTRANSFERRINE

Par un mécanisme de ferriprivation, la lactotransferrine exerce une activité inhibitrice de la croissance de nombreux micro-organismes (MASSON & HEREMANS, 1966; SPIK *et al.*, 1978; BULLEN *et al.*, 1980; STEPHENS *et al.*, 1980). Une étude détaillée de l'activité antibactérienne de la lactotransferrine a été réalisée dans la revue générale de SPIK & MONTREUIL (1983).

Des 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 était allaité (BERSETH *et al.*, 1983; HEIRD *et al.*, 1984; WIDDOWSON, 1985). L'activité facteur de croissance a été étudiée par NICHOLS *et al.* (1987) qui ont montré que la lactotransferrine augmentait de 30 % l'incorporation de thymidine dans

l'ADN des cellules de crypte de l'intestin de Rat, suggérant ainsi qu'elle jouait un rôle dans la maturation du tractus gastro-intestinal. Dans le même ordre d'idée, des études récentes réalisées avec les cellules HT 29 indifférenciées, ont montré que la lactotransferrine jouait le rôle de facteur de croissance pour ces cellules intestinales en culture (AMOURIC *et al.*, 1984). Le même groupe a montré que la lactotransferrine fixée par ces cellules indifférenciées n'était pas internalisée (ROIRON *et al.*, 1989; ROIRON & FIGARELLA, 1990).

La lactotransferrine a également été proposée comme étant un facteur de croissance sur les lignées de lymphocytes B et T humains (HASHIZUME *et al.*, 1983). MAZURIER *et al.* (1989) ont montré que la lactotransferrine humaine exerçait une activité facteur de croissance pour les lymphocytes humains stimulés par une lectine : la phytohémagglutinine, cette stimulation se ferait par l'intermédiaire de récepteurs qui ont été caractérisés.

Lors d'une inflammation, le taux de fer dans le sang baisse brutalement (WEINBERG, 1974), tandis que l'absorption intestinale du fer diminue (BERESFORD *et al.*, 1971) au profit d'une augmentation du fer de réserve dans la ferritine hépatique et macrophagique. L'ensemble de ces phénomènes diminue par ferriprivation la croissance des bactéries. 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 macrophages (VAN SNICK *et al.*, 1974, 1976) serait en faveur de ce mécanisme. Au Laboratoire, GOAVEC *et al.* (1985) ont montré que la lactotransferrine de lait se fixait sur les macrophages via une lectine membranaire à fucose. Cependant, la lactotransferrine leucocytaire humaine ne possède pas de fucose lié en α -1,3 sur le résidu N-acétylglucosaminique 5' (DERISBOURG *et al.*, 1990). En outre, LECLERCQ

(1987) a montré que la partie protéique de la lactotransferrine est impliquée dans la fixation sur les macrophages.

B - ROLE DE LA SÉROTRANSFERRINE DANS LE MÉTABOLISME DU FER

La sérotransferrine est au centre du métabolisme du fer. Son rôle a fait l'objet de plusieurs revues générales : LANE (1976), AISEN & BROWN (1977) et BROCK (1985).

La sérotransferrine 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 du système réticulo-endothéliales), le transporte et le délivre aux sites d'utilisation : moëlle osseuse, placenta et autres cellules. Les globules rouges, au terme de leur vie, sont phagocytés par les macrophages qui catabolisent l'hémoglobine. Le fer libéré est alors capté par la sérotransferrine et peut être réutilisé immédiatement ou stocké au niveau de la ferritine des cellules du système réticulo-endothélial ou des cellules parenchymateuses du foie.

L'activité bactériostatique de la sérotransferrine a été mise en évidence "*in vitro*" (SCHADE & CAROLINE 1944, 1946). En complexant le fer, la sérotransferrine empêche la multiplication d'agents infectieux pour lesquels ce métal est indispensable.

Selon VAN SNICK *et al.* (1974, 1976 & 1977), la lactotransferrine libérée sous forme non saturée en fer, capterait le fer de la sérotransferrine et le délivrerait au niveau du macrophage où le fer serait stocké sous forme de ferritine. La sérotransferrine sans fer pourrait priver la bactérie de métal et empêcher ainsi sa croissance.

C - RECEPTEURS DES TRANSFERRINES

Le rôle de l'apport du fer de la sérotransferrine et de la lactotransferrine aux cellules s'effectue grâce à l'intermédiaire de récepteurs membranaires. Celui de la sérotransferrine est à présent bien connu, alors que quelques études seulement ont été consacrées au récepteur de la lactotransferrine.

1 - RECEPTEUR DE LA SEROTRANSFERRINE

Le récepteur de la sérotransferrine a fait l'objet de nombreuses études tant au plan structural qu'au plan fonctionnel (BOMFORD & MUNRO, 1985; HUEBERS & FINCH, 1985, 1987; REGOECZI, 1987; WARD, 1987).

a - Structure et propriétés du récepteur de la sérotransferrine

Le récepteur de la sérotransferrine est une glycoprotéine de 180 kDa, composé de 2 sous-unités de 90 kDa pouvant fixer chacune une molécule de sérotransferrine (WADA *et al.*, 1979; SCHNEIDER *et al.*, 1982) et réunies entre elles par un pont disulfure. Amphiphile, il possède deux régions hydrophiles de part et d'autre de la membrane et une région hydrophobe permettant son ancrage dans la membrane. Le traitement par la trypsine libère deux fragments de 70 kDa capables de fixer la sérotransferrine. La partie hydrophobe de chaque sous-unité possède un résidu d'acide palmitique (OMARY & TROWBRIDGE, 1981). Le récepteur est phosphorylé (ROTHENBERGER *et al.*, 1987). Sa séquence peptidique a été déduite de la séquence de son mRNA (SCHNEIDER *et al.*, 1984) et de son cDNA (MAC LELLAND *et al.*, 1984). Chaque sous-unité polypeptidique est composée de 760 acides aminés.

b - Localisation du récepteur de la sérotransferrine.

L'hypothèse de l'universalité du récepteur de la sérotransferrine a été émise par HAMILTON *et al.* (1979) et WADA *et al.* (1979) qui, par l'utilisation d'anticorps dirigés contre le récepteur placentaire de la sérotransferrine, ont caractérisé le récepteur sur différentes lignées cellulaires humaines. NEWMAN *et al.* (1982) ont isolé un seul type de récepteur de la sérotransferrine dans une grande variété de cellules : cellules de foie foetal, cellules leucémiques, neuroblastomes et cellules cancéreuses du pancréas. La présence de récepteur de la sérotransferrine au niveau des érythroblastes, des macrophages et des hépatocytes explique l'importance du rôle joué par la sérotransferrine dans le transport du fer. •

2 - RECEPTEURS DE LA LACTOTRANSFERRINE

Le récepteur de la lactotransferrine est présent dans des cellules particulières telles que les macrophages (VAN SNICK *et al.*, 1976; BIRGENS *et al.*, 1984), les monocytes (MARKOWETZ *et al.*, 1979), les T-lymphocytes (HASHIZUME *et al.*, 1983; MAZURIER *et al.*, 1988) 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 de 10^6 à $10^7 M^{-1}$. Les récepteurs entérocytaires de Lapin (MAZURIER *et al.*, 1985), de Souris (HU *et al.*, 1988, 1990) et de Singe (Rhésus) (DAVIDSON *et al.*, 1988) et le récepteur lymphocytaire humain (MAZURIER *et al.*, 1989) ont été partiellement caractérisés, il s'agit toujours d'une protéine membranaire dont la masse moléculaire varie de 100 kDa à 130 kDa.

2°-ROLE DES TRANSFERRINES DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER

I - INTRODUCTION

Chez les mammifères supérieurs le taux de fer demeure constant dans l'organisme. Un bilan globalement positif de la teneur en fer de l'organisme pendant les phases de croissance, et un équilibre entre les pertes et l'absorption du fer à l'âge adulte concourent à maintenir constant ce taux au cours de la vie. Le rôle du fer étant très important, notamment dans le métabolisme cellulaire énergétique, et les pertes étant un phénomène obligatoire, l'absorption du métal doit pallier à ces pertes.

L'absorption du fer alimentaire s'effectue suivant un mécanisme complexe de la digestion des aliments au passage du fer dans la circulation sanguine. Le mécanisme demeure hypothétique, en effet, bien que les effets de nombreux facteurs intervenant dans l'absorption du fer ionique aient été identifiés, le processus dans son ensemble reste non élucidé; il peut être décomposé en trois phases :

- 1 - Incorporation du fer présent dans la lumière intestinale,
- 2 - Transit du fer incorporé à travers la cellule intestinale,
- 3 - Transfert du métal de la cellule intestinale vers le sang.

La sérotransferrine intervient dans l'assimilation intestinale du fer au niveau du transfert du fer capté par l'entérocyte vers la circulation sanguine, cette protéine a également été proposée comme intermédiaire dans la capture du fer libéré par l'alimentation et son transfert dans la cellule intestinale.

C'est au cours de l'incorporation du fer alimentaire dans l'entérocyte que pourrait intervenir la lactotransferrine. Les nombreux travaux consacrés à ce sujet n'ont pas fait la lumière sur ce mécanisme

qui demeure obscur bien que certaines zones d'ombre aient été levées depuis qu'a été émise l'hypothèse (MONTREUIL *et al.*, 1960) concernant l'implication possible de la lactotransferrine dans le mécanisme d'absorption intestinale du fer.

Après avoir décrit les mécanismes d'absorption du fer sous forme de sel, non lié à une protéine, nous étudierons, successivement, dans ce chapitre, les diverses données expérimentales en faveur et en défaveur de l'intervention de la sérotransferrine, puis de la lactotransferrine, dans l'absorption du fer.

II - ABSORPTION DU FER INORGANIQUE

Divers mécanismes d'absorption du fer ferreux et ferrique ont été décrits (GRANICK, 1954). Le fer ferreux est absorbé par l'intestin grêle de sujets anémiés par ferriprivation d'un facteur 1,5 à 10 fois plus vite que le fer ferrique (HAHN *et al.*, 1945). La membrane préparée à partir de la bordure en brosse de l'intestin de plusieurs espèces animales peut fixer le fer de façon saturable, la fixation étant dépendante du temps, inhibée par la baisse de température, sensible au changement de température et de pH (COX et O'DONNELL, 1980, 1981; KIMBER *et al.*, 1973; SIMPSON *et al.*, 1986). Les inhibiteurs de l'endocytose et de la pinocytose tels que la colchicine, la vincristine et la cytochalasine B inhibent l'incorporation de fer ferreux, ce mécanisme nécessiterait donc le fonctionnement du cytosquelette (JOHNSON *et al.*, 1985).

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. SIMPSON *et al.* (1983, 1984, 1985) ont observé le même phénomène pour le fer ferrique chez la Souris. Chez ce

dernier modèle le site de fixation du fer ferreux était localisé préférentiellement dans la portion supérieure de l'intestin grêle (MUIR *et al.*, 1984; MUIR & HOPFER 1985).

III - ROLE DE LA SEROTRANSFERRINE DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER

La sérotransferrine, qui capte le fer internalisé par l'entérocyte et le délivre aux sites d'utilisation de l'organisme, joue un rôle important dans le cycle du fer. Des travaux ont été réalisés en vue d'étudier un possible rôle de la sérotransferrine dans le mécanisme d'assimilation du fer intestinal par l'entérocyte, parmi eux, certains concluaient à une intervention de la protéine dans ce phénomène, tandis que d'autres concluaient le contraire.

A - ARGUMENTS EN FAVEUR DU ROLE DE LA SEROTRANSFERRINE DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER

La sérotransferrine est présente dans le tractus gastro-intestinal (HUEBERS *et al.*, 1976). Selon ces auteurs, la sérotransferrine intestinale, différente de la sérotransferrine sérique et synthétisée par la muqueuse intestinale, pourrait intervenir en tant qu'intermédiaire de l'absorption du fer.

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, sécrétée par l'épithélium dans la lumière intestinale, fixerait le fer, le complexe formé serait internalisé par les cellules épithéliales; le fer serait libéré dans la

cellule et la sérotransferrine sans fer retournerait à la surface du côté apical pour être recyclée.

B - ARGUMENTS EN DEFAVEUR DU ROLE DE LA SEROTRANSFERRINE DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER

Divers faits expérimentaux dénie à la sérotransferrine tout rôle dans le mécanisme d'absorption du fer alimentaire par l'entérocyte.

L'origine de la sérotransferrine de la muqueuse est discutable. Sur la base de compositions légèrement 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.

La présence du récepteur de la sérotransferrine sur la bordure en brosse de l'entérocyte n'a pas pu être confirmée. Dans un premier temps COX *et al.* (1979) ont montré que la sérotransferrine n'était pas capable de céder son fer à des biopsies intestinales humaines. Les études de fixation de la sérotransferrine sur la membrane solubilisée de la bordure en brosse de Lapin ont montré que cette dernière n'était pas capable de fixer la sérotransferrine humaine (MAZURIER *et al.*, 1985). 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). Enfin, il a été montré que la bordure en brosse de l'intestin de Singe (Rhésus) n'était pas capable de fixer spécifiquement la sérotransferrine (DAVIDSON & LÖNNERDAL, 1988). Les mêmes conclusions ont été obtenues chez la Souris; HU *et al.*, (1988, 1990) ayant montré que les vésicules de bordure en brosse préparées à partir d'intestin murin n'étaient pas capables de fixer la sérotransferrine. Par immunocytochimie, PARMLEY *et al.* (1985) et BANERJEE *et al.* (1986) n'ont pas pu caractériser le récepteur de la transferrine dans la membrane apicale des entérocytes de Rat.

C - CONCLUSION

En conclusion, nous pouvons dire que les arguments en faveur d'une participation de la sérotransferrine dans les mécanismes d'assimilation du fer alimentaire sont moins probants et surtout moins nombreux que ceux en défaveur du rôle de cette protéine dans ce mécanisme. Il n'est donc pas excessif d'affirmer ici qu'il est peu probable que la sérotransferrine joue un rôle dans l'assimilation du fer alimentaire.

IV - ROLE DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER

Depuis la première hypothèse (MONTREUIL *et al.*, 1960) concernant l'implication possible de la lactotransferrine dans le mécanisme d'absorption intestinale du fer, de nombreuses études ont été réalisées pour vérifier ce postulat. Ces travaux ont été menés sur différents modèles, en système homologue ou hétérologue. Toutes ces études ont

apporté des résultats contradictoires, certaines concluaient que la lactotransferrine jouait un rôle actif dans l'assimilation du fer alimentaire, alors que d'autres attribuaient un rôle régulateur à cette protéine et les dernières postulaient qu'elle n'intervenait pas dans ce mécanisme. Le rôle de la lactotransferrine dans le passage du fer de la lumière intestinale à travers la membrane de l'entérocyte demeure donc controversé. Après avoir décrit les arguments expérimentaux en défaveur de l'intervention de la lactotransferrine dans la nutrition martiale, nous détaillerons ceux en faveur d'une implication de cette protéine dans le processus d'absorption intestinale du fer.

A - ARGUMENTS EN DEFAVEUR D'UNE INTERVENTION DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER

Parmi les travaux consacrés à l'étude de l'absorption intestinale du fer, rares sont ceux qui, portant sur le rôle de la lactotransferrine, ont conclu à une non-intervention de cette protéine dans ce mécanisme.

Certains auteurs, étudiant l'effet de la lactotransferrine sur l'absorption du fer par les cellules intestinales, ont conclu que la lactotransferrine avait, sur ce mécanisme, un effet inhibiteur. 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 & 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.

Chez le Rat, des études basées sur la quantification dans le fécès du fer radioactif administré oralement, sous forme de chlorure de fer (FeCl_3) ou couplé à la lactotransferrine, ont montré que cette dernière

n'avait aucun effet sur la biodisponibilité du fer (FAIRWEATHER-TAIT et al., 1987). Au contraire, chez le même animal, après une carence en fer induite, KAWAKAMI et al. (1988) ont montré que l'addition de lactotransferrine saturée en fer provoquait une forte augmentation de l'assimilation alors que le sulfate de fer était moins efficace.

DE VET & VAN GOOL (1974), ainsi que BROCK (1980) ont conclu que la lactotransferrine, dont la concentration est accrue dans le suc biliaire et le liquide duodéнал chez le Lapin ou chez l'Homme lors d'une anémie, exercerait un rôle régulateur, inhibant l'absorption intestinale du fer afin d'éviter une absorption excessive.

B - ARGUMENTS EN FAVEUR D'UNE INTERVENTION DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS L'ABSORPTION DU FER PAR L'ENTEROCYTE

De nombreux résultats expérimentaux sont venus étayer l'hypothèse du rôle de la lactotransferrine dans la nutrition martiale, par exemple les nourrissons alimentés au lait de Femme présentent moins d'anémies que ceux alimentés au lait de Vache (SPIK, 1971; 1988). La présence de lactotransferrine en quantité importante dans le lait ou à différents points du tractus gastro-intestinal, la résistance de cette protéine et sa survie lors de son transit à travers le système digestif, sont autant de preuves indirectes de l'importance de la lactotransferrine au niveau des voies digestives. En outre, les résultats de plus en plus nombreux se rapportant à l'existence de récepteurs entérocytaires pour la lactotransferrine ainsi que ceux concernant l'assimilation du fer par les nourrissons laissent supposer que cette protéine serait un facteur important de la nutrition martiale.

1 - LOCALISATION DE LA LACTOTRANSFERRINE

La lactotransferrine peut avoir de nombreuses localisations, parmi celles-ci nous nous intéresserons plus particulièrement à la présence de lactotransferrine dans le lait et au niveau du tractus gastro-intestinal.

a - Présence de la lactotransferrine dans le lait

La lactotransferrine a été isolée, pour la première fois, à partir du lait de Femme (MONTREUIL & MULLET, 1960, MONTREUIL *et al.*, 1960, JOHANSSON *et al.*, 1960), et à partir du lait de Vache (GROVES, 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. De 6 mg / ml dans le colostrum son taux tombe et se stabilise à 1 à 2 mg / ml (MONTREUIL *et al.*, 1960).

b - Présence de lactotransferrine au niveau du tractus gastro-intestinal

La lactotransferrine a été mise en évidence dans la salive (MASSON, 1970) et les sucs biliaires (VAN VUGT *et al.*, 1975) et pancréatiques (CLEMENTE *et al.* 1971), dans le liquide duodénal (DE VET & VAN GOOL, 1974).

La présence de la lactotransferrine à la surface luminale des cellules épithéliales de la muqueuse a été établie par de nombreux auteurs (MASSON *et al.*, 1968; MASON & TAYLOR, 1978; ISOBE *et al.*, 1978;

TEDESCHI *et al.*, 1987; LORIMIER, 1987). Par immunocytochimie, ce dernier auteur a montré la présence de la lactotransferrine sur toute la hauteur de la villosité de la muqueuse de biopsies duodénales humaines. L'origine de cette lactotransferrine serait les cellules caliciformes, sa présence dans les grains de sécrétion des cellules à mucus ayant été mise en évidence.

La présence de lactotransferrine au niveau de la lumière intestinale et en tout point du tractus gastro-intestinal constitue, à notre avis, un argument supplémentaire de la participation de cette protéine à l'assimilation du fer par l'entérocyte. Notons également que la lactotransferrine peut être en contact avec le bol alimentaire à chaque endroit du tractus gastro-intestinal.

2 - ROLE DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS LA NUTRITION MARTIALE DU NOURRISSON

C'est chez le nourrisson qu'ont été obtenus les résultats les plus probants quant à la participation de la lactotransferrine dans l'assimilation du fer au niveau de l'intestin. Chez le nouveau-né, l'absorption du fer est, en général, plus efficace que chez l'adulte. Il est actuellement admis que, chez l'adulte, le fer apporté par l'alimentation est libéré dans l'estomac sous l'effet du pH et sous l'action de la pepsine. Dans le cas de l'estomac du nourrisson, un pH voisin de 4 et une protéolyse faible vis-à-vis de la lactotransferrine permettent à cette dernière de conserver son fer (SPIK *et al.*, 1971).

Chez le nourrisson nourri au lait maternel, l'incidence de la carence en fer est très faible (MAC MILLAN *et al.*, 1976; SAARINEN *et al.*, 1977). Malgré la faible quantité de fer dans le lait de Femme, de nombreuses études ont montré (Tableau I) que les nourrissons alimentés

au lait de Femme absorbaient le fer de façon 2 à 3 fois supérieure que ceux alimentés au lait de Vache et de 5 à 15 fois supérieure à ceux alimentés par des formules de laits artificiels ne contenant pas de lactotransferrine, ni humaine, ni bovine (McMILLAN *et al.*, 1977; SAARINEN *et al.*, 1977; GARRY *et al.*, 1981). L'explication serait la grande bio-disponibilité du fer dans le lait de Femme, les travaux de SIIMES *et al.* (1979) ont montré que la vitesse d'absorption du fer lié à la lactotransferrine était supérieure à celle des sels de fer. D'autres auteurs ont attribué à la lactotransferrine le rôle principal de transporteur de fer dans le lait de Femme (MONTREUIL & MULLET, 1960; MONTREUIL *et al.*, 1960; MONTREUIL, 1971 ; SPIK, 1981).

Cependant, ce concept n'est pas accepté par certains auteurs en raison du fait que, d'une part, la lactotransferrine dans le lait est peu saturée en fer (BULLEN *et al.*, 1972; FRANSSON & LÖNNERDAL, 1980; LÖNNERDAL, 1985); la quantité de fer fixée par la lactotransferrine ne correspond qu'à 1 à 4 % de la capacité totale de fixation du fer par la protéine, et que, d'autre part, il n'existe aucun lien entre le taux de fer et la concentration en lactotransferrine (MASSON *et al.*, 1970). D'autres auteurs, enfin 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, en lactose et en oligosaccharides dy gynolactose (GROSS, 1968; AMINE & HEGSTEAD, 1975; PETERS *et al.*, 1971; PIRZIO-BIROLI *et al.*, 1958).

**TABLEAU I : COMPARAISON DES TAUX DE FER DANS DIFFERENTS LAITS ET
DIFFERENCES DANS L'ABSORPTION DU FER (SPIK, 1988)**

	Lait de Femme	Lait de Vache	Lait artificiel
Taux de fer (mg/l)	0,4 à 1,2	0,2 à 0,3	11 à 23
Taux de lactotrans- ferrine (mg/ml)	0,5 à 1,5	0,2 à 0,3	0
Quantité de fer absorbée (mg/jour)	0,2 à 0,5	0,03	4 à 10
Pourcentage d'absorption	49 à 61	10 à 30	4 à 10

Ayant observé *in vivo* une absorption du fer identique à partir de la lactotransferrine ou à partir de sel ferreux chez les nouveau-nés humains et murins, FRANSSON *et al.* (1983) et FAIRWEATHER-TAIT *et al.* (1987) ont conclu pour les premiers que la lactotransferrine pouvait être un facteur essentiel de l'assimilation du fer tandis que les seconds ont conclu que la présence de lactotransferrine n'augmentait pas ou peu l'absorption du fer.

Chez le nourrisson de Singe Rhésus, alimenté avec une formule de lait pour nourrisson humain supplémenté soit avec de la lactotransferrine humaine, soit avec de la lactotransferrine bovine ou soit avec du sulfate de fer, DAVIDSON *et al.* (1990) ont montré que les trois avaient un effet similaire. Des études menées chez la Souris sevrée et anémiée (KAWAKAMI *et al.*, 1988) ont montré (Tableau II) que la dose de fer sous forme sulfate de fer à administrer oralement à l'animal pour qu'il retrouve un taux d'hémoglobine normal était 4 fois supérieure à la dose de fer nécessaire lorsque le métal était complexé à la lactotransferrine. Pour des doses de fer inférieures à la quantité nécessaire à l'organisme, KAWAKAMI *et al.*, (1988) ont montré, qu'en revanche, lactotransferrine et sulfate de fer avaient le même effet. De ces deux derniers travaux il ressort que, selon les besoins en fer de l'organisme et selon la quantité administrée, la dose assimilée efficacement dépend de la forme sous laquelle le fer est présent. Ainsi, en cas d'anémie, le fer lié à la lactotransferrine est plus disponible et plus utilisable par l'organisme que le fer ionique.

3 - RESISTANCE DE LA LACTOTRANSFERRINE AUX ATTAQUES

PROTEOLYTIQUES LORS DE SON TRANSIT INTESTINAL

Les études de dégradation de la lactotransferrine (SPIK *et*

TABLEAU II : EFFETS COMPARES DES DIFFERENTES DOSES DE FER ADMINISTREES
 SOUS FORME DE SULFATE FERREUX ET DE FERRI-LACTOTRANSFERRINE SUR LE TAUX
 D'HEMOGLOBINE APRES 28 JOURS DE TRAITEMENT (KAWAKAMI *et al.*, 1988)

	Dose administrée ($\mu\text{g}/\text{jour}$)	Taux d'hémoglobine	
		Jour 0	Jour 28
Eau distillée	0	6,3 \pm 0,4	3,5 \pm 0,6
Sulfate	10	5,9 \pm 0,5	3,9 \pm 0,3
Sulfate	20	5,9 \pm 0,6	4,2 \pm 0,3
Sulfate	50	5,9 \pm 0,5	4,6 \pm 0,7
Sulfate	200	6,2 \pm 0,8	10,8 \pm 1,1
Lactotransferrine	10	5,9 \pm 0,7	4,6 \pm 0,7
Lactotransferrine	20	5,8 \pm 0,4	5,9 \pm 0,5
Lactotransferrine	50	5,8 \pm 0,6	8,5 \pm 0,4

MONTREUIL, 1966; BROCK *et al.*, 1986; LINE *et al.*, 1976) ont montré que l'apolactotransferrine était plus facilement dégradée par protéolyse gastrique ou pancréatique que la lactotransferrine saturée en fer, plus résistante.

BRITTON & 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. Ces auteurs ont conclu que la lactotransferrine humaine pouvait lors de son transit intestinal, conserver toutes ses potentialités et exercer ainsi son ou ses rôles biologiques.

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; DAVIDSON & LÖNNERDAL, 1987). Cette copro-lactotransferrine a gardé la capacité de fixer le fer ainsi que son activité bactériostatique.

4 - MISE EN EVIDENCE DE RECEPTEURS ENTEROCYTAIRES DE LA LACTOTRANSFERRINE

Les premiers travaux ont été réalisés en 1979, COX *et al.* ont montré, dans une expérience "*in vitro*", que la lactotransferrine humaine était capable de donner son fer à des biopsies intestinales humaines, de même que la lactotransferrine bovine mais pas la sérotransferrine humaine.

Poursuivant les études, un récepteur de la lactotransferrine humaine a été mis en évidence dans la membrane de la bordure en brosse de l'intestin du Lapin (MAZURIER *et al.*, 1985). Ce récepteur fixe la lactotransferrine ($K_a = 1,2 \times 10^6 M^{-1}$) et possède une masse moléculaire d'environ 100 kDa. Chez la Souris, un récepteur entérocytaire de la lactotransferrine a été mis en évidence, isolé et caractérisé (HU *et al.*, 1988, 1990), il s'agit d'une protéine de 130 kDa qui peut fixer une molécule de lactotransferrine ($K_d = 0,1 \times 10^{-6} M$). Chez le Singe (DAVIDSON et LÖNNERDAL, 1986, 1988) ont montré l'existence d'un récepteur de la bordure en brosse capable de fixer la lactotransferrine humaine ou la lactotransferrine de Singe ($K_d = 9 \mu M$). Ces auteurs ont montré que le récepteur existait, avec les mêmes caractéristiques, chez le jeune Singe allaité ainsi que chez le Singe sevré et adulte. En outre, ils ont montré, par défucosylation de la lactotransferrine humaine que la spécificité de fixation serait due à la présence du fucose sur le glycanne de la lactotransferrine humaine.

C - CONCLUSION

Tous les faits rapportés plus haut, font pencher la balance vers l'hypothèse d'une implication de la lactotransferrine dans l'absorption du fer alimentaire. Cette conclusion n'est pas loin d'être établie avec certitude pour le nourrisson et devrait pouvoir être étendue à l'enfant sevré ou l'adulte. Dans ce cas, le rôle joué par la lactotransferrine du lait serait tenu par celle sécrétée dans le tractus gastro-intestinal avec laquelle le bol alimentaire est en contact lors du transit.

D'autres hypothèses font intervenir l'assimilation directe du fer inorganique et du fer hémique par la muqueuse, ces mécanismes existent; mais n'excluent pas la possibilité du rôle de la lactotransferrine.

C'est le type de conclusion qu'avaient obtenu KAWAKAMI *et al.* (1988) en comparant l'absorption du fer à partir de lactotransferrine saturée à l'absorption à partir de sulfate de fer. Ces auteurs avaient déduit que la lactotransferrine saturée était absorbée à travers la muqueuse intestinale par un mécanisme autre que celui par lequel l'était le fer ionique.

Cependant, si le principe d'un mécanisme de nutrition martiale faisant intervenir la fixation de la lactotransferrine sur un récepteur entérocytaire est admis, 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. Mais le matériel biologique utilisé : des biopsies intestinales de faible durée de vie ainsi que les conditions de l'expérimentation n'ont, peut-être, pas pu mettre en évidence l'internalisation de la protéine.

C'est pourquoi, dans le but d'étudier le rôle de la lactotransferrine dans les mécanismes d'absorption intestinale du fer, c'est à dire, non seulement la fixation de la protéine sur l'entérocyte, mais aussi l'éventuelle internalisation de la lactotransferrine par ces cellules, nous avons recherché un modèle qui permette cette étude chez l'Homme. Les cellules intestinales humaines HT 29 nous permettent d'envisager ces études.

3°-LES CELLULES HT 29 : UN MODELE POUR L'ETUDE DU ROLE DES TRANSFERRINES DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER
--

I - INTRODUCTION

Ces dernières années, de nombreuses lignées cellulaires ont été établies à partir d'adénocarcinomes coliques humains, ces lignées ont provoqué un vif intérêt par la possibilité qu'elles ont de développer, en culture des différenciations similaires à celles de l'épithélium intestinal normal. Récemment, 20 lignées cellulaires ont été étudiées comparativement du point de vue de leurs potentialités à développer une différenciation de type entérocytaire (CHANTRET *et al.*, 1988). Une classification des différentes lignées a pu ainsi être établie, quatre types ont été caractérisés : le type I, (Caco 2), pour lequel la cellule développe spontanément une différenciation entérocytaire; le type II (HT 29, HCT-EB, HCT-GEO), pour lequel les cellules restent indifférenciées dans un milieu glucosé mais se différencient en entérocytes lorsque le glucose est absent du milieu; le type III (HCT-GLY, HCT-FET, HCT-FRI, HCT-CBS, HCT-ALA, Co 115, HRT18, SW-1116), pour lequel les cellules sont organisées en monocouches polarisées mais ne développent aucune différenciation entérocytaire, quelles que soient les conditions de culture; le type IV (HCT-116a, HCT-R, HCT-RCA, HCT-Moser, HCT-8R, SW-480, LS-174T, Vaco 9P), pour lequel les cellules poussent en multicouches, ni polarisées, ni différenciées. Parmi toutes ces lignées, celles du type II permettent à la fois d'étudier les caractéristiques de cellules intestinales en culture et de les comparer avec celles des cellules indifférenciées, c'est pourquoi nous avons choisi de travailler sur les cellules HT 29, appartenant à ce type II.

Les cellules de la lignée HT 29 ont été isolées en 1964 par J. FOGH à partir de cellules prélevées sur un adénocarcinome du colon chez une Femme de 44 ans. Leurs caractéristiques originales ont été décrites par FOGH & TREMPE (1975).

Depuis, les cellules HT 29 ont fait l'objet de nombreux travaux concernant leur métabolisme énergétique et glucidique, l'étude de leurs récepteurs ainsi que celle de la régulation de ces derniers, l'étude de leurs différentes voies de différenciation en culture, des modifications métaboliques, structurales et enzymatiques engendrées par ces processus.

II - CELLULES HT 29 NON DIFFERENCIÉES CULTIVÉES DANS UN MILIEU CONTENANT DU GLUCOSE

A - MÉTABOLISME GLUCIDIQUE DES CELLULES HT 29 NON DIFFERENCIÉES

Les cellules HT 29 en culture dans un milieu standard glucosé présentent des anomalies de leur métabolisme glucidique : des taux élevés de consommation de glucose et par l'absence de production de lactate (ROUSSET *et al.*, 1984).

L'ARN messager du transporteur membranaire du glucose a pu être mis en évidence, dans ces cellules, grâce à des expériences d'hybridation sur filtre de nitrocellulose d'une sonde d'ADN complémentaire préparée à partir d'un hépatome humain (MUECKLER *et al.*, 1985). L'analyse de certaines propriétés physicochimiques de ce transporteur permet de penser que cette protéine est identique au transporteur des hématies.

En revanche, les trois enzymes clés de la glycolyse (hexokinase, phosphofructokinase et pyruvate kinase) ont été dosées, et leurs activités respectives comparées à celles trouvées dans le colon sain

(DENIS, 1985). Seule la pyruvate kinase présente une activité plus forte (multipliée par 5) dans les cellules tumorales. Mais il convient de signaler que les activités de l'hexokinase et de la phosphofructokinase sont déjà très importantes dans l'épithélium colique, comme dans d'autres cellules à renouvellement rapide, telles que l'entérocyte ou le lymphocyte (ARDAWI & NEWSHOLMES, 1985). En outre, ces auteurs démontrent que la forte consommation de glucose des colonocytes de Rat "*in vitro*" ne rend compte que de 12% de l'activité maximale théorique de l'hexokinase. Il est donc concevable que, dans les cellules HT 29, l'augmentation du flux glycolytique soit due à une contribution plus forte de cet enzyme, consécutive à une entrée plus importante de glucose entraînant le flux global vers un nouvel état stationnaire (MAZAT & JEAN-BART, 1985).

L'étude du métabolisme glucidique des cellules HT 29 a montré que, chez ces cellules, existaient de graves altérations dans le métabolisme des N-glycannes des glycoprotéines (OGIER-DENIS *et al.*, 1988, 1990). Ces déficiences se traduisent par une accumulation de N-glycannes immatures de type oligomannosidique, contenant de 8 à 9 résidus de mannose.

L'accumulation du glycogène dans les cellules HT 29 (ZWEIBAUM *et al.*, 1977) est une caractéristique que l'on retrouve dans le colon foetal mais pas chez l'adulte. Cette accumulation dépend du cycle cellulaire, puisqu'elle a lieu principalement en phase G1 dans des cellules synchronisées (ROUSSET *et al.*, 1979), bien que la glycogène synthétase demeure phosphorylée pendant cette phase (ROUSSET *et al.*, 1984). La forme b de cette enzyme est alors activée de manière allostérique par un métabolite présent en grande quantité dans ces cellules, le glucose-6-phosphate.

B - PRINCIPAUX RECEPTEURS ETUDIES SUR LES CELLULES HT 29**NON DIFFERENCIEES**

Plusieurs récepteurs ont été décrits dans la lignée HT 29 non différenciée : le récepteur du VIP (Vaso Intestinal Peptide) (LABURTHES *et al.*, 1978), de l'insuline (FORGUE-LAFITTE *et al.*, 1979), de l'EGF (Epidermal Growth Factor) (KITABGI *et al.*, 1979), de la dopamine (SCEMANA *et al.*, 1984), ainsi que le récepteur alpha2-adrénergique (PARIS *et al.*, 1985, JONES *et al.*, 1990), le récepteur de l'interféron humain (BERNARD *et al.*, 1989) et les récepteurs de la lactotransferrine et de la sérotransferrine (AMOURIC *et al.*, 1984; ROIRON *et al.*, 1989; ROIRON & FIGARELLA, 1990).

Les cellules HT 29 possèdent une classe unique de sites de fixation pour le VIP (MULLER *et al.*, 1985; COUVINEAU *et al.*, 1985). Le VIP exerce sur ces cellules une action glyco-génolytique transitoire (ROUSSET *et al.*, 1981) vraisemblablement liée à leur caractère cancéreux. La diminution du taux de glycogène intracellulaire induite par le VIP pourrait avoir des conséquences sur la vitesse de croissance des cellules HT 29 (PICHON *et al.*, 1982). Une relation intéressante entre la concentration de glycogène et le taux de prolifération cellulaire ayant d'ailleurs été mise en évidence (ROUSSET *et al.*, 1980), un taux élevés de glycogène étant associé à une faible vitesse de croissance. *In vivo*, le VIP, libéré de façon importante par des terminaisons nerveuses dont la paroi colique est particulièrement riche, pourrait peut-être aussi réguler la prolifération des tumeurs du colon.

De la même manière, d'autres messagers intercellulaires pourraient être impliqués dans la régulation fine de la croissance des cellules HT 29 "*in vitro*", comme l'insuline (CEZARD *et al.*, 1981), ou la transferrine (AMOURIC *et al.*, 1984). A cet égard, ces cellules

constituent un excellent modèle pour l'étude de la dépendance hormonale de la prolifération des tumeurs recto-coliques. La souche HT 29 indifférenciée a également été utilisée pour étudier la régulation des récepteurs couplés aux systèmes adényl-cyclasiques de la cellule. TURNER *et al.* (1988), ont montré, en utilisant des agonistes et des activateurs de la protéine kinase C, que le nombre de récepteurs membranaires du VIP était lié à l'intensité de l'activité adényl-cyclasique. Une relation inverse (régulation négative) a été montrée entre le taux de récepteurs α -2-adrénergiques et l'activité adényl-cyclasique (JONES *et al.*, 1990).

III - DIFFERENCIATION DES CELLULES HT 29 CULTIVEES DANS UN MILIEU SANS GLUCOSE

Les travaux cités jusqu'à présent dans ce chapitre ont tous été réalisés à partir de cellules cultivées dans des conditions standard, c'est à dire dans du DMEM contenant du glucose (25 mM) et 10 % de SVF. Dans ces conditions, elles poussent en multicouches non polarisées (Fig. 2A). En 1982, le groupe dirigé par le Dr ZWEIBAUM à Paris rapportait une observation particulièrement importante qui allait constituer la base de nombreuses recherches réalisées dans différents laboratoires au cours de ces dernières années : lorsque les cellules HT 29 sont cultivées en totale absence de glucose, elles s'organisent en une monocouche polarisée et présentent des jonctions serrées ainsi qu'une bordure en brosse apicale (Fig. 2B).

A - CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DE LA DIFFERENCIATION

L'observation initiale a été faite en remplaçant le glucose dans le milieu de culture par un autre sucre : le galactose (PINTO *et al.*, 1982), puis par l'inosine ou l'uridine (WICE *et al.*, 1985)

a

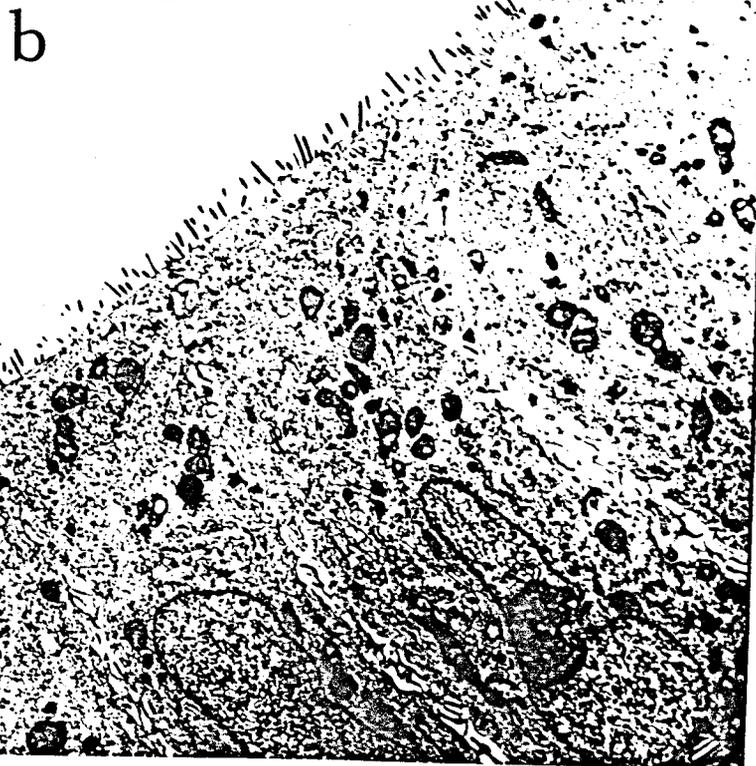
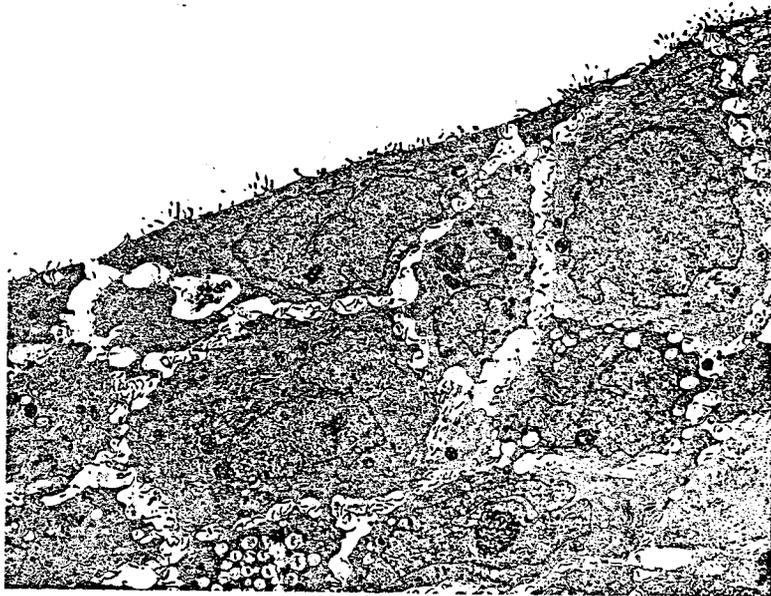


Fig. 2 : DIFFERENCIATION DES CELLULES HT 29 (ROUSSET, 1986)

a : Cellules indifférenciées cultivées en présence de glucose;

b : Cellules différenciées en entérocytes cultivées en absence de glucose.

et enfin, en absence totale d'hexoses (ZWEIBAUM *et al.*, 1985).

Outre les caractéristiques structurales et morphologiques qui apparaissent lors de la différenciation, de nouvelles caractéristiques enzymatiques surviennent, notamment au niveau de la bordure en brosse. Cette dernière acquiert des enzymes telles que la sucrase, l'aminopeptidase, la dipeptidylpeptidase IV et la phosphatase alcaline (ROUSSET, 1986). Toutes ces enzymes sont les hydrolases que l'on trouve dans les membranes des microvillosités des entérocytes normaux mais qui sont absentes des cellules du colon normal. L'activité des ces enzymes dans les cellules HT 29 différenciées est plus faible que celle mesurée dans des cellules intestinales normales (ZWEIBAUM *et al.*, 1983). Il a été montré récemment que les cellules HT 29 Glc(+) étaient capables de synthétiser la sucrase, mais que cette protéine était dégradée par les cellules (TRUGNAN *et al.*, 1987). Ces derniers auteurs ont montré que l'activité de la sucrase et pouvait rendre compte de la différenciation des cellules HT 29. Une autre protéine de la bordure en brosse intestinale, la villine, présente en faible quantité dans les cellules HT 29 Glc(+), vient s'organiser au sein du cytosquelette de la bordure en brosse des cellules HT 29 Glc(-) différenciées (ROBINE *et al.*, 1985).

L'utilisation de la souche HT 29 comme modèle cellulaire d'étude de la différenciation entérocytaire a fait l'objet d'une revue générale (ROUSSET, 1986). La cellule HT 29 différenciée se rapprocherait de la cellule colique foetale, qui exprime les mêmes hydrolases (LACROIX *et al.*, 1984), et en particulier, une forme caractéristique de la sucrase moléculairement différente de celle de l'intestin grêle (TRIADOU & ZWEIBAUM, 1985) Cette différenciation présente, en outre, certaines analogies avec le processus de maturation le long de l'axe

crypte-villosité (ROUSSET, 1986), ce qui justifie les nombreuses études entreprises sur cette lignée.

B - METABOLISME GLUCIDIQUE DES CELLULES HT 29 DIFFERENCIÉES

Les recherches menées sur le métabolisme énergétique des cellules HT 29 Glc(-) ont montré que ces cellules ne produisaient pas de lactate (ZWEIBAUM *et al.*, 1985) et qu'elles acquièrent des propriétés gluconéogéniques (DENIS *et al.*, 1985). La concentration intracellulaire des UDP-N-acétyl hexosamines est faible dans ces cellules, alors qu'elle augmente après confluence dans les cellules HT 29 Glc(+) (WICE *et al.*, 1985). Comme ces métabolites participent à la glycosylation des protéines, une relation entre le métabolisme du glucose, la glycosylation des protéines et la différenciation entérocytaire a été suggérée (ROUSSET, 1986). L'étude comparée du métabolisme des N-glycannes dans les cellules HT 29 Glc(-) et Glc(+) (OGIER-DENIS *et al.*, 1988, 1989, 1990) a montré que ce métabolisme était perturbé dans les cellules indifférenciées mais pas dans les cellules différenciées. La perturbation de ce métabolisme se manifeste dans les cellules HT 29 Glc(+) par une accumulation de structures de type oligomannosidique comprenant de 8 à 9 résidus de mannose, cette accumulation ne se produit pas pour les cellules HT 29 Glc(-). Les études ont montré que ces différences débutaient pendant la phase de croissance exponentielle, c'est à dire, avant la confluence et donc avant que les manifestations visibles ou dosables de la différenciation ne soient détectables. La présence de métabolites de N-glycannes est donc un marqueur précoce de la voie de différenciation dans laquelle s'engageront les cellules après confluence.

Les deux souches HT 29 Glc(-) et Glc (+) ont également été étudiées comparativement en résonance magnétique multinucléaire (C^{13} , P^{31} & H^+) (FANTINI *et al.*, 1987; GALONS *et al.*, 1989), les résultats ont montré que le processus de différenciation était corrélé à une forte augmentation de l'activité du métabolisme oxydatif; les auteurs ont montré qu'alors que les cellules différenciées peuvent transformer le glucose qu'elles synthétisent en glycogène, les cellules indifférenciées ne le peuvent pas. Au cours de la différenciation, il y a expression de récepteurs de l'aldostérone (LOMBES *et al.*, 1984), tandis que la sensibilité de l'activation de l'adénylate cyclase par le VIP diminue (CHASTRE *et al.*, 1985).

IV - AUTRES MODIFICATIONS DU MILIEU DE CULTURE

D'après NAGURA *et al.* (1979), les cellules HT 29 cultivées dans du MEM contenant 10 % de SVF sont polarisées et différenciées morphologiquement. La teneur en glucose du MEM est de 5 mM (le DMEM en contient 25 mM). Dans ces conditions, il a été montré que les cellules pouvaient présenter des caractères différenciés structuraux, tels que bordure en brosse et jonctions serrées, mais pas enzymatiques (PINTO *et al.*, 1982). Ce stade incomplet de maturation serait dû à la faible teneur du milieu en glucose qui, consommé très rapidement, entraînerait un état de carence entre les changements de milieu.

En absence de sérum, environ la moitié des cellules se différencient en cellules de type caliciforme, avec expression de marqueurs spécifiques et production de mucus (ZWEIBAUM *et al.*, 1982) et sécrétion de lysozyme (ALDERMAN *et al.*, 1985 ; FETT *et al.*, 1985).

Enfin, la différenciation des cellules HT 29 a pu être induite en présence de butyrate de sodium (WICE *et al.*, 1985), dans un milieu

hyperosmolaire (HERZ *et al.*, 1981) et dans un milieu dépourvu de glutamine (VIALARD *et al.*, 1986).

V - CLONAGE DES CELLULES HT 29

L'hétérogénéité de la lignée HT 29, en culture depuis plus de vingt ans, a conduit certains groupes à cloner ces cellules (MOSTOV & BLOBEL, 1982 ; AUGERON & LABOISSE, 1984 ; LOUVARD *et al.*, 1985 ; FANTINI *et al.*, 1986).

Certains de ces clones sont différenciés après confluence en milieu standard : le clone sécréteur HT 29 16E, et le clone 19A entérocytaire qui forme des domes (AUGERON & LABOISSE, 1984). Ces clones ont été obtenus après sélection des cellules HT 29 dans un milieu contenant du butyrate de sodium.

Certains autres clones, obtenus dans le groupe du Dr. LOUVARD à Paris, ont gardé la propriété de se différencier dans un milieu contenant du galactose et dépourvu de glucose : le clone multipotent HT 29-18, à partir duquel les auteurs ont pu obtenir plusieurs sous-clones différenciés en entérocytes (HT 29-18-C₁) ou en cellules caliciformes (HT 29-18-N₂).

Enfin, à partir de cellules HT 29 croissant dans un milieu dépourvu de glucose et contenant du galactose, FANTINI *et al.* (1986) ont sélectionné deux sous-clones (HT 29-D4 et HT 29-D9) qui peuvent maintenir continuellement une différenciation de type entérocytaire dans un milieu totalement dépourvu de glucose et qui sont capables de former des domes après confluence, cette différenciation est totalement réversible si l'on replace les cellules dans un milieu qui contient du glucose. Lors du passage des souches d'un milieu glucosé à un milieu non glucosé, les cellules HT 29-D9 ont besoin avant de reprendre leur

croissance d'une adaptation préalable consécutive au changement de milieu : 70 % de la population totale meurt en raison du manque de glucose, les cellules qui restent sur le plastique poussent lentement pour donner en une semaine naissance à la population différenciée. En revanche, les cellules HT 29-D4, supportent parfaitement le remplacement du glucose par du galactose.

VI - CONCLUSION

Comme nous venons de le voir, la souche cellulaire HT 29, qu'il s'agisse de la souche originale ou de ses multiples potentialités de différenciation, a fait l'objet, au cours des dernières années de nombreuses études. Les travaux ont porté surtout sur la différenciation cellulaire (QUARONI, 1985; TRUGNAN *et al.*, 1987; OGIER-DENIS *et al.*, 1988, 1990; LE BIVIC *et al.* 1988; GALONS *et al.*, 1989). Le passage de la cellule indifférenciée à la cellule différenciée semble mimer la situation trouvée dans l'intestin, à savoir, une division rapide des cellules de la crypte durant la phase exponentielle de croissance (de laquelle se rapproche la croissance rapide des cellules HT 29 Glc(+)) ou des cellules HT 29 Glc(-) avant la confluence) et un arrêt de la division cellulaire des cellules du villus qui permet la différenciation (duquel se rapproche la différenciation des cellules HT 29 Glc(-) qui ne débute qu'après l'arrêt de croissance des cellules, consécutif à la confluence). Par ailleurs, comme nous l'avons vu précédemment, de nombreuses études concernant les récepteurs ont pu être réalisées sur ce modèle. D'autres études ont été effectuées concernant le métabolisme énergétique et glucidique de ces cellules (TRUGNAN *et al.*, 1987 ; OGIER-DENIS *et al.*, 1988, 1989, 1990).

Les cellules HT 29 semblent donc être un excellent modèle pour tenter de résoudre les différents problèmes liés à la compréhension du mécanisme d'assimilation intestinale du fer alimentaire par l'organisme. D'autres matériels biologiques, telles que les biopsies intestinales humaines, ne permettent pas de répondre à toutes les interrogations soulevées par ce problème, cela notamment en raison de leur faible durée de vie "*in vitro*". En outre, de part la polarité entérocytaire qu'il acquiert et qu'il maintient en culture, ce modèle permet d'aborder les trois phénomènes impliqués dans le mécanisme d'assimilation du fer alimentaire : le passage apical du fer luminal, le transfert du métal à travers la cellule entérocytaire et enfin sa libération dans la circulation sanguine du côté basolatéral. En particulier, ce modèle permettra de régler chez un modèle humain les problèmes liés aux rôles éventuels des transferrines (lactotransferrine et sérotransferrine) dans l'assimilation du fer.

Néanmoins, en tant que modèle, l'utilisation de la souche HT 29 et de ses différentes voies de différenciation, a ses limites. Ces cellules sont des cellules tumorales et non des cellules normales, peut-on généraliser des résultats acquis avec des cellules qui se sont écartées de la norme et les utiliser pour rendre compte d'un phénomène biologique normal? D'autre part, ces cellules proviennent du colon et le mécanisme d'assimilation du fer a lieu dans l'intestin grêle, au niveau des cellules entérocytaires. Cependant, toutes les caractéristiques structurales et enzymatiques des entérocytes se retrouvent dans les cellules HT 29 Glc(-). C'est pourquoi nous considérons que le modèle HT 29, malgré les limites évoquées, constitue un modèle de choix pour l'étude "*in vitro*" du rôle des transferrines dans l'assimilation, par l'entérocyte, du fer alimentaire.

4°-GENERALITES SUR L'ENDOCYTOSE

I - INTRODUCTION

Trois principaux mécanismes permettent aux macromolécules et particules biologiques d'entrer dans la cellule. Le nom général donné à ces phénomènes est l'endocytose dont une définition a été donnée par PASTAN & WILLINGHAM (1983) : "l'endocytose est l'internalisation, par une cellule vivante, de matériel biologique macromoléculaire enfermé dans un organe délimité par une membrane".

Pour les particules de grande taille le nom donné à ce mécanisme est la phagocytose, aboutissant à la formation d'un phagosome (SILVERSTEIN *et al.*, 1977).

Pour les protéines qui pénètrent dans la cellule, sans avoir été préalablement fixées ou adsorbées sur la membrane, l'internalisation se fait par emprisonnement d'une "bulle" de milieu extérieur par un processus que l'on nomme pinocytose (LEWIS, 1931) menant à la formation d'un pinosome; ce mécanisme est encore appelé macropinocytose (WILLINGHAM & YAMADA, 1978), conduisant à la formation d'un macropinosome; les différentes appellations regroupant le même processus et les mêmes vésicules.

Le troisième mécanisme, qui se produit après fixation de la molécule destinée à être internalisée sur un récepteur membranaire, est appelée endocytose médiée par un récepteur "*receptor-mediated endocytosis*" ou encore endocytose en phase adsorptive, par opposition à l'endocytose en phase fluide (pinocytose). Ce mécanisme aboutit à la formation d'une vésicule appelée endosome (HELENIUS *et al.*, 1983) ou encore réceptosome (PASTAN & WILLINGHAM, 1983; 1985); les deux termes étant équivalents. Par endocytose adsorptive, les cellules internalisent

de nombreux ligands tels que les hormones, les nutriments, les anticorps, les facteurs de croissance et même les toxines et les virus qui pénètrent dans la cellule après fixation sur des sites membranaires spécifiques (GOLDSTEIN *et al.*, 1985).

De la fixation du ligand sur son récepteur à la formation de l'endosome, il existe peu de différences entre les divers ligands et les diverses cellules. Après la formation de cette vésicule, les complexes récepteur-ligand peuvent suivre différentes voies. La sérotransferrine décharge son fer en restant liée à son récepteur, le complexe est ensuite dirigé vers la membrane plasmique et la sérotransferrine dépourvue de fer est libérée dans le milieu extérieur (DAUTRY-VARSAT *et al.*, 1983; KLAUSNER *et al.*, 1983; DICKSON *et al.*, 1983, HANOVER *et al.*, 1984). L'EGF (*Epidermal Growth Factor*) est dirigé vers le lysosome avec son récepteur et les deux sont détruits par les enzymes lysosomaux (CARPENTER & COHEN, 1979; DICKSON *et al.*, 1983; HANOVER *et al.*, 1984; GORMAN & PORETZ, 1987). Les asialoglycoprotéines, les LDL (*Low Density Lipoprotein*) et l' α -2-M (α -2-Macroglobuline) se séparent de leur récepteur au niveau de l'endosome et sont dirigés vers les lysosomes et dégradés alors que leurs récepteurs sont recyclés et retournent à la surface (BROWN *et al.*, 1983, VAN LEUVEN *et al.*, 1980; BREITFORD *et al.*, 1985). Les toxines et virus qui se fixent sur des sites membranaires avant d'être internalisés, suivent encore une autre voie : après formation de l'endosome, ils rompent la membrane de ce dernier et sont libérés directement dans le cytosol (KEEN *et al.*, 1982; MARSH *et al.*, 1983; OSLNES & SANDVIG, 1985).

Pour les cellules épithéliales polarisées, il existe enfin un dernier type d'endocytose appelé transcytose vectorielle (MOSTOV & SIMISTER, 1985), dans ce cas, la vésicule endosomale traverse la cellule d'un pôle à l'autre. C'est le cas des IgA polymériques qui sont

internalisées par la membrane basolatérale de diverses cellules épithéliales dont l'entérocyte (UNDERDOWN, 1986) et sont transportées vers la membrane apicale.

II - STRUCTURES CELLULAIRES IMPLIQUEES DANS L'ENDOCYTOSE

A - LE PUITTS RECOUVERT ET LA VESICULE RECOUVERTE

Après que la fixation des ligands sur leurs récepteurs membranaires, on constate qu'ils sont regroupés en des zones particulières de la membrane plasmique qui ont, au microscope électronique un aspect granuleux, d'où leur nom de vésicules recouvertes ou mantelées (*coated-pits*). Cet aspect granuleux est dû à la présence d'une protéine, la clathrine, dont les caractéristiques ont été décrites dans la revue de PEARSE & BRETSCHER (1988). Le terme clathrine représente en fait une famille de protéines dont la forme majoritaire a une masse moléculaire de 180 kDa. Après fixation des ligands sur les récepteurs et regroupement des complexes dans le puits recouvert, ce dernier s'invagine et se vésicularise pour aboutir à la formation d'une vésicule dont la membrane externe est tapissée par la clathrine, d'où son nom de vésicule recouverte.

B - L'ENDOSOME

L'endosome (HELENIUS *et al.*, 1983) ou réceptosome (PASTAN & WILLINGHAM, 1983) est la vésicule acide contenant les complexes récepteur-ligand. Dès sa formation, la vésicule recouverte perd son revêtement de clathrine pour former un endosome (ROBINSON, 1987). Cet

auteur a postulé que la perte de la clathrine permettait à la vésicule endosomale de migrer vers la zone périnucléaire et à la membrane endosomale de fusionner avec la membrane lysosomale.

Le terme endosome (ou réceptosome) regroupe en fait plusieurs catégories de vésicules aux noms divers selon les auteurs et correspondant aux différents stades de maturation de la vésicule endosomale initiale (WALL *et al.*, 1980; MARSH *et al.*, 1982; BELCHER *et al.*, 1987; GORMAN *et al.*, 1987; SCHMID *et al.*, 1988; DUNN *et al.*, 1989). La vésicule formée après dissociation de la clathrine est appelée endosome périmembranaire, endosome I, endosome primaire ou endosome précoce et fait partie d'un système tubulo-vésiculaire appelé CURL (*Compartment of Uncoupling Receptors and Ligands*) (GEUZE *et al.*, 1983). Cet endosome précoce va migrer le long des tubules et sera appelé endosome tardif, endosome II, endosome secondaire ou endosome périnucléaire, il fait partie du CURL périnucléaire. En 1985, WILLINGHAM & PASTAN ont proposé que les termes réceptosome, endosome et CURL identifiés par différents auteurs, désignent en fait les mêmes organites.

L'endosome va ensuite fusionner avec une vésicule lysosomale émanant du réseau trans golgien ou TGN (*Trans Golgi Network*). Le complexe golgien est une suite de compartiments membranaires qui peuvent être distingués selon leur réactivité cytochimique et leurs orientations respectives : le cis-golgi situé face au reticulum, le media golgi et le trans golgi, situé face aux granules sécrétoires (FARQVAR, 1985). Récemment, un quatrième compartiment a été mis en évidence : le TGN, c'est un compartiment hétérologue formé de tubules et de vésicules. Le TGN possède un haut degré de variabilité dans la nature, la taille et la complexité de ses différents constituants (GRIFFITHS *et al.*, 1985, 1988, 1989; GRIFFITHS & SIMMONS, 1986).

III - MECANISMES DE L'ENDOCYTOSE

A - FIXATION SUR LE RECEPTEUR

De nombreux ligands macromoléculaires ou particulaires peuvent se fixer sur les cellules avant d'être internalisés par endocytose adsorptive. Ils peuvent être de nature très variée : hormones, facteur de croissance, lectines, toxines, anticorps, particules virales. La fixation se fait toujours après reconnaissance d'une séquence spécifique.

La spécificité de fixation peut être due à la partie protéique du ligand (EGF) ou à la partie glucidique (asialotransferrine), dans le cas général, le récepteur membranaire reconnaît une séquence spécifique du ligand, dans certains cas (virus, lectines, anticorps), c'est le ligand qui reconnaît des déterminants spécifiques membranaires.

B - FORMATION DU PUIITS RECOUVERT

La formation du puits recouvert peut être antérieure à la fixation des ligands sur les récepteurs ou, au contraire, être consécutive à la formation des complexes récepteur-ligand.

1 - Puits recouverts préformés

La première observation de la présence d'un puits recouvert contenant des récepteurs non couplés à leurs ligands a été faite pour les récepteurs à LDL des fibroblastes humains (ANDERSON *et al.*, 1976, 1977, 1982). Ces auteurs, utilisant des complexes LDL-ferritine puis des anticorps anti-récepteurs fluorescents ont montré que la plupart des

récepteurs étaient présents dans des puits recouverts préformés. La même observation a également été faite pour le récepteur hépatique des asialoglycoprotéines (WALL *et al.*, 1980) et pour le récepteur de la sérotransferrine des cellules KB (WILLINGHAM *et al.*, 1984). Ces derniers auteurs ont montré que les puits recouverts contenant le récepteur de la sérotransferrine étaient constamment internalisés et donnaient naissance à des endosomes même en l'absence de fixation de ligand, les récepteurs étant recyclés par la suite.

2 - Rassemblement des complexes récepteur-ligand dans un puits recouvert

Les premières observations à ce sujet ont été faites avec le récepteur de l'EGF. Ce récepteur, comme beaucoup d'autres, est une protéine transmembranaire qui a la particularité de diffuser latéralement dans la membrane. En absence de fixation de l'EGF sur le récepteur, il a été calculé que, statistiquement, un récepteur de l'EGF rencontre un puits recouvert toutes les trois secondes (PASTAN & WILLINGHAM, 1981). Les mêmes auteurs ont remarqué qu'après fixation des ligands sur les récepteurs membranaires, les complexes formés migraient et s'accumulaient dans les puits recouverts lorsque la température était portée à 37°C. La fixation de l'EGF serait responsable d'un changement de conformation du récepteur, la nouvelle configuration du complexe serait reconnue par un composant qui empêcherait la migration des récepteurs et provoquerait ainsi, à terme, une accumulation des complexes dans les puits recouverts.

Des études récentes ont confirmé que la formation de la vésicule recouverte par vésicularisation du puits recouvert, serait due à un signal porté par la partie cytoplasmique des récepteurs membranaires

(IACOPETTA *et al.*, 1988) et reçu par les "specific assembly proteins" liées à la clathrine (VIRSKY & BENNET, 1988).

C - FORMATION DE L'ENDOSOME

La vésicule endosomale se forme par vésicularisation du puits recouvert qui forme une vésicule recouverte, qui perd son revêtement de clathrine et aboutir à la formation de l'endosome. Ce mécanisme est inhibé par les basses températures (4°C) ou les inhibiteurs de fuseau tels que la colchicine (ANDERSON *et al.*, 1977; HELENIUS *et al.*, 1977; WALL *et al.*, 1980). Après formation de l'endosome, la clathrine retourne vers la membrane où elle pourra se réassocier sur la face interne et reformer d'autres puits recouverts (WILLINGHAM *et al.*, 1981).

Constitutive de la membrane endosomale, une pompe à protons ATP-dépendante a été décrite (XIE & STONE, 1986; 1988 ; ARAI *et al.*, 1988). Après la dépolymérisation de la clathrine, cette pompe provoque une acidification de l'endosome. Le complexe récepteur-ligand, une fois dans l'endosome, peut avoir plusieurs destinées.

D - DEVENIR DES COMPLEXES ENDOCYTES

1 - Cas de la sérotransferrine : recyclage du ligand et du récepteur

L'hypothèse de l'endocytose de la sérotransferrine a été proposée dès 1969 par MORGAN & APPLETON puis confirmée en 1971 par HEMMAPLARDH & MORGAN. De nombreuses études ont depuis été réalisées sur des cellules animales (OCTAVE *et al.*, 1983, 1984) ou humaine en culture (Hep G2 et K562) (CIECHANOVER *et al.*, 1983a, 1983b; GEUZE *et al.*, 1983; KLAUSNER *et*

al., 1983; DAUTRY-VARSAT *et al.*, 1983; DICKSON *et al.*, 1983) et de nombreuses revues générales lui ont été consacrées : DAUTRY-VARSAT & LODISH, (1984), PASTAN & WILLINGHAM, (1985), SUSSMAN *et al.*, (1985), WILEMAN *et al.*, (1985), DAUTRY-VARSAT, (1986) et CRICHTON & CHARLOTEAUX-WAUTERS, (1987).

Le cycle intracellulaire de la sérotransferrine (Fig. 3), représente un cas particulier d'endocytose et d'exocytose. Cette particularité s'explique par les différences d'affinité qu'ont les deux formes de la protéine (saturée en fer et non saturée) pour le récepteur. A pH 7,4, la sérotransferrine diferrique possède une forte affinité pour son récepteur tandis que la sérotransferrine non saturée en fer ne possède qu'une faible affinité pour son récepteur. En revanche, à pH 5, l'aposérotransferrine forme, avec son récepteur, un complexe très stable.

Grâce à la très forte affinité qu'elle possède pour son récepteur à des pH proches de la neutralité, la sérotransferrine se fixe sur son récepteur. Les complexes sont internalisés et se retrouvent dans les endosomes. La pompe à protons ATP-dépendante de la membrane endosomale provoque l'influx de protons H^+ dans le milieu intravésiculaire et finalement, l'acidification de l'intérieur de la vésicule jusqu'à pH 5,0-5,5, le fer est alors libéré de la sérotransferrine alors que cette dernière reste attachée à son récepteur, le complexe reste donc stable. L'endosome est alors dirigé vers la membrane plasmique, par exocytose, les complexes récepteur-sérotransferrine se retrouvent dans le milieu extérieur de pH proche de la neutralité, pH auquel la sérotransferrine dépourvue de fer, peu affine pour son récepteur, s'en détache et est libérée.

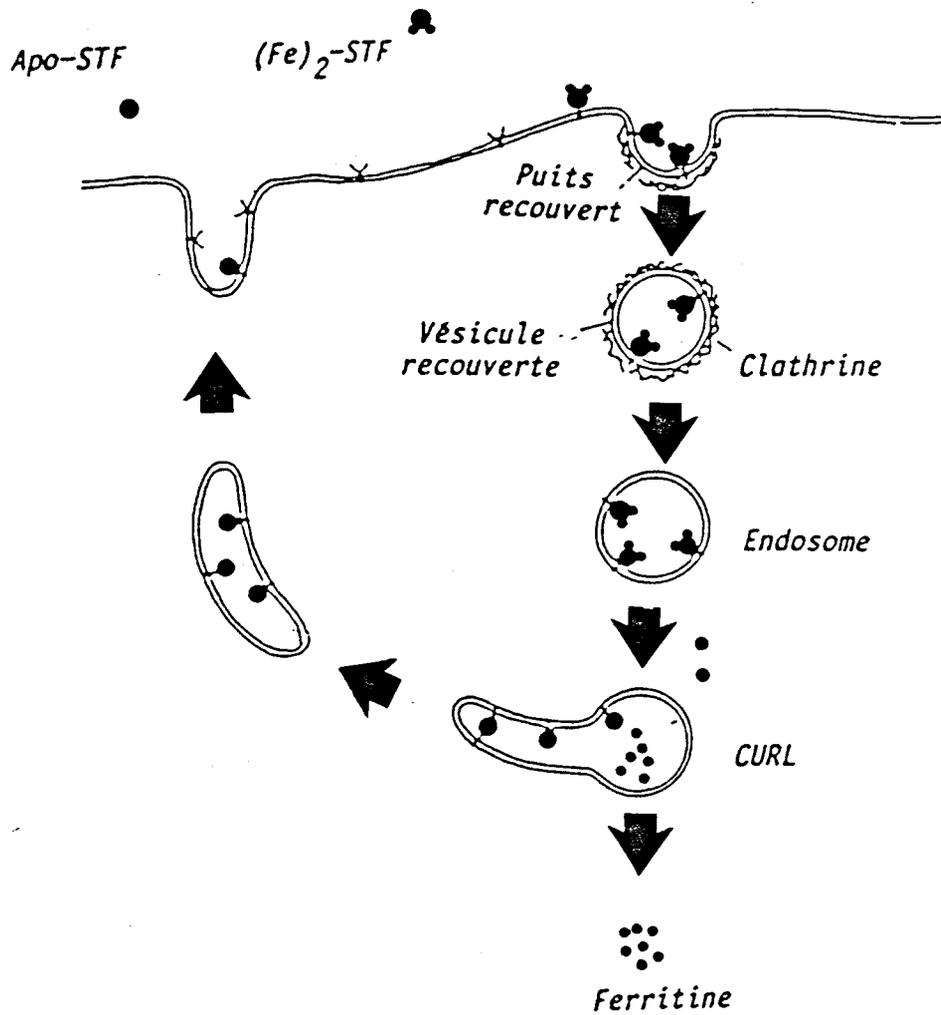


Fig. 3 : ENDOCYTOSE : cas de la sérotransferrine

Recyclage du récepteur et du ligand

(DAUTRY-VARSAT, 1987).

2 - Cas de l'EGF : dégradation du ligand et du récepteur

L'EGF (*Epidermal Growth Factor*), en raison de son importance a fait l'objet d'un grand nombre d'études. Parmi elles, beaucoup ont porté sur son interaction avec des cellules humaines en culture (fibroblastes) et sur son internalisation et son devenir intracellulaire (CARPENTER & COHENS, 1979; HAIGLER *et al.*, 1979; KING *et al.*, 1980a,b, 1981; DICKSON *et al.*, 1983; HANOVER *et al.*, 1984; PASTAN *et al.*, 1985; GORMAN & PORETZ, 1987). Le cas de l'EGF (Fig. 4) représente un cas très différent de celui de la sérotransferrine. En effet, après fixation de l'EGF sur ses récepteurs, lesquels sont disposés de façon homogènes à la surface des cellules et non regroupés dans des puits recouverts (WILLINGHAM & PASTAN, 1982; BEGUINOT *et al.*, 1984), les complexes récepteur-EGF finissent par être concentrés au niveau des puits recouverts et sont internalisés pour finalement aboutir dans un endosome, ce dernier migre le long des microtubules vers la zone périnuculéaire et fusionne avec un lysosome 5 à 10 minutes après l'endocytose, l'EGF et son récepteur seront détruits par les enzymes lysosomaux.

3 - Cas des asialoglycoprotéines : recyclage du récepteur et dégradation du ligand

La clairance des asialoglycoprotéines du sang est assurée par un récepteur hépatique lectinique qui reconnaît les résidus de galactose en position terminale (ASHWELL & MORELL, 1974, 1977). TOLLESHAUG (1981) a proposé un schéma de l'endocytose des asialoglycoprotéines comprenant cinq grandes étapes (Fig. 5) : fixation des ligands sur les récepteurs, internalisation des complexes et formation de vésicules recouvertes, formation de l'endosome par dépolarisation de la clathrine et

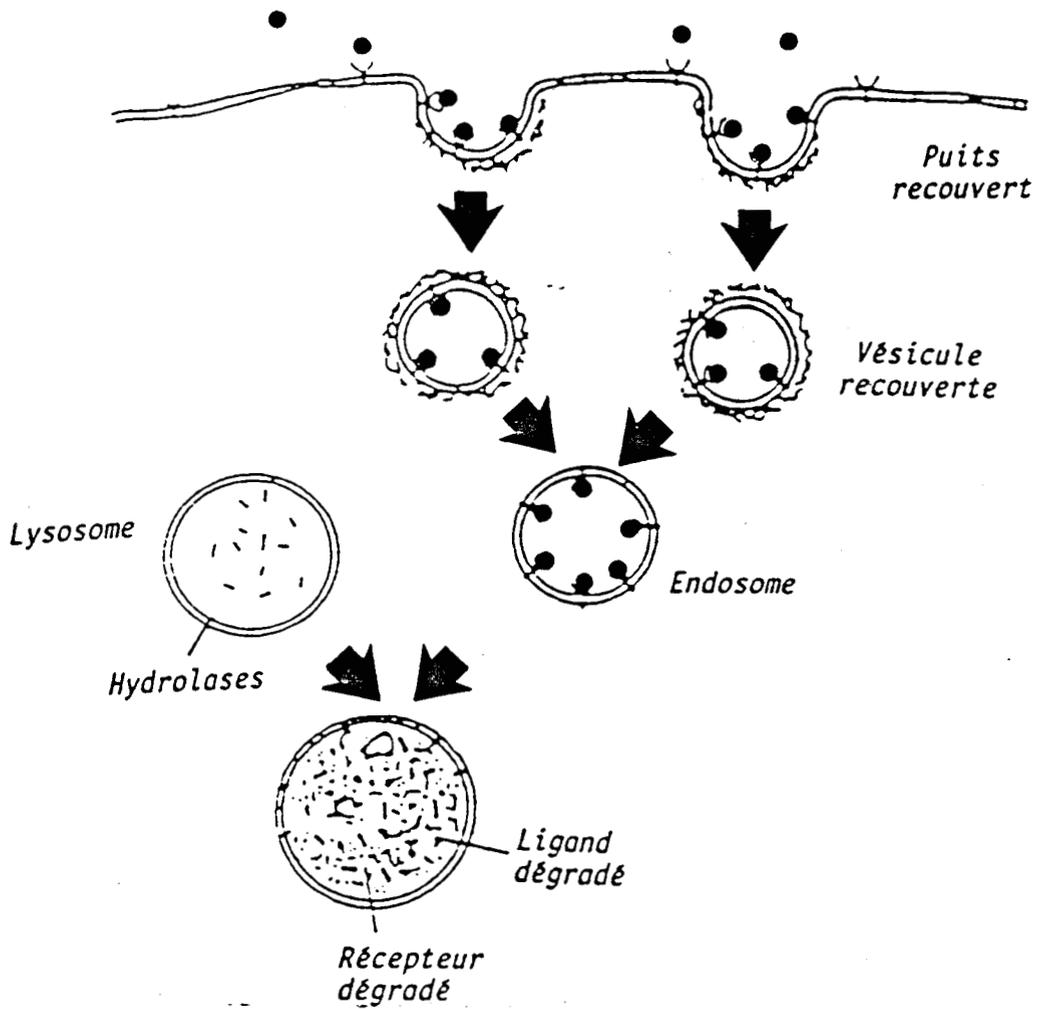


Fig. 4 : ENDOCYTOSE : cas de l'EGF

Dégradation du récepteur et du ligand

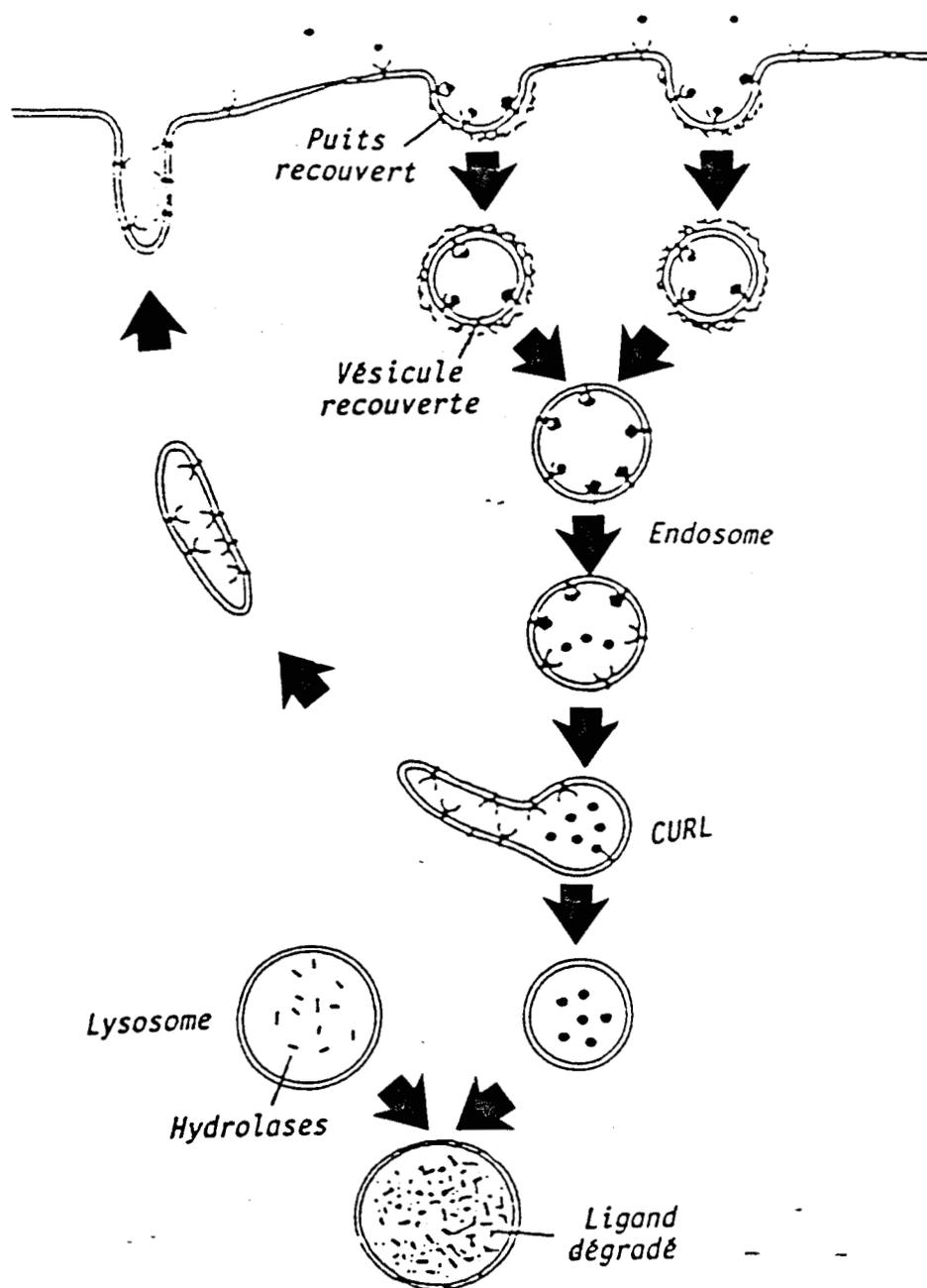


Fig. 5 : ENDOCYTOSE : cas des asialoglycoprotéines

Dégradation du ligand, recyclage du récepteur

(DAUTRY-VARSAT & LODISH, 1984).

acidification de la vésicule endosomale, dégradation lysosomale du ligand et recyclage du récepteur. Le cas du cycle intracellulaire des asialoglycoprotéines représente le cas le plus général. Il existe en effet de nombreux autres cas où le récepteur est recyclé tandis que le ligand (α -2-macroglobuline, insuline, LDL) est dirigé vers les lysosomes pour être dégradé.

La dissociation des complexes récepteur-ligand dans le milieu intérieur de l'endosome est consécutive à la baisse du pH intravésiculaire (BRIDGES *et al.*, 1982; GEUZE *et al.*, 1982, HARFORD *et al.*, 1983; WEIGEL & OKA, 1984. Ce phénomène de dissociation des ligands de leurs récepteurs a donné naissance au concept de CURL (GEUZE *et al.*, 1983, ensemble tubulo-vésiculaire dont font partie les endosomes. Dans le cas d'endosomes ayant un disfonctionnement de la pompe à protons (WILEMAN *et al.*, 1985), les complexes récepteur-ligand ne sont pas dissociés et retournent dans le milieu extérieur par l'exocytose de l'endosome. La dissociation du complexe récepteur-ligand dans l'endosome acide est suivie de la ségrégation entre le récepteur et le ligand, précédant, d'une part, le recyclage du récepteur et, d'autre part, la fusion avec le lysosome et la dégradation du ligand (WOLKOFF *et al.*, 1984).

4 - Cas de la transcytose : transport du ligand d'un pôle à l'autre de la cellule

La transcytose (ou transcytose vectorielle) est le nom donné au transport transcellulaire de nombreux ligands tels que les immunoglobulines (MOSTOV & BLOBEL, 1983; MOSTOV & DEITSHER, 1986), l'insuline (KING & JOHNSON, 1985), l'albumine (GHITESCU *et al.*, 1986), la thyroglobuline (HERZOG, 1983) et d'autres molécules encore. Ce

phénomène est très courant dans les cellules épithéliales, et peut être dans certains cas une voie alternative. Il a été en effet montré que la plupart des cellules épithéliales pouvaient soit diriger le complexe récepteur-ligand vers la voie de la dégradation lysosomale, soit le transporter à travers la cellule (WALL & MAACK, 1985). L'insuline, après avoir s'être fixée sur son récepteur adipocytaire est dégradée dans les lysosomes, néanmoins, une quantité non négligeable de l'insuline fixée est libérée à l'autre pôle de la cellule (MARSHALL, 1985). Dans le cas de l'EGF et de son récepteur des cellules MDKC (Madin-Darby Kidney Cell), il a été constaté que la protéine internalisée pouvait être transportée d'un pôle à l'autre de la cellule, ou être dégradée ou encore être recyclée, c'est à dire exocytée du côté où elle avait été internalisée (MARATOS-FLIER *et al.*, 1987). Il a été postulé que la phosphorylation des résidus de sérine des récepteurs serait responsable de l'engagement des complexes dans une voie ou dans une autre (BEGUINOT *et al.*, 1985; NAMBI *et al.*, 1985).

Dans le cas de l'entérocyte, un transport transépithélial de certaines protéines a été démontré, notamment pour la HRP (*HorseRadish Peroxidase*) dont la transcytose a été mise en évidence chez différentes espèces de mammifères, dont l'Homme et dans un modèle de cellules intestinales humaines en culture : les cellules Caco-2 (HEYMAN *et al.*, 1982, 1986, 1988, 1990); et pour les protéines du lait (MARCON-GENTY *et al.*, 1989), pour lesquelles il a été montré que 90 % sont dégradées par voie lysosomale et 10 % transportées sous une forme intacte et antigéniquement active à l'autre pôle de la cellule.

5 - Cas des virus et des toxines : libération du ligand dans le cytosol

Les quatre processus décrits auparavant correspondent aux

différents moyens utilisés par les cellules pour internaliser et utiliser les molécules biologiques, souvent sécrétées par l'organisme auquel appartiennent les cellules. Il existe d'autres cas où les cellules internalisent des particules ou molécules biologiques provenant d'autres organismes. Ainsi, la plupart des virus et de toxines bactériennes ou végétales peuvent se fixer sur des sites de la membrane plasmique (OLSNES & SANDVIG, 1985), par exemple, la toxine de la graine de ricin (*Ricinus communis* L) se fixe sur les résidus de galactose des glycoprotéines membranaires grâce à une lectine RCA II (*Ricinus Communis Agglutinin II*) (OLSNES & PIHL, 1982). La toxine cholérique et la toxine d'*E. coli* peuvent se lier aux gangliosides membranaires GM1 (HOLMGREN, 1981). Après la fixation, ces composés sont internalisés via la formation d'une vésicule recouverte, puis d'un endosome. Une fois que l'endosome a perdu son revêtement de clathrine, l'action de la particule virale ou de la toxine provoque la rupture de la membrane endosomale et la libération dans le cytoplasme du contenu de l'endosome (DICKSON et al., 1981; KEEN et al., 1982; FITZGERALD et al., 1983).

IV - CONCLUSION

Les cellules HT 29 différenciées en entérocytes vont permettre d'étudier les modalités d'internalisation de la lactotransferrine. En effet, si l'endocytose de la sérotransferrine est bien connue, aucune étude de l'internalisation de la lactotransferrine n'a jusqu'à présent été décrite. La connaissance de ce phénomène permettra de savoir si, comme la sérotransferrine, la lactotransferrine possède un cycle intracellulaire particulier ou si, au contraire, l'endocytose de la lactotransferrine est similaire aux divers cas généraux décrits dans ce chapitre.

RESULTATS PERSONNELS

I - INTRODUCTION

II - MATERIELS ET METHODES

III - RESULTATS

* 1^{ère} partie: Etude de la fixation de la lactotransferrine et de la sérotransferrine humaines par les cellules HT 29 différenciées et indifférenciées.

* 2^{ème} partie: Etude de l'internalisation de la lactotransferrine humaine par les cellules HT 29 différenciées en entérocytes

IV - CONCLUSION ET DISCUSSION

I - INTRODUCTION

Le but principal de cette étude est de savoir si les cellules HT 29 Glc(-) différenciées en entérocytes possèdent des récepteurs pour la lactotransferrine humaine. La présence de ces récepteurs a également été recherchée sur la souche indifférenciée des cellules HT 29 afin de voir si l'expression du récepteur pouvant être une des manifestations de la différenciation entérocytaire des cellules HT 29.

L'étude de la fixation de la lactotransferrine sur des fractions cellulaires solubilisées a été également entreprise. Cette technique nous a permis d'étudier l'évolution du nombre et de la localisation des récepteurs de la lactotransferrine.

Toutes les études réalisées avec la lactotransferrine humaine ont été répétées avec la sérotransferrine dans le but de comparer le comportement de ces deux transferrines vis-à-vis des deux souches de cellules HT 29.

Enfin, après avoir mis en évidence la présence de récepteurs membranaires de la lactotransferrine dans les cellules HT 29 différenciées en entérocytes, nous avons entrepris l'étude de l'internalisation de la lactotransferrine par ces cellules.

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à définir la cinétique d'internalisation de la lactotransferrine. Puis l'étude a été poursuivie par celle de la localisation et de la dégradation de la lactotransferrine internalisée.

Les résultats obtenus ont été confirmés par l'utilisation d'inhibiteurs de l'endocytose et des lysosomes.

II MATERIELS ET METHODES

A - MATERIEL CELLULAIRE

1 - CULTURE DES CELLULES

Les cellules HT 29 ont été établies en culture permanente à partir d'un adénocarcinome colique humain (FOGH & TREMPE, 1975). Le milieu de base pour la culture des lignées différenciées et indifférenciées des cellules HT 29 est le Milieu Essentiel de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) préparé sans glucose (Eurobio, France). Ce milieu est complété par 2,5 mM d'inosine (Sigma, USA), 1 % de pénicilline-streptomycine et 10 % de sérum de Veau foetal décomplémenté (30 min à 56°C) et dialysé pendant 3 jours contre une solution isotonique de chlorure de sodium (150 mM) afin d'éliminer toute trace de glucose présent dans le sérum.

a - Cellules indifférenciées.

Les cellules HT 29 indifférenciées se multiplient dans le milieu décrit plus haut, complété par du glucose (25 mM) et de l'inosine (2.5 mM). Ces cellules, dénommées HT 29 Glc(+), sont entretenues par repiquage hebdomadaire. Les cellules préconfluentes (7^{ème} jour) sont détachées par trypsinisation (0,25 % de trypsine dans une solution de tampon phosphate salin (PBS)) de pH 7,4 contenant 3 mM d'EDTA pendant 10 min à 37°C. Les cellules détachées sont recueillies par centrifugation

Les souches différenciées et indifférenciées des cellules HT 29 nous ont été fournies par le Dr. G. TRUGNAN (Unité de Recherche sur le Métabolisme et la Différenciation des Cellules en Culture, INSERM U 178, Hôpital Broussais, Paris) que nous remercions vivement.

et resuspendues dans du milieu contenant 10 % de SVF ; le sérum de Veau, riche en inhibiteurs de la trypsine, arrête l'action de l'enzyme. Les cellules sont ensuite rincées dans ce milieu par centrifugation et resuspension. Le nombre de cellules vivantes est estimé par comptage dans une cellule de Malassez après coloration par le Bleu Trypan. Les cellules sontensemencées à la concentration de 10^6 cellules par 25 cm^2 et laissées au repos pendant 48 h.

b - Cellules différenciées.

Pour ces cellules, le milieu décrit plus haut (DMEM + 10 % SVF) est utilisé sans adjonction de glucose; ce dernier étant l'agent dont l'absence contribue à induire et à maintenir la différenciation. En absence de glucose, la source carbonée utilisée par les cellules, que nous appellerons désormais HT 29 Glc(-), est l'inosine. Concernant l'entretien de la souche, les manipulations sont identiques à celles décrites plus haut pour les cellules HT 29 Glc(+). Dans le cas des cellules HT 29 Glc(-), le glucose libéré par le métabolisme cellulaire peut provoquer la dédifférenciation et la mort des cellules, c'est pourquoi le changement quotidien du milieu est nécessaire.

2 - PREPARATION DES EXTRAITS CELLULAIRES

a - Préparation des homogénats cellulaires.

Les différents extraits cellulaires que nous avons utilisés ont été préparés par la méthode de SCHMITZ *et al.* (1973). Les cellules sont détachées à 4°C à l'aide d'un grattoir dans 2 ml de tampon Tris (2mM), mannitol (50 mM), pH 7,1 contenant les inhibiteurs de protéases suivants

dans les concentrations indiquées : antipaïne (1 µg/ml), benzamidine (17,5 µg/ml), phényl-méthyl-sulfonylfluoride (PMSF, 1mM), pepstatine (1µg/l) et aprotinine (10 µg/ml). Les cellules sont transférées dans un homogénéiseur de Dounce et homogénéisées dans le tampon décrit plus haut à 4°C (une vingtaine d'allers-et-retours). L'homogénat obtenu est ensuite soumis à sonication (30 secondes).

A partir de cet homogénat obtenu de la même façon des cellules HT 29 Glc(-) et Glc(+), deux protocoles différents sont utilisés pour la préparation des extraits des deux souches.

α - Préparation d'extraits cellulaires de HT 29 Glc(+).

L'homogénat obtenu, que nous appellerons H(+), est additionné de CaCl₂ jusqu'à la concentration finale de 18 mM et laissé au repos 30 min dans la glace. Par centrifugation (2000 g, 20 min, 4°C), deux fractions ont été obtenues :

- S(+), qui représente la partie cytosolique ainsi que les organites intracellulaires ;
- P(+), qui représente la fraction membranaire à laquelle sont associés les noyaux et les débris cellulaires précipités.

β - Préparation d'extraits cellulaires de HT 29 Glc(-).

L'homogénat cellulaire (H) provenant des cellules HT 29 Glc(-) est additionné de CaCl₂ jusqu'à la concentration de 18 mM. Il est laissé au repos pendant 30 min à 4°C et agité de temps en temps. Puis une centrifugation (950 g, 10 min, 4°C) donne deux fractions : P1 et S1. P1 correspond selon SCHMITZ *et al.* (1973) aux membranes basolatérales qui précipitent en présence du chlorure de calcium, aux noyaux et aux autres

débris cellulaires insolubles. La fraction S1 est centrifugée (33 500 g, 30 min, 4°C) pour obtenir deux fractions : S2 qui représente la fraction cytosolique, et P2, fraction enrichie en vésicules de bordure en brosse. Le culot P2 est resuspendu dans un tampon phosphate de sodium (10 mM), pH 6.9 et utilisé de suite ou congelé à -40°C jusqu'à utilisation.

3 - DOSAGE DES ENZYMES MARQUEURS.

L'activité de différents enzymes marqueurs de la bordure en brosse est mesurée dans les différentes fractions préparées afin de suivre la différenciation des cellules HT 29 Glc(-). En effet, les hydrolases membranaires des entérocytes ont été décrites comme étant présentes dans les cellules différenciées et absentes des cellules indifférenciées (PINTO *et al.*, 1982 ; ZWEIBAUM *et al.*, 1983 ; WICE *et al.*, 1985 ; ZWEIBAUM, 1986).

Les activités sucrase-isomaltase (EC 3.3.1.48) et aminopeptidase-N (EC 3.4.14.5) sont déterminées selon les méthodes respectives de MESSER & DAHLQVIST (1966) et de MAROUX *et al.* (1973) utilisant la L-alanine p-nitroanilide comme substrat.

4 - SOLUBILISATION DES EXTRAITS MEMBRANAIRES.

Les différents extraits cellulaires ont été solubilisés par le Triton X-100 selon la technique et dans les conditions utilisées au laboratoire pour solubiliser les vésicules de la bordure en brosse d'entérocytes de Souris (HU *et al.*, 1988). Les culots [P1, P2 ou P(+)] sont resuspendus dans un tampon contenant NaOH/Mes 10 mM, pH 7,4 ; NaCl 150 mM, 0,1 % (p/v) Triton X-100 et les inhibiteurs de protéases décrits plus haut. Après sonication (2 min) les homogénats sont laissés dans la

glace pendant 30 min et agités périodiquement. Les homogénats sont ensuite centrifugés (120 000 g, 4°C, 60 min). Les surnageants sont recueillis et utilisés de suite ou conservés à -40°C pour utilisation ultérieure.

B - PREPARATION DES TRANSFERRINES

1 - PURIFICATION DE LA LACTOTRANSFERRINE

La méthode utilisée pour préparer la lactotransferrine humaine est celle mise au point au Laboratoire (CHERON *et al.*, 1977 ; SPIK *et al.*, 1982). Le lait est délipidé (45 min, 2000 g, 4°C) et décaséiné par précipitation de la caséine à pH 4,6 avec de l'HCl 3 N. Après dialyse pendant 3 jours contre de l'eau permutée, le précipité est éliminé par centrifugation (2000 g, 30 min, 4°C).

Le lactosérum obtenu est chromatographié à 4°C sur une colonne de SP-Sephadex G-50 stabilisée dans l'acétate de sodium 0,22 M . Après lavage par une solution d'acétate de sodium 0,22 puis 0,4 M, la lactotransferrine est éluée par une solution d'acétate de sodium 1 M. L'éluat est ramené à une concentration en acétate de sodium de 0,22 M et réinjecté sur une colonne de SP-Sephadex G-50, l'élution se fait par un gradient discontinu en acétate de sodium de 0,3 à 1 M.

2 - PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE NON SATURÉE EN FER

L'apo-lactotransferrine est préparée selon la méthode mise au point et décrite par MAZURIER *et al.* (1983). La lactotransferrine native est dissoute dans un tampon formiate de sodium 0,2 M, phosphate de sodium

0,2 M, EDTA 40 mM, pH 4 et laissée au repos pendant 24 h à 4°C. La solution est ensuite dialysée 3 jours contre le tampon d'utilisation.

3 - SATURATION EN FER DE LA LACTOTRANSFERRINE

La protéine est dissoute dans un tampon acétate de sodium 0,1 M, bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 8,2 (tampon d'AZARI & BAUGH, 1967). Le fer est ajouté sous forme de citrate ferrique (obtenu en dissolvant 260 mg de chlorure de fer ($\text{FeCl}_3, 6 \text{H}_2\text{O}$) dans 10 ml du tampon décrit plus haut (acétate/bicarbonate). 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 110 % de la quantité théorique. Après 3 heures de repos, le fer libre est éliminé par dessalage sur une colonne de Sephadex G-25 équilibrée dans le tampon d'utilisation.

4 - PREPARATION DES SEROTRANSFERRINES

La sérotransferrine nous est fournie par la firme Behring. Les méthodes de saturation et de désaturation de la sérotransferrine sont les mêmes que celles utilisées pour la lactotransferrine et déjà décrites.

5 - MARQUAGE DES TRANSFERRINES

La méthode de marquage utilisée est la méthode à l'Iodo-Gen, selon la technique décrite par la firme Pierce.

a - Réactifs.

L'Iodo-Gen (1,3,4,6-tétrachloro-3a,6a-diphényl glucoril est dissous dans du chloroforme (1 mg/ml). Des fractions de 200 µl sont réparties dans des tubes en verre et le chloroforme est éliminé par évaporation sous azote.

L'iode radioactif (Na^{125}I) sans entraîneur (3,7 MBq/ml, 300 mCi/ml) est fourni par la firme Amersham.

b - Mode opératoire.

La protéine est dissoute dans le PBS (0,4 mg/ 0,2 ml), la solution est additionné 2 µl de Na^{125}I dans le tube contenant l'Iodo-Gen. La réaction est effectuée à 4°C, sous agitation. Au bout de 20 min, la solution est dessalée sur une colonne de Sephadex G-25 (2 x 15 cm) équilibrée dans le PBS. Des fractions de 200 µl sont recueillies, leur radioactivité est mesurée dans un compteur gamma (Compugamma, LKB). Les rendements de marquage sont de l'ordre de 90 %. Les radioactivités spécifiques sont de l'ordre de 1 à 2 x 10⁶ cpm/µg.

C ETUDE DE L'INTERACTION DES TRANSFERRINES AVEC LES CELLULES HT 29

1 - FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE

Les cellules, mises en culture selon les conditions précédemment décrites, sont lavées par du milieu de culture et mises à incuber pendant une heure à 4°C dans du milieu de culture.

Les boîtes de puits (Nunc-Delta ou Limbro) sont alors vidées et le milieu rajouté (DMEM + SVF 10 %) contient des concentrations croissantes en lactotransferrine radio-iodée. Le volume de réaction est de 300 µl pour les boîtes de 24 puits (Limbro) et de 400 µl pour les boîtes de 12

puits (Nunc-Delta). Les incubations se font pendant une heure à 4°C dans une chambre d'incubation saturée en CO₂.

Chaque concentration de lactotransferrine est utilisée en triple exemplaire. Afin d'estimer la fixation non spécifique, certaines incubations sont réalisées en présence de lactotransferrine non marquée 100 fois en excès molaire.

En fin d'incubation, une fraction aliquote est prélevée afin de déterminer la quantité de lactotransferrine libre. La réaction est ensuite arrêtée par élimination du milieu réactionnel. Les cellules sont ensuite lavées trois fois par du PBS complété par du CaCl₂ 10 mM. Les cellules sont récupérées par de la soude 0,1 N (2 x 150 µl pour les boîtes de 24 puits et 2 x 200 µl pour les boîtes de 12 puits) et la radioactivité attachée aux cellules est ensuite comptée.

Dans le cas de l'étude de la fixation de l'apo-lactotransferrine, le milieu de fixation est préparé avec du DMEM spécialement préparé sans fer.

2 - FIXATION DE LA SEROTRANSFERRINE

Pour l'étude de la fixation de la sérotransferrine, le milieu d'incubation est le DMEM complété par de la sérum albumine bovine à la concentration de 1%. Le sérum de Veau foetal, utilisé pour l'étude de la fixation de la lactotransferrine contient de la sérotransferrine bovine qui pourrait interférer dans le dosage du récepteur.

3 - DOSAGE DES PROTEINES

La concentration en protéines est déterminée selon la méthode de LOWRY et al. (1951) modifiée par PETERSON (1977).

4 - EXPRESSION DES RESULTATS

Après détermination des quantités de protéine libre en fin d'incubation et fixée spécifiquement et non spécifiquement et après soustraction de la quantité de protéine fixée non spécifiquement, les résultats sont exprimés d'une part sous la forme de la courbe de saturation donnant la quantité de protéine fixée en fonction de la quantité de protéine libre dans le milieu en fin d'incubation et, d'autre part, selon la représentation de SCATCHARD (1949).

Le représentation selon Scatchard fait apparaître l'existence d'une ou de plusieurs catégories de sites de fixation d'un ligand sur ses récepteurs membranaires. En représentant la quantité de ligand fixé (B) divisée par la quantité de ligand libre (F) en fonction de la concentration en ligand fixé, on obtient une droite dont la pente est égale à $-K_a$ qui représente la constante d'affinité (dont l'inverse donne le K_d ou constante de dissociation) et dont l'intersection avec l'axe des abscisses donne n qui est le nombre de sites par cellule.

5 - CINETIQUE DE FIXATION

La cinétique de fixation de la lactotransferrine humaine sur les cellules HT 29 Glc(-) a été déterminée à 4°C. Les cellules sont mises à incuber avec du milieu (DMEM + 10 % SVF) contenant une concentration fixe de lactotransferrine (200 nM). A des temps variés, la réaction est arrêtée par aspiration du milieu, les cellules sont lavées trois fois par du PBS, décrochées mécaniquement dans du PBS et leur radioactivité est mesurée dans un compteur gamma.

6 - ETUDE DE LA REVERSIBILITE DE FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE

La réversibilité de fixation de la lactotransferrine sur les cellules HT 29 Glc(-) a été vérifiée en incubant les cellules avec du milieu (DMEM + 10 % SVF) contenant de la lactotransferrine radio-iodée à la concentration de 200 nM. Au bout de 15 min (plateau de saturation atteint), 100 µl de solution de lactotransferrine non marquée (10 mg/ml) sont ajoutés. A la suite de l'addition du ligand froid, la réaction est arrêtée à des temps variés par aspiration du milieu, les cellules sont lavées trois fois comme pour l'étude de la cinétique de fixation.

D - ETUDE DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE ET DE LA SEROTRANSFERRINE SUR LES EXTRAITS CELLULAIRES SOLUBILISES ET DEPOSES SUR MEMBRANE DE NITROCELLULOSE.

Les études ont été réalisées afin d'étudier, d'une part, l'influence du pH sur la fixation des transferrines et, d'autre part, la fixation de ces protéines sur des compartiments cellulaires inaccessibles lors de l'étude sur des cellules entières en culture.

1 - EFFET DU pH DU MILIEU SUR LA FIXATION DES TRANSFERRINES SUR LES EXTRAITS CELLULAIRES SOLUBILISES DES CELLULES HT 29 Glc(-).

L'effet du pH a été étudié en incubant les carrés de membrane nitrocellulose entre pH 5 et 8 dans les conditions suivantes :

-pH 5 : 25 mM d'acétate de sodium ; -pH 6 : 25 mM de Mes ; -pH 7 : 25 mM de Mops ; -pH 8 : 25 mM de Tris ; tous les tampons contenant 10 mM CaCl_2 , 0,25 M NaCl et 0,1 % Triton X-100.

Lorsque les études ont été réalisées avec des transferrines desaturées en fer, le milieu d'incubation a été complétement avec 100 μ M de desferrioxamine afin d'empêcher les transferrines de se charger du fer éventuellement contenu dans le milieu.

**2 - ETUDE DE LA FIXATION A pH 7,4 DES TRANSFERRINES SUR LES
FRACTIONS SUBCELLULAIRES SOLUBILISEES DES CELLULES HT 29 Glc(-)
ET Glc(+) AGEES DE 20 JOURS**

Les différents extraits cellulaires solubilisés sont déposés sur des carrés de nitrocellulose (1 x 1 cm). La feuille de nitrocellulose est ensuite saturée dans le tampon d'incubation : NaOH/Mes (pH 7,4), NaCl 150 mM, 0,1 % Triton X-100 dans lequel du Triton est rajouté jusqu'à atteindre la concentration de 2 %. La feuille de nitrocellulose est ensuite incubée dans le milieu d'incubation contenant des concentrations variables de transferrine radio-iodée. Après lavage par le PBS (2 fois), la feuille de nitrocellulose est séchée, découpée et chaque carré est compté au compteur gamma. La fixation non spécifique est estimée de deux façons: en incubant certains carrés de nitrocellulose (sur lesquels a été déposé du matériel cellulaire solubilisé) en présence d'un fort excès molaire (x 100) de transferrine non marquée, et, d'autre part, en incubant des carrés de nitrocellulose vierges dans les mêmes conditions que les carrés de nitrocellulose sur lesquels du matériel cellulaire a été déposé.

**3 - ETUDE DE LA FIXATION DES TRANSFERRINES SUR LES FRACTIONS
OBTENUES A PARTIR DE CELLULES HT 29 Glc(-) D'AGES DIFFERENTS.**

L'étude a été entreprise sur des cellules âgées de 5, 12, 19 et 26

jours, dans les conditions décrites plus haut (pH 7,4), afin de suivre l'évolution, au cours du temps, la fixation des transferrines dans les différentes fractions.

E - ETUDE CINÉTIQUE DE L'INTERNALISATION

Dans un premier temps, les cellules et les différents milieux réactionnels sont amenés à la température de 4°C pendant 30 min.

Les cellules sont incubées pendant 1 h à 4°C avec du milieu de culture sans sérum de Veau foetal, contenant de la lactotransferrine humaine radio-iodée à une concentration saturante (de 100 à 200 nM). Pendant cette première étape, dite de saturation des sites de fixation, la lactotransferrine se fixe sur ses récepteurs membranaires à une température qui inhibe tout mouvement ou métabolisme membranaire. Après une heure, le milieu est aspiré et les cellules sont lavées trois fois par du PBS froid.

Les cellules sont ensuite mises à incuber à 36°C dans du milieu de culture (sans sérum de Veau foetal), sans lactotransferrine et préchauffé à 36°C durant 30 min. Cette seconde incubation, qui permet au métabolisme cellulaire, et membranaire en particulier, de s'exprimer dure des temps qui varient, selon les expériences, de 1 à 90 min. Au temps d'arrêt de la réaction, les cellules sont placées dans la glace, le milieu est enlevé et conservé pour analyse, les cellules sont ensuite lavées trois fois par du PBS froid.

Les cellules sont traitées pendant 10 min par de l'acide acétique 0,2 M dans du NaCl 500 mM (HAIGLER *et al.*, 1980). Ce tampon acide a pour effet de faire cesser toute interaction entre la lactotransferrine et ses récepteurs membranaires. Recueilli par aspiration, le milieu sera ensuite analysé et rendra compte de la lactotransferrine marquée encore

fixée sur les membranes en fin d'incubation à 36°C. Les cellules sont ensuite lavées trois fois par du PBS froid.

Les cellules sont ensuite décrochées par grattage mécanique dans du PBS contenant les inhibiteurs de protéases suivants (1mM) : PMSF, DTT, aprotinine et O-phénanthroline. La radioactivité encore liée aux cellules après traitement par l'acide sera mesurée et rendra compte de la radioactivité intracellulaire.

Un certain nombre de contrôles ont été nécessaires pour confirmer ou affiner les résultats obtenus :

a) Afin de déterminer la spécificité des phénomènes enregistrés, certaines incubations ont été réalisées de la même façon que précédemment avec, toutefois, une différence au niveau de la première incubation, faite en présence d'un fort excès molaire (100 x) en lactotransferrine non marquée.

b) Afin de faire la différence entre les phénomènes actifs spécifiques et les phénomènes aspécifiques tels que la dissociation de la lactotransferrine des membranes lors de l'incubation à 36°C par la simple loi de l'équilibre, des incubations à 4°C ont été réalisées parallèlement aux incubations à 36°C. Hormis la température, il n'y a pas de différence au niveau du protocole, notamment après la saturation à la suite de laquelle le milieu est aspiré, les cellules lavées et du milieu non radioactif est ajouté.

F - ETUDE DE LA LOCALISATION CELLULAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE

INTERNALISEE

Poursuivant notre étude de l'internalisation de la

lactotransferrine par les cellules HT 29 Glc(-), nous avons recherché la localisation intracellulaire de la lactotransferrine internalisée par les cellules.

Pour cela, les cellules ont été incubées de la même façon que précédemment, c'est à dire successivement à 4°C avec de la lactotransferrine radio-iodée, puis après une étape de rinçage, à 36°C dans du milieu ne renfermant pas de lactotransferrine.

1 - CENTRIFUGATION DES HOMOGENATS CELLULAIRES

Après décrochage acide de la lactotransferrine marquée résiduellement attachée aux membranes et lavage des cellules, ces dernières ont été détachées par grattage mécanique dans 6 ml de tampon Hépés 20 mM, saccharose 250 mM, pH 7,5 supplémenté avec les inhibiteurs de protéases suivants (1 mM): PMSF, DTT, aprotinine et O-phénanthroline. Les cellules sont lysées (Dounce puis sonication) et les membranes et les noyaux éliminés par centrifugation (15 min, 10 000 rpm, 4°C). A 5,5 ml de surnageant, 4,5 ml de Percoll (Pharmacia) contenant de l'Hépés (20 mM) et du saccharose (250 mM) sont ajoutés et le mélange est amené pH 7,5, l'ensemble est centrifugé (90 min, 60 000 rpm, 4°C). Après centrifugation, 20 fractions de 500 µl sont recueillies pour analyse des enzymes marqueurs et comptage de la radioactivité.

2 - DOSAGES DES ENZYMES MARQUEURS

a - Enzymes marqueurs des compartiments lysosomiaux

La phosphatase acide et la N-acétyl-β-D-hexosamidase ont

été choisies comme enzymes marqueurs du lysosome. Elles ont été dosées selon la méthode établie par BARRETT (1972) avec le para-nitrophényl phosphate (PNP-P) et le para-nitrophényl- β -D-N-acétylglucosaminide (PNP-G) comme substrat.

Brièvement, à 100 μ l d'extrait à doser sont ajoutés 50 μ l de tampon acétate 100 mM (pH 4) et 50 μ l de PNP-P ou de PNP-G en tampon acétate (pH 4) de manière à obtenir une concentration finale en substrat de 2mM.

Le milieu réactionnel est ensuite incubé à 36°C pendant 30 min. La réaction est arrêtée par addition d'un volume d'éthanol à -20°C, l'ensemble est centrifugé (10 min, 3000 rpm). A 200 μ l de surnageant sont ajoutés 300 μ l de Na_2CO_3 1M, si la réaction est positive, il se développe une coloration jaune ayant un maximum d'absorption à 420 nm.

b - Enzyme marqueur de l'appareil de Golgi

La sialyltransferase a été choisie comme enzyme marqueur de l'appareil de Golgi. Le protocole de dosage est celui établi par Beauvois *et al.* (1982), utilisant l'asialofétuine comme accepteur exogène.

G - ETUDE DE LA DEGRADATION DE LA LACTOTRANSFERRINE APRES INTERNALISATION

La lactotransferrine humaine que nous avons utilisée pour cette étude a été chromatographiée sur une colonne de Sephadex G-75 (1,2 m x 1,5 cm) afin d'obtenir une protéine pure, débarassée des fragments d'hydrolyse trypsique ménagée qui la contaminent.

Afin d'éviter toute erreur d'interprétation due à la présence d'iode libre contaminant la protéine après marquage, la

lactotransferrine a été dessalée, avant les manipulations, sur une colonne de Sephadex G-75 (30 x 0,9 cm).

Les cellules sont incubées successivement à 4°C puis à 36°C avec de la lactotransferrine marquée. Trois fractions sont recueillies à chaque temps étudié qui sont les milieux d'incubation à 36°C, les fractions membranaires et les fractions intracellulaires recueillies de la façon suivante : après lavage, les cellules sont détachées dans 1 ml de PBS (avec les agents antiprotéasiques déjà décrits) et homogénéisées, la fraction intracellulaire est préparée par centrifugation de l'homogénat.

Les trois fractions recueillies après différents temps d'incubation à 36°C sont ensuite déposées sur la colonne de Sephadex G-75 décrite précédemment (30 x 0,9 cm), 20 fractions de 0,5 ml sont recueillies la radioactivité de chaque fraction est mesurée.

Cette colonne de Sephadex G-75 a également été calibrée avec de la lactotransferrine bovine et les fragments d'hydrolyse trypsique de cette protéine (le domaine "N", le domaine "C" et le domaine "N2", ceci afin de vérifier que la résolution de la colonne n'était pas suffisante pour séparer les divers fragments de la protéine. Il a été en effet constaté que la lactotransferrine bovine avait, sur la colonne de Sephadex G-75 utilisée, le même profil d'élution que ses fragments d'hydrolyse trypsique.

H - EFFETS DES INHIBITEURS SUR L'INTERNALISATION DE LA LACTOTRANSFERRINE

Quatre inhibiteurs différents ont été utilisés pour déterminer leurs effets sur l'internalisation de la lactotransferrine par les cellules HT 29 Glc(-)

- La colchicine, qui est un inhibiteur des microtubules et qui empêche les mouvements d'endocytose ;

- Le carbonyl cyanide chlorophénylhydrazine (CCC) et la monensine qui bloquent le fonctionnement de la pompe à protons des vésicules acides de la cellule et empêche ainsi le fonctionnement des enzymes de ces compartiments ;

- La chloroquine, amine exogène qui inhibe l'acidification des vésicules acides.

1 - DETERMINATION DE LA CONCENTRATION EFFICACE DES INHIBITEURS

Afin de déterminer la concentration efficace de chaque inhibiteur, les cellules HT 29 Glc(-) ont été traitées avec différentes concentrations de chaque inhibiteur (de 10 μ M à 10 mM) . C'est à dire la concentration maximale qui permet la survie des cellules jusqu'en fin d'expérimentation.

Les cellules sont traitées avec chaque concentration en inhibiteur de la manière suivante:

- Préincubation de 30 min à 36°C avec l'inhibiteur étudié puis mise à température des cellules à 4°C pendant 30 min ;

- Le milieu est ensuite changé par du milieu refroidi (4°C) contenant la concentration en inhibiteur étudiée, les cellules sont laissées à 4°C pendant 60 min ;

- Changement de milieu par du milieu préchauffé à 36°C contenant la même concentration en inhibiteur et incubation pendant une heure à 36°C (durée maximale des manipulations réalisées en présence d'inhibiteur) ;

- Le milieu est ensuite enlevé et les cellules sont traitées par le bleu Trypan et examinées au microscope afin d'évaluer leur viabilité après les différentes manipulations de milieu et de température.

La concentration choisie pour chaque inhibiteur est celle pour laquelle plus de 95 % des cellules sont vivantes (non colorées par le bleu Trypan) en fin de traitement.

Les concentrations efficaces en inhibiteurs ainsi déterminées sont les suivantes : 10 μM pour la colchicine, 1 mM pour la monensine et 100 μM pour le CCC et la chloroquine.

2 - ETUDE DES EFFETS DES INHIBITEURS SUR L'INTERNALISATION ET LE DEVENIR DE LA LACTOTRANSFERRINE

Pour chaque expérience, les cellules, avant le traitement à 4°C, sont incubées pendant 30 min avec l'inhibiteur à la concentration déterminée préalablement. L'étude cinétique de l'internalisation de la lactotransferrine en présence d'inhibiteur est réalisée de la même façon que l'étude en absence d'inhibiteur. Chaque milieu d'incubation contenant l'inhibiteur à sa concentration définie comme efficace.

L'étude de la localisation de la lactotransferrine internalisée et l'étude de la dégradation de la protéine sont réalisées de la même façon en présence d'inhibiteurs qu'elles l'avaient été sans inhibiteur.

RESULTATS 1^{ère} PARTIE

**Etude de la fixation de la
lactotransferrine et de
la sérotransferrine humaines
par les cellules HT 29
différenciées
et indifférenciées**

**A - COMPARAISON DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERINE ET DE LA
SEROTRANSFERRINE NON SATUREES EN FER SUR LES CELLULES HT 29
DIFFERENCIIEES ET NON DIFFERENCIIEES**

**1 - COMPARAISON DE LA DIFFERENCIATION DES CELLULES HT 29 Glc(-) ET
HT 29 Glc(+)**

La sucrase et l'aminopeptidase-N ont été choisies pour évaluer le degré de différenciation des cellules HT 29 en entérocytes. Plus précisément, c'est le rapport de l'activité de ces deux enzymes dans les fractions membranaires [P(+)] et P2] sur leur activité dans les homogénats cellulaires de départ [H(+)] et H].

Les résultats (Tableau III) montrent un enrichissement P2/H de 5,9 pour la sucrase et de 2,1 pour l'aminopeptidase-N pour des cellules HT 29 Glc(-) différenciées et âgées de 20 jours. Les cellules indifférenciées du même âge ont, pour ces mêmes enzymes, des enrichissements respectifs P(+)/H(+) de 1,8 et de 0,9. Ces résultats, tout à fait comparables à ceux décrits par d'autres (TRUGNAN *et al.*, 1987) nous confirment donc que les cellules HT 29 Glc(-) ont développé une différenciation entérocytaire, en effet, l'activité sucrasique, quasiment absente des cellules HT 29 Glc(+) est présente dans les cellules cultivées dans des conditions permettant la différenciation.

L'étude de l'évolution comparée des rapports P2/H et P(+)/H(+) a montré que la différenciation était très avancée pour des cellules âgées de 20 jours. Ce sont donc des cellules HT 29 Glc(-) et Glc(+) de cet âge qui ont été choisies pour l'étude de la fixation des deux transferrines.

TABLEAU III ETUDE DE LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE DES CELLULES HT 29 PAR LA COMPARAISON DE L'ACTIVITE DES HYDROLASES MEMBRANAIRES DES CELLULES HT 29 Glc(-) ET Glc(+) AGEES DE 20 JOURS

CELLULES	HT 29 Glc(+)			HT 29 Glc(-)		
	H(+)	P(+)	H(+)/P(+)	H	P2	P2/H
SUCRASE *	0,27	0,5	1,8	4,7	27,7	5,9
AMINOPEPTIDASE-N *	10,8	9,7	0,9	8,3	17,4	2.1

* : L'activité des enzymes est donnée en mU/mg de protéines.

(voir Matériels et Méthodes)

2 - FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE NON SATURÉE EN FER SUR LES CELLULES HT 29

a - Fixation de la lactotransferrine non saturée en fer sur les cellules HT 29 Glc(+) non différenciées

La fixation de la lactotransferrine non saturée en fer (pourcentage de saturation de 10 à 15 %) et marquée à l'iode radioactif a été examinée sur les cellules HT 29 Glc(+) âgées de 20 jours. La courbe de saturation (Fig. 6) montre que la fixation de la lactotransferrine sur les cellules HT 29 Glc(+) n'est pas saturable.

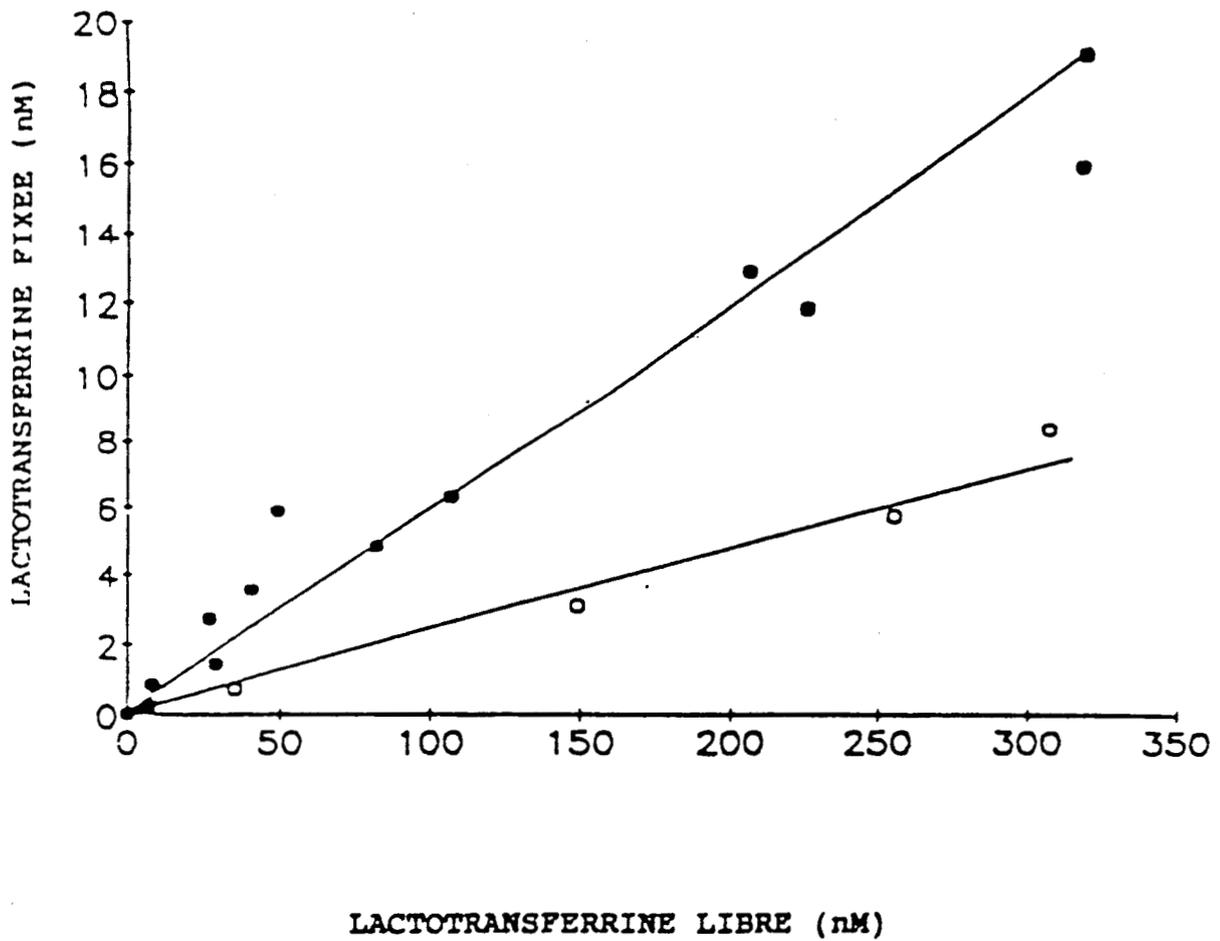
La fixation non spécifique, estimée en présence d'un excès molaire de lactotransferrine non marquée, est relativement importante comparée à la fixation totale.

L'analyse des résultats selon la méthode de SCATCHARD laisse apparaître que, quelle que soit la concentration de lactotransferrine marquée ajoutée, le rapport (lactotransferrine fixée/lactotransferrine libre) est constant, la quantité de la lactotransferrine liée aux cellules est donc linéairement proportionnelle à la quantité de lactotransferrine ajoutée, signe d'une fixation non spécifique.

CONCLUSION

La fixation de la lactotransferrine humaine sur les cellules HT 29 Glc(+) ne semble donc être qu'un phénomène non spécifique.

Cependant, il est à noter qu'une assez forte fixation non spécifique est observée, les raisons de cette adsorption peuvent être de deux ordres : les raisons liées à la protéine et celles liées aux cellules.



(●) : Fixation totale ; (○) : Fixation non spécifique

Fig. 6 : FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE NON SATURÉE
EN FER SUR LES CELLULES HT 29 Glc(+) ÂGÉES DE 20 JOURS

La lactotransferrine est une protéine qui a tendance à former des complexes avec d'autres protéines telles que le lysozyme, les immunoglobulines IgA et les glycopeptides (PERRAUDIN & PRIEELS, 1982 ; SPIK *et al.*, 1984). Or, les cellules HT 29 indifférenciées sécrètent à leur surface du lysozyme (FETT *et al.*, 1982 ; ALDERMAN *et al.*, 1985). La forte fixation aspécifique de la lactotransferrine à la surface des cellules HT 29 pourrait donc en partie être imputée à la nature même de cette protéine qui peut s'adsorber aux constituants membranaires des cellules HT 29 ou aux produits sécrétés par ces cellules.

Par ailleurs, les cellules HT 29 Glc(+) sont des cellules indifférenciées, de forme ronde et superposées en plusieurs couches non reliées par des jonctions serrées (ROUSSET, 1986). Il est donc facilement concevable que le tapis cellulaire puisse facilement "piéger" la lactotransferrine ajoutée, sans que cette dernière ne puisse être facilement délogée par le triple lavage réalisé en fin d'incubation.

Il faut signaler ici que, récemment, une étude (ROIRON *et al.*, 1989) menée sur le clone HT 29-D4 indifférencié a donné des résultats très différents des nôtres. Ces auteurs, en effet, ont trouvé que ces cellules portaient à leur surface deux classes de sites ($n_1 = 4,09 \times 10^9$, $K_{d1} = 402 \text{ nM}$; $n_2 = 2,6 \times 10^7$ et $K_{d2} = 8.5 \text{ } \mu\text{M}$) pour la lactotransferrine humaine. Mais, ces valeurs, très faibles, de constantes d'affinité et, très fortes, de nombres de sites ainsi que les conditions expérimentales discutables: une saturation obtenue pour de très fortes concentrations de lactotransferrine ainsi qu'une fixation non spécifique estimée en présence d'un très fort excès molaire (1000 x) nous laissent croire que ces auteurs ont pu être abusés par une fixation non spécifique très importante. Par ailleurs, le clone HT 29-D4 en question, dérivant du clone HT 29 original, est peut-être différent du nôtre.

b - Fixation de la lactotransferrine non saturée en fer sur les cellules HT 29 Glc(-) différenciées en entérocytes

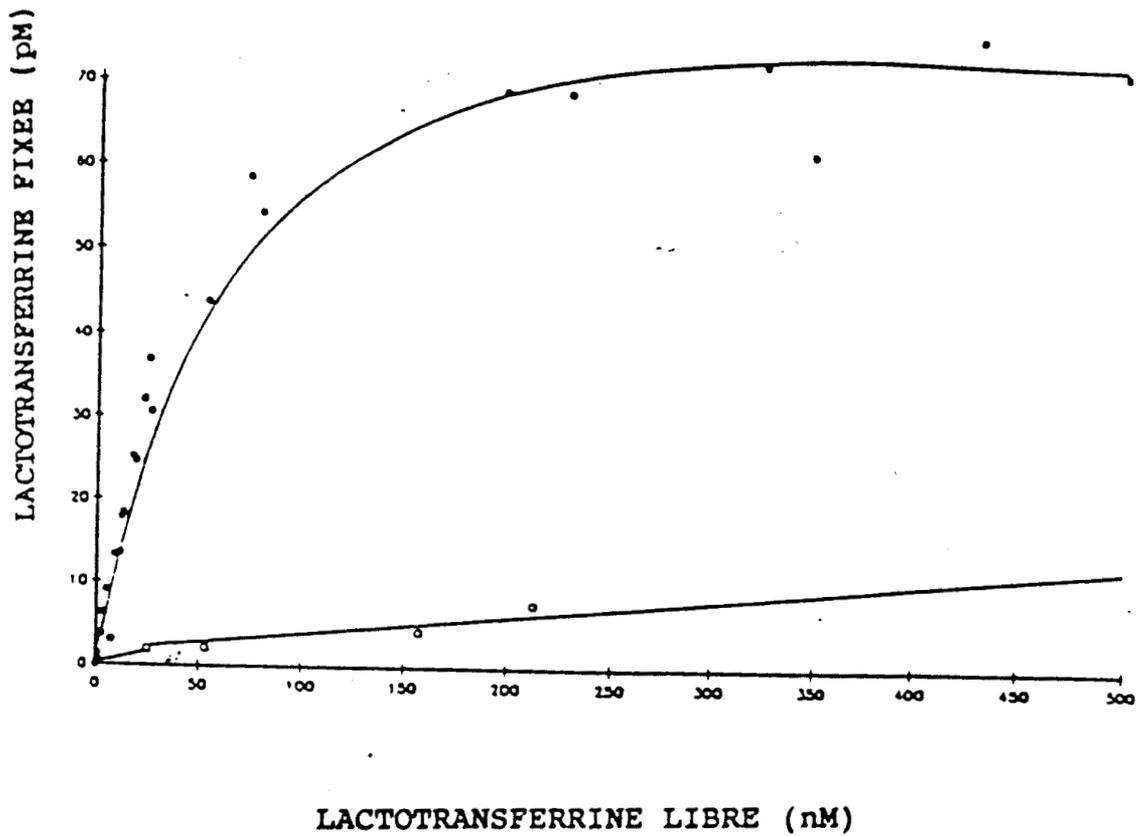
Pour cette étude, nous avons choisi des cellules âgées de 20 jours. La courbe de saturation (Fig. 7) montre que la lactotransferrine se fixe d'une façon saturable sur les cellules HT 29 différenciées; la saturation étant atteinte pour des concentrations de l'ordre de 150 nM. En ce qui concerne la fixation non spécifique, la courbe de saturation laisse apparaître une fixation non spécifique très faible (de l'ordre de 10 %) de la lactotransferrine par rapport à la fixation totale.

La linéarisation selon SCATCHARD des résultats a permis de déterminer les valeurs des constantes de fixation de la lactotransferrine non saturée sur les cellules HT 29 différenciées après 20 jours de culture. Le nombre de sites de fixation est : $n = 2,91 \pm 0,06 \times 10^4$ sites de fixation par cellule et la constante de dissociation est : $K_d = 3,91 \pm 0,115 \times 10^{-8}$ M.

La réversibilité de cette fixation a été étudiée par déplacement de la protéine marquée fixée aux cellules par de la lactotransferrine non marquée en excès molaire. Pour cela nous avons, comme précédemment, utilisé des cellules âgées de 20 jours et de l'apo-lactotransferrine. La courbe obtenue (Fig. 8) montre que la fixation de la lactotransferrine sur les cellules HT 29 Glc(-) est réversible.

CONCLUSION

Les expériences de fixation de la lactotransferrine sur les cellules HT 29 différenciées ont montré que cette protéine se fixe sur



(●) : Fixation totale ; (○) : Fixation non spécifique

Fig. 7 : FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE NON SATURÉE
EN FER SUR LES CELLULES HT 29 Glc(-) AGEES DE 20 JOURS

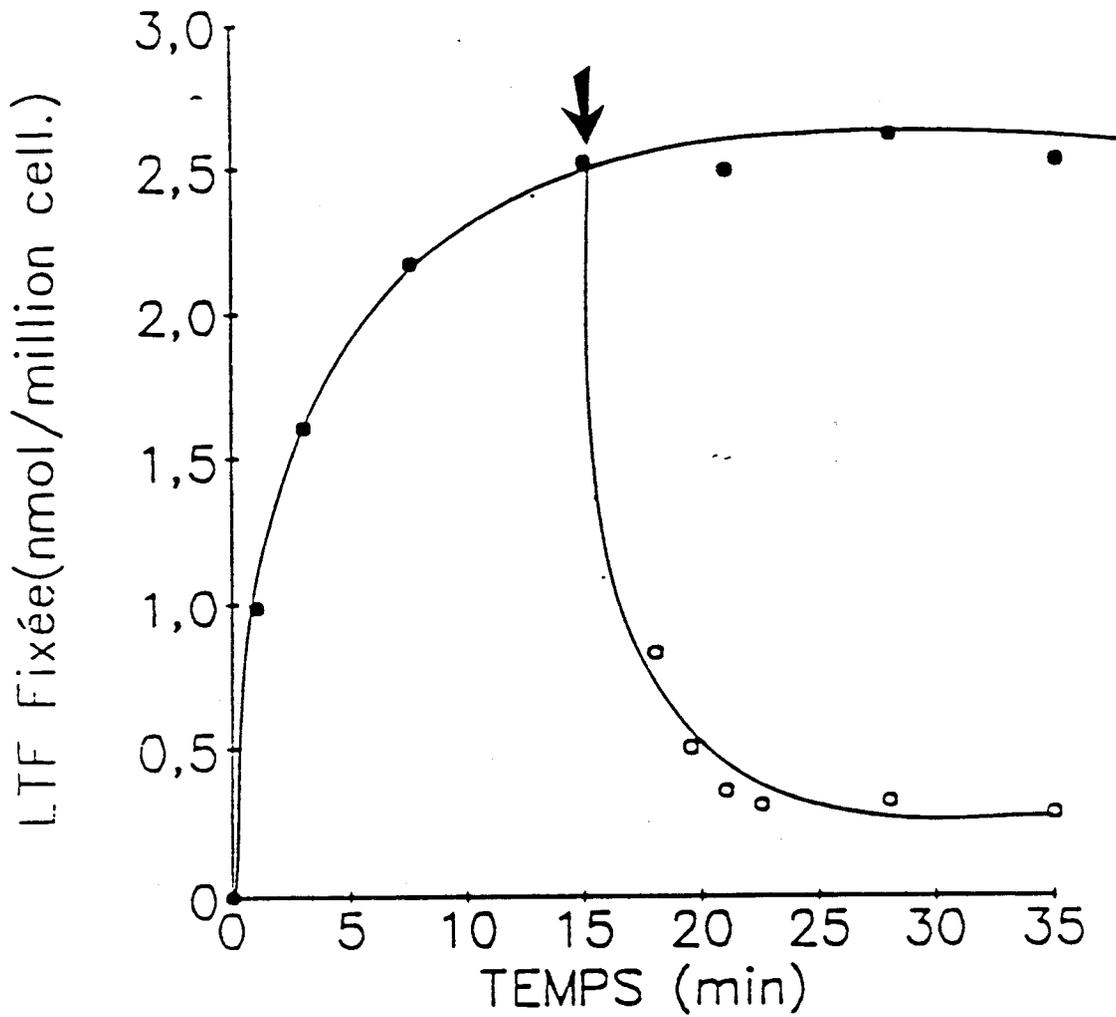


Fig. 8 : CINETIQUE DE FIXATION (●) ET DE REVERSIBILITE (○) DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LES CELLULES HT 29 Glc(-) AGEES DE 20 JOURS

les cellules d'une façon spécifique, saturable et réversible ; selon un mécanisme qui a donc toutes les caractéristiques d'une fixation médiée par un récepteur spécifique.

c - Conclusion

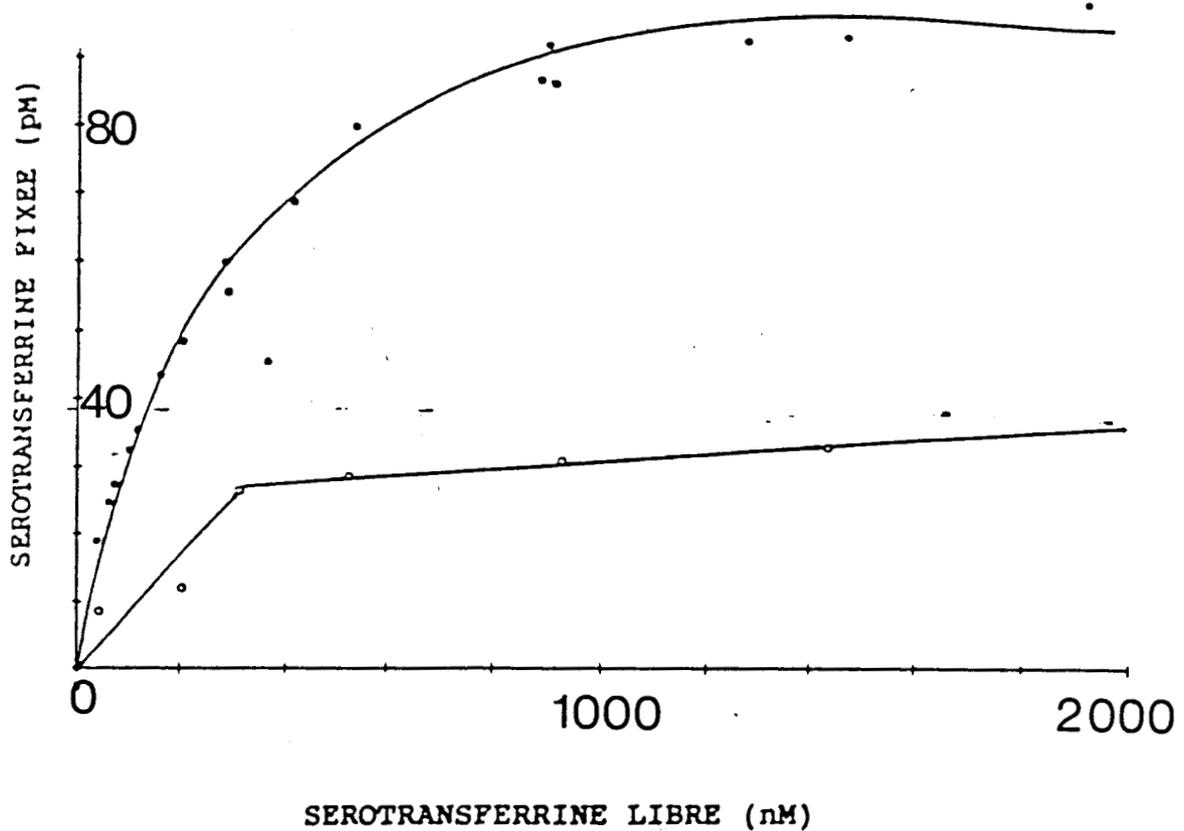
Cette première série d'expériences sur la fixation de la lactotransferrine humaine sur les cellules HT 29 différenciées en entérocytes nous a permis de constater que celles-ci fixent la lactotransferrine selon un mécanisme qui a toutes les caractéristiques d'une fixation spécifique via un récepteur membranaire. Les cellules indifférenciées, en revanche, ne semblent pas posséder les mêmes propriétés.

La capacité de fixer spécifiquement la lactotransferrine humaine et, par conséquent, la présence de récepteurs membranaires pour cette protéine serait donc un critère supplémentaire de la différenciation des cellules HT 29 en entérocytes.

3 - FIXATION DE LA SEROTRANSFERRINE NON SATURÉE EN FER SUR LES CELLULES HT 29

a - Fixation de la sérotransferrine non saturée en fer sur les cellules HT 29 Glc(+) non différenciées

La courbe de saturation (Fig. 9) de la sérotransferrine non saturée en fer sur les cellules HT 29 Glc(+) âgées de 20 jours nous montre que cette protéine se fixe sur ces cellules de façon saturable. Une fixation non spécifique importante est néanmoins observée (20%). Après soustraction de la radioactivité non spécifique et analyse des résultats selon Scatchard, nous avons pu calculer les constantes de



(●) : Fixation totale ; (○) : Fixation non spécifique

**Fig. 9 : FIXATION DE LA SEROTRANSFERRINE NON SATUREE
EN FER SUR LES CELLULES HT 29 Glc(+) AGEES DE 20 JOURS**

fixation suivantes : $n = 3,9 \times 10^4$ sites/cellules et $K_d = 3,7 \times 10^{-7}$ M.

Les études de fixation de l'apo-sérotransferrine sur les cellules HT 29 Glc(+) ont donc montré que ces cellules indifférenciées peuvent fixer cette protéine de manière spécifique, avec cependant une faible affinité.

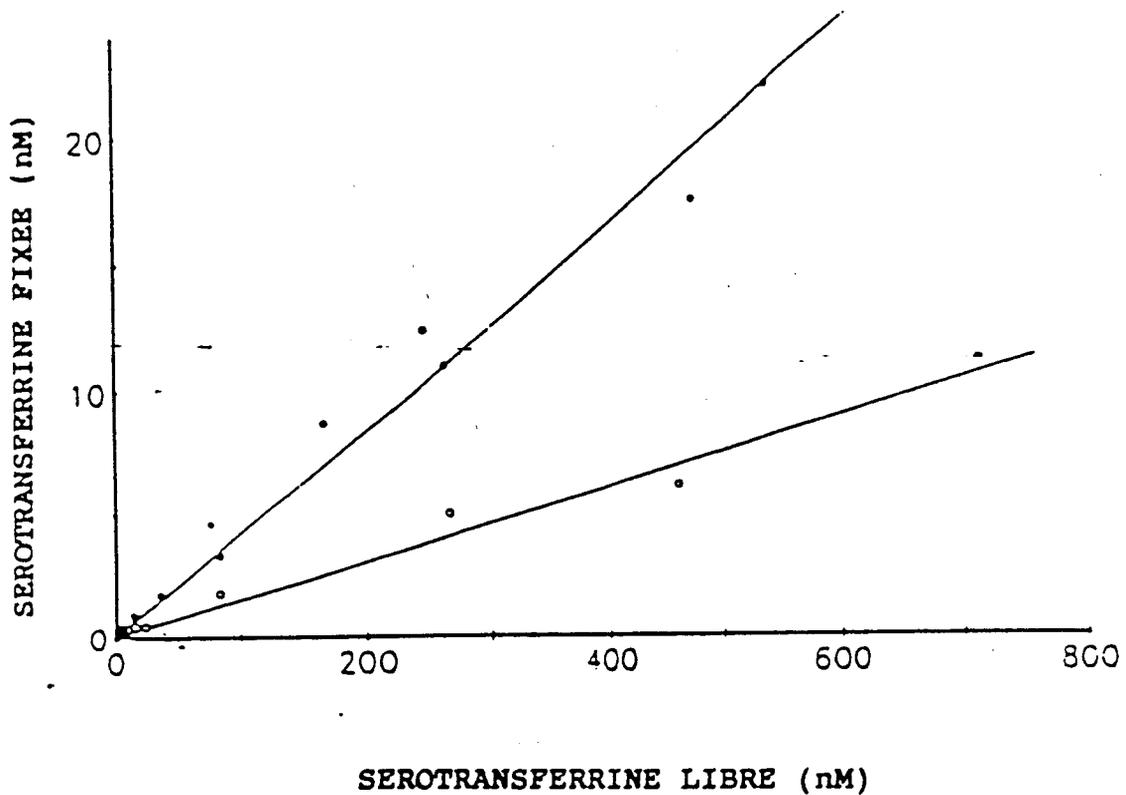
b - Fixation de la sérotransferrine non saturée sur les cellules HT 29 Glc(-) différenciées en entérocytes

La Fig. 10 montre que les cellules HT 29 Glc(-) âgées de 20 jours ne fixent pas la sérotransferrine de façon saturable.

Contrairement à ce qui se passait pour la lactotransferrine, les cellules HT 29 différenciées semblent ne pas posséder à leur surface de récepteurs membranaires pour la sérotransferrine.

c - Conclusion

La présence de récepteurs de la sérotransferrine à la surface des cellules HT 29 Glc(+) n'est pas surprenante, en effet, ce récepteur a été trouvé à la surface de nombreuses cellules en croissance (WADA *et al.*, 1979 ; NEWMAN *et al.*, 1979) et à celle de nombreuses cellules eucaryotes (REGOECZI, 1984). Or les cellules HT 29 indifférenciées ont la particularité de continuer à se renouveler en culture, même après la confluence cellulaire (ROUSSET, 1986). En revanche, il est plutôt surprenant de constater que ce récepteur semble avoir disparu lorsque les cellules HT 29 se sont différenciées en entérocytes, cette observation ne remet pourtant pas en cause l'hypothèse de l'universalité du récepteur de la sérotransferrine (HAMILTON *et al.*, 1979 ; WADA *et*



(●) : Fixation totale ; (○) : Fixation non spécifique

Fig. 10 : FIXATION DE LA SEROTRANSFERRINE NON SATURÉE
EN FER SUR LES CELLULES HT 29 Glc(-) AGÉES DE 20 JOURS

al., 1979). En effet, la différenciation des cellules HT 29 s'accompagne de remaniements structuraux importants (ROUSSET, 1986) dont la séparation des membranes en membrane apicale et en membrane basolatérale, les cellules étant reliées les unes aux autres par des jonctions serrées ce qui fait que l'on peut assimiler la monocouche de cellules à un épithélium. Cette dernière particularité permettrait d'expliquer la non détection, par notre dosage, d'éventuels récepteurs de la sérotransferrine situés dans la partie apicale du tapis cellulaire. Nous ne pouvons donc pas exclure la présence de récepteurs de la sérotransferrine dans d'autres localisations des cellules HT 29.

4 - CONCLUSION

Les cellules HT 29 ont, vis-à-vis des deux transferrines humaines étudiées, des comportements différents selon qu'elles sont différenciées en entérocytes ou qu'elles restent indifférenciées. La présence de récepteurs de la lactotransferrine à la surface des cellules HT 29 Glc(-) différenciées en entérocytes, de même que la disparition du récepteur de la sérotransferrine de la membrane apicale des cellules pourraient constituer de nouveaux marqueurs de la différenciation des cellules HT 29.

B - EVOLUTION DES CONSTANTES DE FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE EN FONCTION DE LA DIFFERENCIATION DES CELLULES HT 29 Glc(-)

Le processus de différenciation des cellules HT 29 en entérocytes est un phénomène progressif, qui débute avec la confluence et se

poursuit pendant la phase stationnaire après l'arrêt de la croissance des cellules (ROUSSET, 1986).

Ayant montré la présence d'un récepteur spécifique de la lactotransferrine à la surface des cellules HT 29 Glc(-) âgées de 20 jours, et que ce récepteur, absent des cellules indifférenciées, pouvait être considéré comme un marqueur de la différenciation. Nous avons étudié les variations des paramètres de fixation de la lactotransferrine en fonction de l'âge des cellules.

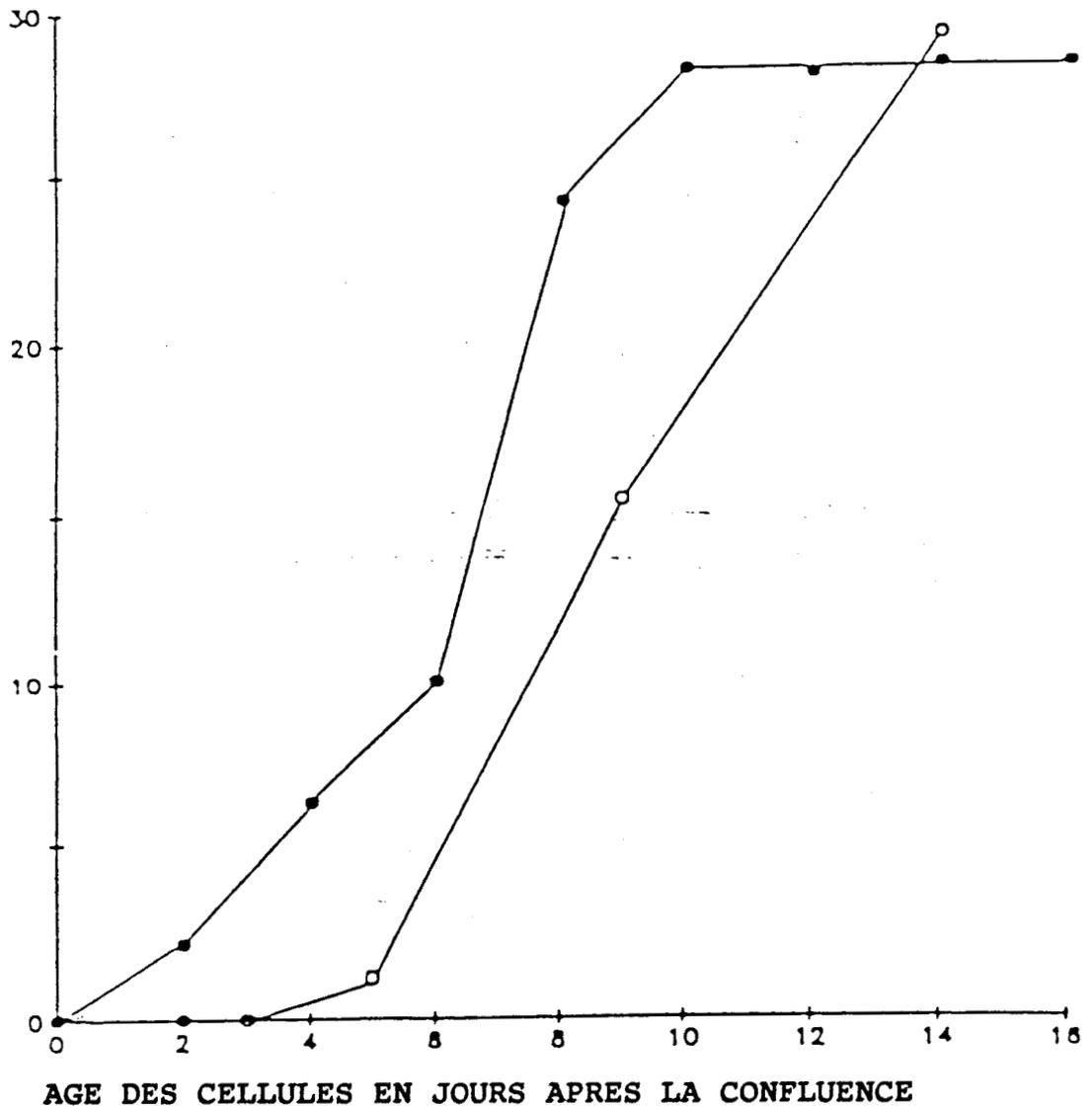
La différenciation des cellules HT 29 Glc(-) dans les conditions de culture décrites dans le chapitre " Matériels et Méthodes" étant un phénomène connu, nous nous sommes contentés, pour suivre l'évolution de la différenciation de ces cellules, de prendre comme marqueur l'activité de la sucrase dans les fractions enrichies en bordure en brosse (P2) des cellules de différents âges utilisées. Il a d'ailleurs été montré (ZWEIBAUM *et al.*, 1985) que l'activité de cette enzyme dans la fraction P2 est un critère nécessaire et suffisant de la différenciation des cellules.

La Fig. 11 montre que l'activité de la sucrase est maximale pour des cellules au bout de 10 jours après la confluence (soit 17 jours de culture), un plateau est atteint qui reste constant aux alentours de 28 mU/mg de protéines.

Lorsque, parallèlement, on compare l'évolution du nombre de sites de fixation par cellule (Tableau IV) on constate une forte augmentation à partir du 12^{ème} jour (5 jours après la confluence) où n est égal à $0,113 \pm 0,015 \times 10^4$ sites/cellule au 20^{ème} jour où n est égal à $2,91 \pm 0,06 \times 10^4$ sites par cellule. Durant ces huit jours, alors que

**TABLEAU IV VARIATION DES PARAMETRES DE FIXATION DE LA
LACTOTRANSFERRINE SUR LES CELLULES HT 29 Glc(-) EN
FONCTION DE LEUR AGE.**

Age (jours)	n ($\times 10^4$)	Kd ($\times 10^{-8}$ M)
10	non détecté	non détecté
12	0.11 \pm 0.02	1.01 \pm 0.06
16	1.54 \pm 0.08	1.95 \pm 0.09
20	2.91 \pm 0.06	3.91 \pm 0.12



(●) : Nombre de sites par cellule
 (○) : Activité de la sucrase

Fig. 11 : EVOLUTION DU NOMBRE DE SITES DE FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE EN FONCTION DE LA DIFFERENCIATION DES CELLULES HT 29 Glc(-)

La différenciation des cellules est estimée par dosage de la sucrase dans la fraction bordure en brosse "P2".

l'activité de la sucrase augmente d'un facteur 3,44, le nombre de sites de fixation par cellule est multiplié d'un facteur 27,3. Par ailleurs, si l'on compare les valeurs de constante de dissociation on s'aperçoit que, pour la même période, le K_d n'augmente que d'un facteur 3,7.

La comparaison des courbes de saturation [Fig. 2 (20 jours), Fig. 12A (10 jours), Fig. 12B (12 jours) & Fig. 12C (16 jours)] nous montre que les profils sont similaires ; dans tous les cas, la saturation est obtenue à des concentrations en lactotransferrine de l'ordre de 100 nM.

CONCLUSION

Cette étude nous a permis de montrer que le nombre de sites de fixation de la lactotransferrine sur les cellules HT 29 Glc(-) augmente avec la différenciation des cellules. L'hypothèse émise à la fin du chapitre précédent selon laquelle la présence d'un récepteur de la lactotransferrine à la surface apicale des cellules HT 29 Glc(-) différenciées en entérocytes serait un marqueur de la différenciation se trouve ainsi confirmée. Le dosage du nombre de récepteurs pourrait rendre compte de l'état d'avancement de la différenciation. L'augmentation du nombre de sites est fort probablement due au développement de la bordure en brosse dont la surface augmente avec l'âge des cellules. En ce qui concerne la variation de la constante de dissociation, on constate que l'augmentation (facteur 3,7) est moins importante. Nous ne pouvons conclure, à ce stade de notre étude, si cette variation est due à une modification structurale du récepteur, ou à une modification de l'environnement membranaire du récepteur ou alors au développement même de la bordure en brosse qui jouerait sur l'accessibilité du récepteur pour le ligand.

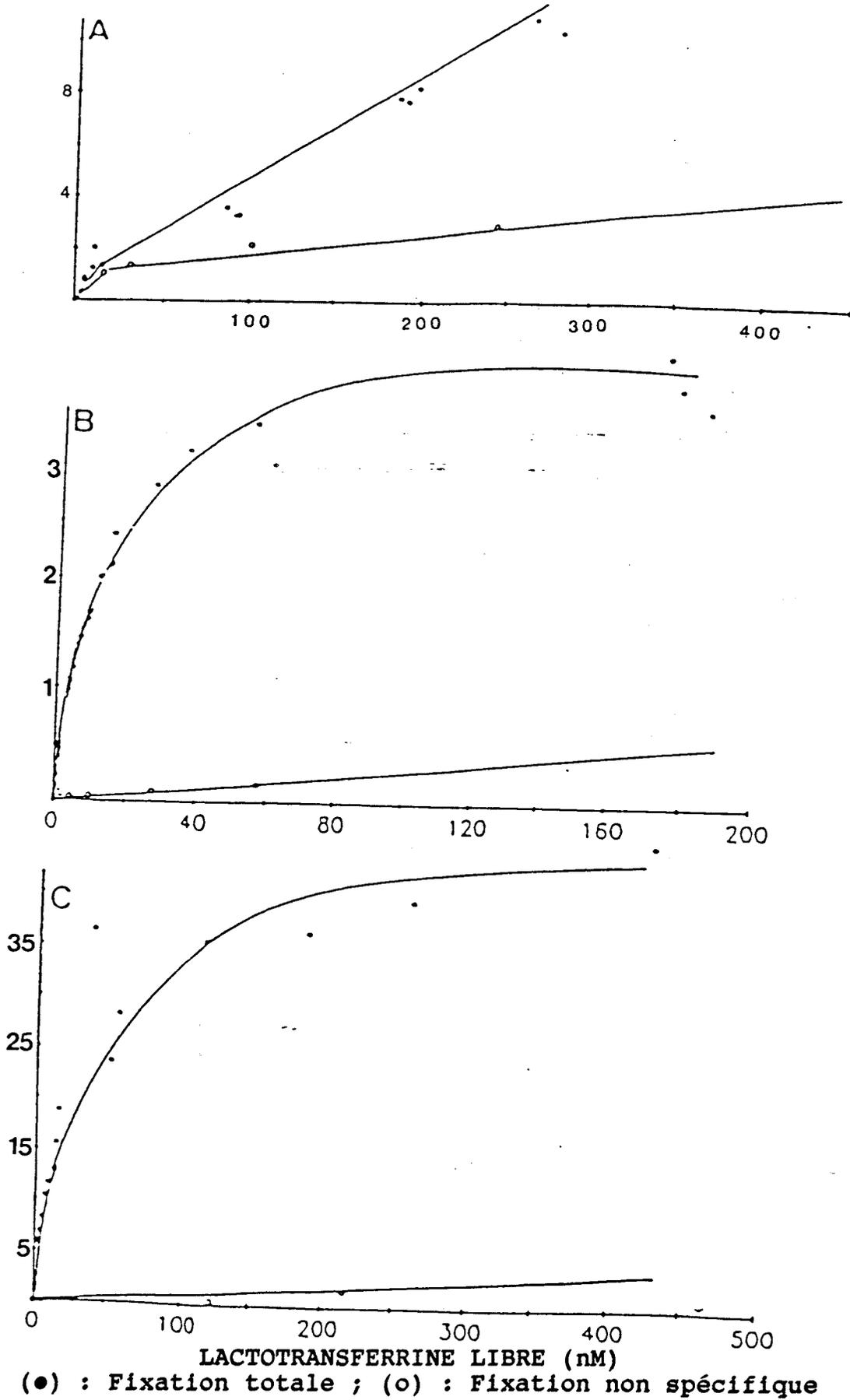


Fig. 12 : VARIATION DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE EN FONCTION DE L'AGE SUR LES CELLULES HT 29 Glc(-)

Age des cellules (jours) -A : 10; B : 12; C : 16.



C - ETUDE COMPAREE DE LA FIXATION DES FORMES SATUREES EN FER ET NON SATUREES DES TRANSFERRINES SUR LES CELLULES HT 29

Le récepteur de la sérotransferrine est connu pour avoir la particularité de présenter, à pH 7, des affinités différentes pour l'apo-sérotransferrine et la sérotransferrine saturée (DAUTRY-VARSAT *et al.*, 1983, KLAUSNER *et al.*, 1983). Nous avons voulu vérifier si le récepteur de la sérotransferrine des cellules HT 29 Glc(+) et le récepteur de la lactotransferrine des cellules HT 29 Glc(-) avaient les mêmes propriétés. Pour cette étude, nous avons choisi d'examiner la fixation des formes saturées en fer de la lactotransferrine et de la sérotransferrine sur, respectivement les cellules HT 29 Glc(-) différenciées et les cellules HT 29 Glc(+) non différenciées, c'est à dire, pour l'une et l'autre des transferrines, les souches sur lesquelles une fixation spécifique avait été observée lors de l'étude de la fixation des protéines non saturées.

1 - COMPARAISON DES FIXATIONS DES LACTOTRANSFERRINES SATUREE EN FER ET NON SATUREE EN FER SUR LES CELLULES HT 29 Glc(-)

Jusqu'ici les études de fixation de la lactotransferrine sur les cellules HT 29 ont été réalisées avec une protéine sous forme partiellement saturée (de 10 à 15 % de la saturation). Nous avons poursuivi l'étude en examinant la fixation de la lactotransferrine saturée en fer sur les cellules HT 29 Glc(-). Ayant montré que les constantes de fixation de la lactotransferrine sur son récepteur évoluaient avec la différenciation des cellules HT 29 Glc(-), la comparaison des fixations a été réalisée avec des cellules âgées de 16 et 20 jours.

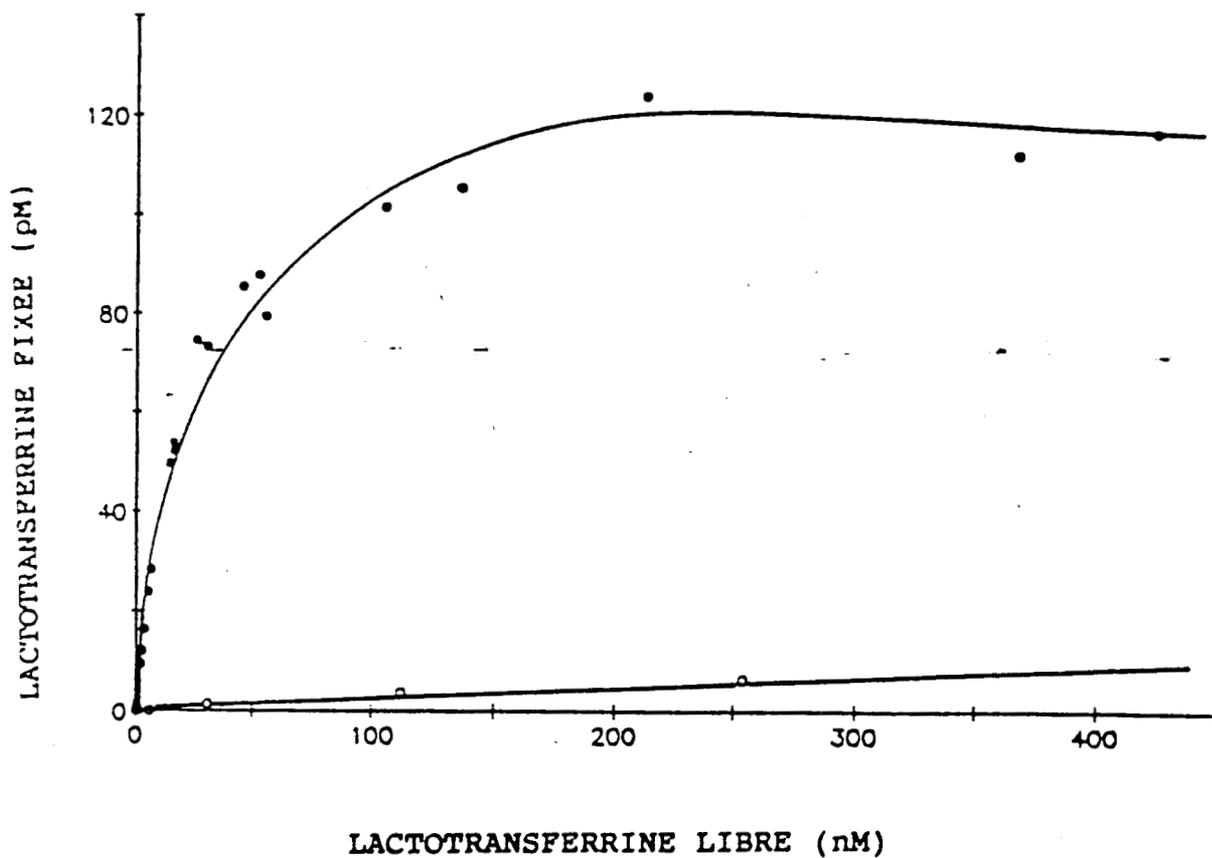
La Fig. 13 nous montre que, sur des cellules âgées de 20 jours, la fixation de la lactotransferrine saturée (85 % de la saturation) est identique à celle de la protéine non saturée.

Pour des cellules âgées de 16 jours (Tableau V) les constantes de fixation calculées pour la lactotransferrine saturée sont très comparables à celles obtenues pour la lactotransferrine non saturée.

2 - COMPARAISON DES FIXATIONS DES SEROTRANSFERRINES NON SATURÉE EN FER ET SATURÉE EN FER PAR LES CELLULES HT 29 Glc(+)

La fixation de la sérotransferrine saturée en fer sur les cellules HT 29 Glc(+) semble être analogue à celle de l'apo-sérotransferrine (Fig. 14). En effet cette fixation est saturable et, comme pour la fixation de la protéine non saturée en fer, une importante fixation non spécifique (de l'ordre de 20%) est observée. L'analyse des résultats selon Scatchard nous a permis de calculer les constantes suivantes : $n = 3,23 \pm 0,165$ sites/cellule et $K_d = 1,29 \pm 0,135$ M.

Les deux formes de sérotransferrine (saturée en fer et non saturée en fer) se fixent donc sur les cellules HT 29 non différenciées avec des constantes de fixation très différentes. Pour autant, les nombres de sites étant, dans les deux cas, similaires, il est possible de conclure que c'est le même récepteur qui fixe la sérotransferrine saturée en fer et l'apo-sérotransferrine. Cette propriété du récepteur de la sérotransferrine a été observée dans toutes les cellules étudiées jusqu'à maintenant (REGOECZI, 1984).

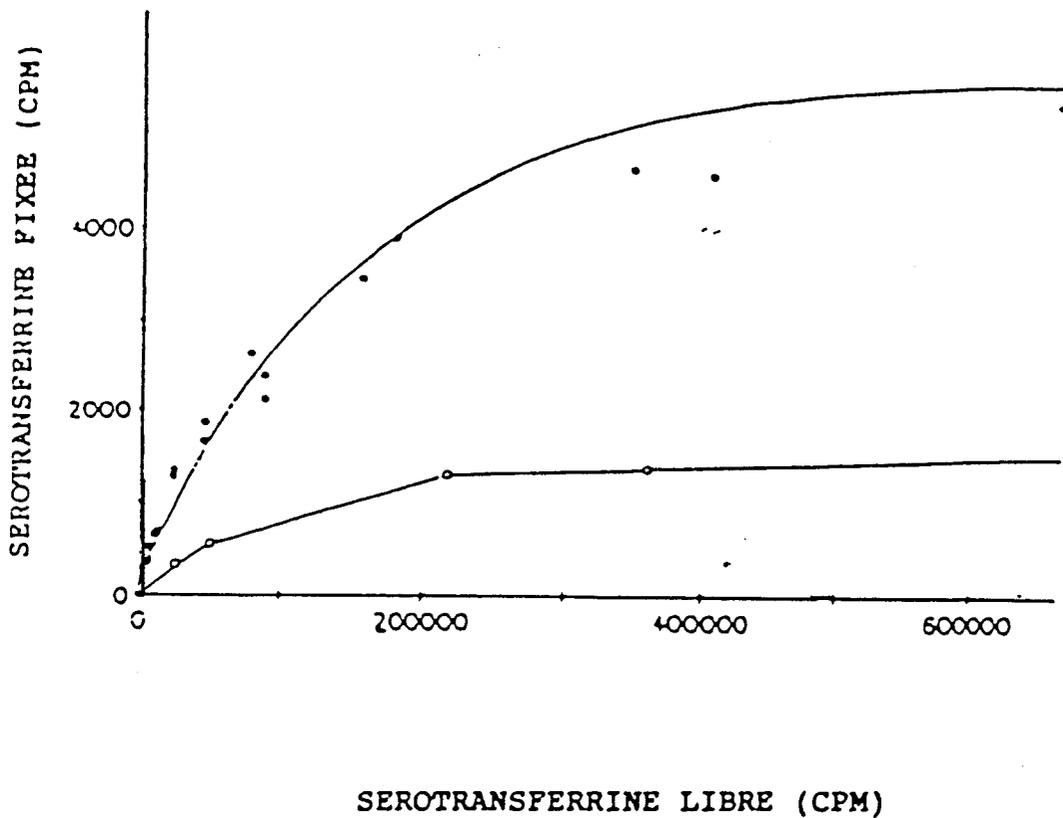


(●) : Fixation totale ; (○) : Fixation non spécifique

Fig. 13 : FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE SATURÉE EN FER SUR LES CELLULES HT 29 Glc(-) AGÉES DE 20 JOURS

TABLEAU V COMPARAISON DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE NON SATURÉE (apo-LTF) ET DE LA LACTOTRANSFERRINE SATURÉE (LTF-(Fe³⁺)₂) SUR LES CELLULES HT 29 AGEES DE 16 ET 20 JOURS.

Age (jours)	Protéine	n (x 10 ⁴)	Kd(x 10 ⁻⁸ M)
16	apo-LTF	1,54 ± 0,075	1,95 ± 0,091
	LTF-(Fe ³⁺) ₂	1,71 ± 0,042	4,1 ± 0,105
20	apo-LTF	2,91 ± 0,06	3,91 ± 0,115
	LTF-(Fe ³⁺) ₂	3,8 ± 0,7	3,55 ± 0,85



(●) : Fixation totale ; (○) : Fixation non spécifique

Fig. 14 : FIXATION DE LA SEROTRANSFERRINE SATURÉE EN FER SUR LES CELLULES HT 29 Glc(+) ÂGÉES DE 20 JOURS

D - FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LES EXTRAITS CELLULAIRES SOLUBILISES

L'étude de la fixation de la lactotransferrine sur les cellules HT 29 nous a permis de dégager quelques conclusions sur la présence de récepteurs pour cette protéine à la surface des cellules différenciées et leur absence à la surface de cellules indifférenciées. Mais en raison de la structure même du tapis cellulaire, les études réalisées sur les cellules entières ne permettent pas au ligand d'accéder à des compartiments tels que le compartiment intracellulaire ou les membranes basolatérales. En effet, pour ce dernier compartiment la présence de jonctions serrées (*tight-junction* et *gap-junction*) fait que la lactotransferrine ajoutée au milieu est en contact avec la membrane de la bordure en brosse apicale mais tout contact avec les membranes basolatérales est empêché.

1 - ETUDE DE LA VARIATION DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LA FRACTION P2 "BORDURE EN BROSSE" EN FONCTION DU pH

L'étude a été réalisée avec les 2 formes de la lactotransferrine (saturée et non saturée en fer). Nous avons choisi la fraction P2 obtenue à partir de cellules différenciées âgées de trois semaines.

Les résultats (Fig. 15) laissent une fois de plus apparaître qu'il n'y a pas de différence entre la fixation de l'apo-lactotransferrine et de la lactotransferrine saturée en fer, quelque soit le pH considéré. En outre, les profils de fixation dans chaque fraction sont identiques : la fixation la plus importante est observée à pH 7, mais, d'une façon générale, la fixation de la lactotransferrine sur son récepteur de

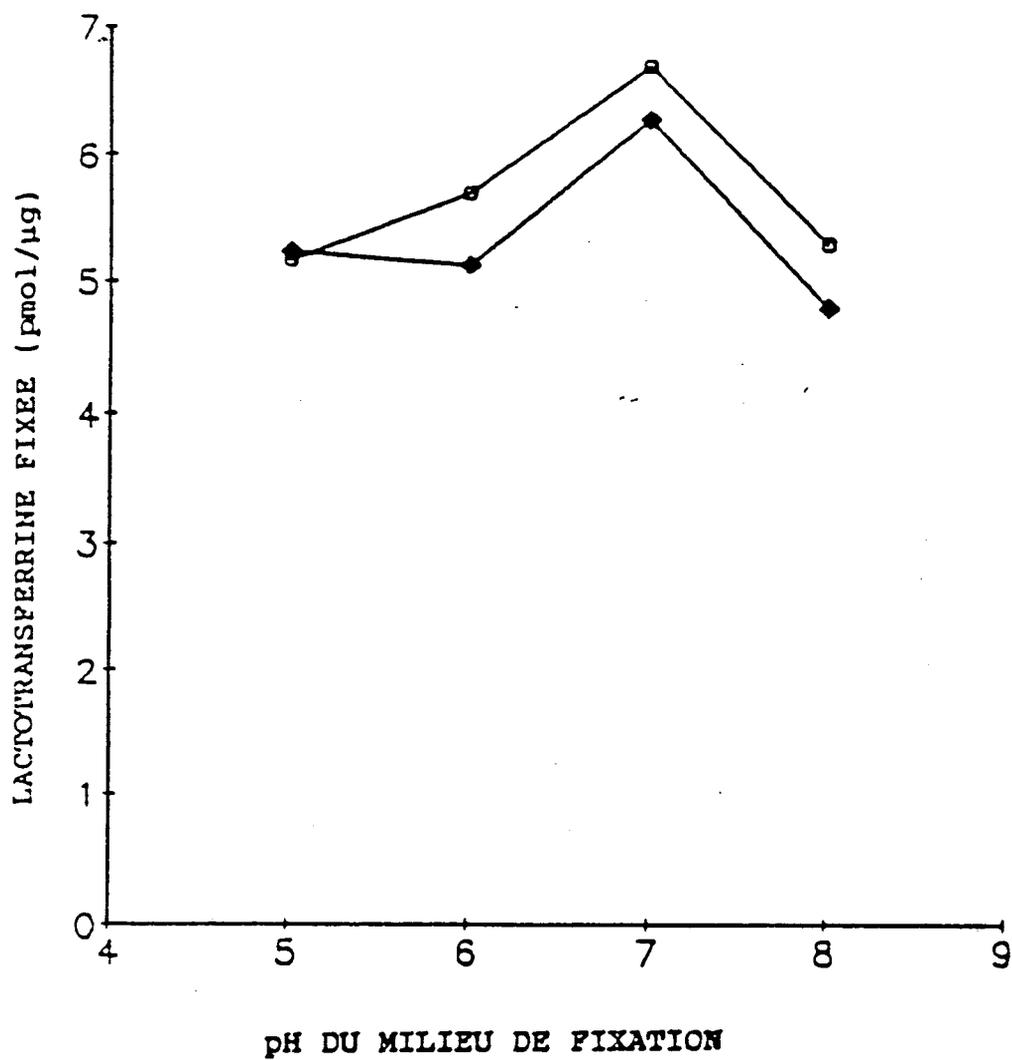


Fig. 15 : INFLUENCE DU pH SUR LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE SATURÉE EN FER (◆) ET NON SATURÉE EN FER (○) SUR LA FRACTION P2 "BORDURE EN BROSSE" SOLUBILISÉE

la bordure en brosse des cellules HT 29 Glc(-) semble peu influencée par le pH du milieu.

CONCLUSION

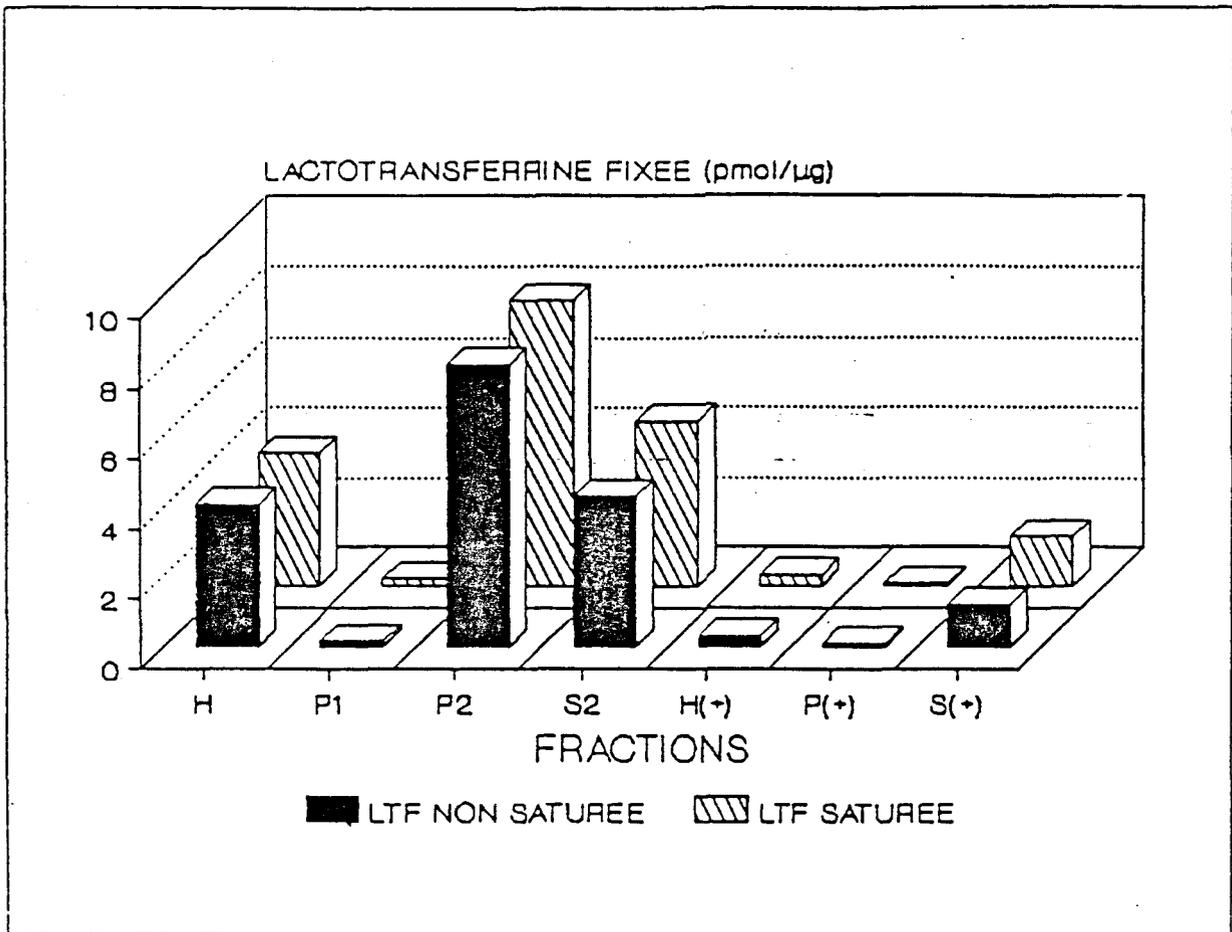
Comme l'avaient montré les études réalisées sur les cellules entières, le résultat obtenu sur les membranes apicales solubilisées montre, qu'au moins en ce qui concerne son comportement vis-à-vis du pH ambiant, le récepteur de la lactotransferrine n'a pas les mêmes propriétés que le récepteur de la sérotransferrine.

2 - VARIATION DE LA FIXATION EN FONCTION DU COMPARTIMENT CELLULAIRE POUR DES CELLULES AGEES DE 20 JOURS

Dans un premier temps, nous avons examiné, comparativement, la fixation de la lactotransferrine sous forme apo et saturée en fer sur les différentes fractions obtenues à partir des cellules HT 29 Glc(-) et Glc(+).

La Fig. 16 montre les résultats de ces expériences. Les valeurs sont données compte tenu des valeurs de fixation non spécifique qui ont été soustraites. La réaction de fixation a été réalisée à pH 7,4, soit le même pH que celui utilisé lors de l'étude sur les cellules entières. Pour être comparables entr'elles, les valeurs de fixation ont été ramenées en pmol de lactotransferrine liée par μg de protéines déposées sur nitrocellulose.

Tout d'abord, et ce résultat est en accord avec celui obtenu avec les cellules entières, quelle que soit la fraction considérée il n'y a pas de différences significatives entre la fixation de la



**Fig. 16 : FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LES
DIFFERENTES FRACTIONS SOLUBILISEES OBTENUES A PARTIR
DES CELLULES HT 29 Glc(-) ET HT 29 Glc(+)**

lactotransferrine saturée en fer et celle de la lactotransferrine très faiblement saturée en fer.

La comparaison des intensités relatives de la fixation dans les différentes fractions, indique que P1 et P(+) n'expriment qu'une très faible capacité à fixer la lactotransferrine, le taux de fixation étant inférieur à 0,5 pmol de lactotransferrine fixée par μg de protéines déposées.

La fraction S(+), qui représente le compartiment intracellulaire des cellules HT 29 indifférenciées, semble fixer la lactotransferrine. Ce phénomène étant cependant de faible intensité (0,7 pmol de lactotransferrine fixée par μg de protéines déposées).

Quant aux cellules HT 29 différenciées, les trois fractions qui fixent la lactotransferrine sont H, P2 et S2. En ce qui concerne la fraction P2 qui représente la fraction bordure en brosse et la fraction H, ce résultat était attendu et confirme celui obtenu avec les cellules HT 29 Glc(-) en culture, à savoir la présence de récepteurs membranaires de la lactotransferrine situés dans la partie apicale.

Concernant la fraction S2, nous constatons que cette fraction fixe la lactotransferrine à un taux relativement élevé de 4,5 pmol de lactotransferrine/ μg de protéines déposées. Ce résultat, qui ne pouvait être mis en évidence avec les cellules entières en culture, tout comme l'absence de fixation sur les membranes baso-latérales, nous renseigne sur la présence d'un pool de récepteur de lactotransferrine à l'intérieur des cellules HT 29 différenciées.

Quant à la présence de ces récepteurs à l'intérieur des cellules, on ne sait s'ils ont un rôle particulier dans le métabolisme intracellulaire du fer ou s'il s'agit de récepteurs néo-synthétisés qui vont ensuite être dirigés vers la membrane apicale où ils pourront remplir leur rôle biologique.

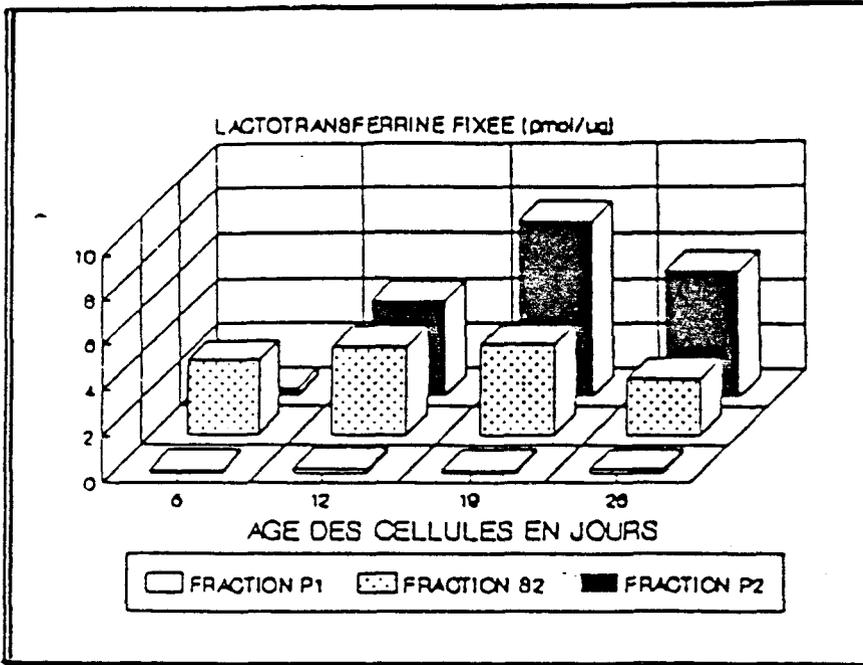
**3 - VARIATION DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS LES
DIFFERENTS COMPARTIMENTS DES CELLULES HT 29 Glc(-) EN FONCTION
DE L'AGE DES CELLULES**

L'étude a été réalisée sur les fractions S2, P1 et P2 solubilisées et déposées sur membrane de nitrocellulose. Comme précédemment, la réaction de fixation a été réalisée à pH 7,4. Les résultats (Fig. 17) montrent que tout d'abord que, quelque soit l'âge envisagé, aucune fixation spécifique n'est détectable dans la fraction P2 après soustraction de la fixation non spécifique de la lactotransferrine sur la nitrocellulose.

Concernant la fraction bordure en brosse (P2) on constate qu'à partir d'un niveau très bas (jour 5), une forte augmentation est observée au 12^{ème} jour, s'accroît au 19^{ème} et diminue légèrement au 26^{ème} jour. Si l'on considère le pourcentage de lactotransferrine fixée dans la fraction P2 par rapport aux autres fractions, il est de 65,7 au jour 19 et se maintient à cette valeur au jour 26 (68,1 %).

En ce qui concerne la fraction S2, la valeur de la quantité de lactotransferrine fixée par μg de protéines déposées est constante du 5^{ème} au 19^{ème} jour puis diminue d'environ 40 % au 26^{ème} jour. Le pourcentage de fixation dans les trois fractions étudiées, par rapport à la fixation totale, est de 86,4 (jour 5), puis il tombe à 46,3 (jour 12), et enfin diminue progressivement jusqu'à 29,5 % au 26^{ème} jour. Ce résultat nous apporte des résultats complémentaires sur le rôle de ce pool de récepteurs intracellulaires de la lactotransferrine dans les cellules HT 29 différenciées en entérocytes. On peut en effet émettre

A



B

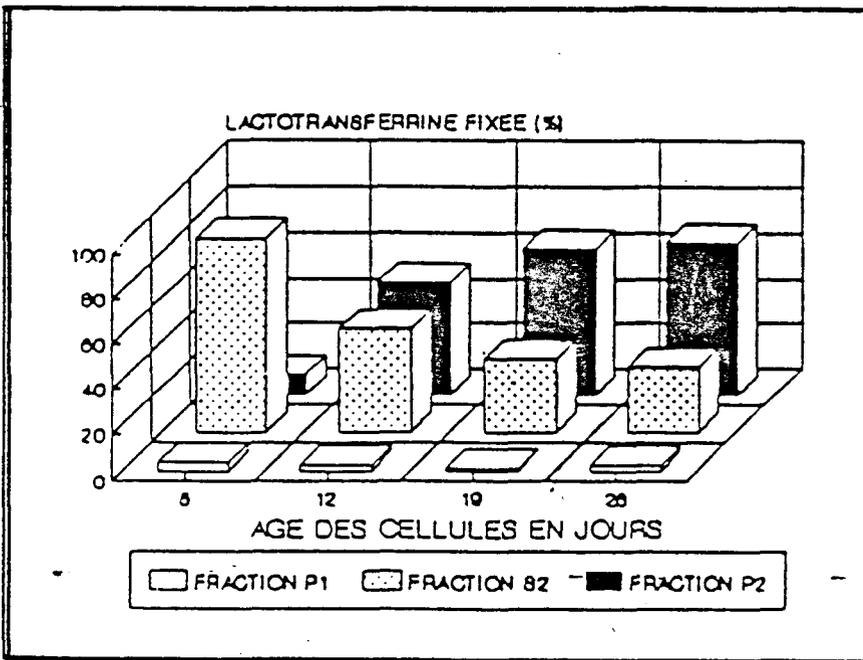


Fig. 17 : VARIATION DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LES FRACTIONS P1, S2 et P2 PREPAREES A PARTIR DE CELLULES HT 29 Glc(-) D'AGES DIFFERENTS

A : Lactotransferrine fixée en pmol/μg de protéines

B : Lactotransferrine fixée en pourcentage de la fixation totale.

l'hypothèse, fruit de l'observation comparée des pourcentages de fixation de la lactotransferrine dans les fractions S2 et P2, que le pool de récepteurs intracellulaires sert à alimenter la surface cellulaire apicale de la cellule en récepteurs de la lactotransferrine.

Pour des cellules jeunes âgées de 5 jours, alors qu'il n'y a pas ou très peu de fixation dans la fraction bordure en brosse, la quasi totalité de la fixation est observée dans la fraction intracellulaire.

Au 12^{ème} jour, 50,1 % de la fixation est membranaire (et apicale) et 46,3 % est intracellulaire. Ce qui suggère qu'une partie des récepteurs cellulaires a migré vers la bordure en brosse.

Au 19^{ème} jour, le taux de fixation de la lactotransferrine dans la fraction P2 atteint la valeur de 65,7 % et s'y maintient jusqu'au 26^{ème} jour, alors que le taux de fixation intracellulaire ne varie pas de façon significative durant la même période (de 33,2 à 29,5 %).

L'étude de la fixation de la lactotransferrine sur les différentes fractions nous a permis de proposer l'hypothèse selon laquelle une proportion importante du taux intracellulaire de récepteurs de la lactotransferrine migrerait ensuite vers la surface membranaire apicale, lieu de l'action biologique de ce récepteur. A partir du 19^{ème} jour, une stagnation relative des deux pools de récepteurs intracellulaires et membranaires (aux environs de 65 et 30 %, respectivement) est observée.

Les expériences ne permettent pas de préciser si cette stagnation est le signe d'un arrêt de la migration des récepteurs de l'intérieur de la cellule vers la membrane ou si elle résulte d'un équilibre entre les deux pools lors d'un éventuel recyclage des récepteurs membranaires. Cette dernière éventualité, pour être envisageable, entraîne l'hypothèse d'une biosynthèse continue du récepteur de la lactotransferrine. Si l'on considère maintenant la quantité de lactotransferrine fixée par μg de protéines de la fraction S2 déposé, on constate que cette valeur est

quasi-constante au cours du vieillissement de la cellule, cela malgré la migration des récepteurs vers la membrane. Cette dernière observation laisse supposer que la biosynthèse du récepteur de la lactotransferrine, par les cellules HT 29, qui débute avant d'autres manifestations visibles de la différenciation des cellules (5^{ème} jour) se poursuit après le début de la différenciation.

4 - CONCLUSION

Les études de fixation de la lactotransferrine sur les cellules HT 29 en culture permettaient de ne mettre en évidence que la fixation sur la bordure en brosse des cellules.

Ces études ont pu être complétées par les expériences de fixation sur les extraits cellulaires solubilisés et déposés sur membrane de nitrocellulose. Ainsi avons-nous pu mettre en évidence l'absence de fixation de la lactotransferrine sur les membranes baso-latérales des cellules HT 29 Glc(-) et la présence d'un pool intracellulaire dans les souches différenciées et indifférenciées.

Plusieurs éléments nous laissent légitimement conclure que ce pool intracellulaire de récepteurs aurait pour rôle de migrer vers la membrane apicale et contribuerait, grâce à une biosynthèse continue de maintenir à un niveau constant la quantité de récepteurs de la bordure en brosse.

En ce qui concerne l'effet du pH sur la fixation de la lactotransferrine, nous constatons que nos résultats diffèrent de ceux obtenus par HU *et al.* (1988) avec du matériel biologique analogue (bordure en brosse d'intestin de Souris). Ces auteurs avaient en effet déterminé une fixation optimale à pH 5,5 alors que pour les cellules HT 29, ce pH semble être de 7.

E - FIXATION DE LA SÉROTRANSFERRINE SUR LES EXTRAITS CELLULAIRES SOLUBILISÉS

1 - ÉTUDE DE LA VARIATION DE LA FIXATION DE LA SÉROTRANSFERRINE SUR LA FRACTION P1 EN FONCTION DU pH.

La fixation de la sérotransferrine a été examinée, en fonction du pH du milieu, sur la fraction P1 solubilisée et déposée sur membrane de nitrocellulose.

Les résultats (Fig. 18) montrent que pour les pH les plus acides (5 et 6), la fixation de la sérotransferrine non saturée est très similaire à celle de la protéine saturée et se situe aux environs de 3 pmol de sérotransferrine fixée par μg de protéines déposées.

La fixation de la sérotransferrine saturée reste à ce niveau élevé aux pH 7 et 8. En revanche, en présence de desferrioxamine ($100\mu\text{M}$) qui empêche la protéine de fixer le fer du milieu, la sérotransferrine non saturée en ferse fixe avec une intensité nettement plus faible. A pH 7, la fixation de cette protéine est environ 50 % moins importante que celle de la sérotransferrine saturée. A pH 8, la fixation de l'apo-sérotransferrine n'est plus que de 0,8 pmol/ μg de protéines déposées, c'est à dire quatre fois moins importante que la fixation de la sérotransferrine saturée.

CONCLUSION

Comme nous l'avions observé lors de l'étude sur les cellules entières, la fixation de la sérotransferrine non saturée sur son récepteur membranaire est beaucoup plus faible aux pH neutres que celle

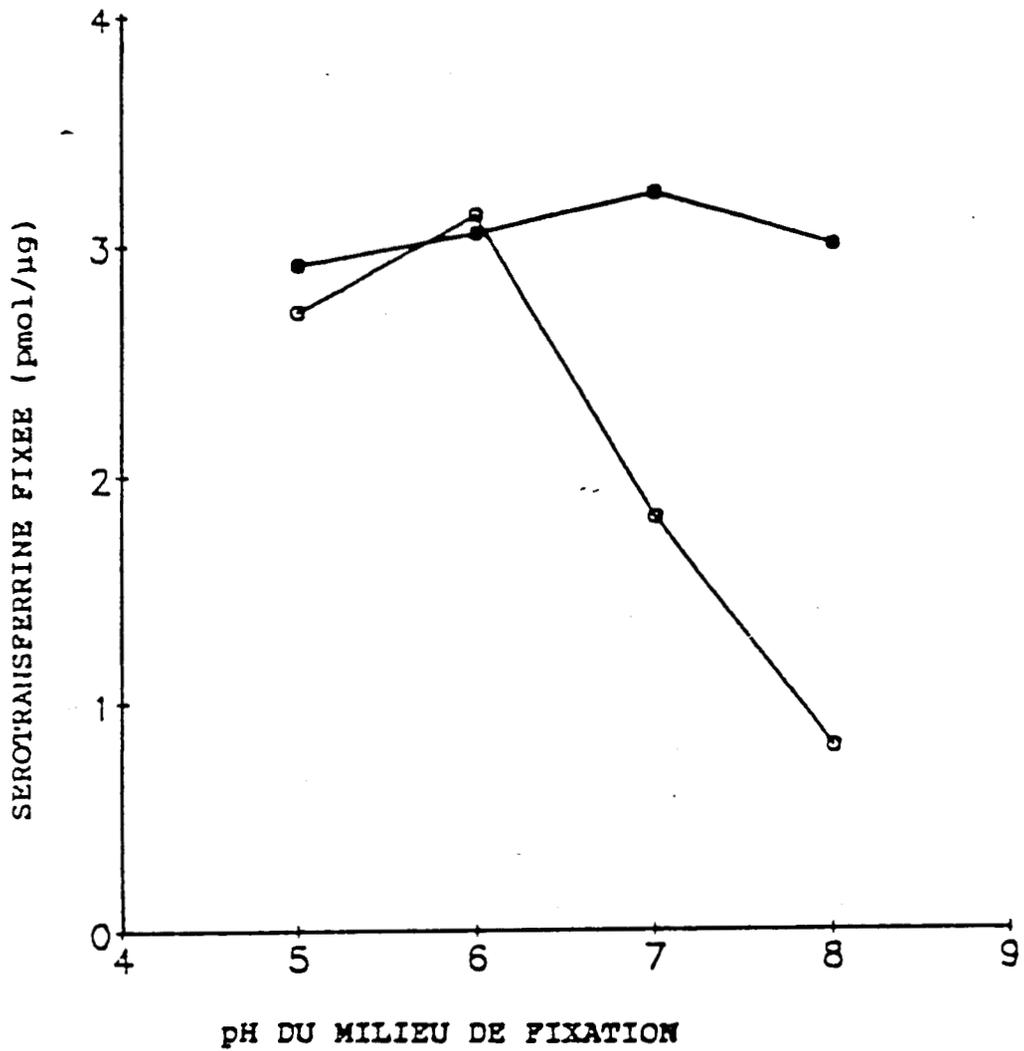


Fig. 18 : INFLUENCE DU pH SUR LA FIXATION DE LA SEROTRANSFERRINE SATUREE EN FER (●) ET NON SATUREE EN FER (○) SUR LA FRACTION P1 "MEMBANES BASOLATERALES" SOLUBILISEE

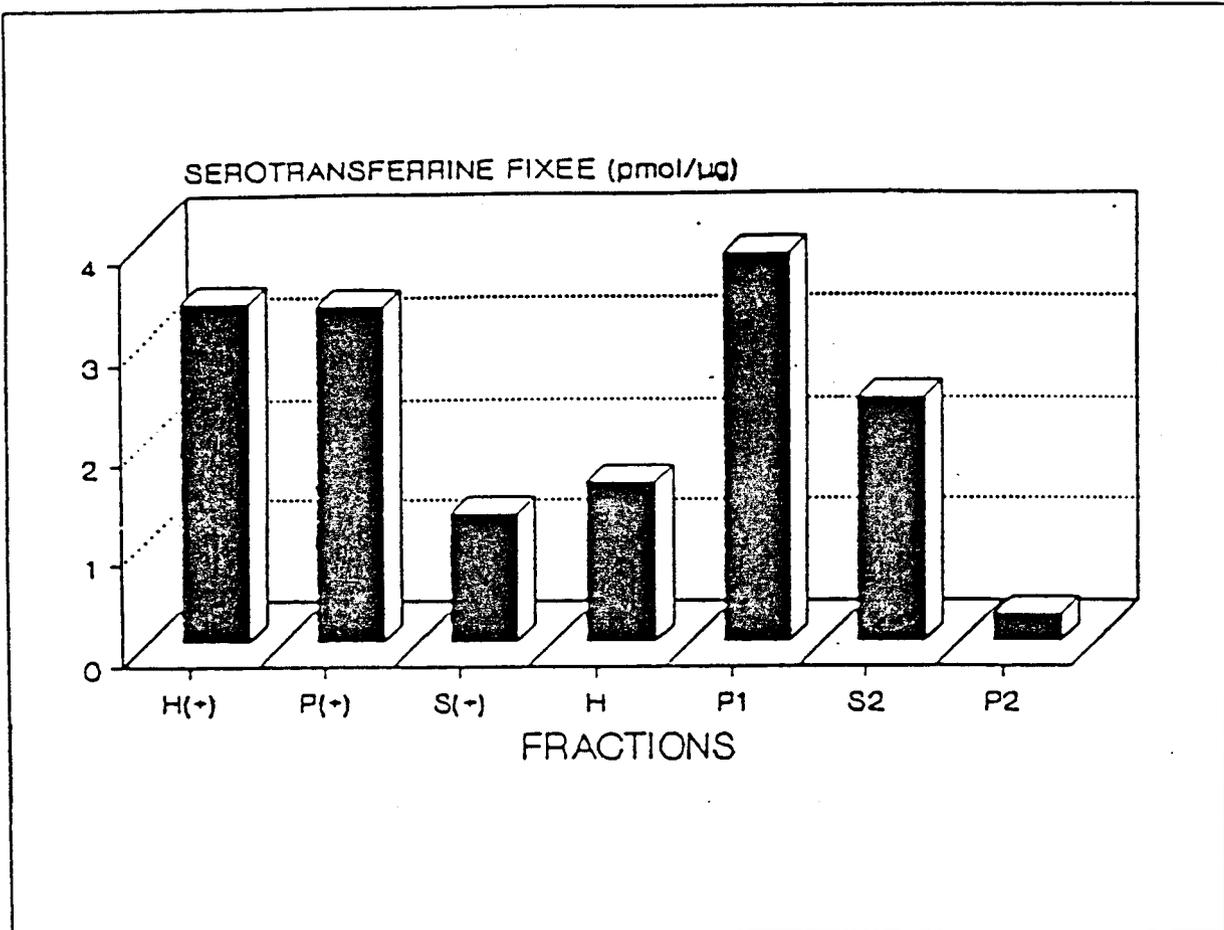
de la sérotransferrine saturée. Cette propriété du récepteur de la sérotransferrine a déjà été observée par d'autres auteurs, notamment par DAUTRY-VARSAT et al. (1983) pour le récepteur de la cellule d'hépatome HEP G2 et par KLAUSNER et al. (1983) pour les cellules de la lignée lymphocytaire K562.

2 - VARIATION DE LA FIXATION DE LA SEROTRANSFERRINE EN FONCTION DU COMPARTIMENT CELLULAIRE POUR DES CELLULES AGEES DE 20 JOURS

Les résultats de fixation de la sérotransferrine saturée sur les différentes fractions obtenues des cellules HT 29 différenciées et non différenciées (Fig. 19) montrent, d'abord, que cette protéine se fixe sur la fraction P(+) qui représente la fraction membranaire des cellules HT 29 Glc(+) à un taux de 3,4 pmol de sérotransferrine fixée par μg de protéines déposées, ce qui est en accord avec les résultats obtenus lors de l'étude sur les cellules entières.

Le milieu intracellulaire S(+) peut fixer la sérotransferrine à raison de 40% de la fixation observée dans la fraction P(+). Ce résultat démontre l'existence d'un pool intracellulaire de récepteurs de la sérotransferrine.

Les résultats de la fixation de la sérotransferrine sur les extraits solubilisés des cellules HT 29 Glc(-) indiquent que, contrairement à ce qui avait été observé lors de l'étude de la fixation de cette protéine sur les cellules HT 29 Glc(-) entières, certaines fractions peuvent fixer la sérotransferrine : la fraction S2 qui représente la fraction cytosolique où la fixation de la sérotransferrine est de 2,6 pmol par μg de protéines déposées, et surtout la fraction P2 qui représente les membranes baso-latérales, pour cette fraction, le taux de fixation est de 3,8 pmol de sérotransferrine par μg de protéines



**Fig. 19 : FIXATION DE LA SEROTRANSFERRINE SUR LES
DIFFERENTES FRACTIONS SOLUBILISEES OBTENUES A PARTIR
DES CELLULES HT 29 Glc(-) ET HT 29 Glc(+)**

déposées, soit un taux légèrement supérieur à celui observé dans la fraction membranaire P(+) des cellules HT 29 Glc(+) indifférenciées

3 - VARIATION DE LA FIXATION DE LA SÉROTRANSFERRINE DANS LES DIFFÉRENTS COMPARTIMENTS DES CELLULES HT 29 Glc(-) EN FONCTION DE L'ÂGE DES CELLULES

La Fig. 20 montre les variations de la fixation de la sérotransferrine saturée en fer sur les fractions P1, S2 et P2 obtenues à partir des cellules HT 29 Glc(-) d'âges différents (5, 12, 19 et 26 jours).

Pour des cellules jeunes (5 jours), la fixation de la sérotransferrine se répartit comme suit : 6,7 % dans la fraction P2 "bordure en brosse", 34,5 % dans la fraction S2 "intracellulaire" et 58,8 % dans la fraction P1 "membranes baso-latérales" ; soit 34,5 % dans la fraction intracellulaire et 65,5 % dans la partie membranaire.

A partir du 12^{ème} jour, la fixation de la sérotransferrine dans la fraction P2 devient presque nulle et se situe aux alentours de 2% de la fixation totale, quelque soit l'âge considéré. Si l'on considère maintenant les taux de fixation de la sérotransferrine dans les fractions P1 et S2, on constate qu'ils sont respectivement de l'ordre de 60 et 40 % et qu'ils n'évoluent pas de façon sensible pour des cellules plus âgées.

Contrairement à ce qui se passait pour la lactotransferrine lors de l'étude de la variation de la fixation dans les différentes fractions en fonction de l'âge des cellules, il n'y a pas d'évolution entre les taux de fixation intracellulaire et membranaire. Mais cet équilibre apparent entre la fixation dans les deux compartiments, atteint dès les premiers stades de la différenciation des cellules, n'exclut pas pour autant la

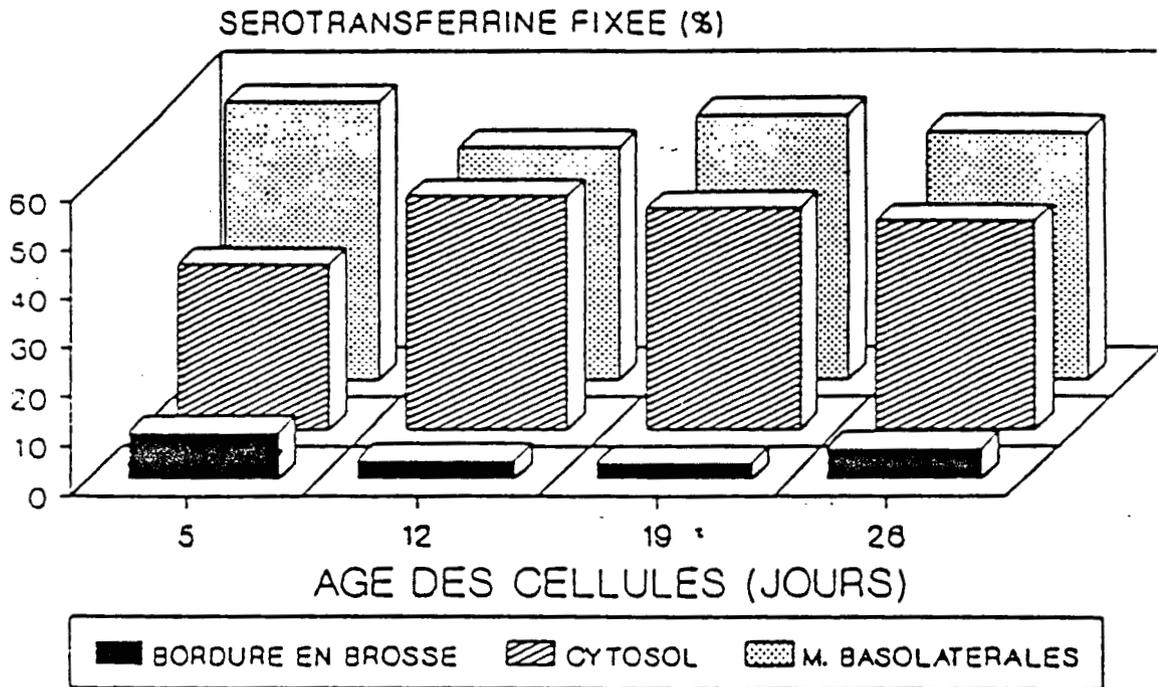


Fig. 20 : VARIATION DE LA FIXATION DE LA SEROTRANSFERRINE SUR LES FRACTIONS P1, S2 et P2 PREPAREES A PARTIR DE CELLULES HT 29 Glc(-) D'AGES DIFFERENTS

migration des récepteurs de la sérotransferrine d'un compartiment à l'autre de la cellule, mais pourrait résulter d'un équilibre entre l'échange de récepteurs lors du recyclage éventuel de ces derniers.

4 - CONCLUSION

Les études de fixation de la sérotransferrine sur les fractions subcellulaires solubilisées obtenues à partir des cellules HT 29 nous apportent, tout d'abord, une confirmation de la présence d'un récepteur membranaire de la sérotransferrine à la surface des cellules HT 29 Glc(+). En outre, concernant ces cellules indifférenciées, la technique a permis de révéler la présence d'un pool intracellulaire de récepteurs de la sérotransferrine.

Quant à l'étude de la fixation de la sérotransferrine sur les fractions obtenues des cellules HT 29 Glc(-) différenciées en entérocytes, de nouveaux résultats apparaissent. Tout d'abord, comme il avait été observé à l'intérieur des cellules pour le récepteur de la lactotransferrine, il est à noter ici la présence d'un pool intracellulaire de moyenne importance de récepteurs pour la sérotransferrine. Par ailleurs, cette étude a permis de montrer que des récepteurs pour la sérotransferrine étaient présents à la surface des membranes baso-latérales des cellules HT 29 Glc(-) différenciées en entérocyte. De même, elle a montré que ces récepteurs étaient absents de la partie apicale de la membrane de ces cellules, ce résultat est en accord avec les résultats de la fixation de la sérotransferrine sur les cellules entières.

RESULTATS : 2^{ème} PARTIE

**Etude de l'internalisation de
la lactotransferrine
humaine par les cellules HT 29
différenciées en entérocytes**

**A - ETUDE CINETIQUE DE L'INCORPORATION DE LA LACTOTRANSFERRINE PAR
LES CELLULES HT 29 GLC (-) DIFFERENCIEES**

1 - ETUDE DE LA LACTOTRANSFERRINE MARQUEE MEMBRANAIRE

Après l'incubation à 4°C, on considère que tous les sites de fixation sont saturés, en effet, pour des cellules âgées de 20 jours, le Kd de la lactotransferrine pour son récepteur est de l'ordre de 2×10^{-8} M. Les incubations ont été réalisées avec la lactotransferrine à la concentration de 10 à 20×10^{-8} M (100 à 200 nM), soit de 5 à 10 x Kd.

La quantité de lactotransferrine marquée liée aux membranes en fin de seconde incubation à 36°C est mesurée après dissociation de la liaison de la lactotransferrine de ses sites de fixation membranaires après traitement acide.

Les résultats (Fig. 21) montrent que pour les cellules incubées à 4°C, le taux de radioactivité membranaire chute régulièrement en fonction du temps. Au bout d'une heure, 40 % de la lactotransferrine radioactive initialement liée aux membranes, sont relâchés dans le milieu. A la température de l'expérience, on peut attribuer la chute de la quantité de radioactivité à la surface des cellules à une libération de lactotransferrine de ses sites membranaires. Cette libération étant due au phénomène physique de retour à l'équilibre, après que ce dernier ait été déplacé lors du changement du milieu de réaction par un autre ne contenant pas de lactotransferrine.

En ce qui concerne les cellules incubées à 36°C, on constate dans un premier temps une baisse rapide de la quantité de lactotransferrine membranaire, par comparaison avec les cellules témoins (4°C), on voit que la pente est plus rapide, en outre elle est irrégulière et varie au cours du temps, ce qui laisse présager que le phénomène observé est la

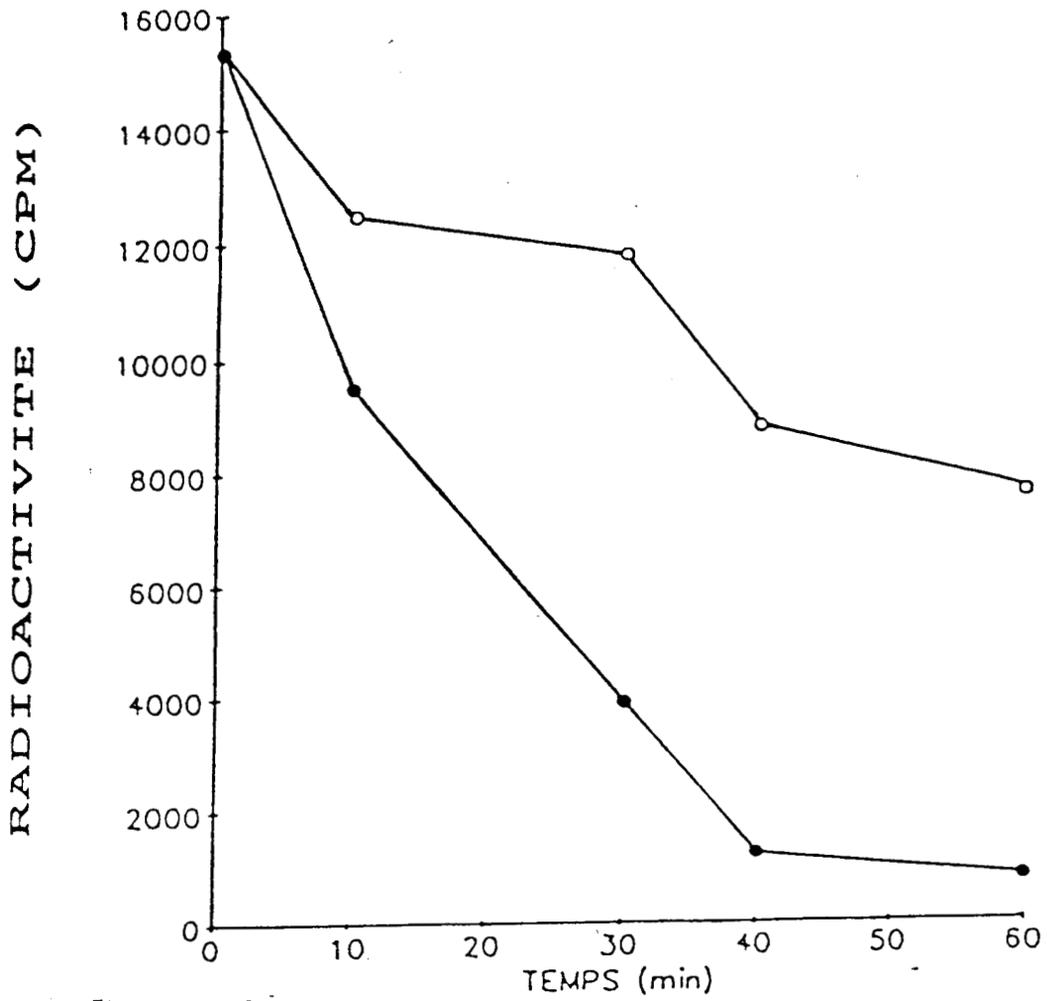


Fig. 21 : EVOLUTION EN FONCTION DU TEMPS D'INCUBATION A 4°C (○)
ET A 36 °C (●) DE LA QUANTITE DE RADIOACTIVITE MEMBRANAIRE

résultante de deux mécanismes : celui décrit plus haut pour les cellules témoins, c'est à dire le phénomène de retour à l'équilibre consécutif au changement de milieu, et un autre, de nature biologique rendu possible par l'augmentation de la température.

2 - ETUDE DE LA LACTOTRANSFERRINE RADIOACTIVE LIBEREE DANS LE MILEU D'INCUBATION A 36°C

La comparaison des taux de lactotransferrine radioactive libérés dans le milieu d'incubation des cellules témoins et des cellules incubées à 36°C (Fig. 22) laisse apparaître trois phases :

- de 0 à 10 min, on constate que la quantité de lactotransferrine marquée relarguée dans le milieu à 36°C est soit identique soit légèrement inférieure (selon les expériences) à celle libérée dans le milieu à 4°C;

- de 10 à 30 min, la deuxième phase se caractérise par un fort accroissement du taux de radioactivité libéré par les cellules à 36°C;

- après 30 min, on constate que les deux droites sont parallèles, les cellules incubées à 36°C semblent relarguer la lactotransferrine à la même vitesse que les cellules témoins.

La libération de la lactotransferrine fixée à 4°C par les cellules HT 29 Glc(-) dans le milieu d'incubation se fait donc différemment selon la température à laquelle sont placées les cellules. C'est surtout entre 15 et 35 min que la différence est sensible, les cellules placées à 36°C semblent alors libérer la lactotransferrine de façon plus rapide.

3 - ETUDE DE LA LACTOTRANSFERRINE MARQUEE ASSOCIEE AUX CELLULES

La quantité initiale de lactotransferrine radioactive associée

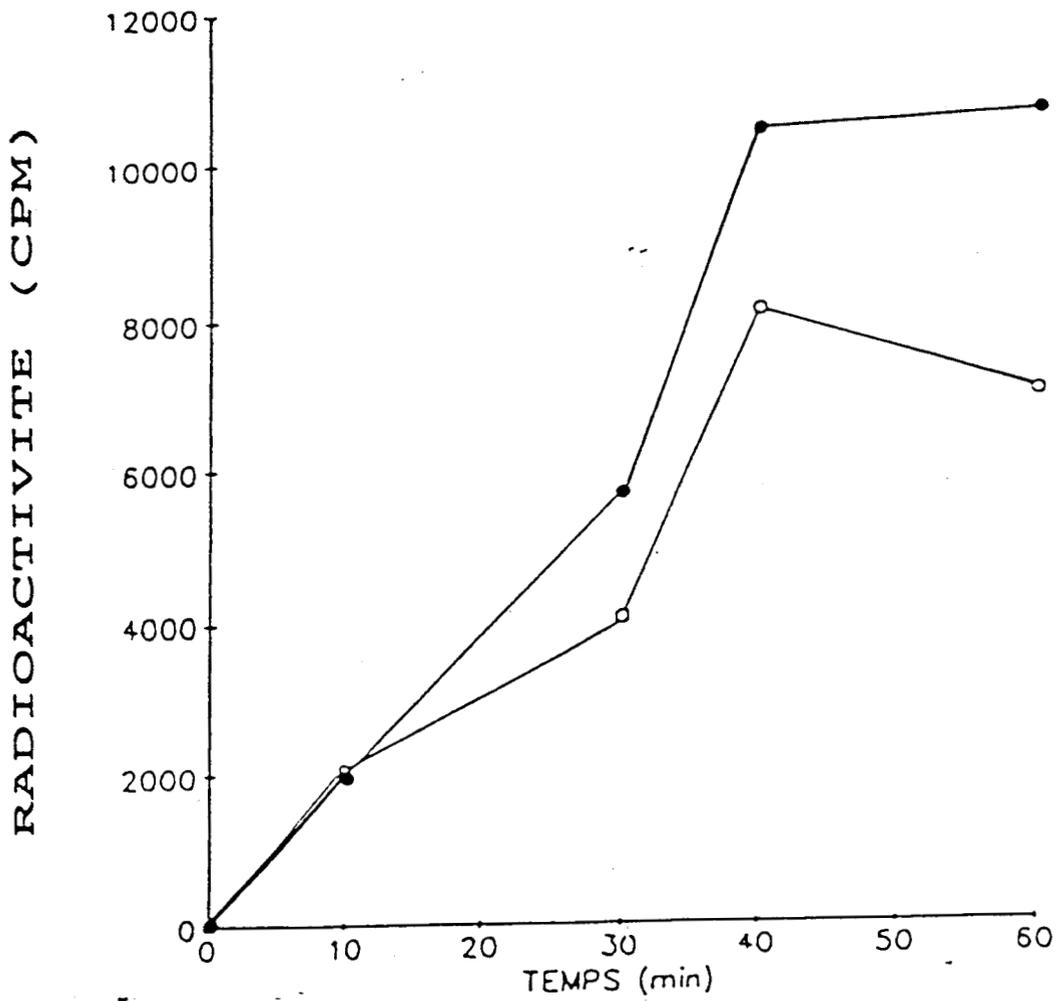


Fig. 22 : EVOLUTION EN FONCTION DU TEMPS D'INCUBATION A 4°C (○) ET A 36°C (●) DE LA QUANTITE DE RADIOACTIVITE RELACHEE DANS LE MILIEU

aux cellules (Fig. 23) est relativement importante et représente une contamination par la lactotransferrine fixée de façon aspécifique dans les espaces intersticiels du tapis cellulaire et la lactotransferrine radioactive non détachée des cellules par le traitement acide.

Pour les cellules laissées à 4°C, on constate que, quelque soit le temps d'incubation, la valeur de cette radioactivité reste constante. Il n'y a ni entrée ni sortie de lactotransferrine des cellules.

Quant aux cellules mises à incuber à 36°C, on remarque une augmentation de la quantité de radioactivité associée aux cellules de 0 à 10 min. Jusqu'à 30 min, cette quantité augmente légèrement jusqu'à un niveau double de la quantité initiale. La radioactivité associée aux cellules décroît ensuite rapidement entre 30 et 40 min pour atteindre un plateau à une valeur légèrement supérieure au niveau initial.

4 - CONCLUSION

L'ensemble des phénomènes observés est regroupé dans les Fig.4A et 4B où sont reportés, pour chaque temps, les pourcentages des valeurs de radioactivité associées aux trois compartiments étudiés.

De l'observation des figures 24A et 24B, il ressort que l'évolution des trois compartiments radioactifs étudiés est très différente selon que les cellules aient été placées à 4°C ou à 36°C.

L'élévation de température a donc permis au métabolisme cellulaire de se mettre en oeuvre et les observations suivantes ont été faites :

- d'une part, la lactotransferrine pénètre dans la cellule et atteint un plateau au bout de 15 min. La quantité de lactotransferrine radioactive ayant pénétré dans la cellule représente 30 % de la valeur initialement fixée à la surface de la cellule. Au bout de 30 min, la radioactivité sort de la cellule, toutefois ce phénomène n'est pas total. En effet au bout de 60 min, le taux de radioactivité

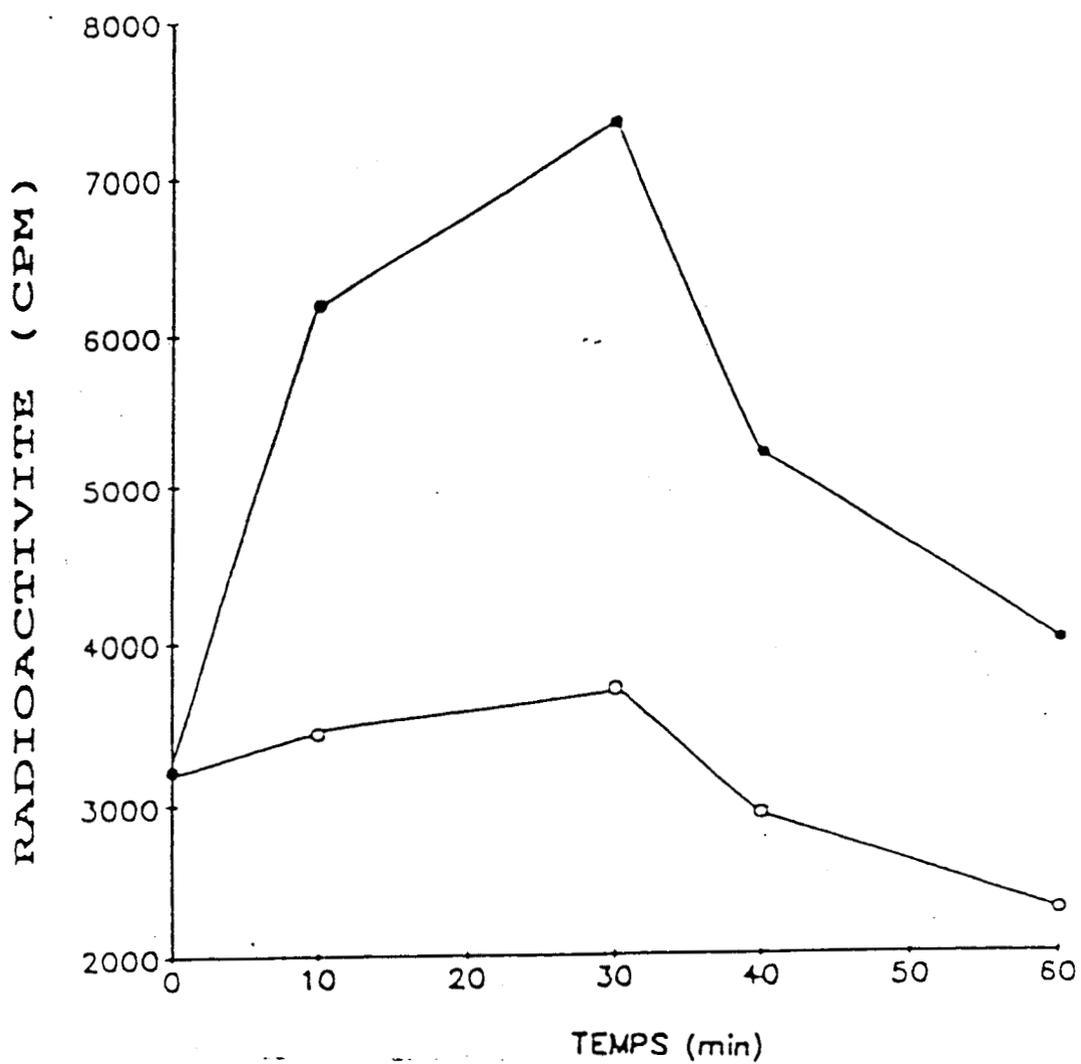


Fig. 23 : EVOLUTION EN FONCTION DU TEMPS D'INCUBATION A 4°C (○) ET A 36°C (●) DE LA QUANTITE DE RADIOACTIVITE ASSOCIEE AUX CELLULES

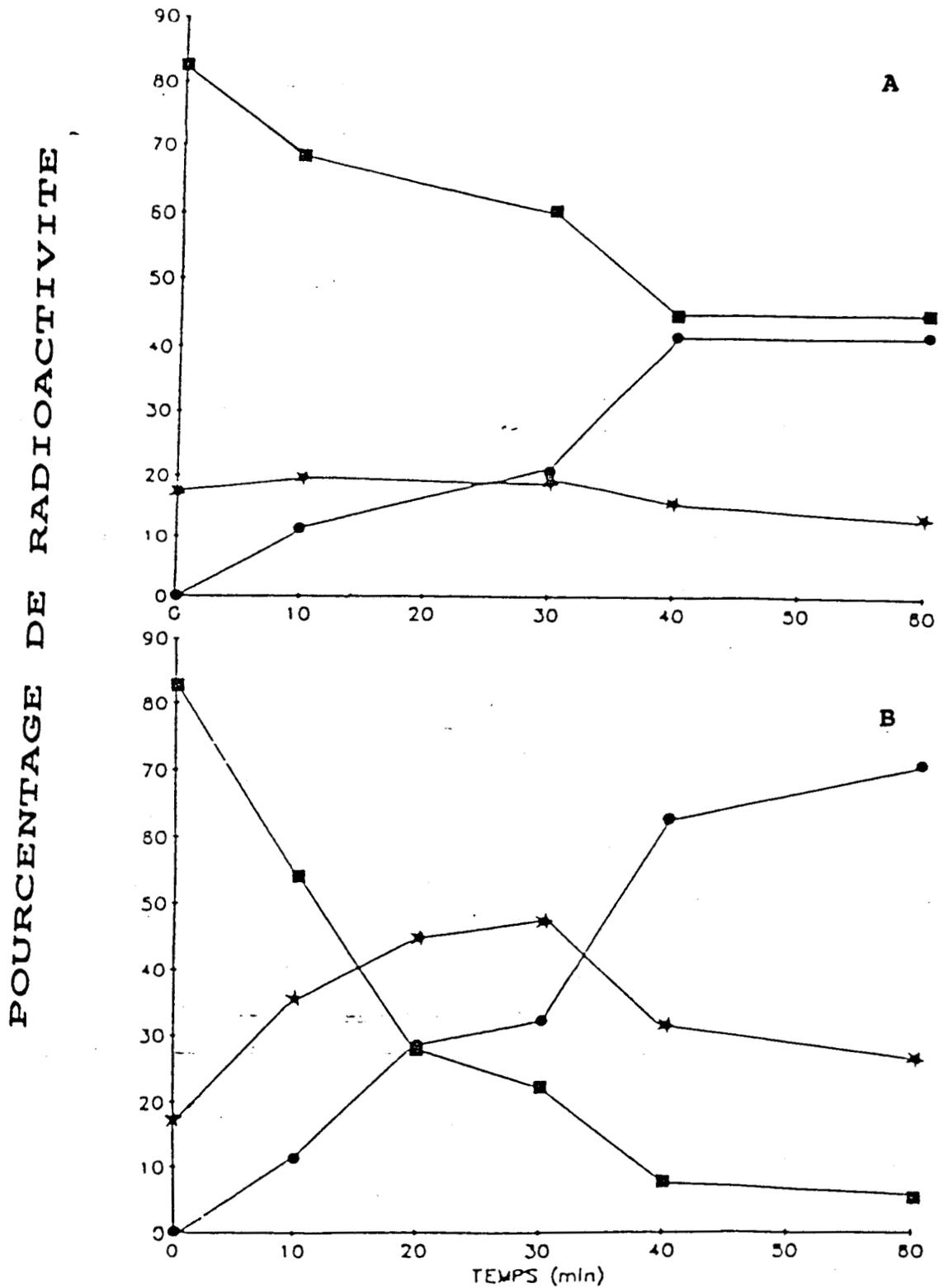


Fig. 24 : EVOLUTION DES POURCENTAGES DE RADIOACTIVITE DANS CHAQUE FRACTION EN FONCTION DU TEMPS D'INCUBATION A 4°C ET A 36°C

A : Cellules incubées à 4°C

B : Cellules incubées à 36°C

(●) : MILIEU ; (★) : CELLULES ; (■) : MEMBRANES

intracellulaire est de 25 % alors que le taux initial est de 17 % ;

- de 0 à 30 min, pour des cellules incubées à 36°C, la radioactivité membranaire chute de 60 % alors que, pour des cellules incubées à 4°C, la baisse n'est que de 20 %. La différence, soit 40 % de la lactotransferrine fixée à 4°C sur les cellules HT 29 correspond donc à la quantité de protéine qui a été internalisée par la cellule.

La lactotransferrine après s'être fixée sur ses récepteurs des cellules HT 29 Glc(-) à 4°C est capable de pénétrer dans la cellule. Ce phénomène ne se produit pas si les cellules sont laissées à basse température (4°C), il s'agit donc d'un phénomène de transport actif.

Ayant montré que les cellules HT 29 Glc(-) différenciées portaient à leur surface des récepteurs de la lactotransferrine et que cette protéine était internalisée, nous pouvons donc déjà proposer, comme mécanisme d'internalisation de cette protéine, l'endocytose adsorptive qui aboutira à la formation d'un endosome.

B - ETUDE DE LA LOCALISATION CELLULAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE INTERNALISEE

1 - LOCALISATION INTRACELLULAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE APRES UNE INCUBATION DE 30 MINUTES A 36°C

Après une incubation d'une heure à 4°C, les cellules sont lavées trois fois. Puis, du milieu préchauffé à 36°C et ne contenant pas de lactotransferrine est rajouté. Les cellules sont mises à incuber à 36°C pendant 30 min, temps au bout duquel les incubations sont arrêtées par aspiration du milieu et refroidissement des cellules. Après traitement acide et lavage, les cellules sont reprises par le tampon de centrifugation et homogénéisées. Après élimination des débris

cellulaires insolubles, la centrifugation est réalisée. Parallèlement, un lot de cellules témoins est homogénéisé de la même façon.

Les résultats (Fig. 25) du dosage des enzymes spécifiques des lysosomes montrent que les deux activités N-acétyl- β -D-hexosaminidase et phosphatase se retrouvent dans les mêmes fractions (tubes 5 à 13). L'activité sialyltransférase, golgienne, est située dans une zone de densité plus faible du gradient de Percoll. Par ailleurs, un repérage des fractions protéiques (non reporté sur la figure 25), indique que toutes les fractions sont positives avec néanmoins une intensité plus forte vers les zones de hautes densités (bas du gradient).

Avant la première centrifugation (élimination des débris insolubles), la radioactivité présente dans les homogénats obtenus à partir des cellules ayant été incubées avec la lactotransferrine marquée a été mesurée. La radioactivité des culots, qui représentent le matériel cellulaire insoluble tels que les noyaux et les débris membranaires, a été mesurée. La valeur mesurée représente 15 à 20 % de la radioactivité cellulaire initiale. Cette observation peut être rapprochée de celle faite lors de l'étude cinétique de l'internalisation où il avait été constaté qu'au temps 0 (sans incubation à 36°C après l'étape de saturation des sites à 4°C), la radioactivité associée aux cellules était de cet ordre de grandeur. Il s'agit probablement d'une contamination provenant de la lactotransferrine piégée dans les espaces intersticiels des cellules et de la lactotransferrine non détachée par le traitement acide.

La comparaison de la localisation des enzymes marqueurs et celle de la lactotransferrine marquée (Fig. 25), montre que les fractions où est concentrée la majeure partie de la lactotransferrine intracellulaire totale (88 %) sont celles qui correspondent à la zone d'expression de

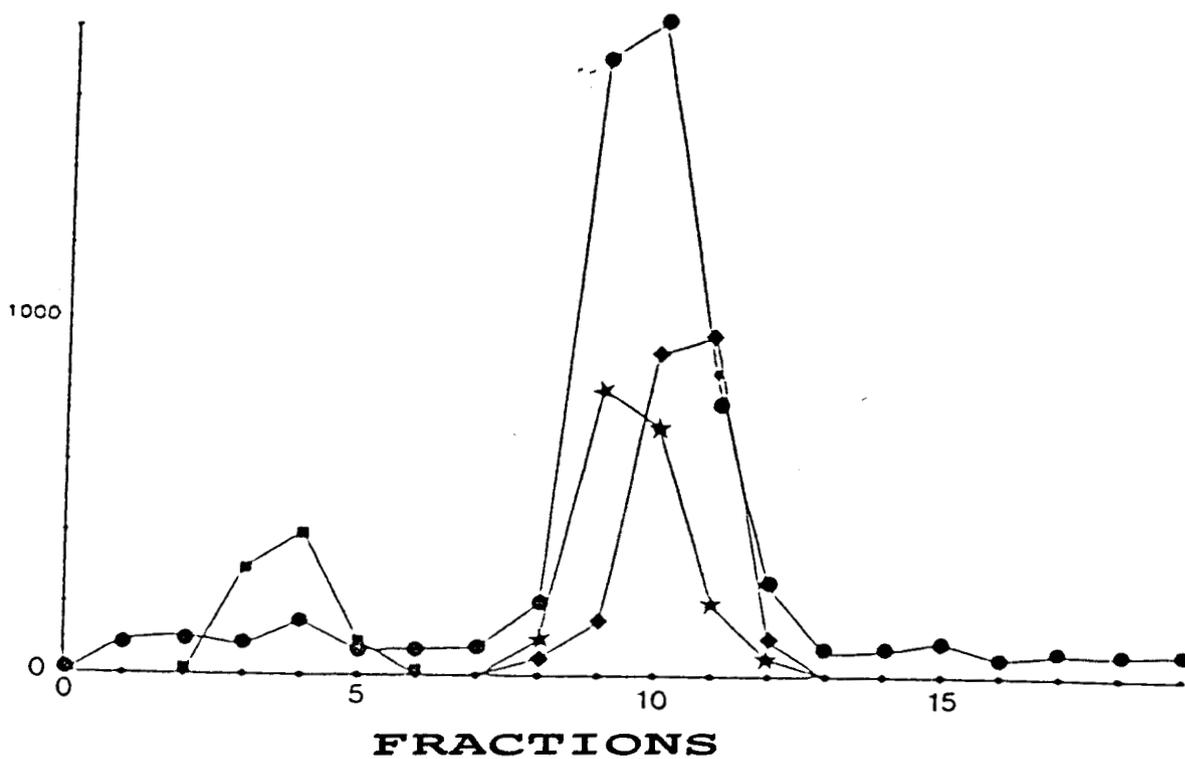


Fig. 25 : COMPARAISON DE LA LOCALISATION DE LA RADIOACTIVITE INTRACELLULAIRE ET DE LA LOCALISATION DES ENZYMES MARQUEURS DES ORGANITES INTRACELLULAIRES

(●) : Radioactivité (CPM)

(■) : Activité sialyltransférase (DPM)

(◆) : Activité hexosaminidase (DO x 1000)

(★) : Activité phosphatase (DO x 1000)

l'hexosaminidase et de la phosphatase acide. Les 12 % résiduels sont répartis régulièrement dans les autres fractions.

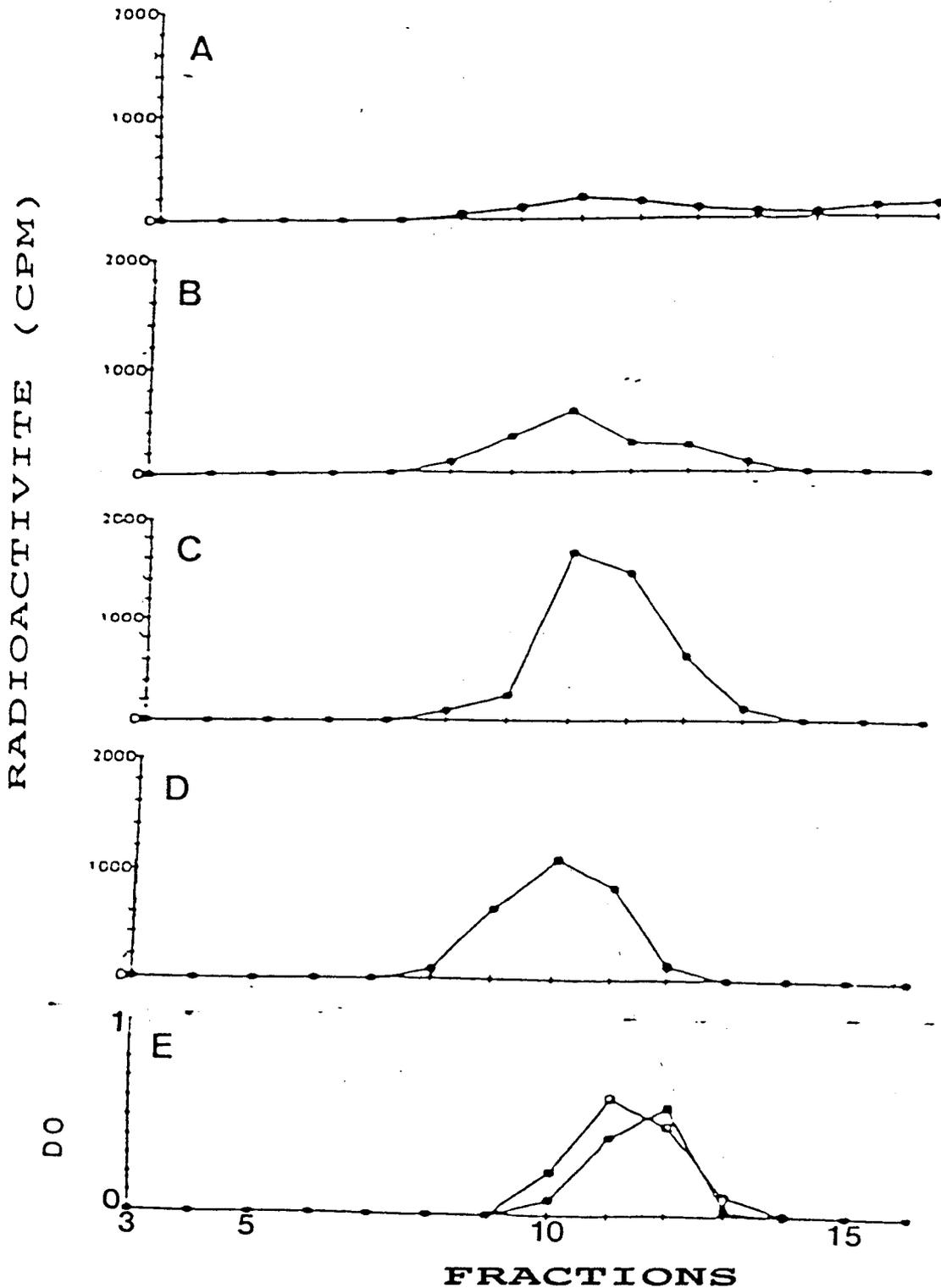
CONCLUSION

Les premières expériences de localisation de la lactotransferrine 30 min après son internalisation, montrent que cette protéine est associée à des fractions de la cellule qui contiennent les activités N-acétyl- β -D-hexosaminidasique et phosphatasique acide. Ces compartiments acides de la cellule qui contiennent les activités hydrolasiques acides sont principalement les lysosomes et les compartiments prélysosomiaux (GRIFFITHS *et al.*, 1988).

2 - VARIATION CINÉTIQUE DE LA LOCALISATION DE LA LACTOTRANSFERRINE INTERNALISÉE

Les manipulations réalisées pour étudier la localisation intracellulaire de la lactotransferrine internalisée ont été répétées sur des cellules ayant été incubées pendant des temps différents à 36°C. Cette expérience a été réalisée pour voir si la localisation intracellulaire de la lactotransferrine varie en fonction du temps.

La Fig. 26 montre que, quelque soit le temps d'incubation des cellules à 36°C, les activités hydrolasiques acides et la lactotransferrine radioactive sont toujours étroitement associées et situées dans la même zone du gradient de Percoll. Notamment aux temps 10, 30 et 60 min, pour lesquels on constate que les fractions radioactives recourent exactement les fractions des cellules témoins où sont détectées les activités hydrolasiques acides. Quant à la radioactivité intracellulaire contenue dans les cellules HT 29 Glc(-)



(●) HEXOSAMINIDASE ; (○) PHOSPHATASE

Fig. 26 : EVOLUTION EN FONCTION DU TEMPS D'INCUBATION A 36°C DE LA LOCALISATION DE LA RADIOACTIVITE INTRACELLULAIRE
 A : Cellules incubées 1h à 4°C puis 3 min à 36°C ;
 B : Cellules incubées 1h à 4°C puis 10 min à 36°C ;
 C : Cellules incubées 1h à 4°C puis 30 min à 36°C ;
 D : Cellules incubées 1h à 4°C puis 60 min à 36°C ;
 E : Cellules témoins, dosage des enzymes lysosomiaux.

placées 3 min à 36°C, les résultats sont moins clairs, la très faible quantité de radioactivité détectée est répartie en deux localisations distinctes du gradient de Percoll : 60 % de la lactotransferrine est retrouvée dans la même zone de densité que les activités β -hexosaminidase et phosphatase acide et 40 % dans la zone de forte densité.

Les observations faites aux temps 30 et 60 min sont en accord avec le mécanisme d'endocytose adsorptive proposé pour l'internalisation de la lactotransferrine par les cellules HT 29 Glc(-). Il n'en est pas de même pour les résultats observés dans les figures 26A et 26B. Par comparaison avec les descriptions des voies endocytotiques de protéines telle que l'EGF, qui après son internalisation se retrouve associée avec les lysosomes au bout de 15 à 20 minutes (PASTAN & WILLINGHAM, 1981, FITZGERALD *et al.*, 1983), ou telle que l' α 2-macroglobuline dont l'endocytose par le fibroblaste murin a été étudiée (WILLINGHAM & PASTAN, 1980 ; TYCKO & MAXFIELD, 1982) et pour laquelle il a été montré que la fusion avec les lysosomes ne se produisait qu'après des temps du même ordre, il est surprenant de constater que pour des temps de 3 et 10 minutes la radioactivité est associée aux compartiments lysosomaux.

3 - CONCLUSION

Il n'est pas surprenant de constater l'apparition de lactotransferrine radioactive dans la cellule dès les premières minutes d'incubation à 36°C. En effet, PASTAN & WILLINGHAM (1981) ont montré, lors de leurs études sur le récepteur de l'EGF, qu'un puits recouvert, contenant les complexes EGF-récepteur se formait toutes les 20 sec. Mais l'association entre la localisation de la lactotransferrine et celle des

compartiments lysosomaux après 3 ou 10 min est plus surprenante et une telle observation n'a jamais été faite.

Les mécanismes d'endocytose adsorptive décrits pour différentes protéines sont très similaires voire identiques et concordent sur le fait que la protéine endocytée est souvent dans le CURL (*late endosome*) dans les 15 premières minutes de l'internalisation (WILLINGHAM & PASTAN, 1980; PASTAN & WILLINGHAM, 1981; TYCKO & MAXFIELD, 1982).

Par ailleurs il a été clairement montré que ces vésicules endosomales du CURL ne contenaient pas l'activité phosphatase acide (TYCKO & MAXFIELD, 1982). Nous ne pouvons donc, pour expliquer l'association constatée entre la localisation de la lactotransferrine internalisée depuis 3 min et celle des compartiments lysosomaux, que supposer que le protocole de centrifugation utilisé est insuffisant pour séparer les vésicules endosomales périmembranaires et les compartiments lysosomaux. Cela peut être dû au fait qu'endosomes et vésicules lysosomales ont la même densité, ou alors que le gradient de Percoll que nous avons utilisé n'est pas assez performant pour les séparer.

Nous ne pensons toutefois pas que cela remette en cause les observations faites aux temps supérieurs à 10 minutes. En effet il a été montré que les endosomes précoces se transformaient en endosomes tardifs avant qu'ils ne fusionnent avec les vésicules des compartiments lysosomaux (PASTAN & WILLINGHAM, 1985). A des temps supérieurs à 10 min, ces endosomes tardifs sont dans la zone périnucléaires où s'opère la liaison après 10 à 20 minutes selon les types cellulaires. Nous pouvons donc postuler que les endosomes périmembranaires qui étaient présents dans la cellule 3 minutes après le début de l'incubation à 36°C n'existent plus après 30 minutes. L'évolution de la quantité de lactotransferrine intracellulaire (Fig. 23) vient appuyer cette hypothèse, en effet, la figure 23 montre qu'après 30 min, le taux de

lactotransferrine intracellulaire décroît fortement, il n'y a donc plus d'internalisation de lactotransferrine et donc plus d'endosomes. L'absence d'internalisation de la lactotransferrine après 30 min d'incubation à 36°C est confirmée par l'observation de la cinétique de libération de la radioactivité membranaire. En effet, à partir de 30 min (Fig. 22) les courbes de libération de la lactotransferrine liée aux membranes sont identiques et parallèles à 4°C et à 36°C, ce qui confirme qu'il n'y a plus d'internalisation au bout de 30 min.

Au terme de cette étude sur la localisation intracellulaire de la lactotransferrine internalisée à 36°C par les cellules HT 29 Glc(-) différenciées en entérocytes, nous pouvons conclure que la protéine se retrouve associée aux lysosomes après une incubation de 30 minutes. Nous n'avons malheureusement pas pu mettre en évidence la localisation de cette protéine lors des premières minutes de son internalisation. PASTAN & WILLINGHAM (1985) ayant remarqué pour l'EGF une relation directe entre la dégradation de ces protéines et leur arrivée dans les compartiments lysosomaux, l'étude de l'endocytose de la lactotransferrine a été poursuivie par l'étude de sa dégradation.

C - ETUDE DE LA DEGRADATION DE LA LACTOTRANSFERRINE INTERNALISEE

Les trois fractions radioactives recueillies sont concentrées par lyophilisation et déposées sur la colonne de Sephadex G-75. Une quinzaine de fractions sont recueillies et leur radioactivité est mesurée.

Après 3 min d'incubation à 36°C (Fig. 27A) les profils chromatographiques des radioactivités membranaire, intracellulaire et relachée dans le milieu ne montrent que la présence d'un seul pic qui correspond à une haute masse moléculaire. La colonne ayant été calibrée

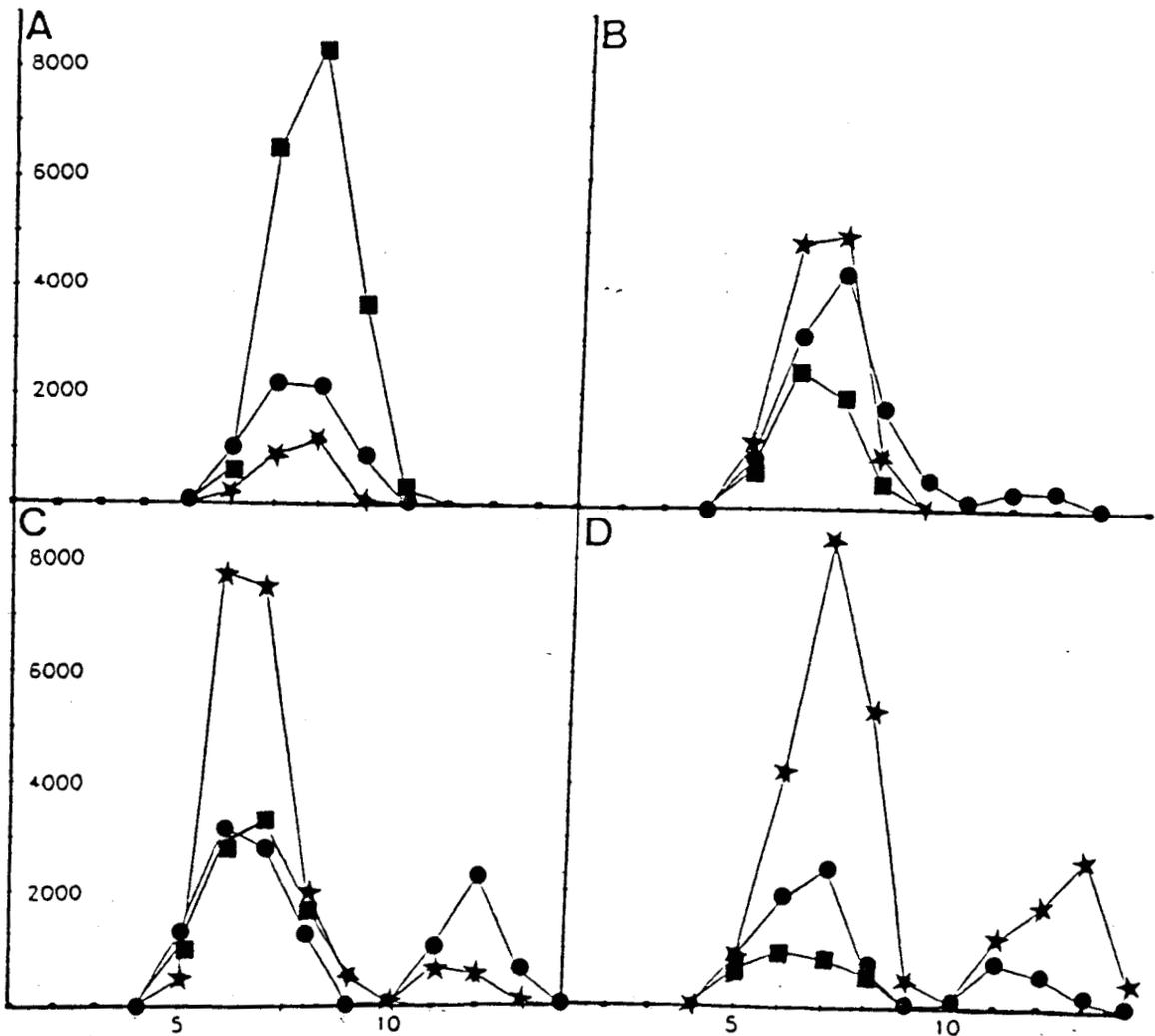


Fig. 27 : COMPARAISON DES PROFILS CHROMATOGRAPHIQUES SUR SEPHADEX G-75 DES RADIOACTIVITES MEMBRANAIRE (■) , INTRACELLULAIRE (●) ET RELACHEE DANS LE MILIEU (★) APRES INCUBATION A 36°C

- A : Incubation 3 min à 36°C
- B : Incubation 15 min à 36°C
- C : Incubation 30 min à 36°C
- D : Incubation 60 min à 36°C

avec la lactotransferrine humaine, nous pouvons conclure que ce pic correspond à la lactotransferrine non dégradée.

Après une incubation de 15 min à 36°C (Fig. 27B) on constate que les profils chromatographiques des radioactivités présentes dans le milieu et attachée aux membranes restent inchangés et se caractérisent par la présence d'un seul pic correspondant aux hautes masses moléculaires. Quant à la fraction intracellulaire, le même pic de lactotransferrine non dégradée existe et un deuxième pic de faible masse moléculaire apparaît. Ce second pic représente 5,7 % de la radioactivité intracellulaire totale. La colonne de Sephadex G-75 utilisée a été calibrée avec les fragments d'hydrolyse tryptique de la lactotransferrine bovine qui ont le même comportement chromatographique sur cette colonne que la lactotransferrine non dégradée, ce pic de faible masse moléculaire ne peut donc correspondre à ces fragments. En revanche, préalablement à l'étude, la lactotransferrine radio-iodée utilisée a été dessalée sur cette même colonne et la radioactivité correspondant à l'iode libre non couplé à la protéine sortait de la colonne au même niveau que cette radioactivité micromoléculaire qui apparaît après 15 min d'incubation à 36°C. C'est pourquoi nous pensons que ce pic correspondrait à des molécules de petite taille tels que les acides aminés qui résulteraient de la dégradation dans les lysosomes de la lactotransferrine marquée internalisée.

Au bout de 30 min (Fig. 27C), les deux pics de radioactivité intracellulaire sont toujours présents, mais leurs proportions relatives sont maintenant de 67 % pour la lactotransferrine non dégradée et 33 % pour la protéine dégradée. Les mêmes pics sont observés sur le profil chromatographique de la radioactivité libérée dans le milieu, les proportions relatives des deux pics sont respectivement de 93,8 et 6,2%. En ce qui concerne la radioactivité attachée aux membranes on constate

une nouvelle fois la présence d'un seul pic macromoléculaire correspondant à la lactotransferrine non dégradée.

Après 60 min d'incubation à 36°C (Fig. 27D), on constate que la radioactivité attachée aux membranes demeure intacte. Les deux pics de radioactivité macromoléculaire et micromoléculaire sont encore détectés pour la fraction intracellulaire et la fraction relâchée dans le milieu, la proportion de radioactivité micromoléculaire a diminué dans la cellule alors qu'elle a augmenté dans le milieu par rapport à 30 min.

CONCLUSION

L'ensemble des résultats sont rassemblés dans le tableau VI. La première observation faite est que, quelque soit le temps d'incubation des cellules HT 29 Glc(-) à 36°C, la lactotransferrine attachée aux membranes est intacte, 100 % de cette radioactivité est retrouvée dans le pic correspondant à la lactotransferrine non dégradée. Seule varie au cours du temps, la quantité de lactotransferrine attachée aux membranes, de 46,68 ng pour 10^7 cellules en début d'incubation à 3,76 ng/ 10^7 cellules au bout d'une heure à 4°C.

La valeur de la radioactivité intracellulaire associée à la fraction micromoléculaire, qui correspond à 5,7 % de la radioactivité totale au temps 15 min, augmente ensuite à 33 % à 30 min puis redescend en fin d'incubation à 19.5 %.

En ce qui concerne la fraction radioactive libérée dans le milieu par les cellules, on constate que, durant les 30 premières minutes, la lactotransferrine est libérée intacte. De la radioactivité associée à la fraction micromoléculaire apparaît au temps 30 minutes pour

TABEAU VI : DEGRADATION DE LA LACTOTRANSFERRINE INTERNALISEE PAR
LES CELLULES HT 29 Glc(-) DIFFERENCIEES

TEMPS	FRACTIONS	RADIOACTIVITE TOTALE (ng/10 ⁷ cell.)	RADIOACTIVITE MACROMOLECULAIRE (%)	RADIOACTIVITE MICROMOLECULAIRE (%)
3 min	Membranes	46,08	100	0
	Cellules	12,3	100	0
	Milieu	4	100	0
15 min	Membranes	28,92	100	0
	Cellules	19,1	94,3	5,7
	Milieu	14,6	100	0
30 min	Membranes	14,72	100	0
	Cellules	26,05	67	33
	Milieu	39	93,8	6,2
60 min	Membranes	3,76	100	0
	Cellules	14,5	80,5	19,5
	Milieu	53,2	69,8	30,2

finalement représenter 30,2 % de la radioactivité totale du milieu au bout d'une heure d'incubation.

En conclusion, la lactotransferrine internalisée par les cellules HT 29 Glc(-) différenciées en entérocytes est dégradée. Comme le montre l'étude de la fraction marquée membranaire, il est nécessaire que cette protéine pénètre dans la cellule pour être dégradée. Il apparaît des produits de dégradation dans le milieu extérieur avec un décalage par rapport à l'apparition de ces produits à l'intérieur de la cellule.

Lors de l'étude de la localisation de la lactotransferrine internalisée par les cellules HT 29, il avait été observé que la protéine radioactive était située dans la même zone que les enzymes caractéristiques des compartiments lysosomaux. Nous avons conclu que cette localisation était possible pour des temps supérieurs à 10 min mais peu vraisemblable dans le cas contraire et que, par conséquent la présence de lactotransferrine marquée dans la même zone du gradient de Percoll résultait probablement de la non séparation par la centrifugation des vésicules endosomales renfermant la lactotransferrine marquée internalisée et des vésicules lysosomales. Une relation directe entre l'arrivée d'un ligand internalisé dans les compartiments lysosomaux et la dégradation de ce ligand a été montrée (PASTAN & WILLINGHAM, 1985) pour des protéines telles que l'EGF et pour l' α 2-macroglobuline. Or, il est clair que la lactotransferrine n'est pas dégradée dans les 15 premières minutes de son entrée dans la cellule. Nous pouvons donc proposer que la lactotransferrine endocytée est renfermée dans une vésicule endosomale précoce. Cet endosome migre ensuite vers le CURL en se transformant progressivement en endosome tardif où il fusionne avec des vésicules lysosomales. A l'intérieur du lysosome ainsi formé, la lactotransferrine est dégradée.

Quant à la taille des produits de dégradation formés, la calibration de la colonne de Sèphadex G-75 utilisée montre que ces produits ne peuvent pas correspondre aux fragments d'hydrolyse de la lactotransferrine humaine décrits dans la littérature (LINE *et al.*, 1976 ; BLUARD-DECONNINCK *et al.*, 1978 ; METZ-BOUTIGUE *et al.*, 1981 ; MAZURIER *et al.*, 1983 ; SPIK *et al.*, 1983 ; LEGRAND *et al.*, 1984). Ces fragments sont les produits d'hydrolyse de la protéine par des enzymes telles que la trypsine, la chymotrypsine, la papaïne, la pepsine et la protéase V8 de *Staphylococcus aureus*. Or les endopeptidases lysosomales (ou cathepsines) (de DUVE *et al.*, 1962 ; BARRETT *et al.*, 1972, 1977) et les exopeptidases lysosomales (Mc DONALD & SCHWABE, 1977) sont très différentes. Ces enzymes peuvent dégrader une protéine totalement et très rapidement en résidus d'acides aminés (COFFEY & de DUVE, 1968). C'est pourquoi, nous concluons que la lactotransferrine internalisée qui a rejoint le compartiment lysosomal est totalement détruite en acides aminés. Au terme de cette dégradation, les acides aminés peuvent quitter le lysosome. Il a été en effet montré que la membrane lysosomale est imperméable aux peptides de taille supérieure aux dipeptides et aux acides aminés (EHRENREICH & COHN, 1969 ; LLOYD, 1971). Des transporteurs d'acides aminés ont été décrits dans la membrane lysosomale (GAHL *et al.*, 1982, 1983 ; JONAS, 1986 ; PISONI *et al.*, 1985, 1987, 1989 ; BERNAR *et al.*, 1985, 1986, TIETZE *et al.*, 1989).

Cependant, toute la lactotransferrine internalisée n'est pas détruite; au temps 30 min, 67 % de la protéine est encore intacte. Ce taux augmente et passe à 80,5 % à 60 min mais comme la lactotransferrine n'est plus internalisée après 30 min cette augmentation du taux de lactotransferrine non dégradée ne peut être due qu'à la sortie des produits d'hydrolyse de la cellule vers le milieu extérieur. Il faut noter qu'à 30 min, 6,2% de la radioactivité relâchée dans le milieu est

constituée par les produits de dégradation de la lactotransferrine rejetés par les cellules et que ce taux est de 30,2% au bout de 60 min. Ce résultat nous amène à la conclusion que la lactotransferrine continue à être dégradée après 30 min et que les produits de dégradation sont externalisés.

En conclusion, le cycle intracellulaire de la lactotransferrine internalisée par les cellules HT 29 Glc(-) différenciées en entérocytes semble être très similaire à celui de l'EGF (PASTAN & WILLINGHAM, 1981 ; FITZGERALD *et al.*, 1983 ; WILLINGHAM *et al.*, 1983 ; DICKSON *et al.*, 1983). Cette protéine, après avoir été internalisée, rejoint les compartiments lysosomiaux de la cellule où elle est dégradée moins de 20 minutes après avoir été internalisée, les produits de dégradation étant rejetés dans le milieu extérieur.

D - EFFETS DES INHIBITEURS SUR L'INTERNALISATION DE LA LACTOTRANSFERRINE

L'étude de l'internalisation de la lactotransferrine par les cellules HT 29 Glc(-) différenciées en entérocytes a été poursuivie en étudiant les effets d'inhibiteurs tel que la colchicine qui empêche les mouvements membranaires et inhibe ainsi les phénomènes d'endocytose, et tels que la monensine, la cloroquine ou le CCC (carbonyl cyano-chloro-phenyl hydrazone) qui inhibent le fonctionnement des compartiments acides de la cellule tels que les endosomes et lysosomes.

1 - EFFETS DU CARBONYL CYANO-CHLOROPHENYL HYDRAZONE (CCC) ET DE LA MONENSINE SUR LA CINÉTIQUE D'INTERNALISATION DE LA LACTOTRANSFERRINE PAR LES CELLULES HT 29 Glc(-)

a - Effets de la monensine et du CCC sur l'évolution de la lactotransferrine marquée relâchée dans le milieu

La figure 28A montre l'influence de la monensine et du CCC sur l'évolution, en fonction du temps d'incubation à 36°C, de la lactotransferrine radioactive relâchée dans le milieu. Dans un premier temps (de 0 à 15 min) la libération de lactotransferrine radioactive par les cellules traitées par les inhibiteurs est identique à la libération observée pour les cellules témoins. A partir de 15 min, la libération de lactotransferrine radioactive par les cellules non traitées devient plus rapide. Au bout de 40 min, pour les cellules témoins, la radioactivité du milieu représente plus de 60 % de la radioactivité totale et augmente ensuite pour atteindre 70 % au temps 60 min. Pour les cellules traitées, le taux de radioactivité libérée dans le milieu est inférieur à 50 % au temps 40 min et n'augmente presque pas par la suite. La monensine et le CCC ont des effets identiques sur la cinétique de libération de la lactotransferrine par les cellules HT 29 Glc(-) incubées à 36°C. La présence de l'un ou l'autre de ces inhibiteurs dans les différents milieux d'incubation a pour effet de faire descendre de 20 % le taux de radioactivité libérée par les cellules.

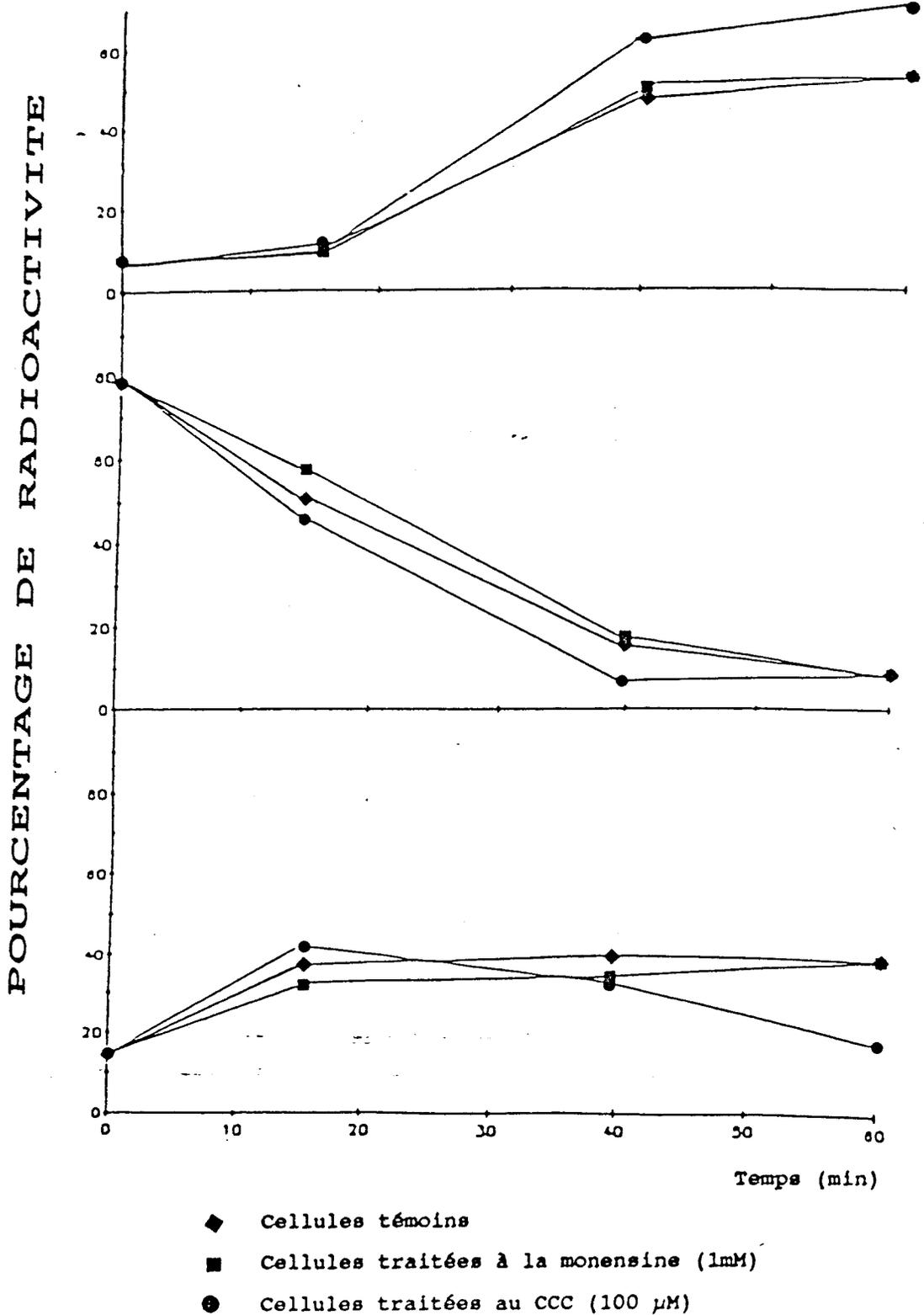


Fig. 28 : INFLUENCE DE LA MONENSINE ET DU CARBAMYL CYANIDE CHLOROPHENYL HYDRAZINE (CCC) SUR LA CINETIQUE D'INTERNALISATION DE LA LACTOTRANSFERRINE

A : MILIEU EXTERIEUR

B : MEMBRANES

C : CELLULES

b - Effets de la monensine et du CCC sur le taux de lactotransferrine radioactive liée aux membranes

La figure 28B montre que les cinétiques de libération des membranes de la lactotransferrine marquée sont identiques pour les cellules témoins et pour les cellules traitées. La variation du pourcentage de lactotransferrine radioactive liée aux membranes en fonction du temps d'incubation, ne semble pas être influencée par les inhibiteurs présents dans le milieu.

c - Effets de la monensine et du CCC sur l'évolution de la lactotransferrine marquée à l'intérieur de la cellule

Les résultats de la figure 28C montrent que, dans un premier temps, la présence de monensine ou de CCC dans les milieux d'incubation ne semble pas influencer sur l'internalisation de lactotransferrine par les cellules HT 29 Glc(-). Pendant les 15 premières minutes consécutives au début de l'incubation à 36°C, le taux intracellulaire de lactotransferrine passe de 16 à 42 %. Quant aux cellules traitées par la monensine ou le CCC, elles incorporent, dans un premier temps, la lactotransferrine de la même façon que les cellules non traitées, à un niveau toutefois légèrement inférieur (37 % pour les cellules traitées par le CCC et 33 % pour les cellules traitées par la monensine). Puis, alors que le taux de lactotransferrine radioactive présent dans la fraction intracellulaire des cellules témoins diminue progressivement jusqu'à 19 %, à un niveau légèrement supérieur au niveau initial, la quantité de radioactivité reste constante pour les cellules traitées par la monensine ou le CCC. Ces inhibiteurs semblent provoquer une accumulation de la lactotransferrine à l'intérieur des cellules.

d - Conclusion

La première conclusion, concernant l'étude de l'influence de la monensine et du CCC sur la cinétique d'endocytose de la lactotransferrine par les cellules HT 29 Glc(-) est que les deux inhibiteurs ont des effets tout à fait identiques. La figure 14 montre la récapitulation de tous les phénomènes observés lors de l'étude comparée des cinétiques d'internalisation de la lactotransferrine par les cellules HT 29 Glc(-) inhibées (Fig. 29B) ou non (Fig. 29A) par la monensine.

La monensine, comme le CCC, n'empêche pas la lactotransferrine d'être internalisée par les cellules HT 29 Glc(-). En revanche, il a été constaté que ces inhibiteurs empêchaient la lactotransferrine de ressortir de la cellule alors que, pour les cellules non traitées le passage de la lactotransferrine dans la cellule était transitoire.

2 - EFFETS DE LA COLCHICINE SUR LA CINÉTIQUE D'INTERNALISATION DE LA LACTOTRANSFERRINE PAR LES CELLULES HT 29 Glc(-)

a - Effets de la colchicine sur le taux de lactotransferrine marquée fixée aux membranes

La figure 30A montre que la variation du pourcentage de lactotransferrine radioactive fixée aux membranes en fonction du temps d'incubation est très différente en présence de colchicine. Le taux de lactotransferrine radioactive liée aux membranes passe, pour les cellules témoins, de 81% à 5% durant les 60 min d'incubation à 36°C. Pour les cellules traitées par la colchicine, le taux initial de 81 % chute régulièrement jusqu'à 50 % (40 min) puis reste constant

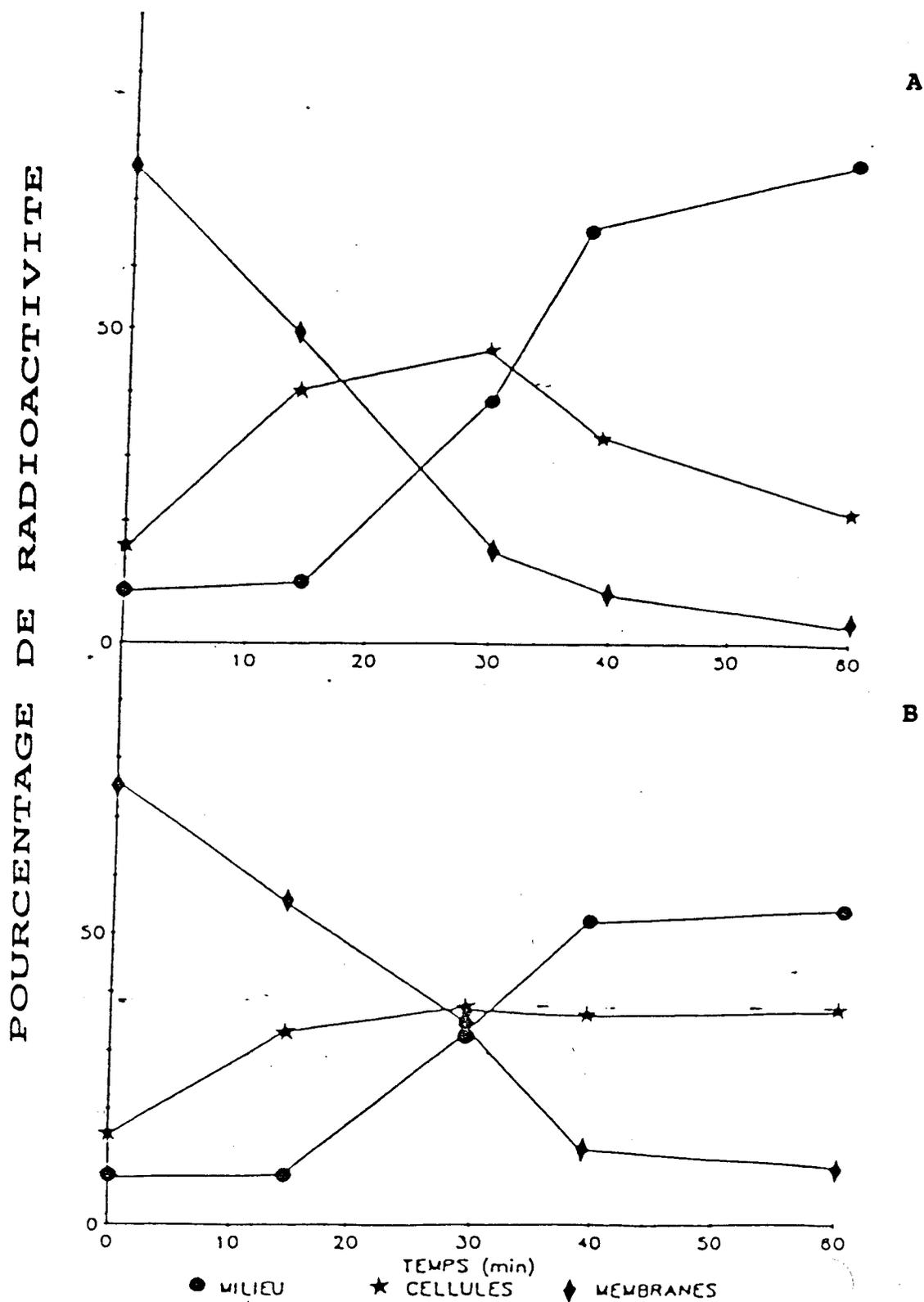


Fig. 29 : EVOLUTION DES POURCENTAGES DE RADIOACTIVITE DANS CHAQUE FRACTION POUR DES CELLULES TRAITÉES PAR LA MONENSINE, COMPARAISON AVEC DES CELLULES NON TRAITÉES

A : Cellules témoins

B : Cellules traitées par la monensine (1 mM)

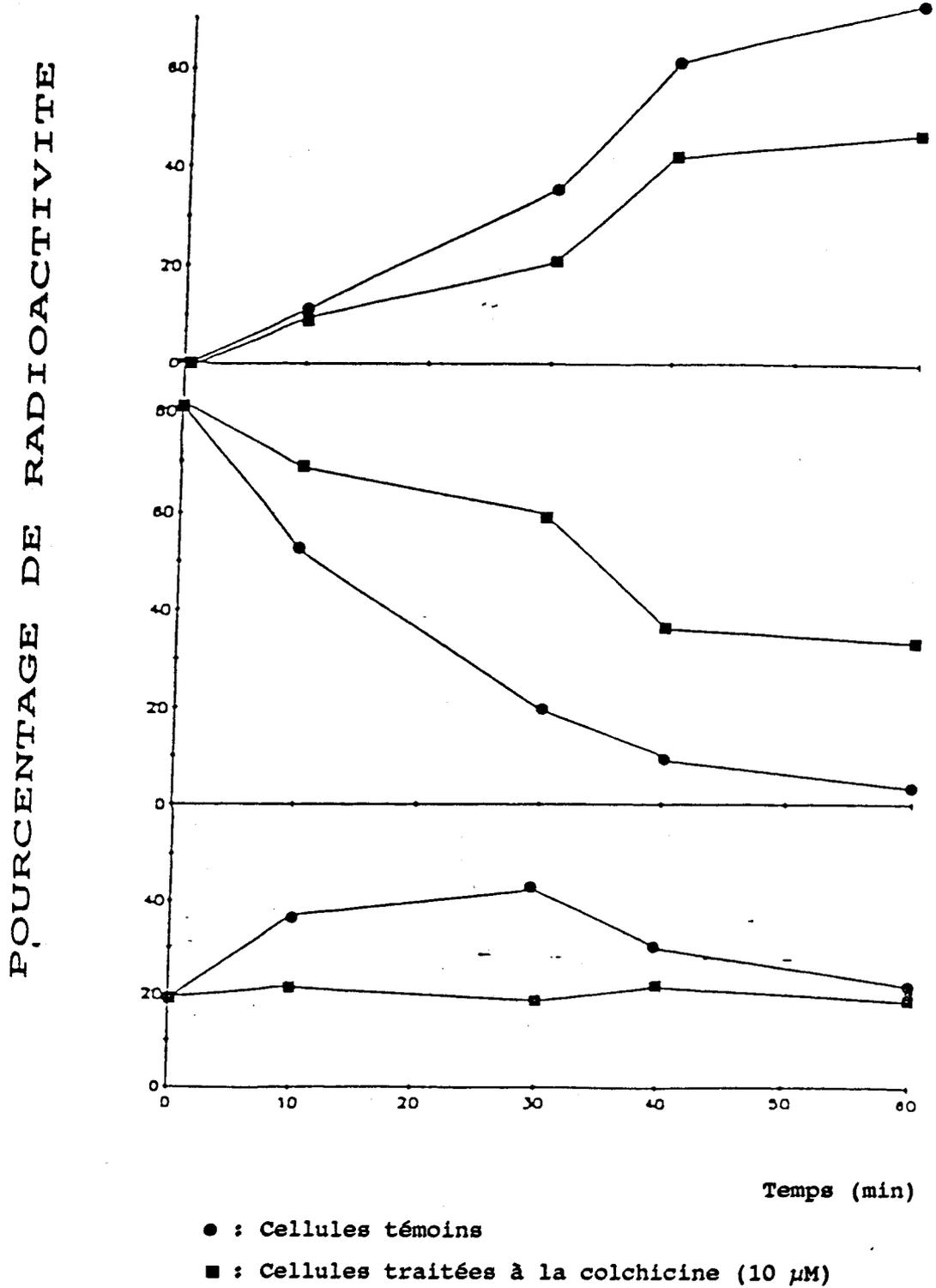


Fig. 30 : INFLUENCE DE LA COLCHICINE SUR LA CINETIQUE D'INTERNALISATION DE LA LACTOTRANSFERRINE

- A : MILIEU EXTERIEUR
B : MEMBRANES
C : CELLULES

jusqu'à la fin de l'incubation. La variation de la quantité de lactotransferrine attachée aux membranes des cellules traitées par la colchicine est tout à fait similaire à celle observée pour des cellules incubées à 4°C (Fig. 1) pour lesquelles il avait été conclu que la chute de la quantité de lactotransferrine liée aux membranes était due au phénomène de retour à l'équilibre lors du changement de milieu.

b - Effets de la colchicine sur l'évolution du taux de lactotransferrine marquée relâchée dans le milieu

La figure 30B montre l'influence de la colchicine sur l'évolution, en fonction du temps d'incubation à 36°C, de la lactotransferrine radioactive relâchée dans le milieu. Dans un premier temps (de 0 à 10 min) la libération de lactotransferrine par les cellules traitées par la colchicine est identique à celle des cellules témoins. A partir de 10 min, la libération de lactotransferrine radioactive par les cellules non traitées devient plus rapide. Au bout de 40 min, pour les cellules témoins, le pourcentage de radioactivité du milieu représente plus de 60 % de la radioactivité totale et augmente ensuite pour atteindre 70 % au temps 60 min. Pour les cellules traitées, le taux de radioactivité libérée dans le milieu est de l'ordre de 40 % de la radioactivité totale (40 min) et demeure constant. La libération de radioactivité par les cellules traitées à la colchicine est identique à celle observée pour des cellules laissées à 4°C.

c - Effets de la colchicine sur l'évolution du taux de lactotransferrine radioactive relâchée dans le milieu

Les résultats de la figure 30C montrent que par rapport aux cellules témoins il n'y a ni entrée ni sortie de lactotransferrine dans les cellules HT 29 Glc(-) traitées par la colchicine.

d - Conclusion

Les différents effets de la colchicine sur la cinétique d'internalisation de la lactotransferrine sont regroupés dans la figure 31. On constate qu'en présence de cet inhibiteur la cinétique d'internalisation est tout à fait identique à celle observée lorsque l'incubation des cellules HT 29 Glc(-) est réalisée à 4°C. Ce résultat montre que l'internalisation de la lactotransferrine nécessite le bon fonctionnement des microfibrilles et des microfilaments de tubuline du fuseau. En effet lorsque la formation des filaments est inhibée par la colchicine, l'endocytose ne se produit pas.

3 - CONCLUSION

Les inhibiteurs utilisés lors de cette étude peuvent être classés en deux groupes : la colchicine, d'une part qui inhibe l'internalisation de la lactotransferrine par les cellules HT 29 Glc(-) et, d'autre part, la monensine et le CCC, qui n'empêchent pas l'endocytose de la lactotransferrine mais provoquent l'accumulation de la lactotransferrine dans les endosomes et inhibent ainsi la sortie du matériel radioactif.

La colchicine par son action sur la tubuline et sur les microfibrilles est bien connue pour inhiber l'endocytose. De nombreux exemples sont connus tels que l'inhibition de l'endocytose des immunoglobulines IgA dimériques (KÜHN & KRAEHENBUHL, 1982).

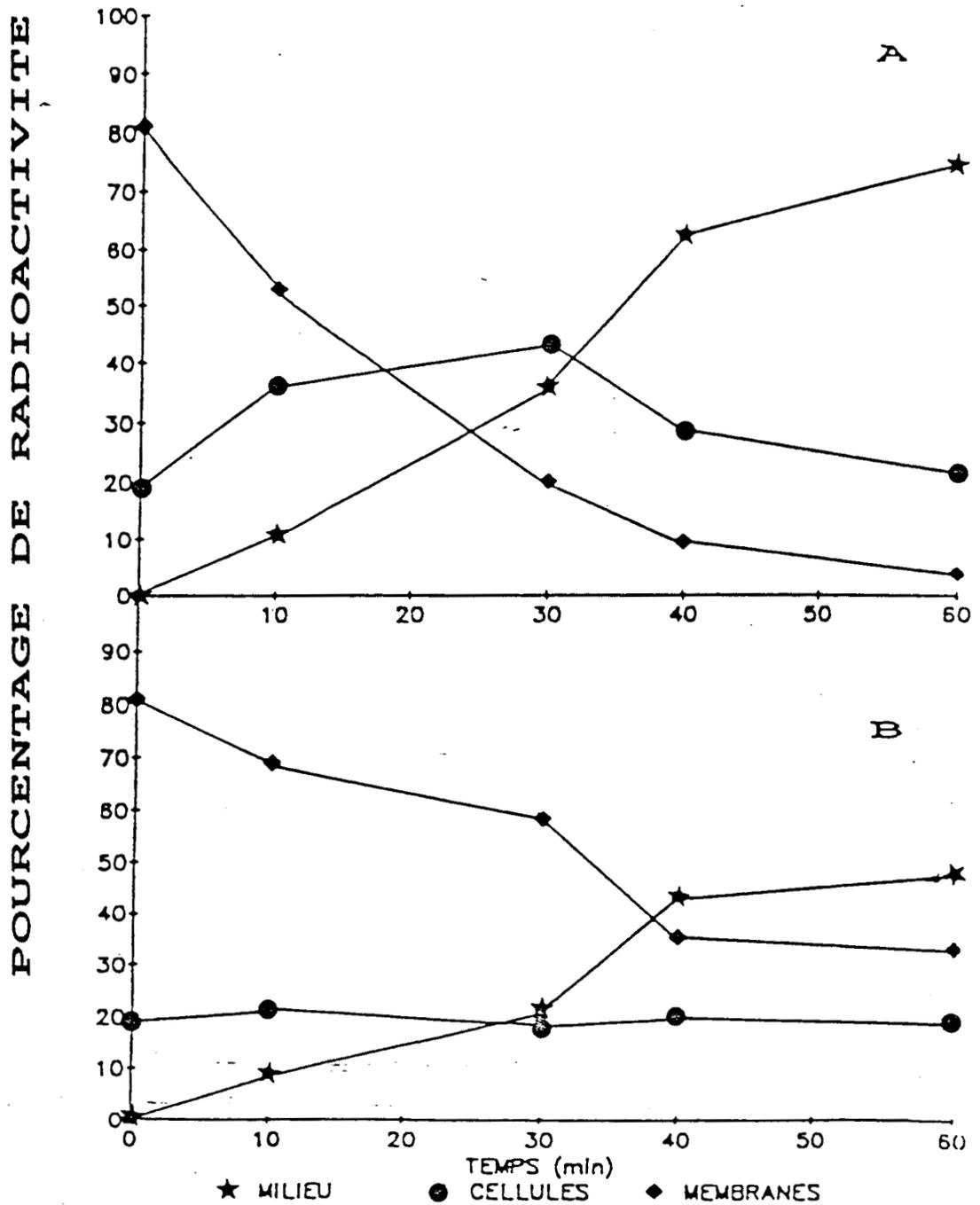


Fig. 31 : EVOLUTION DES POURCENTAGES DE RADIOACTIVITE DANS CHAQUE FRACTION POUR DES CELLULES TRAITÉES A LA COLCHICINE, COMPARAISON AVEC DES CELLULES NON TRAITÉES

A : Cellules témoins

B : Cellules traitées par la colchicine (10 µM)

La monensine est un ionophore qui favorise la sortie des protons H^+ des endosomes et l'entrée des cations Na^+ dans ces vésicules. Le blocage du fonctionnement de la pompe à protons inhibe l'acidification des endosomes et empêche la maturation nécessaire à leur migration vers le CURL et à leur fusion avec les vésicules (BASU *et al.*, 1981 ; MERION & SLY, 1983). Le CCC (carbonyl cyano-chlorophénylhydrazone) est un ionophore électrogénique qui génère un potentiel et bloque l'acidification de toutes les vésicules acides (MAXFIELD, 1985).

Ces deux derniers inhibiteurs bloquent la sortie des produits radioactifs présents dans la cellule après l'internalisation de la lactotransferrine radio-iodée. Les études de dégradation de la lactotransferrine internalisée par les cellules HT 29 Glc(-) ont montré que 33 % de la protéine endocytée étaient détruits dans les 30 premières minutes de l'internalisation et rejetés dans le milieu, le taux de lactotransferrine non dégradée augmentant par la suite (voir Tableau VI) dans la fraction intracellulaire. On peut supposer que la lactotransferrine non dégradée peut ne pas sortir de la cellule comme le font les produits de dégradation. L'inhibition de la sortie de la lactotransferrine internalisée par les cellules HT 29 Glc(-) traitées par la monensine ou par le CCC est peut-être due à une inhibition de la dégradation de cette protéine par ces inhibiteurs. C'est pour vérifier cette hypothèse que l'étude des effets des inhibiteurs a été poursuivie par l'étude de l'influence de ces inhibiteurs sur la dégradation de la lactotransferrine internalisée.

**E - ETUDE DES EFFETS DES INHIBITEURS SUR LA DEGRADATION DE LA
LACTOTRANSFERRINE INTERNALISEE PAR LES CELLULES HT 29 Glc(-)
DIFFERENCIÉES**

Pour cette étude, nous avons choisi d'examiner, par chromatographie de gel-filtration sur une colonne de Sèphadex G-75, la dégradation de la lactotransferrine internalisée après 30 min d'incubation à 36°C. C'est en effet à ce temps que le taux intracellulaire de lactotransferrine dégradée est le plus important. Les trois inhibiteurs (colchicine, monensine et CCC) utilisés lors de l'étude de la cinétique d'internalisation ont été utilisés. Les profils chromatographiques des fractions intracellulaires ont été comparés à ceux obtenus pour des cellules témoins non traitées incubées 30 min à 36°C (Fig. 32A).

La colchicine, comme l'a montré l'étude précédente, empêche l'endocytose de la lactotransferrine dans les cellules HT 29 Glc(-). Il n'a donc pas été surprenant de constater que la quantité de lactotransferrine radioactive détectée dans le compartiment intracellulaire est très faible. La fraction intracellulaire a néanmoins été chromatographiée et le profil chromatographique obtenu après passage sur la colonne de Sèphadex G-75 (Fig. 32B) montre la présence d'un seul pic correspondant à de la lactotransferrine non dégradée.

Le profil chromatographique de la fraction intracellulaire, pour les cellules traitées par la monensine (Fig. 32C), montre la présence d'un seul pic radioactif dont le profil correspond à une masse moléculaire élevée et pouvant être identifié à de la lactotransferrine non dégradée. Le constituant radioactif micromoléculaire, observé sur le profil chromatographique de la fraction intracellulaire des cellules témoins n'a pas été observé ici. La monensine semble donc inhiber

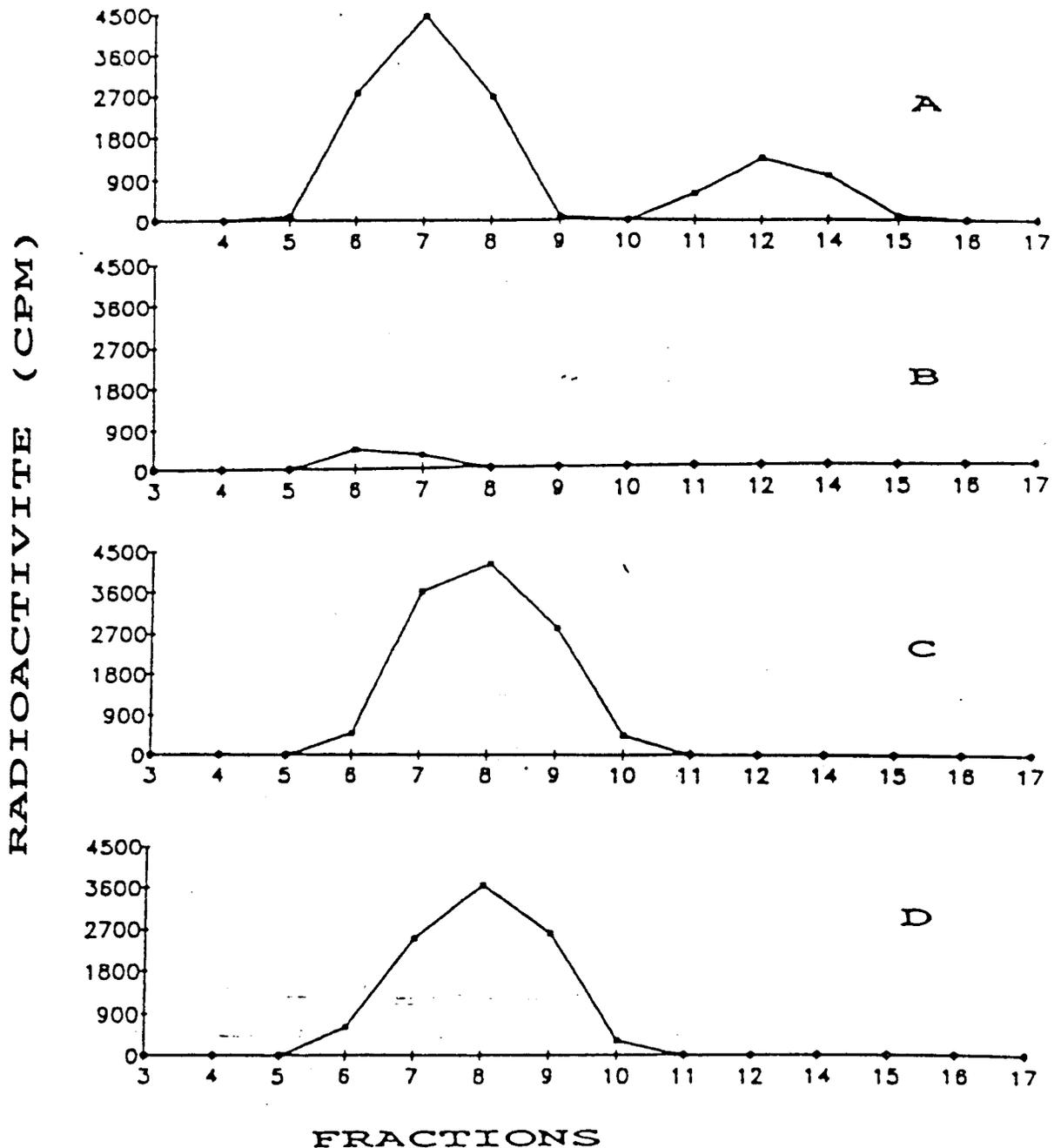


Fig. 32 : EFFET DES INHIBITEURS SUR LA DEGRADATION DE LA LACTO-TRANSFERRINE INTERNALISEE, PROFILS CHROMATOGRAPHIQUES SUR SEPHADEX G-75 DE LA RADIOACTIVITE INTRACELLULAIRE

Après saturation des sites à 4°C par la lactotransferrine marquée, les cellules sont incubées 30 min à 36°C, la fraction intracellulaire est préparée et déposée sur G-75, 20 fractions sont recueillies et mesurées pour leur radioactivité.

- A : Cellules témoins non traitées**
- B : Cellules traitées par la colchicine (10 μ M)**
- C : Cellules traitées par la monensine (1 mM)**
- D : Cellules traitées par le CCC (100 μ M)**

la dégradation de la lactotransferrine internalisée par les cellules HT 29 Glc(-).

Le CCC exerce le même effet inhibiteur que la monensine sur la dégradation de la lactotransferrine internalisée par les cellules HT 29 Glc(-). En effet le profil chromatographique observé (Fig. 32D) est identique à celui observé précédemment pour la monensine.

CONCLUSION

Les inhibiteurs du type de la monensine et du CCC qui bloquent le fonctionnement des vésicules acides de la cellule, inhibent donc la dégradation de la lactotransferrine par les cellules HT 29 Glc(-) différenciées en entérocytes. L'hypothèse que nous formulions à la fin du chapitre précédent selon laquelle l'inhibition de la sortie du matériel radioactif des cellules était due à la non dégradation de la lactotransferrine internalisée se trouve ainsi confirmée. L'inhibition de la dégradation lysosomale par les ionophores et les protonophores tels que la monensine ou le CCC est un phénomène bien connu des effets dus à ces inhibiteurs (MAXFIELD, 1985). Il a été observé pour des ligands variés, tels que la toxine diphtérique (MARNELL *et al.*, 1982) dont la dégradation en [¹²⁵I]monoiodotyrosine est inhibée par les composés qui augmentent le pH lysosomal (LEPPLA *et al.*, 1980). Nous pensons donc que la monensine et le CCC ont le même effet sur la dégradation de la lactotransferrine internalisée par les cellules HT 29 Glc(-) différenciées en entérocytes.

**E - ETUDE DE L'INFLUENCE DES INHIBITEURS SUR LA LOCALISATION DE LA
LACTOTRANSFERRINE INTERNALISEE PAR LES CELLULES HT 29 Glc(-)**

La colchicine inhibant l'entrée de la lactotransferrine dans les cellules HT 29 Glc(-), l'étude a été réalisée avec la monensine, le CCC et la chloroquine qui n'inhibent pas l'entrée de la lactotransferrine dans la cellule mais inhibent sa dégradation. L'étude de la localisation de la radioactivité intracellulaire a été faite après 30 min d'incubation à 36°C. Les résultats (Fig. 33) montrent que, quelque soit l'inhibiteur utilisé, la localisation de la radioactivité internalisée est toujours la même que la localisation de la radioactivité internalisée en absence d'inhibiteur (Fig. 33A). La radioactivité internalisée est toujours située dans la zone d'expression des enzymes marqueurs des compartiments lysosomaux de la cellule.

CONCLUSION

La monensine, le CCC et la chloroquine semblent donc ne pas influencer sur la localisation intracellulaire de la lactotransferrine internalisée. La protéine est associées aux compartiments lysosomaux de la cellule mais n'est pas dégradée par les enzymes de ces vésicules dont le fonctionnement est inhibé. La lactotransferrine non dégradée est emmagasinée dans le lysosome d'où elle ne peut sortir, la membrane de ces vésicules étant imperméable aux protéines.

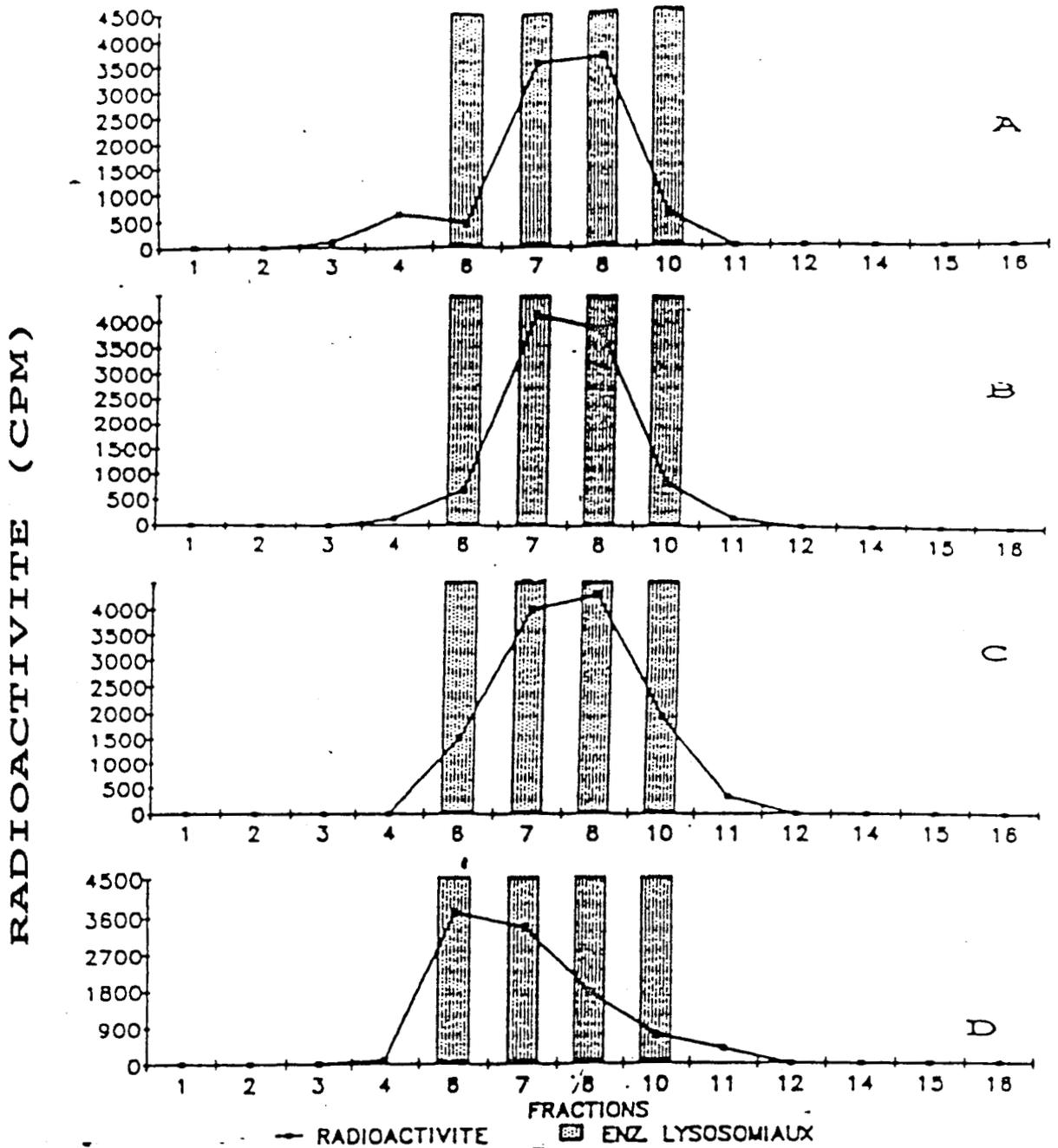


Fig. 33 : EFFET DES INHIBITEURS SUR LA LOCALISATION INTRACELLULAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE INTERNALISEE

Les cellules, après saturation des sites à 4°C par de la lactotransferrine marquée, sont incubées à 36°C pendant 30 min. La fraction intracellulaire est préparée et centrifugée, puis 15 fractions sont recueillies et mesurée pour leur radioactivité et leur activité hexosaminidase et phosphatase acides (voir section "Matériels et Méthodes").

- A : Témoin ; cellules non traitées
- B : Cellules traitées par la monensine (1 mM)
- C : Cellules traitées par le CCC (100 μ M)
- D : Cellules traitées par la chloroquine (100 μ M)

IV - CONCLUSION ET DISCUSSION

1 - FIXATION DE LA SÉROTRANSFERRINE

Un récepteur membranaire de la sérotransferrine est présent dans les cellules HT 29 Glc(-) différenciées en entérocytes ; il est exclusivement localisé à la surface des membranes baso-latérales de ces cellules. Les expériences de fixation de la sérotransferrine sur les cellules HT 29 Glc(-) entières en culture ne nous avaient pas permis de détecter la fixation de cette protéine sur son récepteur. Cela n'est guère surprenant, la monocouche de cellules HT 29 Glc(-) forme un épithélium et des jonctions serrées relient les cellules entr'elles (ROUSSET, 1986). Dès lors, par la présence même de ces jonctions, il est normal que les études de fixation sur les cellules entières en culture n'aient pas permis de caractériser ces récepteurs.

La présence du récepteur de la sérotransferrine dans les cellules HT 29 Glc(-) différenciées a été révélée par les expériences de fixation sur les extraits cellulaires solubilisés et déposés sur membrane de nitrocellulose. La même technique a permis de montrer la présence à l'intérieur de la cellule d'un "pool" de récepteurs de la sérotransferrine qui représente jusqu'à 40 % de la fixation totale.

La présence de récepteurs de la sérotransferrine a également été détectée à la surface des cellules HT 29 Glc(+) non différenciées. Ce résultat a été confirmé par le dosage des récepteurs dans les différentes fractions obtenues à partir des cellules HT 29 indifférenciées, dosage qui a permis également de mettre en évidence l'existence de récepteurs de la sérotransferrine dans la fraction intracellulaire de ces cellules.

Les cellules HT 29 Glc(+) sont des cellules indifférenciées qui poussent continuellement (ROUSSET, 1986) même après la confluence, jusqu'à former des multi-couches cellulaires. Or, le récepteur de la sérotransferrine a été mis en évidence à la surface de nombreuses cellules humaines (NEWMAN et al., 1988) et il a été observé que sa présence à la surface des cellules est directement liée à la prolifération cellulaire (LARRICK & CRESSWELL, 1979 ; SUTHERLAND et al., 1981). Il est donc normal de trouver à la surface des cellules HT 29 Glc(+), qui sont des cellules tumorales prolifératives, des récepteurs de la sérotransferrine.

Propriétés du récepteur de la sérotransferrine

Les effets du pH et de la saturation en fer sur la fixation de la sérotransferrine sur son récepteur ont été étudiés. D'abord sur les cellules HT 29 Glc (+) entières en culture, pour lesquelles il a été montré qu'à pH 7,4 les deux formes de la protéine se fixaient avec des affinités différentes sur leurs récepteurs, bien que le nombre de sites de fixation soit identique dans les deux cas. La constante de dissociation de la sérotransferrine saturée en fer est de $1,29 \pm 0,135 \times 10^{-9}$ M ; elle est de $3,7 \times 10^{-7}$ M pour la sérotransferrine non saturée. Puis, une étude similaire a été réalisée sur la fraction P1, fraction enrichie en membranes baso-latérales des cellules HT 29 Glc(-) différenciées. Il a été montré que la fixation des deux formes de la sérotransferrine est identique aux pH 5 et 6. En revanche, lorsque les études ont été faites à pH 7, et plus encore à pH 8, il a été constaté que la fixation de la sérotransferrine non saturée en fer est nettement moins forte que celle de la protéine saturée.

Conclusions sur le récepteur de la sérotransferrine

Le récepteur de la sérotransferrine des cellules HT 29 Glc(+) et Glc(-) semble donc posséder les mêmes propriétés que celles du récepteur bien connu trouvé à la surface de nombreuses cellules humaines (REGOECZI, 1984), particulièrement celui de la lignée cellulaire HEP G2 (DAUTRY-VARSAT *et al.*, 1983) dont les Kd sont, à pH 7,3, de 7×10^{-7} M et 7×10^{-9} M pour respectivement les sérotransferrines saturées et non saturées, ou celui de la lignée K 562 (KLAUSNER *et al.*, 1983) dont les Kd respectifs pour les même protéines sont, à pH 7,2 de $4,8 \times 10^{-8}$ M et $1,9 \times 10^{-9}$ M.

D'un point de vue plus général, concernant l'utilisation de la souche HT 29 Glc(-) comme modèle pour l'étude du rôle des transferrines dans les mécanisme d'assimilation du fer alimentaire par l'entérocyte, l'absence du récepteur de la sérotransferrine dans la partie apicale de cette cellule différenciée est à rapprocher de diverses observations faites sur différents modèles où le récepteur de la sérotransferrine avait été recherché sans pouvoir être mis en évidence : dans la bordure en brosse des entérocytes de Lapin (MAZURIER *et al.*, 1985) ; de Rat (PARMLEY *et al.*, 1985 ; BANERJEE *et al.*, 1986) ; chez l'Homme (OSTERLÖH *et al.*, 1986) ; chez la Souris (HU *et al.*, 1988) et chez le Singe (DAVIDSON & LÖNNERDAL, 1988). L'absence de récepteurs de la sérotransferrine à la surface de la bordure en brosse des cellules HT 29 Glc(-) différenciées en entérocytes vient donc confirmer ces données.

2 - FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE

Les cellules HT 29 Glc(-) qui ont développé une différenciation de type entérocytaire, peuvent fixer la lactotransferrine d'une façon

saturable, réversible et spécifique. La fixation de cette protéine sur ces cellules a donc toutes les caractéristiques d'une fixation médiée par un récepteur membranaire.

L'analyse selon SCATCHARD (1949) des résultats de fixation de la lactotransferrine a permis de calculer les constantes de fixation suivantes : $n = 2,91 \pm 0,06 \times 10^4$ sites par cellule et $K_d = 3,91 \pm 0,115 \times 10^{-8}$ M. Ces résultats ont été obtenus à pH 7,4, avec une lactotransferrine presque totalement dépourvue de fer (entre 10 et 15 % de saturation) et pour des cellules âgées de 20 jours. Nos résultats de dosage de deux enzymes marqueurs de la bordure en brosse (sucrase et aminopeptidase-N) ayant montré qu'à cet âge les cellules HT 29 Glc(-) avaient suivi une différenciation avancée. Avec de la lactotransferrine saturée en fer (taux de saturation supérieur à 85 %), les études de fixation au même pH (7,4) et avec des cellules du même âge, ont conduit à la conclusion que les constantes de fixation étaient les suivantes : $n = 3,8 \pm 0,7 \times 10^4$ sites par cellule et $K_d = 3,55 \pm 0,85 \times 10^{-8}$ M. La conclusion de cette observation est que les deux formes de lactotransferrine se fixent sur leurs récepteurs avec la même affinité, tout au moins à pH 7,4. Les mêmes manipulations, réalisées avec des cellules âgées de 16 jours ont conduit aux mêmes conclusions, c'est à dire, que pour des cellules de cet âge également, les deux lactotransferrines (saturée en fer et non saturée) se fixaient de la même façon.

Cette propriété du récepteur de la lactotransferrine a déjà été observée (HU et al., 1988) chez la Souris. Ces auteurs, étudiant la fixation des deux lactotransferrines sur des vésicules de bordure en brosse solubilisées en fonction du pH du milieu, avaient conclu que, quelque soit le pH, la lactotransferrine non saturée en fer se fixait de la même façon que la lactotransferrine saturée. Ces auteurs avaient

aussi observé que la fixation optimale des deux protéines était observée entre les pH 5,5 et 6. Cette même étude a été réalisée avec les vésicules de bordure en brosse solubilisées préparées à partir de cellules HT 29 Glc(-) âgées de 20 jours. Les résultats obtenus sont en partie identiques à ceux décrits plus haut : en ce qui concerne la comparaison de la fixation des deux formes de la protéine, il a été observé que leur fixation était indentique pour tous les pH étudiés ; quant au pH optimal de fixation, celui trouvé est situé autour de 7, sans toutefois qu'il ait été observé de variation sensible de la fixation des lactotransferrines aux différents pH testés.

La différence de comportement des récepteurs de la lactotransferrine et de la sérotransferrine vis-à-vis du pH et de la saturation de la protéine est très intéressante pour les futures études sur l'internalisation de la lactotransferrine par les cellules HT 29 Glc(-). En effet, elle implique des différences dans le cycle intracellulaire des deux transferrines liées à leurs récepteurs.

Les cellules HT 29 Glc(+) non différenciées ne peuvent pas fixer la lactotransferrine de façon spécifique comme le font les cellules HT 29 Glc(-). L'apparition de récepteurs de la lactotransferrine, lors de la différenciation des cellules laisse supposer que ce récepteur pourrait être un nouveau marqueur de la différenciation de ces cellules. Poursuivant plus loin l'étude nous avons regardé si le nombre, les propriétés et la répartition de ce récepteur évoluaient lors de la différenciation des cellules. D'abord par l'étude des constantes de fixation de la lactotransferrine sur des cellules HT 29 Glc(-) d'âges différents, puis par l'étude de la fixation de la lactotransferrine sur les fractions solubilisées préparées à partir de cellules HT 29 Glc(-) d'âges différents.

Evolution de la fixation de la lactotransferrine

Les résultats de l'étude de l'évolution des constantes de fixation sur les cellules entières ont montré que le nombre de sites de fixation de la lactotransferrine des cellules HT 29 augmente considérablement lors du processus de différenciation (suivi par la mesure de l'activité de la sucrase dans la fraction bordure en brosse). Si la présence de l'activité sucrasique dans la partie apicale est détectée plus précocement (8^{ème} jour) que la présence de récepteurs (12^{ème} jour), il a été constaté que du jour 12 au jour 20 le nombre de récepteurs de la bordure en brosse augmente d'un facteur 27,3 alors que, durant la même période, l'activité de la sucrase n'augmente que d'un facteur 3,44.

Les études de fixation de la lactotransferrine sur les fraction S2 "intracellulaire" et P2 "bordure en brosse" solubilisées ont montré que pour les jeunes cellules HT 29 Glc(-) (5 jours) il existait un taux élevé de fixation intracellulaire de la lactotransferrine, alors qu'aucune fixation significative n'avait été observée dans la fraction P2. Ce résultat est très intéressant et complète celui obtenu lors de l'étude avec les cellules entières. En effet, l'apparition très tôt dans la cellule HT 29 Glc(-) de récepteurs de la lactotransferrine, alors que ces derniers ne sont pas encore exprimés à la surface membranaire apicale nous amène à la conclusion que le récepteur de la lactotransferrine pourrait être un nouveau marqueur précoce de la différenciation entérocytaire des cellules HT 29 Glc(-). Récemment, un autre marqueur précoce de la différenciation des cellules HT 29 a été mis en évidence (OGIER-DENIS *et al.*, 1988, 1989, 1990); il s'agit des structures des glycanes des glycoprotéines des cellules HT 29. Ces auteurs ont montré que les cellules HT 29 Glc(+) accumulaient des structures glycaniques immatures de type oligomannosidique comprenant

de 8 à 9 résidus de mannose alors que les cellules HT 29 Glc(-) ne le faisaient pas. Cette distinction entre les structures des glycanes des deux types de cellule est mesurable et dosable dès la phase de croissance exponentielle et donc avant que ne soient visibles les manifestations structurales et enzymatiques de la différenciation.

Conclusion sur le récepteur de la lactotransferrine

La présence d'un récepteur de la lactotransferrine dans la membrane de la bordure en brosse des cellules HT 29 Glc(-) vient confirmer les résultats obtenus par d'autres auteurs qui avaient constaté également la présence d'un tel récepteur à la surface de la bordure en brosse d'entérocytes humains (COX *et al.*, 1979), de Lapin (MAZURIER *et al.*, 1985), de Souris (HU *et al.*, 1988) et de Singe (DAVIDSON & LÖNNERDAL, 1988). L'hypothèse de la participation active de la lactotransferrine à l'assimilation intestinale du fer (MONTREUIL & MULLET, 1960 ; MONTREUIL *et al.*, 1960) par l'entérocyte est donc plus que jamais confortée par ce résultat.

Afin de progresser dans la compréhension du rôle de la lactotransferrine dans le mécanisme d'assimilation du fer alimentaire par l'entérocyte, ce travail a été poursuivi par l'étude de l'internalisation de la lactotransferrine par les cellules HT 29 Glc(-) différenciées en entérocytes.

3 - ENDOCYTOSE DE LA LACTOTRANSFERRINE

L'étude cinétique de l'internalisation de la lactotransferrine par les cellules HT 29 Glc(-) différenciées en entérocytes a montré que cette protéine était endocytée. Après l'étape de saturation des sites

membranaires par la lactotransferrine radio-iodée, lorsque les cellules sont placées à 36°C, 50 % de la lactotransferrine fixée sur les membranes pénètrent dans les cellules. Les études réalisées parallèlement à 4°C ont montré que 45 % de la lactotransferrine initialement fixée sur ces récepteurs membranaires étaient libérés consécutivement au changement de milieu. 5 % de la quantité initiale de lactotransferrine restent fixés après une heure d'incubation à 36°C. Cette quantité de la lactotransferrine encore fixée aux membranes peut être rapprochée de la valeur de la fixation non spécifique (moins de 10 %) observée lors des études de fixation de la lactotransferrine sur les cellules HT 29 Glc(-). L'entrée de lactotransferrine dans la cellule se produit très rapidement. Les expériences de localisation de la protéine internalisée ont montré que de la lactotransferrine était retrouvée intracellulairement au bout de 3 min. La courbe exprimant la cinétique d'internalisation de la lactotransferrine montre que ce phénomène est transitoire. En effet, après 30 minutes à 36°C, il n'y a plus entrée de lactotransferrine dans la cellule, on constate au contraire une sortie de composés radioactifs. Du début à la fin de l'incubation à 36°C, l'augmentation du taux de radioactivité intracellulaire est de l'ordre de 5 % alors que 50 % de la lactotransferrine initialement fixée sur les cellules ont pénétré dans la cellule, ce qui signifie que 90 % de la lactotransferrine internalisée ressort de la cellule.

L'ensemble des résultats acquis lors de cette étude cinétique de l'internalisation de la lactotransferrine par les cellules HT 29 Glc(-) démontrent sans ambiguïté que la protéine est endocytée par un mécanisme actif puisqu'il est inhibé par les basses températures. Les différents mécanismes d'internalisation des molécules et macromolécules sont bien connus et, nous reportant à la revue générale de PASTAN & WILLINGHAM (1983, 1985), ayant montré que les cellules HT 29 Glc(-) possédaient à

leur surface des récepteurs pour la lactotransferrine, nous en avons conclu que le mécanisme d'internalisation de la lactotransferrine par ces cellules était l'endocytose en phase adsorptive.

La cinétique d'internalisation de la lactotransferrine par les cellules HT 29 Glc(-) ne nous donne pas de renseignements sur le cycle intracellulaire de la protéine. Les études de fixation de la lactotransferrine saturée et non saturée en fer sur les cellules HT 29 Glc(-), ainsi que les études de fixation de ces deux protéines sur la fraction "bordure en brosse" solubilisée en fonction du pH, nous font *a priori* exclure que le cycle intracellulaire de la lactotransferrine soit identique à celui de la sérotransferrine. Des réponses à ces questions pouvaient être données par l'étude de la localisation intracellulaire de la lactotransferrine et par l'étude de la dégradation de cette protéine. En effet, la sérotransferrine n'est jamais en contact avec les lysosomes au cours de son cycle cellulaire et n'est pas dégradée dans la cellule où elle est internalisée.

Etude de la lactotransferrine endocytée

L'étude de la localisation et de la dégradation de la lactotransferrine internalisée par les cellules HT 29 Glc(-) a permis d'apporter les précisions suivantes :

-La lactotransferrine internalisée est localisée dans la même zone cellulaire que les enzymes caractéristiques des compartiments lysosomaux après 15 min d'incubation à 36°C. Ce résultat doit cependant être nuancé par le fait que l'association entre la lactotransferrine marquée et les enzymes lysosomaux a été caractérisée après 3 min d'incubation à 36°C. Or, cette dernière observation ne correspond à aucun schéma décrit dans les différentes voies endocytiques connues. Nous attribuons ce résultat

à une insuffisance de notre protocole de centrifugation des homogénats cellulaires et à une mauvaise séparation des endosomes, déjà formés durant les trois premières minutes, et des lysosomes.

-La lactotransferrine internalisée par les cellules HT 29 Glc(-) est dégradée. Comme l'ont montré les études de chromatographie de gel-filtration des différentes fractions étudiées, la lactotransferrine liée à ses récepteurs membranaires est toujours intacte; la dégradation de la protéine nécessite donc son internalisation. L'étude cinétique de la dégradation a montré que cette dernière ne débutait que 15 min après l'internalisation. PASTAN & WILLINGHAM (1983, 1985) ont montré que la fusion des endosomes avec les lysosomes et la dégradation des ligands par les enzymes lysosomaux pouvait se produire entre 10 et 20 minutes après l'entrée des ligands dans la cellule. Cette grande variabilité étant liée au type de cellule et due au fait que, dans la plupart des types cellulaires, la migration des vésicules n'est pas suffisamment synchrone pour que des cinétiques précises puissent être établies. Dans le cas de la lignée cellulaire KB, la cinétique de migration a pu néanmoins être établie et il a été montré que l'EGF arrivait dans le CURL 10 minutes après avoir été internalisé et se retrouvait dans les lysosomes moins de deux minutes plus tard (WILLINGHAM & PASTAN, 1982).

Les études de dégradation de la lactotransferrine internalisée par les cellules HT 29 Glc(-) ont permis de lever les ambiguïtés qui subsistaient après l'analyse des résultats de l'étude de la localisation cellulaire de la protéine internalisée. La dégradation d'un ligand étant directement liée à son entrée dans le lysosome (PASTAN & WILLINGHAM, 1983, 1985) nous pouvons donc conclure que la lactotransferrine n'entre dans le lysosome que 15 min après son internalisation.

La destruction d'une protéine par les endopeptidases et exopeptidases lysosomales est rapide et totale (COFFEY & de DUVE, 1968 ;

EHRENREICH & COHN, 1969 ; LLOYD, 1971), ce qui explique pourquoi la destruction de la lactotransferrine est totale, les produits de dégradation étant rejetés dans le milieu extérieur. L'hypothèse est d'ailleurs renforcée par l'observation de ces derniers auteurs selon laquelle la membrane du lysosome n'est pas perméable aux peptides de taille supérieure aux acides aminés et aux dipeptides.

L'étude de l'influence des inhibiteurs a permis de confirmer ces résultats. La colchicine qui est un inhibiteur de la tubuline et des microfibrilles, empêche l'internalisation de la lactotransferrine; les cellules traitées par cet inhibiteur ont exactement le même comportement que les cellules incubées à 4°C.

La monensine et le CCC n'empêchent pas la lactotransferrine de rentrer dans les cellules HT 29 Glc(-) mais empêchent la sortie de la protéine de la cellule. Les expériences de localisation ont montré que cette inhibition était due au fait que la lactotransferrine est piégée dans les lysosomes d'où elle ne peut sortir. L'alcalinisation du milieu intralysosomal, due aux inhibiteurs, empêchant l'action des protéases lysosomales.

4 - CONCLUSION

Au terme de cette étude, nous pouvons conclure que la lactotransferrine, après s'être fixée spécifiquement sur ces récepteurs de la bordure en brosse des cellules HT 29 Glc(-) différenciées en entérocytes, pénètre dans la cellule par un mécanisme d'endocytose en phase adsorptive. En effet, l'internalisation de la lactotransferrine à l'intérieur des cellules possède les caractéristiques de ce mécanisme; à savoir qu'elle nécessite dans un premier temps la fixation de la protéine sur ses récepteurs membranaires, qu'elle est inhibée par les

basses températures et par la présence d'inhibiteurs tels que la colchicine.

Après son endocytose, la lactotransferrine se retrouve rapidement dans les lysosomes où elle est dégradée par les hydrolases lysosomales. Les produits de dégradation, que nous n'avons pas identifiés avec certitude, sont ensuite relâchés dans le milieu extérieur. L'hydrolyse de la lactotransferrine est inhibée par la monensine qui empêche le transfert des endosomes vers les lysosomes et la fusion de ces vésicules. Elle est également inhibée par le CCC et la chloroquine qui, en bloquant la baisse du pH intralysosomal, empêche le fonctionnement des hydrolases acides du lysosomes. La dégradation de la lactotransferrine dans les lysosomes, ainsi que l'indiquent nos expériences de chromatographie sur colonne de Sephadex G-75 de la lactotransferrine internalisée, aboutit à la formation de matériel radioactif de faible masse moléculaire. Nous en référant à la littérature, nous avons postulé que ces produits de dégradation devaient être des acides aminés simples ou, au plus, des dipeptides. Ce dernier point devra être élucidé par la suite. Si l'internalisation de la lactotransferrine doit aboutir, à terme, à la libération du fer, l'affinité de cette protéine pour ce métal est telle qu'il est difficilement concevable qu'il puisse exister dans l'entérocyte un accepteur du fer qui ait une affinité supérieure à celle de la lactotransferrine. C'est pourquoi la dégradation totale de la protéine internalisée nous paraît être l'hypothèse la plus compatible avec les propriétés de la lactotransferrine.

L'étude de l'endocytose de la lactotransferrine nous a donc permis d'arriver à la conclusion que cette protéine, après avoir été internalisée est dégradée dans les lysosomes. Le cycle intracellulaire de la lactotransferrine est du type de celui de l'EGF (DICKSON *et al.*, 1983) ou de celui des asialoglycoprotéines (TOLLESHAUG, 1981). Pour ces

deux exemples, la protéine internalisée est détruite dans les lysosomes. Les cycles diffèrent cependant au niveau du récepteur, celui de l'EGF est détruit alors que celui des asialoglycoprotéines est recyclé. Les expériences menées au cours de cette étude n'ont pas apporté de renseignements sur l'éventuel recyclage du récepteur de la lactotransferrine.

CONCLUSION
GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Les travaux dont nous rapportons les résultats dans ce mémoire font suite à ceux réalisés au Laboratoire par MAZURIER *et al.*, (1985) qui avaient montré que les vésicules membranaires de la bordure en brosse d'intestin de Lapin pouvaient fixer la lactotransferrine humaine et à ceux de HU *et al.*, (1988, 1990) qui avaient montré la présence d'un récepteur de la lactotransferrine humaine et de la lactotransferrine murine sur des vésicules de la bordure en brosse d'intestin de Souris.

Dans le but d'élargir nos connaissances sur le rôle de la lactotransferrine et de son récepteur entérocytaire dans l'absorption intestinale du fer, nous avons entrepris nos travaux en choisissant les cellules HT 29 comme modèle. Ces cellules qui développent en culture une différenciation de type entérocytaire, nous ont permis d'aborder cette étude en système homologue : entérocyte humain et lactotransferrine humaine. Plus qu'au récepteur, et à ses propriétés physico-chimiques ou structurales, nous nous sommes intéressés à l'interaction des sérotransferrine et lactotransferrine humaines, puis à l'internalisation de cette dernière protéine par les cellules. Les conclusions que nous pouvons tirer sont les suivantes :

1 - La sérotransferrine ne semble pas se fixer sur les cellules HT 29 différenciées en entérocytes alors qu'elle se fixe sur les cellules indifférenciées.

Les études de fixation sur les fractions cellulaires solubilisées et déposées sur nitrocellulose ont cependant montré qu'une fixation de sérotransferrine pouvait être mise en évidence sur les membranes

baso-latérales. De même, ces études ont montré l'existence d'un pool intracellulaire de récepteurs de la sérotransferrine.

Par ailleurs, les propriétés de fixation du récepteur vis-à-vis des deux formes de sérotransferrine (saturée et non saturée en fer) à différents pH, ont montré que ce récepteur possède les mêmes propriétés que le récepteur de la sérotransferrine décrit dans de nombreuses autres souches.

2 - La lactotransferrine, qui ne se fixe pas spécifiquement sur les cellules HT 29 indifférenciées, peut se fixer sur la souche différenciée de façon spécifique, saturable et réversible.

Les études de fixation de la protéine sur les fractions cellulaires solubilisées et déposées sur membrane de nitrocellulose, ont montré que, pour la partie membranaire, seule la fraction bordure en brosse était capable de fixer la lactotransferrine, aucune fixation spécifique n'a pu être détectée dans la fraction baso-latérale. En revanche, un pool relativement important de récepteurs intracellulaires de la lactotransferrine a été mis en évidence. Les études de variation de la fixation dans les différents compartiments, ont laissé apparaître l'existence dans la cellule au jour 5 de récepteurs de la lactotransferrine alors que pour des cellules du même âge, la bordure en brosse n'est pas encore développée et qu'aucune fixation de lactotransferrine n'a été détectée dans les fractions membranaires. Le récepteur de la lactotransferrine est donc un marqueur précoce de la différenciation des cellules HT 29 en entérocyte.

3 - L'endocytose de la lactotransferrine a été étudiée sur les cellules entérocytaires HT 29 âgées de 20 jours. Par utilisation d'une lactotransferrine marquée à l'iode radioactif, nous avons mis en

évidence l'internalisation de la lactotransferrine selon un mécanisme qui a toutes les caractéristiques de l'endocytose en phase adsorptive.

Nos travaux ont donc contribué à démontrer que la lactotransferrine jouait un rôle dans l'absorption intestinale du fer. En accord avec les travaux déjà cités de MAZURIER *et al.* (1985) et de HU *et al.* (1988, 1990), nous pouvons donc conclure que ce rôle important de la lactotransferrine dans l'absorption intestinale se fait par l'intermédiaire de récepteur spécifique à la surface de la bordure ne brosse.

Nous avons également montré, ce qui n'avait jusqu'à présent pas pu être mis en évidence, que l'entérocyte pouvait internaliser la lactotransferrine.

Cependant, si nos travaux font avancer la compréhension du rôle joué par la lactotransferrine dans la nutrition martiale, ils ne permettent pas de répondre à toutes les questions. Le modèle des cellules HT 29 différenciées en entérocytes permet de poursuivre dans la compréhension du mécanisme de l'absorption intestinale du fer. Les prochaines étapes à étudier seront le transfert du fer de la lactotransferrine à l'entérocyte, le transport intracellulaire du métal et, enfin, l'étude du passage du fer vers la sérotransferrine sérique chargée de véhiculer le fer à tous les tissus de l'organisme.

BIBLIOGRAPHIE

AISEN P. & BROWN E.B. (1977) "Lactoferrin and transferrin: a comparative study", *Semin. Haematol.*, **14**, 31

ALDERMAN E.M., LOBB R.R. & FETT J.W. (1985) "Isolation of tumor-secreted products from human adenocarcinoma cells maintained in a defined protein-free medium", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5771

AMINE E.K. & HEGSTEAD D.M. (1975) "Effect of dietary carbohydrates and fats on inorganic iron absorption", *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 204

AMOURIC M., MARVALDI J., PICHON J., BELLOT F. & FIGARELLA C. (1984) "Effect of lactoferrin on the growth of a human colon adenocarcinoma cell line. Comparison with transferrin", *In Vitro*, **20**, 543

ANDERSON R.G., BROWN M.S., BEISIGEL U. & GOLDSTEIN J.L.G. (1982) "Surface distribution and recycling of the LDL receptor as visualized by anti-receptor antibody", *J. Cell. Biol.*, **93**, 523

ANDERSON R.G., BROWN M.S. & GOLDSTEIN J.L.G. (1977a) "Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2434

ANDERSON R.G., GOLDSTEIN J.L.G. & BROWN M.S. (1977b) "A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localise in coated pits on the cell surface of human fibroblasts", *Nature*, **270**, 695

ANDERSON B.F., BAKER H.M., DODSON E.J., NORRIS G.E., RUMBALL S.V., WATERS J.M. & BAKER E.N. (1987) "Structure of human lactoferrin at 4.2 Å resolution", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1769

- ANDERSON B.F., BAKER H.M., NORRIS G.E., RICE D.W. & BAKER E.N. (1989) "Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution", *J. Mol. Biol.*, **209**, 711
- ARAI H., TERRES G., PINK S. & FARGAG M. (1988) "Topography and subunit stoichiometry of the coated vesicle proton pump", *J. Biol. Chem.*, **263**, 8796
- ARDAWI M.S. & NEWSHOLMES E.A. (1985) "Fuel utilisation in colonocytes of the Rat", *Biochem. J.*, **231**, 713
- ARNOLD R., COLE M.F. & MAC GHEE J.R. (1977) "A bactericidal effect for human lactoferrin", *Science*, **197**, 263
- ASHWELL G. & MORELL A.G. (1974) "The role of surface carbohydrate in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins", *Adv. Enzymol.*, **41**, 99
- AUGERON C. & LABOISSE C.L. (1984) "Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate", *Cancer Res.*, **44**, 3961
- AZARI P. & BAUGH R.F. (1967) "A simple and rapid procedure for preparation of large quantities of pure ovotransferrin", *Arch. Biochem. Biophys.*, **118**, 138
- BANERJEE D., FLANAGAN P.R., CLUETT J. & VALBERG L.S. (1986) "Transferrin receptors in the human gastrointestinal tract. Relationship to body iron store", *Gastroenterology*, **91**, 861

BARRET A.J. (1972)

"*Lysosomes, a Laboratory Handbook*", (J.T. DINGLE, Editeur), North Holland Publishing Co., Amsterdam, 110

BARRET A.J. & HEATH M.F. (1977)

"*Lysosomes, a Laboratory Handbook*", (J.T. DINGLE, Editeur), North Holland Publishing Co., Amsterdam, 19

BAUVOIS B., CACAN R., FOURNET B., CAEN J., MONTREUIL J. & VERBERT A.

(1982) "Discrimination between α -2,3-sialyltransferase and α -2,6-sialyltransferase in human platelets using p-nitrophenyl- β -D galactosidiose as acceptor", *Eur. J. Biochem.*, **121**, 567

BEGUINOT L., HANOVER J.A., ITO S., RICHERT N.D., WILLINGHAM M.C. &

PASTAN I.H. (1985) "Phorbol esters induce transient internalization without degradation of inoccupied epidermal growth factor receptors", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2274

BEGUINOT L., WALL R., WATERFIELD M., WILLINGHAM M.C. & PASTAN I. (1984)

"Down-regulation of the EGF receptor in KB cells is due to receptor internalization and subsequent degradation in lysosomes", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2384

BELCHER J.D., HAMILTON R.L., BRADY S.F., HORNICK C.A., JUECKLE S.,

SCHNEIDER W.J. & HAVEL R. (1987) "Isolation and characterization of three endosomal fractions from the liver of oestradiol-treated rats", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6785

BENNETT R.M. & KOKOCINSKI T. (1978) "Lactoferrin content of peripheral blood cells", *Br. J. Haematol.*, **39**, 509

BERESFORD C.H., NEALE R.J. & BROOKS O.G. (1971) "Iron absorption and pyrexia", *Lancet*, **1**, 568

BERNAR J., TIETZE F., KOHN L., BERNARDINI I., HARPER G., GROLLMAN E. & GOHL W.A. (1986) "Characteristics of a lysosomal membrane transport system for tyrosine and other neutral amino acids in rat thyroid cells", *J. Biol. Chem.*, **261**, 17107

BERSETH C.L., LICHTENBERGER L.M. & MOURRISS F.H. (1983) "Comparison of the gastrointestinal growth-promoting effects of rat colostrum and mature milk in newborn Rats in vivo", *Am. J. Clin. Nutr.*, **37**, 52

BIRGENS H.S. (1984) "The biological significance of lactoferrin in haematology", *Scand. J. Haematol.*, **33**, 225

BISERTE G., HAVEZ R. & CUVELIER R. (1963) "Glycoprotéines des sécrétions bronchiques", *Exp. Annu. Biochem. Med.*, **25**, 85

BOISSARD C., CHELBI M.K., GALI P., THANG N.N. & ROSSELIN G. (1989) "Mise en évidence du récepteur de l'interféron alpha sur la cellule cancéreuse colique humaine en culture", *C. R. Acad. Sci. Paris*, **III-309**, 485

BOMFORT A.B. & MUNRO H.N. (1985) "Transferrin and its receptors: their roles in cell function", *Hepatology*, **5**, 870

BREITFELD P., SIMMONS L., STOUS G., GEUZE H. & SCHWARTZ A. (1985) "Cell biology of asialoglycoprotein system: a model of receptor-mediated endocytosis", *Int. Rev. Cytol.*, **97**, 47

BROCK J.H., ARZABE F., LAMPREAVE F. & PINEIRO A. (1976) "The effect of trypsin on bovine transferrin and lactoferrin", *Biochim. Biophys. Acta*, **446**, 214

BROCK J.H. (1980) "Lactoferrin in human milk: its role in iron absorption and protection against enteric infection in the newborn infant", *Arch. Dis. Child.*, **55**, 417

BROCK J.H. (1985) "*Metalloproteins*", P.M. HARRISSON, Editeur), Mac Millan, London, 93

BROCK J.H., MAINOU-FOWLER T. & WEBSTER L. (1986) "Evidence that transferrin may function exclusively as an iron donor in promoting lymphocyte proliferation", *Immunology*, **57**, 105

BROWN J.P., ROSE T.M. & PLOWMAN G.D. (1985) "Proteins of Iron Storage and Transport" (G. SPIK, J. MONTREUIL, R.R. CRICHTON & J. MAZURIER, Editeurs), Elsevier, Amsterdam, 39

BROWN M.S., ANDERSON R.G.N. & GOLDSTEIN J.L. (1983) "Recycling receptors: the round-trip of migrant membrane proteins", *Cell*, **32**, 663

BULLEN J.J., ROGERS H.J. & LEIGH L. (1972) "Iron-binding proteins in milk and resistance to *Echerischia coli* infection in infants", *Br. Med. J.*, **1**, 69

CAMPBELL E.J. (1982) "Human leukocyte elastase, cathepsin G and lactoferrin: family of neutrophil granule glycoproteins that bind to an alveolar macrophage receptor", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 6941

CARPENTER G. & COHENS B. (1979) "Epidermal growth factor", Annu. Rev. Biochem., **48**, 193

CEZARD J.P., FORGUE-LAFITTE M.E., CHAMBLIER M.C. & ROSSELIN G.E. (1981) "Growth-promoting effect, biological activity, and binding of insulin in human intestinal cancer cells in culture", Cancer Res., **41**, 1148

CHANTRET I., BARBAT A., DUSSAULX E., BRATTAIN M.G. & ZWEIBAUM A. (1988) "Epithelial polarity, villin expression and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines", Cancer Res., **48**, 1936

CHASTRE E., EMAMI S., ROSSELIN G. & GESPACH C. (1985) "Intestinal peptide receptor activity during enterocyte-like differentiation and retrodifferentiation of the human colonic cancerous subclone HT 29-18", FEBS Lett., **188**, 197

CHERON A., MAZURIER J. & FOURNET B. (1977) "Fractionnement chromatographique et études sur la microhétérogénéité de la lactotransferrine de vache préparée par un procédé original", C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. Ser. D, **284**, 585

CIECHANOVER A., SCHWARTZ A.L., DAUTRY-VARSAT A. & LODISH H.H. (1983b) "Kinetics of the internalization and recycling of transferrin and the

transferrin receptor in a human hepatoma cell line", J. Biol. Chem., 258, 9681

CIECHANOVER A., SCHWARTZ A.L. & LODISH H.H. (1983a) "The asialoglycoprotein receptor internalizes and recycles independantly of the transferrin receptor and insulin receptors", Cell, 32, 267

CLEMENTE F., RIBEIRO T., COLOMB E., FIGARELLA C. & SALES H. (1971) "Comparaison des protéines de sucs pancréatiques humains normaux et pathologiques. Dosages des protéines sériques et mise en évidence d'une protéine particulière dans la pancréatite chronique calcifiante", Biochim. Biophys. Acta, 251, 456

COFFEY J.W. & de DUVE C. (1968) "Digestive activity of lysosomes: the digestion of proteins by extracts of rat liver lysosomes", J. Biol. Chem., 243, 3255

COUVINEAU A., ROUSSET M. & LABURTHES M. (1985) "Molecular identification and structural requirement of vasoactive intestinal peptide receptors in the human colon adenocarcinoma cell line HT 29", Biochem. J., 231, 139

COX T.M., MAZURIER J., SPIK G., MONTREUIL J. & PETERS T.F. (1979) "Iron binding proteins and influx of iron accross the duodenal brush border. Evidence for specific lactotransferrin receptors in the human intestine", Biochim. Biophys. Acta, 588, 120

COX T. & O'DONNELL M. (1980) "Kinetics of iron binding by intestinal microvillus membranes isolated from iron-deficient and iron-repleted rabbits", Biochemistry International, 1, 446

COX T.M. & O'DONNELL M.W. (1981) "Studies on the binding of iron by rabbit intestinal microvillus membranes", *Biochem. J.*, **194**, 753

CRICHTON R.R. & CHARLOTEAU-WAUTERS M. (1987) "Iron transport and storage", *Eur. J. Biochem.*, **164**, 485

DAUTRY-VARSAT A. (1986) "Receptor-mediated endocytosis: the intracellular journey of transferrin and its receptor", *Biochimie*, **62**, 375

DAUTRY-VARSAT A., CIECHANOVER A. & LODISH H.H. (1983) "pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **225**, 2258

DAUTRY-VARSAT A. & LODISH H.F. (1984) "Les récepteurs cellulaires et l'endocytose", *Pour la Science*, **81**, 78

DAVIDSON L.A., LITOV R.E & LÖNNERDAL B. (1990) "Iron retention from lactoferrin-supplemented formulas in infant Rhesus monkey", *Ped. Res.*, **27**, 176

DAVIDSON L.A. & LÖNNERDAL B. (1987) "Persistence of human milk proteins in the breast-fed infants", *Acta Paediatr. Scand.*, **76**, 733

DAVIDSON L.A. & LÖNNERDAL B. (1988) "Specific binding of lactoferrin to brush-border membrane: ontogeny and effect of glycan chain", *Am. J. Physiol.*, **254**, 580

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

DE LAEY P., MASSON P. & HEREMANS J.F. (1968) "The role of lactoferrin in human absorption", *Prot. Biol. Fluids*, **16**, 627

DENIS C., MILS V., MURAT J.C., ROUSSET M., PINTO M., TROCHERIS V., ZWEIBAUM A. & PARIS H. (1985) "Evidence for development of gluconeogenesis in the HT 29 human colon adenocarcinoma cell line grown in a glucose-free medium", *IRCS Med. Sci.*, **13**, 898

DERISBOURG P., WIERUSZESKI J.M., MONTREUIL J. & SPIK G. (1990) "Primary structure of glycans isolated from human leucocyte lactotransferrin. Absence of fucose residues questions the proposed mechanism for hyposideraemia", *Biochem. J.*, **269**, 821

DE VET B.J.C.M. & VAN GOOL J. (1974) "Lactoferrin and iron absorption in the small intestine", *Acta Med. Scand.*, **196**, 393

DICKSON R.B., BEGUINOT L., HANOVER J.A., RICHERT N.D., WILLINGHAM M.C. & PASTAN I.H. (1983a) "Isolation and characterization of a highly enriched preparation of receptosomes (endosomes) from a human cell line", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5335

DICKSON R.B., HANOVER J.A., WILLINGHAM M.C. & PASTAN I.H. (1983b) "Prelysosomal divergence of transferrin and epidermal growth factor during receptor-mediated endocytosis", *Biochemistry*, **22**, 5667

DICKSON R.B., SCHLEGER R.W. & PASTAN I.H. (1982) "Reversible and irreversible inhibitors of clustering of α -2-macroglobulin in clathrin coated pits on the surface of fibroblasts", *Exp. Cell. Res.*, **140**, 215

DICKSON R.B., WILLINGHAM M.C. & PASTAN I.H. (1981) " α -2-macroglobulin adsorbed to colloidal gold: new probe in the study of receptor-mediated endocytosis", *J. Cell. Biol.*, **89**, 29

DICKSON R.B., WILLINGHAM M.C. & PASTAN I.H. (1981) "Binding and internalization of α -2-macroglobulin by cultured fibroblasts", *J. Biol. Chem.*, **256**, 3454

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

DUNN K.W., MAC BRAU T.E. & MAXFIELD F.R. (1989) "Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined in an early sorting endosome", *J. Cell. Biol.*, **109**, 3303

FAIRWEATHER-TAI S.J., BALMER S.E., SCOTT P.H. & MINSKI M.J. (1987) "Lactoferrin and iron absorption in newborn infants", *Pediatr. Res.*, **22**, 651

FANTINI J., ABADIE B., TIRARD A., REMY L., RIPERT J.P., EL BATTARI A., & MARVALDI J. (1986) "Spontaneous and induced dome formation by two clonal cell populations derived from a human adenocarcinoma cell line HT 29", *J. Cell Sci.*, **83**, 235

FANTINI J., GALONS J.P., MARVALDI J., COZZONE P.J. & CANIONI P. (1987) "Growth of a human colonic adenocarcinoma cell line (HT 29) on microcarrier beads: metabolic studies by ³¹ Phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy", *Int. J. Cancer*, **39**, 255

FANTINI J., TIRARD A., EL BATTARI A., LUIS J., MULLER J.M., PICHON J. & MARVALDI J. (1985) "Système immunitaire intestinal. Le récepteur du VIP sur le lymphocyte T: un nouveau marqueur de différenciation?", *Gastroenterol. Clin. Biol.*, **9**, 929

FARQUAR M.G. & PALADE G.E. (1981) "The Golgi apparatus complex from artifact center stage", *Ann. Rev. Cell Biol.*, **1**, 447

FETT J.W., STRYDOM D.J., LOBB R.R., ALDERMAN E.A. & VALLEE B.L. (1985) "Lysozyme: a major secretory product of a human colon carcinoma cell line", *Biochemistry*, **24**, 965

FOGH J. & TREMPE G. (1975) *New Human Tumor Cell Lines*, "Human Tumor Cell Lines in vitro", (J. FOGH, Editeur), Plenum Publishing Corp., New York, 115

FORGUE-LAFITTE M.E., HORVAT A. & ROSSELIN G. (1979) "Insulin binding by a cell line (HT 29) derived from a human colonic cancer", *Mol. Cell. Endocrinol.*, **14**, 123

FRANSSON G-B., KEEN C.L. & LÖNNERDAL B. (1983) "Supplementation of milk with iron bound to lactoferrin using weanling mice; effects on hematology and tissue iron", *J. Pediatr. Gastro. Nut.*, **2**, 693

FRANSSON G-B. & LÖNNERDAL B. (1980) "Iron in human milk", J. Pediatr., 96, 380

GAHL W.A., BASHAN N., TIETZE F., BERNARDINI I., RAIFORD D. & SCHULMAN J.D. (1982) "Cystin transport is defective in isolated leukocyte lysosome from patients with cystinosis", Science, 217, 1263

GAHL W.A., TIETZE F., BASHAN N., BERNARDINI I., RAIFORD D. & SCHULMAN J.D. (1983) "Characterization of cystine counter transport in normal and cystinotic lysosome-rich leucocyte granular fractions", Biochem. J., 216, 393

GALONS J.P., FANTINI J., VION-DURY J., COZZONE P.J. & CANIONI P. (1989) "Metabolic changes in undifferentiated and differentiated human colon adenocarcinoma cells studied by multinuclear magnetic resonance spectroscopy", Biochimie, 71, 949

GARRY P.J., OWEN G.M., HOOPER E.M. & GILBERT B.A. (1981) "Iron absorption from human milk and formula with and without supplementation", Pediatr. Res., 15, 822

GEUZE H.J., SLOT J.W., STOUS J.A.M., LODISH H.A. & SCHWARTZ A.C. (1983) "Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis", Cell, 32, 277

GHITESCU L., FIXMAN A., SIMIONESCU M. & SIMIONESCU N. (1986) "Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemma vesicles of

continuous capillary endothelium: receptor mediated transcytosis", *J. Cell. Biol.*, **77**, 853

GOAVEC M., MAZURIER J., MONTREUIL J. & SPIK G. (1985) "Rôle des glycanes dans la fixation de la sérotransferrine et de la lactotransferrine sur les macrophages alvéolaires humains", *C. R. Acad. Sci. Paris*, III-301, 689

GOLDSTEIN J.L., BROWN M.S., ANDERSON R.G.W. RUSSEL D.W. & SCHNEIDER W.J. (1985) "Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system", *Ann. Rev. Cell Biol.*, **1**, 1

GORMAN R.M. & PORETZ R.D. (1987) "Resolution of multiple endosomal compartments associated with the internalization of epidermal growth factor and transferrin", *J. Cell. Physiol.*, **131**, 158

GRANICK (1954) "Protein apoferritin and ferritin in iron feeding and absorption", *Bull. N. Y. Acad. Med.*, **30**, 81

GRIFFITHS G., BACK R. & MARSH M. (1989) "A quantitative analysis of the endocytic pathway in baby hamster kidney cells", *J. Cell. Biol.*, **109**, 273

GRIFFITHS G., HOFLACK B., SIMONS K., MELLMAN I. & KORNFELD S. (1988) "The mannose-6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes", *Cell*, **52**, 329

GRIFFITHS G., PFEIFFER S., SIMONS K. & MATLIN K. (1985) "Exit of newly synthesized protein from the trans cisternae of the Golgi complex to the plasma membrane", J. Cell. Biol., 101, 949

GRIFFITHS G. & SIMONS K. (1986) "The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi system", Science, 243, 438

GROSS S. (1968) "The relationship between milk protein and iron content on hematologic values in infancy", J. Pediatr., 73, 521

GROVES N.L. (1960) "The isolation of a red protein from milk", J. Am. Chem. Soc., 82, 3345

HAHN P.F., BALE W.F., ROSS J.F. & BALFOUR W.M. (1943) Radioactive iron absorption in the gastrointestinal tract. Influence of anemia, anoxia and antecedent feeding. Distribution in growing dogs", J. Exp. Med., 78, 169

HAIGLER H.T., MAXFIELD F.R., WILLINGHAM M.C. & PASTAN I.H. (1980) "Dansylcadaverine inhibits internalisation of ¹²⁵I-epidermal growth factor in BALB 3T3 cells", J. Biol. Chem., 255, 1239

HAIGLER H.T., Mc KANNA J.J. & COHEN S. (1979) "Rapid stimulation of pinocytes in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factor", J. Cell. Biol., 87, 382

HAMILTON T.A., WADA H.G. & SUSSMAN H.H. (1979) "Identification of transferrin receptors on the surface on human cultured cells", Proc. Natl. Acad. sci. USA, 76, 6404

HANOVER J.A. & DICKSON R.B. (1985) "Endocytosis" (I.H. PASTAN & M.C. WILLINGHAM, Editeurs) Plenum Press, London and New-York, 131

HANOVER J.A., WILLINGHAM M.C. & PASTAN I.H. (1984) "Kinetics of transit of transferrin and epidermal growth factor through clathrin-coated membranes", *Cell*, **39**, 245

HARFORD J., BRIDGES K., ASHWELL G. & KLAUSNER R.D. (1983) "Intracellular dissociation of receptor-bound asialoglycoproteins in cultured hepatocytes: a pH mediated non lysosomal event", *J. Biol. Chem.*, **253**, 3191

HASHIZUME S., KURODA K. & MURAKAMI H. (1983) "Identification of lactotransferrin as an essential growth factor for human lymphocyte cell lines in serum-free medium", *Biochim. Biophys. Acta*, **763**, 377

HEIRD W.C., SCHWARZ S.M. & HANSEN I.H. (1984) "Colostrum-induced enteric mucosal growth in beagle puppies", *Pediatr. Res.*, **18**, 512

HELENIUS A., MELLMAN I., WALL D. & HUBBARD A. (1983) "Endosomes", *Trends Biochem. Sci.*, **8**, 245

HERSHKO P. (1977) "Pathogenesis and management of iron overload in thalassemia", *Haematol.*, **10**, 105

HERZ F., SCHERMER A., HAWLER M. & BOGART L.H. (1981) "Alkaline phosphatase in HT 29, a human colon cancer cell line: influence of sodium butyrate and hyperosmolarity", *Arch. Biochem. Biophys.*, **210**, 581

HERZOG V. (1983) "Transcytosis in thyroid follicle cells", J. Cell Biol., 97, 607

HEYMAN M., CRAIN-DENOYELLE A.M., CORTIER G., MORGAT J.L. & DESJEUX J.F. (1986) "Postnatal development of protein absorption in conventional and germ-free mice", Am. J. Physiol., 251, G326

HEYMAN M., CRAIN-DENOYELLE A.M., KUMHR NATH S. & DESJEUX J.F. (1990) "Quantification of protein transcytosis in the human colon carcinoma cell line Caco-2", J. Cell. Physiol., 143, 391

HEYMAN M., DUCROC R., DESJEUX J.F. & MORGAT J.L. (1982) "Horseradish peroxidase transport across adult rabbit jejunum in vitro", Am. J. Physiol., 92, G558

HEYMAN M., GRASSET E., DUCROC R. & DESJEUX J.F. (1988) "Antigen absorption by the jejunal epithelium of children with cow's milk allergy", Pediatr. Res., 24, 197

HOLMGREN J. (1981) "Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera", Nature, 292, 413

HU W.L., MAZURIER J., MONTREUIL J. & SPIK G. (1990) "Isolation and partial characterization of a lactotransferrin receptor from mouse intestinal brush border", Biochemistry, 29, 535

HU W.L., MAZURIER J., SAWATZKI G., MONTREUIL J. & SPIK G. (1988) "Lactotransferrin receptors of mouse small-intestine brush border", Biochem. J., 249, 435

HUEBERS H. & FINCH C.A. (1985) "Proteins of Iron Storage and Transport" (G. SPIK, J. MONTREUIL, R.R. CRICHTON J. MAZURIER , Eds.), Elsevier, Amsterdam, 263

HUEBERS H. & FINCH C.A. (1987) "The physiology of transferrin and transferrin receptors", *Physiol. Rev.*, **67**, 520

HUEBERS H., HUEBERS E., CSIBA E., RUMMEL W. & FINCH C.A. (1983) "The significance of transferrin for intestinal iron absorption", *Blood*, **61**, 283

HUEBERS H., HUEBERS E., FORTH W. & RUMMEL W. (1971) "Binding of iron to a non-ferritin protein in the mucosa cells of normal and iron deficient Rats during absorption", *J. Med. Sci.*, **10**, 1141

HUEBERS H., HUEBERS E., RUMMEL W. & CRICHTON R.R. (1976) "Isolation and characterization of iron-binding proteins from Rat intestinal mucosa", *Eur. J. Biochem.*, **66**, 447

IACOPETTA B.J., ROTHENBERGER S. & KÜHN L.C. (1988) "A role for the cytoplasmic domain in transferrin receptor sorting and coated pit formation during endocytosis", *Cell*, **54**, 485

IDZERDA R.L., HUEBERS H.E., FINCH C.A. & MAC KNIGHT G.S. (1986) "Rat transferrin gene expression: tissue-specific regulation by iron deficiency", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3723

ISOBE K., SAKURAMI T. & YSOBE Y. (1978) "Studies on iron transport in human intestine by immunoperoxidase technic: localisation of ferritin,

lactoferrin and transferrin in human duodenal mucosa", *Acta Haematol. Jap.*, **41**, 1328

JOHNSON G., JACOBS P. & PURVES R. (1985) "The effect of cytoskeletal inhibitors on intestinal iron absorption in the Rat", *Biochim. Biophys. Acta*, **843**, 83

JONAS A.J. (1986) "Cystine transport in purified rat liver lysosomes", *Biochem. J.*, **236**, 671

JONES S.B., LEONE S.L. & BYLUND D.B. (1990) "Desensitivation of the alpha-2-adrenergic receptor in HT 29 and opossum kidney cell lines", *J. Pharm. Exp. Therap.*, **254**, 294

KAWAKAMI H., HIRATSUKA M. & DOSAKO S. (1988) "Effects of iron-saturated lactoferrin on iron absorption", *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 903

KEEN J.H., MAXFIELD F.R., HARDEGREE M.C. & HARBIG W.H. (1982) "Receptor-mediated endocytosis of diptheria toxin by cells in culture", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2912

KENNY A.J. & MAROUX S. (1982) "Topology of microvillar membrane hydrolases of kidney and intestine", *Physiol. Rev.*, **62**, 91

KIMBER C.L., MUKHERJEE T. & DELLER D.L. (1973) "In vitro iron attachment to the intestinal brush border. Effect of iron stores and other environmental factors", *Dig. Dis. Sci.*, **18**, 781

- KING A.C. & CUATRECASAS P. (1981) "Peptide hormone-induced receptor mobility, aggregation and internalization", *N. Engl. J. Med.*, **305**, 77
- KING A.C., DAVIS HERNY L. & CUATRECASAS P. (1980) "Lysomotropic amines cause intracellular accumulation of receptors for epidermal growth factor", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3283
- KING A.C., WILLIS R.A. & CUATRECASAS P. (1980) "Accumulation of epidermal growth factor within cells does not depend on receptor recycling", *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 940
- KING G.L. & JOHNSTON S.M. (1985a) "Receptor-mediated transport of insulin across endothelial cells", *Science*, **227**, 1583
- KING G.L. & JOHNSTON S.M. & JIALAL I. (1985b) "Processing and transport of insulin by vascular endothelial cells: effects of sulfonylureas on insulin receptors", *Am. J. Med.*, **79**, 43
- KITABGI P., POUSTIS C., ZWEIBAUM A. & FREYCHET P. (1979) "*Hormone receptors in digestion and nutrition*", (G. ROSSELIN, P. FROMAGEOT & F. BONFILS, Editeurs), Elsevier, Amsterdam, 255
- KLAUSNER R.D., Van RENSWOODE J., ASHWELL G., KEMPK G., SCHECHTER A.N., DEAN A. & BRIDGES D.R. (1983) "Binding of apotransferrin to K562: explanation of the transferrin cycle", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **258**, 4715

KÜHN L.C. & KRAEHENBUHL J.P. (1982) "The sacrificial receptor translocation of polymeric IgA across epithelia", Trends Biochem. Sci., 7, 299

LACROIX B., KEDINGER M., SIMON-ASSMAN P., ROUSSET M., ZWEIBAUM A. & HAFFEN K. (1984) "Development pattern of brush border enzymes in the human fetal colon. Correlation with some morphogenetic events", Early Hum. Dev., 9, 95

LANE R.S. (1976) "*Structure and Function of Plasma Protein*", (A. ALLISON, Editeur), 2, 53

LE BIVIC A., HIRN M. & REGGIO P. (1988) "HT 29 cells are an in vitro model for the generation of cell polarity in epithelia during embryonic differentiation", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 136

LECLERCQ Y. (1987) Thèse de Doctorat de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois

LEPPLA S.H. (1982) "Inhibition of diphteria toxin degradation and cytotoxicity by chloroquine", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 3162

LEWIS W.H. (1931) "Pinocytosis", Bull. John Hopkins Hosp., 49, 17

LINE W.F., SLY D.A. & BEZKOROVAINY A. (1976) "Limited cleavage of human lactoferrin with pepsin", Int. J. Biochem., 7, 203

LLYOD J.B. (1971) "A study of permeability of lysosomes to amino acids and small peptides", Biochem. J., 121, 245

LÖNNERDAL B. (1985) "Biochemistry and physiological function of human milk proteins" *Am. J. Clin. Nutr.*, **42**, 1299

LORIMIER P. (1987) Thèse de doctorat de 3eme cycle, Université Pierre et Marie CURIE, Paris VI

LOUVARD D., GODEFROY O., HUET C., SAHUQUILLO-MERINO C., ROBINE S. & COUDRIER E. (1985) "*Protein Transport and Secretion*", (M.J. GETTING, Editeur), Cold Spring Harbor Laboratory, 168

LOWRY D.H., ROSEBROUGH N.J., FAHR A.L. & RANDALL R.J. (1951) "Protein measurment with the Folin phenol reagent", *J. Biochem.*, **193**, 265

MAC CLELLAND A., KÜHN L.C & RUDDLE F.H. (1984) "The human transferrin receptor gene: genomic organisation, and the complete primary structure of the receptor deduced from a cDNA sequence", *Cell*, **39**, 257

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

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

MAC MILLAN M.A., LANDAW S.A. & OSKI I.A. (1976) "Iron sufficiency in breast fed infants and the availability of iron human milk", *Pediatrics*, **58**, 686

MARATOS-FLIER E., YANG KAO C.Y., VERDIN E.M. & KING G.L. (1985) "Receptor-mediated transcytosis of epidermal growth factor by Madin-Darby Canine Kidney cells", *J. Cell Biol.*, **105**, 1595

MARCON-GENTY D., TOME D., KHEROUA O., DUMONTIER A.M., HEYMAN M. & DESJEUX J.F. (1989) "Transport of β -lactoglobulin across rabbit ileum in vitro", *Am. J. Physiol.*, **256**, G943

MARNELL M.H., STOOKEY M. & DRAPER R.K. (1982) "Monensin blocks the transport of diphtheria toxin to the cell cytoplasm", *J. Cell. Biol.*, **93**, 57

MAROUX S., LOUVARD D. & BARRATTI J. (1973) "The aminopeptidase from hog intestinal brush border", *Biochem. Biophys. Acta*, **321**, 282

MARSH M., BOLZAU E. & HELENIUS A. (1982) "Penetration of Semliki Forest virus from acidic prelysosomal vacuoles", *Cell*, **32**, 931

MARSHALL S. (1985) "Receptor-mediated transport of insulin across endothelial cells", *Science*, **227**, 1583

MARX J.J.M. & AISEN P. (1981) "Iron uptake by rabbit intestinal mucosal membranes vesicles", *Biochim. Biophys. Acta*, **649**, 297

- MÄRZ L., HATTON M.W.C., BERRY L.R. & REGOECZI E. (1982) "The structural heterogeneity of the carbohydrate moiety of desialylated human transferrin", *Can. J. Biochem.*, **60**, 624
- MASON D.Y. & TAYLOR C.R. (1978) "Distribution of transferrin, ferritin and lactoferrin in human tissues", *J. Clin. Pathol.*, **31**, 316
- MASSON P.L. (1970) "La lactoferrine, protéine des sécrétions externes et des leucocytes neutrophiles" Edition Arsca, Bruxelles
- MASSON P.L., HEREMANS J.F. (1966) "Studies on lactoferrin, the iron-binding protein of secretions", *Prot. Biol. Fluids*, **14**, 115
- MASSON P.L. & HEREMAN J.F. (1971) "Lactoferrin in milk from different species", *Comp. Biochem. Physiol.*, **39**, 119
- MASSON P.L., HEREMANS J.F. & DIVE C. (1966) "An iron-binding protein common to many external secretions", *Clin. Chim. Acta*, **14**, 735
- MASSON P.L., HEREMANS J.F., SCHONNE E. & CRABBE P.A. (1968) "New data on lactoferrin, the iron-binding protein of secretions", *Prot. Biol. Fluids*, **16**, 633
- MATSUMOTO A., YOSHIMA H., TAKASAKI S. & KOBATA A. (1982) "Structural study of the sugar chains of human lactoferin: finding of four novel complex type asparagine-linked sugar chains", *J. Biochem.*, **91**, 143
- MAXFIELD F.R (1985) "*Endocytosis*" (I.H. PASTAN & M.C. WILLINGHAN, Eds.), Plenum Press, London, New-York, 235

MAZAT J.P. & JEAN-BART E. (1985) "La notion d'étape limitante: un concept limité", *Biochimie*, **67**, XI

MAZURIER J., HU W.L., MONTREUIL J. & SPIK G. (1989) "Expression of human lactotransferrin receptors in phytohemagglutinin stimulated human peripheral blood lymphocytes", *Eur. J. Biochem.*, **186**, 367

MAZURIER J., LHOSTE J.M., SPIK G. & MONTREUIL J. (1977) "The two metal-binding sites of human lactotransferrin and serotransferrine: differences in histidine coordination as revealed by EPR of cupric complexes", *FEBS Lett.*, **81**, 371

MAZURIER J., METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., SPIK G., MONTREUIL J. & JOLLES P. (1983) "Human lactotransferrin: molecular, functional and evolutionary comparisons with human serum transferrin and hen ovotransferrin", *Experientia*, **39**, 135

MAZURIER J., MONTREUIL J. & SPIK G. (1985) "Visualisation of lactotransferrin brush border receptors for lactotransferrin by ligand-blotting", *Biochim. Biophys. Acta*, **321**, 453

MAZURIER J. & SPIK G. (1980) "Comparative study of the iron-binding properties of human transferrins: I- complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactotransferrin", *Biochim. Biophys. Acta*, **629**, 399

MERION M. & SLY W.S. (1983) "The role of intermediate vesicles in the adsorptive endocytosis and transport of ligand to lysosomes by human fibroblasts", *J. Cell. Biol.*, **96**, 644

MESSER M. & DAHLQVIST A. (1966) "A one-step ultramicromethod for the assay of intestinal disaccharidases", *Anal. Biochem.*, **14**, 376

METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., JOLLES P., MAZURIER J., SPIK G. & MONTREUIL J. (1980) "Amino acid sequence, location and phylogenetic aspects of the glycopeptides of human lactotransferrin", *Biochim. Biophys. Acta*, **622**, 308

METZ-BOUTIGUE M.H., JOLLES J., MAZURIER J., SCHOENTGEN F., LEGRAND D., SPIK G., MONTREUIL J. & JOLLES P. (1984) "Human lactotransferrin: aminoacid sequence and structural comparison with other transferrins", *Eur. J. Biochem.*, **145**, 659

METZ-BOUTIGUE M.H., MAZURIER J., JOLLES J., SPIK G., MONTREUIL J. & JOLLES P. (1982) "The present state of the human lactotransferrin sequence", *Biochim. Biophys. Acta*, **670**, 243

MONTREUIL J. (1971) "Maternalisation des laits, état actuel de la question", *Ann. Nutr. Alim.*, **25**, A1

MONTREUIL J. (1980) "Primary structure of glycoprotein glycans. Basis for the molecular biology of glycoproteins", *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **37**, 157

MONTREUIL J. (1982) "Glycoproteins", *Comp. Biochem.*, **19B/II**, 1

MONTREUIL J. (1983) "Conformation of the glycoprotein glycans of the N-acetyllactosaminique type", *Biochem. Soc. Transactions*, **11**, 134



MONTREUIL J. (1984) "Spatial structures of glycans chains of glycoproteins in relation to metabolism and function. Survey of a decade of research", *Pure Appl. Chem.*, **56**, 859

MONTREUIL J. (1986) "Molecular and cellular basis of digestion" (P. DESNUELLE, H. SJÖSTRÖM & O. NÖREN, Editeurs), Elsevier, Amsterdam, 3

MONTREUIL J., FOURNET B., SPIK G. & STRECKER G. (1978) "Etude théorique de la conformation spatiale des glycanes de la sérotransferrine humaine", *C. R. Acad. Sci. Paris*, **287D**, 837

MONTREUIL J., MAZURIER J., LEGRAND D. & SPIK G. (1985) "Proteins of Iron Storage and Transport" (G. SPIK, J. MONTREUIL, R.R. CRICHTON & J. MAZURIER, Editeurs), Elsevier, Amsterdam, 25

MONTREUIL J. & MULLET S. (1960) "Isolement d'une lactosidérophiline du lait de Femme", *C. R. Acad. Sci. Paris*, **250**, 1736

MONTREUIL J., TONNELAT J. & MULLET S. (1960) "Préparation et propriétés d'une lactosidérophiline (LTF) isolée du lait de Femme", *Biochim. Biophys. Acta*, **45**, 413

MORGAN E.H. & APPLETON (1969) "Autoradiographic localization of I^{125} -labelled transferrin in rabbit reticulocytes", *Nature*, **222**, 1371

MOSTOV K.E. & BLOBEL G. (1982) "A transmembrane precursor of secretory component: the receptor for transcellular transport of polymeric immunoglobulins", *J. Biol. Chem.*, **257**, 11816

MOSTOV K.E. & BLOBEL G. (1983) "Transcellular transport of polymeric immunoglobulin by secretory components: a model system for studying intracellular protein sorting", *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA*, **73**, 1212

MOSTOV K.E. & DEITCHER R. (1986) "Polymeric immunoglobulin receptor expressed in MDCK cells transcytoses IgA", *Cell*, **46**, 613

MOSTOV K.E. & SIMISTER N.E. (1985) "Transcytosis", *Cell*, **43**, 389

MUECKLER M., CARUSO C., BALDWIN S.A., PANICO M., BLENCH I., MORIS H.R., ALLORD W.J., LIENHARD G.E. & LODISH H.F. (1985) "Sequence and structure of a human glucose transporter", *Science*, **229**, 941

MUIR W.A. & HOPFER U. (1985) "Regional specificity of iron uptake by small intestinal brush border membranes from normal and iron-deficient mice", *Am. J. Physiol.*, **248**, G376

MUIR W.A., HOPFER U. & KING M. (1984) "Iron transport across brush border membranes from normal and iron deficient mouse upper small intestine", *J. Biol. Chem.*, **259**, 4896

MULLER J.M., LUIS J., FANTINI J., ABADIE B., GIANNELLINI F., MARVALDI J. & PICHON J. (1985) "Covalent cross-linking of vaso-active intestinal peptide to its receptor in intact colonic adenocarcinoma cells in culture (HT 29)", *Eur. J. Biochem.*, **151**, 411

NAGATSU T., HINO M., FUYAMADA H., HAYAKAMA T., SAKAKIBARA S., NAGAGAWA Y. & TAKEMOTO (1976) "New chromogenic substrates for X-propyl dipeptidyl aminopeptidase", *Anal. Biochem.*, **74**, 466

NAGURA H., NAKANE P.K. & BROWN W.R. (1979) "Translocation of dimeric IgA through neoplastic colon cells in vitro", *J. Immunol.*, **123**, 2359

NAMBI P., PETERS J.R., SIBLEY D.R. & LEFKOWITZ R.J (1985) "Desensitivation of the turkey erythrocyte β -adrenergic receptor in a cell-free system", *J. Biol. Chem.*, **260**, 2165

NEWMAN R., SCHNEIDER C., SUTHERLAND R., VODINELICH L. & GREAVES M. (1982) "The transferrin receptor", *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 397

NICHOLS B.L., MAC KEE K.S., HENRY J.F. & PUTMAN M. (1987) "Human lactoferrin stimulates thymidine incorporation into DNA of rat crypt cells", *Pediatr. Scand.*, **21**, 563

NORRIS G.E., BAKER H.M. & BAKER E.N. (1989) "Preliminary crystallographic studies on human apolactoferrin in its native and deglycosylated forms", *J. Mol. Biol.*, **209**, 329

OCTAVE J.N., SCHNEIDER Y.S., SIBILLE J., CRICHTON R.R. & TROUET A. (1984) *Prot. Biol. Fluids*, Bergamon Press, 77

OGIER-DENIS E., CODOGNO P., CHANTRET I. & TRUGNAN G. (1988) "The processing of asparagine-linked oligosaccharides in HT 29 cells is a function of their state of enterocytic differentiation: an accumulation of $\text{Man}_{9-8}\text{-GlcNAc}_2\text{-Asn}$ species is indicative of an impaired N-glycan trimming in undifferentiated cells", *J. Biol. Chem.*, **263**, 6031

OGIER-DENIS E., BAUVY C., AUBERY M., CODOGNO P., SAPIN C., ROUSSET M., ZWEIBAUM A. & TRUGNAN G. (1989) "The processing of asparagine-linked

oligosaccharides in HT 29 cells is an early biochemical marker of the enterocytic differentiation of HT 29 cells", *J. Cell Biochem.*, **41**, 13

OGIER-DENIS E., BAUVY C., AUBERY M., CODOGNO P., SAPIN C., DARMOUL D., ZWEIBAUM A. & TRUGNAN G. (1990) "N-glycosylation modification of proteins is an early marker of the enterocytic differentiation process of HT 29 cells", *Reprod. Nutr. Dev.*, **30**, 325

OKHUMA S. & POOLE B. (1978) "Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of the traffic by various agents", *Proc. Natl. acad. Sci. USA*, **75**, 3327

OLIVER C. (1982) "Endocytic pathways at the lateral and basal cell surfaces of exocrine acinar cells", *J. Cell. Biol.*, **95**, 154

OLSNES S. & PIHL A. (1982) "Molecular Action of Toxins and virus" (P. COHEN & S. VAN HEYNINGHEM, Editeurs), Elsevier Biomedical Press, New York, **51**, 105

OLSNES S. & SANDVIG K. (1985) "*Endocytosis*" (I.H. Pastan & M.C. Willingham, Editeurs), Plenum Press, London, New-York, 195

OMARY M.B. & TROWBRIDGE T.S. (1981) "Biosynthesis of the human transferrin receptor", *J. Biol. Chem.*, **256**, 4715

OSTERLOH K.R.S., SCHÜMANN K., EHTECHAMI C. & FORTH W. (1985) "Transferrin in isolated cells from Rat duodenum and jejunum", *Blut*, **51**, 41

- OSTERLOH K.R.S., SIMPSON R.J. & PETERS T.J. (1987) "The role of mucosal transferrin in intestinal iron absorption", Br. J. Haematol., **65**, 1
- PARIS H., BOUSCAREL B., CORTINOVIS C. & MURAT J.C. (1985) "Growth-related variations of α -2-adrenergic receptivity in the HT 29 adenocarcinoma cell line from human colon", FEBS Lett., **184**, 82
- PARMLEY R.T, BARTON J.C. & CONRAD M.E. (1984) "Ultrastructural cytochemical identification of the siderophilic enterocyte", J. Histochem. Cytochem., **32**, 724
- PARMLEY R.T, BARTON J.C. & CONRAD M.E. (1985) "Ultrastructural localization of transferrin, transferrin receptor and iron-binding sites on human placental and duodenal microvilli", Br. J. Haemat., **60**, 81
- PASTAN I.H. & WILLINGHAM M.C. (1981) "Journey to the center of the cell: role of the receptosome", Science, **214**, 504
- PASTAN I.H. & WILLINGHAM M.C. (1983) "Receptor-mediated endocytosis: coated pits, receptosomes and the Golgi", Trends Biochem. Sci., **8**, 250
- PASTAN I.H. & WILLINGHAM M.C. (1985) "Endocytosis" (I.H. PASTAN & M.C. WILLINGHAM, Editeurs) Plenum Press, London and New-York, 131
- PEARSE B.M.F. & BRETSCHER M.S. (1981) "Membrane recycling by coated vesicles", Ann. Rev. Biochem., **50**, 85
- PERRAUDIN J.P. & PRIEELS J.P. (1982) "Lactoferrin binding to lysozyme-treated *Micrococcus luteus*", Biochim. Biophys. Acta, **718**, 42

PETERS T., APT L. & ROSS J.F. (1971) "Effect of phosphates upon iron absorption studied in normal human subjects and in an experimental model using dialysis", *Gastroenterology*, **61**, 315

PETERSON G.L. (1977) "A simplification of the protein assay method of Lowry which is more generally applicable", *Anal. Biochem.*, **83**, 346

PICHON J., MARCHIS G. & MARVALDI J. (1982) "*Colonic Carcinogenesis*", (R.A. MALT & R.C.N. WILLIAMSONS, Editeurs), PTP Press Ltd., Lancaster, Boston, La HAGUE, 297

PINTO M., APPAY M.D., SIMON-ASSMAN P., CHEVALIER G., DRACOPOLI N., FOGH. J. & ZWEIBAUM A. (1982) "Enterocytic differentiation of cultured human colon cancer cells by replacement of glucose by galactose in medium", *Biol. Cell*, **44**, 193

PINTO M., ROBINE-LEON S., APPAY M.D., KEDINGER M., TRIADOU N., DUSSAULX E., LACROIX B., SIMON-ASSMAN P., HAFFNEN K., FOGH. J. & ZWEIBAUM A. (1983) "Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture", *Biol. Cell*, **47**, 323

PIRZIO-BIRIOLI G., BOTHWELL T.H. & FINCH C.A. (1958) "The absorption of radioiron administered with a normal meal in man", *J. Lab. Clin. Med.*, **51**, 37

PISONI R.C., THOENE J.G., LIMONS R.M. & CHRISTENSEN H.N. (1987) "Important differences in cationic amino acid transport by lysosomal system c and system γ^+ of the human fibroblast", *J. Biol. Chem.*, **262**, 15011

- PISONI R.C., FLIKINGER K.S., THOENE J.G. & CHRISTENSEN H.N. (1987) "Characterization of carrier-mediated transport system for small neutral amino acids in human fibroblasts lysosomes", *J. Biol. Chem.*, **262**, 6810
- PISONI R.C & THOENE J.G (1989) "Detection and characterization of a nucleoside transport system in human fibroblast lysosomes", *J. Biol. Chem.* **264**, 4850
- QUARONI A. (1985a) "Crypt cell development in newborn rat small intestine", *J. Cell. Biol.*, **100**, 1600
- QUARONI A. (1985b) "Development of fetal rat intestine in organ and monolayer culture", *J. Cell. Biol.*, **100**, 1611
- REGOECZI E. (1984) "*Pathophysiology of Plasma Protein Metabolism*" (MARIANI, Editeur), Mac Millan, London, 373
- REGOECZI E. (1987) "*Vertebrate Lectin*", (K. OLDEN & J.B. PARENT, Editeurs), Van Nostrand Reinhold Company, New york, 124
- REITER B., BROCK J.H. & STEEL E.D. (1975) "Inhibition of *Escherichia coli* by bovine colostrum and postnatal milk", *Immunology*, **28**, 83
- ROBINE S., HUET C., MOLL R., SAHUQUILLO-MERINO C., COUDRIER E., ZWEIBAUM A. & LOUVARD D. (1985) "Can villin be used to identify malignant and undifferentiated normal digestive epithelial cells?", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 8488

ROBINSON M.S. (1987) "Coated vesicles and protein sorting", *J. Cell Science*, **87**, 203

ROIRON D., AMOURIC M., MARVALDI J. & FIGARELLA C. (1989) "Lactoferrin binding sites at the surface of HT 29-D4 cells", *Eur. J. Biochem.*, **186**, 367

ROIRON D. & FIGARELLA C. (1990) "Evidence for a different mechanism of lactoferrin and transferrin translocation on HT 29-D4 cells", *Biochim. Biophys. Res. Com.*, **170**, 837

ROTHENDERGER S., IACOPETTA, B.J. & KÜHN L.C. (1987) "Endocytosis of the transferrin receptor requires the cytoplasmic domain but not its phosphorylation site", *Cell*, **49**, 423

ROUSSET M. (1986) "The human colon carcinoma cell line HT 29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation", *Biochimie*, **68**, 1035

ROUSSET M., CHEVALIER G., ROUSSET J.P., DUSSAULX E. & ZWEIBAUM A. (1979) "Presence cell growth-related variations of glycogen in human colorectal adenocarcinoma cell lines in culture", *Cancer Res.*, **39**, 531

ROUSSET M., DUSSAULX E., CHEVALIER G. & ZWEIBAUM A. (1980) "Growth-related glycogen levels of human intestine carcinoma cell lines in vitro and in nude mice", *J. Natl. Cancer Inst.*, **65**, 885

ROUSSET M., LABURTHES M., CHEVALIER G., BOISSARD C., ROSSELIN G. & ZWEIBAUM A. (1981) "Vasoactive intestinal peptide (VIP) control of

glycogenolysis in the human colon adenocarcinoma cell line HT 29 in culture", *FEBS Lett.*, **126**, 38

ROUSSET M., PARIS H., CHEVALIER G., MURAT J.C. & ZWEIBAUM A. (1984) "Growth-related enzymatic control of glycogen metabolism in cultured human tumor cells", *Cancer Res.*, **44**, 154

RÜMKE P., VISSER D., KWA H.G. & HART A.A.M. (1971) "Radioimmunoassay of lactoferrin in blood-plasma of breast cancer patients, lactating and normal women: prevention of false high level caused by leakage from neutrophilic leucocytes in vitro", *Folia. Med. Neerl.*, **14**, 156

SAARINEN U., SIIMES M.A. & DALLMAN P.R. (1977) "Iron absorption in infants: high bioavailability of iron is indicated by the extrinsic tag method of iron absorption and by the concentration of serum ferritin", *J. Pediatr.*, **91**, 36

SCATCHARD G. (1949) "The attraction of proteins for small molecules and ions", *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **51**, 660

SCEMANA J.L., RUELLAN C., CLERC F., CLEMENTE F. & RIBET A. (1984) "Dopamine receptors in a human colonic cancer cell line (HT 29). Some receptor-related biological effects of dopamine", *Int. J. Cancer*, **34**, 675

SCHADE A. & CAROLINE L. (1944) *Science*, **100**, 14

SCHADE A. & CAROLINE L. (1946) "Raw hen egg white and the role of iron in growth inhibition of *Shigelle dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*", *Science*, **104**, 340

SCHMID S.I., FUCKS R., MALE P. & MELLMAN I. (1988) "Two distinct subpopulations of endosomes involved in membrane recycling and transport to lysosomes", *Cell*, **32**, 77

SCHMITZ J., PREISER D., MAESTRACCI D., GHOSH B.B.K, CERDA J.J. & CRANE R.K. (1973) "Purification of the human intestinal brush border membrane", *Biochim. Biophys Acta*, **323**, 98

SCHNEIDER G., SUTHERLAND R., NEWMAN R. & GEAVES M. (1982) "Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9", *J. Biol. Chem.*, **257**, 8516

SCHNEIDER C., OWEN M.J., BANVILLE D. & WILLIAMS J.G. (1984) "The primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence", *Nature*, **311**, 676

SCHÜMANN K., SCHÄFER S.G. & FORTH W. (1986) "Iron absorption and biliary excretion of transferrin in rats", *Res. Exp. Med.*, **186**, 215

SIIMES M.A., VUORI E. & KUITINEM P. (1970) "Breast milk iron: a declining concentration during the course of lactation", *Acta Paediatr. Scand.*, **98**, 29

SILVERSTEIN S.C., STEINMAN R.M. & COHN Z.A. (1977) "Endocytosis", *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 669

SIMPSON R.J. & PETERS T.J. (1984) "Studies of Fe^{3+} transport across isolated intestinal brush border membrane of the mouse", *Biochim. Biophys. Acta*, **772**, 220

SIMPSON R.J., RAJA K.B. & PETERS T.J. (1985) " Fe^{2+} uptake by intestinal brush border vesicles from normal and hypoxic mice", *Biochim. Biophys. Acta*, **814**, 381

SIMPSON R.J., RAJA K.B. & PETERS T.J. (1985) " Fe^{3+} transport by brush border membrane vesicles isolated from normal and hypoxic mouse duodenum and ileum", *Biochim. Biophys. Acta*, **814**, 8

SIMPSON R.J. & PETERS T.J. (1986) "Mouse intestinal Fe^{3+} uptake in vivo. The significance of brush border membrane vesicle transport in the mechanism of Fe^{3+} uptake", *Biochim. Biophys. Acta*, **856**, 115

SIMPSON R.J., OSTERLOH K.R.S., RAJA K.B., SNAPE S.D. & PETERS T.J. (1986) "Studies on the role of transferrin and endocytosis on the uptake of Fe^{3+} from Fe-nitrilotriacetate", *Biochim. Biophys. Acta*, **884**, 166

SIMPSON R.J., RAJA K.B. & PETERS T.J. (1986) " Fe^{2+} uptake by mouse intestinal mucosa in vivo and by isolated intestinal brush border vesicles", *Biochim. Biophys. Acta*, **860**, 229

SPIK G. (1971) "Formes communes et assimilation du lactofer" *Ann. Nutrit. Aliment.*, **25**, 81

SPIK G. (1981) "Alimentation du Nourrisson" (Blanc B. ed.), Liebefeld, Berne, 315

SPIK G. (1988) "Rôle de la lactotransferrine dans la nutrition martiale du nourrisson", *Cah. Nutr. Diét.*, **XXIII**, 2, 121

SPIK G., BRUNET B., MAZURIER-DEHAINE C., FONTAINE G; & MONTREUIL J. (1982) "Characterization and properties of the human and bovine lactotransferrins extracted from the faeces of newborns infants", *Acta Paediatr. Scand.*, **71**, 979

SPIK G., CHERON A., MONTREUIL J. & DOLBY J.M. (1978) "Bacteriostasis of a milk-sensitive strain of *Escherichia coli* by immunoglobulins and iron-binding proteins in association", *Immunology*, **35**, 663

SPIK G., JORIEUX S., MAZURIER J., NAVARRO J., ROMOND G. & MONTREUIL J. (1984) "*Human Milk Banking*", (A.F. WILLIAMS & J.D. BAUM, Editeurs), Raven Press, New York

SPIK G. & MONTREUIL J. (1966) "Etudes comparatives de la structure de la lactotransferrine et de la sérotransferrine humaines. Finger printing des hydrolysats protéasiques des deux glycoprotéines", *C. R. Soc. Biol.*, **160**, 94

SPIK G. & MONTREUIL J. (1983) "Rôle de la lactotransferrine dans les mécanismes moléculaires de la défense antibactérienne", *Bull. Europ. Physiopath. Resp.*, **19**, 123

SPIK G., STRECKER G., FOURNET B., BOUQUELET S., MONTREUIL J., DORLAND L., VAN HALBEEK & Vliegenthart J.F.G. (1982) "Primary structure of the glycans isolated from human lactotransferrin", *Eur. J. Biochem.*, **121**, 413

- SPIK G., VANDERSYPPE R., FOURNET B., BAYARD P. & BOUQUELET S. (1974)**
"Structure of glycopeptides isolated from human serotransferrin and lactotransferrin", Actes du Colloques International du CNRS, Villeneuve d'Ascq, 20-27 juin 1973, Eds. CNRS, Paris, 221, 483
- SPIK G., VANDERSYPPE R., MONTREUIL J., TETAERT D. & HAN K.K. (1974)**
"Amino acid sequences of two glycopeptides isolated from tryptic and chymotryptic hydrolysats of human lactotransferrin", FEBS Lett., 38, 213
- STEPHENS S., DOLBY J., MONTREUIL J. & SPIK G. (1980)** "Differences in inhibition of the growth of commensal and enteropathogenic strains of *Escherichia coli* by lactotransferrin and secretory immunoglobulin A isolated from human milk", Immunology, 41, 597
- SUSSMAN H.H., STEIN B.S, & ISAVOLER L. (1985)** "Protides of Iron Transport and Storage", (G. SPIK, J. MAZURIER, R.R. CRICHTON & J. MONTREUIL, Editeurs), Elsevier Science Publisher, 147
- TEDESCHI A., TUCCARI G., MAGAZZU G., ARENA F., RICCIARDI R. & BARRESI G. (1987)** "Immunohistochemical localization of lactoferrin in duodenojejunal mucosa from celiac children", J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 6, 328
- TERENT A., HALL R., GREN R., VENGE P. & BERGSTROM K. (1981)**
"Lactoferrin, lysozyme and β -2-microglobulin in cerebrospinal fluids", Stroke, 12, 79
- TIETZE F., KOHN L.D., KOHN A.D., BERNARDINI I., ANDERSSON H.C., ADAMSON M.D., HARPER G.S. & GAHL W.A. (1989)** "Carrier-mediated transport of

monoiodotyrosine out of thyroid cell lysosomes", *J. Biol. Chem.*, **264**, 4762

TOLLESHAUG H. (1981) "Binding and internalization of asialoglycoprotein by isolated rat hepatocytes", *Int. J. Biochem.*, **13**, 45

TRIADOU N. & ZWEIBAUM A. (1985) "Maturation of sucrase-isomaltase complex in human foetal small and large intestine during gestation", *Pediatr. Res.*, **19**, 136

TRUGNAN G., ROUSSET M., CHANTRET I. & BARBAT A. (1987) "The post-translational processing of sucrase-isomaltase in HT 29 cells is a function of their state of enterocytic differentiation", *J. Cell. Biol.*, **104**, 1199

TURNBULL A. (1977) "Iron in Biochemistry and Medicine" , (A. JACOBS & M. WORWOOD, Editeurs), Academic Press, London, 369

TURNER J.T., JAMES-KLACKE M.R. & CAMDEN J.M. (1989) "Regulation of the neurotensin receptor and intracellular calcium mobilization in HT 29 cells", *J. Pharm. Exp. Therap.*, **253**, 1049

TYCKO B. & MAXFIELD F.R. (1982) "Rapid acidification of endocytic vesicles containing α -2-macroglobulin", *Cell*, **28**, 643

UNDERDOWN B.J. (1986) "Immunoglobulin A: strategic defensive initiative at the mucosal cell surface", *Ann. Rev. Immunol.*, **4**, 389

UZAN G., FRAIN M., PARK I., BESMOND C., HAESSENS G., TREPAT J.S., ZAKIN M.M. & KAKIN A. (1984) "Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human transferrin", *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **119**, 273

VAITUKAITIS J., BOBBINS J.B., NIESCHLAG E. & ROSS G.T. (1971) "A method for producing specific antisera with small doses of immunogen", *J. Clin. Endocrinol.*, **33**, 988

VAN LEUVEN F., CASSIMAN J.J. & VAN DEN BERGHE H. (1980) "Primary amines inhibit recycling of alpha-2-macroglobulin receptors in fibroblasts", *Cell*, **30**, 37

VAN SNICK J.L., MASSON P.L. & HEREMANS J.F. (1974) "The involvement of lactoferrin in the hyposideremia of acute inflammation", *J. Exp. Med.*, **140**, 1068

VAN SNICK J.L. & MASSON P.L. (1976) "The binding of human lactoferrin to mouse peritoneal cells", *J. Exp. Med.*, **144**, 1568

VAN SNICK J.L., MARKOWETZ B. & MASSON P.L. (1977) "The ingestion and digestion of human lactoferrin by mouse peritoneal macrophages and the transfert of its iron into ferritin", *J. Exp. Med.*, **146**, 817

VIALARD V., DENIS C., TROCHERIS V. & MURAT J.C. (1986) "Effect of glutamine deprivation and glutamate or ammonium chloride addition on growth rate, metabolism and differentiation of human colon cancer cell line HT 29", *Int. J. Biochem.*, **18**, 263

VIRSHUPP D.M. & BENNET V. (1988) "Clathrin-coated vesicle containing assembly polypeptides: physiological properties and reconstitution studies with brain membranes", *J. Cell. Biol.*, **106**, 39

WADA H.G., HASS P.E. & SUSSMAN H.H. (1979) "Transferrin receptor in human placental brush border membranes. Studies on the binding of transferrin to placental membranes vesicles and the identification of a placental brush border glycoprotein with high affinity for transferrin", *J. Biol. Chem.*, **254**, 12629

WALL D.A., WILSON G. & HUBBARD A.C. (1980) "The galactose-specific recognition system of mammalian liver: the route of ligand internalization in rat hepatocyte", *Cell*, **21**, 7983

WARD J.H., KUSHNER J.P. & KAPLAN J.(1982) "Transferrin receptors of human fibroblasts", *Biochem. J.*, **208**, 19

WARD J.H., KUSHNER J.P. & KAPLAN J.(1982) "Regulation of HeLa cells transferrin receptors", *J. Biol. Chem.*, **257**, 10317

WEINBERG E.D. (1974) "Iron and susceptibility to infectious diseases", *Science*, **152**, 172

WICE B.M., TRUGNAN G., PINTO M., ROUSSET M., CHEVALIER G., DUSSAULX E., LACROIX B. & ZWEIBAUM A. (1985) "The intracellular accumulation of UDP-N-acetylhexosamines is concomitant with the inability of human colon cancer cells to differentiate", *J. Biol. Chem.*, **260**, 139

WIDDOWSON E.M. (1985) "Development of the digestive system: comparative animal studies", *Am. J. Clin. Nutr.*, **41**, 384

WILEMAN T., HARDING C. & STAHL P. (1985) "Receptor-mediated endocytosis", *Biochem. J.*, **232**, 1

WILLINGHAM M.C., HAIGLER H.T., FITZGERALD D.J.P., GALLO M., RUTHERFORD A.V. & PASTAN I.H. (1983) "The morphologic pathway of binding and internalisation of epidermal growth factor in cultured cells: studies on A431, KB and 3T3 cells using multiple methods of labelling", *Exp. Cell Res.*, **146**, 163

WILLINGHAM M.C., HANOVER J.A., DICKSON R.B. & PASTAN I.H. (1984) "Morphologic characterization of the pathway of transferrin endocytosis and recycling in human KB cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 175

WILLINGHAM M.C. & PASTAN I.H. (1980) "The receptosome: an intermediate organelle of receptor-mediated endocytosis in cultured fibroblasts", *Cell*, **21**, 67

WILLINGHAM M.C. & PASTAN I.H. (1982) "The transit of epidermal growth factor through coated pits of the Golgi system", *J. Cell. Biol.*, **94**, 207

WILLINGHAM M.C. & PASTAN I.H. (1985) "Receptosomes, endosomes and CURL: different terms for the same organelle system", *Trends Biochim. Sci.*, **10**, 190

WILLINGHAM M.C. & YAMADA S.S. (1978) "A mechanism for the destruction of pinosomes in cultured fibroblasts", *J. Cell. Biol.*, **94**, 207

WOLKOFF A.N., KLAUSNER R.D., ASCHWELL G. & HARFORD J. (1984)

"Intracellular segregation of asialoglycoproteins and their receptors: a prelysosomal event subsequent to dissociation of the ligand-receptor complex", *J. Cell Biol.*, **98**, 375

XIE X.S. & STONE D.K. (1986) "Isolation and reconstitution of the clathrin-coated vesicle proton translocating complex", *J. Biol. Chem.*, **161**, 2492

XIE X.S. & STONE D.K. (1987) "Partial resolution and reconstitution of the subunits of the clathrin-coated vesicle proton ATPase responsible for Ca^{2+} -activated ATP hydrolysis", *J. Biol. Chem.*, **163**, 9859

YANG F., LUM J.B., Mc GILL J.R., MOORE C.M., NAYLOR S.L., VAN BRAGT P.H., BALWIN W.D. & BOWMAN B.H. (1984) "Human transferrin: cDNA characterization and chromosomal localisation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2752

ZWEIBAUM A. (1986) "Enterocytic differentiation of cultured human colon cancer cell lines. Negative modulation by D-glucose" in *"Ion Gradient Coupled Transport"*, (F. ALVARADO & C.H. VAN OS, Editeurs), Elsevier Amsterdam, 345

ZWEIBAUM A., PINTO M., CHEVALIER G., DUSSAULX E., TRIADOU N., LACROIX B., HAFFEN K., BRUN J.L. & ROUSSET M. (1985) "Enterocytic differentiation of subpopulation of the human colon tumor cell line HT 29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose", *J. Cell Physiol.*, **122**, 21

ZWEIBAUM A., ROUSSET M., LEON S., MARTIN F. & BURTIN P. (1979) "Mise en évidence à l'aide de sérums de Lapins immunisés contre une souche d'Escherichia coli 013 de quantités importantes de glycogène ou d'une substance apparentée dans les cellules embryonnaires et les carcinomes du côlon humain", C. R. Acad. Sci. Paris, **284**, 105

ZWEIBAUM A., ROUSSET M., PINTO M., CHEVALIER G., DUSSAULX E. & BRUN J.L. (1982) "Mucus glycoprotein differentiation by serum deprivation of the human colon carcinoma cell line HT 29 in culture", Biol. Cell, **45**, 91

ZWEIBAUM A., TRIADOU N., KEDINGER M., AUGERON C., ROBINE-LEON S., PINTO M., ROUSSET M. & HAFEN K. (1983) "Sucrase-isomaltase: a marker of foetal and malignant epithelial cells of the human colon", Int. J. Cancer, **32**, 407

