

50376
1992
10

62171

50376
1992
10

N° d'ordre : 844

THESE

présentée à

L' UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : BIOCHIMIE

par

Elisabeth ROCHARD



**ETUDE DU MECANISME DE L'INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE
AVEC SON RECEPTEUR MEMBRANAIRE ET DE SA DESTINEE
INTRACELLULAIRE DANS LES CELLULES CANCEREUSES DE GLANDE
MAMMAIRE HUMAINE**

Présentée le 8 janvier 1992 devant la commission d'examen

Président	:	J. Montreuil
Rapporteur	:	JH. Brock
Rapporteur	:	M. Crépin
Rapporteur	:	A. Verbert
Examineur	:	D. Louvard
Examineur	:	G. Spik



A mes parents,
avec toute mon affection
et à Aziz

Ce travail a été réalisé sous la direction du Professeur Geneviève Spik dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Unité Mixte du CNRS n°111 : Relations Structure - Fonctions des constituants membranaires; Directeur : André Verbert).

Il a bénéficié d'une Allocation de Recherche du Ministère de la Recherche et de la Technologie et d'un contrat de recherche avec l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC).

A Madame le Professeur G. Spik

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre équipe et de m'avoir confié ce travail que j'ai réalisé avec le plus grand plaisir.

A Monsieur le Professeur J. Montreuil

Vous m'avez fait l'honneur de bien vouloir m'accepter dans votre Laboratoire et je voudrais vous exprimer ma plus vive gratitude pour la confiance que vous m'avez témoignée.

A Monsieur le Professeur Verbert

Malgré vos nombreuses occupations, vous m'avez fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse. Soyez remercié et assuré de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Crépin

Vous avez suivi nos travaux avec beaucoup d'intérêt et de bienveillance en nous prodiguant de précieux conseils. Vous nous avez permis d'approfondir nos travaux en nous offrant la possibilité d'obtenir différentes cellules issues de mastose et de tissus sains. Veuillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur J. Brock

Vous avez bien voulu me faire l'honneur de juger cette thèse. Je vous prie de bien vouloir trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance et soyez assuré de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Louvard

Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier également :

- **Le Professeur G. Vergoten** et son groupe pour les études de modélisation moléculaire qui ont été essentielles dans l'interprétation de nos résultats.
- **Le Docteur B. Vandewalle** pour nous avoir fourni les différentes lignées cancéreuses qui ont servi de modèles expérimentaux.
- **Le Professeur Tartar et le Docteur P. Maes** pour la détermination de la structure primaire du peptide.
- **Le Docteur Dominique Legrand** pour m'avoir guidée tout au long de ce travail en me faisant bénéficier de son expérience et de sa compétence scientifique.
- **Le docteur Florence Delplace** qui m'a initiée aux techniques de microscopie de fluorescence, avec beaucoup de gentillesse et de patience. Je tiens à remercier également le Professeur M. Delhaye et le personnel du Lasir, pour leur nombreux conseils.
- **Myriam Lecocq et Odette Labiau** pour leur aide technique en culture cellulaire.
- **Madame Celen** qui a assuré la reproduction de ce mémoire.

J'exprime ma plus vive reconnaissance à tout **les membres du C9** qui par leur aide, leur gentillesse et leur amitié, ont contribué à la réalisation de ce mémoire et en particulier **mes "camarades du 103"** qui m'ont soutenue dans les moments difficiles.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

	Pages
- <u>INTRODUCTION</u>	1
- <u>GENERALITES</u> :	6
STRUCTURE ET FONCTIONS DES TRANSFERRINES	6
I - INTRODUCTION	6
II - STRUCTURE ET CONFORMATION DES TRANSFERRINES	8
A- STRUCTURE PRIMAIRE	8
B- CONFORMATION	9
III- LES SITES DE FIXATION DU FER	15
IV - LES GLYCANNES	20
A- STRUCTURE	20
B- CONFORMATION	21
V - LES ROLES BIOLOGIQUES DES TRANSFERRINES	25
A- LES ROLES BIOLOGIQUES DE LA SEROTRANSFERRINE	26
B- LES ROLES BIOLOGIQUES DE LA LACTOTRANSFERRINE	33
LES RECEPTEURS DES TRANSFERRINES	43
I - LE RECEPTEUR DE LA SEROTRANSFERRINE	43
A- LOCALISATION DU RECEPTEUR	43
B- STRUCTURE ET PROPRIETES DU RECEPTEUR	44
C- REGULATION DE L'EXPRESSION DU RECEPTEUR	46
D- INTERACTION SEROTRANSFERRINE-RECEPTEUR	49
II - LES RECEPTEURS DE LA LACTOTRANSFERRINE	54
A- INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC LES CELLULES DU SYSTEME RETICULO-ENDOTHELIAL	54
B- INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC LES HEPATOCYTES	58
C- INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC LES ENTEROCYTES	58
D- INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC LES LYMPHOCYTES	61

E- INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC LES PLAQUETTES	64
F- INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC LES BACTERIES ET LES PARASITES	65
MECANISME DE CAPTURE DU FER PAR LES CELLULES	67
I - LES MECANISMES DE L'ENDOCYTOSE	67
A- DEFINITION	67
B- LA DESTINEE DU COMPLEXE LIGAND-RECEPTEUR	68
II - CAPTURE DU FER DE LA SEROTRANSFERRINE PAR LES CELLULES	69
A- ENDOCYTOSE DU COMPLEXE SEROTRANSFERRINE-RECEPTEUR	72
B- LIBERATION DU FER A LA SURFACE CELLULAIRE	74
III- ENDOCYTOSE DE LA LACTOTRANSFERRINE	77
LES TRANSFERRINES DANS LE DIAGNOSTIC ET DANS LA THERAPIE ANTICANCEREUSE	80
I - DETECTION DU RECEPTEUR DE LA SEROTRANSFERRINE CHEZ LES SUJETS CANCEREUX	81
A- LOCALISATION DANS LES TISSUS	81
B- LOCALISATION DANS LES CELLULES	85
C- PRESENCE DANS LE SERUM	87
II - L'UTILISATION DE LA SEROTRANSFERRINE ET DE SON RECEPTEUR DANS LE DIAGNOSTIC ET LA THERAPIE ANTICANCEREUSE	88
A- LE COMPLEXE SEROTRANSFERRINE- ⁶⁷ Ga	88
B- LA SEROTRANSFERRINE COMME VECTEUR DE DROGUES ANTITUMORALES	90
C- L'IMMUNOTHERAPIE ANTICANCEREUSE	90
III- LA LACTOTRANSFERRINE COMME MARQUEUR DE LA CANCERISATION	94
A- LOCALISATION DANS LES TISSUS CANCEREUX	94
B- LE COMPLEXE LACTOTRANSFERRINE- ⁶⁷ Ga	97

LES CELLULES DE GLANDES MAMMAIRES COMME MODELE EXPERIMENTAL	100
I - LES LIGNEES CANCEREUSES DE GLANDE MAMMAIRE	100
II - LES LIGNEES CELLULAIRES DE MASTOSE	105
III- LES CELLULES ISSUES DE TISSUS SAINS	106
<u>- MATERIELS ET METHODES</u>	108
I- MATERIEL CELLULAIRE	108
A- LES CELLULES DE GLANDE MAMMAIRE HUMAINE	108
B- ISOLEMENT ET PREPARATION DE LYMPHOCYTES HUMAINS ACTIVES	109
II- PREPARATION DES TRANSFERRINES	110
A- PREPARATION DES LACTOTRANSFERRINES	110
B- PREPARATION DE LA SEROTRANSFERRINE	112
C- RADIOMARQUAGE DES TRANSFERRINES	112
D- MARQUAGE DE LA LACTOTRANSFERRINE A LA FLUORESCEINE	113
III- PREPARATION DES FRAGMENTS PEPTIDIQUES DE LA LACTOTRANSFERRINE	114
A- ISOLEMENT DES FRAGMENTS N- ET C-TRYPSIQUES	114
B- ISOLEMENT DU GLYCOPEPTIDE N2	115
C- ISOLEMENT DE PEPTIDES A PARTIR DU FRAGMENT N-TRYPSIQUE	117
IV - INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC SON RECEPTEUR	117
A- LA CYTOFLUORIMETRIE DE FLUX	117
B- LES TECHNIQUES DE RADIOMARQUAGE	119
V - CARACTERISATION DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE PAR IMMUNOPRECIPITATION	121
A- MARQUAGE DES PROTEINES MEMBRANAIRES DE SURFACE	121
B- IMMUNOPRECIPITATION DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE	121

VI - ETUDE A 37°C DE LA DESTINEE INTRACELLULAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS LES CELLULES T47D	122
A- ETUDE PAR MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE	122
B- ETUDE PAR MARQUAGE DE LA LACTOTRANSFERRINE A L' ¹²⁵ I	123
C- ANALYSE DE LA LACTOTRANSFERRINE LIBEREE DANS LE MILIEU	124
VII- ETUDE DE LA DESTINEE INTRACELLULAIRE DU FER DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS LES CELLULES T47D	126
A- ETUDE PAR MARQUAGE DE LA LACTOTRANSFERRINE MARQUEE AU ⁵⁹ Fe	126
B- CINETIQUE DE LIBERATION DU ⁵⁹ Fe FIXE A LA LACTOTRANSFERRINE- ¹²⁵ I	127
- <u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	128
MISE EN EVIDENCE DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LES CELLULES EPITHELIALES CANCEREUSES T47D	
INTRODUCTION	128
I- ETUDE DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LES CELLULES T47D	129
A- ETUDE PAR CYTOFLUORIMETRIE	129
B- DETERMINATION DES PARAMETRES DE FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE- ¹²⁵ I	131
C- INHIBITION DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE DIFERRIQUE	132
D- CONCLUSION	135
II- IDENTIFICATION DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LES CELLULES T47D	136
A- CARACTERISATION DU RECEPTEUR PAR CYTOFLUORIMETRIE DE FLUX	136
B- VISUALISATION DU RECEPTEUR PAR IMMUNOPRECIPITATION	136
C- CONCLUSION	139
III- CONCLUSION	

**RECHERCHE DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR
DIFFERENTES LIGNEES CELLULAIRES DE GLANDE MAMMAIRE
HUMAINE 141**

INTRODUCTION 141

**I- ETUDE DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR
LES CELLULES DE GLANDE MAMMAIRE HUMAINE 142**

A- ETUDE PAR CYTOFLUORIMETRIE DE FLUX 142

**B- DETERMINATION DES PARAMETRES DE FIXATION DE LA
LACTOTRANSFERRINE 147**

**II- IDENTIFICATION DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE
SUR LES DIFFERENTES CELLULES DE GLANDE MAMMAIRE 155**

A- LES CELLULES CANCEREUSES 155

B- LES CELLULES DE MASTOSE 156

C- LES CELLULES DE TISSUS SAINS 156

D- CONCLUSION 156

III- CONCLUSION 159

**LOCALISATION DU SITE DE FIXATION DE LA
LACTOTRANSFERRINE HUMAINE SUR SON RECEPTEUR 162**

INTRODUCTION 162

**I- IDENTIFICATION DU DOMAINE STRUCTURAL DE LA
LACTOTRANSFERRINE RECONNU PAR LE RECEPTEUR
LYMPHOCYTAIRE 163**

**A- FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE ET DE SES
FRAGMENTS TRYPSIQUES SUR LE RECEPTEUR
LYMPHOCYTAIRE 163**

**B- INHIBITION DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE
SUR LE RECEPTEUR PAR LES FRAGMENTS TRYPSIQUES 165**

C- CONCLUSION 165

**II- ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UN PEPTIDE DE LA
LACTOTRANSFERRINE RECONNU PAR LE RECEPTEUR
LYMPHOCYTAIRE 168**

**A- ISOLEMENT DE PEPTIDES A PARTIR DU LOBE N-
TERMINAL DE LA LACTOTRANSFERRINE 168**

**B- CARACTERISATION DU PEPTIDE RECONNU PAR LE
RECEPTEUR 171**

C- CONCLUSION 173

III- IDENTIFICATION DU SITE D'INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC LES CELLULES T47D	173
A- INHIBITION DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE PAR LES FRAGMENTS PEPTIDIQUES	175
B- CONCLUSION	175
IV - CONCLUSION	177
ETUDE DE LA DESTINEE INTRACELLULAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE ET DE SON FER DANS LES CELLULES T47D	183
I- ETUDE DE LA DESTINEE INTRACELLULAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE	184
A- ETUDE PAR MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE	184
B- ETUDE PAR MARQUAGE DE LA LACTOTRANSFERRINE A L'IODE 125	184
C- CONCLUSION	195
II- ETUDE DE LA DESTINEE INTRACELLULAIRE DU FER FIXE A LA LACTOTRANSFERRINE	191
A- CINETIQUE A 37°C DE LA DESTINEE INTRACELLULAIRE DU FER DE LA LACTOTRANSFERRINE	191
B- LIBERATION DU FER FIXE A LA LACTOTRANSFERRINE-¹²⁵I	191
C- CONCLUSION	195
III- CONCLUSION	195
- CONCLUSION GENERALE	200
- BIBLIOGRAPHIE	206

LISTE DES ABREVIATIONS

CODE DES ACIDES AMINES

A	: Alanine	(Ala)
C	: Cystéine	(Cys)
D	: Acide Aspartique	(Asp)
E	: Acide Glutamique	(Glu)
F	: Phénylalanine	(Phe)
G	: Glycine	(Gly)
H	: Histidine	(His)
I	: Isoleucine	(Ile)
K	: Lysine	(Lys)
L	: Leucine	(Leu)
M	: Méthionine	(Met)
N	: Asparagine	(Asn)
P	: Proline	(Pro)
Q	: Glutamine	(Gln)
R	: Arginine	(Arg)
S	: Sérine	(Ser)
T	: Thréonine	(Thr)
V	: Valine	(Val)
W	: Tryptophane	(Trp)
Y	: Tyrosine	(Tyr)

FRAGMENTS DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

LTF : Lactotransferrine

Fragment N-t : Fragment trypsique N-terminal

Fragment C-t : Fragment trypsique C-terminal

Glycopeptide N2 : Glycopeptide trypsique correspondant au domaine NII

ABREVIATIONS DIVERSES

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

BSA : Sérum albumine bovine

EDTA : Ethylènediaminetétracétate de sodium

⁵⁹Fe : Fer 59

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

⁶⁷Ga : Gallium 67

HEPES : Acide N-2 hydroxyéthylpipérazine-N'-2- éthanesulfonique.

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

HyF : [5-(2 carbohydrazino méthyl thio acétyl) amino] fluorescéine

¹²⁵I : Iode 125

¹¹¹In : Indium 111

Lactotransferrine-¹²⁵I : Lactotransferrine marquée à l'iode 125

MEM : Milieu de Eagle Modifié

NTA : Nitriloacétate

PBS : Tampon phosphate de sodium

SASD : Sulfosuccinimidyl 3 [(2-(p azidosalicrylamido) éthyl dithio] propionate

SDS : Dodécyl sulfate de sodium

STF : Sérotransferrine

Sulfo-SANPAH : Sulfosuccinimidyl 6-(4'azido 2'-nitrophénylamino) hexanoate

Tris : (hydroxyméthyl)-aminométhane sulfonique

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La découverte de la lactotransferrine dans le lait de Femme par Montreuil (Montreuil et al., 1960; Montreuil et Mullet, 1960), a ouvert la voie, au Laboratoire, à une multitudes d'études structurales et fonctionnelles sur les fractions glycaniques et protéiques des transferrines, en particulier, sur les rôles biologiques de ces fractions et sur leurs mécanismes d'interaction avec des récepteurs spécifiques.

Contrairement au récepteur de la sérotransferrine qui est présent à la surface de toutes les cellules, le récepteur de la lactotransferrine a été localisé jusqu'à présent sur un nombre limité de cellules. En effet, le récepteur de la lactotransferrine a été caractérisé dans des biopsies intestinales humaines (Cox et al., 1979), sur des cellules entérocytaires de Lapin (Mazurier et al., 1985) et de Souris (Hu et al. 1988, 1990), à la surface de lymphocytes humains activés (Mazurier et al., 1989), ainsi que sur des plaquettes sanguines (Leveugle, 1991). Le récepteur de la lactotransferrine a été identifié à une glycoprotéine monomérique dont la masse moléculaire est comprise entre 100 et 130 kDa.

Le fait que la lactotransferrine soit un facteur de croissance pour de nombreuses cellules (Hashizume et al., 1983; Oria et al., 1988; Mazurier et al., 1989; Nichols et al., 1987, 1990), nous amène à penser que la lactotransferrine, en association avec son récepteur, pourrait bien avoir un rôle-clé dans la multiplication cellulaire et, en conséquence, dans les mécanismes de défense immunitaire.

Des études récentes ont démontré que la lactotransferrine se fixe également sur des cellules cancéreuses telles que les lignées issues d'un adénocarcinome du colon humain HT29 et HT29-D4 (Roiron-Lagrourx et al., 1989; Derisbourg, 1990), les cellules leucémiques (Birgens et al.,

1984) et également sur des biopsies de carcinomes de l'intestin (Tuccari et al., 1989) et du sein (Charpin et al., 1985). Dans les cas particuliers de la glande mammaire et de l'utérus, la biosynthèse de la lactotransferrine peut être stimulée par des hormones qui interviennent dans le développement du tissu (Green et Pastewka, 1978; Pentecost et Teng, 1987). Cependant, la signification biologique de la présence de la lactotransferrine dans les tissus cancéreux n'est pas encore élucidée.

Dans le cadre d'un contrat avec l'A.R.C., nous avons donc recherché la présence du récepteur de la lactotransferrine sur différentes cellules cancéreuses de glande mammaire humaine, afin d'établir si, comme dans le cas de la sérotransferrine, le récepteur de la lactotransferrine pouvait être utilisé comme un marqueur potentiel de la cancérisation des cellules et comme cible cellulaire dans le cadre d'une thérapie anticancéreuse.

Notre travail a consisté dans un premier temps, à mettre en évidence le récepteur de la lactotransferrine sur la lignée cancéreuse T47D de glande mammaire humaine et à définir les principaux paramètres de fixation de la lactotransferrine sur ces cellules.

Dans un second temps, nous avons recherché la présence du récepteur sur d'autres lignées cancéreuses établies à partir de métastases ou de tumeurs solides du sein, ainsi que sur des cellules issues de tissus sains et de mastopathies, représentatives d'un état précancéreux, de manière à préciser l'évolution quantitative du récepteur et les modifications éventuelles de ses propriétés.

La connaissance du mécanisme de l'interaction de la lactotransferrine avec son récepteur est indispensable si l'on veut utiliser la lactotransferrine comme vecteur de drogues antitumorales dans le cadre d'une thérapie anticancéreuse. Or, jusqu'à ce jour, aucune étude n'a été réalisée sur ce sujet. Par conséquent, dans une troisième étape,

nous avons cherché à localiser le site d'interaction de la lactotransferrine, d'une part, avec les lymphocytes activés et d'autre part, avec les cellules T47D et à identifier précisément la région de la lactotransferrine impliquée dans la reconnaissance.

Après avoir ainsi défini la nature de l'interaction de la lactotransferrine avec les cellules T47D, nous avons étudié la destinée intracellulaire de la lactotransferrine dans ces cellules. Cette étude permettra de mieux comprendre le rôle joué par la lactotransferrine dans la multiplication cellulaire et de savoir également si la lactotransferrine est capable de véhiculer des drogues à l'intérieur de cellules cibles par un mécanisme d'endocytose.

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

PUBLICATIONS

- **Rochard E., Legrand D., Mazurier J., Montreuil J. and Spik G.**

The N-terminal domain I of human lactotransferrin binds specifically to PHA-stimulated peripheral blood human lymphocyte receptor.

FEBS Lett. 255 (1989) 201-204.

- **Legrand D., Mazurier J., Maes P., Rochard E., Montreuil J. and Spik G.**

Inhibition of the specific binding of human lactotransferrin to human peripheral blood PHA-stimulated lymphocytes by fluorescein labeling and location of the binding site.

Biochem. J. 276 (1991) 733-738.

- Legrand D., Mazurier J., Ellass A., **Rochard E.**, Maes P., Vergoten G., Montreuil J. and Spik G.

Molecular interaction between human lactotransferrin and the PHA-activated lymphocyte receptor is located between residues 4 to 52 of human lactotransferrin.

Biochemistry (soumis à publication).

- **Rochard E.**, Legrand D., Delplace F., Mazurier J., Montreuil J. and Spik G.

Specific binding of lactotransferrin to the T47D human breast cancer cell line and analysis of the iron release from lactotransferrin.

J. Cell Biol. (soumis à publication).

COMMUNICATIONS

- **Rochard E.**, Legrand D., Mazurier J., Montreuil J. and Spik G.

Localisation du site d'interaction de la lactotransferrine humaine avec le récepteur présent à la surface des lymphocytes humains activés.

XVII^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs en Biochimie et Biologie

Moléculaire, Villeneuve d'Ascq, 3-6 juillet 1990.

- Legrand D., Mazurier J., Ellass A., **Rochard E.**, Maes P., Vergoten G., Montreuil J. and Spik G.

Localization and characterisation of the binding site of human lactotransferrin to PHA-activated lymphocyte receptor.

Xth International Conference on Iron and Iron Proteins, Oxford,

27-31 juillet 1991.

- Legrand D., Mazurier J., Ellass A., **Rochard E.**, Maes P., Vergoten G., Montreuil J. and Spik G.

Localization and characterisation of the binding site of human lactotransferrin to PHA-activated lymphocyte receptor.

XVII^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs en Biochimie et Biologie

Moléculaire, Tours, 1-7 septembre 1991.

GENERALITES

STRUCTURE ET FONCTIONS DES TRANSFERRINES

I- INTRODUCTION

Les transferrines forment une famille de glycoprotéines dont le rôle est de transporter le fer chez les Vertébrés et les Invertébrés.

Cette famille comprend :

- la sérotransferrine, protéine sérique (Schade et Caroline, 1946; Laurell et Ingleman, 1947).

- la lactotransferrine, appelée aussi lactoferrine (Montreuil et Mullet, 1960; Montreuil et al., 1960), isolée pour la première fois du lait de Femme par Montreuil et par Johansson (1960) et du lait de vache par Groves (1960). Ultérieurement, sa présence fut reconnue dans la plupart des laits de différents Mammifères ainsi que dans de nombreux milieux biologiques et liquides de sécrétions (Revue générale de Masson et al., 1970) tels que les sécrétions bronchiques (Biserte et al., 1963; Masson et Heremans, 1966 a et b), le mucus gastrointestinal (Masson et Heremans, 1966 b), la salive (Masson et al., 1966), le liquide synovial (Bennett et al., 1973) et à faible concentration dans le sang (Rumke et al., 1971).

Outre l'existence de la lactotransferrine dans les cellules épithéliales de glande mammaire et de l'intestin (Mason et Taylor, 1978), la lactotransferrine est également présente à l'intérieur des granules secondaires des leucocytes neutrophiles (Masson et al., 1969; Masson, 1970) et à l'état de traces dans les monocytes (Bennett et Kokocinski, 1978).

- l'ovotransferrine, isolée du blanc d'oeuf de Poule par Schade et Caroline (1944) et trouvée par la suite, dans la plupart des oeufs des Oiseaux.

- la mélanotransferrine (p97), protéine membranaire isolée de mélanomes humains (Brown et al., 1982; Rose et al., 1986).

Outre leur propriété de fixer le fer, les transferrines possèdent de nombreuses propriétés structurales communes:

- ce sont des glycoprotéines monocaténaires de masse moléculaire voisine de 80 000 Da.;

- elles fixent réversiblement deux ions ferriques (Fe^{3+}) en développant une couleur rose saumon dont le maximum d'absorption est centré à 465 nm;

- elles présentent de nombreuses homologies dans leur structure primaire et sont constituées de deux lobes structuraux, portant chacun un site de fixation du fer;

- elles assurent le transport du fer dans différents tissus, en reconnaissant des récepteurs spécifiques situés à la surface des cellules, et jouent un rôle extrêmement important dans le métabolisme du fer.

Dans ce chapitre, nous étudierons plus particulièrement la structure et le rôle biologique de la lactotransferrine humaine et de la sérotransferrine dans le métabolisme du fer, en insistant sur les homologies structurales et fonctionnelles entre ces deux protéines.

La connaissance de la structure et de la conformation des protéines est indispensable à la compréhension des rôles biologiques joués par celles-ci, notamment dans les mécanismes d'interaction protéine-récepteur.

II- STRUCTURE ET CONFORMATION DE LA LACTOTRANSFERRINE ET DE LA SEROTRANSFERRINE

A- LA STRUCTURE PRIMAIRE

L'étude de la séquence primaire de la lactotransferrine humaine isolée du lait a été réalisée au Laboratoire en collaboration avec le groupe du Professeur Jollès, à partir de fragments obtenus par hydrolyse enzymatique ou chimique de la lactotransferrine (Metz-Boutigue et al., 1984). Cette structure a été confirmée par séquençage du cDNA partiel de la lactotransferrine leucocytaire (Rado et al., 1987) dont la séquence entière est publiée par Anderson et al. (1989) et par séquençage du cDNA total de la lactotransferrine de la glande mammaire humaine (Powell et Ogden, 1990; Rey et al., 1990).

La lactotransferrine humaine est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 692 résidus d'acides aminés (Rey et al., 1990; Powell et Ogden, 1990) et possède une masse moléculaire de 80.600 Da.

Récemment, la structure primaire de la lactotransferrine bovine a été déterminée par séquençage du cDNA isolé à partir de glandes submaxillaires (Pierce et al., 1991) et de glandes mammaires bovines (Mead et Tweedie, 1990). La séquence peptidique de la lactotransferrine humaine est identique à 69% avec celle de la lactotransferrine bovine et à 70% avec celle de la lactotransferrine murine utérine, produite après stimulation hormonale, dont la séquence a été établie par clonage du cDNA (Pentecost et Teng, 1987).

La séquence peptidique de la sérotransferrine humaine a été déterminée par Mac Gillivray et al. (1982, 1983) puis confirmée par les études de séquençages du cDNA du foie humain codant pour la sérotransferrine (Yang et al., 1984; Uzan et al., 1984). Elle comporte 679 résidus d'acides aminés et possède une masse moléculaire de 79.650 Da.

Ainsi que nous pouvons le constater dans la figure 1 (p.10), l'étude comparative de la séquence peptidique de la lactotransferrine et de la sérotransferrine met en évidence 59 % d'identité entre les deux transferrines (Mazurier et al., 1983; Metz-Boutigue et al., 1984; Legrand et al., 1984).

B- CONFORMATION DE LA LACTOTRANSFERRINE ET DE LA SEROTRANSFERRINE

1) Les lobes N- et C-terminaux

Dès 1975, Mac Gillivray et Brew, d'une part, et Williams (1975), d'autre part, remarquèrent une grande homologie interne dans la séquence de la chaîne peptidique de la sérotransferrine humaine et de l'ovotransferrine de Poule. Ces auteurs suggérèrent alors que chacune de ces transferrines est organisée en deux lobes, possédant chacun un site de fixation du fer. L'existence de la nature bilobée des transferrines fut confirmée par l'obtention des moitiés N- et C-terminales après protéolyse partielle de la sérotransferrine humaine (Evans et Williams, 1978; Lineback-Zincs et al., 1980) et bovine (Brock et Azarbe, 1976; Brock et al., 1978), de l'ovotransferrine de Poule (Williams, 1975; Keung et Azari, 1982) ainsi que de la lactotransferrine humaine (Bluard-Deconinck et al., 1978; Line et al., 1976; Legrand et al., 1984) et bovine (Brock et al., 1976).

Tout comme pour la sérotransferrine, les homologies de séquence entre les moitiés N- et C-terminales de la lactotransferrine sont importantes. On obtient ainsi pour la lactotransferrine humaine 37% d'identité entre les lobes N- et C-terminaux (Mazurier et al., 1983; Metz-Boutigue et al., 1984). Ces observations sont en faveur de

1 10 20 30
LTF : G R R R R S V Q W C A V S Q P E A T K C F Q W Q R N H R K V R - -
STF : V P D K T V R W C A V S E H E A T K C Q S F R D H H K S V I P S

40 50 60
LTF : - G P P V S C I K R D S P I Q C I Q A I A E N R A D A V T L D G G
STF : D G P S V A C V K K A S Y L D C I R A I A A N E A D A V T L D A G

70 80 90
LTF : F I Y E A G L A P Y K L R P V A A E V Y G T E R Q P R T H Y Y A V
STF : L V Y D A Y L A P N N L K P V V A E F Y G S K E D P Q T F Y Y A V

100 110 120
LTF : A V V K K G G S F Q L N E L Q G L K S C H T G L R R T A G W N V P
STF : A V V K K D S G F Q M N Q L R G K K S C H T G L G R S A G W L I P

130 140 150 160
LTF : I G T L R P F L N W T G P P E P I E A A V A R F F S A S C V P G A
STF : I G L L Y C D L - - P E P R K P L E K A V A N F F S G S C A P C A

170 180 190
LTF : D K Q Q P P N L C R L C A G T G E N K C A F S S Q E P Y F S Y S G
STF : D G T D F P Q L C Q L C P G C G - - - C S T L N - E - Y F G Y S G

200 210 220
LTF : A F K C L R D G A G D V A F I R E S T V P E D L S D E A E R D E Y
STF : A F R C L K D G A G D V A F V K H S T I P E N L A N K A D R D Q Y

230 240 250 260
LTF : E L L C P D N T R K P V D K F K D C H L A R V P S H A V V A R S V
STF : E L L C L D N T R K P V D E Y K D C H L A K V P S H T V V A R S H

270 280 290
LTF : G K K E D A I W N L L R Q A Q E K F G K D K S P K F Q L F G S P S
STF : G K K E D L I W E L L N Q A Q E H F G K D R S K E F Q L F S S P H

300 310 320
LTF : G Q K D L L F K D S A I G F S R V P P R I D S G L Y L G S G Y P T
STF : G - K D L L F K D S A H G F L K V P P R H D A K M Y L G Y E Y V T

330 340 350
LTF : A I Q N L R K S E E E V A - - - A R R A R V V W C A V G E Q E L R
STF : A I R N L R E G T C P E A P T D E C K P V - K W C A L S H H E R L

360 370 380 390
LTF : K C N Q W S G L S E G S V T C S S A S T T E D C I A L V L K G E A
STF : K C D E W S V N S V G K I E C V S A E T T E D C I A K I M N G E A

400 410 420
LTF : D A M S L D G G Y V Y T A G K C G L V P V L A E N Y K S Q Q S S D
STF : D A M S L D G G F V Y I A G R C V L V P V L A E N Y N K S D N - -

430 440 450
LTF : P D P N C V D R P V E G Y L A V A V V R R S D T S L T W N S V R G
STF : - - - - C E D T P E A G Y F A V A V V K K S A S D L T W D N L K G

460 470 480
LTF : K K S C H T A V D R T A G W N I P M G L L F N Q T G S C K F D E Y
STF : K K S C H T A V G R T A G W N I P M G L L Y N K I N H C R F D E F

490 500 510 520
LTF : F S Q S C A P G S D P R S N L C A L C I G D E Q G E N R C V P N S
STF : F S E G C A P G S K K D S S L C X L C M G S - - G L N L C E P N N

530 540 550
LTF : N E R Y Y G Y T G A P R C L A E N A G D V A F V K D V T V L Q N T
STF : K E G Y Y G Y T G A P R C L - V E R G D V A F V K H Q T V P Q N T

560 570 580
LTF : D G N N N E A W A R D L K L A D F A L L C L D G K R R K P V T E A R
STF : G G K N P D P W A K N L N E K D Y E L L C L D G T R K P V E E Y A

590 600 610 620
LTF : S C H L A M A P N H A V V S R M D R V E R L K Q V L L H Q Q A K F
STF : N C H L A R A P N H A V V T R K D K E A C Y H K I L R Q Q H L F

630 640 650
LTF : G R N G S D C P D K F C L F Q S E T K N L L F N D N T E C L A R L
STF : G D N V T D C S G N F C L F R S E T K D L L F R D D T V C L A K L

660 670 680
LTF : H G K T T Y E K Y L G P Q Y V A G I T N L R K C S T S P L L E A C
STF : H D R N T Y E K Y L G E E Y Y K A V G N L R K C S T S S L L E A C

690
LTF : E F L R R K
STF : T F R R P

Figure 1 : Comparaison des séquences primaires des chaînes peptidiques de la lactotransferrine humaine (LTF) (Rey et al., 1990) et de la sérotransferrine humaine (STF) (Mac Gillivray, et al., 1983).

l'hypothèse de la duplication d'un gène ancestral codant pour les transferrines (Mac Gillivray et al., 1977; Jeltsch et Chambon, 1982; Metz-Boutigue et al., 1984).

Par hydrolyse trypsique de la lactotransferrine humaine, Legrand et al. (1984) ont obtenu le fragment N-trypsique (N-t) de 30 kDa (résidus d'acides aminés de 4 à 283) (Fig.2A, p.12) et le fragment C-trypsique (C-t) de 50 kDa (résidus d'acides aminés 284 à 692) (Fig.2B, p.12). Ces deux fragments glycosylés possèdent des pHi inférieurs à celui de la lactotransferrine native et un degré d'organisation moins élevé que la protéine native, marqué en particulier par une baisse du taux d'hélicité α (Legrand et al., 1986). Ces deux fragments, en proportions équimolaires, peuvent se réassocier en un complexe non covalent N-t/C-t qui possèdent des propriétés électrophorétiques et spectroscopiques voisines de celles de la lactotransferrine intacte (Legrand et al., 1986).

L'analyse par diffraction des rayons X, de la structure de la sérotransferrine de lapin (Gorinsky et al., 1979; Bailey et al., 1988) et de la lactotransferrine humaine (Anderson et al., 1987, 1989; Baker et Rumball, 1977; Baker et al., 1987) confirme la nature bilobée des transferrines. La lactotransferrine est constituée d'un lobe N-terminal comprenant les résidus d'acides aminés de 1 à 334 et d'un lobe C-terminal (résidus d'acides aminés 348 à 692) (Fig.2A, p.12)). Les deux lobes sont reliés par une hélice α de trois tours (résidus d'acides aminés 335 à 347) (Anderson et al., 1989). Chaque lobe porte un glycanne et un site de fixation du fer.

L'alignement des lobes N- et C-terminal de la lactotransferrine, basé sur la superposition de leur structure tridimensionnelle (Anderson et al., 1989), révèle une conformation très voisine pour les deux lobes. Cependant, le lobe C-terminal est plus compact que le lobe N-terminal

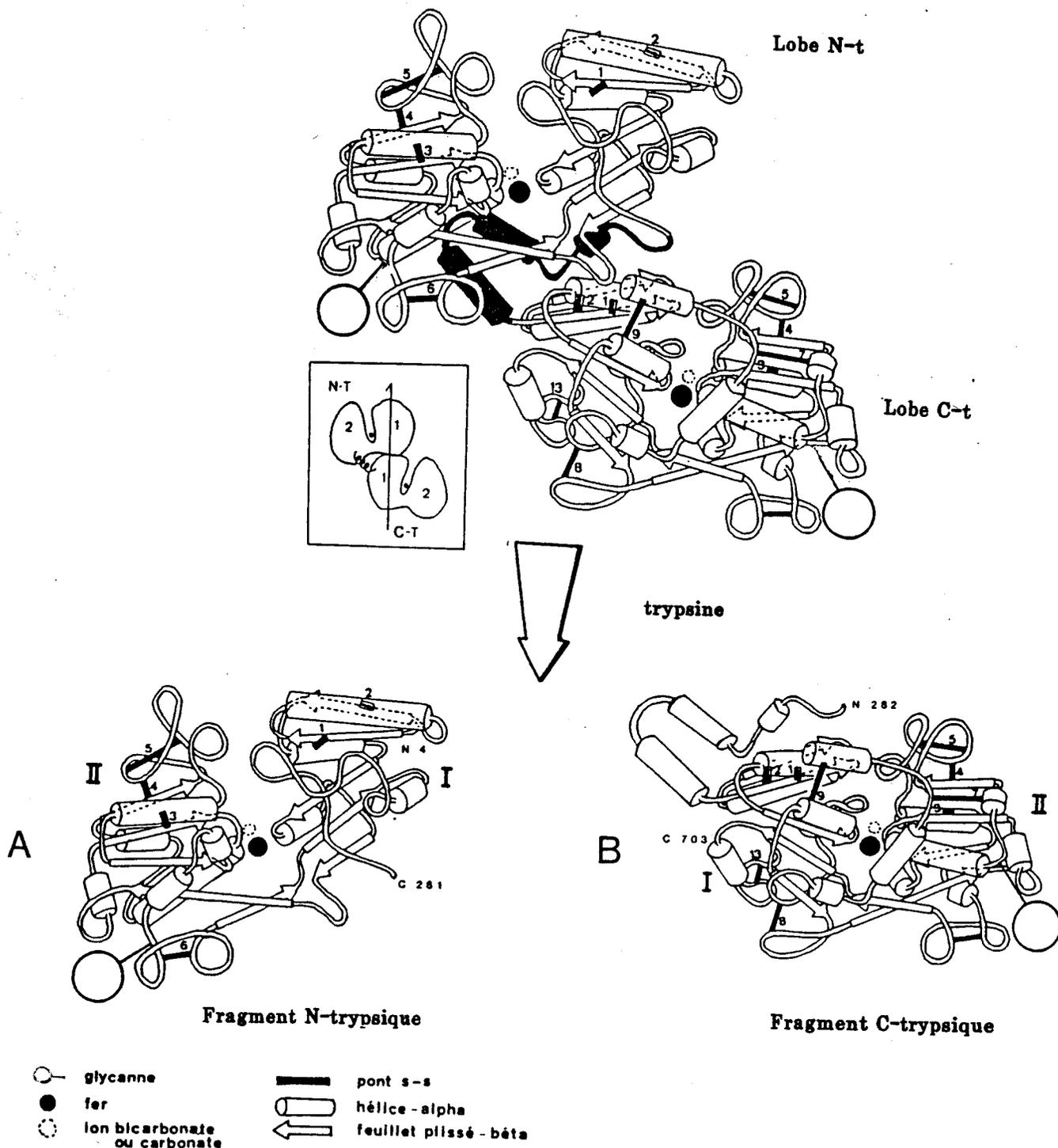


Figure 2 : Conformation de la lactotransferrine (Anderson et al., 1987) et de ses fragments trypsiques (Legrand et al., 1984).

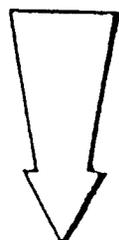
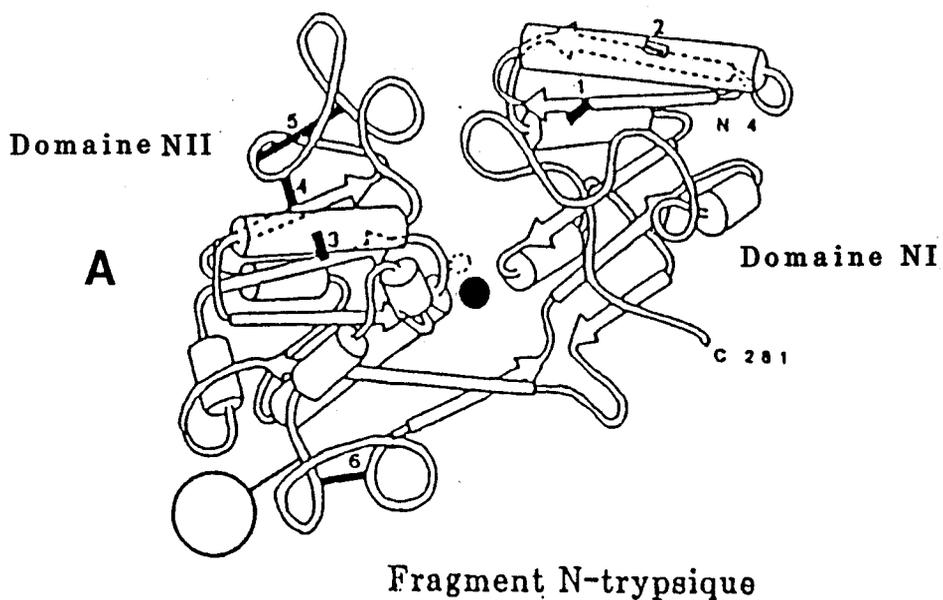
en raison de la présence de ponts disulfure supplémentaires dans la région C-terminale de la lactotransferrine (Metz-Boutigue et al., 1981).

Cependant, la zone charnière qui joint d'une façon covalente les deux lobes de la lactotransferrine, n'est pas conservée dans toutes les transferrines. Dans la lactotransferrine humaine, le peptide de liaison forme une hélice α de trois tours de dix résidus d'acides aminés (résidus de 335 à 347). Dans la sérotransferrine humaine, ce peptide est plus long que celui de la lactotransferrine et renferme trois résidus de Pro et deux ponts disulfure supplémentaires. Selon Anderson et al. (1989), ces différences pourraient affecter les orientations relatives des deux lobes dans les transferrines et expliquer l'incapacité de la lactotransferrine à se fixer au récepteur de la sérotransferrine.

2) Les domaines structuraux

Chaque lobe des transferrines est divisé en deux domaines dont l'organisation structurale est identique et basée sur l'alternance de structure en feuillets plissés β et de structure en hélice α (Anderson et al., 1987, 1989; Baker et al., 1987). Le fer est situé à l'interface entre les deux domaines. Le premier domaine est appelé N-I (résidus d'acides aminés de 1 à 90 et de 254 à 322, numérotés d'après la séquence de Rey et al., 1991) pour le lobe N-terminal et C-I (résidus d'acides aminés 347 à 433 et de 578 à 661) pour le lobe C-terminal. Le second domaine appelé N-II (résidus d'acides aminés 91 à 253) et C-II (résidus d'acides aminés 434 à 577) est constitué de la partie médiane de la chaîne peptidique de la lactotransferrine (Fig.3A, p.14) (Anderson et al., 1987, 1989).

L'hydrolyse trypsique ménagée du lobe N-terminal a permis d'isoler un glycopeptide de 18 kDa (résidus d'acides aminés de 91 à 259)



trypsine

18 kDa N2-GLYCOPEPTIDE

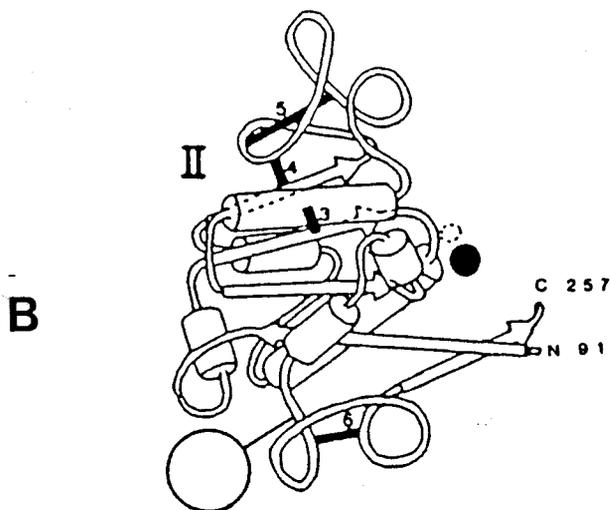


Figure 3 : Domaines structuraux et hydrolyse trypsique du lobe N-terminal de la lactotransferrine humaine (Legrand et al., 1984).

correspondant au domaine N-II de la lactotransferrine (Legrand et al., 1984) (Fig.3B, p.14). Ce fragment appelé glycopeptide N2 est le plus petit peptide isolé d'une transferrine, capable de fixer encore le fer.

III- LES SITES DE FIXATION DU FER

Les transferrines peuvent fixer, de manière réversible, deux ions ferriques, en développant une coloration rose saumon dont le maximum d'absorption est centré à 465 nm (Laurell et Ingleman, 1947). La fixation de chaque ion ferrique nécessite celle d'un ion (bi) carbonate et la libération de trois protons selon la réaction:



Les transferrines possèdent une forte affinité pour le fer ferrique et une faible affinité pour le fer ferreux. A pH 6,4, la constante d'association pour le complexe $(\text{Fe}^{3+})_2\text{-Tf}$ est de l'ordre de 10^{24} M^{-1} mais diminue avec le pH (Aisen et Leibman, 1968, 1971). La lactotransferrine a une affinité pour le fer ferrique 260 fois plus forte que celle de la sérotransferrine (Aisen et Leibman, 1971).

De nombreuses études ont contribué à la détermination des résidus d'acides aminés inclus dans la fixation du fer, notamment par spectroscopie et par modifications chimiques des transferrines (Aisen et al., 1978; Chasteen, 1983; Brock, 1985; Legrand et al., 1988, 1991) ainsi que par méthodes de prédiction en tenant compte de l'évolution conservative des transferrines (Williams et al., 1982; Mazurier et al., 1981, 1983; Metz-Boutigue et al., 1984). Récemment, les études par diffraction des rayons X de la lactotransferrine humaine à 3,2 Å (Anderson et al., 1987; Baker et al., 1987), et à 2,8 Å (Anderson et al., 1989) ont montré que chaque ion ferrique est coordonné à deux résidus de Tyr, d'His, à un Asp et à un ion (bi) carbonate. Les

résidus d'acides aminés impliqués dans la fixation du ligand sont identiques dans chacun des deux lobes (Fig.4A, p.18):

- Asp 61, Tyr 93, Tyr 193, His 254 dans le lobe N-terminal;
 - Asp 396, Tyr 436, Tyr 509, His 578 dans le lobe C-terminal
- (numérotés d'après la séquence de Rey et al., 1990).

Les sites de fixation du fer sont positionnés de façon similaire dans chaque lobe, à l'interface entre les deux domaines structuraux des lobes N- et C-terminaux. Ils sont fortement anioniques ce qui expliqueraient la forte affinité des transferrines pour les ions cationiques.

L'ion (bi) carbonate se fixe au sein d'une poche, entre le fer et les groupements cationiques de la protéine. Selon Anderson et al. (1989), le rôle de l'anion est de neutraliser, d'une part, la charge de ces groupements cationiques pour permettre la fixation du fer et, d'autre part, de compléter la coordination du fer et empêcher ainsi l'attraction de l'eau.

Les études cristallographiques de la sérotransferrine de lapin par diffraction des rayons X à 2,3 Å par Bailey et al. (1988), montrent que les résidus d'acides aminés impliqués dans la fixation du fer sont conservés et que la géométrie des deux sites de fixation est similaire à celle de la lactotransferrine humaine.

Les deux sites de fixation du fer dans les transferrines peuvent être différenciés en un site "acido-labile" situé dans le lobe N-terminal qui libère le fer par protonation, à pH 5,8 et un site "acido- stable" situé dans le lobe C-terminal qui libère le fer à pH 4,8, dans le cas de la sérotransferrine (Princiotta et Zapolski, 1975). Des résultats similaires ont été obtenus pour la lactotransferrine humaine par Mazurier et Spik (1980) qui démontrent, que durant la resaturation en fer de la lactotransferrine à un pH compris entre 6,2 et 4,8 seul le site "acido

labile" (le lobe N-terminal) fixe le fer. Cette différence de stabilité peut s'expliquer par la présence d'un plus grand nombre de ponts disulfure dans le lobe C-terminal conférant ainsi une structure plus compacte que celle du lobe N-terminal. Dans le lobe C-terminal, la présence d'un pont disulfure supplémentaire qui relie les deux domaines C-I et C-II pourrait réduire les mouvements de ces deux domaines et limiter ainsi l'ouverture et la fermeture du site de fixation du fer localisé dans le lobe C-terminal (Baker et al., 1987; Anderson et al., 1989). L'asymétrie de la molécule de lactotransferrine peut également expliquer que les deux sites ne soient pas accessibles de la même façon. Les études de diffraction des rayons X montrent, en effet, que l'entrée du fer dans le lobe C-terminal de la lactotransferrine est proche de la zone d'interaction entre les lobes N- et C-terminaux et est par conséquent moins accessible que celui du N-terminal (Anderson et al., 1987; Norris et al., 1989). Par ailleurs, l'analyse récente cristallographique de l'apolactotransferrine à une résolution de 2,8 Å (Norris et al., 1989; Anderson et al., 1990) démontre que la fixation du fer induit des changements conformationnels dans la molécule (Fig.4B, p.18). Dans l'apolactotransferrine, le site de fixation du lobe N-terminal est largement ouvert et se referme lors de la fixation du fer ferrique grâce à la flexibilité des chaînes polypeptidiques reliant les deux domaines (Anderson et al., 1990; Baker et al., 1991). La protéine devient plus compacte et moins sensible à la dégradation protéolytique. Le même mécanisme n'a pas été démontré pour le site de fixation du lobe C-terminal.

Par ailleurs, les glycanes de la lactotransferrine semblent intervenir dans la stabilité des sites de fixation du fer. En effet, les expériences de déglycosylation des fragments N-tryptiques et du glycopeptide N2 des lactotransferrines humaine et bovine, correspondant

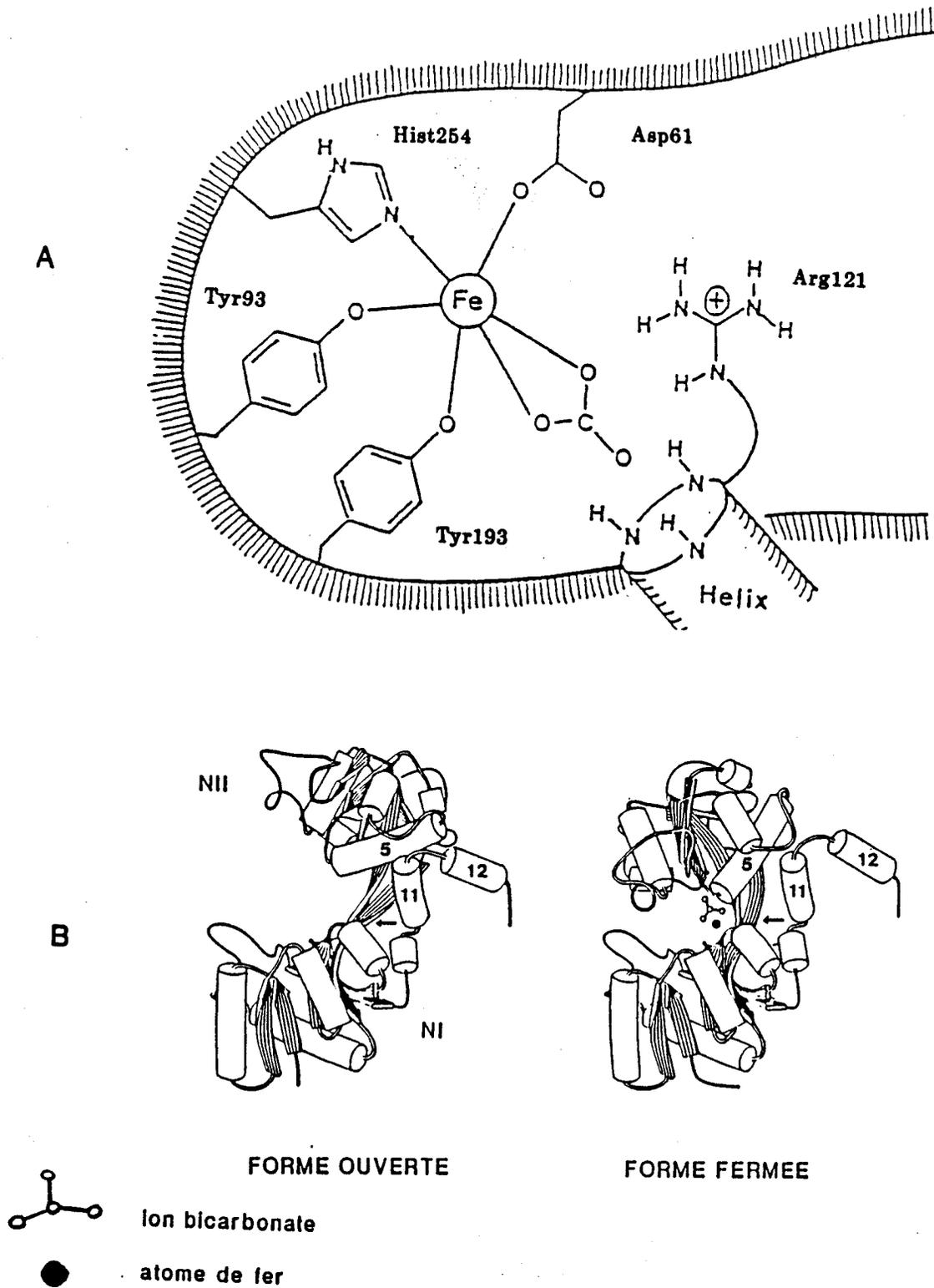


Figure 4: Représentation schématique du site de fixation du fer de la lactotransferrine (A) (Anderson et al., 1989) et modification conformationnelle du lobe N-terminal lors de la fixation du fer (B) (Anderson et al., 1990).

respectivement au lobe N-terminal et au domaine N2 de la protéine, démontrent que la libération du glycanne conduit à la libération simultanée du fer de la protéine (Legrand et al., 1990).

Bien que les sites de fixation du fer localisés dans la lactotransferrine et dans la sérotransferrine soient similaires, la lactotransferrine possède une affinité pour le fer ferrique plus élevée que celle de la sérotransferrine. Contrairement à la sérotransferrine humaine qui libère son fer à pH 5,5, la lactotransferrine conserve particulièrement bien son fer à pH acide (Montreuil et al., 1960). Il est nécessaire de descendre à un pH de 3 pour désaturer complètement la lactotransferrine humaine. La meilleure rétention du fer de la lactotransferrine à pH acide, comparée à la sérotransferrine est attribuée aux différences structurales qui existent entre ces deux transferrines. Selon Anderson et al. (1989), des interactions spécifiques telles que des liaisons de type Van der Waals, ou l'établissement de ponts hydrogène, existent entre les domaines structuraux de chaque transferrine. Ces interactions qui contrôlent la rétention du fer par les transferrines, sont différentes entre la lactotransferrine et la sérotransferrine. Ces différences pourraient expliquer une plus grande stabilité des sites anioniques de fixation du fer de la lactotransferrine, comparée à celle des sites de la sérotransferrine.

Les transferrines fixent également de nombreux ions de métaux de transition ainsi que plusieurs lanthanides tels que: Cu^{2+} , Zn^{2+} , V^{2+} , Mn^{2+} , Co^{3+} , Ga^{3+} , Hf^{3+} , Er^{3+} , Tb^{3+} , Eu^{3+} , Nd^{3+} , Pr^{3+} , Gd^{3+} , à raison de deux ions par molécule de transferrine à l'exception de Nd^{3+} et Pr^{3+} dont un seul ion est fixé (Luk, 1971).

IV - LES GLYCANNES

A- STRUCTURE

L'étude comparative de la partie glycanique des transferrines montre que les transferrines se différencient par le nombre, la nature et la localisation de leurs glycanes (Spik, 1968; Spik et al., 1985a; Spik et al., 1988). La sérotransferrine humaine possède deux glycanes de type N-acétyllactosaminique, biantenné ou triantenné (Fig.5, p.22). La structure du glycanne biantenné a été établie définitivement par Spik et al. (1974, 1975) puis confirmée par analyse des spectres en résonance magnétique nucléaire par Dorland et al. (1977). Les glycanes de type triantennés possèdent deux structures différentes déterminées par Spik et al. (1985 b). La répartition des glycanes bi- et triantennés de la sérotransferrine humaine est soumise à des grandes variations dans des cas pathologiques comme les affections hépatiques (Debruyne et al., 1984) et des conditions particulières comme la gestation (Léger et al., 1989) où le nombre de glycanes triantennés augmente.

La présence d'un glycanne de structure tétraantenné a également été envisagée (März et al., 1982; Spik et al., 1985 b). De plus, les cellules HepG2 d'hépatome humain sécrètent une sérotransferrine ayant des glycanes fucosylés, tétra et pentaantennés (Campion et al., 1989).

La recherche de la séquence Asn-X-Thr/Ser codant pour la N-glycosylation des protéines a permis de positionner les glycanes de la sérotransferrine dans le lobe C-terminal de la molécule (Mazurier et al., 1983; Mac Gillivray et al., 1983).

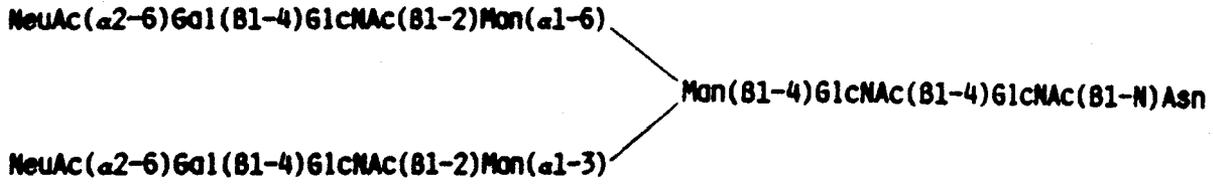
Les glycanes de la lactotransferrine présentent une grande microhétérogénéité liée, en particulier, à l'existence de résidus de fucose en nombre variable. La lactotransferrine contient deux glycanes

de type N- acétyllactosaminique fucosylé (Fig.6, p.23) (Spik et al., 1974, 1982a). Ces structures glycaniques sont mono- ou disialylées et renferment un ou deux résidus de fucose liés en α -1,6 sur la N-acétylglucosamine du point d'attache ou en α -1,3 sur la N-acétylglucosamine 5' de l'antenne. D'autres structures plus complexes polyfucosylées sont trouvées en très faible quantité (Matsumoto et al., 1982; Spik et al., 1982 a). Les sites de glycosylation de la lactotransferrine sont localisés dans le domaine NII pour le lobe N-terminal et le domaine CII dans le cas du lobe C-terminal.

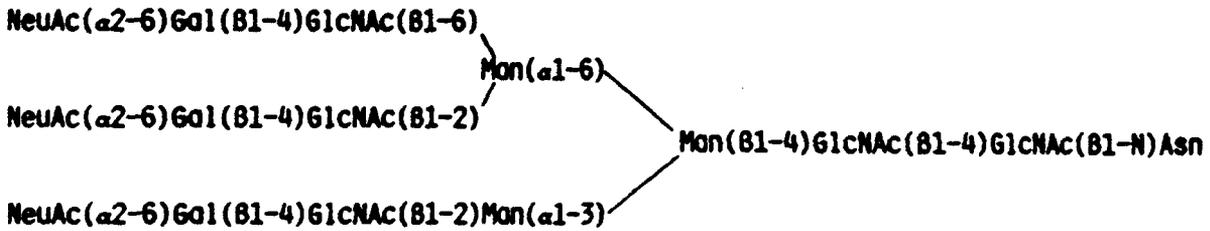
L' absence de fucose α -1,3 dans les glycanes de la lactotransferrine leucocytaire humaine la distingue de la structure glycanique de la lactotransferrine humaine isolée du lait (Derisbourg et al., 1990). Contrairement à la lactotransferrine humaine, la lactotransferrine bovine renferme outre des glycanes de type N-acétyllactosaminique, des glycanes de type oligomannosidique (Coddeville et al., 1991). La proportion de glycanes de types N-acétyllactosaminique et oligomannosidique varie au cours de la lactation.

2) CONFORMATION

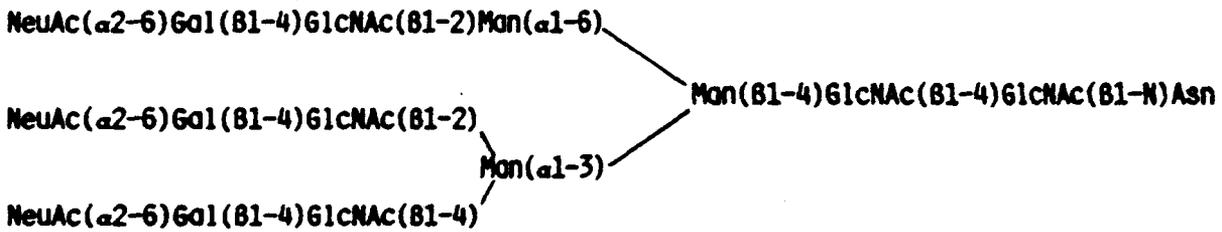
Sur la base de la construction de modèles moléculaires, accompagnée des données acquises par les méthodes de résonance magnétique nucléaire et de diffusion de neutrons, trois conformations principales ont été proposées pour les glycanes de la lactotransferrine et de la sérotransferrine: une conformation en "Y", en "T", "en oiseau" et en "aile brisée" (Fig.7, p.24) (Montreuil et al., 1978; Warin et al., 1979; Montreuil, 1980, 1982, 1983, 1984; Bock et al., 1982; Sutton et Phillips, 1983). La conformation en "oiseau" est énergétiquement la plus stable. Ces trois conformations sont interconvertibles et ne doivent pas être considérées comme fixes ou rigides. Sur la base de la conformation "en



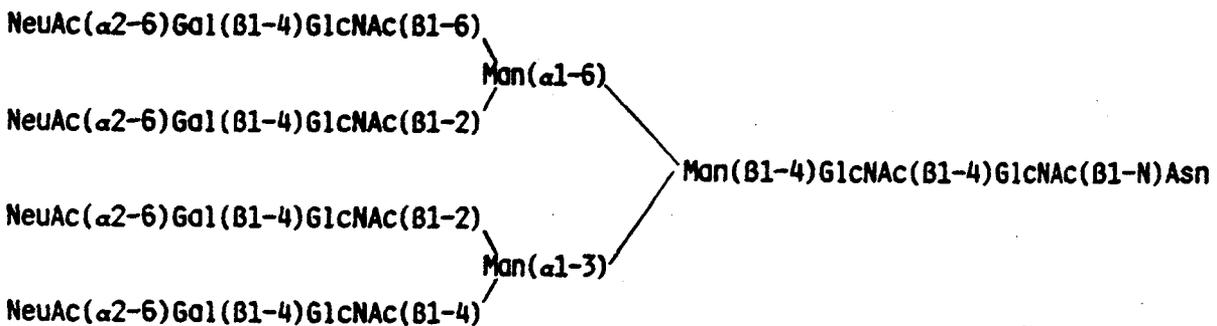
A



B



C



D

Figure 5 : Structure des glycanes de la sérotransferrine humaine :

A : bi-antenné (Spik et al., 1974, 1975; Dorland et al., 1977)

B : tri-antenné (Spik et al., 1985)

C : tri'-antenné (Spik et al., 1985)

D : tétra-antenné (März et al., 1982; Spik et al., 1985).

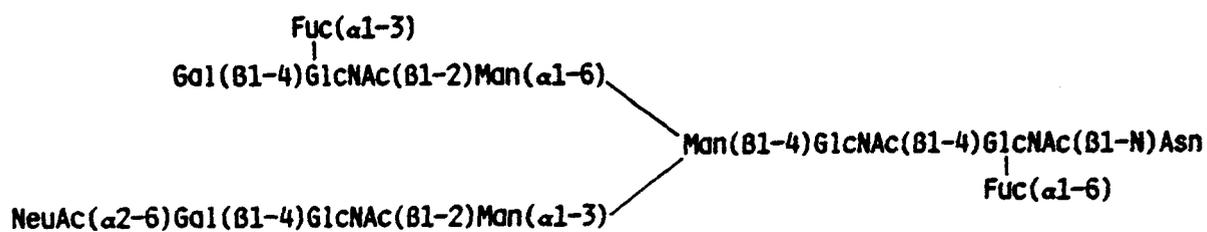
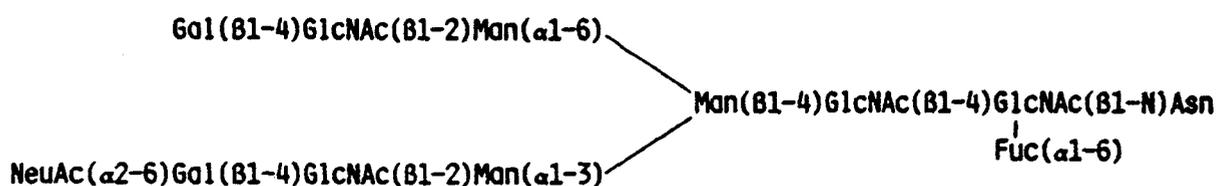
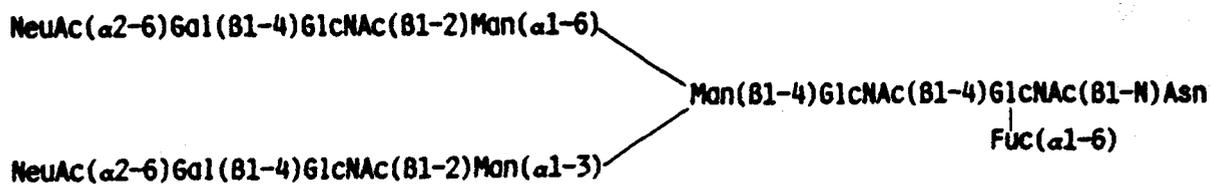


Figure 6 : Structure des glycanes de la lactotransferrine humaine (Spik et al., 1982a).

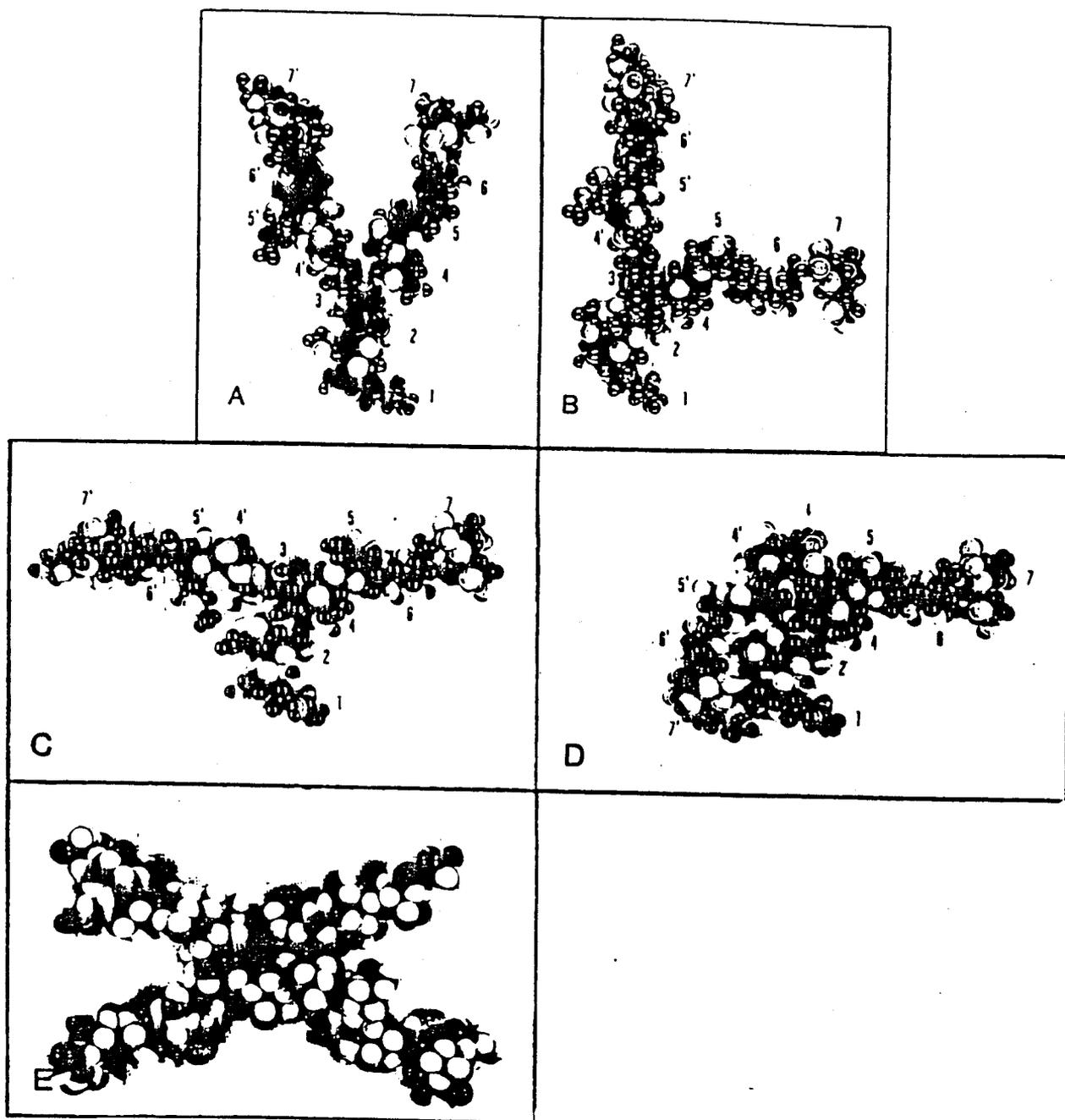


Figure 7 : Modèles moléculaires des glycanes de type N-acétyllactosaminiques (Montreuil et al., 1978; Montreuil, 1982, 1983, 1984, 1986).

A : conformation en "Y"

D : conformation en "aile brisée"

B : conformation en "T"

E : conformation en "parapluie"

C : conformation en "oiseau"

oiseau", Montreuil (1982, 1983) propose également une conformation en "parapluie" pour les glycanes portant une branche supplémentaire sur les résidus de mannoses (α 1-6) et (α 1-3).

Récemment, en collaboration avec le Professeur Vergoten, l'analyse conformationnelle des glycanes de type N- acétyllactosaminique, par l'application de calculs empiriques en utilisant le champ de force "Tripos", a permis de montrer qu'en absence d'interaction avec la protéine, le glycanne biantenné peut adopter une quarantaine de conformations. Ces différentes conformations peuvent être classées en cinq conformations principales: quatre d'entre elles correspondent aux conformations en "Y", en "T", en "oiseau" et en "aile brisée", précédemment annoncées, la cinquième est non décrite et est appelée "aile retournée" (Mazurier et al., 1991 a). Dans le cas de la sérotransferrine de Lapin, lorsque le glycanne est conjugué à la protéine, une seule conformation est mise en évidence: la conformation en "aile brisée". En effet, le glycanne contribue vraisemblablement à maintenir la protéine dans une conformation biologiquement active en formant un pont entre les deux lobes de la chaîne peptidique (Mazurier et al., 1991 b). Dans le cas de la lactotransferrine humaine, les deux glycanes sont plutôt dans une position "libre" et peuvent jouer un rôle de signaux de reconnaissance.

V- LES ROLES BIOLOGIQUES DES TRANSFERRINES

De part leurs propriétés de fixer le fer, la lactotransferrine et la sérotransferrine interviennent dans le métabolisme du fer. Néanmoins, bien que ces deux protéines possèdent de nombreuses homologies structurales, leurs fonctions sont différentes.

Le rôle principal de la sérotransferrine comme transporteur de fer pour l'ensemble des cellules de l'organisme est clairement établi. La

lactotransferrine intervient dans des mécanismes variés, en particulier dans la défense immunitaire. Certains de ces rôles sont parfaitement définis alors que d'autres restent l'objet de controverses.

A- LES ROLES BIOLOGIQUES DE LA SÉROTRANSFERRINE

Le rôle de la sérotransferrine a fait l'objet de plusieurs revues générales: Aisen et Brown (1975), Aisen et Listowsky (1980), Brock (1985), De Jong et al. (1990).

1) Rôle dans le transport du fer

Le rôle de la sérotransferrine dans le métabolisme du fer est clairement établi. La principale fonction attribuée à la sérotransferrine est le transport du fer des sites d'absorption et de réserve aux sites d'utilisation. En effet, la sérotransferrine prélève le fer au niveau des muqueuses intestinales, du parenchyme hépatique et du site de catabolisme des érythrocytes (les cellules du système réticulo-endothélial, c'est à dire les cellules de Küpffer et les macrophages) et le délivre jusqu'aux sites d'utilisation comme la moëlle osseuse ou le fer participe à la synthèse de l'hémoglobine ainsi qu'à toutes les autres cellules de l'organisme (Jandl et Katz, 1963; Rymer, 1981) . Le cycle du fer est décrit dans la figure 8 (p.28). Ainsi, au terme de leur vie les globules rouges sont phagocytés par les macrophages et le fer libéré de l'hémoglobine est capté par la sérotransferrine. Le fer est soit réutilisé immédiatement par la cellule, soit stocké dans de la ferritine des cellules du système réticulo-endothélial ou des cellules du foie, les hépatocytes.

2) Rôle dans l'absorption intestinale du fer

Le rôle de la sérotransferrine dans l'absorption intestinale reste encore très controversé. Après son absorption par l'intestin, le fer est stocké dans la ferritine de l'entérocyte avant d'être livré à la sérotransferrine. Le mécanisme par lequel le fer pénètre dans l'entérocyte n'est pas connu.

Huebers et al. (1976, 1983) sont en faveur de l'intervention de la sérotransferrine comme intermédiaire dans l'absorption intestinale du fer chez le Rat. Cependant, März et al. (1984), Mazurier et al. (1985) rendent compte de l'absence de récepteurs de la sérotransferrine à la surface des microvillosités des entérocytes humains et de Lapin. Plusieurs auteurs mettent alors en évidence la participation de la lactotransferrine dans l'absorption intestinale du fer par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques chez l'Homme (Cox et al., 1979), chez le Lapin (Mazurier et al., 1985), chez le Singe (Davidson et Lönnerdal, 1988) et chez la Souris (Hu et al., 1988, 1990).

3) Rôle dans l'activité bactériostatique

L'activité bactériostatique de la sérotransferrine a été mise en évidence in vitro par Schade et Caroline en 1944 et 1946. En complexant le fer du milieu, la sérotransferrine empêche la multiplication d'agents infectieux par un mécanisme de ferriprivation (Bullen et al., 1972; Weinberg, 1974; Bullen, 1981; Crosa, 1984; Bullen et Griffiths, 1987).

Lors d'une infection bactérienne ou virale, la sidérémie et l'absorption intestinale du fer baissent brutalement au profit d'une augmentation du fer de réserve dans le foie et dans les macrophages, ce qui a pour but de diminuer par ferriprivation la croissance

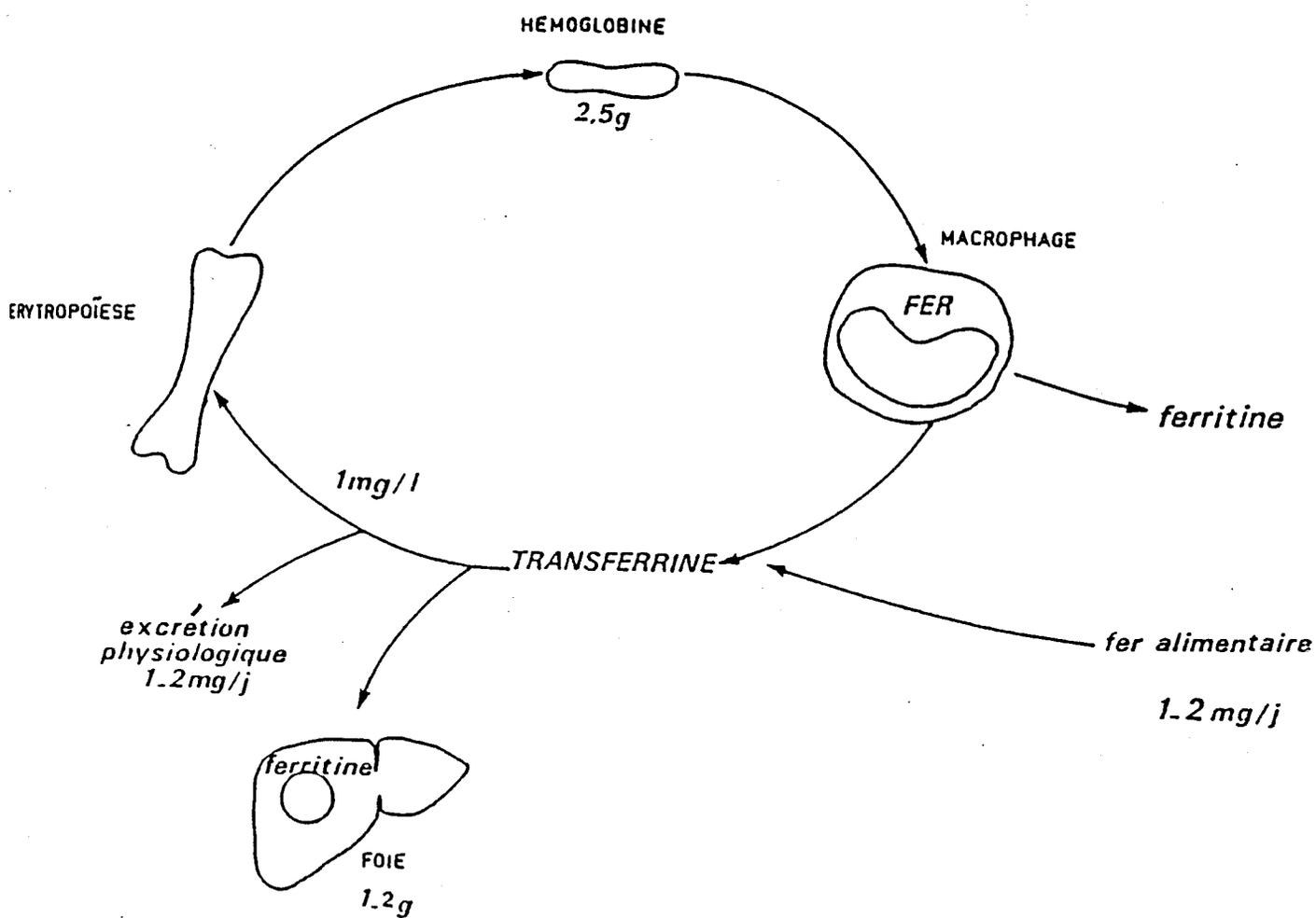


Figure 8 : Le cycle du fer dans l'organisme (Rymer, 1981).

bactérienne. Selon van Snick (van Snick et al., 1974, 1977, van Snick et Masson, 1976), l'apolactotransferrine libérée des leucocytes capterait le fer de la sérotransferrine plasmatique et le livrerait aux macrophages. Par ce mécanisme, la sérotransferrine désaturée priverait la bactérie de fer. Récemment, Berger (1987) a démontré que la sérotransferrine se fixait aux endotoxines bactériennes inhibant ainsi l'action pathogène de ces substances.

4) Rôle dans la prolifération cellulaire

La croissance de la plupart des cellules normales et cancéreuses est arrêtée lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu dépourvu de sérum de veau foetal (Barnes et Sato, 1980). L'addition de sérotransferrine saturée en fer dans le milieu de culture stimule la prolifération et la transformation cellulaire (Tormey et Mueller, 1972; Hutchings et Sato, 1978; Brock, 1981; Brock et Mainou-Fowler, 1983; Seligman, 1983).

La fixation préalable de la sérotransferrine à son récepteur est une étape indispensable pour que la sérotransferrine exerce une activité de facteur de croissance. En effet, des anticorps dirigés contre le récepteur de la sérotransferrine inhibent la prolifération cellulaire en bloquant la fixation de la sérotransferrine sur la cellule (Trowbridge et Omary, 1981; Trowbridge et Lopez, 1982; Mendelsohn et al., 1983; Neckers et Crossman, 1983; Brock et al., 1986).

Il est maintenant clairement établi que l'activité facteur de croissance de la sérotransferrine est due principalement à ses propriétés de livrer le fer aux cellules (Brock et Rankin, 1981; Bomford et al., 1983). Le taux de saturation en fer de la sérotransferrine ainsi que le nombre de récepteurs spécifiques présents à la surface cellulaire

régulent cette activité (Testa, 1985). La sérotransferrine, avec un taux de saturation en fer variant de 30 à 70% et à des concentrations comprises entre 10 et 50 $\mu\text{g/ml}$, stimule la transformation des lymphocytes activés par un mitogène (Phillips et Azari, 1975; Brock 1981; Taylor et al. 1988). L'aposérotransferrine est incapable d'activer la croissance cellulaire (Brock et Mainou-Fowler, 1983).

Le fer est un cofacteur de nombreuses protéines et enzymes impliquées dans les réactions métaboliques vitales pour la vie cellulaire comme l'hémoglobine qui assure le transport et le stockage de l'oxygène, la ribonucléotide réductase qui intervient dans la synthèse de l'ADN (Hoffbrand et al., 1976; Kay et Benzie, 1986) et l'ARN polymérase (Shoji et al., 1985). De même, l'activité de la protéine kinase C augmente en présence de sérotransferrine, chez les lymphocytes activés et les cellules leucémiques CCRF-CEM (Phillips et al., 1987; Alcantera et al., 1991). Cet effet a été attribué essentiellement au fer apporté par la protéine étant donné que l'aposérotransferrine n'a aucune action. Ainsi, pour assurer leur besoin au cours de leur croissance, les cellules cancéreuses et les cellules en voie de division exigent un apport de fer plus important que les cellules au repos, ce qui se traduit par une augmentation du nombre de récepteur de la sérotransferrine à la surface cellulaire (Sutherland et al., 1981).

Actuellement, plusieurs observations tendent à prouver que la sérotransferrine pourrait jouer différent de celui lié à sa capacité de livrer directement son fer à la cellule. La participation de la sérotransferrine, comme accepteur d'électrons au niveau de la membrane plasmique, a été démontrée par la mise en évidence de la réduction du fer ferrique en fer ferreux par des cellules HeLa et par les hépatocytes de foie de Rat (Morley et al., 1983; Crane et al., 1985; Löw et al., 1986, 1987; Thortensen 1988; Thortensen et Romslo, 1988; Crane et al.,

1990). A partir de membranes plasmiques isolées de foie de Rat, la NADH oxydoréductase plasmique a été identifiée comme étant l'enzyme responsable de la réduction du fer ferrique fixé à la sérotransferrine. Cette réaction s'accompagne simultanément d'une oxydation du NADH cytosolique en NAD^+ et d'une libération de protons dans le milieu externe (Sün et al., 1985, 1987a; Thorstensen et Romslo, 1990; Crane et al., 1990). La sécrétion de protons provoque une alcalinisation du cytoplasme et une entrée d'ions sodium à travers un système antiport Na^+/H^+ (Garcia-Canero, 1988; Fuhrmann et al., 1989). La capture d'ions Na^+ par la cellule déclenche le pompage d'ions Na^+ vers l'extérieur de la cellule par un mécanisme ATPase Na^+/K^+ dépendant. Cette cascade de réactions entraîne une augmentation du potentiel membranaire des cellules (Crane et al., 1990; Tooles-Simms et al., 1991). Ces différents phénomènes, tels que l'alcalinisation du cytoplasme, les changements intracellulaires du taux de $\text{NAD}^+/\text{NADH}^+$ et le maintien de composés rédox dans la membrane plasmique dans un état oxydé sont directement ou indirectement impliqués dans la croissance cellulaire et peuvent être ciblés par la NADH oxydoréductase (Thorstensen et Rosmlo, 1990). La figure 9 (p.32) résume l'ensemble de ces réactions.

Certains anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur de la sérotransferrine inhibent la réaction d'oxydoréduction et la croissance de certaines lignées cellulaires, sans empêcher la fixation de la protéine à son récepteur (Crane et al., 1985; Navas et al. 1986; Löw et al., 1986; Taetle et al., 1987). Le fait que cette inhibition ne puisse être levée par l'addition de fer démontre que le récepteur est directement impliqué dans le mécanisme d'activité de la NADH oxydoréductase.

La sérotransferrine peut également stimuler la réduction du fer extérieur, introduit dans le milieu sous forme de citrate ferrique. Ce

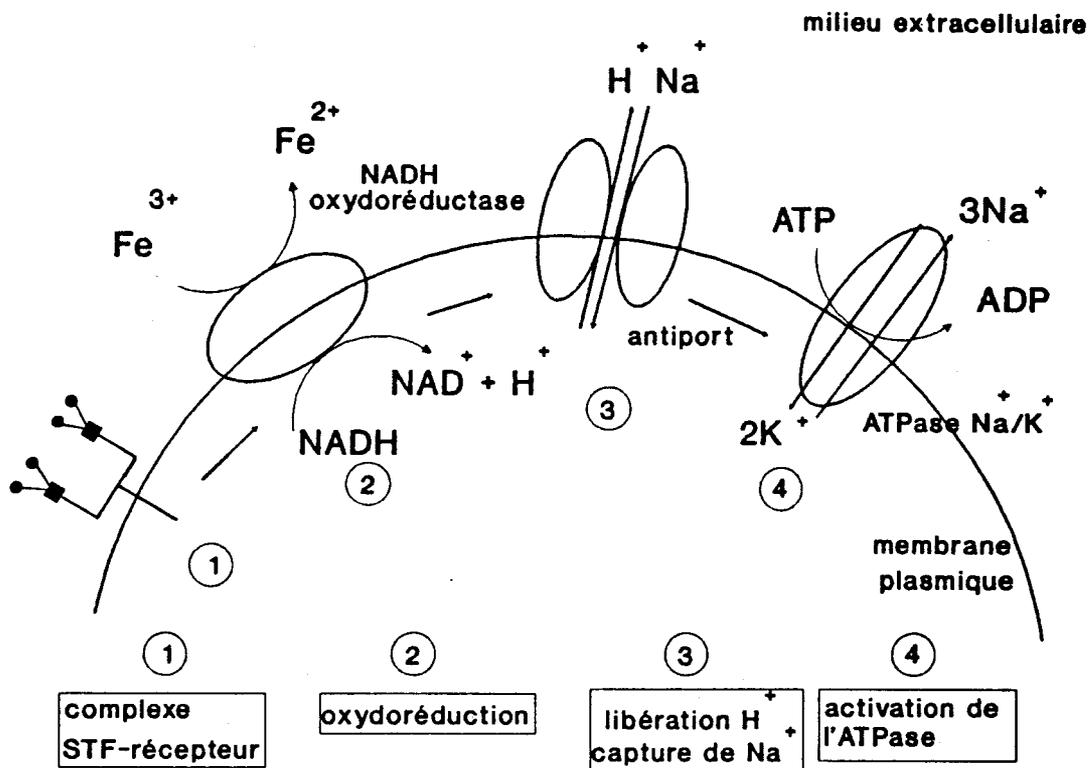


Figure 9: Modèle du mécanisme d'oxydoréduction de la sérotransferrine au niveau de la membrane plasmique (Crane et al., 1990).

résultat suggère que la fixation de la sérotransferrine à son récepteur active directement le transport d'électrons, probablement en stimulant la NADH oxydoréductase. L'activité oxydoréductasique de la membrane diminue quand la croissance s'arrête (Crane et al., 1990).

B- LES ROLES BIOLOGIQUES DE LA LACTOTRANSFERRINE

La lactotransferrine intervient plus particulièrement dans l'absorption intestinale du fer, dans les mécanismes anti-infectieux et dans l'immunité à médiation cellulaire (Spik et Montreuil, 1983, 1986; Montreuil et al., 1985; Crichton et Charloiseau-Wauters, 1987; Gentile et Broxmeyer, 1987).

1) Rôle de la lactotransferrine dans l'absorption intestinale du fer

Le mécanisme d'absorption intestinale du fer qui implique le passage du fer de la lumière intestinale à travers la membrane de l'enterocyte est encore mal connu. L'hypothèse la moins controversée fait intervenir la lactotransferrine comme étant la source principale de fer, en particulier pour le nourrisson (Montreuil et al., 1960; Spik, 1988). Chez le nouveau né, l'absorption du fer est en général plus efficace que chez l'adulte (Spik, 1971). En effet, chez l'adulte, le fer apporté par l'alimentation est libéré dans l'estomac sous l'effet du pH et l'action de la pepsine. Dans le cas du nourrisson, un pH voisin de 4 et une protéolyse très faible de la lactotransferrine, permettent à celle-ci de conserver son fer (Spik, 1971). La lactotransferrine partiellement dégradée a été retrouvée intacte dans les selles de nourrisson alimentés au lait maternel (Spik et al., 1982 b; Davidson et Lönnerdal, 1987). Cette coprolactotransferrine a gardé son activité antibactérienne et sa capacité

de fixer son fer. Les travaux de Siimes et al. (1979), montrent également que, lorsque le fer est lié à la lactotransferrine, sa vitesse d'absorption est supérieure à celle des sels de fer.

L'hypothèse du transport de fer à travers la muqueuse intestinale, par l'intermédiaire de la lactotransferrine, a été renforcée dans un premier temps par la mise en évidence d'une fixation spécifique de la lactotransferrine au niveau des biopsies provenant du duodénum humain (Cox et al., 1979). D'autre part, la présence du récepteur de la lactotransferrine a été démontrée à la surface de la bordure en brosse des cellules de jéjunum de Lapin (Mazurier et al., 1985), du duodénum de Souris (Hu et al., 1988, 1990) et des enterocytes de Singe (Davidson et Lönnerdal 1986, 1989).

2) Rôle dans les mécanismes de la défense anti-infectieuse

Dans les mécanismes de défense immunitaires, la lactotransferrine intervient, d'une part, comme agent bactériostatique et, d'autre part, comme agent dans l'immunité à médiation cellulaire.

a) Rôle dans l'immunité humorale

La lactotransferrine humaine possède une activité bactériostatique in vitro pour des souches entéropathogènes (Reiter et al., 1975; Arnold et al., 1977, Spik et al., 1978). L'activité bactériostatique de la lactotransferrine repose sur un mécanisme de ferriprivation où la lactotransferrine entre en compétition avec les sidérophores bactériens pour la capture du fer (Bullen et Griffiths, 1987). Arnold et al. (1981, 1982) et Kalmar et Arnold (1988) démontrent également un effet bactéricide de la lactotransferrine. Un contact direct de la

lactotransferrine avec la paroi bactérienne est exigé pour que cet effet bactéricide s'exerce, suggérant un mécanisme plus complexe qu'une simple ferriprivation. En effet, la lactotransferrine est présente dans la plupart des sécrétions ainsi que le lysozyme et les immunoglobulines. Ces trois constituants agissent en synergie d'action lors d'une attaque microbienne (Bullen et Armstrong, 1979). In vitro, le lysozyme associe son activité lytique pour les parois des bactéries Gram + à l'action bactériostatique de la lactotransferrine (Perraudin et Prieels, 1982). L'activité bactériostatique de la lactotransferrine augmente en présence d'IgAs ou d'IgG spécifiques des bactéries pathogènes (Bullen et al., 1974; Spik et al., 1978) et s'exerce uniquement sur des bactéries pathogènes. Selon Bullen et al. (1974), les immunoglobulines spécifiques inhiberaient le passage du complexe fer-entérochiline à l'intérieur de la bactérie en se fixant sur le récepteur membranaire de l'entérochiline. Un autre mécanisme a été proposé par Izhar et al. (1982), selon lequel l'inhibition de l'adhésion des bactéries sur les muqueuses pourrait être liée à la partie glycanique de la lactotransferrine et des IgAs et plus particulièrement, aux résidus de L-fucose présents dans ces molécules.

Par ailleurs, de récents travaux montrent que l'apolactotransferrine peut provoquer une libération des lipopolysaccharides de la paroi des bactéries Gram- qui deviennent alors plus sensible à l'action d'antibiotiques hydrophobes (Ellison et al., 1988). L'apolactotransferrine agirait en fixant les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} nécessaires à la stabilisation des lipopolysaccharides dans la paroi bactérienne (Ellison et al., 1990).

b) Rôle dans l'immunité à médiation cellulaire

α) Régulation de la myélopoïèse

La lactotransferrine, libérée par les granules des leucocytes a été identifiée comme un inhibiteur de la production des colonies de granulocytes et de macrophages. Deux mécanismes d'action de la lactotransferrine ont été proposés. Selon Broxmeyer et al. (1978, 1983, 1990), elle agirait directement en diminuant la libération des "colony stimulating factors" ou "CSF", synthétisés par les lymphocytes et les macrophages et en inhibant la libération de prostaglandine de type E. Bagby et al. (1981, 1983) ont proposé un mécanisme indirect plus complexe, selon lequel la lactotransferrine agirait en bloquant la libération de monokines par les macrophages qui régule la production des "CSF" par les lymphocytes T, par les cellules endothéliales et par les fibroblastes. L'interleukine 1 a été identifiée comme une de ces monokines (Zucali et al., 1989).

β) Rôle dans l'activité bactéricide des leucocytes polymorphonucléaires et dans l'hyposidérémie inflammatoire

Selon van Snick et al. (1974, 1976), lors d'une inflammation, les leucocytes activés libèrent dans le sang un "leukocytic endogenous mediator" ou LEM (Kampschmidt et al., 1975) qui a été identifié à l'interleukine 1 (Heylar et al., 1987). Ce facteur stimule la dégranulation des leucocytes et provoque la libération d'une partie de l'apolactotransferrine leucocytaire, le reste étant déversé dans les phagolysosomes (Leffell et Spitznagel, 1975). A ce niveau, la lactotransferrine a un double effet bactéricide qui se traduit par la captation du fer du milieu ambiant et par la régulation de la production de radicaux hydroxyles libres à partir de l'oxygène. En effet, au cours de la phagocytose, des ions superoxydes O_2^- et le peroxyde d'oxygène

H_2O_2 sont produits par les neutrophiles. L'association de ces deux composés conduit à la formation de radicaux libres qui constituent de puissants agents oxydants capables d'endommager les molécules et d'induire une peroxydation des lipides. Le fer apporté par la lactotransferrine interviendrait comme catalyseur de cette réaction (Ambruso et Johnston, 1981).

D'autre part, selon van Snick (van Snick et al., 1974; van Snick et Masson, 1976), l'apolactotransferrine libérée des leucocytes capterait le fer de la sérotransferrine et le livrerait aux macrophages par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire. Dans le macrophage, ce fer serait ensuite cédé à la ferritine. La libération du fer de la sérotransferrine serait favorisée par un pH acide existant au lieu de l'inflammation, causée par la libération d'acide lactique et d'autres produits métaboliques par les polymorphonucléaires. Selon van Snick et al. (1977) et Campbell (1982), la présence de récepteurs membranaires de la lactotransferrine sur les macrophages serait en faveur de ce mécanisme.

δ) Rôle dans la migration et l'activité des cellules

immunocompétentes sur le lieu de l'inflammation

Les leucocytes polymorphonucléaires sont les premières cellules à arriver sur le lieu de l'inflammation. Selon De Souza (1978), la lactotransferrine provenant de la dégranulation des leucocytes y attirerait les macrophages et les lymphocytes par l'intermédiaire de récepteurs membranaires.

De plus, la lactotransferrine leucocytaire, en se fixant aux leucocytes neutrophiles (Bennett et Davis, 1981), pourrait ainsi affecter leur migration, en les rendant adhérents aux cellules de petits

vaisseaux (Oseas et al., 1981). La lactotransferrine agirait en abolissant la répulsion électrostatique des membranes qui permettait aux leucocytes de rester en suspension. L'immobilisation des leucocytes serait renforcée par l'effet de la lactotransferrine sur la production d'un facteur inhibiteur de la migration leucocytaire (Kiljstra, 1984).

Par ailleurs, Nishiya et Horwitz (1982) ont démontré une augmentation de l'activité cytotoxique des monocytes, sur le lieu de l'infection, en présence d'apolactotransferrine ou de lactotransferrine saturée.

Des études récentes réalisées chez la Souris démontrent également que la lactotransferrine, à des concentrations comprises entre 1 et 10µg/ml, stimule la réponse immunitaire par un processus qui implique l'activation de la différenciation des cellules T (Zimecki et al., 1991).

3) Effet antithrombotique d'un peptide de la lactotransferrine

L'implication des plaquettes dans la thrombogénèse artérielle a conduit à la recherche de nouveaux agents antiplaquettaires. L'agrégation plaquettaire met en jeu la fixation du fibrinogène sur le complexe glycoprotéinique GPIIb-GPIIIa de la membrane plaquettaire (Plow et al., 1985). Deux séquences peptidiques différentes de la molécule de fibrinogène sont impliquées dans sa liaison avec le récepteur GPIIa-GPIIIa: un dodécapeptide qui se fixe sur la sous-unité GPIIb et deux séquences tétrapeptidiques RGDF et RGDS reconnus par GPIIIa (D'Zouza et al., 1988). In vitro, l'adhésion et l'agrégation des plaquettes sont inhibées par des peptides contenant la séquence RGD_X du fibrinogène (Gartner et Bennett, 1985). In vivo ce peptide prévient la thrombose artérielle (Cadroy et al., 1989). Néanmoins comme la

séquence RGDS induit le détachement des cellules endothéliales, une toxicité générale in vivo peut avoir lieu.

La coagulation du sang présente de nombreuses homologies avec celle du lait : une homologie fonctionnelle entre le mécanisme de clivage de la kappa-caséine du lait par la chymotrypsine et celui du fibrinogène par la thrombine et une homologie structurale entre la séquence de la kappa-caséine et le dodécapeptide du fibrinogène (Jollès et al., 1978, 1986). Par conséquent, une séquence n'ayant pas les effets néfastes de RGDX a été recherchée dans les protéines du lait. L'étude systématique des homologies de séquence a permis de découvrir une séquence qui s'apparente à RGDX, la séquence KRDS (résidus d'acides aminés de 39 à 42) qui forme un coude β dans la lactotransferrine humaine. In vitro, KRDS inhibe l'aggrégation plaquettaire induite par l'ADP et inhibe la fixation du fibrinogène aux plaquettes de façon moins importante que RGDS (Raha et al., 1988; Mazoyer et al., 1990; Drouet et al., 1990). Néanmoins, KRDS semble avoir un mode d'action différent de RGDS. Contrairement à RGDS, KRDS ne s'oppose pas à la fixation d'un anticorps monoclonal (PAC1) dirigé contre un épitope de configuration du complexe glycoprotéinique GPIIb/GPIIIa de la membrane plaquettaire (Mazoyer et al., 1990). De plus, KRDS est un inhibiteur de la sécrétion de la sérotonine induite par la thrombine, par un mécanisme indépendant de la phosphorylation protéique (Mazoyer et al., 1990), alors que RGDS n'a aucun effet. Cette inhibition s'exerce sur des plaquettes de patients déficients en GPIIb-GPIIIa excluant donc que l'activité de KRDS soit due à la fixation du peptide sur le complexe GPIIb-GPIIIa. Selon Mazoyer et al. 1990, KRDS et RGDS agiraient sur des sites différents. In vivo, KRDS a également une action antithrombique (Sollier et al., 1990). Un effet potentialisateur de l'association KRDS plus RGDS a pu être mis en évidence in vivo mais

pas in vitro (Sollier et al., 1990; Drouet et al., 1990), confirmant une différence dans le mode d'action entre ces deux peptides.

4) Activité de facteur de croissance de la lactotransferrine

La lactotransferrine, tout comme la sérotransferrine, exerce une activité de facteur de croissance sur différentes cellules dans un milieu dépourvu de sérum de veau foetal. En effet, la lactotransferrine stimule l'incorporation de thymidine tritiée dans le DNA de cellules entérocytaires de Rat (Nichols et al., 1987), de cellules fibroblastiques de Souris BALB/L3T (Azuma et al., 1989), de lignées macrophagiques murines P388D1 (Oria et al., 1988) et de lymphocytes humains activés (Mazurier et al., 1989). L'effet facteur de croissance de la lactotransferrine sur les lymphocytes T activés est maximal à des concentrations comprises entre 1 et 56 $\mu\text{g/ml}$ et pour un taux de saturation en fer de 30%. La lactotransferrine exerce également un effet mitogène en augmentant la prolifération de certaines cellules de type myoblastiques (Byatt et al., 1990), de cellules d'adénocarcinome du colon humain HT29 (Amouric et al., 1984) ainsi que de cellules de type lymphoïde (Hashizume et al., 1983). Selon Hashizume et al. (1983), la prolifération des lignées lymphocytaires B et T est plus importante en présence de lactotransferrine qu'en présence de sérotransferrine. De plus, la lactotransferrine bovine pourrait se substituer à la lactotransferrine humaine comme facteur de croissance.

Le rôle du fer dans l'activité de facteur de croissance de la lactotransferrine reste encore à élucider. Il semblerait que le rôle de la lactotransferrine dans la prolifération cellulaire ne soit pas lié à son fer. En effet, l'apolactotransferrine mis en présence de desferrioxamine pour éviter une resaturation en fer de la protéine, peut se substituer à

la lactotransferrine saturée comme facteur de croissance (Nichols et al., 1990). Par ailleurs, Oria et al. (1988) ont démontré que le fer n'était pas capturé par la lignée macrophagique P388D1. L'absence d'internalisation de la lactotransferrine dans les cellules HT29D4, un sous-clône de cellules HT29, montre que les cellules ne capturent pas le fer par un mécanisme d'endocytose du complexe ligand-récepteur comme c'est le cas pour la sérotransferrine (Roiron-Lagroux et Figarella, 1990).

L'ensemble de ces résultats suggérant que la capture du fer fixé à la lactotransferrine n'est pas le mécanisme responsable de l'activité de facteur de croissance de cette protéine.

Récemment, Sün et al. (1991) ont observé une réduction du fer ferrique de la lactotransferrine fixée à la surface des cellules leucémiques K562 et des cellules HeLa. L'introduction dans le milieu extérieur de puissants chélateurs, tels que la bathophénantroline, qui forment un complexe avec le fer ferreux libéré de la lactotransferrine, permet de mesurer la vitesse de cette réaction. La vitesse de réduction du fer de la lactotransferrine est plus rapide que celle observée pour la sérotransferrine. Ces auteurs observent également que la lactotransferrine saturée en fer est capable de stimuler, en présence des cellules HeLa ou K562, la réduction de fer externe apporté par le citrate d'ammonium ferrique introduit dans le milieu. En travaillant sur des membranes de foie de Rat isolées, Sün et al. 1991 ont démontré que la NADH oxydoréductase était l'enzyme membranaire impliquée dans la réduction du fer fixé à la lactotransferrine. Cette réaction s'accompagne simultanément d'une oxydation du NADH⁺ cytosolique en NAD⁺ et d'une libération d'ions H⁺ dans le milieu extérieur par l'intermédiaire de l'antiport Na⁺/H⁺. Ce mécanisme semble être identique à celui rapporté pour la sérotransferrine dans la prolifération cellulaire.

5) Activité ribonucléasique de la lactotransferrine

Récemment, Furmanski (Furmanski et al., 1989; Furmanski et Li, 1990) ont mis en évidence la présence de deux formes de lactotransferrine dans le lait et dans les leucocytes qui possèdent des activités différentes:

- une forme majeure conventionnelle, fixant le fer nommée LTF α ,
- deux formes mineures LTF β et LTF δ , incapables de fixer le fer mais possédant une activité ribonucléasique.

Ces trois lactotransferrines ont des propriétés physicochimiques et antigéniques identiques. Ces auteurs suggèrent que l'activité ribonucléasique de la lactotransferrine pourrait jouer un rôle dans la dégradation des débris cellulaires.

VI- CONCLUSION

La lactotransferrine et la sérotransferrine présentent de nombreuses homologies conformationnelles et structurales. La connaissance de la structure et de la conformation des protéines est indispensable à la compréhension des rôles biologiques joués par celles-ci, notamment, dans les mécanismes d'interaction cellulaire. Le rôle de la sérotransferrine comme transporteur du fer jusqu'aux cellules utilisatrices est clairement établi. La lactotransferrine semble intervenir plus particulièrement dans les mécanismes de défense immunitaire, mais également dans la prolifération cellulaire. Ces deux glycoprotéines exercent leurs activités par l'intermédiaire de récepteurs présents sur différentes cellules, particulièrement sur les cellules en voie de division.

LES RECEPTEURS DES TRANSFERRINES

I- INTRODUCTION

La sérotransferrine assure son rôle de transporteur du fer par des récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules.

Le récepteur de la sérotransferrine a été mis en évidence sur un grand nombre de cellules eucaryotes, à la fois sur les cellules normales et cancéreuses. La structure, la fonction et la régulation de l'expression du récepteur de la sérotransferrine sont à présent bien connues et font l'objet de plusieurs revues générales (Goding, 1983; Bomford et Munro, 1985; Huebers et Finch, 1985, 1987; Ward, 1987; De Jong et al., 1990).

La fixation spécifique de la lactotransferrine n'a été démontrée que sur certaines cellules, en particulier sur les entérocytes et sur les lymphocytes humains activés (Cox et al., 1979; Hu et al., 1988, 1990; Mazurier et al., 1989). Cependant, très peu d'études ont été, jusqu'à ce jour, réalisées sur la structure, la fonction et la régulation de l'activité et de l'expression du récepteur de la lactotransferrine.

II- LE RECEPTEUR DE LA SEROTRANSFERRINE

A- LOCALISATION DU RECEPTEUR DE LA SEROTRANSFERRINE

Dès 1959, Jandl et al. ont mis en évidence la fixation de la sérotransferrine sur les réticulocytes humains. Différents auteurs ont confirmé ces résultats et démontré que les réticulocytes perdaient progressivement le récepteur de la sérotransferrine au cours de leur

maturation en érythrocytes (Ecarot-Charier et al. 1980; Iacopetta et al., 1982; Lebman et al., 1982; Pan et al., 1983).

Au niveau de l'hépatocyte, le fer est amené par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques de la sérotransferrine dont l'existence a été démontré par Gardiner et Morgan (1974) et Gröhlich et al. (1979), puis confirmée par Dautry-Varsat et al. (1983) sur une lignée cellulaire humaine provenant d'un hépatome (HepG2). Néanmoins, Soda et Tavassoli (1984), Soda et al. (1989) suggèrent que le récepteur de la sérotransferrine est situé sur les cellules endothéliales de foie et non sur les hépatocytes.

Durant la gestation, les besoins en fer du fœtus sont pourvus grâce à l'apport du métal lié à la sérotransferrine maternelle. La sérotransferrine se fixe sur un récepteur localisé sur les microvillosités du syncytium trophoblastique, tissu directement en contact avec le sang maternel (Fletcher et Suter, 1969; Wada et al., 1979). Le récepteur de la sérotransferrine a été localisé également dans certains tissus du cerveau de Rat, riches en récepteurs des neuropeptides (Hill et al., 1985) et dans les myocytes (Fava et al., 1981).

A l'aide d'un anticorps dirigé contre le récepteur placentaire de la sérotransferrine, le récepteur a été mis en évidence à la surface des cellules normales en voie de prolifération (Larrick et Cresswell, 1979 a et b; Ward, 1987) ainsi que sur des cellules néoplastiques bénignes et malignes (Hamilton et al., 1979; Newman et al., 1982; Schulman et al., 1981; Ward et al., 1982; Trowbridge et al., 1984).

B- STRUCTURE ET PROPRIETES DU RECEPTEUR

L'utilisation d'anticorps monoclonaux B3/25 et OKT9 dirigés contre le récepteur de la sérotransferrine, isolés respectivement à partir de la

lignée érythroleucémique K562 et de lymphocytes T humains, a permis l'isolement et l'étude structurale du récepteur de la sérotransferrine (Sutherland et al., 1981; Goding et Burns, 1981).

Le récepteur de la sérotransferrine a été identifié comme une glycoprotéine de 180 kDa, composée de deux sous-unités de 90 kDa reliées par un pont disulfure (Seligman et al., 1979; Enns et Sussman, 1981; Schneider et al., 1982) (Fig.10, p.47). Chacune de ces sous-unités fixe une molécule de sérotransferrine et porte un glycanne de type N-acétyllactosaminique et deux glycannes de type oligomannosidique (Schneider et al., 1982). Récemment, des glycannes liés O- glycosidiquement ont été mis en évidence sur le récepteur de la sérotransferrine isolé à partir de lignées cellulaires humaines de carcinomes d'épidermes (A431) et de cellules érythroleucémiques (K562) (Do et al., 1991).

Le récepteur est transmembranaire et phosphorylé (Schneider et al., 1982; Rothenberger et al., 1987). Chaque sous-unité est liée à un acide palmitique qui permet l'ancrage du récepteur dans la membrane (Omary et Trowbridge, 1981).

L'hydrolyse trypsique du récepteur membranaire de la sérotransferrine libère deux fragments de 70 kDa capables de fixer la sérotransferrine. Le temps de demi-vie du récepteur a été estimé entre 10 et 60 heures (Ward et al. 1982).

Le gène contrôlant la biosynthèse de ce récepteur a été localisé sur le chromosome 3, tout comme celui de la sérotransferrine (Enns et al., 1982; Goodfellow et al., 1982). La séquence peptidique du récepteur de la sérotransferrine humaine a été déduite de la séquence du mRNA par Schneider et al. 1984 et du cDNA par Mac Clelland et al. (1984). Chaque sous-unité polypeptidique est composée de 760 résidus d'acides aminés. La partie N-terminale (62 résidus d'acides aminés) est orientée

vers le cytoplasme et ce domaine semble être indispensable à l'internalisation du récepteur (Rothenberg et al., 1987). La partie transmembranaire (26 résidus d'acides aminés), hydrophobe, sert d'ancrage et de signal de translocation dans la membrane (Zerial et al., 1986). Bien que de nombreux auteurs soient en faveur de l'hypothèse de l'universalité du récepteur de la sérotransferrine (Hamilton et al., 1979; Enns et Sussman, 1981; Stein et Sussman, 1983), des différences structurales et immunologiques du récepteur ont été mises en évidence entre les différentes espèces animales et sur des cellules issue d'une même espèce, en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes variés du récepteur (Bartek et al., 1985; Panaccio et al., 1987; Cotner et al., 1989). Les récepteurs humain et murin de la sérotransferrine se distinguent par des différences de masse moléculaire et de taux de glycosylation (Van Agthoven et al., 1984). Par ailleurs, Van Driel et Goding (1985), en étudiant le récepteur de la sérotransferrine murine, distinguent deux récepteurs de sérotransferrine dont le nombre de sites de glycosylation est différent.

C- REGULATION DU NOMBRE DE RECEPTEURS

Les changements concernant le nombre de récepteurs de la sérotransferrine présent à la surface des cellules peuvent être dus, soit à une modification dans l'expression du récepteur, soit à une modification de la répartition du nombre de récepteurs entre la surface cellulaire et les vésicules intracellulaires (Bomford et Munro, 1985).

La synthèse de l'ARNm et la transcription en protéine du récepteur de la sérotransferrine sont régulées par la quantité de fer présent dans le milieu et par l'état physiologique de la cellule. Ainsi, en présence de chélateurs de fer, le nombre total de récepteurs à la surface de la

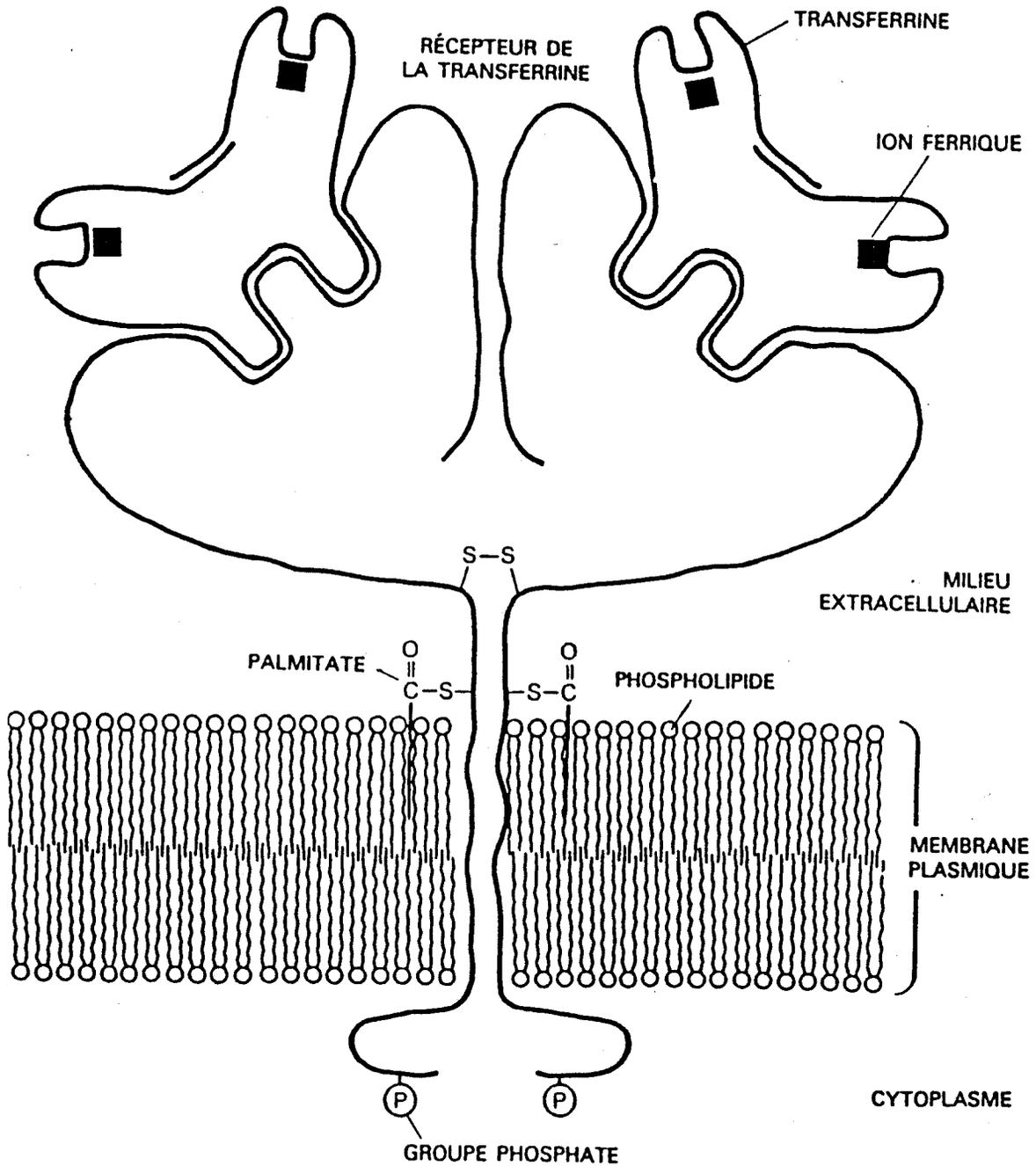


Figure 10 : Le récepteur de la sérotransferrine (Schneider *et al.*, 1982).

cellule augmente suite à une biosynthèse de nouveaux récepteurs (Mattia et al., 1984; Bridges et Cudkowicz, 1984). A l'inverse de ce mécanisme, en présence d'un excès de fer, la synthèse de l'ARNm du récepteur de la sérotransferrine diminue (Louache et al., 1984; Rao et al., 1985). L'hème intracellulaire est également un signal de régulation de la synthèse du récepteur (Pelicci et al., 1982; Ward et al., 1984; Theil, 1990). Des éléments de séquences spécifiques, responsables de la régulation par le fer de l'expression du récepteur de la sérotransferrine et de la ferritine, ont été localisés dans l'ARNm de ces deux protéines (Hentze et al., 1987; Casey et al., 1988; Theil 1990). Une protéine cytosolique IRE-BP (Iron Regulated RNA Binding Protein) interagit spécifiquement avec ces séquences d'ARNm. Cette interaction conduit, d'une part, à une inhibition de la traduction de l'ARNm de la ferritine et, d'autre part, à la stabilisation de la traduction de l'ARNm du récepteur de la sérotransferrine (Rouault et al., 1988, 1991).

L'apparition du récepteur est régulée par les besoins nutritionnels nécessaires à la croissance des cellules (Neckers, 1991). La présence d'un nombre plus important de récepteurs de la sérotransferrine dans les tissus néoplastiques comparés à des lésions bénignes est due principalement à une augmentation des besoins en fer (Trowbridge et Omary, 1981; Sutherland et al., 1981, Chitambar et al., 1983). Les lymphocytes au repos expriment peu de récepteurs de la sérotransferrine qui n'apparaissent qu'après stimulation par des mitogènes (Larrick et Cresswell, 1979 a; Galbraith et al., 1980). Ce phénomène précède la synthèse d'ADN (Neckers et al., 1983). L'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse protéique bloque l'apparition des récepteurs, suggérant que ces derniers sont nouvellement synthétisés et non pas dérivés d'un compartiment intracellulaire (Galbraith et al., 1981). Durant la mitose, le nombre de récepteur en

surface diminue en raison d'une inhibition du recyclage du récepteur à la surface cellulaire (Warren et al., 1988).

Certains facteurs libérés par les cellules peuvent réguler l'expression du récepteur de la sérotransferrine. Ainsi, l'apparition du récepteur de l'interleukine 2 sur les lymphocytes activés précède celle du récepteur de la sérotransferrine et régule l'expression de ce dernier (Brock et Mainou-Fowler 1983; Neckers et al., 1983). Au contraire, l'interféron α conduit à une diminution du récepteur à la surface des lymphocytes (Besançon et al., 1985).

Le stade de différenciation cellulaire détermine également la régulation du nombre de récepteur de la sérotransferrine (Chitambar et al., 1983). Ainsi, le nombre de récepteurs est élevé sur les précurseurs des cellules érythrocytaires, puis diminue graduellement lors de la maturation des cellules (Iacopetta et al., 1982; Sieffs et al., 1982; Seligman, 1983).

L'expression du récepteur de la sérotransferrine à la surface cellulaire peut être régulé par un mécanisme indépendant de la biosynthèse du récepteur, causé par une redistribution des récepteurs entre le pool externe et interne de la cellule. Ainsi, les esters de phorbols (Buys et al. 1984) et certains facteurs de croissance, comme l'EGF (Wiley et Kaplan, 1984) et l'insuline (Davis et al., 1986), provoquent une augmentation des récepteurs à la surface de certaines lignées cellulaires causée par une redistribution des récepteurs intracellulaires localisés dans des endosomes (Ward et Kaplan, 1986).

D- INTERACTION DE LA SEROTRANSFERRINE AVEC SON RECEPTEUR

Chaque récepteur fixe deux molécules de transferrine (Schneider et al., 1982).

La sérotransferrine bovine se fixe sur les cellules érythroleucémiques humaines K562 avec une affinité 2000 fois plus faible que celle de la sérotransferrine humaine (Tsavaler et al., 1986).

A un pH physiologique, l'affinité du récepteur pour la sérotransferrine varie en fonction du taux de saturation en fer de cette dernière. Ainsi, selon Young et al. (1984), Wada et al., 1979), à pH neutre, les constantes de dissociation sont de l'ordre:

- de 1×10^{-8} M pour la sérotransferrine diferrique
- de 5×10^{-8} M pour la sérotransferrine monoferrique
- de 2×10^{-7} M pour l'aposérotransferrine

Néanmoins, l'affinité du récepteur pour la sérotransferrine monoferrique ne varie pas, suivant que le fer est fixé sur le site N- ou C-terminal de la sérotransferrine (Huebers et al., 1981).

La fixation de la sérotransferrine est pH dépendante. Elle est optimale à pH compris entre 7 et 8. L'affinité de l'aposérotransferrine pour le récepteur est 10 fois plus faible à pH 7 qu'à pH 5 (Dautry-Varsat et al., 1983; Klausner et al., 1983).

Le nombre de récepteurs de la sérotransferrine varie de 6×10^4 à $2,8 \times 10^5$ sites par cellule, en fonction de la nature de la cellule, de la croissance cellulaire et du stade de différenciation (Tableau I, p.51).

Le site d'interaction de la sérotransferrine avec son récepteur n'est pas encore déterminé. Dekker et al. (1985), en travaillant en système hétérologue sérotransferrine humaine-réticulocytes de Rat, concluent que les structures glycaniques de la sérotransferrine ne sont pas impliquées dans la reconnaissance de la sérotransferrine par son récepteur. Seul, l'asialosérotransferrine se fixe au récepteur lectinique d'Ashwell, présent sur les cellules de Küppfer et sur les

Tableau I : Paramètres de fixation de la sérotransferrine humaine (STF) sur différentes cellules.

Cellules	Nombre de récepteurs par cellule ($\times 10^3$)	Constante d'affinité pour la STF saturée (M^{-1})	Réf.
Lymphoblastoïdes T	60	1×10^8	Larrick et Cresswell (1979b)
Lymphoblastoïdes B	30	1×10^8	
K562 (leucémie)	150	$5,3 \times 10^8$	Klausner et al. (1983)
Choriocarcinomes	370	$4,2 \times 10^8$	Hamilton et al. (1979)
HeLa	278	$3,7 \times 10^7$	Ward et al. (1982)
HepG2 (hépatome)	60	$1,4 \times 10^8$	Dautry-Varsat et al. (1983)
MCF7 (carcinome du sein)	210	1×10^8	Vandewalle et al. (1985)

hépatocytes, qui reconnaît les résidus galactose/N-acétylgalactosamine en position terminale (Debanne et al., 1981).

De même, la déglycosylation enzymatique de la sérotransferrine de Lapin n'influence pas la fixation de la protéine sur les réticulocytes de de l'animal (Léger et al., 1987).

Quelques études ont été réalisées pour préciser la région de la sérotransferrine reconnue par le récepteur en utilisant les fragments N- et C-terminaux obtenus par hydrolyse enzymatique de la sérotransferrine. En milieu hétérologue, Esparza et Brock (1980) montrent que les fragments N- et C-terminaux correspondant respectivement aux lobes N- et C-terminaux de la sérotransferrine bovine se fixent sur les réticulocytes de Lapin. La fixation du fragment N-t est supérieure à celle du fragment C-t mais plus faible que la fixation de la sérotransferrine intacte. Néanmoins contrairement au fragment N-terminal, le fragment C-terminal garde sa capacité de livrer le fer à la cellule. Ces auteurs émettent l'hypothèse que le segment N-terminal interviendrait plus particulièrement dans la première phase de l'interaction transferrine-récepteur. Le lobe C-terminal stabiliserait cette interaction et conduirait à l'internalisation du complexe sérotransferrine-récepteur.

Récemment, Bali et al. (1990) ont démontré que l'interaction de la sérotransferrine avec son récepteur isolé augmentait, à pH acide, la libération du fer de la sérotransferrine.

De plus, selon Brock et Rankin (1981), la libération du fer à partir des fragments monoferriques de la sérotransferrine bovine est plus lente qu'à partir de la protéine intacte. Ceci expliquerait que, contrairement à la sérotransferrine native, les fragments N- et C-terminaux sont incapables de stimuler la prolifération cellulaire de lymphocytes activés (Brock et Rankin, 1981).

Afin de mieux comprendre les interactions transferrine-récepteur, différentes études ont été réalisées sur l'interaction de l'ovotransferrine avec son récepteur. Ainsi, Oratore et al. (1989), Brown-Mason et Woodworth (1984) montrent que les lobes N- et C-terminaux isolés, obtenus par hydrolyse tryptique de l'ovotransferrine, ne sont pas reconnus par le récepteur de la sérotransferrine présent sur les réticulocytes embryonnaires de Poulet. Cependant, quand les deux lobes, réassociés ou non en un complexe non covalent N-t/C-t, sont présents, la fixation des fragments a lieu (Brown-Mason et al., 1984, 1987; Oratore et al., 1989). Ces auteurs concluent que le récepteur de l'ovotransferrine doit posséder des sites de fixation pour le récepteur, à la fois dans les lobes N- et C-terminaux. De plus, par des expériences d'iodination des fragments N- et C-terminaux, Mason et Brown (1987) soulignent l'importance d'un résidu tyrosyl dans le lobe C-terminal de l'ovotransferrine qui interviendrait dans la reconnaissance de la protéine avec son récepteur.

Des modifications structurales du récepteur peuvent également engendrer des changements dans la reconnaissance de la protéine. Ainsi, le récepteur de la sérotransferrine synthétisé par les cellules K562 cultivées en présence de tunicamycine est dépourvu de N-glycannes. Ce récepteur déglycosylé fixe toujours la sérotransferrine, mais avec une affinité plus faible que le récepteur glycosylé (Hunt et al., 1989a). Enns et Williams (1991) démontrent, par mutagenèse dirigée au niveau des sites de glycosylation du récepteur de la sérotransferrine, qu'une simple ou une double mutation sur Asn 251 et/ou Asn 317 qui induit l'absence de glycosylation, n'affecte pas le transport du récepteur dans la cellule ou sa capacité à fixer la sérotransferrine. Cependant, si la mutation a lieu sur le troisième site

de glycosylation (Asn 727), la mobilité du récepteur est diminuée et la capacité de fixation est réduite.

La déphosphorylation et l'acylation du récepteur n'ont aucun effet apparent sur l'interaction du récepteur avec la sérotransferrine (Hunt et al., 1989 b; Jing et Trowbridge, 1990). Cependant, l'hyperphosphorylation du récepteur induite par les esters de phorbol entraîne une rapide internalisation de ce récepteur (Klausner et al., 1984; May et al., 1985).

III- LES RECEPTEURS DE LA LACTOTRANSFERRINE

Tenant compte des rôles biologiques joués par la lactotransferrine, la fixation de la lactotransferrine humaine a été étudiée, en particulier, sur les cellules intervenant dans la défense immunitaire (macrophages, lymphocytes activés) et sur les cellules impliquées dans l'absorption intestinale du fer (entérocytes).

A- INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC LES CELLULES DU SYSTEME RETICULO-ENDOTHELIAL

De nombreux auteurs ont déjà étudié in vitro le nombre et l'affinité des sites de fixation de la lactotransferrine à la surface des macrophages péritonéaux et alvéolaires de différentes espèces animales (Tableau II, p.55). Dans l'ensemble, ces résultats montrent que la capacité de fixation de la lactotransferrine sur ces cellules est élevée (comprise entre 2 et 50×10^6 sites par cellule). En revanche, l'affinité est faible et les constantes de dissociation sont comprises entre 10^{-6} et 10^{-7} M (Birgens, 1991).

Tableau II : Paramètres de fixation de la lactotransferrine humaine sur les macrophages et les monocytes humains et murins.

Réf.	Type cellulaire	Sites/cellule ($\times 10^6$)	K_d (nM)
Markowitz <u>et al.</u> 1979	Macrophages alvéolaires murins	2	-
van Snick et et Masson 1976	Macrophages péritonéaux murins	22	1500
Imber et Pizzo 1983	Macrophages péritonéaux murins	-	28
Campbell 1982	Macrophages alvéolaires humains	54	1700
Goavec <u>et al.</u> 1985	Macrophages alvéolaires humains	12	500
Bennett et Davis 1981	Monocytes sanguins. humains	33	1800
Birgens <u>et al.</u> 1983	Monocytes sanguins humains	1,6	4,5
Moguilevski <u>et al.</u> 1985	Monocytes sanguins humains	10	430

Selon van Snick et Masson (1976), Markowetz et al. (1979), la fixation de la lactotransferrine sur les macrophages alvéolaires et péritonéaux de Souris dépendrait de son taux de saturation en fer, le macrophage ayant une plus forte affinité pour la lactotransferrine saturée que pour l'apolactotransferrine. Néanmoins, Goavec et al. (1985) n'ont observé aucune différence de fixation entre ces deux protéines.

Les résultats concernant le rôle respectif des parties glycanique et protéique de la lactotransferrine restent encore très controversés. Plusieurs études ont été réalisées afin de déterminer l'importance de la partie glycanique, en particulier celle du fucose dans la reconnaissance de la lactotransferrine par les macrophages et les cellules de Küppfer. Goavec et al. (1985) observent une inhibition de la fixation de la lactotransferrine sur les macrophages alvéolaires humains par les néoglycoprotéines à fucose et à mannose. Ces auteurs concluent à la possibilité d'une reconnaissance de la lactotransferrine par le récepteur à mannose/fucose/N-acétylglucosamine du macrophage. Cependant Imber et Pizzo (1983) et Moguilevski et al. (1987) n'observent aucune différence, in vivo, entre la clairance par les cellules de Küppfer de la lactotransferrine native et celle de la lactotransferrine défucosylée. Ces auteurs concluent que le fucose n'intervient pas dans la reconnaissance de la lactotransferrine. Toutefois, il convient de préciser que, lors de ces études, la lactotransferrine n'était défucosylée qu'aux deux tiers.

Au Laboratoire, Leclercq (1987) a démontré une fixation de la lactotransferrine sur deux types de récepteurs présents à la surface des macrophages péritonéaux de Souris: un récepteur lectinique à haute affinité ($K_d = 10^{-8}$ M) qui reconnaît le fucose lié en α -1,3 sur le glycanne de la lactotransferrine et un récepteur à faible affinité ($K_d = 10^{-6}$ M) qui reconnaît la partie protéique de la lactotransferrine.

La faible affinité des macrophages pour la lactotransferrine et le nombre de sites élevés ont conduit certains auteurs à suspecter une interaction non-spécifique de la lactotransferrine avec les cellules. La lactotransferrine est une glycoprotéine possédant un pHi très basique et elle pourrait de ce fait interagir avec des groupements anioniques présents à la surface membranaire. Des modifications chimiques de la partie protéique de la lactotransferrine par succinylation ou par carbamylation qui abaisse le pHi de la protéine, provoquent une diminution de l'affinité de la lactotransferrine pour le macrophage (van Snick et Masson, 1976; Moguilevski, 1987). Bennett et al. (1983) et Moguilevski et al. (1987) ont montré que l'ADN membranaire était capable de fixer la lactotransferrine par interaction de type ionique. Après traitement des cellules par des endonucléases, la fixation de la lactotransferrine sur ces cellules est réduite de 50 %. Des protéines très basiques, telles que le lysozyme dimérique, inhibent la fixation de la lactotransferrine sur le macrophage (Moguilevski, 1987). De plus, selon Campbell (1982), l'élastase et la cathepsine G se fixeraient sur le même récepteur macrophagique que celui de la lactotransferrine.

Plus récemment, Mizyazawa et al. (1991) ont démontré également que la lactotransferrine pouvait se fixer sur les macrophages par l'intermédiaire de lipopolysaccharides bactériens accrochés à la surface cellulaire de ces cellules.

Le mécanisme de reconnaissance de la lactotransferrine par le macrophage semble donc encore très controversé. L'ensemble de ces résultats tendent à prouver que la nature de cette interaction pourrait varier en fonction de la localisation tissulaire des macrophages (monocytes circulants, macrophages alvéolaires et péritonéaux).

B- INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC LES HEPATOCYTES

Bien qu'il soit clairement établi que la lactotransferrine injectée par voie intraveineuse soit captée par le foie, la nature des cellules impliquées dans la clairance in vivo de la protéine reste controversée.

Prieels et al. (1978) et Pizzo et al. (1981) ont montré que les hépatocytes possédaient à leur surface un récepteur lectinique capable de reconnaître la lactotransferrine humaine par l'intermédiaire du fucose lié en α 1-3 sur la N-acétylglucosamine terminale. La présence de résidus de galactose en position terminale sur les glycanes de la lactotransferrine a conduit d'autres auteurs à l'hypothèse d'une reconnaissance de la protéine par le récepteur des asialoglycoprotéines (Lehrman et al., 1986).

In vivo, van Snick et al. (1974) et Moguilevski (1987) démontrèrent que le blocage préalable du système réticulo-endothélial par injection de sulfate de dextran diminuait la clairance hépatique de la lactotransferrine humaine. Ce résultat tend à prouver que la lactotransferrine est éliminée de la circulation sanguine par les cellules de Küpffer et non les hépatocytes.

C- INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC LES ENTEROCYTES

Dés 1979, Cox et al. ont démontré in vitro que la lactotransferrine humaine et bovine se fixent sur des biopsies intestinales humaines, mais pas la sérotransferrine humaine. Ces auteurs suggérèrent alors la présence de récepteurs spécifiques de la lactotransferrine à la surface de ces cellules (Tableau III, p.59). Le récepteur de la lactotransferrine a été mis en évidence sur les vésicules de la bordure en brosse de

Tableau III : Caractérisation du récepteur de la lactotransferrine présent à la surface des entérocytes [(1) Mazurier et al., 1985; (2) Hu et al. 1988, 1990; (3) Davidson et Lønnerdal, 1988], de la lignée HT29 [(4) Derisbourg, 1990; (5) Roiron-Lagroux et al., 1989], des lymphocytes activés [(6) Bennett et Davis, 1981; (7) Birgens et al., 1984; (8) Mazurier et al., 1989] et des plaquettes [(9) Leveugle, 1991].

Cellules	Espèce	Masse moléculaire du récepteur (kDa)	K_d (nM)	n nombre de sites	Réf.
ENTEROCYTE	Lapin	100	830	$0,15 \times 10^{14}$ par mg de protéines	1
	Souris	130 (monomère glycosylé)	380	$5,3 \times 10^{14}$ par mg de protéines	2
	Singe	-	9000	-	3
HT29	Homme	-	39	$0,29 \times 10^5$ par cellule	4
HT29-D4		-	408	4×10^6 par cellule	5
LIGNEE LYMPHOCYTAIRE	Homme	-	43	$1,6 \times 10^6$ par cellule	6 et 7
LYMPHOCYTES ACTIVES	Homme	110 (monomère glycosylé)	83	4×10^5 par cellule	8
PLAQUETTES	Homme	105 (monomère glycosylé)	-	-	9

jéjunum de Lapin par Mazurier et al. (1985). Le récepteur fixe la lactotransferrine humaine avec une constante de dissociation de 830 nM et possède une masse moléculaire voisine de 100 kDa. Chez la Souris, le récepteur entérocytaire de la lactotransferrine a été isolé et caractérisé (Hu et al., 1988, 1990). Il reconnaît les lactotransferrines isolées du lait de différents Mammifères avec des affinités semblables et un nombre de sites de $5,3 \cdot 10^{14}$ /mg de protéines.

L'interaction ligand-récepteur dépend de la présence de cations bivalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}) et du pHi du milieu, avec un maximum de fixation à pH 5,5 (Hu et al., 1988). La partie glycanique de la lactotransferrine n'est pas responsable de la reconnaissance de la lactotransferrine par le récepteur entérocytaire. De plus, des protéines basiques, telles que le lysozyme, n'inhibent pas la fixation de la lactotransferrine au récepteur ce qui suggère une interaction de nature spécifique.

Le récepteur entérocytaire murin a été identifié comme une glycoprotéine monomérique de 130 kDa, de pHi 5,8, possédant 12 glycannes bi- et triantennés de type N-acétyllactosaminique (Hu et al., 1990).

Le récepteur de la lactotransferrine a également été mis en évidence sur les entérocytes de Singe, mais, contrairement au récepteur murin, ce récepteur est de nature lectinique et reconnaît en particulier le fucose lié sur le glycanne de la lactotransferrine humaine (Davidson et Lønnerdal, 1988). La lactotransferrine humaine et de Singe sont reconnues avec la même affinité et l'affinité du récepteur est plus forte pour la lactotransferrine humaine diferrique que pour la protéine partiellement saturée.

Ces résultats tendent à démontrer que des différences peuvent exister suivant les espèces étudiées.

Quelques études ont également été réalisées sur des lignées entérocytaires en culture telles que les cellules HT29, dérivées d'un adénocarcinome humain du colon, capables de se différencier en entérocytes. La lactotransferrine humaine apo et saturée se fixent avec la même constante de dissociation ($K_d = 39 \times 10^{-9}$ M) sur les cellules HT29 différenciées, âgées de 20 jours avec un nombre de sites de 29.000 sites par cellule. Contrairement au récepteur de la sérotransferrine, le récepteur de la lactotransferrine est absent des cellules HT29 indifférenciées (Derisbourg et al., 1990). Roiron-Lagroux et al. (1989), observe une fixation de la lactotransferrine sur une sous-lignée HT29-D4 avec une constante plus faible que la lignée souche HT29, de l'ordre de 408×10^{-9} M et un nombre de sites de 4×10^6 sites par cellule.

D- INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC LES LYMPHOCYTES

La fixation de la lactotransferrine a été observée à la surface de sous-populations de lymphocytes B isolés du sang humain, avec une constante de dissociation qui varie selon les auteurs de $0,76 \times 10^{-6}$ M (Bennett et Davis, 1981; Bennett et al., 1983) à $4,3 \times 10^{-8}$ M (Birgens et al., 1984) et un nombre de sites élevé, variant de $1,9 \times 10^6$ à $2,5 \times 10^6$ sites par cellule. Selon Birgens et al. (1984), ces différences concernant l'affinité de la lactotransferrine pour ces cellules peuvent s'expliquer, d'une part, par l'hétérogénéité des préparations cellulaires et, d'autre part, par les concentrations en lactotransferrine. En effet, Birgens et al. (1984) utilisent des concentrations en lactotransferrine humaine comprises entre 10^{-7} et 10^{-9} M, alors que Bennett et al. (1983)

travaillent à des concentrations élevées de 10^{-7} M et n'observent qu'une fixation de faible affinité.

Par immunofluorescence et par cytofluorimétrie, Butler et al. (1990) mirent en évidence la présence de lactotransferrine à la surface de différentes préparations lymphocytaires de type B, issues de différents types de leucémies représentatives des stades de la maturation cellulaire. Ces auteurs constatèrent que le taux de lactotransferrine détecté à la surface des lymphocytes B immatures était élevé, puis diminuait chez les pré-plasmocytes. Ces résultats suggèrent que l'expression de la lactotransferrine à la surface des lymphocytes B est fonction de la maturation cellulaire. Néanmoins, aucun récepteur de la lactotransferrine n'a, jusqu'à présent, été identifié sur ces cellules.

Le récepteur de la lactotransferrine a été plus particulièrement étudié sur les lymphocytes T. En 1984, Gnezditskaya et al. démontrent par immunofluorescence qu'une sous-population de lymphocytes du thymus humain fixe spécifiquement la lactotransferrine. La préincubation des lymphocytes T avec l'adénosine et la théophylline qui augmentent la concentration intracellulaire d'AMPc, provoque également une augmentation de la fixation de la lactotransferrine. Birgens et al. (1984) observent une fixation plus importante de la lactotransferrine sur les lignées lymphoblastiques et myéloblastiques que sur les lymphocytes T au repos isolés du sang. Néanmoins, l'affinité de ces cellules pour la lactotransferrine est identique. Yamada et al. (1987) montrent également que les cellules leucémiques K562 fixent de façon spécifique la lactotransferrine humaine. Contrairement au récepteur de la sérotransferrine, le récepteur de la lactotransferrine des cellules K562 n'est pas régulé par le taux de fer intracellulaire mais est fonction de la prolifération cellulaire.

Au Laboratoire, Mazurier et al. (1989) ne détectent aucune fixation spécifique de la lactotransferrine sur les lymphocytes T non activés. En effet, le récepteur de la lactotransferrine n'apparaît à la surface des lymphocytes T humains qu'après stimulation par un mitogène comme la phytohémagglutinine qui induit une biosynthèse de récepteurs de la lactotransferrine. L'apolactotransferrine et la lactotransferrine saturée sont reconnues par le récepteur avec la même affinité ($K_d = 80 \times 10^{-9}$ M) et un nombre de sites élevé compris entre 2×10^5 et 4×10^5 sites par cellule (Tableau III, p.59). La fixation de la lactotransferrine sur les membranes de lymphocytes solubilisées montre que 60% des récepteurs sont intracellulaires. Le récepteur lymphocytaire de la lactotransferrine a été visualisé par immuno-électrotransfert du lysat membranaire et reconnaissance par de la lactotransferrine marquée à ^{125}I dans des conditions non dénaturantes. Le récepteur associé à la lactotransferrine a été isolé par chromatographie d'affinité sur colonne d'anticorps anti-lactotransferrine et présente, en électrophorèse sous la forme de deux bandes protéiques de 100 et 110 kDa (Mazurier et al., 1989). La présence de deux bandes peut être la conséquence de la maturation du récepteur au cours de sa biosynthèse. Cependant, la sensibilité du récepteur de la lactotransferrine aux enzymes protéolytiques ne peut pas être exclue, même en présence d'inhibiteurs de protéases.

Récemment, le récepteur de la lactotransferrine a également été mis en évidence dans le milieu de culture de lymphocytes humains activés pendant trois jours. Après une préincubation du lysat en présence de lactotransferrine, le complexe récepteur-lactotransferrine a été isolé par chromatographie d'affinité sur colonne d'anticorps anti-lactotransferrine. Le récepteur est, sous sa forme soluble, une glycoprotéine monocaténaire de masse moléculaire apparente de 100 kDa. La différence de masse moléculaire (5 kDa) entre les récepteurs membranaires et

solubles correspondrait à la zone intracytoplasmique du récepteur (Leveugle, 1991). Le récepteur est N-glycosylé, les glycannes sont de type N-acétylactosaminique et sont liés au domaine extracellulaire du récepteur.

A partir du récepteur soluble lymphocytaire isolé, un anticorps a été préparé au Laboratoire par B. Leveugle (1991). Cet anticorps permettra de mettre en évidence des récepteurs de la lactotransferrine sur différentes cellules normales et cancéreuses. Cet anticorps sera utilisé par la suite dans notre travail.

La séquence en acides aminés de courts peptides a été déterminée au Laboratoire en collaboration avec le Laboratoire d'Ingénierie des Protéines de Saclay et devrait permettre d'obtenir des sondes nucléotidiques qui serviront à cloner l'ADNc du récepteur de la lactotransferrine. Ces travaux sont actuellement en cours au Laboratoire.

E- INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC LES PLAQUETTES SANGUINES

Un récepteur spécifique de la lactotransferrine a été identifié à la surface des plaquettes sanguines humaines (Leveugle, 1991). Il possède les mêmes caractéristiques structurales et immunologiques que le récepteur lymphocytaire. Il s'agit d'une protéine N-glycosylée d'une masse moléculaire de 105 kDa.

F- INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC LES BACTERIES ET LES PARASITES

Le fer est un nutriment essentiel pour les bactéries et les parasites. La plupart des bactéries pathogènes peuvent synthétiser et sécréter des sidérophores, capables de capturer le fer fixé aux transferrines. Récemment, de nombreuses études ont démontré que les bactéries et les parasites possédaient également le récepteur de la lactotransferrine. La lactotransferrine humaine se fixe sur toutes les souches de *Neisseria* (Schryvers et al., 1988, Schryvers et Lee, 1989; Lee et Schryvers, 1988). L'addition de $FeCl_3$ dans le milieu de culture inhibe la capacité de fixation de la lactotransferrine, suggérant ainsi que l'expression du récepteur est régulée par la quantité de fer disponible dans le milieu de culture. Le récepteur de la lactotransferrine humaine présent sur les souches de *Neisseria* a été identifié à une protéine de 105 kDa (Schryvers, 1989; Griffiths et al., 1990). Deux protéines membranaires de 105 et 106 kDa capables de fixer spécifiquement la lactotransferrine humaine ont également été isolées à partir de lysats membranaires d' *Haemophilus influenzae* (Schryvers, 1989).

Par ailleurs, la fixation de la lactotransferrine a également été observée à la surface membranaire de bactéries pathogènes telles que *Bordetella pertussis* (Redhead et Hill, 1989) et de *Staphylocoques* (Naidu et al., 1990).

Le récepteur a été identifié sur le parasite *Trichomonas vaginalis* sous la forme de deux protéines membranaires de 178 et 75 kDa (Kenneth et Alderete, 1984).

Un second rôle a été attribué à l'interaction de la lactotransferrine

avec les parasites. Selon Lima et Kierszenbaun (1985), l'interaction de la lactotransferrine avec Trypanozoma cruzi facilite la phagocytose de ces parasites par les monocytes. La lactotransferrine jouerait le rôle de pontage entre les différents éléments cellulaires.

IV- CONCLUSION

Le récepteur de la sérotransferrine a été identifié sur un grand nombre de cellules normales et cancéreuses. La structure, la régulation de l'expression et la signification biologique de ce récepteur sont parfaitement connues.

Le récepteur de la lactotransferrine a été partiellement caractérisé sur les lymphocytes humains activés, les entérocytes et les plaquettes. La fixation de la lactotransferrine sur les macrophages semble être de nature non-spécifique.

Le rôle principal de la sérotransferrine est de livrer son fer à la cellule par un mécanisme d'endocytose, celui de la lactotransferrine reste encore obscur.

MECANISME DE CAPTURE DU FER PAR LES CELLULES

Le rôle principal de la sérotransferrine est de livrer le fer aux cellules. Actuellement deux mécanismes de capture du fer fixé à la sérotransferrine, ont été mis en évidence:

- Le premier repose sur l'internalisation du fer par l'endocytose du complexe sérotransferrine-récepteur;
- Le second consiste en la libération du fer de la sérotransferrine à la surface cellulaire, suivi de sa capture par la cellule.

Contrairement à la sérotransferrine, les études concernant l'internalisation de la lactotransferrine et de son fer restent limitées et n'ont porté que sur deux types cellulaires: les macrophages et les cellules entérocytaires.

Dans ce chapitre, nous rappellerons dans un premier temps les différents mécanismes d'endocytose de molécules.

I- LES MECANISMES DE L'ENDOCYTOSE

A- DEFINITION DE L'ENDOCYTOSE

Les macromolécules et les particules biologiques pénètrent dans la cellule par un mécanisme appelé endocytose. On distingue trois types d'endocytose (Fig.11, p.69) décrites dans de nombreuses revues générales (Pastan et Willingham, 1983, 1985; Geisow, 1980; Mellman, 1984; Dautry-Varsat et Lodish, 1984):

- La phagocytose ou l'internalisation de particules de grandes tailles, comme les bactéries, qui se fixent à la surface cellulaire et induisent la formation de vésicules formées par l'invagination de la membrane plasmique.

- La pinocytose ou endocytose en phase fluide qui est un processus non-spécifique par lequel la cellule prélève du liquide extracellulaire dans lequel des molécules sont dissoutes.

- L'endocytose par l'intermédiaire d'un récepteur ou endocytose en phase adsorptive, mécanisme spécifique qui implique l'interaction spécifique d'un ligand avec son récepteur. La fixation du ligand déclenche l'invagination de la membrane, puis la formation d'une vésicule dans laquelle est inclus le ligand qui pénètre ainsi dans la cellule.

B- LA DESTINÉE DU COMPLEXE LIGAND-RECEPTEUR

De nombreux ligands tels que les hormones, les facteurs de croissance, les lectines, les toxines, les anticorps et les particules virales pénètrent dans la cellule par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

De nombreux travaux ont permis de mieux connaître les différents mécanismes d'internalisation du complexe ligand-récepteur et sa destinée dans la cellule (Dautry-Varsat et Lodish, 1984; Wileman et al., 1985; Warren et al., 1988; Shepherd, 1989; Dunn et Maxfield, 1990).

Après fixation des ligands aux récepteurs, les complexes sont regroupés au niveau de zones particulières de la membrane plasmique, appelées "puits recouverts" et entourées d'un réseau de clathrine (coated-pits) (Pastan et Willingham, 1981; Willingham et Pastan, 1984). Le puits recouvert est alors transporté dans la cellule et perd son revêtement de clathrine pour former un endosome ou réceptosome (Helenius et al., 1983; Pastan et Willingham et al., 1983, 1985; Robinson, 1987). La formation de l'endosome est bloquée par les basses températures ou par des inhibiteurs du cytosquelette tels que la

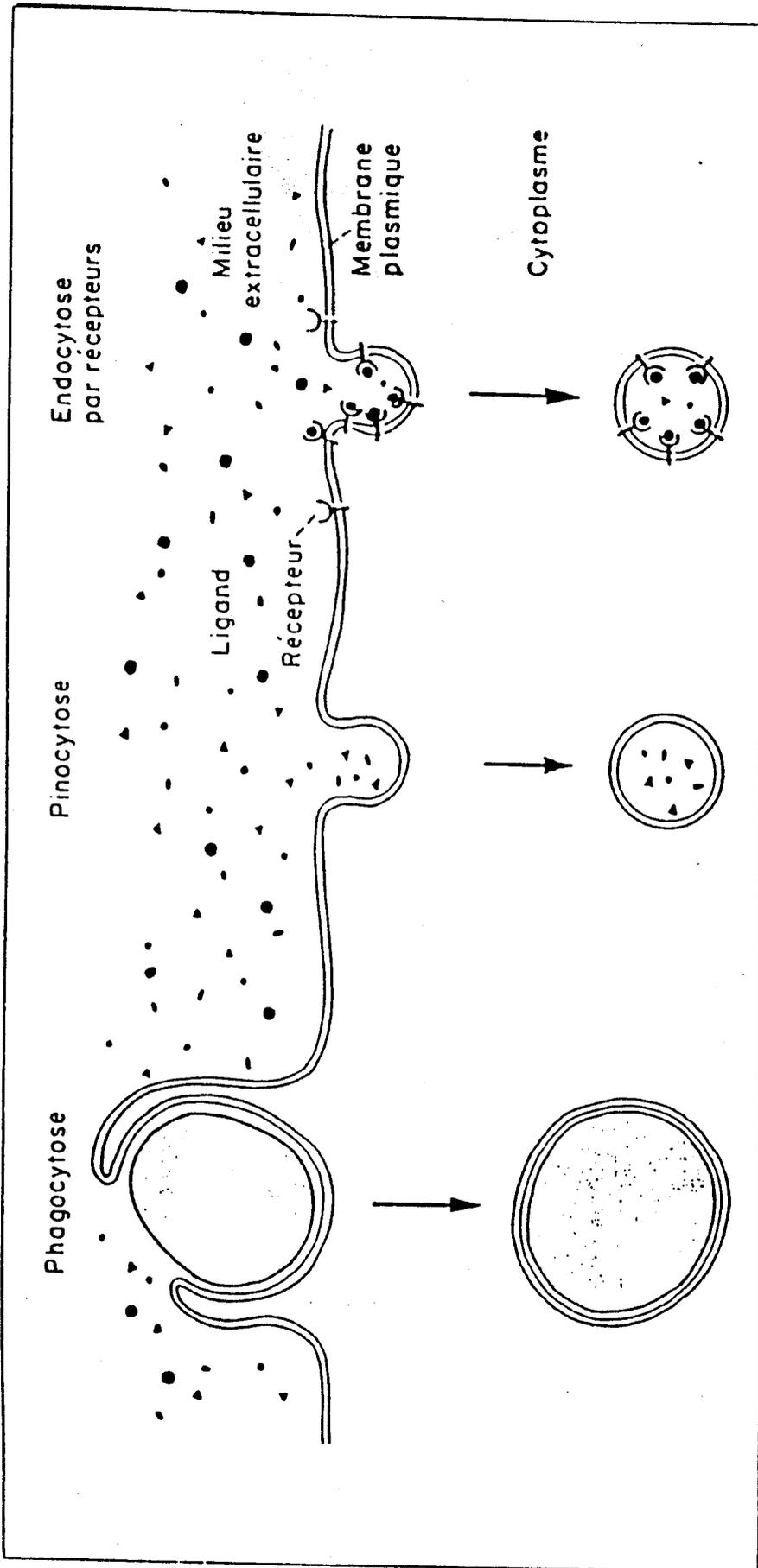


Figure 11 : Les mécanismes d'internalisation de molécules contenues dans le milieu extracellulaire (Dautry-Varsat et Lodish, 1984).

colchicine ou par des inhibiteurs de la production d'énergie cellulaire tels que l'azide (Anderson et al., 1977; Wall et al., 1980). Après dépolymérisation de la clathrine, une pompe à protons ATP-dépendante provoque l'acidification de l'endosome (Tycko et Maxfield, 1982; Helenius et al., 1983; Xie et Stone, 1986).

Le complexe ligand-récepteur, une fois dans l'endosome, peut suivre plusieurs destinées, suivant la nature de la molécule fixée. On distingue essentiellement 4 voies (Fig.12, p.71):

- Dans la première voie (Fig.12 a), le ligand se dissocie du récepteur sous l'effet du pH acide de l'endosome, puis est dirigé vers les lysosomes où il est dégradé. Les récepteurs, restés fixés à la membrane de la vésicule, sont rassemblés dans la partie tubulaire de l'endosome, puis recyclés à la surface cellulaire. Ce mécanisme a été décrit dans le cas des LDL et des asialoglycoprotéines (Goldstein et Brown, 1984; Goldstein et al., 1985; Geuze et al., 1983).

- Dans la seconde voie (Fig.12 b), le récepteur et le ligand sont tous deux recyclés au niveau de la membrane. C'est le cas de la sérotransferrine qui perd son fer à pH acide, mais reste fixée à son récepteur (Dautry-Varsat et al., 1983; Dautry-Varsat et Lodish, 1983; Dautry-Varsat, 1986).

- La troisième voie possible est illustrée par la figure 12 c. Après fusion de l'endosome avec les lysosomes, le récepteur et son ligand sont dégradés, comme pour l'EGF (Carpenter et Cohens, 1979; Hanover et al., 1984; Pastan et Willingham 1985).

- Enfin, la quatrième voie (Fig. 12 d) est spécifique des cellules polarisées telles que les cellules endothéliales et épithéliales. Le complexe ligand-récepteur peut être transporté d'un pôle à l'autre de la cellule (transcytose). Ce mécanisme a été démontré en particulier pour les immunoglobulines (Mostov et Blobel, 1983) et l'insuline (King et Johnston, 1985).

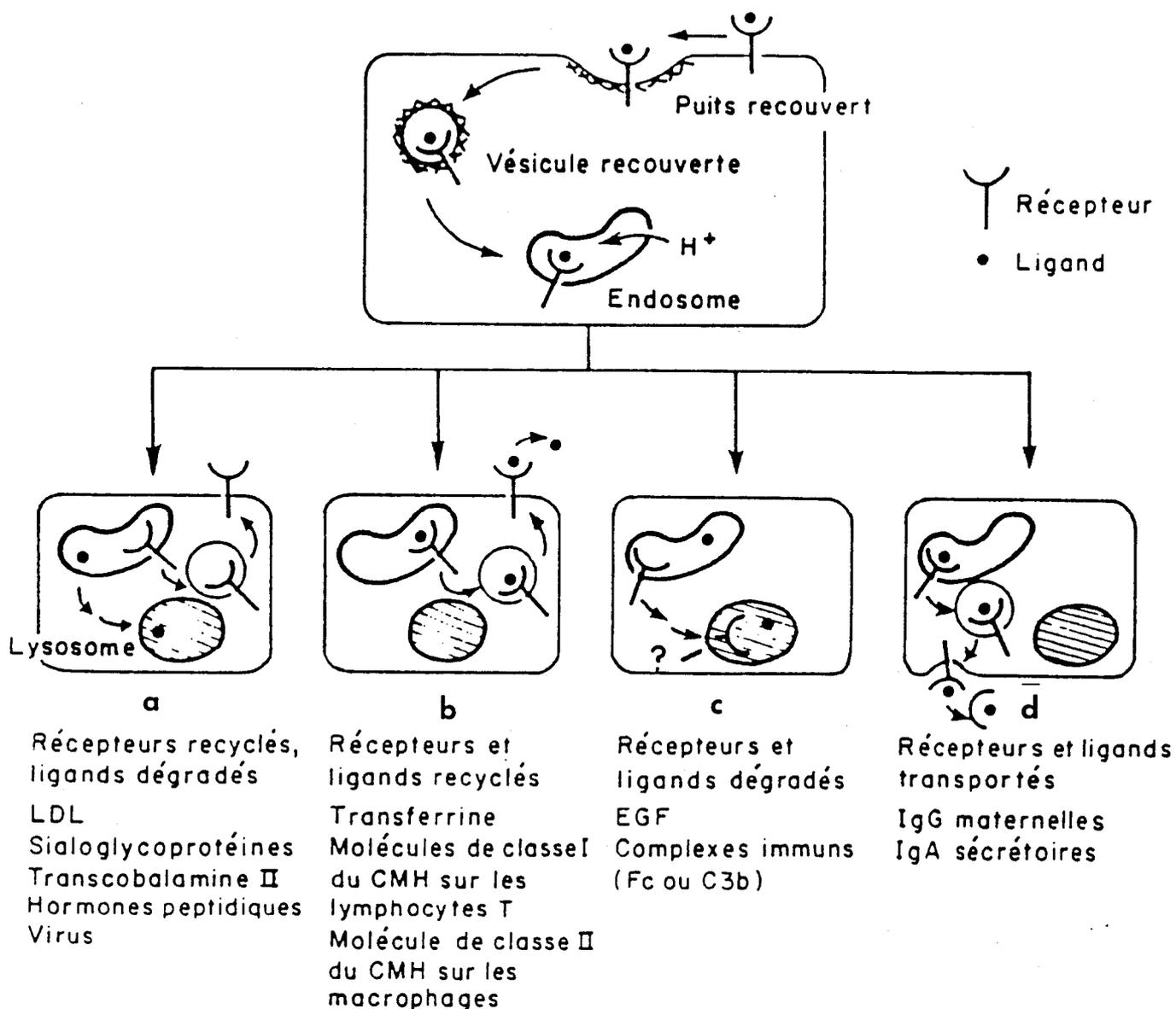


Figure 12 : Diversité de la destinée intracellulaire des ligands et de leurs récepteurs (Goldstein et al., 1985).

LDL : Low Density Lipoprotein; CMH : Complex Major Histocompatibility

EGF : Epidermal Growth Factor

II- CAPTURE DU FER DE LA SEROTRANSFERRINE PAR LES CELLULES

A- ENDOCYTOSE DU COMPLEXE SEROTRANSFERRINE-RECEPTEUR

L'hypothèse de l'endocytose de la sérotransferrine a été proposée dès 1969 par Morgan et Appleton, puis confirmée en 1977 par Hemmaplardh et Morgan. De nombreuses études ont été réalisées sur des cellules animales (Octave et al., 1983) et sur des cellules humaines en culture, notamment HepG2 et K562 (Ciechanover et al., 1983; Dautry-Varsat et al., 1983; Klausner et al., 1983; Dickson et al., 1983). Plusieurs revues générales ont été consacrées à l'étude du mécanisme de l'endocytose sérotransferrine-récepteur: Dautry-Varsat et Lodish (1984), Pastan et Willingham (1985), Wileman et al. (1985), Dautry-Varsat (1986), Crichton et Charlotteau-Wauters (1987).

Contrairement à d'autres ligands, la sérotransferrine n'est ni dégradée, ni stockée dans la cellule. Le cycle intracellulaire de la sérotransferrine est représenté dans la figure 13 (p.73).

A pH neutre, la sérotransferrine diférique se fixe avec une forte affinité à son récepteur et le complexe ligand-récepteur est endocyté dans un puits recouvert. Dans l'endosome, sous l'effet du pH acide, le fer est libéré de la sérotransferrine, puis transporté jusqu'à la ferritine cytoplasmique par un mécanisme inconnu. En outre, à pH acide, l'aposérotransferrine reste fixée à son récepteur et le complexe est recyclé à la surface cellulaire. A pH neutre, pH du milieu extracellulaire, l'affinité du récepteur pour l'aposérotransferrine est faible et le complexe ligand-récepteur se dissocie. L'aposérotransferrine, libérée dans le milieu peut fixer à nouveau deux ions ferriques et le récepteur membranaire peut être réutilisé.

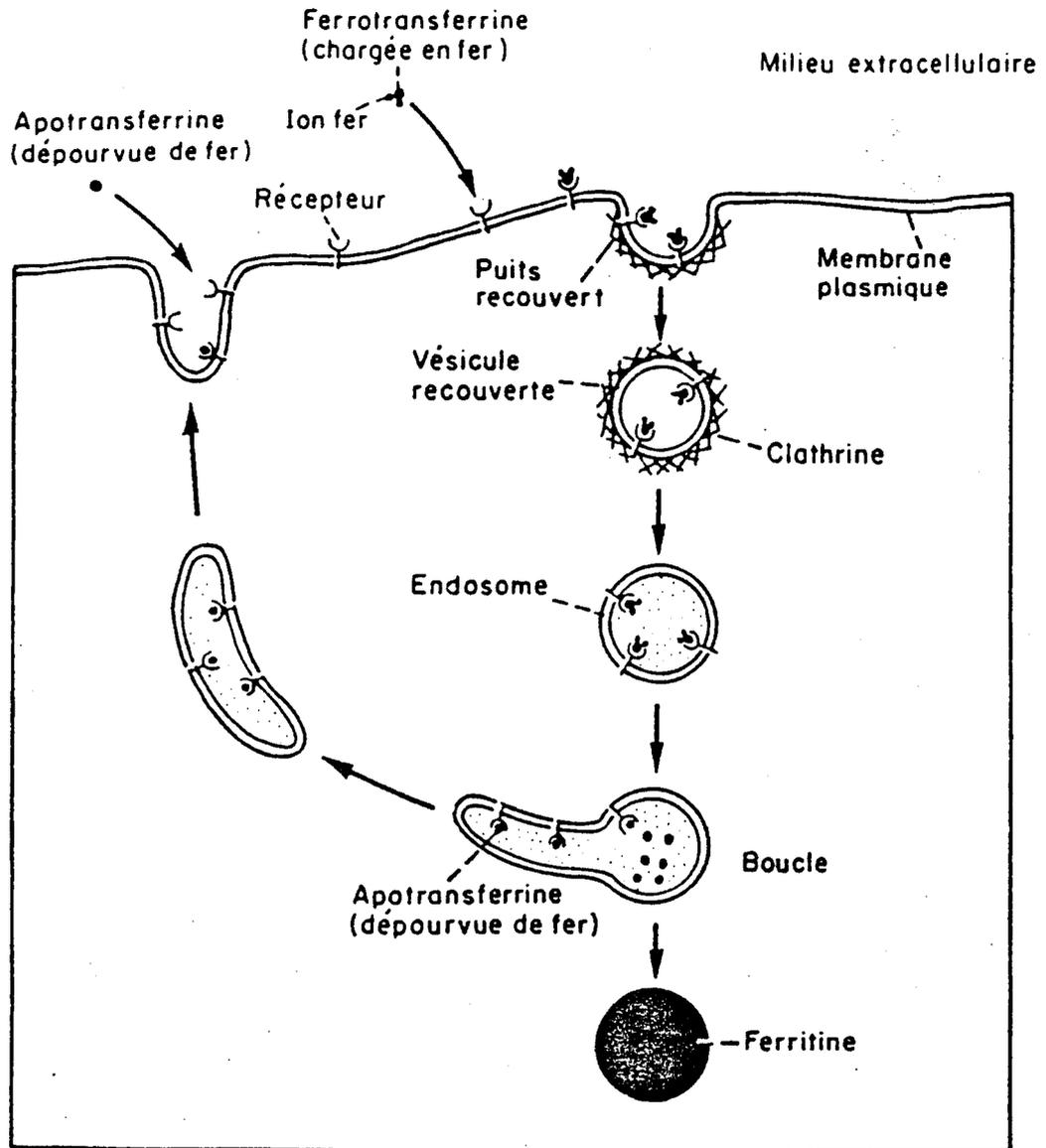


Figure 13 : Endocytose de la sérotransferrine et recyclage de son récepteur (Dautry-Varsat et Lodish, 1984).

Le cycle de la sérotransferrine est très rapide et ne dure que 15 à 20 min. Il peut être répété au moins 300 fois avant la dégradation du récepteur. La cellule est capable de capter, en fonction du nombre de récepteurs présent à la surface cellulaire, environ 19.000 ions ferreux/min en quelques heures.

B- LIBERATION DU FER DE LA SEROTRANSFERRINE A LA SURFACE CELLULAIRE

Le second modèle proposé repose sur la libération du fer de la sérotransferrine au niveau de la membrane plasmique, suivi de son transfert dans la cellule (Fig.14, p.75). Ce mécanisme a été mis en évidence chez les hépatocytes (Batey et al., 1980; Morley et al., 1983; Morley et Bezkorovainy, 1985; Cole et Glass, 1983; Thorstensen, 1988; Thorstensen et Romslo 1988), les cellules HeLa (Löw et al., 1986; Sün et al., 1987b) et les réticulocytes (Glass et al., 1980; Nunez et al., 1985).

Après interaction de la sérotransferrine avec son récepteur, le fer ferrique de la sérotransferrine est réduit en fer ferreux, puis dissocié de la protéine. L'introduction dans le milieu extérieur de chélateurs de fer, tels que le sulfonate de bathophénantroline, permet d'étudier la libération du fer fixé à la sérotransferrine (Navas et al., 1986; Löw et al., 1986; Sün et al., 1987).

La NADH oxydoréductase, enzyme présente dans la membrane plasmique, est responsable de la réduction du fer ferrique (Sün et al., 1987a,b; Thorstensen, 1988; Thorstensen et Romslo, 1990; Löw et al., 1986; Crane et al., 1990.). Cette réaction s'accompagne d'une oxydation en NAD^+ du NADH cytosolique qui joue le rôle d'accepteur d'électrons et d'une libération d'ions H^+ dans le milieu extérieur par l'intermédiaire de l'antiport Na^+/H^+ (Sün et al., 1987a; Crane et al., 1990).

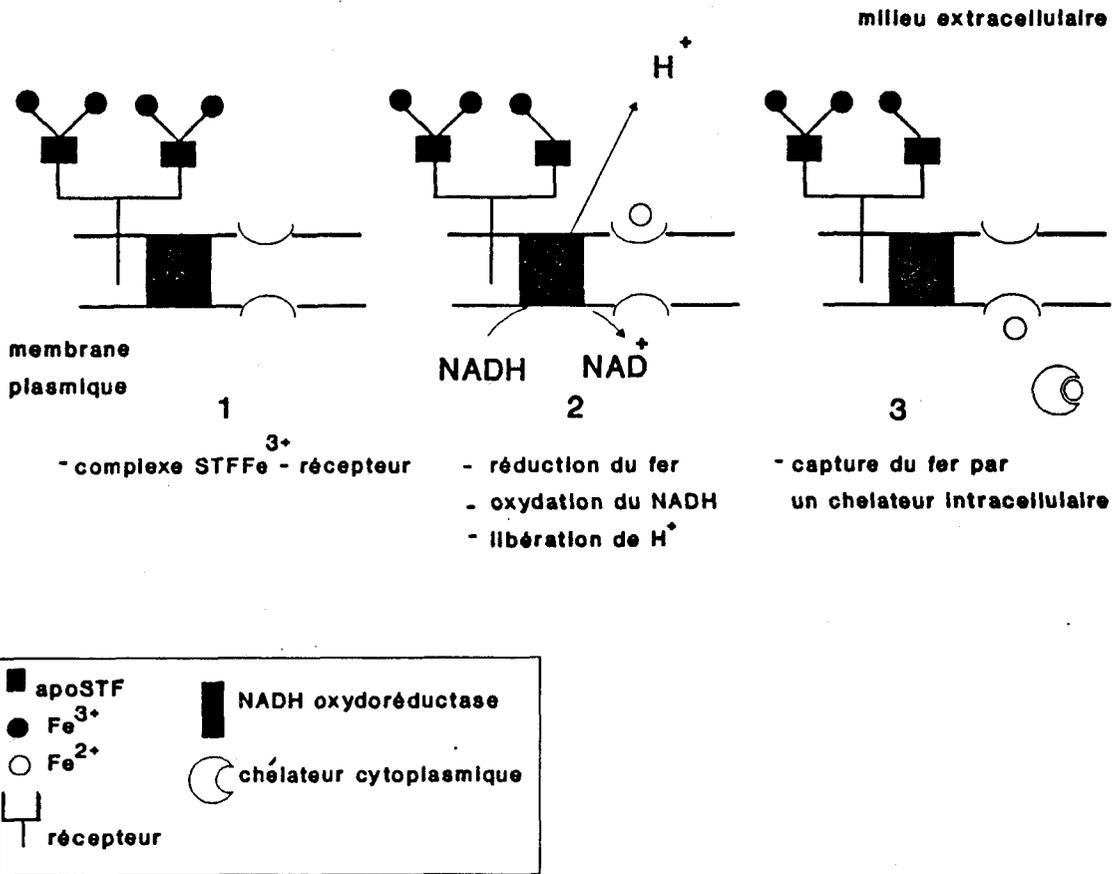


Figure 14 : Schéma de la libération du fer de la sérotransferrine par un mécanisme d'oxydoréduction et de sa capture par les cellules (Thorstensen, 1988; Thorstensen et Romslo, 1988).

Le fer réduit, dissocié de la sérotransferrine, peut traverser la membrane plasmique des hépatocytes par un mécanisme inconnu, puis est transporté jusqu'à la ferritine par un chélateur cytoplasmique (Morley et Bezkorovainy, 1985; Thorstensen et Romslo 1988; Thorstensen, 1988). Selon ces auteurs, dans les hépatocytes, la majeure partie du fer de la sérotransferrine serait captée par ce mécanisme d'oxydoréduction et une fraction mineure par la voie de l'endocytose. Au contraire, dans les réticulocytes, l'endocytose est le mécanisme principal de capture du fer.

Par ailleurs, De Jong et al. (1990) suggèrent qu'une partie du fer libéré pourrait être réoxydée dans le milieu extérieur en présence d'oxygène, puis recaptée par la sérotransferrine circulante. Le rôle majeur de ce mécanisme ne serait plus de livrer le fer à la cellule mais de réguler, d'une part, la distribution du fer entre les molécules de sérotransferrine circulantes et, d'autre part, la prolifération cellulaire en intervenant dans les réactions d'oxydoréductions membranaires.

III- L'ENDOCYTOSE DE LA LACTOTRANSFERRINE

Les études concernant l'endocytose de la lactotransferrine et de son fer sont limitées à deux types cellulaires: les cellules entérocytaires d'adénocarcinome humain HT29 (Derisbourg, 1990; Roiron-Lagroux et Figarella, 1990) et les macrophages alvéolaires et péritonéaux (van Snick et Masson, 1976; van Snick et al., 1977; Markowitz et al., 1979).

La lactotransferrine, après s'être fixée spécifiquement sur les récepteurs de la bordure en brosse des cellules HT29 différenciées, pénètre dans la cellule par un mécanisme d'endocytose en phase adsorptive (Derisbourg, 1990). Néanmoins, contrairement, à la sérotransferrine qui est recyclée, la lactotransferrine est dégradée dans

les lysosomes et les produits de dégradation sont retrouvés dans le milieu extérieur. L'hydrolyse de la lactotransferrine est inhibée par la monensine, ionophore carboxylique, qui neutralise la pompe ATP-H⁺ dépendante. La chloroquine inhibe également la fonction des hydrolases acides des lysosomes en neutralisant le pH intralysosomique, empêchant ainsi la dégradation de la lactotransferrine.

Cependant, Roiron-Lagroux et Figarella (1990), sur un sous-clone de HT29 appelé HT29-D4, n'observent aucune internalisation de la lactotransferrine dans ces cellules. La lactotransferrine reste fixée à la surface cellulaire.

Aucune étude n'a été réalisée sur le devenir du fer fixé à la lactotransferrine dans ces lignées cellulaires.

Par marquage au ⁵⁹Fe, van Snick et al. (1977), Markowitz et al. (1979) et Moguilevski (1987) démontrent que les macrophages alvéolaires et péritonéaux de Souris capturent préférentiellement le fer de la lactotransferrine plutôt que celui de la sérotransferrine. Les cellules fixent et internalisent de la même façon la lactotransferrine saturée ou l'apolactotransferrine. Le fer est accumulé par la cellule à un taux constant de $0,19 \cdot 10^9$ atomes/cellule/heure, puis stocké dans la ferritine intracellulaire. L'apolactotransferrine, plus sensible à la protéolyse que la lactotransferrine saturée, est dégradée rapidement ($t_{1/2} = 5$ à 8 h). Selon, Moguilevski (1987), la dégradation de la lactotransferrine dans les lysosomes est la condition nécessaire au relargage du fer, le pH acide de l'endosome étant insuffisant pour provoquer sa libération. Un modèle de capture du fer de la lactotransferrine par le macrophage a été proposé par Moguilevski en 1987 (Fig.15, p.78).

Récemment, par microscopie électronique et en utilisant des anticorps anti-lactotransferrine couplés à des grains d'or, Sato et al. (1990) ont démontré que les lymphocytes B circulants, cultivés en

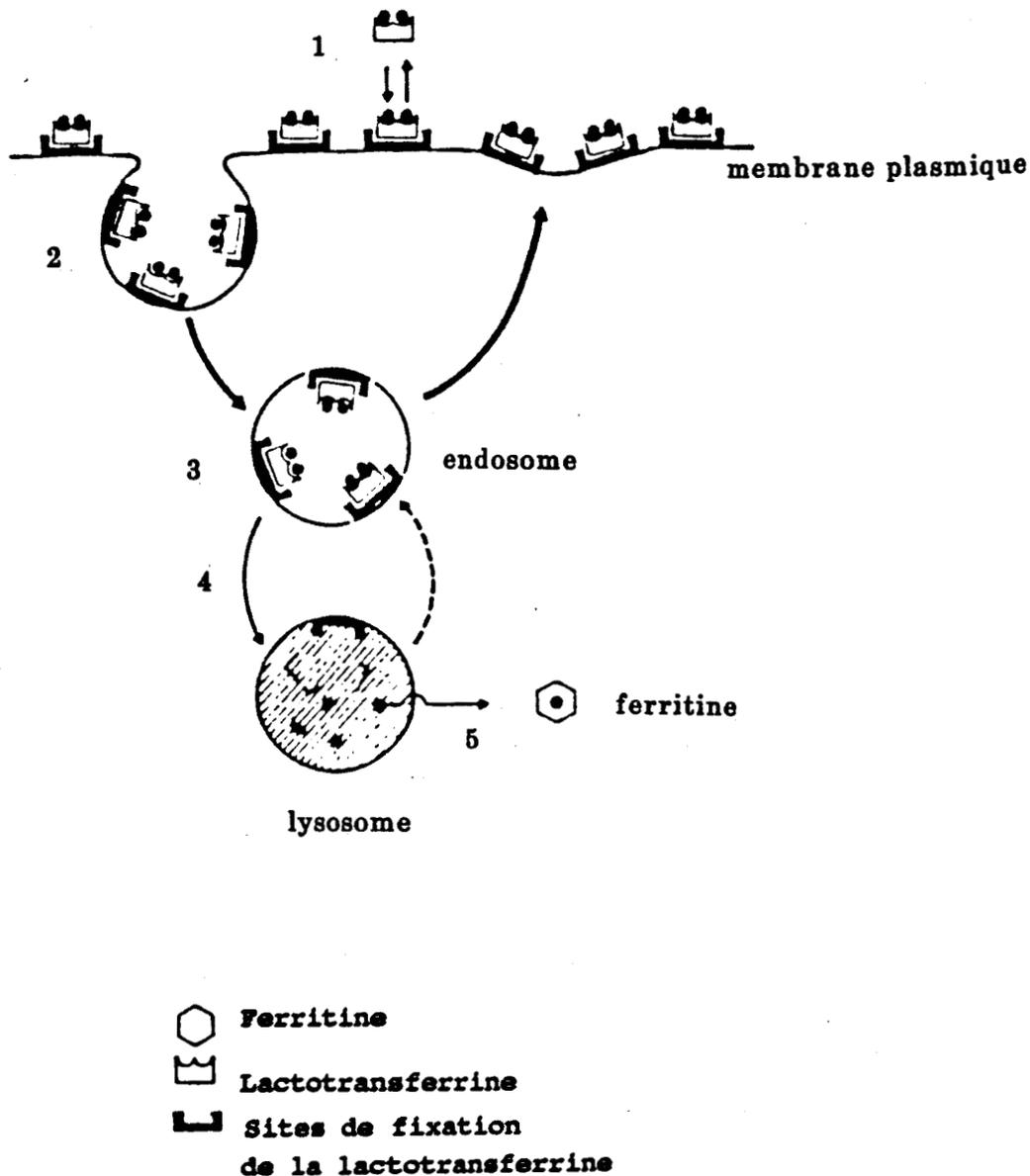


Figure 15 : Endocytose de la lactotransferrine dans les macrophages (Moguilevski, 1987).

présence de lactotransferrine humaine, capturaient, puis sécrétaient la lactotransferrine dans le milieu extérieur. Néanmoins, aucune étude quantitative sur l'internalisation de la lactotransferrine n'a été réalisée sur ces cellules. Ces auteurs ne précisent pas si la lactotransferrine libérée est encore intacte et si elle a conservé son fer.

IV- CONCLUSION

Toutes les études sur l'endocytose de la sérotransferrine démontrent clairement que le rôle majeur de cette protéine est de livrer le fer à la cellule. Deux mécanismes ont pu être mis en évidence : l'endocytose du complexe récepteur-ligand et la réduction du fer à la surface cellulaire. Suivant la cellule, l'un ou l'autre de ces mécanismes est privilégié.

Les résultats concernant l'étude du mécanisme d'internalisation de la lactotransferrine et de son fer restent encore très hétérogènes suivant la nature des cellules impliquées. De part son rôle dans l'absorption intestinale du fer, il est possible que la lactotransferrine soit internalisée dans les cellules entérocytaires. Concernant les macrophages, le mécanisme n'est pas clair, mais l'endocytose de la lactotransferrine semble se faire plutôt par l'intermédiaire d'un récepteur lectinique ou par un mécanisme non spécifique tel que l'endocytose en phase fluide ou la phagocytose.

Les travaux récents de Sün et al. (1991) sur l'intervention de la lactotransferrine dans les mécanismes d'oxydoréduction membranaires peuvent expliquer le rôle de la lactotransferrine dans la prolifération cellulaire et ouvrent de nouvelles perspectives d'étude du mécanisme d'action de la lactotransferrine fixée à son récepteur.

**LES TRANSFERRINES DANS LE DIAGNOSTIC ET LA THERAPIE
ANTICANCEREUSE**

Le fer gouverne le métabolisme cellulaire en participant, comme cofacteur de nombreux systèmes enzymatiques, aux réactions biochimiques vitales pour la vie cellulaire. In vitro, les lignées cellulaires cancéreuses exigent un apport de fer plus important que les cellules normales (Trowbridge et Omary, 1981; Weinberg (1984). Stevens et al. (1988) et Mitjavila (1990) constatent également que, in vivo, des individus dont l'organisme est surchargé en fer, sont plus favorables à l'expression d'une tumeur maligne que des individus déficients en fer. Les données les plus récentes concernant les relations entre les transferrines et la croissance des cellules tumorales sont résumées dans le livre de De Souza et Brock (1989). Les connaissances acquises concernant le rôle de la sérotransferrine et de son récepteur dans la prolifération des cellules tumorales sont nombreuses, celles qui concernent la lactotransferrine restent encore très fragmentaires.

De part sa présence en nombre important dans les cellules et tissus cancéreux, le récepteur de la sérotransferrine a été considéré comme un marqueur potentiel de la cancérisation. La sérotransferrine couplée à des radioisotopes et l'anticorps anti-récepteur vecteur de drogues antitumorales ont été utilisés dans le dépistage du cancer et dans le cadre d'une thérapie anticancéreuse .

I- DETECTION DU RECEPTEUR DE LA SEROTRANSFERRINE DANS LES CELLULES CANCEREUSES

A- LOCALISATION DU RECEPTEUR DANS LES TISSUS CANCEREUX

Différentes techniques ont été utilisées pour détecter la présence du récepteur de la sérotransferrine à la surface de différents tissus (Tableau IV, p.82).

Ainsi, par immunofluorescence à l'aide d'anticorps anti-récepteur et d'anticorps anti-sérotransferrine, Faulk et al. (1980) décrivent pour la première fois l'existence du récepteur de la sérotransferrine dans des carcinomes du sein et des fibroadénomes mais n'observent aucune fixation de l'anticorps anti-récepteur sur les tissus sains. Shindelman et al. (1981) démontrent, en étudiant la fixation de la sérotransferrine marquée à l' ^{125}I sur des préparations microsomales de tissus de carcinomes et de sarcomes du sein, la présence de 10 à 20 fois plus de récepteurs de la sérotransferrine sur ces tissus malins par comparaison à des tissus sains. Ces résultats ont été confirmés par la suite par Walker et Camplejohn (1986).

Par immunocytochimie et en utilisant des anticorps monoclonaux anti-récepteur marqués à la peroxydase, Gatter et al. (1983) et Khogo et al. (1985) observent une répartition du récepteur de la sérotransferrine sur un nombre limité de tissus normaux tels que l'épiderme basal, le pancréas et les hépatocytes. Cependant, le récepteur est présent en quantités importantes dans de nombreux carcinomes et sarcomes, en particulier de l'estomac, du sein, du colon, de la prostate et dans les lymphomes. Des résultats similaires ont été décrits à propos de lymphomes (Kvaloy et al., 1984; Habeshaw et al., 1983) et dans le cas du cancer de l'estomac (Sciot et al., 1990) et de la

Tableau IV : Détection de la sérotransferrine (STF) et de son récepteur dans les tissus cancéreux humains

Tissus cancéreux	Méthodes de détection	Réf.
Sein	Ac anti-STF	Faulk <u>et al.</u> 1980
	Ac anti-STF	Walker et Camplejohn, 1986
	¹²⁵ I-STF	Shindelman <u>et al.</u> 1981
	Ac anti-récepteur	Tonik <u>et al.</u> 1986
	Ac anti-récepteur	Vandewalle <u>et al.</u> 1985
Estomac, colon	Ac anti-récepteur	Khogo <u>et al.</u> 1985
	Ac anti-STF	Gatter <u>et al.</u> 1983
	¹²⁵ I-STF	Niitsu <u>et al.</u> 1984
Prostate	Ac anti-récepteur	Khogo <u>et al.</u> 1985
Leucémie	Ac anti-récepteur	Lebman <u>et al.</u> 1982
	¹²⁵ I-STF	Larrick et Logue 1980
Lymphomes	Ac anti-récepteur	Kvaloy <u>et al.</u> 1984
	Ac anti-récepteur	Habeshaw <u>et al.</u> 1983

Ac : anticorps

vessie (Loyd et al., 1984; Seymour et al., 1987).

Le nombre important de récepteurs de la sérotransferrine chez ces différentes tumeurs reflète les besoins accrus en fer de ces tissus pour la prolifération tumorale. Le taux en fer (en poids sec) s'est révélé 3 fois plus grand dans les tissus cancéreux du sein que dans les tissus normaux (Santoliquido et al., 1976). Larson et al. (1980) démontrent que le taux de ^{59}Fe accumulé dans les sarcomes mammaires de Souris BALB/C est corrélé avec la fixation de la ^{59}Fe -sérotransferrine sur son récepteur. L'utilisation d'une quantité importante de fer par les tissus peut expliquer le fait que certains patients cancéreux présentent une anémie avancée, en raison d'une diminution de la sérotransferrine saturée dans le sérum. Hugues (1972) montrent que l'anémie chez ces patients est causée par une diminution de la sérotransferrine circulante qui est capturée par les tumeurs. Ainsi, les tissus cancéreux entrent en compétition avec la moëlle osseuse, lieu de l'hématopoïèse, pour capturer le fer (Hughes, 1972).

Certains auteurs ont mis en évidence une relation entre le nombre de récepteurs de la sérotransferrine, d'une part, et la masse et le stade pathologique de la tumeur, d'autre part. Ainsi, Kvaloy et al. (1984) sur des lymphomes humains et Seymour et al. (1987) sur des tissus urothéliaux malins, observent une augmentation du nombre de récepteurs de la sérotransferrine corrélée avec l'augmentation du stade pathologique de la tumeur. Cependant, ces résultats sont contestés par Faulk et al. (1980), Walker et Camplejohn (1986) ainsi que par Gatter et al. (1983) qui n'ont observé aucune relation entre ces deux paramètres en travaillant sur des tissus cancéreux de la glande mammaire.

Plus récemment, des études ont été réalisées afin de déterminer les relations possibles qui pourraient exister entre la présence de récepteurs de la sérotransferrine sur des tissus de la glande mammaire

et celle de récepteurs spécifiques de différentes hormones qui interviennent dans le développement de la glande mammaire. Ainsi, Tonik et al. (1986) démontrent que le nombre de récepteurs de la sérotransferrine présents dans des carcinomes du sein de type "canalaire invasif" est inversement proportionnel à celui des récepteurs aux oestrogènes. Chez les patientes atteintes de tumeurs du sein au stade préménopause, le nombre de récepteurs de la sérotransferrine est élevé et celui des récepteurs des oestrogènes est faible. Cependant, aucune relation similaire n'a pu être établie entre les récepteurs de la progestérone et le récepteur de la sérotransferrine (Tonik et al., 1986).

Une glycoprotéine membranaire, la mélanotransferrine ou p97, présentant une forte homologie de séquence avec la lactotransferrine et la sérotransferrine, a été découverte spécifiquement dans la membrane plasmique de mélanomes (Brown et al., 1982; Rose et al., 1986). Le rôle de cette protéine dans la capture du fer par les cellules de mélanomes et la prolifération cellulaire n'est pas clair. Cependant, le gène codant pour P97 est localisé sur le même chromosome 3 que celui de la sérotransferrine et de son récepteur (Goodfellow et al., 1982; Plowman et al., 1983).

De même, un gène transformant ou oncogène appelé "Blym 1", isolé et séquencé à partir de DNA de lymphomes de Burkitt, code pour un court peptide de 56 résidus d'acides aminés ayant une forte homologie avec la séquence N-terminale de la sérotransferrine humaine (Goubin et al., 1983; Diamond et al., 1984), mais sa fonction n'est pas connue.

B- LOCALISATION DU RECEPTEUR DANS LES CELLULES CANCEREUSES

Les contraintes techniques, en particulier, dues à l'emploi de biopsies tumorales, la conservation et l'homogénéité des tumeurs, ainsi que le nombre limité de cellules viables obtenues, ont conduit les chercheurs à s'intéresser aux différentes lignées cellulaires transformées maintenues en culture et établies à partir de différentes tumeurs.

De nombreuses études portant sur l'augmentation du nombre de récepteurs de la sérotransferrine à la surface d'une grande variété de cellules malignes (Newman et al., 1982; Hamilton et al., 1979) ont été réalisées, en particulier sur des lignées de type lymphoblastiques issues de patients atteints de leucémies (Larrick et Cresswell, 1979 b; Larrick et Logue, 1980; Galbraith et al., 1980; Sutherland et al., 1981; Trowbridge et Omary, 1981), sur des lignées de mélanomes et de choriocarcinomes (Lebman et al., 1982), sur des lignées fibroblastiques (Octave et al., 1981) et, plus récemment, sur des lignées cellulaires épithéliales du cancer du sein telles que MCF7 (Vandewalle et al., 1985, 1988) et T47D (Reddel et al., 1985).

Larrick et Cresswell (1979 b) observent 40 à 120 fois plus de récepteurs de la sérotransferrine sur les lignées lymphoblastiques que sur les cellules périphériques mononucléaires sanguines de patients sains. Par ailleurs, l'augmentation de l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN de cellules cancéreuses de glande mammaire MCF7, est corrélée avec l'apparition d'un nombre important de récepteurs de la sérotransferrine à la surface de ces cellules (Vandewalle et al., 1985). L'importance du fer dans la croissance cellulaire liée à la présence d'un nombre élevé de récepteurs de la sérotransferrine a été particulièrement étudiée en relation avec le cycle cellulaire, notamment dans les cellules

lymphomyéloïdes malignes et les cellules épithéliales cancéreuses. Dans les lignées leucémiques, Trowbridge et Lopez (1982) montrent que le fer apporté par la sérotransferrine est exigé par les cellules pour permettre à celles-ci de progresser dans la phase S du cycle cellulaire. Le fer, est en effet, un cofacteur de la ribonucléotide réductase qui est une enzyme intervenant dans la synthèse de l'ADN.

Reddel et al. (1985) observent également qu'une déficience en fer provoque un ralentissement de la prolifération des cellules épithéliales cancéreuses de glande mammaire T47D et une accumulation des cellules en phase G2 du cycle cellulaire. Simultanément, la quantité de cellules polyploïdes et le nombre de récepteurs de la sérotransferrine à la surface cellulaire augmentent. L'addition de transferrine ou de citrate ferrique rétablit la prolifération cellulaire, ce qui suggère que le fer fixé à la sérotransferrine joue un rôle majeur dans la croissance des cellules. Dans cette étude, le fer n'est pas un facteur limitant pour la synthèse du ADN, puisque les cellules s'arrêtent en phase G2 et non en phase S et que les cellules de type diploïde augmentent. Néanmoins, ce résultat peut s'expliquer par le fait qu'il n'y a pas suffisamment de fer disponible pour approvisionner les cellules filles en division. Ce fer est nécessaire au fonctionnement des enzymes qui interviennent dans les mécanismes de respiration et d'oxydoréduction cellulaire, ainsi que dans la formation des protéines du cytosquelette des cellules qui doivent se diviser (Sussman, 1989).

Quelques études ont été réalisées concernant l'effet de certains facteurs de croissance sur la prolifération de différentes lignées cellulaires, en relation avec le taux de récepteurs de la sérotransferrine. Ainsi, Castagnola et al. (1987) observent, en présence d'EGF, une augmentation rapide et réversible du nombre de récepteurs de la sérotransferrine à la surface des cellules épithéliales normales et cancéreuses. De même, la phosphorylation du récepteur est augmentée.

Par ailleurs, l'addition du facteur PDGF ou de l'insuline dans les milieux de culture provoque une redistribution des récepteurs de la sérotransferrine entre la surface et l'intérieur des cellules fibroblastiques BALB3T3 et des cellules de carcinome d'épiderme humain (Taetle et al., 1987; Wiley et Kaplan, 1984).

Certaines hormones telles que l'oestradiol E2, peuvent stimuler, dans un milieu supplémenté en sérum de veau foetal et dépourvu de rouge de phénol, l'apparition du récepteur de la sérotransferrine à la surface des cellules de glande mammaire MCF7 (Vandewalle et al., 1988). Ce résultat suggère que le récepteur peut être utilisé comme un marqueur de l'action des oestrogènes et présente un intérêt certain dans les études de croissance et de différenciation des cellules cancéreuses (Vandewalle et al., 1991).

C- DETECTION DU RECEPTEUR DE LA SEROTRANSFERRINE DANS LE SERUM DE PATIENTS CANCEREUX

Khogo et al. (1985, 1986, 1988) et Flowers et al. (1989) ont démontré que le récepteur circulant de la sérotransferrine augmente de manière significative chez les sujets atteints de lymphome, de leucémie, de cancers de l'estomac, du colon, de l'oesophage. Dans le cas d'une leucémie aigüe, la quantité de récepteur libérée dans le sérum reflète le nombre de cellules leucémiques présentes dans la moëlle osseuse et dans le sang. Le récepteur circulant de la sérotransferrine pourrait ainsi être un marqueur de la prolifération tumorale. Pour confirmer ces résultats, Khogo et al. (1985) inoculèrent des cellules cancéreuses du colon à des Souris nudes et mesurèrent l'apparition du récepteur de la sérotransferrine dans le sérum de ces Souris. Ils observèrent une augmentation du taux de récepteurs circulants proportionnelle à la taille de la tumeur inoculée, suggérant que le récepteur de la

sérotransferrine libéré dans le sang provenait de la tumeur. De même, sur des lignées cellulaires établies, ces auteurs constatent, in vitro, une libération importante du récepteur de la sérotransferrine non dégradé dans le milieu de culture. Le phénomène est réduit lorsque les cellules sont placées à 4°C au lieu de 37°C ou incubées sans sérotransferrine. Ces résultats tendent à démontrer que l'interaction ligand-récepteur est nécessaire pour que l'expulsion du récepteur dans le milieu ait lieu.

Depuis une quinzaine d'années, la présence d'un nombre important de récepteurs de la sérotransferrine dans les tissus malins a incité les chercheurs à s'intéresser à l'utilisation de la sérotransferrine et de son récepteur dans le diagnostic et dans la thérapie anticancéreuse. En effet, le récepteur constitue une cible potentielle pour les agents anti-tumoraux couplés à la lactotransferrine ou la sérotransferrine.

II- UTILISATION DE LA SEROTRANSFERRINE ET DE SON RECEPTEUR DANS LE DIAGNOSTIC ET LA THERAPIE ANTICANCEREUSE

A- LE COMPLEXE SEROTRANSFERRINE-⁶⁷Ga

En médecine nucléaire, plusieurs radioisotopes ont été utilisés comme agents potentiels dans le dépistage des tumeurs, en particulier ⁵²Fe, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga et ¹¹¹In. La demie-vie trop courte du ⁵²Fe, estimée à environ 8,5 h, limite son utilisation en médecine. Le radioisotope le plus couramment employé pour le diagnostic du cancer et l'identification de processus inflammatoires en relation avec les transferrines est le ⁶⁷Ga (Hoffer et al., 1978; Larson, 1981; Beckerman et al., 1984). Dès 1969, la capture sélective du ⁶⁷Ga par des tumeurs est mise en évidence par

Edwards et Hayes (1969), puis confirmée par plusieurs auteurs (Seratini et al., 1971; Saha et Boyd, 1983; Anghileri et al., 1983).

Dans les applications cliniques, le citrate- ^{67}Ga est administré par voie intraveineuse, puis la radioactivité est retrouvée dans le sang sous forme de complexe sérotransferrine- ^{67}Ga (Gunasakera, 1972; Larson et al., 1978; Vallabhajosula et al., 1980, Tsan et Scheffel, 1986). La constante de formation du complexe sérotransferrine- ^{67}Ga est élevée et de l'ordre de 10^{24} (Kulprathipanja et al., 1979). La capture du ^{67}Ga par la tumeur a lieu grâce à la fixation du complexe sérotransferrine- ^{67}Ga sur le récepteur présent à la surface cellulaire (Larson et al., 1979, 1981; Aulbert et al., 1980). Le complexe est ensuite internalisé dans la cellule et le ^{67}Ga est libéré de la sérotransferrine, puis complexé à la ferritine (Clauser et al., 1974; Hegge et al., 1977; Weiner et al., 1983). Cependant, l'hypothèse de l'accumulation du Ga^{67} dans les tumeurs par l'intermédiaire du récepteur de la sérotransferrine repose essentiellement sur des expériences in vitro, tandis que in vivo, les résultats sont controversés. Ainsi, Scheffel et al. (1985) observent que in vitro, l'addition de sérotransferrine augmente la capture de ^{67}Ga par les lignées cellulaires d'hépatomes bien qu'in vivo, ce phénomène n'ait pu être observé dans des tumeurs hépatiques chez le rat. Ces résultats suggèrent qu'in vivo de nombreux mécanismes ou d'autres protéines peuvent intervenir dans l'accumulation du ^{67}Ga dans les tumeurs.

Malgré les controverses concernant l'accumulation du ^{67}Ga dans les tumeurs, le citrate- ^{67}Ga est largement utilisé dans l'évaluation clinique du cancer, notamment dans les lymphomes d'Hogkin's et dans les mélanomes métastatiques (Beckerman et al., 1984; Newman et al., 1984). Néanmoins, en raison de l'accumulation de ^{67}Ga dans certains tissus normaux, la précision de la détection tumorale par le ^{67}Ga , dépend de la localisation de la tumeur.

Il est à noter également que la sérotransferrine possède une forte affinité pour l'¹¹¹In qui est un radioisotope rarement utilisé en imagerie clinique pour la détection de tumeurs (Moerlein et Welch, 1981).

B- LA SEROTRANSFERRINE UTILISEE COMME VECTEURS DE DROGUES ANTITUMORALES

En raison de la forte affinité de la sérotransferrine pour son récepteur et de l'internalisation du complexe sérotransferrine-récepteur, des études visant à utiliser la sérotransferrine comme vecteur de drogues antitumorales pour cibler les cellules cancéreuses ont été entreprises. Ainsi, des couplages entre la sérotransferrine et la ricine A (Raso et Lawrence, 1984; Raso et Basala, 1984), la toxine diphtérique (O'keefe et Draper, 1985) et la néocarzinostatine qui est un antibiotique cytotoxique utilisé en chimiothérapie (Jung et al., 1981; Khogo et al., 1985) ont été réalisés. Le complexe sérotransferrine-néocarzinostatine inhibe la croissance des cellules tumorales des cancers du colon inoculées chez la Souris nude (Khogo et al., 1985). Cependant, l'utilisation des toxines s'est révélée peu envisageable dans la thérapie anticancéreuse en raison des effets néfastes secondaires causés chez l'Homme.

C- L'IMMUNOTHERAPIE ANTICANCEREUSE

Etant donné le nombre important de récepteurs de la sérotransferrine sur les cellules cancéreuses et leur rôle dans la prolifération cellulaire (Trowbridge et Lopez, 1982; Trowbridge et al., 1984, 1988), les anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur de la sérotransferrine ont été considérés comme des agents thérapeutiques potentiels dans le traitement du cancer (Tableau V, p.92).

On distingue deux voies différentes concernant l'utilisation des anticorps monoclonaux anti-récepteur dans l'immunothérapie anticancéreuse:

- La première est fondée sur l'utilisation des anticorps comme vecteurs de drogues pour cibler les cellules cancéreuses via le récepteur de la sérotransferrine (Simpson et al., 1982; Herschman et al., 1984; Trowbridge et Domingo, 1981);

- La seconde est fondée sur la capacité de certains anticorps monoclonaux à interférer directement avec la fonction essentielle du récepteur, bloquant ainsi la croissance cellulaire (Trowbridge et Omary, 1981; Taetle et al., 1983; Trowbridge et Domingo 1982; Trowbridge et al., 1988).

Différents anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur de la sérotransferrine ont été préparés. Certains anticorps tels que B3/25 (Omary et al., 1980) et OKT9 (Trowbridge et Lopez, 1982), n'interfèrent pas avec la fonction du récepteur de la sérotransferrine et n'inhibent pas la croissance cellulaire. Néanmoins, lorsque l'anticorps B2/25 est couplé à la ricine A, la croissance des cellules T leucémiques est stoppée in vitro. Le même résultat est observé, in vivo, chez des cellules de mélanomes humains ou des cellules tumorales ovariennes injectées à des Souris nudes (Trowbridge et Domingo, 1981; Fitzgerald et al., 1986, 1987). L'addition d'adénovirus augmente la cytotoxicité du complexe anticorps-exotoxine probablement par fragilisation des vésicules d'endocytose par le virus, permettant ainsi une meilleure diffusion des toxines dans le cytoplasme des cellules (Pirker et al., 1985; Fitzgerald et al., 1986). Le couplage d'anticorps anti-récepteur avec la protéine II Pokeweed antivirale inhibe également la prolifération cellulaire in vitro des cellules épithéliales MCF7.

Tableau V : Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses à l'aide de la sérotransferrine (STF) et d'anticorps (Ac) anti-récepteur couplés à des drogues antitumorales.

Cellules cibles	In vitro/in vivo	Méthodes	Réf.
CEM Raji	in vitro	STF- ricine A	Raso et Basala 1984
K562 M7609	in vitro in vivo	STF-néocarzinostatine	Khogo <u>et al.</u> 1985
LMTK	in vitro	STF-toxine	O'Keefe et Draper 1984
CCRF CEM HeLa	in vitro in vivo	Ac anti-récepteur couplé à la ricine A	Trowbridge et Domingo 1981
KB, HeLa	in vitro in vivo	Ac anti-récepteur couplé à une toxine	Fitzgerald <u>et al.</u> 1986, 1987 Pirker <u>et al.</u> 1985
MCF7	in vitro	Ac anti-récepteur couplé à la protéine II pokeweed antivirale	Bjorn <u>et al.</u> 1984

D'autres anticorps monoclonaux tels que 42/6 et R17.208 inhibent directement la croissance cellulaire en bloquant la fixation de la sérotransferrine sur son récepteur (Trowbridge et Omary, 1981; Trowbridge et Lopez, 1982; Lesley et Schulte, 1985). Il existe néanmoins de grandes variations dans la sensibilité des cellules en culture vis-à-vis des anticorps monoclonaux anti-récepteur. Ainsi, bien qu'ils inhibent complètement in vitro la croissance des lymphocytes, des précurseurs des cellules hématopoïétiques, de lignées leucémiques et de lymphomes (Mendelsohn et al., 1983; Taetle et al., 1983; Lesley et Schulte, 1985; Rammensee et al., 1985), ces anticorps ont peu d'effet sur la croissance de différents carcinomes, de mélanomes et de lignées fibroblastiques (Taetle et al., 1987; Trowbridge et al., 1988). Ces différences de sensibilité ne sont pas encore clairement élucidées, mais peuvent s'expliquer, d'une part, par la variabilité des cellules à répondre à une privation en fer, suivant leur réserve intracellulaire, où, d'autre part, par le fait que les anticorps anti-récepteur peuvent interférer avec la capture d'autres nutriments en bloquant l'accès des puits-recouverts. Les anticorps pourraient également agir en bloquant le transport transmembranaire des électrons comme cela a été décrit par Tooles-Simms et al. (1991).

Des expériences in vivo démontrent qu'en injectant par voie péritonéale des anticorps monoclonaux anti-récepteur REM17.2 et R17.208 à des Souris auxquelles des cellules leucémiques ont été inoculées, la survie de ces Souris peut être prolongée et les tumeurs diminuent au niveau du site d'inoculation (Sauvage et al., 1987). Pour obtenir un effet thérapeutique plus grand, ces auteurs ont envisagé la combinaison d'anticorps anti-récepteur qui bloquerait la croissance tumorale avec un anticorps qui produirait un effet anti-tumoral par activation des mécanismes de défense immunitaire. Une augmentation de l'activité cytotoxique est observée quand l'anticorps anti-récepteur de la

sérotransferrine et l'anticorps dirigé contre l'antigène membranaire lymphocytaire Thy1 sont additionnés simultanément (Sauvage et al., 1987). Cependant, le traitement anti-tumoral est réellement efficace si le cancer est détecté très tôt, mais reste inefficace contre des tumeurs déjà bien établies (Sauvage et al., 1987).

Ainsi, les tissus cancéreux à un stade tumoral avancé sont des facteurs limitants pour l'immunothérapie. Pour cette raison, le traitement tumoral chez la Souris à l'aide d'anticorps anti-récepteur a été envisagé en association avec d'autres facteurs conventionnels utilisés en chimiothérapie comme la cyclophosphamide ou le cytosine arabinoside (Sauvage et al., 1987).

Un autre problème soulevé par l'immunothérapie à l'aide d'anticorps anti-récepteur est la présence du récepteur de la sérotransferrine sur des tissus normaux (Gatter et al., 1983). Un jour après son injection in vivo, les anticorps peuvent être retrouvés dans des sites majeurs d'utilisation, de stockage ou d'absorption du fer (Sauvage et al., 1987). Néanmoins, les examens histologiques de ces tissus ne révèlent aucun dommage cellulaire aux doses utilisées en immunothérapie. Cependant, des doses plus élevées en anticorps anti-récepteur, de l'ordre de 1 mg injectées quotidiennement pendant 7 jours, provoquent une diminution de l'érythropoïèse et de la myélopoïèse au niveau de la moëlle osseuse. (Sauvage et al., 1987).

II- LA LACTOTRANSFERRINE UTILISEE COMME MARQUEUR DE LA CANCERISATION

A- LOCALISATION DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS LES CELLULES CANCEREUSES

Alors que de nombreuses études ont été réalisées sur le rôle de la

sérototransferrine dans le diagnostic et la thérapie anticancéreuse, celui de la lactotransferrine n'a pas encore été élucidé.

In vitro, Hashizume et al. (1983) et Amouric et al. (1984) ont démontré l'importance de la lactotransferrine dans la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses, respectivement sur des lignées lymphocytaires leucémiques et sur les cellules d'adénocarcinomes du colon humain HT29. La fixation spécifique de la lactotransferrine a été mise en évidence sur les cellules cancéreuses, principalement de leucémie telles que K562 ou Molt4 (Yamada et al., 1987; Birgens et al., 1984) et sur des cellules d'adénocarcinome du colon humain HT29 et HT29-D4 (Derisbourg, 1990; Roiron-Lagrour et al., 1989).

Par méthodes immunocytochimiques à l'aide d'anticorps anti-lactotransferrine marqués à la peroxydase ou à la fluorescéine, la lactotransferrine a été détectée dans des lignées lymphocytaires néoplasiques (Butler et al., 1990) et dans certains tissus cancéreux tels que des carcinomes et adénomes de l'intestin (Tuccari et al., 1989), du sein (Charpin et al., 1985), de la parotide (Caselitz et al., 1981), de la glande thyroïde (Tuccari et Barresi, 1985; Barresi et Tuccari, 1987) et des carcinomes bien différenciés de la prostate (Barresi et Tuccari, 1984) et du rein (Loughlin et al., 1987).

Parmi 67 cas de carcinomes du sein, Charpin et al. (1985) mettent en évidence la présence de la lactotransferrine dans seulement 7,5% des cas, bien que Wurster et al. (1980) en révèlent plus de 42%. Les différences de résultats entre ces deux auteurs peuvent s'expliquer par la nature des méthodes immunocytochimiques utilisées et surtout par la nature des fixateurs employés en pathologie qui peuvent provoquer des altérations de l'antigène. Ainsi, selon Charpin et al. (1985), de meilleurs résultats concernant la détection de la lactotransferrine sont obtenus avec des biopsies congelées, plutôt qu'avec des tissus fixés et enrobés dans la paraffine (Charpin et al., 1985). Tous les tissus

cancéreux de la glande mammaire positifs à la lactotransferrine qui ont été étudiés par Charpin et al. (1985) sont des carcinomes mammaires de type "canalaire invasif", identifiés comme étant de faible malignité (stades I et II). Cambell et al. (1990) font la même observation et suggèrent alors que la lactotransferrine pourrait être utilisée comme marqueur des carcinomes de faible malignité. Dans les tissus mammaires cancéreux, la présence de kappa-caséine semble être également associée à celle de la lactotransferrine (Charpin et al., 1985). Par ailleurs, ces tissus positifs à la lactotransferrine possèdent également des récepteurs à l'oestrogène. Green et Pastewka (1978) ont observé in vitro une augmentation de la lactotransferrine produite par des explants mammaires de Souris sous l'effet de la prolactine. De même, les oestrogènes augmentent de 300 fois la production de la lactotransferrine par les tissus épithéliaux utérins murins (Pentecost et Teng, 1987). La présence de lactotransferrine dans les cellules cancéreuses pourrait donc être régulée par une stimulation hormonale. Néanmoins, dans ces études, le nombre de cas positifs étudiés est insuffisant pour établir une relation statistique significative entre la présence de la lactotransferrine et le stade histopathologique de la tumeur, le degré de différenciation ou la présence de récepteurs des hormones stéroïdiennes.

Récemment, Panella et al. (1991) constatent un polymorphisme important et une diminution de la méthylation de l'ADN codant pour la lactotransferrine isolé de cellules cancéreuses de glande mammaire, par comparaison à l'ADN isolé de cellules saines. Selon ces auteurs, la diminution de la production de lactotransferrine mesurée dans le cas de ces cellules cancéreuses serait en relation avec ces variations structurales observées dans l'ADN..

Dans les tissus cancéreux de l'estomac (Tuccari et al., 1989) et de la glande thyroïdienne (Tuccari et Barresi, 1985), la répartition de la lactotransferrine semble être différente suivant la nature des lésions

tissulaires. Ainsi, Tuccari et al. (1989) démontrent que les tissus cancéreux de l'intestin de type carcinome et adénome renferment de la lactotransferrine. En revanche, les carcinomes de type diffus et les polypes hyperplasiques en sont dépourvus.

Le rôle de la lactotransferrine dans les tissus cancéreux n'est pas encore connu. Sa présence dans ces tissus pourrait être associée à l'anémie observée chez de nombreux cancéreux, comme cela a été démontré dans le cas du carcinome du rein (Loughlin et al., 1987). Les tumeurs élaborent des substances assimilées à des pyrogènes qui peuvent provoquer une libération de la lactotransferrine stockée dans les leucocytes neutrophiles (Klempner et al., 1978). L'apolactotransferrine capterait le fer de la sérotransferrine circulante comme cela a été décrit dans le mécanisme de l'hyposidérémie inflammatoire proposé par van Snick et al. (1974). Selon Loughlin et al. (1987), une partie de la lactotransferrine libérée pourrait ensuite être directement captée par les tumeurs pour leurs besoins dans la prolifération cellulaire. En effet, différentes techniques immunoenzymatiques ont été mises au point pour doser la lactotransferrine dans le sang et révèlent une concentration sanguine de lactotransferrine dans les sérums de patients atteints du cancer ou d'infection virale ou bactérienne, 2 à 10 fois supérieure chez les sujets sains (Bennett et Mohla, 1976; Bezwoda et al., 1985; Maacks et al., 1989).

B- LE COMPLEXE LACTOTRANSFERRINE-⁶⁷Ga

Très peu d'études ont été réalisées concernant l'utilisation de la lactotransferrine dans le diagnostic du cancer. Cependant, en raison de la plus forte affinité de la lactotransferrine pour le ⁶⁷Ga par

comparaison à la sérotransferrine (Hoffer et al., 1977; Weiner et al., 1978, 1981 a), certains chercheurs se sont intéressés à la formation du complexe lactotransferrine- ^{67}Ga et à son utilisation comme traceur dans le diagnostic du cancer.

Le citrate- ^{67}Ga injecté par voie intraveineuse est retrouvé partiellement fixé à la sérotransferrine circulante (Gunasakera, 1972). Néanmoins, Winchell et al. (1976) et Harris (1986) suggèrent que d'autres protéines ayant une plus forte affinité pour le ^{67}Ga pourraient fixer le radioisotope et même le libérer de la sérotransferrine pour le transporter jusqu'à certains tissus. Weiner et al. (1981a) démontrèrent in vitro que le ^{67}Ga se dissociait de la sérotransferrine à pH 7,5 en présence de lactotransferrine et se retrouvait sous forme de complexe lactotransferrine- ^{67}Ga . A un pH de 6, proche de celui rencontré au voisinage d'une tumeur l'affinité de la sérotransferrine pour le ^{67}Ga diminue, alors que le complexe lactotransferrine- ^{67}Ga reste stable. L'ensemble de ces résultats tendent à prouver que la lactotransferrine pourrait intervenir directement dans la capture du ^{67}Ga par les tumeurs.

Après son injection, le ^{67}Ga a été localisé dans de nombreux tissus où la lactotransferrine est présente à forte concentration et plus particulièrement dans les tissus mammaires (Fogh et al., 1971; Paterson et al., 1976; Weiner et al., 1985)) et dans les sécrétions telles que le colostrum et le lait (Larson et Schall, 1971; Tyndall et al., 1976; Tobin et al., 1976).

Le complexe lactotransferrine- ^{67}Ga a été identifié et isolé par Hoffer et al. (1978) dans les larmes, dans les sécrétions mammaires de patients atteints de galactorrhée (Hoffer et al., 1977) ainsi que dans les lymphomes de Burkitt et d' Hodgkin (Hoffer et al., 1979). La présence de ^{67}Ga couplé à la lactotransferrine a été observée également, in vitro, chez les leucocytes polymorphonucléaires (Weiner et al., 1981b). Hoffer

et al., (1979) ont également démontré que la lactotransferrine, libérée des leucocytes sous l'action de pyrogène, captait le ^{67}Ga fixé à la sérotransferrine circulante et le transportait jusqu'aux tumeurs .

III- CONCLUSION

De part ses fonctions biologiques et sa présence sur un grand nombre de cellules cancéreuses, le récepteur de la sérotransferrine est un marqueur potentiel dans le diagnostic tumoral et une cible possible pour véhiculer spécifiquement des drogues antitumorales jusqu'aux tissus malins. L'inhibition de la prolifération de certaines cellules par des anticorps anti-récepteur de la sérotransferrine est un atout supplémentaire dans la thérapie anticancéreuse. Les anticorps pourraient être utilisés en association avec d'autres agents employés en chimiothérapie afin d'augmenter l'effet antitumoral. Cependant, les conséquences d'administration in vivo de tels composés restent à déterminer. Jusqu'à maintenant, l'application clinique de ces anticorps monoclonaux n'a jamais été faite chez l'Homme car, d'une part, la plupart de ces anticorps sont d'origine murine et, d'autre part, le récepteur de la sérotransferrine est présent sur les cellules normales.

Les travaux concernant la présence et la fixation de la lactotransferrine dans certaines cellules et tissus cancéreux sont relativement récents et restent très fragmentaires. Bien que le rôle physio-pathologique de la lactotransferrine dans les tumeurs soit encore spéculatif, sa présence dans de nombreux tissus tumoraux, ainsi que son rôle dans la capture du ^{67}Ga par ces tumeurs, semblent être établis.

LES CELLULES DE GLANDES MAMMAIRES COMME MODELE EXPERIMENTAL

L'importance des transferrines dans le métabolisme et le transport du fer, ainsi que dans les phénomènes d'inflammation et de défense immunitaire, nous ont conduite à nous intéresser à l'interaction de la lactotransferrine avec les cellules cancéreuses.

Les expérimentations réalisées in vitro sur des lignées cellulaires en culture, permettent une recherche multidisciplinaire (biochimique, biologique, immunologique, génétique) qui est nécessaire pour définir les mécanismes de régulation qui ont lieu in vivo.

De nombreuses lignées cellulaires ont été établies à partir de tumeurs solides de glande mammaire humaine, de métastases ou de mastopathies. Ces lignées cellulaires fournissent un excellent modèle pour explorer in vitro l'interaction de la lactotransferrine avec les cellules cancéreuses et suivre l'apparition du récepteur de la lactotransferrine lors de la développement tumoral.

Dans ce chapitre, nous présenterons les cellules utilisées dans notre étude.

I- LES LIGNEES CANCEREUSES DE GLANDE MAMMAIRE

Le premier stade du cancer du sein est le carcinome in situ non-invasif ou non-infiltrant. Le deuxième stade, le plus fréquent, est l'adénocarcinome invasif ou infiltrant qui peut être classé en trois sous-classes correspondant à des pronostics de malignité croissante (stades I, II et III).

Les carcinomes localisés dans les canaux galactophériques sont dits canaux, alors que d'autres situés dans les lobules sont appelés

lobulaires. Le stade ultime de la progression tumorale est représenté par les métastases.

Un grand nombre de lignées cellulaires de carcinome du sein ont été établies en culture à partir de métastases du cancer du sein et un nombre plus restreint à partir des tumeurs in situ, en raison de la difficulté d'obtenir une population cellulaire majeure viable et homogène (Engel et Young, 1978). Des critères histopathologiques, biochimiques et génétiques (caryotype) permettent d'identifier ces cellules comme étant d'origine humaine mammaire et maligne. Les lignées cancéreuses nous ont été fournies par le Docteur B. Vandewalle du Laboratoire d'Endocrinologie du CHR Oscar Lambret de Lille que nous remercions.

Les principales caractéristiques des lignées cellulaires que nous avons utilisées, sont représentées dans le Tableau VI (p.102). Ces lignées sont issues de métastases du cancer du sein et, plus particulièrement, d'effusion pleurale ou de tumeur primaire. Elles se distinguent essentiellement par le diagnostic histopathologique et la présence ou non de récepteurs des hormones stéroïdiennes et peptidiques.

Ainsi, les lignées T47D et MCF7 sont établies à partir d'une effusion pleurale d'une patiente atteinte d'un carcinome du sein de type "canalaire invasif" (Keydar et al., 1979; Soule et al., 1973).

MDAMB-231 est issue d'une effusion pleurale d'un malade avec un cancer métastasant du sein, de type adénocarcinome (Cailleau et al., 1974).

BT20 et VHB1 proviennent directement d'une tumeur primaire du sein de type carcinome "canalaire invasif" (Lasfargues et Ozello, 1978; Vandewalle et al., 1987).

Des récepteurs à haute affinité pour les hormones stéroïdiennes telles que l'oestradiol, la progestérone, les glucocorticoïdes et la

Tableau VI : Principales caractéristiques des lignées cellulaires cancéreuses de glande mammaire humaine utilisées.

Lignées	Source	Réf.	Diagnostic histopathologique	Récepteurs				
				Oestr./Progest.	Glucocort.	Ins.	Prolact.	
T47D	Effusion pleurale	Keydar <u>et al.</u> 1979	IDC	+	+	+	+	+
MCF7	Effusion pleurale	Soule <u>et al.</u> 1973	IDC	+	+	+	+	-
MDAMB 231	Effusion pleurale	Cailleau <u>et al.</u> 1974	AC	-	-	+	+	-
BT20	Tumeur I	Lasfargues et Ozzello 1958	IDC	-	-	+		
VHB1	Tumeur I	Vandewalle <u>et al.</u> 1987	IDC	+	+	+	+	+

(IDC : carcinome invasif de type canalaire)

(AC : adénocarcinome)

(Leung, 1983) ont été mis en évidence dans les lignées T47D (Horwitz et al., 1978; Keydar et al., 1979; Chalbos et al., 1982), MCF7 (Brooks et al., 1973; Lippman et al., 1976, 1977, Horwitz et al. 1978) et VHB1 (Vandewalle et al. 1987). Dans les lignées BT20 et MDAMB-231, seuls des récepteurs aux hormones glucocorticoïdes ont été détectés (Horwitz et al., 1978; Lippman et al., 1977). Le rôle biologique de ces hormones a fait l'objet de nombreuses études, du fait de leur importance dans le développement et la croissance des glandes mammaires (Osborne et al., 1978; Lippman et al., 1977).

Le nombre de récepteurs de la prolactine, hormone peptidique, varie également suivant les lignées cellulaires. Trois fois plus de récepteurs sont observés sur T47D que sur MCF7, BT20 et MDAMB-231 (Shiu, 1979, 1981).

L'insuline régule également la croissance et le métabolisme de ces lignées par l'intermédiaire de récepteurs de haute affinité (Osborne et al., 1978; Papa et al., 1990; Bonnetterre et al., 1990).

Les variations concernant le nombre de récepteurs spécifiques des hormones présents dans ces différentes lignées cellulaires, ont amené les chercheurs à considérer ces récepteurs comme des marqueurs potentiels de la différenciation des cellules épithéliales de glande mammaire et de la progression tumorale dans le cancer du sein (Lippman et al., 1976, 1977; Mass et al., 1975).

A notre connaissance, très peu d'études ont été réalisées concernant la présence de récepteurs de la sérotransferrine sur les lignées cellulaires de glande mammaire en culture. Seuls, Vandewalle et al. (1985) ont décrit une fixation spécifique et saturable de la sérotransferrine saturée sur la lignée MCF7 avec une constante d'affinité de l'ordre de $0,2 \times 10^8 M^{-1}$, voisine de celle donnée pour d'autres cellules (Hamilton et al., 1979) et un nombre de sites s'élevant

à $7,6 \times 10^5$ par cellule. Ces paramètres de fixation sont identiques dans des lignées de primoculture de cellules cancéreuses et dans des lignées établies à long terme en culture. Aucune relation n'a pu être trouvée entre l'expression du récepteur de la sérotransferrine sur des primocultures de carcinome du sein et le stade histologique de la tumeur (Vandewalle et al., 1985).

Reddel et al. (1985) observent que, dans un milieu à basse concentration en sérum de veau foetal (entre 0,25% et 1%), les cellules T47D s'accumulent en phase G2 du cycle cellulaire et que, simultanément, le nombre de récepteurs de la sérotransferrine augmente à la surface cellulaire. De même, Vandewalle et al. (1985) démontrent que l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des cellules MCF7 en croissance, est corrélée avec l'apparition de récepteurs de la sérotransferrine. L'ensemble de ces résultats soulignent l'importance du récepteur de la sérotransferrine dans la prolifération de ces cellules.

Le nombre de récepteurs de la sérotransferrine à la surface des cellules MCF7 peut être également augmenté sous l'action de certaines hormones telles que l'oestradiol E2 (Vandewalle et al., 1988). L'oestradiol stimule également la libération extracellulaire de la sérotransferrine synthétisée par les MCF7, ce qui suggère un rôle potentiel joué par la sérotransferrine dans les fonctions autocrines ou paracrines (Vandewalle et al., 1989). Ces auteurs démontrent également que la différenciation induite par l'AMPc de la lignée MCF7 cultivée sur une matrice extracellulaire provoque une stimulation de la sécrétion de la sérotransferrine (Vandewalle et al., 1991). Ce résultat suggère un rôle possible de la sérotransferrine comme modulateur de la différenciation des cellules cancéreuses de glande mammaire.

A notre connaissance, aucune autre étude n'a été faite concernant le rôle et la présence du récepteur de la sérotransferrine sur les cellules tumorales du sein maintenues en culture.

II- LES LIGNEES CELLULAIRES ETABLIES A PARTIR DE MASTOPATHIES

Les mastoses ou mastopathies se présentent sous plusieurs formes que l'on peut classer en dystrophies fibrokystiques, fibro-adénomes ou hyperplasies. Les deux premiers types sont bénins, le troisième est une prolifération limitée et contrôlée des cellules épithéliales. Ces mastoses appelées prolifératives peuvent dégénérer en carcinome in situ.

Les cellules de mastose, ainsi que les cellules de tissus sains, nous ont été fournies par le Professeur M. Crépin du Laboratoire d'Oncologie Moléculaire de Bobigny que nous remercions vivement. Les primocultures NPM14 et NPM21 sont établies à partir de mastopathies bénignes non prolifératives. Cependant, les cultures primaires cessent rapidement de croître et constituent un matériel insuffisant et instable pour des études expérimentales. Ainsi, ces lignées NPM14 et NPM21 ont été immortalisées avec le gène T du virus SV40 pour être maintenues en culture et les clones NPM14T et NPM21T ont été obtenus (Gamby et al., 1991; Salle et al., 1991a). Certains marqueurs cellulaires restent inchangés dans les clones immortalisés par rapport aux primocultures. D'autres éléments comme les récepteurs des oestrogènes ou la sensibilité des cellules à certains facteurs de croissance sont perdus après immortalisation. Ainsi, bien que 70% des primocultures de mastose possèdent le récepteur de l'oestradiol, les lignées NPM14T et NPM21T immortalisées en sont dépourvues. De même, la prolactine stimule la croissance des cellules épithéliales de mastose en primoculture bien que l'immortalisation de ces

cellules par le gène T de SV40 supprime son effet stimulateur. Cet effet ne s'explique pas par l'absence de récepteurs puisque des récepteurs de la prolactine ont été isolés sur NPM14T et NPM21T (Foehrle, 1990).

Les récepteurs de la progestérone sont également présents sur NPM14T, mais NPM21T en possède très peu (Gamby et al. 1991).

Les cellules de mastopathies, tout comme les cellules normales et les cellules cancéreuses, sont sensibles à l'action de l'insuline et à certains facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor) par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques (Salle et al., 1991b; Veber et al., 1990).

Nous n'avons malheureusement pas pu obtenir de primocultures NPM14 et NPM21 pour effectuer une étude comparative avec les cellules immortalisées NPM14T et NPM21T.

III- LES CELLULES ISSUES DE TISSUS SAINS

Contrairement à la plupart des cellules cancéreuses, les cellules normales de glandes mammaires ne possèdent pas de récepteurs à l'oestradiol et très peu de récepteurs à la prolactine (Shiu et al., 1979, 1981).

Une lignée cellulaire de glande mammaire issue d'un individu sain, appelée HBL100, nous a été fournie par le Professeur Crépin du Centre d'Oncologie cellulaire et Moléculaire de Bobigny. Ces cellules ont été établies in vitro à partir du lait d'une Femme. Cette lignée a été immortalisée par le virus SV40 injecté au cours d'une vaccination contre la polyomélite. Les cellules HBL100 sont non tumorigènes chez la Souris nude, mais le deviennent après transfection par un plasmide contenant l'oncogène hst, permettant ainsi d'obtenir différents clones cellulaires dont la lignée HH9.

IV- CONCLUSION

Les cellules de glandes mammaires constituent un modèle expérimental intéressant pour étudier le mécanisme d'interaction de la lactotransferrine avec les cellules cancéreuses principalement pour deux raisons :

- le nombre important de lignées cellulaires en culture permet de comparer la fixation de la lactotransferrine sur des cellules normales, précancéreuses et malignes;

- la lactotransferrine étant une protéine majeure du lait, le tissu de la glande mammaire représente le modèle adéquat pour étudier le rôle de la lactotransferrine dans la prolifération cellulaire.

**MATERIELS
ET
METHODES**

MATERIELS ET METHODES

I- MATERIEL CELLULAIRE

A- LES CELLULES EPITHELIALES DE GLANDE MAMMAIRE HUMAINE

1) Culture des cellules cancéreuses

Les cellules épithéliales cancéreuses de glande mammaire humaine T47D, MCF7, BT20, VHB1 et MDAMB 231 dont les caractéristiques ont été définies plus haut (p.100), sont cultivées dans un Milieu Essentiel Minimum (MEM) avec sels d'Earles (Gibco). Ce milieu est complété avec 10 % de sérum de veau foetal, de la L-glutamine (3 g/l), de l'Hepes (4,7 g/l), du bicarbonate de sodium (2,2 g/l), de l'insuline (80 U/l) et des antibiotiques (amphotéricine B, gentamycine). Ces cellules nous ont été fournies par le Dr. Vandewalle du Laboratoire d'Endocrinologie du Centre Oscar Lambret de Lille que nous remercions. Ces cellules ont été utilisées entre le 55^{ème} et le 72^{ème} passage pour T47D, entre le 100^{ème} et 110^{ème} passage pour VHB1 et BT20. Pour les cellules MCF7, nous n'avons pas eu connaissance du nombre de passage.

Les cellules en culture forment, à confluence, un tapis cellulaire et sont maintenues en culture dans des boîtes de culture de 80 et 175 cm² (Nunc). A confluence, les cellules sont détachées par addition d'une solution de Versène. Les cellules sont ensuite diluées dans du milieu de culture contenant 10% de sérum de veau foetal et remises en culture, d'une part, dans des boîtes de culture de 80 cm² pour leur entretien et, d'autre part, en boîtes de culture de 24 ou de 6 puits (Costar et

Limbro) pour les manipulations ultérieures.

Dans toutes nos études expérimentales, les cellules sont utilisées au stade préconfluent, entre le 2^{ème} et 5^{ème} jour de culture.

2) Les cellules de mastose et de tissus sains

Les cellules de glande mammaire humaine immortalisées ont été établies à partir de mastose (NPM14T et NPM21T). La lignée cellulaire HBL100 provient de la glande mammaire d'une Femme en bonne santé. Ces cellules sont cultivées dans un milieu MEM modifié par Dubellco (DMEM) et complété avec les même éléments que ceux décrits précédemment, pour les cellules cancéreuses. Les cellules HBL100 ont été utilisées entre le 55^{ème} et le 60^{ème} passage et les cellules NPM14T et NPM21T entre le 51^{ème} et le 57^{ème} passage.

Ces cellules nous ont été gracieusement fournies par le Professeur M. Crépin du Laboratoire d'Oncologie Moléculaire de Bobigny que nous remercions.

B- ISOLEMENT ET PREPARATION DE LYMPHOCYTES HUMAINS ACTIVES

Le sang total recueilli sur héparine est centrifugé 30 min à 3.500 t/min. Le plasma est éliminé et les cellules sanguines diluées dans un volume de PBS, sont séparées sur Ficoll (Lymphoprep), après centrifugation à 1.500 t/min pendant 30 min. Le sang nous a été gracieusement fourni par le Centre de Transfusion Sanguine de Lille (Directeur: Dr. JJ. Huart).

A l'interface PBS/Lymphoprep, les macrophages, les lymphocytes et les plaquettes sont récupérés. Ces dernières sont éliminées par

centrifugation pendant 10 min à 1.200 t/min. Le culot cellulaire contenant les lymphocytes et les macrophages est resuspendu à une concentration de 5×10^6 cellules/ml, dans du milieu RPMI 1640, 25 mM Hépès pH 7,3. Les macrophages et les monocytes sont éliminés par adhérence sur des boîtes de culture de 24 puits (Nunc). Après 2 h à 37°C sous 5% CO₂ et 95% d'air, les cellules non-adhérentes (lymphocytes) sont récupérées et diluées dans le milieu de culture complété avec 10% de sérum de veau foetal, à une concentration de $1,2 \times 10^6$ cellules/ml. Les cellules sont activées avec 10 µg/ml de phytohémagglutinine (IBF) pendant trois jours à 37°C sous 5% CO₂ et 95% d'air dans les conditions précédemment décrites par Mazurier et al. (1989).

II- PREPARATION DES TRANSFERRINES

A- PREPARATION DES LACTOTRANSFERRINES

1) Purification de la lactotransferrine

La lactotransferrine humaine a été préparée selon le protocole mis au point au Laboratoire par Chéron et al. (1977) et Spik et al. (1982). Le lait est délipidé par centrifugation à 2.000g pendant 45 min. et à 4°C, puis décaséiné par précipitation de la caséine à pH 4,6 avec de l'HCl 3N. Après dialyse pendant trois jours contre de l'eau permutée, le précipité est éliminé par centrifugation à 2000g pendant 30 min à 4°C.

Le lactosérum obtenu est chromatographié à 4°C sur une colonne de SP-Sephadex C50 équilibrée dans l'acétate de sodium 0,22 M. La colonne est lavée successivement par de l'acétate de sodium 0,22 M, puis 0,4 M et 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 C-50. L'élution de la lactotransferrine est réalisée par un gradient discontinu en acétate de sodium de 0,3 à 1 M. La lactotransferrine est ensuite dialysée pendant trois jours contre de l'eau permutée, puis lyophilisée.

2) Préparation de la lactotransferrine non-saturée en fer

L'apo-lactotransferrine est préparée selon la méthode mise au point et décrite par Mazurier et Spik (1980). La lactotransferrine native est dissoute dans un tampon formiate de sodium 0,2 M, phosphate de sodium 0,2 M, EDTA 40 mM, pH 4 puis laissée au repos pendant 24 h à 4°C. La solution est ensuite dialysée contre le tampon d'utilisation.

3) Préparation de la lactotransferrine saturée en fer

La saturation en fer de la lactotransferrine est réalisée selon la méthode préconisée par Azari et Baugh (1967) et modifiée par Mazurier et Spik (1980). La lactotransferrine native est dissoute dans un tampon citrate de sodium/bicarbonate de sodium 0,1 M pH 8,2. Le fer est ajouté sous forme de citrate ferrique (260 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ dissous dans 10 ml du tampon). La quantité de fer ajoutée pour saturer totalement la protéine est de 1,6 μg par mg de protéine, ce qui représente 110 % de la quantité théorique nécessaire pour une saturation en fer complète de la lactotransferrine. Après trois heures de repos, le fer libre est éliminé par dialyse de la solution contre de l'eau, puis contre une solution d'acétate de sodium 250 mM. La protéine est repurifiée sur une colonne de SP-Sephadex C50. La colonne est lavée par un tampon acétate de sodium 400 mM et l'élution de la protéine est réalisée par de

l'acétate de sodium à 500 mM. La solution de lactotransferrine diferrique purifiée est dialysée, puis lyophilisée.

B- PREPARATION DE LA SEROTRANSFERRINE

L'aposérotransferrine est fournie par la firme Behring. Elle est saturée en fer, selon la méthode décrite pour la lactotransferrine.

C- RADIOMARQUAGE DES TRANSFERRINES

1) Marquage des transferrines à l' ^{125}I

La méthode de marquage utilisée est celle à l'Iodo-Gen décrite par la firme Pierce. Des tubes en verre sont tapissés par 100 μmoles d'Iodo-Gen mis en solution dans le chloroforme qui est ensuite évaporé sous azote.

La protéine dissoute dans le PBS (500 $\mu\text{g}/500 \mu\text{l}$) est placée dans le tube contenant l'Iodo-Gen. 2 μl d'une solution radioactive d' ^{125}I (Na^{125}I sans entraîneur, 5 mCi/50 μl , 3,7 MBq/ml, Amersham) sont additionnés. La réaction est effectuée à 4°C sous agitation. Au bout de 20 min, l'excès d'iode libre est éliminé par dessalage sur colonne de Sephadex G-25 (Pharmacia), équilibrée dans du PBS. La radioactivité spécifique est déterminée après mesure de la concentration en protéine (absorbance à 280 nm) et comptage d'une aliquote de la fraction radioactive dans un compteur multigamme (Compugamma, LKB).

2) Marquage de la lactotransferrine au ^{59}Fe

Le marquage au ^{59}Fe de la lactotransferrine est effectué en

incubant l'apolactotransferrine dans une solution de $^{59}\text{FeCl}_3$ (3-20 mCi/ml, Amersham) diluée dans du tampon citrate/bicarbonate de sodium 0,1 M pH 8,2 (Mazurier et Spik, 1980). Après trois heures d'incubation à température ambiante, le fer libre est éliminé par dessalage sur colonne de Dowex 1x2, puis sur Sephadex G-25. Le taux de saturation en fer de la protéine est calculé d'après la radioactivité spécifique du ^{59}Fe et la concentration en protéine (absorbance à 280 nm). Dans nos expériences, le rapport molaire fer/protéine est de l'ordre de 1,6, ce qui correspond à une saturation en fer de la protéine de l'ordre de 80%.

3) Double radiomarquage de la lactotransferrine

Dans le cas d'un double marquage, la lactotransferrine est marquée dans un premier temps au ^{59}Fe , puis à l' ^{125}I selon les protocoles décrits p.112 et 113.

Le rapport molaire fer/protéine est déterminé selon la radioactivité spécifique de chacun des éléments radioactifs.

D- MARQUAGE DE LA LACTOTRANSFERRINE A LA FLUORESCEINE

La méthode de couplage de la fluorescéine aux glycanes de la lactotransferrine humaine a été mise au point au Laboratoire par D. Legrand. La réaction a lieu en deux étapes :

- Dans une première étape, les résidus d'acides sialiques des glycanes de la lactotransferrine sont soumis à une oxydation périodique.
- Dans la seconde étape, les fonctions aldéhydiques créées réagissent avec la [5-(2 carbohydrazino méthyl thio acétyl) amino] fluorescéine ou HyF. Le protocole est le suivant :

5 mg de lactotransferrine humaine, dissous dans 230 μ l de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 5,6, sont mélangés à 100 μ l de periodate de sodium 0,018 M et incubés pendant 10 min à 4°C. La réaction est arrêtée par addition de 10 μ l d'éthylène glycol et la solution est dessalée sur une colonne de Sephadex G-25 équilibrée dans du PBS 0,1 M pH 7,4. Après l'oxydation ménagée des acides sialiques, la lactotransferrine est incubée avec 650 μ g d'HyF dissous dans 10 μ l de diméthylformamide, pendant 20 h à température ambiante. L'excès de réactif est éliminé par passage de la solution sur colonne de Sephadex G-25 équilibrée dans du PBS contenant 5% (v/v) de n-butanol et par dialyse contre du tampon PBS. Le nombre de molécules d'HyF fixées par molécule de lactotransferrine humaine est compris entre 1,5 et 2.

III- PREPARATION DES FRAGMENTS PEPTIDIQUES DE LA LACTOTRANSFERRINE

A- ISOLEMENT DES FRAGMENTS N- ET C-TRYPSIQUES

Les deux lobes N- et C-terminaux de la lactotransferrine humaine et le complexe N-t/C-t sont obtenus selon la technique décrite par Legrand et al. (1984, 1986):

- 1 g de lactotransferrine humaine saturée en fer, dissous dans 100 ml de tampon tris/HCl à 0,1 M pH 8,2, est hydrolysé par 50 ml de trypsine couplée au Sepharose-4B à 1mg/ml. L'incubation a lieu à 37°C, pendant 24 h sous agitation.

- Après centrifugation à 400 g pendant 5 min, le surnageant est recueilli et filtré sur filtre Millipore 0,22 μ puis concentré par ultrafiltration sur membranes Diaflo.

Dans le but de conserver le fragment N-trypsique intact, il est

nécessaire d'inhiber la quantité de trypsine présente dans la fraction d'hydrolyse par 20 μ l de diisopropylfluorophosphate (DFP) à 4°C, sous agitation pendant 2 h.

- Les hydrolysats tryptiques sont chromatographiés sur colonne de Bio-Gel P-60 (8x140 cm) dans l'acide acétique à 10% (v/v) avec un débit de 50 ml/h et un volume d'injection de 50 ml. Après dialyse, le pH est ramené à 7,6 par addition de bicarbonate d'ammonium et les fragments obtenus sont saturés en fer selon la technique décrite par Mazurier et Spik (1980). La solution est concentrée par ultrafiltration sur membranes Diaflo, puis congelée.

Les deux fragments N- et C-terminaux saturés en fer peuvent se réassocier en un complexe non-covalent lorsqu'ils sont mélangés en proportion équimolaire et que le pH est ramené à 7,5 par addition de NaOH 3 M.

B- ISOLEMENT DU GLYCOPEPTIDE N2

Le glycopeptide N2 correspondant au domaine N-II de la lactotransferrine est obtenu par hydrolyse tryptique du lobe N-t de la protéine selon le protocole décrit par Legrand et al. 1984:

- une solution à 1% (p/v) du fragment N-t dans le bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 7,8 est soumise à l'hydrolyse par la trypsine dans un rapport 1:50 (p/p), pendant 3 h à 37°C. Le précipité est éliminé par centrifugation.

- l'hydrolysats tryptique du fragment N-t est chromatographié sur colonne de Bio-Gel P60 (2x100 cm) dans du bicarbonate de sodium 0,05 M avec un débit de 4 ml/h et un volume d'injection de 4 ml.

C- ISOLEMENT DE PEPTIDES A PARTIR DU FRAGMENT N-TRYPSIQUE

Le fragment N-trypsique de la lactotransferrine (120 mg) obtenu dans les conditions décrites précédemment (p.114), est dialysé contre de l'eau pendant 6 h, puis concentré à un volume final de 50 ml. Le pH de la solution est ajusté à 4 par addition d'une solution de Tris 2 M. La solution est incubée en présence de 3 mg de la protéase V8 de *Staphylococcus aureus* (Sigma), pendant 20 h à 37°C, sous agitation.

L'hydrolysate est centrifugé à 5.000 g pour éliminer le précipité. Une aliquote de la solution est soumise à une électrophorèse en gel de polyacrylamide (gradient 8-25%), en présence de SDS (Fast-System, Pharmacia).

La solution de peptides est concentré sous vide jusqu'à un volume de 10 ml et filtrée sur 0,22 μ (Millipore). Un millilitre de la solution peptidique est purifié par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase réverse sur une colonne Zorbax ODS (25 cm de long x 0,94 cm diamètre interne) (Dupont Instrument). L'élution est réalisée par un gradient eau/acétonitrile de 0 à 50% en acétonitrile contenant 0,1% (v/v) d'acide trifluoroacétique, pendant 180 min (débit 1,5 ml/h). Les fractions sont collectées, lyophilisées et analysées en électrophorèse SDS-PAGE sur un gel d'acrylamide à 16,5% (p/v), en présence d'urée 6M, d'après la méthode de Schagger et von Jagow (1987).

L'analyse de la composition en acides aminés du peptide a été réalisée au Laboratoire par C. Brassard, après hydrolyse acide du peptide et purification des résidus d'acides aminés par HPLC (Spectra Physic 8100 équipé d'un détecteur à longueur d'onde variable, connecté à un intégrateur).

La séquence peptidique a été déterminée dans le Service de Chimie

des Biomolécules de l'Institut Pasteur de Lille (Unité associée au C.N.R.S. D-1302; Directeur: Pr. Tartar) par le Dr. P. Maes que nous remercions. Le peptide a été soumis à la dégradation d'Edman dans un séquenceur automatique en phase gazeuse (modèle 4701 Biosystem). Les dérivés phénylthiohydantoïnique (PTH) des acides aminés libérés au cours du processus de dégradation sont identifiés et quantifiés par HPLC en utilisant l'analyseur PTH-applied Biosystems 120A.

IV- INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC SON RECEPTEUR

A- LA CYTOFLUORIMETRIE DE FLUX

1) Méthode indirecte

Les cellules sont incubées à 4°C en présence de 250 nM de lactotransferrine humaine diferrique non-marquée, dans du milieu PBS additionné de Ca^{2+} et de Mg^{2+} .

0,2% de sérotransferrine, non reconnue par le récepteur (Goavec et al., 1985), sont ajoutés afin de limiter l'absorption non-spécifique de la lactotransferrine au plastique.

Après 40 min, les cellules sont lavées et les anticorps polyclonaux anti-lactotransferrine (dilution 1/40) sont ajoutés au milieu qui est incubé pendant 30 min. Les anticorps anti-IgG de Lapin marqués au FITC (dilution 1/80) sont ensuite additionnés. Après 30 min à 4°C, les cellules sont décrochées par une solution de Versène (EDTA disodique 1,25 g/l, NaCl 8 g/l, Na_2HPO_4 1,14 g/l, KH_2PO_4 200 mg/l, KCl 200 mg/l pH 7,3) et remises en suspension dans du PBS. La fixation non-spécifique des IgG est mesurée en incubant les cellules dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus, mais en absence de lactotransferrine humaine.

2) Méthode directe

Les cellules sont incubées à 4°C en présence de 250 nM de lactotransferrine marquée au FITC sur sa partie glycanique et en solution dans du PBS complété avec du Ca^{2+} (CaCl_2 0,5 mM), du Mg^{2+} (MgCl_2 0,5 mM) et avec 0,2% de sérotransferrine. Au bout de 30 min d'incubation les cellules sont lavées puis analysées au cytofluorimètre. La fixation non-spécifique de la lactotransferrine est mesurée en présence de lactotransferrine non marquée à 25 μM .

3) Analyse des résultats

La fluorescence émise par les cellules est analysée à l'aide d'un cytofluorimètre de flux (Becton-Dickinson) équipé d'un laser à argon émettant à 488 nm et d'un filtre à bande passante étroite centré sur 525 nm permettant la détection de la fluorescence verte. Les cellules, en suspension dans du tampon PBS, sont entraînées dans un flux de liquide (Isoton) et chacune d'entre elle intercepte le faisceau lumineux du laser. Chaque cellule, après interception de la lumière incidente, émet ou diffuse un certain nombre de signaux:

- la lumière diffusée sous un petit angle par rapport au rayon incident dont l'intensité est corrélée avec la taille de la cellule (forward scatter);
- la lumière diffusée à un angle droit qui est corrélé à l'importance du noyau et des inclusions cytoplasmiques dans la cellule (side scatter);
- l'intensité de fluorescence verte (FL1).

Les signaux sont transformés en données numériques et un traitement informatique permet la visualisation des résultats sous forme d'histogrammes monoparamétriques ou biparamétriques.

Sur un histogramme de fluorescence, la surface du pic de fluorescence est proportionnelle au pourcentage de cellules fluorescentes, alors que la position du pic sur l'échelle de l'intensité de fluorescence est proportionnelle au nombre de molécules fluorescentes par cellule.

B- LES TECHNIQUES DE RADIOMARQUAGE

1) Détermination des paramètres de fixation d'un ligand

Les cellules mises en culture dans des boîtes de 24 puits (Limbro) suivant les conditions décrites à la page 108, sont lavées par du PBS, puis refroidies à 4°C pendant 10 min. La lactotransferrine ou ses fragments N- et C-tryptiques marqués à l'¹²⁵I sont dilués à des concentrations comprises entre 0 et 400 nM dans du PBS, Ca²⁺, Mg²⁺ et ajoutés dans chaque puits. Les incubations sont réalisées pendant 1 h à 4°C, à raison de trois puits par concentration en protéine. La fixation non spécifique de la protéine est évaluée en ajoutant la protéine non marquée à des concentrations comprises entre 0 et 40 µM. En fin d'incubation, une aliquote de 50 µl de la solution radioactive est prélevée dans chaque puits afin de déterminer la quantité de protéine radioactive libre. Les cellules sont lavées trois fois par du PBS à 4°C, détachées par la solution de Versène et la radioactivité de chaque puits est mesurée au compteur gamma (LKB).

Le dosage des protéines membranaires des cellules effectué selon la méthode de Lowry (1951) modifiée par Peterson (1977) permet de déterminer le nombre exact de cellules par puits de culture.

La différence entre la quantité totale de ligand fixé et la quantité de ligand fixé de manière non-spécifique détermine la fixation spécifique

de la protéine sur les cellules. Les constantes de dissociation (K_d) et le nombre de sites de fixation (n) sont calculés selon la méthode de Scatchard (1949).

2) Les expériences de compétition

a) Influence du taux de saturation en fer de la lactotransferrine sur l'interaction ligand-récepteur

Afin de déterminer si le taux de saturation en fer de la lactotransferrine influence sa reconnaissance par le récepteur, des expériences de compétition sont réalisées entre 100 nM de lactotransferrine diferrique marquée à ^{125}I , d'une part, et l'apolactotransferrine, la lactotransferrine saturée en fer à 20% ou la lactotransferrine diferrique, d'autre part. Les incubations ont lieu à 4°C durant 30 min, en présence de 0 à 10 μM de chaque inhibiteur. 10 μM de desferrioxamine (Ciba) sont ajoutés lorsque les l'incubations sont réalisées avec l'apolactotransferrine pour éviter toute resaturation en fer de la protéine. Les expériences sont réalisées sur les cellules T47D préconfluentes, en boîtes de culture de 24 puits.

b) Localisation du site d'interaction

Pour localiser le site d'interaction de la lactotransferrine avec son récepteur, des expériences de compétition ont été réalisées dans les mêmes conditions que décrites ci-dessus entre la lactotransferrine humaine marquée à ^{125}I , d'une part, et 0 à 10 μM de chacun des fragments N- et C-trypsiques, du complexe N-t/C-t, du glycopeptide N2 et des peptides obtenus par hydrolyse du fragment N-trypsique par la protéase V8 de *Staphylococcus aureus*, d'autre part.

V- CARACTERISATION DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE PAR IMMUNOPRECIPITATION

Ces expériences ont été réalisées sur les cellules T47D préconfluentes et sur les lymphocytes humains activés pendant trois jours par la phytohémagglutinine.

A- MARQUAGE DES PROTEINES MEMBRANAIRES DE SURFACE

8×10^6 cellules sont lavées avec du PBS et incubées 30 min à 4°C sous agitation, en présence de 0,3 mCi de Na^{125}I et 3 billes Iodo-Beads (Pierce) utilisées comme catalyseur de la réaction. L'iode libre est éliminé par lavages successifs avec du PBS additionné de KI 1 mM. Les cellules radioactives sont solubilisées en présence de Tris-HCl 20 mM, pH 8,2, NaCl 150 mM, EDTA 2mM et 0,5% (p:v) de Nonidet P-40 contenant 1 mM de chacun de ces inhibiteurs de protéases: DFP, pepstatine A, PMSF, leupeptine. Après 1 h d'incubation à 4°C, la fraction insoluble est éliminée par centrifugation à 10.000 g pendant 30 mn.

B- IMMUNOPRECIPITATION DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE

Des anticorps spécifiques ont été utilisés pour immunoprécipiter le récepteur de la lactotransferrine présent parmi les protéines membranaires marquées à ^{125}I . Ces anticorps polyclonaux anti-récepteur nous ont été fournis par B. Leveugle (1991) que nous remercions. Ils ont été préparés au Laboratoire à partir du récepteur soluble de la lactotransferrine isolé par passage du milieu de culture

concentré de lymphocytes humains activés sur une colonne d'anticorps anti-lactotransferrine (Leveugle, 1991).

Le protocole (Fig.16, p.123) utilisé pour immunoprécipiter le récepteur de la lactotransferrine présent à la surface des cellules épithéliales T47D est le suivant:

- Les protéines membranaires marquées et solubilisées sont incubées 3 h dans le tampon Tris/HCl 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 8,2 en présence de l'anticorps anti-récepteur (dilution 1/40);
- Le complexe anticorps-récepteur est purifié par chromatographie d'affinité en batch, par addition de 10 mg de Protéine A Sepharose-CL4B (Pierce), sous agitation à 4°C pendant une nuit. Le gel de Protéine A Sepharose est récupéré par centrifugation à 500 g pendant 10 min, puis lavé soigneusement par le tampon d'incubation. Un témoin est préparé en remplaçant l'anticorps anti-récepteur par du sérum purifié de Lapin non-immunisé.
- Le récepteur de la lactotransferrine est élué par 100 µl de tampon échantillon contenant du SDS (Tris-HCl 0,075M pH 8,5, 10% (p:v) glycérol, 10% (p:v) SDS), en présence ou non de 1% de β-mercaptoéthanol (v:v). Les échantillons sont chauffés pendant 5 min à 100°C et analysés en gel de polyacrylamide à 7,5% d'après la méthode décrite par Laemmli (1970). Les témoins de masse moléculaire sont colorés à l'Amido-Schwarz et les protéines radioactives sont révélées par autoradiographie sur film X-O-Mat Am (Kodak) à -70°C.

VI- ETUDE A 37°C DE LA DESTINEE INTRACELLULAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS LES CELLULES T47D

A- ETUDE PAR MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE

Les cellules T47D cultivées en boîte de culture de 6 puits (Costar)

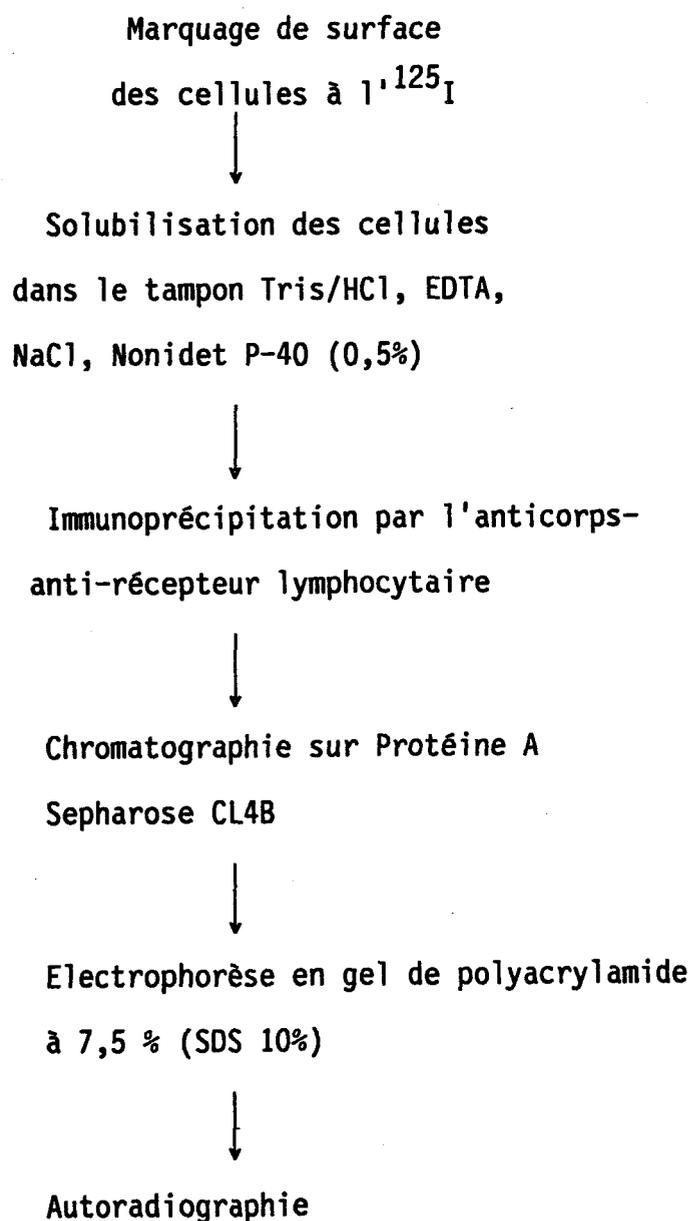


Figure 16 : Schéma du protocole d'immunoprécipitation du récepteur de la lactotransferrine présent à la surface des cellules T47D.

sont préincubées à 4°C pendant 45 min dans du PBS, Ca^{2+} , Mg^{2+} en présence de 250 nM de lactotransferrine humaine afin de saturer tous les sites de fixation à la surface cellulaire. Après trois lavages pour libérer la lactotransferrine non-fixée au récepteur, les cellules sont ramenées à 37°C pendant 60 min. Le surnageant est ensuite éliminé et les cellules sont refroidies par addition de PBS froid, puis fixées dans 2,5% (p:v) de paraformaldéhyde pendant 1 h. Les cellules fixées sont lavées par du PBS contenant 10 mM de glycine.

Toutes les incubations qui suivent sont réalisées dans du PBS complétement avec 0,2% (p:v) de BSA et 0,05% (p:v) de saponine pour perméabiliser les cellules. L'anticorps anti-lactotransferrine (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) est incubé pendant 1 h avec les cellules, suivi de l'anticorps anti-IgG de Lapin marqué au FITC (dilution 1/200).

La fixation non-spécifique des anticorps est déterminée dans les mêmes conditions que celles décrites ci dessus, mais en absence de lactotransferrine.

Les cellules sont analysées à l'aide d'un microscope de fluorescence Leitz à excitation laser (longueur d'onde d'excitation 488 nm, puissance laser 30 mW) équipé d'un filtre à 500 nm et d'un objectif à immersion (x60). Les photographies sont prises sur un film Ektachrome Asa 400 .

B- ETUDE PAR MARQUAGE DE LA LACTOTRANSFERRINE A L^{125}I

Toutes les expériences de cinétique sont réalisées sur des cellules T47D préconfluentes cultivées dans des boîtes de culture de 6 puits (Costar). Dans un premier temps, les cellules sont incubées pendant 45 min à 4°C dans du milieu de culture MEM sans sérum de veau foetal, additionné de 250 nM de lactotransferrine diferrique marquée à L^{125}I . Pendant cette étape dite de saturation des sites de fixation, la

lactotransferrine se fixe sur ses récepteurs membranaires à une température (4°C) qui inhibe tout mouvement ou métabolisme membranaire. Après 40 min, le milieu est aspiré et les cellules sont lavées trois fois par du PBS froid. Les cellules sont incubées à 37°C dans du milieu de culture préchauffé, sans lactotransferrine, pendant des temps variant de 5 à 90 min. A cette température, l'endocytose peut avoir lieu. Aux temps indiqués, les cellules sont placées dans la glace et le milieu d'incubation est éliminé, puis conservé pour analyse. Les cellules sont lavées et traitées par de la trypsine 0,25% (p:v)/EDTA 02% (p:v) pendant 30 min à 4°C. Le ligand accessible à la surface membranaire et sensible à la trypsine est recueilli dans le surnageant. Après lavage et traitement des cellules par la trypsine, la radioactivité encore liée aux cellules et dite radioactivité résistante à la trypsine, représente la lactotransferrine internalisée par les cellules.

La fixation non-spécifique de la lactotransferrine est mesurée en présence de 25 µM de lactotransferrine non marquée.

Un contrôle est également effectué à 4°C, sans incubation des cellules à 37°C, afin de déterminer le pourcentage de ligand radioactif fixé à la surface cellulaire qui ne pourra jamais être détaché par le traitement à la trypsine.

C- ANALYSE DE LA LACTOTRANSFERRINE LIBEREE DANS LE MILIEU

Une aliquote du milieu d'incubation à 37°C est prélevée, diluée dans du tampon d'échantillon (Tris/HCl 0,075 M, pH 8,5, glycérol, 10% (p:v) SDS et analysée en gel de polyacrylamide à 15%, en présence de 10% SDS selon la technique de Laemmli (1970). La lactotransferrine

radioactive est révélée par autoradiographie afin de déterminer si la lactotransferrine libérée dans le milieu est dégradée. Des témoins, de masse moléculaire standard comprise entre 94 kDa et 14 kDa sont utilisés (phosphorylase b : 94 kDa, BSA : 66 kDa, ovalbumine : 44 kDa, inhibiteur de la trypsine : 20 kDa, α -lactalbumine : 14 kDa).

Le reste du milieu d'incubation est précipité par l'acide trichloroacétique (ATCA) à 10% (p:v) pendant 10 min, puis centrifugé à 1000 g pendant 30 min. La quantité de radioactivité contenue dans la fraction acido-soluble est déterminée afin de détecter si la lactotransferrine a été dégradée. Le taux de radioactivité de la fraction acido-précipitable, renfermant les macromolécules telles que la lactotransferrine marquée à ^{125}I , est déterminé au compteur LKB.

VII-ETUDE DE LA DESTINEE INTRACELLULAIRE DU FER DE LA LACTOTRANSFERRINE, DANS LES CELLULES T47D

A- ETUDE PAR MARQUAGE DE LA LACTOTRANSFERRINE AU ^{59}Fe

Afin de déterminer si le fer fixé à la lactotransferrine pouvait être internalisé par les cellules T47D, une étude cinétique a été réalisée à 37°C en présence de lactotransferrine marquée au ^{59}Fe préalablement fixée sur le récepteur. Le protocole utilisé est identique à celui décrit pour la lactotransferrine marquée à ^{125}I . Les expériences sont réalisées dans des boîtes de culture de 6 puits (Costar).

B- CINETIQUE DE LIBERATION DU ^{59}Fe FIXE A LA LACTOTRANSFERRINE- ^{125}I

Par double marquage de la lactotransferrine à ^{125}I et au ^{59}Fe , nous avons suivi simultanément la destinée de la protéine et de son fer

dans les cellules T47D, à 37°C.

Les cellules T47D préconfluentes sont préincubées à 4°C pendant 45 min, avec 250 nM de lactotransferrine marquée à l'¹²⁵I et au ⁵⁹Fe, afin de saturer tous les sites de fixation de la lactotransferrine à la surface cellulaire. Après lavage, les cellules sont placées à 37°C de 5 à 90 min, dans du milieu MEM contenant de 100 µM de nitriloacétate pour chélater le fer susceptible d'être libéré de la lactotransferrine. Aux temps indiqués, les cellules sont lavées et la radioactivité associée aux cellules est déterminée. En fonction des radioactivités spécifiques de chaque élément radioactif, le rapport molaire fer/protéine est calculé.

Afin de déterminer si le mécanisme de libération du fer de la lactotransferrine est influencé par la température, une cinétique a été réalisée à 4°C selon le même protocole que ci-dessus.

Dans le but de vérifier que le nitriloacétate n'influence pas la libération du fer de la lactotransferrine, la lactotransferrine doublement marquée (rapport molaire fer/protéine= 1,6) a été incubée en présence de 100µM de nitriloacétate, mais en absence de cellules. Après 90 min d'incubation, la lactotransferrine est chromatographiée sur colonne de SP Sephadex C50. Le rapport fer/protéine de la lactotransferrine purifiée est déterminé par comptage de la radioactivité. Ce taux est identique à celui de la lactotransferrine qui a été introduite au début de l'incubation (fer/protéine= 1,6) suggérant que le fer n'est pas dissocié spontanément de la lactotransferrine sous l'action du nitriloacétate.

RESULTATS

**MISE EN EVIDENCE DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE
SUR LES CELLULES EPITHELIALES CANCEREUSES T47D**

INTRODUCTION

Dans ce chapitre, nous avons recherché la présence du récepteur de la lactotransferrine à la surface de cellules épithéliales cancéreuses de la glande mammaire humaine T47D. Ces cellules se cultivent parfaitement in vitro et un nombre important de cellules peut être ainsi obtenu en vue de réaliser différentes études comparatives. Les principales caractéristiques des cellules T47D sont décrites dans le Tableau VI (p.102). De nombreux travaux ont été réalisés sur l'étude de récepteurs hormonaux présents sur ces cellules. Au cours de nos expériences, les cellules T47D ont été utilisées en phase exponentielle de croissance, entre les passages 57 à 80.

Nous avons mis en évidence par cytofluorimétrie de flux la fixation de la lactotransferrine humaine sur les cellules, d'une part, à l'aide d'anticorps anti-lactotransferrine et, d'autre part, en utilisant la lactotransferrine couplée sur sa partie glycanique à un dérivé de la fluorescéine (HyF), selon la technique décrite à la page 113. Les paramètres de fixation de la lactotransferrine ont été déterminés par les techniques de radiomarquage. Des expériences d'inhibition réalisées en présence de lactotransferrine avec des taux de saturation en fer variant de 0 à 100% ont été effectuées afin de déterminer si le taux de saturation en fer de la protéine ne modifiait pas son interaction avec le récepteur. Le récepteur de la lactotransferrine présent sur les cellules T47D a été identifié par cytofluorimétrie, en utilisant l'anticorps polyclonal dirigé contre le récepteur lymphocytaire de la

lactotransferrine, préparé au Laboratoire par Béatrice Leveugle (1991). Par immunoprécipitation et autoradiographie, nous avons visualisé le récepteur de la lactotransferrine présent à la surface cellulaire de la lignée T47D.

I- ETUDE DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LES CELLULES T47D

A- ETUDE PAR CYTOFLUORIMETRIE DE FLUX

1) Méthode indirecte

L'étude de la fixation de la lactotransferrine humaine sur les cellules épithéliales cancéreuses T47D a été réalisée par cytofluorimétrie de flux, par technique indirecte, selon la technique décrite à la page 117. Cette technique immunocytochimique fondée sur l'utilisation d'anticorps de Lapin anti-lactotransferrine et d'anticorps de Chèvre anti-IgG de Lapin couplés à la fluorescéine, permet de détecter la fixation de faible quantité de lactotransferrine sur les cellules, par amplification de la réaction.

L'histogramme A de la figure 17 (p.130) représente l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cellules. Le pic 1 est un pic témoin illustrant la fixation non-spécifique des IgG sur les cellules. Le pic 2 a été obtenu en préincubant les cellules en présence de 20 $\mu\text{g/ml}$ de lactotransferrine, puis en présence d'anticorps anti-lactotransferrine. Le pic 2 est décalé vers de plus hautes intensités de fluorescence par rapport au pic 1 (témoin), ce qui suggère que la lactotransferrine humaine s'est fixée sur les cellules T47D.

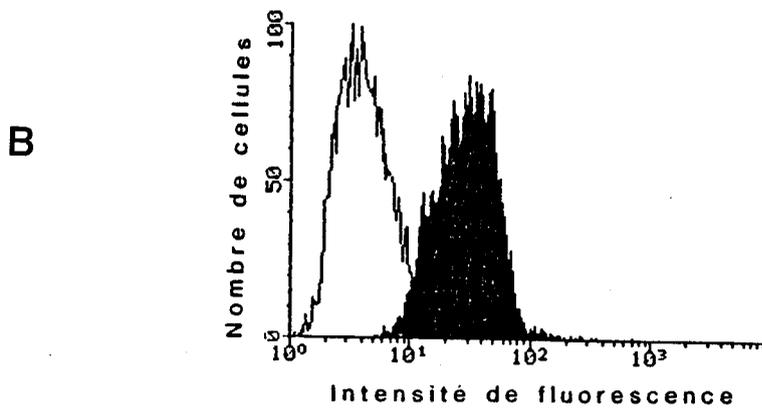
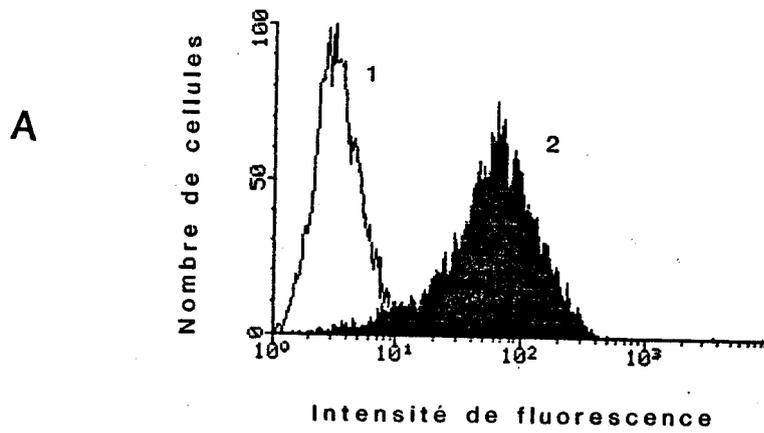


Figure 17 : Etude par cytofluorimétrie de flux de la fixation de la lactotransferrine (LTF) humaine sur les cellules T47D :

A- technique indirecte (Ac anti-LTF)

Pic 1 : témoin

B- technique directe (LTF-HyF)

Pic 2 : fixation de la LTF

2) Méthode directe

La technique indirecte de cytofluorimétrie ne permet pas d'estimer la fixation non-spécifique de la lactotransferrine sur les cellules. Nous avons donc étudié la fixation de la lactotransferrine par technique directe en couplant la protéine à la fluorescéine. Legrand et al. (1991) ont démontré que la fixation de la lactotransferrine sur les lymphocytes activés était inhibée lorsque la fluorescéine est couplée à la partie protéique de la lactotransferrine. Nous avons donc utilisé la lactotransferrine marquée avec un dérivé de la fluorescéine (HyF) sur ses glycanes selon le protocole mis au point au Laboratoire par Legrand et décrit à la page 113.

Les résultats sont présentés dans l'histogramme B de la figure 17 (p.130). Le pic 1 est un témoin de la fixation non-spécifique de la lactotransferrine obtenu en incubant les cellules avec 20 $\mu\text{g/ml}$ de lactotransferrine-HyF et 2 mg/ml de lactotransferrine non-marquée. Le décalage du pic 2 vers de plus hautes intensités de fluorescence par comparaison au pic 1 démontre la fixation spécifique de la lactotransferrine sur les cellules T47D. A des concentrations en lactotransferrine-HyF supérieures à 20 $\mu\text{g/ml}$, nous n'avons observé aucune augmentation de l'intensité de fluorescence, suggérant qu'à ces concentrations tous les sites de fixation sont saturés.

B- DETERMINATION DES PARAMETRES DE FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE MARQUEE A L'¹²⁵I

La fixation de la lactotransferrine humaine saturée en fer et marquée à l'¹²⁵I a été étudiée sur des cellules T47D préconfluentes, selon le protocole décrit à la page 119. La fixation non-spécifique de la

lactotransferrine est déterminée en présence lactotransferrine non-marquée, puis soustraite de la quantité totale de ligand fixé. Elle représente 18% de la radioactivité totale liée aux cellules. La figure 18A (p.133) montre que la fixation spécifique de la lactotransferrine sur les cellules T47D augmente linéairement aux faibles concentrations, puis devient saturable à partir de 200 nM.

La représentation de Scatchard (Fig.18B, p.133) indique, dans la zone de concentration utilisée, la présence d'une seule classe de sites. La constante de dissociation est de l'ordre de 120 nM et le nombre de sites de fixation d'environ 1.2×10^6 sites/cellule.

C- INHIBITION DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE DIFERRIQUE

Afin d'étudier si le degré de saturation en fer ne modifie pas l'interaction de la lactotransferrine avec son récepteur, des expériences d'inhibition de la fixation de la lactotransferrine marquée à ^{125}I , sur les cellules T47D ont été effectuées, selon la technique décrite à la page 122. Cette inhibition a été réalisée en présence d'apolactotransferrine (0% de saturation en fer), de lactotransferrine native (20% de saturation) et de lactotransferrine diferrique (100% de saturation) non marquées. L'addition de chacune de ces protéines, à des concentrations comprises entre 0 et 10 μM , entraîne une perte progressive de la fixation de la lactotransferrine- ^{125}I diferrique sur le récepteur (Fig.19, p.134). Les profils d'inhibition sont similaires pour chacun des inhibiteurs. Un maximum de 75% d'inhibition est atteint en présence de 10 μM de chacune des lactotransferrines non-marquées.

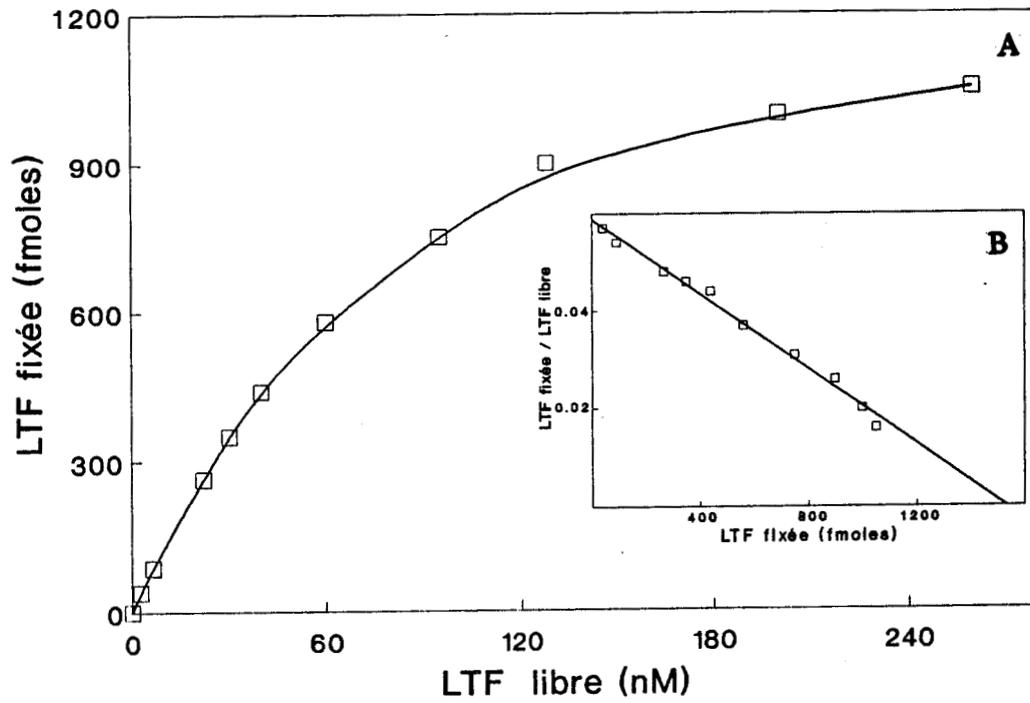


Figure 18 : Fixation de la lactotransferrine humaine diferrique sur les cellules T47D :

A : courbe de saturation

B : représentation de Scatchard

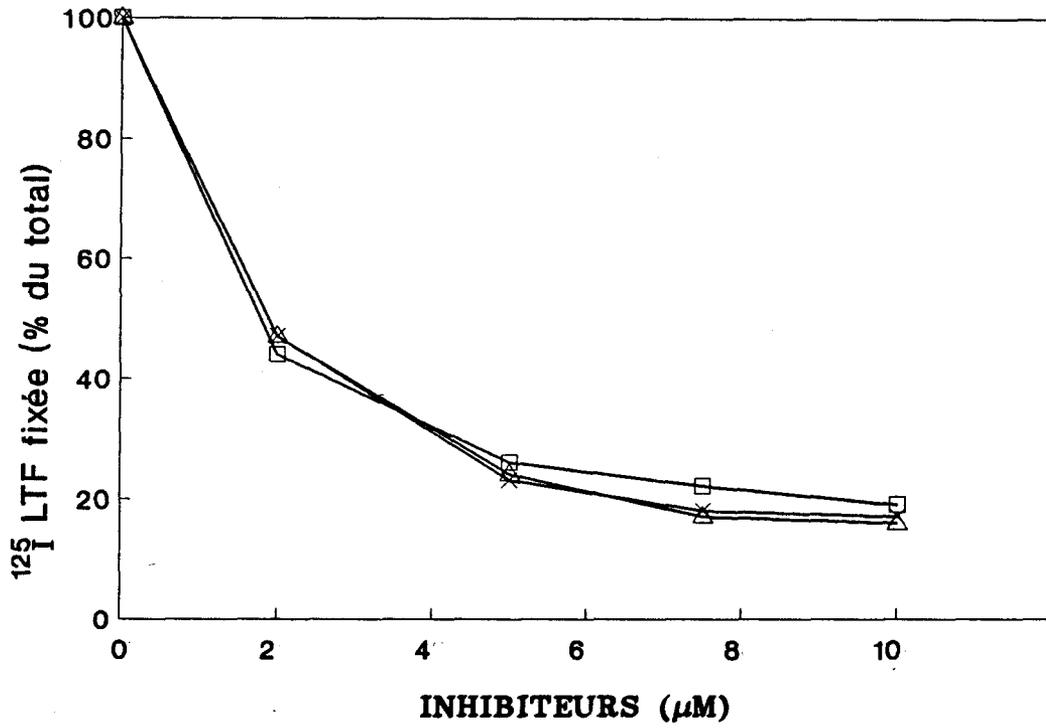


Figure 19 : Inhibition de la fixation de la lactotransferrine- ^{125}I diferrrique sur les cellules T47D par: l'apolactotranferrine (\square - \square), la lactotransferrine partiellement saturée (\times - \times) et la lactotransferrine diferrrique (Δ - Δ).

D- CONCLUSION

L'ensemble de ces résultats démontrent que la lactotransferrine humaine se fixe d'une manière saturable et spécifique sur les cellules cancéreuses T47D avec une constante de dissociation ($K_d = 120 \pm 20$ nM) comparable à celle décrite pour les lymphocytes humains activés ($K_d = 80 \pm 15$ nM). Le fait que le nombre de sites de fixation soit trois fois plus élevé sur les cellules épithéliales T47D ($n = 1,2 \times 10^6 \pm 0,03$) que sur les lymphocytes ($n = 4 \times 10^5 \pm 0,01$) (Mazurier et al., 1989) peut s'expliquer par des différences de taille entre les deux cellules. En effet, les cellules T47D présentent une surface cellulaire, accessible à la lactotransferrine, environ deux fois plus importante que les lymphocytes.

L'apolactotransferrine et la lactotransferrine saturée à 20% inhibent la fixation de la lactotransferrine- ^{125}I diférique de la même façon que la lactotransferrine diférique non marquée. Ce résultat suggère que la reconnaissance de la lactotransferrine par le récepteur est indépendante du taux de saturation en fer de la protéine. Dans le cas du récepteur de la sérotransferrine, l'aposérotransferrine se fixe à pH neutre sur le même récepteur que la sérotransferrine saturée en fer mais avec une affinité 10 fois plus faible (Klausner et al., 1983). Par conséquent, l'interaction de la lactotransferrine et de la sérotransferrine, avec leur récepteur respectif, semble être spécifique de chacune de ces protéines.

II- IDENTIFICATION DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE PRESENT SUR LES CELLULES T47D

A- CARACTERISATION DU RECEPTEUR PAR CYTOFLUORIMETRIE DE FLUX

La fixation de l'anticorps dirigé contre le récepteur lymphocytaire de la lactotransferrine a été étudiée par cytofluorimétrie sur les cellules T47D et comparée à la fixation de ce même anticorps sur les lymphocytes humains activés.

Sur les histogrammes de la figure 20 (p.137) le pic 1 est un témoin de la fixation non-spécifique des IgG sur les cellules, obtenu en remplaçant l'anticorps anti-récepteur par du sérum de Lapin non-immunisé. Le déplacement du pic 2 vers de plus hautes intensités de fluorescence par rapport au pic 1, démontre que l'anticorps anti-récepteur lymphocytaire reconnaît spécifiquement les cellules T47D (Fig.20 A, p.137). Les profils de fixation de l'anticorps anti-récepteur obtenus sont similaires pour les cellules T47D et les lymphocytes humains activés (Fig.20 B, p.137), suggérant que l'anticorps anti-récepteur reconnaît avec une affinité voisine les deux types cellulaires.

B- VISUALISATION DU RECEPTEUR PAR IMMUNOPRECIPITATION

Le protocole mis au point pour visualiser le récepteur de la lactotransferrine présent sur les cellules T47D est décrit dans la figure 16 (p.121), du chapitre "Matériels et Méthodes". Les protéines de surface sont marquées à l'¹²⁵I et solubilisées par le Nonidet P-40 en présence d'inhibiteurs de protéases. Après immunoprécipitation par l'anticorps anti-récepteur lymphocytaire, la protéine reconnue

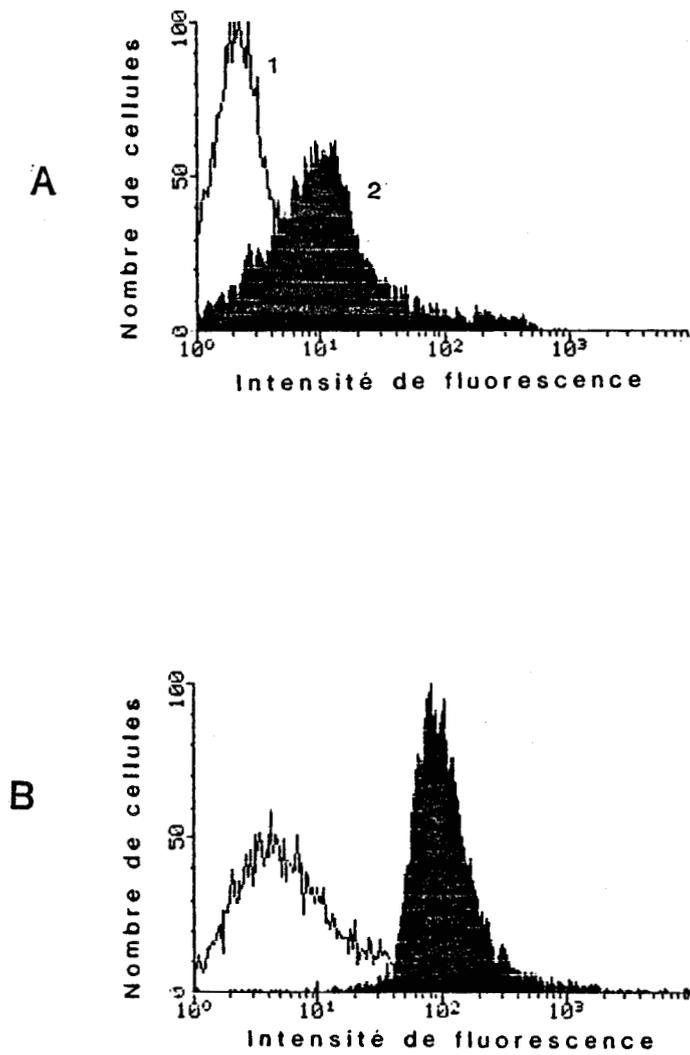


Figure 20 : Caractérisation par cytofluorimétrie de flux du récepteur de la lactotransferrine présent à la surface des cellules T47D (A) et des lymphocytes activés (B), en utilisant l'anticorps anti-récepteur lymphocytaire.

Pic 1 : témoin

Pic 2 : fixation de l'anticorps anti-récepteur

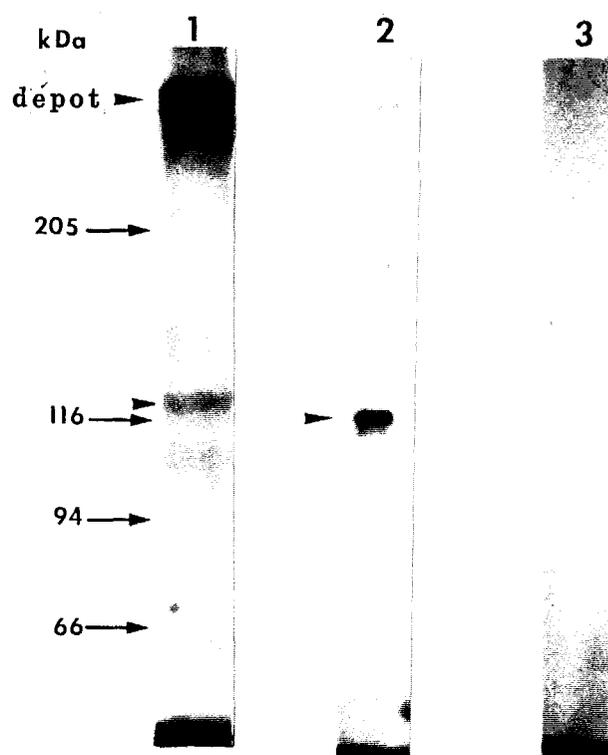


Figure 21 : Identification du récepteur de la lactotransferrine présent à la surface des cellules T47D (1) et à la surface des lymphocytes humains activés (2), à l'aide de l'anticorps anti-récepteur [gel de polyacrylamide à 7,5%, témoin (3)].

spécifiquement par cet anticorps est purifiée par chromatographie d'affinité sur Protéine A-Sepharose CL4B (p.121). L'autoradiogramme obtenu, après électrophorèse en gel de polyacrylamide à 7,5% dans des conditions non réductrices, met en évidence une seule bande correspondant à une masse moléculaire de 126 kDa pour les cellules T47D (piste 1) et de 110 kDa pour les lymphocytes humains activés (piste 2) (Fig.21, p.138). Les profils sont identiques lorsque l'électrophorèse est effectuée dans des conditions réductrices en présence de β -mercaptoéthanol.

Un contrôle de la fixation non-spécifique des IgG sur ces cellules, réalisé en remplaçant l'anticorps anti-récepteur par du sérum de Lapin non immunisé, ne révèle aucune protéine radioactive (piste 3).

C- CONCLUSION

La fixation de l'anticorps anti-récepteur lymphocytaire, mesurée par cytofluorimétrie de flux sur les cellules T47D, suggère que le récepteur présent sur ces cellules possède des épitopes communs avec celui isolé par Mazurier et al. (1989) sur les lymphocytes humains activés. Par immunoprécipitation sur protéine A-Sépharose, le récepteur des cellules T47D a été caractérisé comme une protéine monocaténaire de masse moléculaire apparente de 126 kDa. Sur les lymphocytes humains activés et les entérocytes de Souris, le récepteur a été visualisé sous la forme d'une bande protéique de 110 kDa et 130 kDa, respectivement. La différence de masse moléculaire entre le récepteur présent sur les cellules T47D et celui des lymphocytes activés pourrait s'expliquer par des variations de glycosylation du récepteur.

De plus, les cellules T47D et les lymphocytes humains activés possèdent un environnement membranaire distinct et, par conséquent,

des différences dans la capacité de solubilisation des membranes pourraient expliquer les variations de masse moléculaire du récepteur présent sur ces deux types de cellules.

III- CONCLUSION

Nous avons mis en évidence, pour la première fois, la présence du récepteur de la lactotransferrine sur les cellules cancéreuses T47D de glande mammaire humaine. Ce récepteur possède des caractéristiques immunologiques et fonctionnelles comparables à celles déterminées sur les lymphocytes humains activés. Tout comme pour les entérocytes de Souris (Hu et al., 1988) et pour la lignée entérocytaire humaine HT29 (Derisbourg, 1991), les cellules épithéliales T47D fixent la lactotransferrine, indépendamment du taux de saturation en fer de la protéine.

**RECHERCHE DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR
DIFFERENTES LIGNEES CELLULAIRES DE GLANDE MAMMAIRE HUMAINE**

INTRODUCTION

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que le récepteur de la lactotransferrine était présent sur les cellules épithéliales cancéreuses de glande mammaire humaine T47D et qu'il possédait des propriétés voisines de celui caractérisé sur les lymphocytes activés.

Au cours de cette étude, nous avons recherché si d'autres lignées de glande mammaire, cancéreuses ou non, possédaient le récepteur afin d'établir si la lactotransferrine pouvait être utilisée comme marqueur potentiel de la cancérisation.

Nous avons utilisé comme modèles cellulaires, les lignées suivantes qui nous ont été données par le Professeur Crépin de Bobigny et par le Docteur Vandewalle de Lille :

- **les lignées cancéreuses** issues de métastases (MCF7, MDAMB 231) et de tumeurs primaires de la glande mammaire (BT20, VHB1) ainsi que la lignée HH9. Cette dernière lignée, tumorigène chez la souris nude, provient de la lignée HBL100 issue d'un tissu sain qui a été transfectée par l'oncogène hst.
- **les lignées représentatives d'un état précancéreux** telles que la lignée HBL100 issue du lait d'une Femme saine et les lignées NPM14T et NPM21T établies à partir de mastopathies bénignes non prolifératives. Les cellules NPM14T et NPM21T sont immortalisées par le gène T du virus SV40 pour être maintenues en culture. Les principales propriétés de ces cellules ont été décrites p.100.

I- ETUDE DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LES CELLULES DE GLANDE MAMMAIRE HUMAINE

A- ETUDE PAR CYTOFLUORIMETRIE DE FLUX

1) Les cellules cancéreuses

a- Méthode indirecte

Cette technique, identique à celle décrite pour les cellules T47D, utilise d'une part, des anticorps anti-lactotransferrine capables de reconnaître spécifiquement la lactotransferrine humaine fixée sur les cellules et d'autre part, des anticorps anti-IgG marqués à la fluorescéine. Les histogrammes de fluorescence, obtenus pour les différentes lignées cellulaires de glande mammaire humaine, sont présentés dans la figure 22 (p.143). Le pic 1 est un témoin de la fixation non spécifique des IgG sur les cellules. Nous observons un déplacement du pic 2 vers de plus hautes intensités de fluorescence, traduisant une augmentation de l'intensité de fluorescence des cellules, ce qui suggère que la lactotransferrine s'est fixée sur toutes les lignées cancéreuses étudiées (MCF7, MDAMB 231, BT20, VHB1 et HH9).

b- Méthode directe

Le pic 1 des histogrammes de la figure 23 (p.145) est un témoin de la fixation non-spécifique de la lactotransferrine, déterminée en incubant les cellules en présence de 20 $\mu\text{g/ml}$ de lactotransferrine couplée à l'HyF et de 100 excès molaire de lactotransferrine non-fluorescente. Le pic 2 illustre la fixation de la lactotransferrine-HyF sur toutes les cellules cancéreuses testées. Ces résultats confirment donc ceux obtenus par technique indirecte.

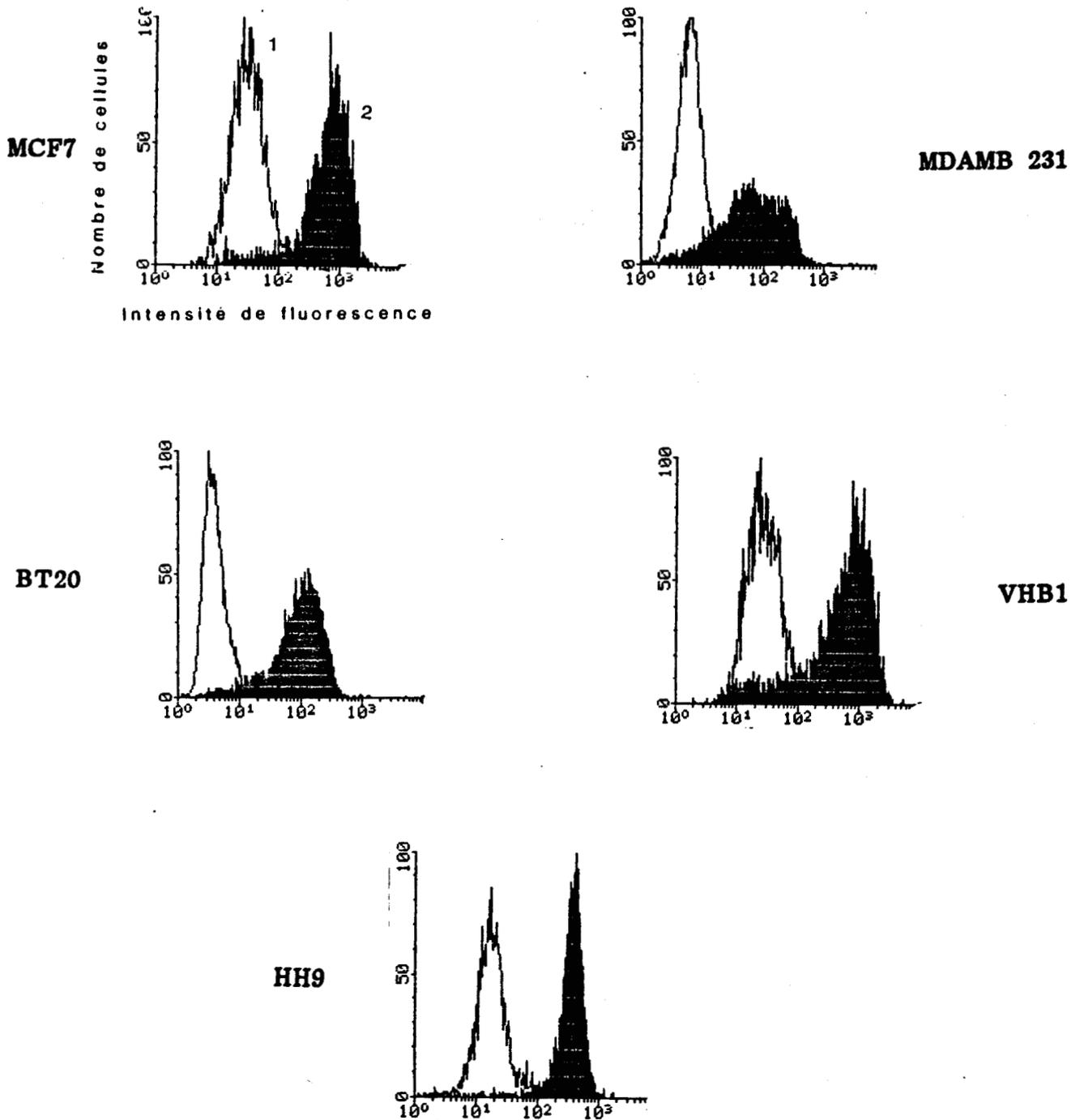


Figure 22 : Etude de la fixation de la lactotransferrine sur les cellules cancéreuses MCF7, HH9, MDAMB 231, BT20 et VHB1, par cytofluorimétrie de flux, par technique indirecte:

Pic 1 : témoin

Pic 2 : fixation de la lactotransferrine

2) Les cellules de mastoses

a- Méthode indirecte

Les profils de fluorescence, obtenus sur les cellules de mastose NPM14T et NPM21T (Fig.24 A et B, p.146), sont semblables à ceux précédemment déterminés pour les cellules cancéreuses. Ces résultats suggèrent la fixation spécifique de la lactotransferrine humaine sur les lignées précancéreuses NPM14T et NPM21T.

b- Méthode directe

Les histogrammes de la figure 24 D et E (p.146) démontrent que la lactotransferrine couplée à l'HyF est reconnue par les cellules NPM14T et NPM21T, confirmant ainsi les résultats précédents obtenus par technique indirecte.

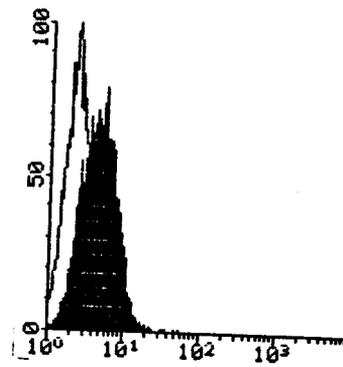
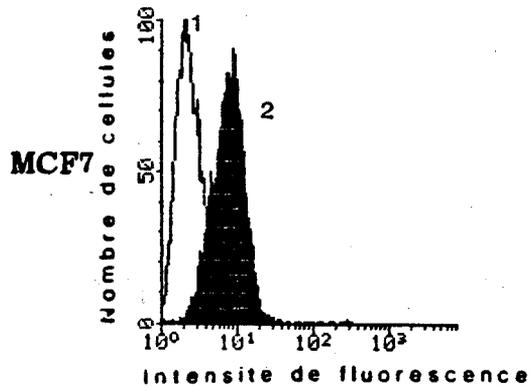
3) Les cellules issues de tissus sains

a- Méthode indirecte

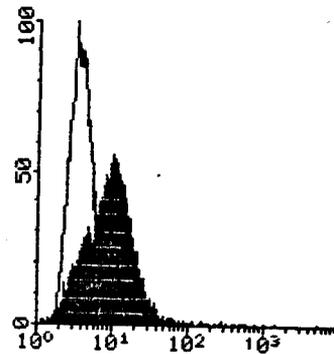
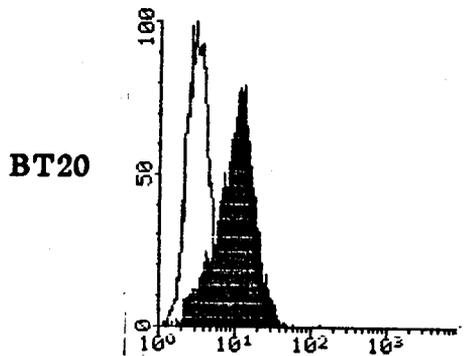
Le décalage du pic 2 (Fig.24 C, p.146) par rapport au pic témoin 1 reflète la fixation de la lactotransferrine sur les cellules HBL100.

b- Méthode directe

L'histogramme de fluorescence présenté dans la figure 24 F (p.146) montre que les cellules HBL100 fixent la lactotransferrine-HyF de manière identique aux cellules cancéreuses et aux cellules de mastose.



MDAMB 231



VHB1

HH9

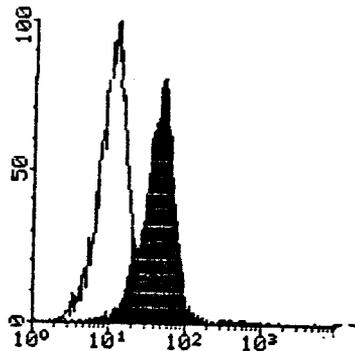


Figure 23 : Etude de la fixation de la lactotransferrine sur les cellules cancéreuses MCF7, HH9, MDAMB 231, BT20 et VHB1, par cytofluorimétrie de flux, par technique directe:

Pic 1 : témoin

Pic 2 : fixation de la lactotransferrine-HyF

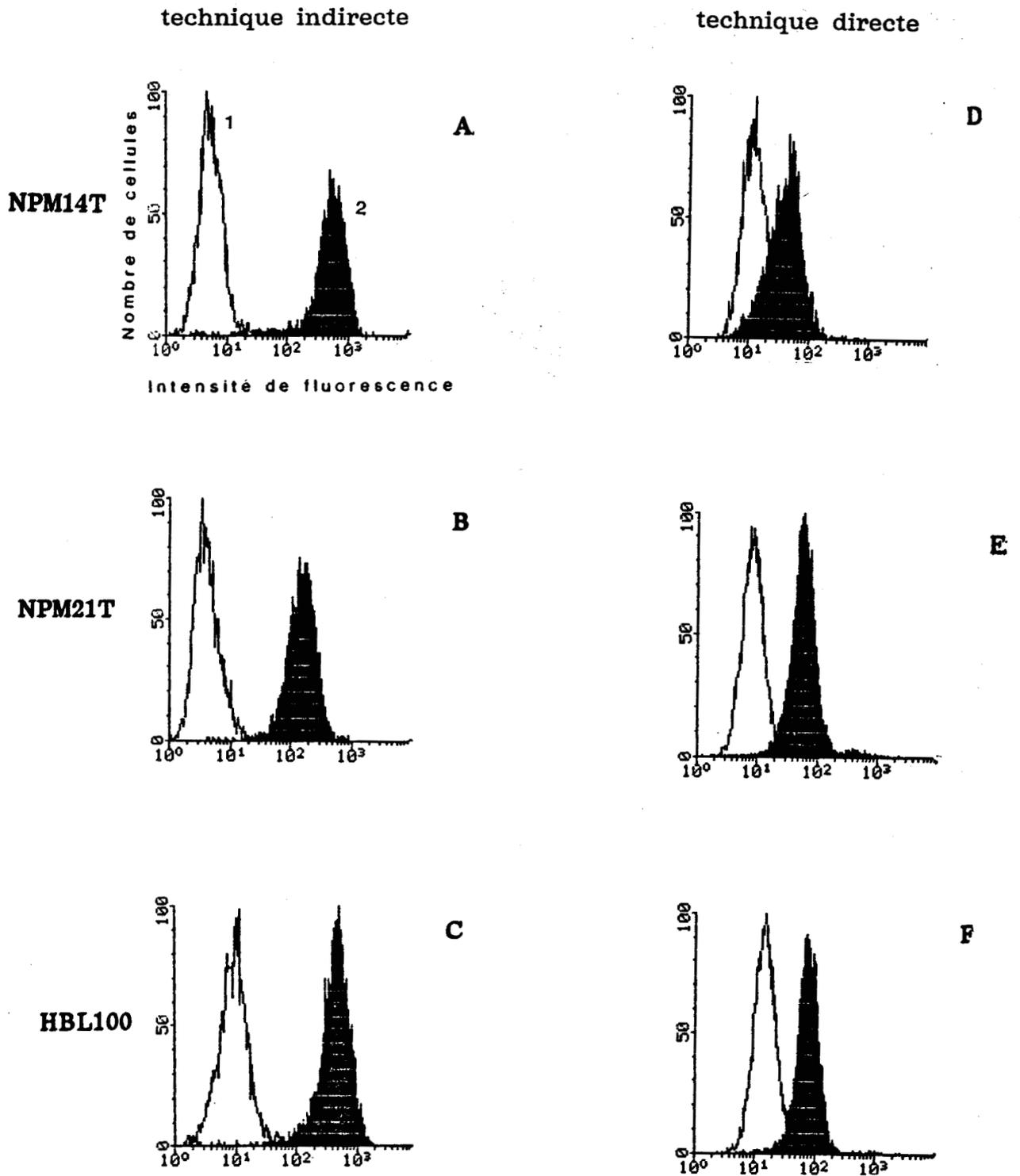


Figure 24 : Etude de la fixation de la lactotransferrine sur les cellules de mastose NPM14T et NPM21T et celles de tissus sains HBL100, par cytofluorimétrie de flux, par technique indirecte (A, B, C) et directe (D, E, F).

B- DETERMINATION DES PARAMETRES DE FIXATION

1) Les cellules cancéreuses

La fixation de la lactotransferrine-¹²⁵I humaine saturée en fer sur les différentes cellules cancéreuses est représentée dans les figures 25, 26 et 27 (p.148 à 150) en fonction des différentes concentrations en lactotransferrine introduite dans le milieu d'incubation. Les courbes de saturation montrent que la fixation de la lactotransferrine-¹²⁵I sur les cellules MCF7, BT20, VHB1 et HH9, est saturable à partir de 200 nM (Fig.25 A, p.148 et 26 A, p.149) .

La linéarisation des résultats selon la méthode de Scatchard (Fig.25 B) a permis de déterminer la constante de dissociation (K_d) et le nombre de sites de fixation (n) de la lactotransferrine sur ces cellules. Ces valeurs sont regroupées dans le Tableau VII (p.151). Le K_d est de 190 +/- 30 nM pour MCF7, de 160 +/- 20 et 288 +/- 30 nM pour, respectivement, BT20 et VHB1 et de 340 +/- 10 nM pour HH9. Le nombre de sites de fixation varie de $1,18 \times 10^6$ +/- 0,02 à $1,21 \times 10^6$ +/- 0,03 sites/cellule.

Ces paramètres sont très proches pour les différentes cellules étudiées, quelque soit leur origine (métastases ou tumeur primaire), et comparables aux valeurs déjà déterminées pour les cellules T47D.

Pour la lignée MDAMB 231, la fixation de la lactotransferrine est difficilement saturable et n'atteint un plateau qu'à des concentrations très élevées de l'ordre de 600 nM (Fig.27, p.150). La constante de dissociation est de 960 +/- 40 nM , soit une affinité environ 6 fois plus faible que celle obtenue pour les autres lignées cancéreuses. Le nombre de sites est 5 fois plus grand, de l'ordre de $4,8 \times 10^6$ +/- sites/cellule.

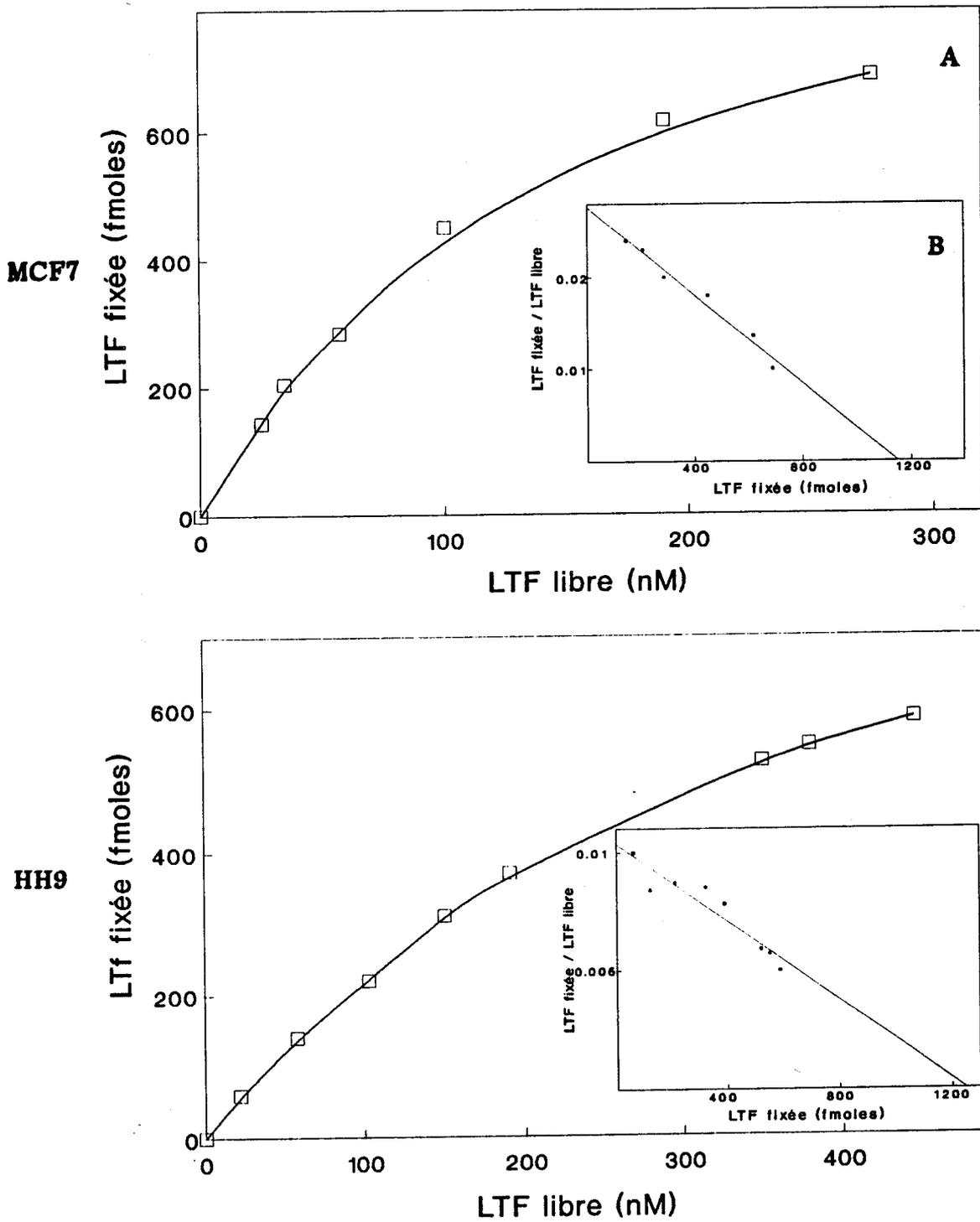


Figure 25 : Fixation de la lactotransferrine-¹²⁵I humaine sur les cellules cancéreuses MCF7 et HH9 :

A : courbe de saturation

B : représentation de Scatchard

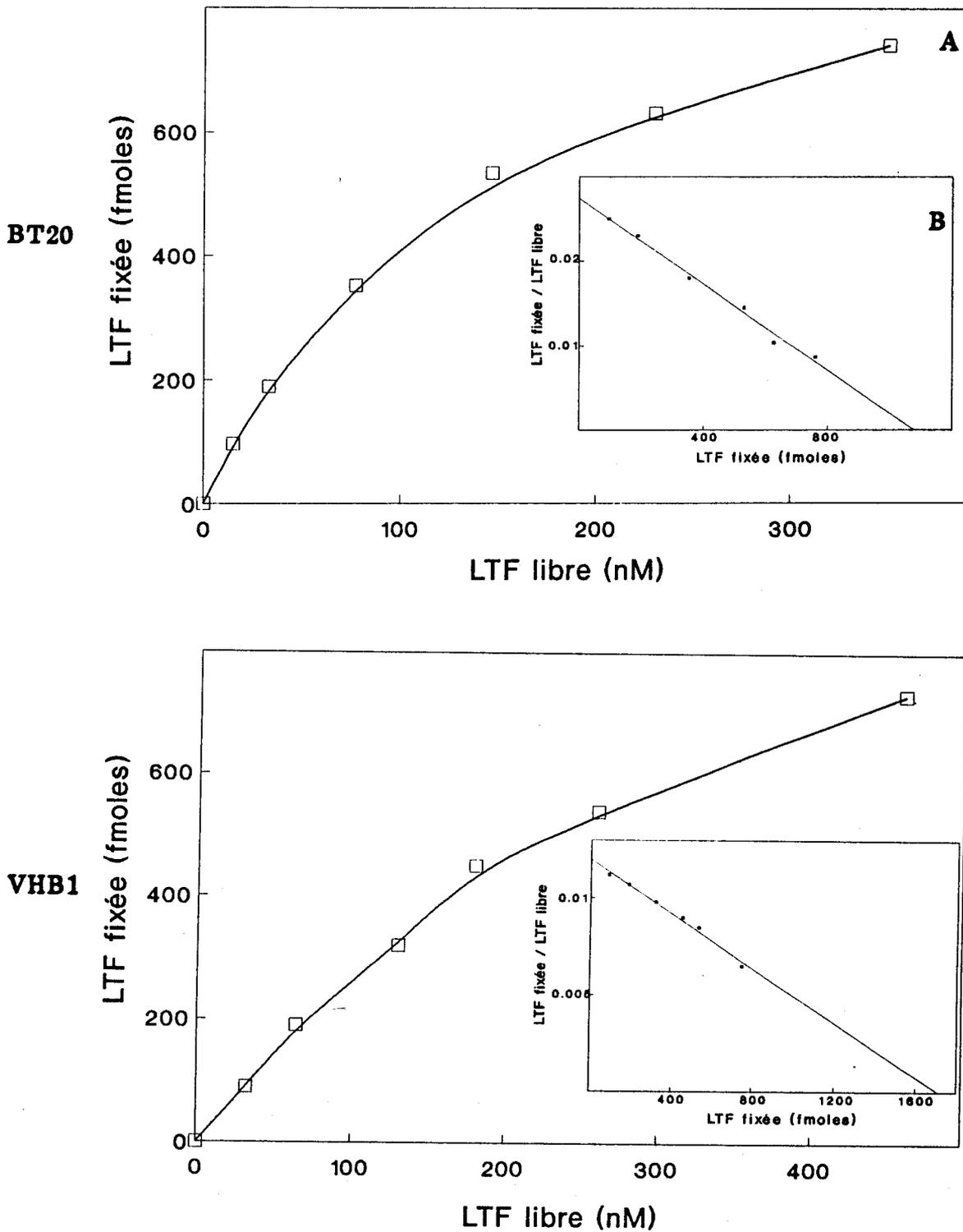


Figure 26 : Fixation de la lactotransferrine-¹²⁵I humaine sur les cellules cancéreuses BT20 et VHB1 :

A : courbe de saturation

B : représentation de Scatchard

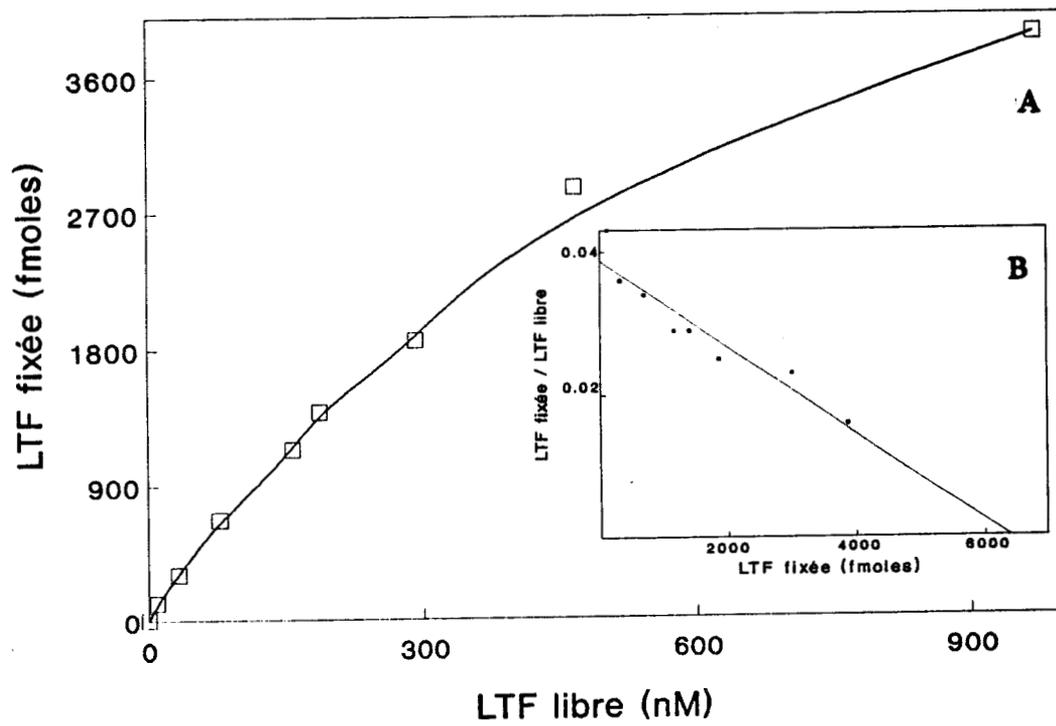


Figure 27 : Fixation de la lactotransferrine-¹²⁵I humaine sur les cellules cancéreuses MDAMB 231 :

A : courbe de saturation

B : représentation de Scatchard

Tableau VII : Paramètres de fixation de la lactotransferrine humaine sur les cellules cancéreuses, sur les cellules de mastose et sur les cellules de tissus sains.

Cellule	K_d (nM)	$n \times 10^6$ (sites/cellule)
T47D	120 +/- 20	1,2 +/- 0,03
MCF7	190 +/- 30	1,18 +/- 0,02
HH9	340 +/- 10	1,21 +/- 0,02
BT20	160 +/- 20	1,18 +/- 0,03
VHB1	288 +/- 30	1,21 +/- 0,03
MDAMB-231	960 +/- 40	4,8 +/- 0,03
NPM14T	288 +/- 30	1,4 +/- 0,02
NPM21T	350 +/- 20	1,6 +/- 0,01
HBL100	216 +/- 30	1,4 +/- 0,02

2) Les cellules de mastose

Les constantes de dissociation de la fixation de la lactotransferrine sur NPM14T (Fig.28 A, p.153) et NPM21T (Fig.28 B, p.153) sont, respectivement, de 288 ± 30 nM et 350 ± 20 nM, valeurs comparables à celles trouvées dans le cas des cellules cancéreuses T47D, MCF7, BT20, VHB1 et HH9. Le nombre de sites n'est pas modifié et varie de $1,4 \times 10^6 \pm 0,02$ sites/cellule pour NPM21T à $1,6 \times 10^6 \pm 0,01$ sites/cellule pour NPM14T.

3) Les cellules de tissus sains

Les cellules HBL100 fixent spécifiquement la lactotransferrine humaine avec une constante de dissociation de 216 ± 30 nM et un nombre de sites par cellule de $1,4 \times 10^6 \pm 0,02$, comparables aux paramètres déterminés pour les cellules cancéreuses et pour les cellules de mastopathie (Fig.29, p.154) .

D- CONCLUSION

Les différentes lignées cancéreuses, à l'exception de la lignée MDAMB 231, les cellules de mastose et les cellules issues de tissus sains reconnaissent de la même façon, la lactotransferrine humaine saturée en fer (Tableau VII, p.151). L'affinité et le nombre de sites sont élevés, comparables à ceux obtenus pour les lignées T47D et les lymphocytes activés (Mazurier et al., 1989), suggérant l'existence d'un récepteur similaire sur ces différentes cellules.

Seules les cellules MDAMB 231 fixent la lactotransferrine avec une affinité 6 fois plus faible que celle déterminée pour T47D et un nombre de sites 5 fois plus élevé. Par conséquent, il semblerait que les cellules

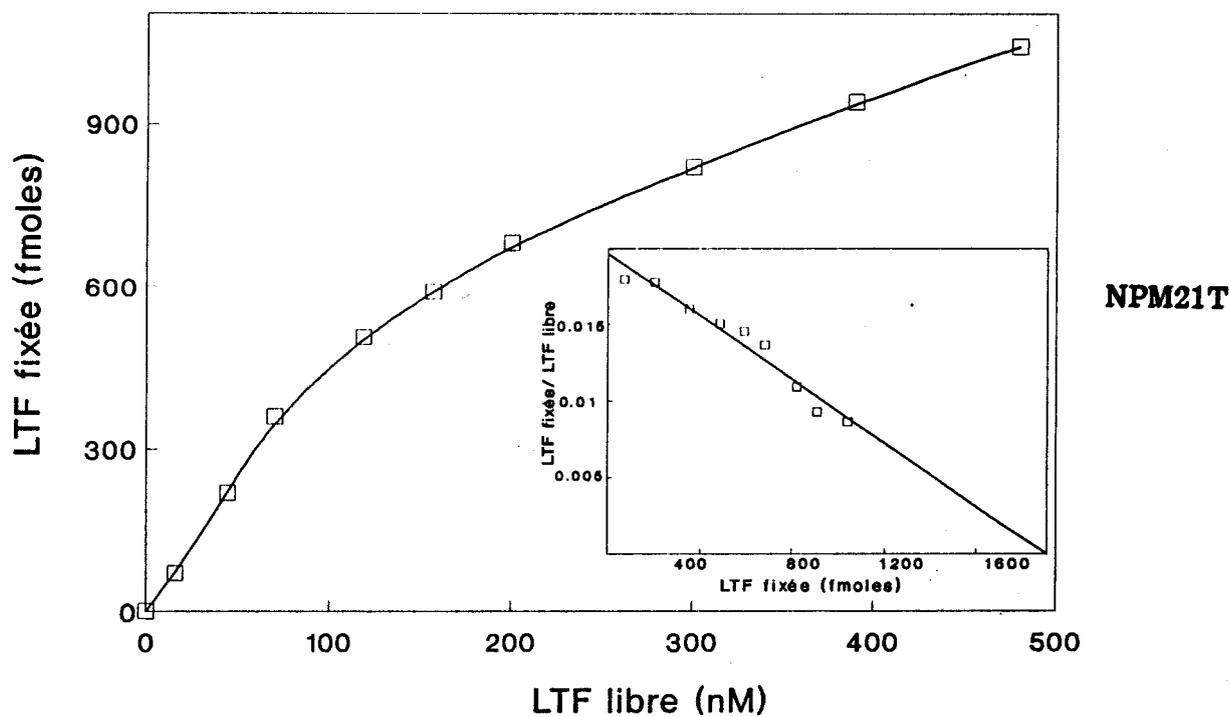
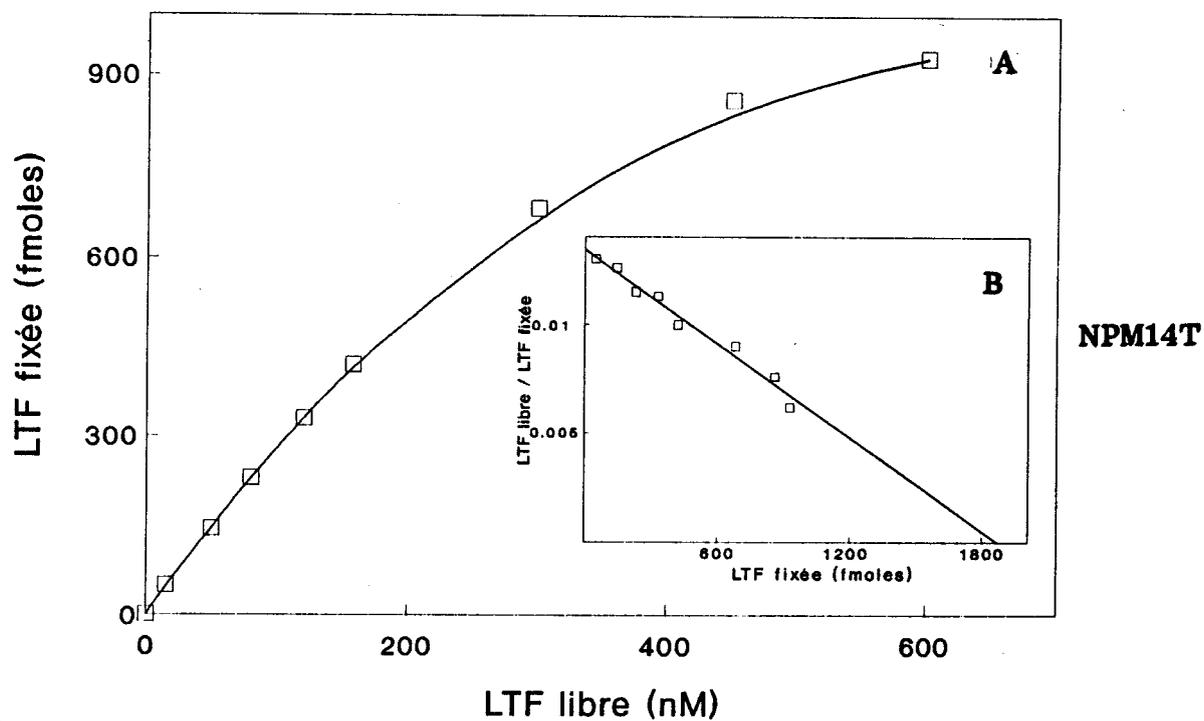


Figure 28 : Fixation de la lactotransferrine-¹²⁵I humaine sur les cellules de mastoses NPM14T et NPM21T :

A : courbe de saturation

B : représentation de Scatchard

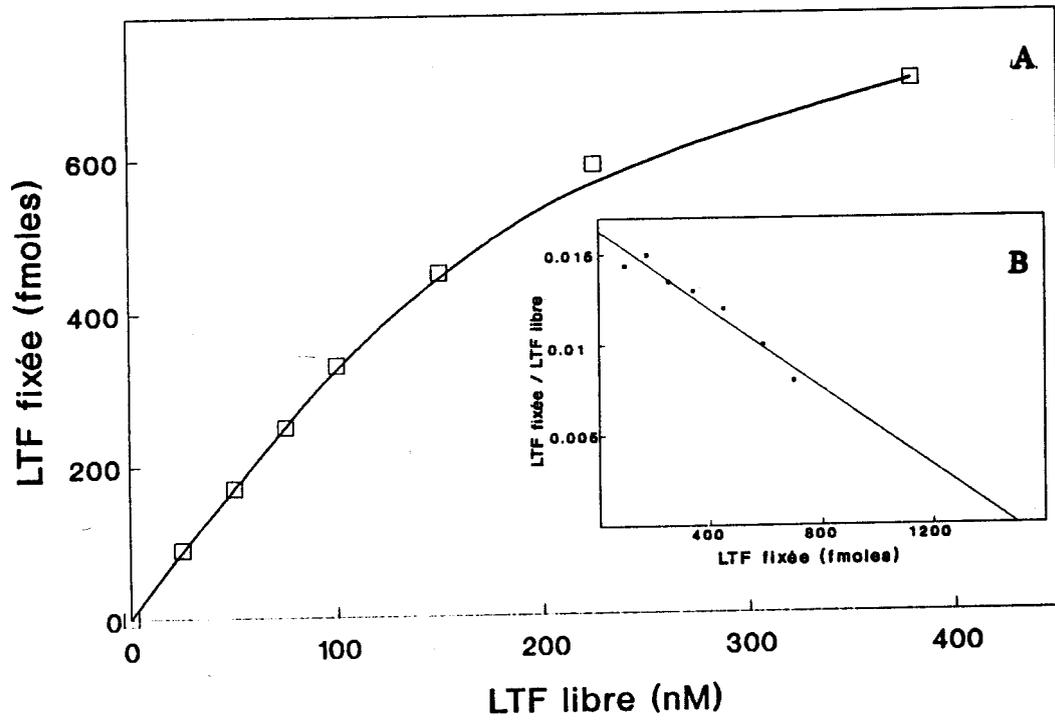


Figure 29 : Fixation de la lactotransferrine-¹²⁵I humaine sur les cellules de tissus sains HBL100 :

A : courbe de saturation

B : représentation de Scatchard

MDAMB 231 ne reconnaissent pas la lactotransferrine par le même mécanisme que les cellules cancéreuses T47D, MCF7, BT20, VHB1 et HH9.

II- IDENTIFICATION PAR CYTOFLUORIMETRIE DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LES DIFFERENTES LIGNEES CELLULAIRES

Les études de fixation de la lactotransferrine suggèrent la présence d'un récepteur similaire sur les lignées MCF7, BT20, VHB1 et HH9 que celui présent sur les cellules T47D. Nous avons donc recherché si le récepteur possédait des épitopes antigéniques communs à celui caractérisé sur les T47D et sur les lymphocytes humains activés. La fixation spécifique de l'anticorps dirigé contre le récepteur lymphocytaire de la lactotransferrine a été étudiée par cytofluorimétrie sur les cellules cancéreuses, les cellules de mastose et celles issues de tissus sains de la glande mammaire.

A- LES CELLULES CANCEREUSES

Les histogrammes de fluorescence (Fig.30, p.157) obtenus pour chacune des cellules cancéreuses, à l'exception de MDAMB 231, montrent un décalage du pic 2 vers de hautes intensités de fluorescence, par comparaison au pic témoin 1. Ce résultat suggère que l'anticorps anti-récepteur lymphocytaire reconnaît spécifiquement une protéine présente à la surface des lignées MCF7, BT20, VHB1 et HH9 qui est immunologiquement similaire à celle caractérisée sur les lymphocytes humains activés.

Pour la lignée MDAMB 231, la superposition des pics de fluorescence 1 et 2 indique que l'anticorps anti-récepteur ne s'est pas fixé sur ces cellules. Par conséquent, le récepteur de la lactotransferrine ne semble pas être présent à la surface des cellules MDAMB 231.

B- LES CELLULES DE MASTOSE

La fixation de l'anticorps anti-récepteur lymphocytaire sur les cellules NPM14T et NPM21T, illustrée dans la figure 31 (p.158) est similaire à celle obtenue pour les lignées MCF7, BT20, VHB1 et HH9.

C- LES CELLULES DE TISSUS SAINS

Les profils de fluorescence de la figure 31 (p.158) montrent que l'anticorps anti-récepteur reconnaît spécifiquement les cellules HBL100.

D- CONCLUSION

L'anticorps anti-récepteur lymphocytaire se fixe spécifiquement sur les différentes cellules cancéreuses (MCF7, VHB1, BT20, HH9), de mastose (NPM14T, NPM21T) et de tissus sains (HBL100). Ce résultat confirme ceux obtenus lors des expériences de radiomarquage qui ont démontré que la lactotransferrine interagissait avec ces cellules avec des paramètres de fixation similaires. Il semblerait donc qu'un récepteur semblable à celui des T47D et des lymphocytes activés soit présent sur toutes ces lignées cellulaires.

La faible affinité des cellules MDAMB 231 pour la lactotransferrine, le nombre de sites élevé et l'absence de fixation de l'anticorps anti-récepteur, suggèrent que ces cellules ne possèdent pas à leur surface le récepteur de la lactotransferrine qui a été caractérisé sur les cellules T47D. La fixation de la lactotransferrine obtenue sur les cellules MDAMB 231 semble être de nature non-spécifique. La lactotransferrine étant une protéine très basique, elle pourrait s'adsorber aux constituants membranaires chargés négativement, présents sur les cellules.

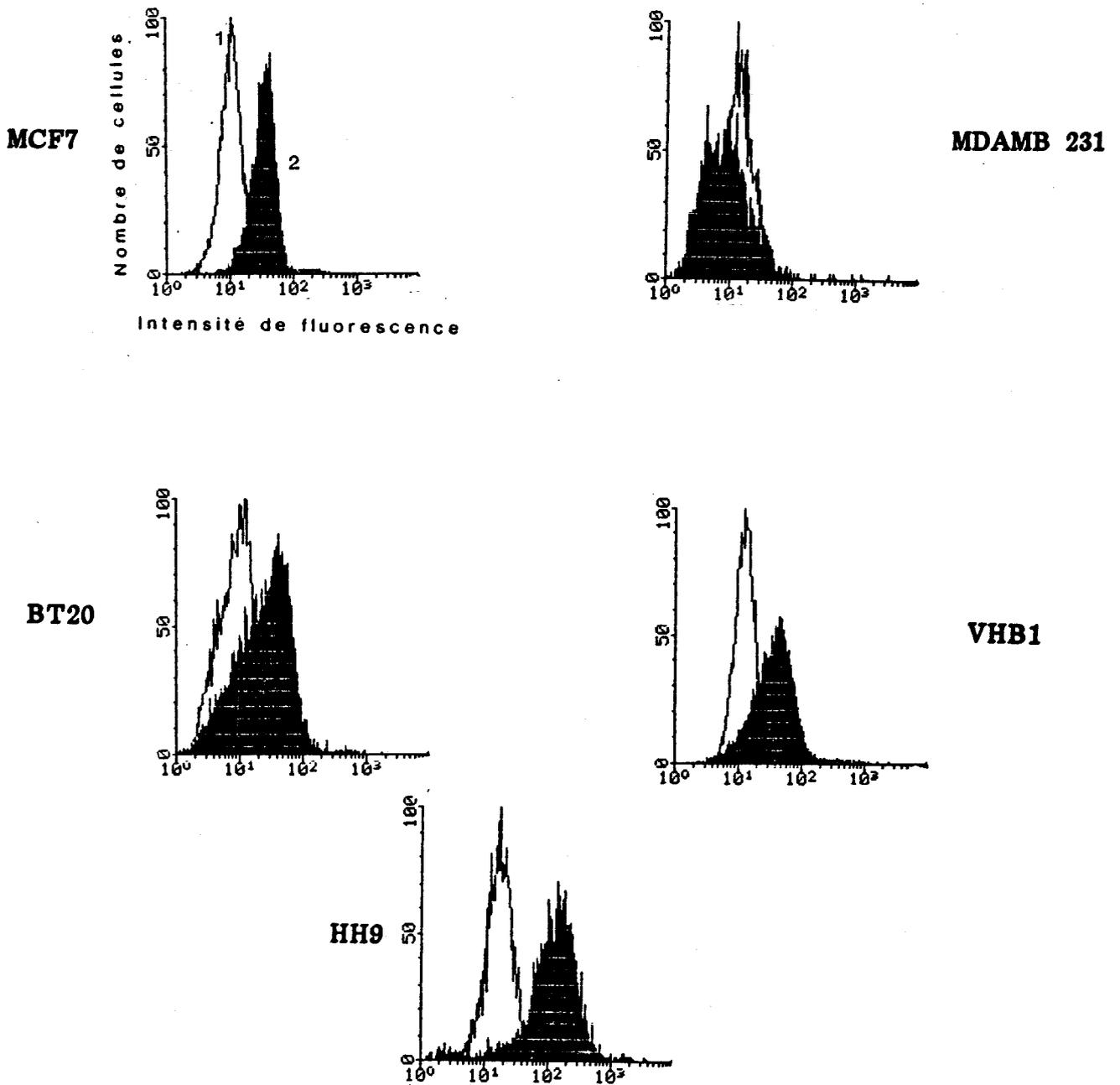


Figure 30 : Identification du récepteur de la lactotransferrine présent à la surface des cellules cancéreuses par cytofluorimétrie de flux, à l'aide d'anticorps anti-récepteur lymphocytaire.

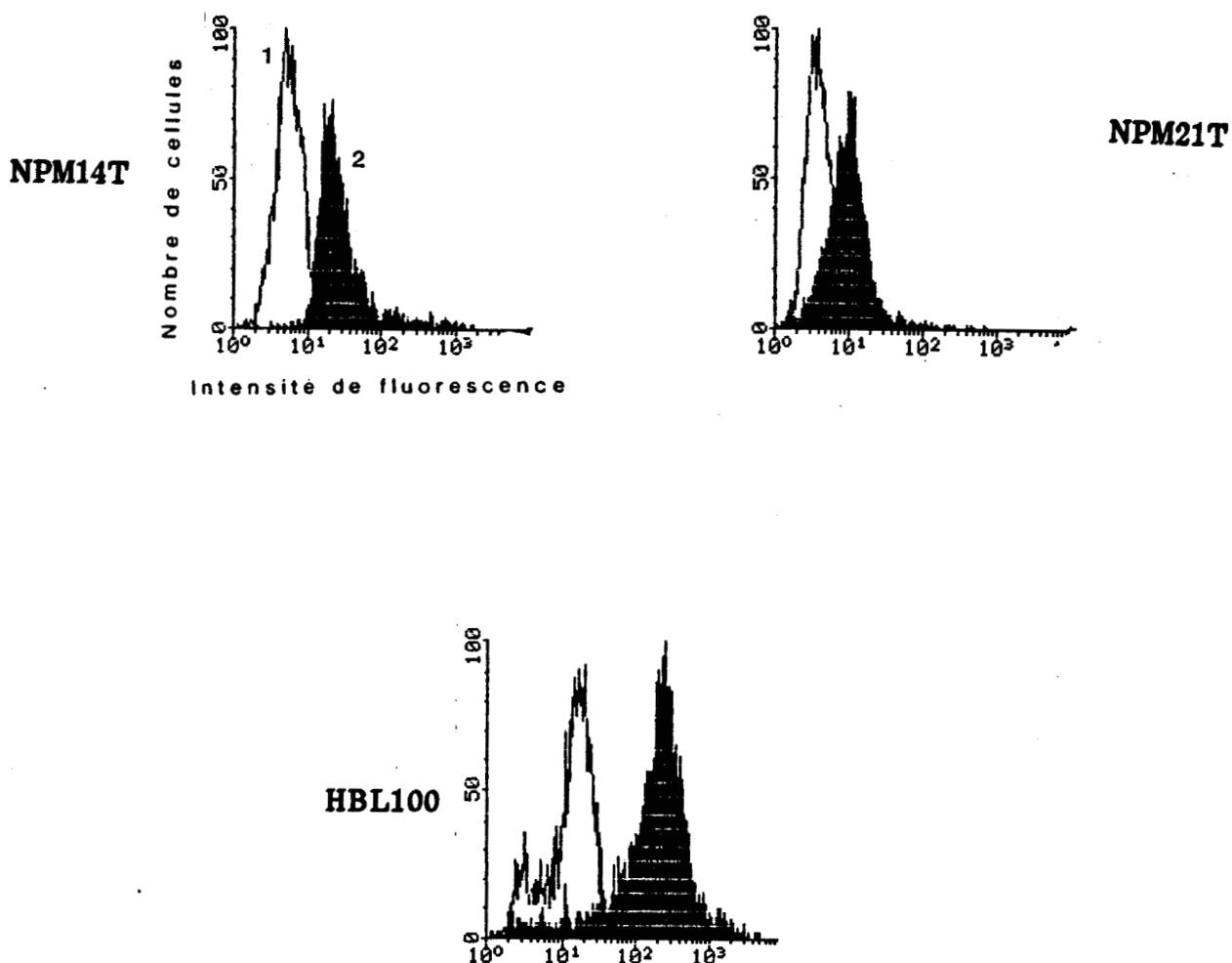


Figure 31 : Identification du récepteur de la lactotransferrine présent à la surface des cellules de mastose (NPM14T, NPM21T) et des cellules normales (HBL100), par cytofluorimétrie de flux, à l'aide d'anticorps anti-récepteur lymphocytaire.

III- CONCLUSION

Les cellules cancéreuses MCF7, BT20, VHB1 et HH9, les cellules de mastose NPM14T et NPM21T ainsi que celles issues de tissus sains HBL100, fixent la lactotransferrine humaine par l'intermédiaire d'un récepteur semblable à celui présent sur les cellules T47D et caractérisé sur les lymphocytes activés (Mazurier et al., 1989).

Contrairement aux cellules cancéreuses qui possèdent 10 à 20 fois plus de récepteurs de la sérotransferrine que les cellules normales, aucune différence significative n'a été observée concernant le nombre de récepteurs de la lactotransferrine présent sur les cellules précancéreuses et les cellules malignes établies à partir de métastases ou de tumeurs solides. De même les paramètres de fixation de la lactotransferrine sont comparables pour les cellules de tissu sain HBL100 et les cellules tumorigènes HH9, qui dérivent des cellules HBL100 transfectées par l'oncogène hst. Ainsi, ces résultats préliminaires suggèrent que l'apparition et le nombre de récepteur de la lactotransferrine ne sont pas modifiés lors de la progression tumorale. Cependant, les cellules testées sont toutes issues de lignées cultivées à long terme in vitro. Aussi, afin de s'assurer que les conditions de culture in vitro et que l'immortalisation des cellules de mastose ne modifient pas l'apparition du récepteur de la lactotransferrine, il serait intéressant de réaliser les mêmes expériences directement sur des primocultures de tissus sains et de les comparer à des primocultures de carcinomes. Charplin et al. (1985) et Wuster et al. (1980), à l'aide anticorps anti-lactotransferrine ont mis en évidence la lactotransferrine sur des biopsies de carcinomes du sein de type "canalaire invasif". Néanmoins, ces auteurs n'ont pas étudié l'existence de la

lactotransferrine sur des tissus sains et la présence de récepteurs de la lactotransferrine n'a jamais été démontrée. Jusqu'à maintenant, les essais sur les primocultures de biopsies de glande mammaire saine et cancéreuse n'ont pu être effectués, en raison de la difficulté d'obtenir un nombre suffisant de ces cellules.

Bien que ces résultats tendent à démontrer que le récepteur de la lactotransferrine ne puisse pas être considéré directement comme un nouveau marqueur de la cancérisation, cela n'exclût pas la possibilité que la présence du récepteur puisse être corrélée à celle d'autres marqueurs de développement des tumeurs, intervenant dans la prolifération cellulaire. En effet, dans le cas de la sérotransferrine, aucune relation directe n'a été établie entre le nombre de récepteurs et le stade pathologique de la tumeur de la glande mammaire (Faulk et al., 1980; Gatter et al., 1983 et Vandewalle et al., 1985). Cependant, Vandewalle et al. (1988) démontrent que l'apparition du récepteur de la sérotransferrine à la surface des cellules cancéreuses MCF7, est stimulée par l'oestradiol, suggérant un rôle potentiel de la sérotransferrine comme marqueur de l'action des oestrogènes. Récemment, le rôle possible de la sérotransferrine comme modulateur de la différenciation des cellules cancéreuses de glande mammaire a également été évoqué (Vandewalle et al., 1991). Dans le cas de la lactotransferrine, les études dans ce domaine sont pratiquement inexistantes. Bien que le nombre de cas positifs testés soit insuffisant pour établir une relation significative entre la présence de récepteurs de la lactotransferrine et le degré de différenciation ou la présence de récepteurs aux hormones stéroïdiennes, Charplin et al. (1985) observent que tous les carcinomes du sein positifs à la lactotransferrine sont de grade tumoral peu avancé (stades I et II) et, surtout, possèdent des récepteurs à l'oestrogène et à la progestérone. Ainsi, ces observations,

suggèrent que la fixation de la lactotransferrine sur les cellules cancéreuses de glande mammaire et la présence de son récepteur puissent être corrélées à d'autres facteurs tels que les hormones et leurs récepteurs.

Pour comprendre le rôle biologique joué par un récepteur exprimé à la surface de cellules, il est utile, sinon indispensable, de connaître la nature des interactions moléculaires qui existent entre le récepteur et son ligand, ainsi que la destinée du ligand dans la cellule. C'est pourquoi, nous avons choisi, dans un premier temps, d'étudier la nature de l'interaction de la lactotransferrine, d'une part, avec les cellules cancéreuses et d'autre part, avec les lymphocytes activés. Dans un second temps, nous avons suivi la destinée intracellulaire de la lactotransferrine saturée en fer dans les cellules T47D.

**LOCALISATION DU SITE DE FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE
HUMAINE SUR SON RECEPTEUR**

INTRODUCTION

Les rôles biologiques de la lactotransferrine sont nombreux et diversifiés. Elle intervient tout particulièrement dans la croissance cellulaire comme décrit p.40. Néanmoins, les mécanismes spécifiques par lesquels la lactotransferrine interagit avec son récepteur pour contrôler la prolifération cellulaire ne sont pas encore élucidés.

La lactotransferrine est constituée d'une seule chaîne polypeptidique repliée en deux lobes: N- et C-terminaux. Chaque lobe est glycosylé et renferme deux domaines structuraux appelés, respectivement : NI, NII et CI, CII. L'hydrolyse trypsique ménagée de la lactotransferrine a permis d'isoler : un fragment N-trypsique de 30 kDa (résidus d'acides aminés 4 à 283) et un fragment C-trypsique de 50 kDa (résidus d'acides aminés 284 à 692) correspondant aux lobes N et C-terminaux, ainsi que le glycopeptide N2 de 18 kDa (résidus d'acides aminés 91 à 259), correspondant au domaine II du lobe N-terminal (Legrand et al., 1984). Les fragments N- et C-trypsiques peuvent se réassocier en un complexe non covalent N-t/C-t (Legrand et al., 1986).

Ces différents fragments ont été utilisés pour localiser le site de fixation de la lactotransferrine humaine sur le récepteur présent à la surface des lymphocytes humains activés et des cellules épithéliales T47D.

De nombreux peptides, obtenus par hydrolyse de la lactotransferrine humaine par la protéase V8 de Staphylococcus aureus, ont également été isolés, afin de localiser plus précisément la région peptidique de la lactotransferrine reconnue par son récepteur.

I- IDENTIFICATION DU DOMAINE STRUCTURAL DE LA LACTOTRANSFERRINE RECONNU PAR LE RECEPTEUR LYMPHOCYTAIRE

Etant donné que le récepteur de la lactotransferrine présent sur les lymphocytes humains activés est parfaitement connu, nous avons choisi, dans un premier temps, d'utiliser ces cellules pour caractériser le site d'interaction de la lactotransferrine avec son récepteur. Dans un second temps, nous avons vérifié nos résultats en prenant les cellules T47D comme modèle cellulaire.

Dans le but de déterminer la nature de l'interaction de la lactotransferrine avec son récepteur, nous avons étudié la fixation des fragments N- et C-trypsiques, du complexe N-t/C-t et du glycopeptide N2 sur les lymphocytes humains activés. Par des expériences de compétition, nous avons également mesuré la capacité d'inhibition de la fixation de lactotransferrine-¹²⁵I, par les différents fragments tryptiques de la lactotransferrine.

A- FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE ET DE SES FRAGMENTS TRYPTIQUES SUR LE RECEPTEUR LYMPHOCYTAIRE

La fixation des différents fragments tryptiques marqués à l'¹²⁵I sur les lymphocytes humains activés par la PHA, a été réalisée selon le protocole utilisé pour la lactotransferrine native et décrit dans le chapitre "Matériels et Méthodes" (p.119).

Comme le montre la figure 32 (p.164), la fixation du fragment N-tryptique et du complexe N-t/C-t sur les lymphocytes est saturable à partir de 100 nM, avec des constantes de dissociation (K_d) de 44 nM et de 39 nM, similaires à celle de la lactotransferrine intacte ($K_d = 46$ nM).

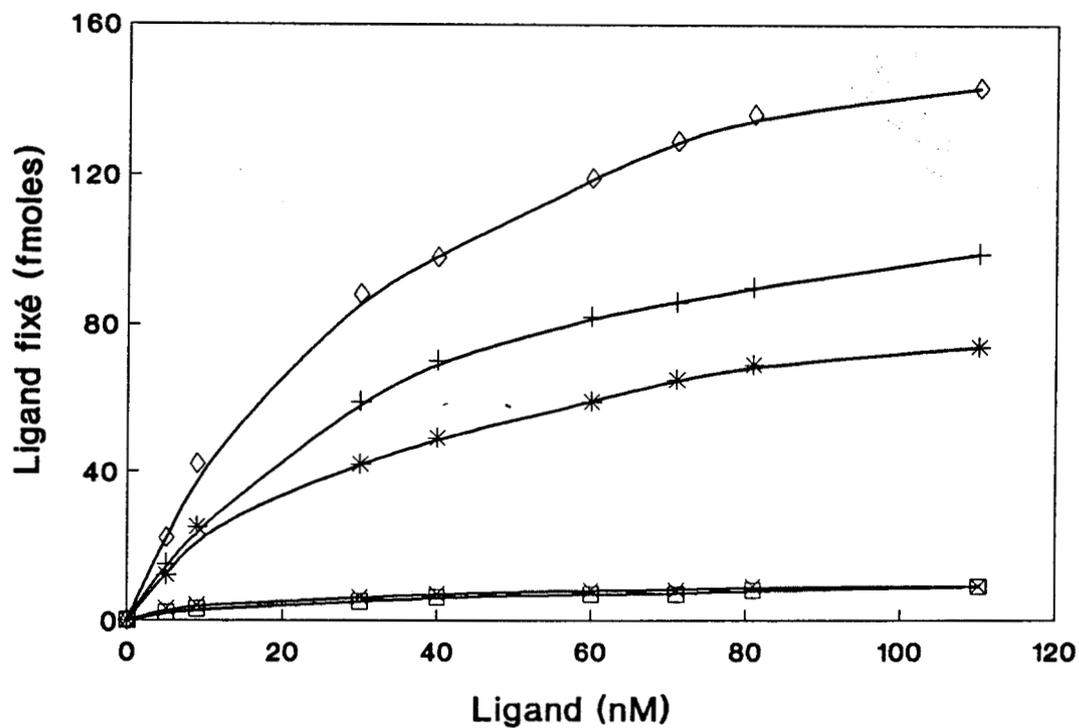


Figure 32 : Fixation de la lactotransferrine (◇-◇) et des fragments tryptiques (complexe Nt/Ct (+-+); fragment N-t (★-★); fragment C-t (x-x); glycopeptide N2 (□-□)) sur les lymphocytes humains activés.

Le nombre de sites de fixation, obtenus pour le fragment N-t (n= 140 000) et le complexe N-t/C-t (n= 170 000) est deux fois plus faible que celui obtenu pour la protéine native (n= 350 000). La fixation du fragment C-t et celle du glycopeptide N2 ne représentent que 8% de la fixation totale de la lactotransferrine. De plus, cette fixation est linéaire et non saturable, ce qui suggère une fixation non-spécifique.

B- INHIBITION DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE-¹²⁵I SUR LE RECEPTEUR LYMPHOCYTAIRE PAR LES FRAGMENTS TRYPSIQUES

Les expériences de compétition sont réalisées à 4°C entre la lactotransferrine marquée à l'¹²⁵I (100 nM) et 0 à 10 µM de fragments tryptiques non marqués (Fig.33, p.166). Ainsi, en présence de 25µM de lactotransferrine non radioactive, le taux de ¹²⁵I-lactotransferrine fixée aux cellules n'est plus que de l'ordre de 51 %. Lorsque les incubations sont réalisées en présence du complexe N-t/C-t ou du fragment N-tryptique, seulement 63% et 70% de la lactotransferrine-¹²⁵I sont fixés sur les lymphocytes. Par ailleurs, ni le fragment C-t, ni le glycopeptide N2 n'inhibent de façon significative la fixation de la lactotransferrine sur les lymphocytes, puisque seulement 5 % d'inhibition sont obtenus en présence de ces deux fragments. Ces expériences confirment donc les études de fixation précédemment décrites.

C- CONCLUSION

Le fragment N-tryptique de la lactotransferrine et le complexe N-t/C-t se fixent spécifiquement sur les lymphocytes activés, tandis que ni le glycopeptide N2 correspondant au domaine NII du lobe N-t, ni

le fragment C-t ne sont reconnus par le récepteur lymphocytaire.

Ces résultats indiquent donc:

- d'une part, que le site d'interaction de la lactotransferrine avec son récepteur est localisé dans le fragment N-t (résidus d'acides aminés 4 à 283) et, plus précisément, dans le domaine NI (résidus d'acides aminés de 1 à 91 et de 251 à 319);

- d'autre part, que les glycanes de la lactotransferrine n'interviennent pas dans l'interaction de la lactotransferrine humaine avec le récepteur, puisque ni le glycopeptide N2, ni le fragment C-trypsique, tous deux glycosylés ne se fixent sur les lymphocytes.

Par ailleurs, les expériences de fixation des fragments tryptiques marqués à l' ^{125}I et les expériences de compétition utilisant les fragments non-marqués, démontrent que l'iodination de la protéine ne modifie pas la fixation de la lactotransferrine sur son récepteur. L'ensemble de ces résultats diffèrent de ceux obtenus pour l'ovotransferrine par Mason et Brown (1987) qui ont démontré d'une part, que les lobes N- et C-terminaux isolés de l'ovotransferrine ne sont pas reconnus par les réticulocytes embryonnaires de poulet et d'autre part, que l'iodination d'un résidu tyrosinyl du lobe C-terminal diminue l'affinité du récepteur pour l'ovotransferrine. Néanmoins, lorsque les deux fragments N- et C-tryptiques réassociés ou non sont présents, la fixation de l'ovotransferrine sur les réticulocytes a lieu.

Par conséquent, à partir de ces résultats préliminaires, il apparaît que les interactions de la lactotransferrine humaine et de l'ovotransferrine avec leur récepteur spécifique sont différentes.

II- ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UN PEPTIDE DE LA LACTOTRANSFERRINE RECONNU PAR LE RECEPTEUR LYMPHOCYTAIRE

En collaboration avec Dominique Legrand, nous avons cherché à isoler le plus petit peptide du domaine NI du lobe N-terminal de la lactotransferrine qui soit encore capable d'interagir avec le récepteur lymphocytaire.

Différents peptides obtenus par hydrolyse ménagée du lobe N-terminal par la protéase V8 de Staphylococcus aureus, ont été isolés par HPLC, selon le protocole décrit à la page 116. Le pouvoir inhibiteur de ces peptides sur la fixation de la lactotransferrine à la surface des lymphocytes activés a été étudié. La structure primaire du peptide inhibiteur de la fixation de la lactotransferrine a été déterminée en collaboration avec le Professeur Tartar de l'Institut Pasteur de Lille.

A- ISOLEMENT DE PEPTIDES A PARTIR DU LOBE N- TERMINAL DE LA LACTOTRANSFERRINE

Le fragment N-trypsique, correspondant au lobe N-t de la lactotransferrine, capable de se fixer au récepteur lymphocytaire, a été hydrolysé par la protéase V8 de Staphylococcus aureus dans les conditions décrites à la page 116.

La figure 34 (p.169) montre le profil de purification de l'hydrolysat du fragment N-trypsique, obtenu par HPLC en phase inversée. Les 11 fractions détectées sont numérotées de I à XI. L'analyse des fractions peptidiques, en gel de polyacrylamide à 16,5% en présence de SDS et dans des conditions réductrices, indique que les fractions I à IV ne contiennent pas de composés détectables au bleu de Coomassie, et sont

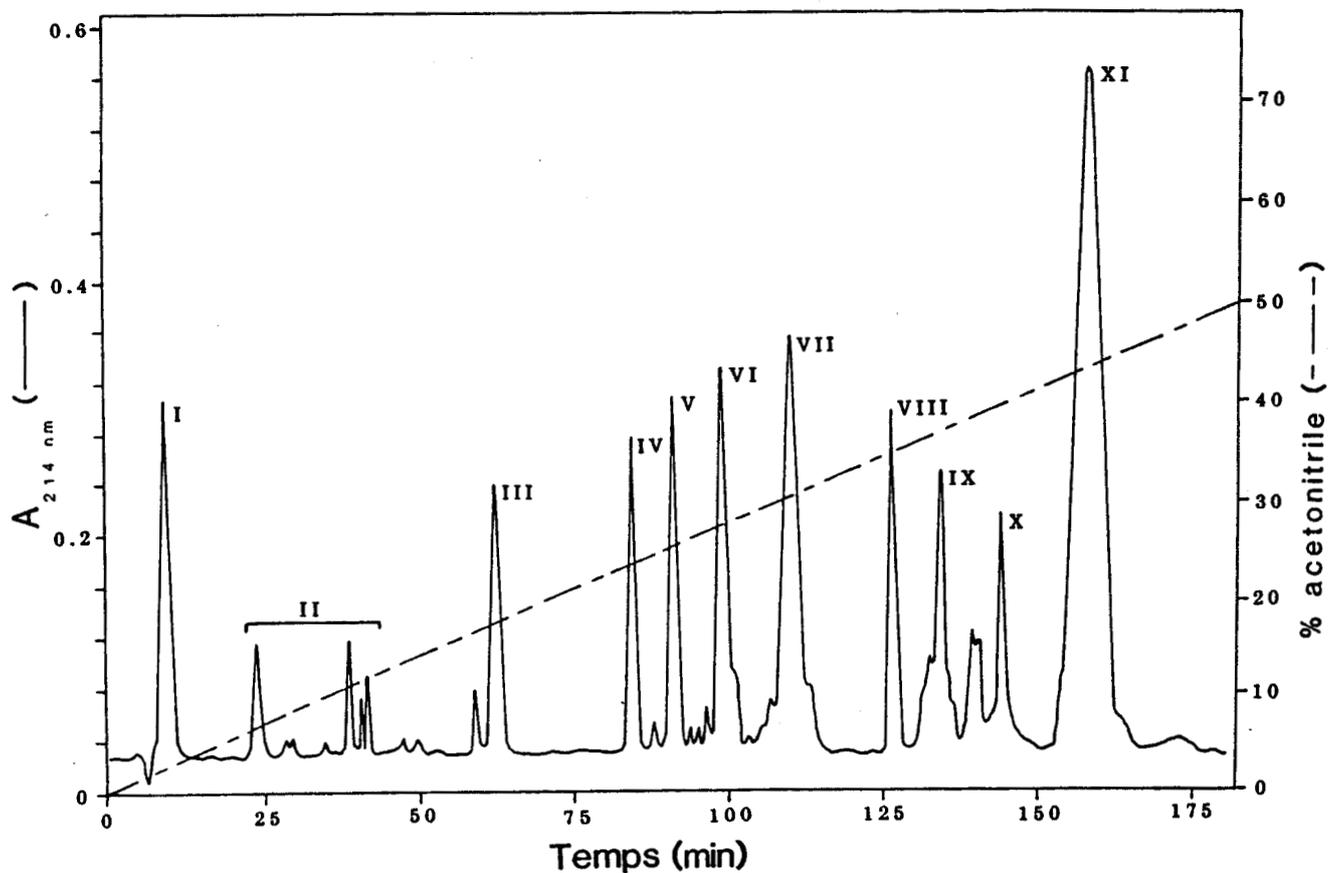


Figure 34 : Profil de purification des hydrolysats peptidiques du lobe N-t de la lactotransferrine humaine, obtenu par HPLC.

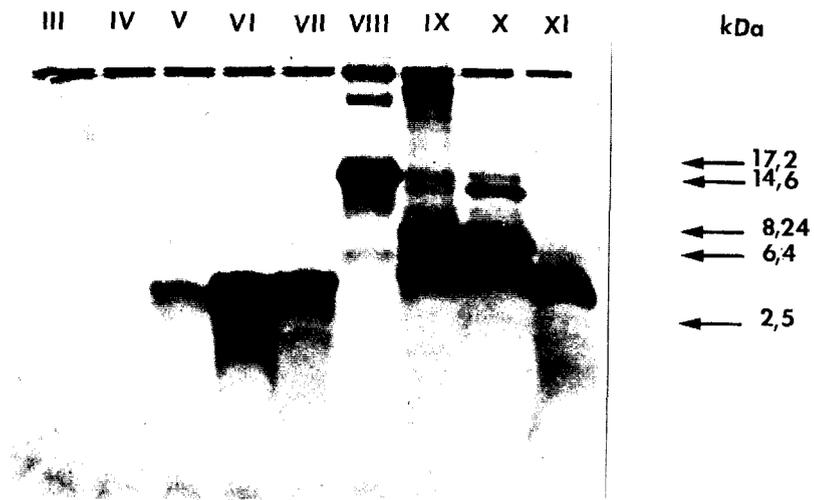


Figure 35 : Détermination des masses moléculaires des hydrolysats peptidiques du lobe N-t de la lactotransferrine, par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 16,5%.

constituées probablement de sels, d'acides aminés ou de très courts peptides (Fig.35, p.170). Les fractions VI, IX et X contiennent un mélange de peptides dont les masses moléculaires sont comprises entre 30 kDa (probablement le fragment N-trypsique intact) et 1 kDa, avec des bandes majeures de 13 à 14 kDa (Fig.35, p.170). Les fractions V, VII et XI renferment une bande protéique majeure de masse moléculaire voisine de 4 kDa.

B- CARACTERISATION DU PEPTIDE RECONNU PAR LE RECEPTEUR

L'inhibition de la fixation de la lactotransferrine humaine marquée à ^{125}I sur les lymphocytes humains activés est réalisée en présence de 10 μM de chacune des fractions VI à IX, du fragment N-t, du glycopeptide N2 ou de la lactotransferrine native.

Comme le montre la figure 36 (p.172), et comme précédemment décrit à la page 168, la fixation de la ^{125}I -lactotransferrine est inhibée à 58% et à 35% par 25 μM respectivement de lactotransferrine et de fragment N-trypsique. Seule une inhibition de 5% est observée avec le glycopeptide N2 de 18 kDa. L'inhibition la plus importante (45 %) est mesurée en présence de la fraction VII qui contient une bande protéique majeure de 4 kDa. Les pourcentages d'inhibition les plus faibles (16 et 24%), obtenus avec les fractions V et VI et IX à XI pourraient s'expliquer par la présence, parmi les différentes bandes visualisées en gel de polyacrylamide, d'une bande de 4 kDa qui pourrait être identique à celle trouvée dans la fraction VII (Fig.35, p.170).

La détermination de la séquence primaire du peptide contenu dans la fraction VII, réalisée dans le Laboratoire du Professeur Tartar, a mis en évidence deux séquences : RRSVQ et ATKCF, dans un même rapport molaire. En tenant compte de ces deux séquences N-terminales, de la composition en acides aminés de la fraction VII et du clivage spécifique

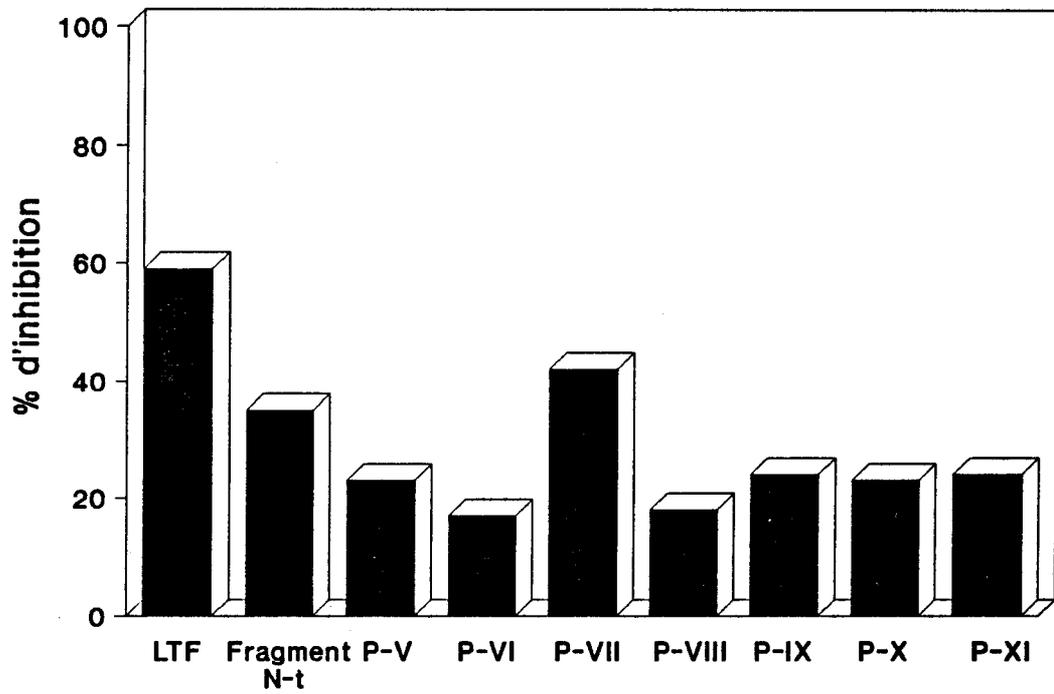


Figure 36 : Inhibition de la fixation de la lactotransferrine-¹²⁵I sur les lymphocytes humains activés, par les hydrolysats peptidiques du lobe N-t.

de la lactotransferrine par la protéase V8, à pH 4, après les résidus d'acide glutamique, le peptide de 4 kDa a été localisé sur la séquence de la lactotransferrine humaine entre les résidus d'acides aminés 4 à 16 et 17 à 52 (Fig.37, p.174). La présence d'un pont disulfure entre les résidus de cystéine 10 et 46 permet aux deux chaînes peptidiques de rester associées de façon covalente. Les trois premiers résidus d'acides aminés de la lactotransferrine (GRR) sont perdus lors de la protéolyse de la protéine par la trypsine pour obtenir les fragments N- et C-trypsiens (Legrand et al., 1984, 1986).

C- CONCLUSION

Ces résultats indiquent que la zone d'interaction de la lactotransferrine avec le récepteur lymphocytaire est localisée précisément dans la séquence d'acides aminés de 4 à 16 et de 17 à 52 du domaine NI du lobe N-terminal de la lactotransferrine humaine.

III- IDENTIFICATION DU SITE D'INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC LES CELLULES T47D

Dans le but de confirmer que le récepteur de la lactotransferrine présent sur les cellules épithéliales T47D est similaire à celui des lymphocytes humains activés, nous avons vérifié que la nature de l'interaction de la protéine avec les cellules T47D était identique à celle déterminée pour le récepteur lymphocytaire.

A- INHIBITION DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE PAR LES FRAGMENTS PEPTIDIQUES

Des expériences d'inhibition de la fixation de la lactotransferrine-¹²⁵I ont été effectuées en présence de 0 à 10 μ M de chacun des fragments N- et C-trypsiques, du glycopeptide N2, de la fraction peptidique VII ou de la lactotransferrine native.

La figure 38 (p.176) montre que 38% et 45% d'inhibition sont obtenus en présence de 10 μ M respectivement du fragment N-t et de la fraction VII, contre 81% d'inhibition avec la lactotransferrine native.

Le fragment C-trypsique et le glycopeptide N2 n'inhibent la fixation de la lactotransferrine-¹²⁵I qu'à 6%, suggérant que ces deux peptides n'interagissent pas avec le récepteur de la lactotransferrine présent sur les cellules épithéliales T47D.

B- CONCLUSION

Ces expériences démontrent que le récepteur de lactotransferrine des cellules T47D reconnaît spécifiquement le fragment N-trypsique et le peptide de 4 kDa (résidus d'acides aminés 4 à 52) contenu dans la fraction VII.

Par conséquent, le site d'interaction de la lactotransferrine avec les cellules T47D est identique à celui caractérisé sur les lymphocytes activés. Il est localisé dans la région du domaine NI de la lactotransferrine humaine comprenant les résidus d'acides aminés de 4 à 52.

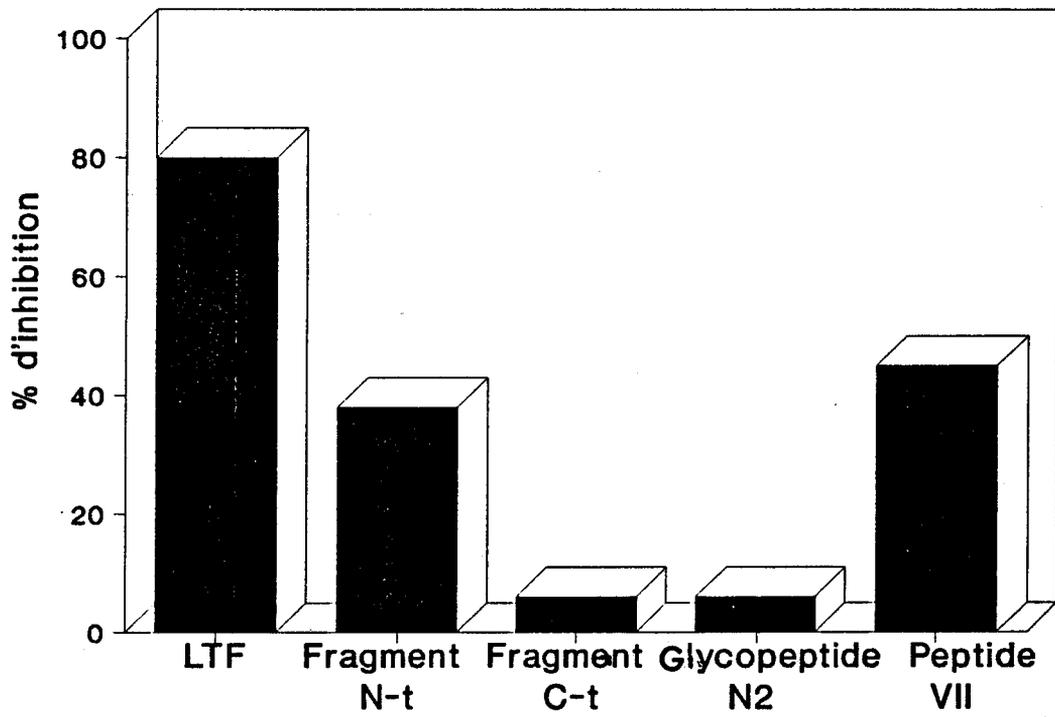


Figure 38 : Inhibition de la fixation de la lactotransferrine-¹²⁵I sur les cellules T47D par les fragments peptidiques de la lactotransferrine humaine.

IV- DISCUSSION

Au cours de cette étude, la région de la lactotransferrine humaine impliquée dans l'interaction de la glycoprotéine avec le récepteur lymphocytaire et avec celui des cellules T47D, a été localisée précisément dans le domaine I du lobe N-terminal de la lactotransferrine entre les résidus d'acides aminés 4 à 52. Dès 1989, Anderson et al. avaient émis l'hypothèse que cette région basique de la lactotransferrine, contenant 6 Arg et 3 Lys, pouvait constituer un site possible de reconnaissance pour un récepteur membranaire.

D'autres expériences sont venues confirmer nos résultats. Ainsi, Legrand et al. (1991 a) ont montré que l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) couplé de façon covalente à la lactotransferrine humaine, inhibait la fixation de la protéine sur les lymphocytes activés. L'isolement de peptides fluorescents, obtenus après protéolyse de la lactotransferrine marquée au FITC, a révélé que le FITC se lie préférentiellement sur la Lys 264 du domaine NI du lobe N-terminal. Ce résultat confirme ainsi l'observation selon laquelle le domaine NI serait impliqué dans la reconnaissance de la lactotransferrine par les cellules.

Une approche expérimentale semblable à celle utilisée pour le FITC a été réalisée par D. Legrand et al. (1991 a et b), en couplant la lactotransferrine au Sulfosuccinimidyl 3 [(2-(p azidosalicrylamido) éthyl dithio] propionate (SADS) et au sulfosuccinimidyl 6-(4'azido 2-nitrophénylamino)hexanoate (Sulfo-SANPAH), deux réactifs bifonctionnels généralement utilisés pour le couplage de récepteur avec un ligand. Les groupements azide de ces deux réactifs sont inactivés par photolyse et seuls les groupements succinimidyl ester sont couplés aux Lys de la protéine. Lorsque la lactotransferrine est couplée au SASD, préférentiellement sur la Lys 74, la protéine marquée n'est plus

reconnue par le récepteur lymphocytaire. Néanmoins, si la lactotransferrine est conjuguée sur la Lys 281 au sulfo-SANPAH, la lactotransferrine se fixe sur les lymphocytes activés. Par modélisation moléculaire, en collaboration avec le groupe du Professeur G. Vergoten, Legrand et al. (1991 a et b) ont démontré que le FITC et le SASD couplés à la lactotransferrine masquaient la région peptidique des résidus d'acides aminés de 4 à 52, reconnue par le récepteur (Fig.39, p.179). Contrairement au FITC et au SASD, le Sulfo-SANPAH ne recouvre pas la région du site d'interaction de la lactotransferrine. Les calculs de modélisation ont été réalisés à partir des données cristallographiques de la lactotransferrine humaine, par un programme SEARCH du logiciel SYBYL, sur une station de travail Evans et Sutherland PS350 connecté à un ordinateur Hôte Vax 6320.

La structure tridimensionnelle du peptide, comprenant les résidus d'acides aminés 4 à 52, a été déterminée par modélisation moléculaire, sur la base des données issues de la cristallographie (Legrand et al., 1991 b). La conformation du peptide est stabilisée par la présence de deux ponts disulfure. La figure 40 (A p.180) représente la conformation spatiale du peptide qui est constituée par l'enchaînement de structures en feuillet β reliées alternativement par des structures en hélice α (β - α - β - α). Cette région peptidique de la lactotransferrine est distante du site de fixation du fer et est facilement accessible aux solvants.

Sur la base de ces résultats, quatre régions du peptide 4-52 de la lactotransferrine humaine semblent accessibles au récepteur membranaire: les résidus 4 à 6, 14 à 27 et deux régions de structure en coude β KVRG (résidus 28 à 34) et KRDS (résidus 38 à 42) (Legrand et al., 1991 a et b). Comme décrit dans les "Généralités" à la page 38, le térapeptide KRDS inhibe la fixation du fibrinogène sur le complexe GPIIb-IIIa des plaquettes (Raha et al., 1988; Mazoyer et al., 1990; Drouet et al., 1990). En effet, KRDS possède une forte homologie

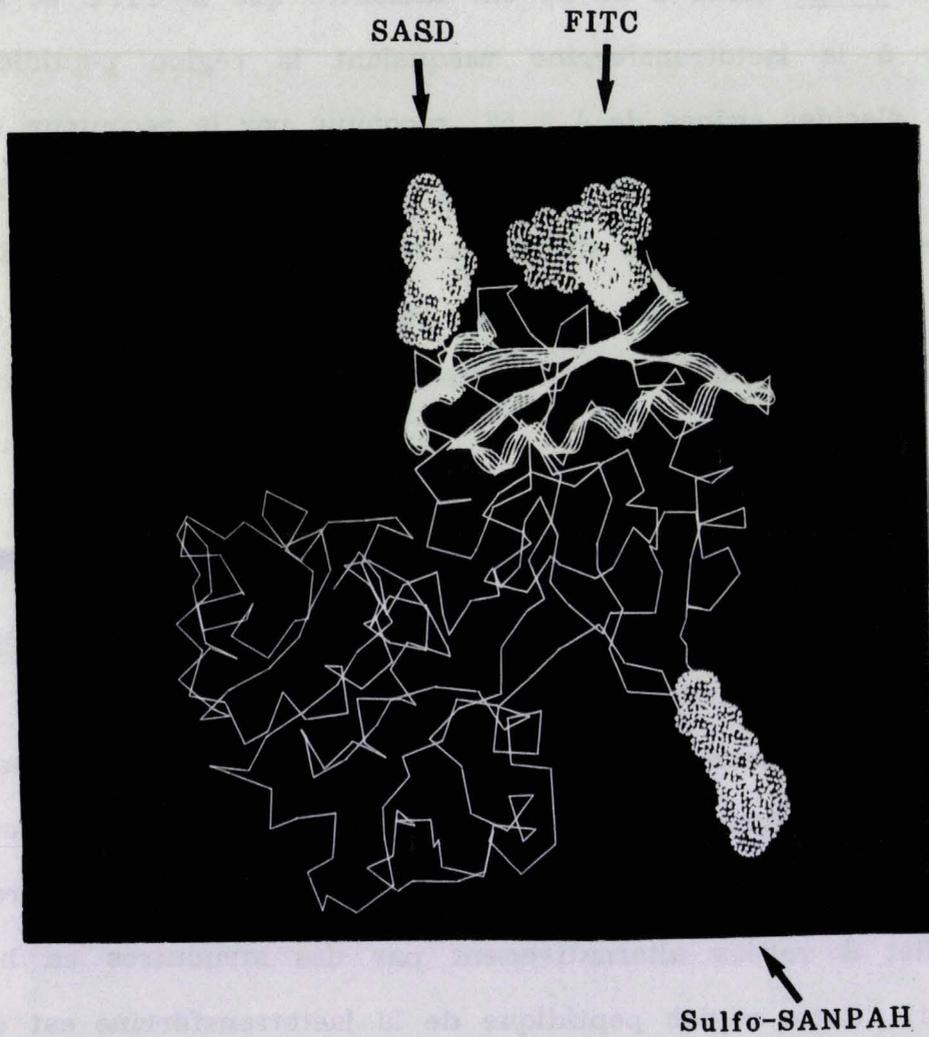
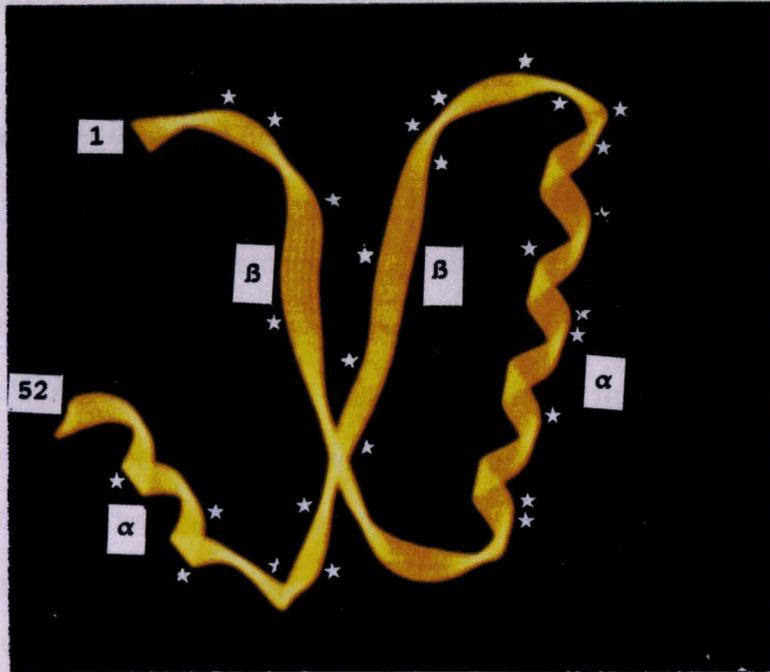


Figure 39 : Localisation du peptide (résidus d'acides aminés 1 à 52), du FITC, du SASD et du sulfo-SANPAH sur le lobe N-t de la lactotransferrine humaine, par modélisation moléculaire.

A



B

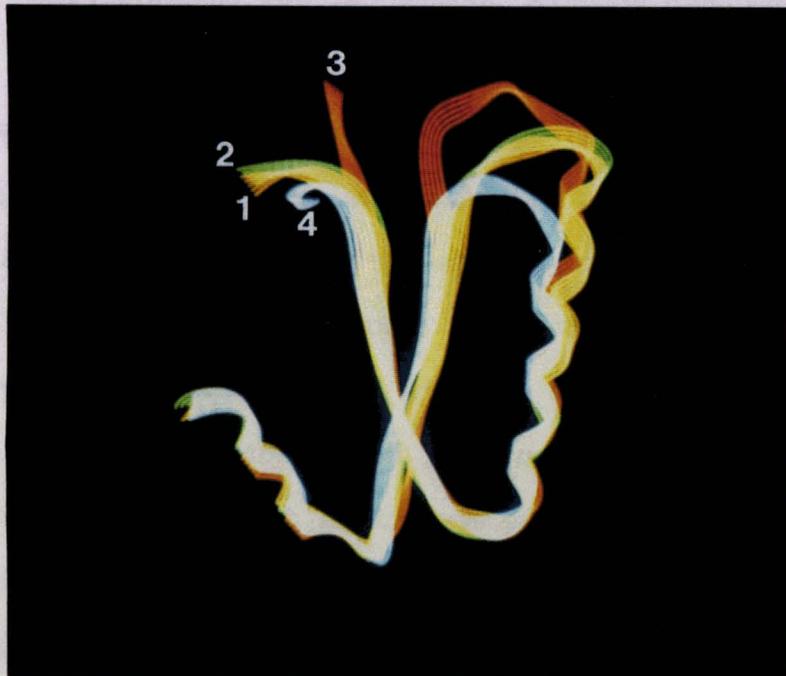


Figure 40 : Modélisation du peptide comprenant les résidus d'acides aminés 1 à 52 des différentes transferrines:

A : Peptide du lobe N- terminal de la lactotransferrine humaine (LTF).

Les étoiles indiquent les acides aminés accessibles au solvant.

B : Superposition des peptides du lobe N- terminal de la LTF humaine (1), de la LTF bovine (2), de la STF humaine (3) et du peptide du lobe C- terminal de la LTF humaine (4).

structurale avec la séquence RGDS qui est l'un des sites de fixation du fibrinogène sur GPIIb-IIIa. Cependant, les actions in vitro et in vivo de ces deux peptides semblent être différentes, suggérant selon Mazoyer et al. (1990) que KRDS et RGDS agissent sur des sites distincts. Aucune interaction de la lactotransferrine avec GPIIb-IIIa n'a d'ailleurs jusqu'à ce jour été mise en évidence. Au Laboratoire, Legrand et al. (1991b) ont démontré que KRDS était incapable d'inhiber la fixation de la lactotransferrine humaine sur le récepteur lymphocytaire. Par conséquent, le site d'interaction de la lactotransferrine avec les lymphocytes et les cellules T47D semble être localisé dans les régions incluant les résidus d'acides aminés 4 à 6, 14 à 27 et 28 à 34 de la lactotransferrine humaine, accessibles aux solvants (Fig.40 A, p.180).

Actuellement, les études concernant le site d'interaction de la lactotransferrine avec son récepteur se poursuivent au Laboratoire. Les résultats préliminaires obtenus par Sophie Delettre (1991) indiquent que la lactotransferrine bovine est reconnue par les cellules T47D, mais avec une affinité inférieure à celle de la lactotransferrine humaine. En collaboration avec le Groupe du Professeur G. Vergoten, la conformation de la région 4-52 du lobe N-terminal de la lactotransferrine humaine a été comparée aux régions homologues de la lactotransferrine bovine, de la sérotransferrine et du lobe C-terminal de la lactotransferrine humaine. L'existence d'une boucle en coude β , située entre les résidus 30 et 35, pourrait expliquer la spécificité de reconnaissance de chacune de ces protéines par le récepteur. En effet, le peptide localisé dans le lobe C-terminal possède globalement la même structure spatiale que le peptide du lobe N-terminal mais est plus court de 4 acides aminés au niveau de la région en β -turn, reliant la première hélice α au second feuillet β (Fig.40 B, p.180). Nous avons démontré que le récepteur ne

reconnaissait pas le lobe C-terminal de la lactotransferrine humaine. Le fait que la région en β -turn reliant les résidus d'acides aminés 30 à 35, soit réduite dans le lobe C-terminal, nous a conduit à émettre l'hypothèse que ce segment pourrait être impliqué dans le mécanisme de reconnaissance entre la lactotransferrine et son récepteur. De plus, la conformation du peptide localisé dans le lobe N-terminal est identique dans les lactotransferrines humaine et bovine, malgré la nature différentes des acides aminés qui constitue cette région. La superposition, de la région en β -turn du peptide des lactotransferrines humaine et bovine, explique pourquoi ces protéines sont reconnues par le même récepteur présent sur les cellules T47D (Fig.40 B, p.180). Le peptide de la sérotransferrine, bien que présentant une forte homologie de structure basée sur l'enchaînement β - α - β - α avec la lactotransferrine humaine, voit sa conformation modifiée au niveau de la zone en coude β reliant la première hélice α au second feuillet β (Fig.40 B, p.180). La présence de trois résidus supplémentaires dans cette région explique cette différence de conformation. On sait actuellement que la sérotransferrine n'est pas reconnue par le récepteur de la lactotransferrine. Le fait que le site peptidique en coude β de la lactotransferrine ne soit pas superposable à celui de la sérotransferrine pourrait expliquer l'incapacité de la sérotransferrine à se fixer sur le récepteur de la lactotransferrine.

**ETUDE DE LA DESTINEE INTRACELLULAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE
ET DE SON FER DANS LES CELLULES T47D**

INTRODUCTION

Il est clairement établi que l'activité facteur de croissance de la sérotransferrine sur les cellules est essentiellement liée à son apport en fer, comme cela a été décrit dans le chapitre "Généralités" (p.67). Le mécanisme d'endocytose de la sérotransferrine, mis en évidence dans plusieurs lignées cellulaires est bien connu : après internalisation, la sérotransferrine libère son fer à pH acide dans les endosomes et le complexe sérotransferrine-récepteur est recyclé à la surface cellulaire. A pH neutre, l'aposérotransferrine se dissocie de son récepteur, puis est libérée dans le milieu (Klausner et al., 1983; Dautry-Varsat et al., 1983). Plus récemment, un second mécanisme, expliquant l'activité facteur de croissance de la sérotransferrine, a été caractérisé. Ce mécanisme implique la réduction du fer de la sérotransferrine par une NADH oxydoréductase de la membrane plasmique (Sün et al., 1987a; Thorstensen et Romslo 1990).

Le rôle de la lactotransferrine dans la prolifération de cellules normales et cancéreuses n'est pas encore élucidé (Hashizume et al., 1983; Nichols et al., 1987; Mazurier et al., 1989). Selon les études préliminaires d'Oria et al. (1988) et de Nichols et al. (1990), le fer n'est pas indispensable pour stimuler la croissance des cellules. En effet, ces auteurs ont démontré que le fer ne pénétrait pas dans les cellules macrophagiques P388D et que l'apolactotransferrine possédait la même activité facteur de croissance que la lactotransferrine saturée.

Pour expliquer d'une part, le rôle de la lactotransferrine humaine comme facteur de croissance et, d'autre part, pour éclaircir la présence

de la lactotransferrine dans de nombreux tissus cancéreux (Charpin et al., 1985; Tuccari et al., 1989), nous avons suivi la destinée intracellulaire du fer et de la lactotransferrine dans les cellules T47D. Nous avons utilisé, pour nos recherches, des techniques d'immunocytochimie, de microscopie de fluorescence et des techniques biochimiques utilisant la lactotransferrine marquée à l' ^{125}I et au ^{59}Fe , en présence ou non d'inhibiteurs de l'endocytose.

I- ETUDE DE LA DESTINEE INTRACELLULAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE

Dans une première étape, nous avons cherché à visualiser par microscopie de fluorescence, en collaboration avec Florence Delplace, la destinée intracellulaire de la lactotransferrine dans les cellules T47D. Dans une seconde étape, à partir de cinétiques réalisées à 37°C en présence de lactotransferrine marquée à l' ^{125}I , nous avons évalué les proportions relatives de produits radioactifs liés aux membranes, localisés à l'intérieur des cellules et celles libérés dans le milieu de culture.

A- ETUDE PAR MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE

Les cellules T47D ont été préincubées 45 min à 4°C en présence de 20 $\mu\text{g/ml}$ de lactotransferrine, soit une quantité correspondante à deux fois la valeur du K_d , afin de saturer tous les sites de fixation.

Les cellules sont placées ensuite à 37°C pendant 60 min, lavées, fixées, perméabilisées puis incubées en présence d'anticorps anti-lactotransferrine et d'anticorps anti-IgG de lapin couplés à la fluorescéine, selon la technique décrite à la page 122. Les préparations cellulaires ont été analysées à l'aide d'un microscope de fluorescence à

excitation Laser, en plongeant directement l'objectif à immersion dans le tampon qui recouvre les cellules T47D adhérentes à la boîte de Pétri. Cette technique permet de collecter plus de lumière et de préserver les cellules de la dégradation par l'irradiation au Laser, en limitant l'échauffement de la préparation et l'évaporation du tampon.

Les résultats montrent que lorsque les cellules sont incubées à 4°C (Fig.41 A, p.18), une fluorescence intense apparaît à la périphérie des cellules, correspondant à la fixation de la lactotransferrine à la surface des T47D. Dans le cas du témoin illustrant la fixation non-spécifique des IgG sur les cellules T47D, réalisé en absence de lactotransferrine, aucun fluorescence n'est observée.

Après 60 min d'incubation à 37°C, seule la surface cellulaire apparaît toujours fluorescente (Fig.41 B, p.186).

B- ETUDE PAR MARQUAGE DE LA LACTOTRANSFERRINE A L'¹²⁵I

1) Cinétique à 37°C de la destinée intracellulaire de la lactotransferrine

Après fixation de la lactotransferrine marquée à l'¹²⁵I à la surface des cellules T47D, à 4°C, une cinétique est réalisée à 37°C, entre 5 et 90 min, selon le protocole décrit à la page 125, dans le but de quantifier le taux de lactotransferrine internalisée dans ces cellules. Aux temps indiqués, le milieu d'incubation est retiré et les cellules adhérentes sont traitées, à 4°C, à la trypsine/EDTA, afin de libérer la

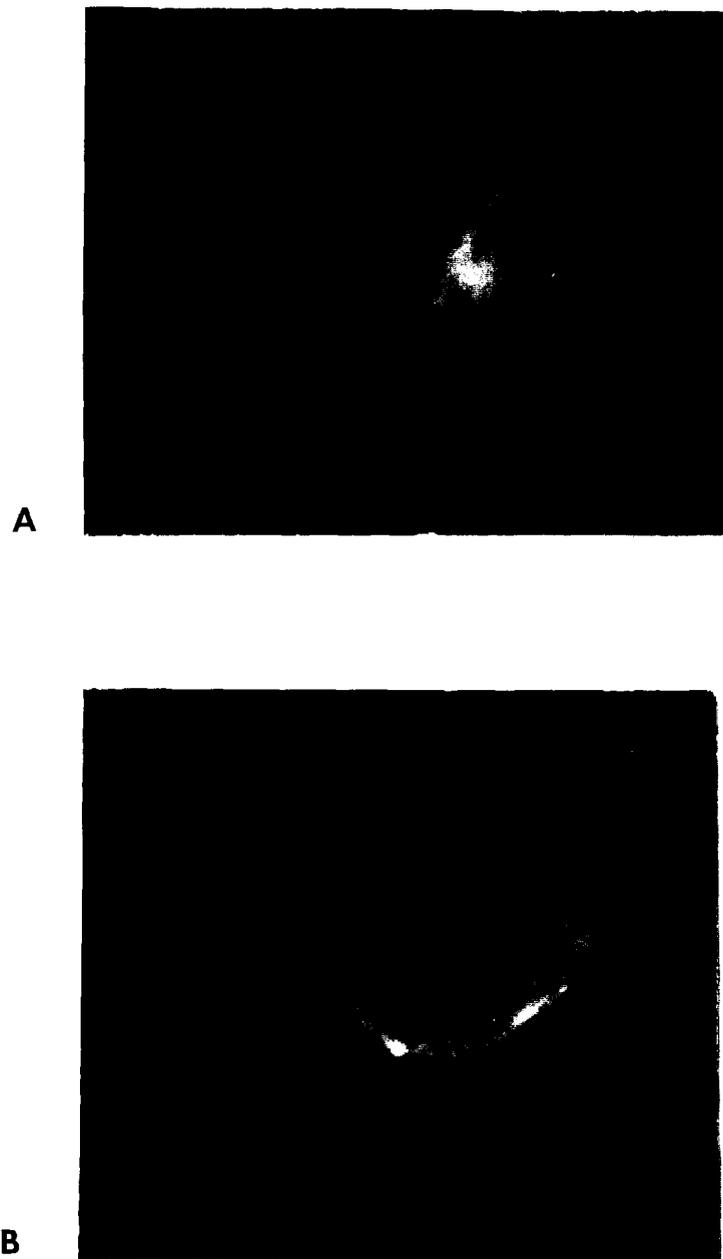


Figure 41 : Etude de la destinée intracellulaire de la lactotransferrine dans les cellules T47D, par microscopie de fluorescence (Gx1200) :

A : Incubation 45 min à 4°C

B : Incubation 60 min à 37°C

lactotransferrine-¹²⁵I non-intérialisée, présente à la surface cellulaire. La quantité de radioactivité libérée dans le milieu, celle résistante à la trypsine qui correspond à la lactotransferrine internalisée, et celle sensible à la trypsine qui représente la lactotransferrine liée aux membranes, sont mesurées séparément. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité totale de lactotransferrine fixée à 4°C sur les cellules.

Comme le montre la figure 42 p.188, lorsque les cellules sont incubées uniquement à 4°C, 82% de la lactotransferrine totale sont retrouvés dans la fraction trypsine-sensible et 18% ne sont pas détachés par le traitement enzymatique.

Entre 2 et 10 min d'incubation à 37°C, en tenant compte de la quantité de lactotransferrine fixée sur la membrane cellulaire et non détachable par la trypsine (18%), seulement 5% de la lactotransferrine-¹²⁵I totale sont inaccessibles à la trypsine et donc considérés comme internalisés dans les cellules T47D.

La lactotransferrine initialement fixée aux membranes, est relâchée rapidement dans le milieu, entre 2 et 20 min d'incubation à 37°C. A partir de 30 min seule 40% restent spécifiquement fixés à la surface membranaire des cellules T47D, le reste étant libéré dans le milieu.

2) Analyse de la lactotransferrine libérée dans le milieu

Une aliquote du milieu d'incubation à 37°C prélevée aux temps 5, 15, 30, 60 et 90 min, est analysée en gel de polyacrylamide à 15% en présence de SDS selon les conditions décrites à la page 125 (Fig.43 B, p.189). Pour les différents temps indiqués, une seule bande protéique radioactive de 80 kDa est observée. Cette bande correspond à la masse moléculaire de la lactotransferrine native. Aucun produit de dégradation de masse moléculaire inférieure à 80 kDa n'est détectable.

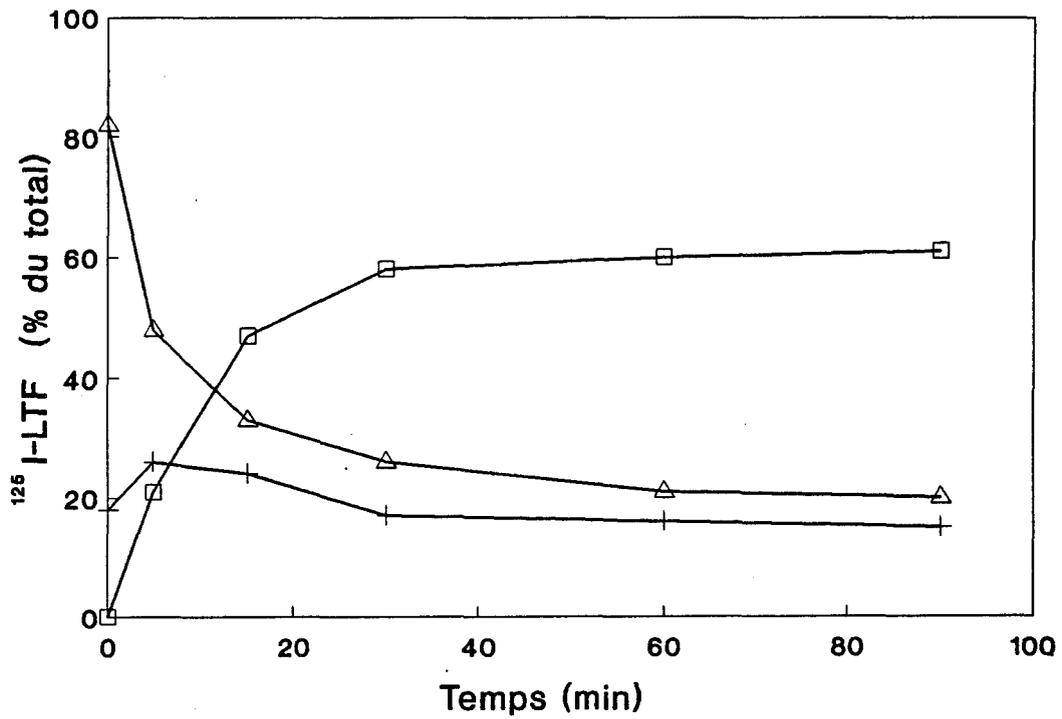


Figure 42 : Etude de la destinée intracellulaire de la lactotransferrine- ^{125}I (LTF) dans les cellules T47D : LTF internalisée (+-+), LTF libérée dans le milieu (□-□) et LTF fixée à la surface cellulaire (Δ-Δ).

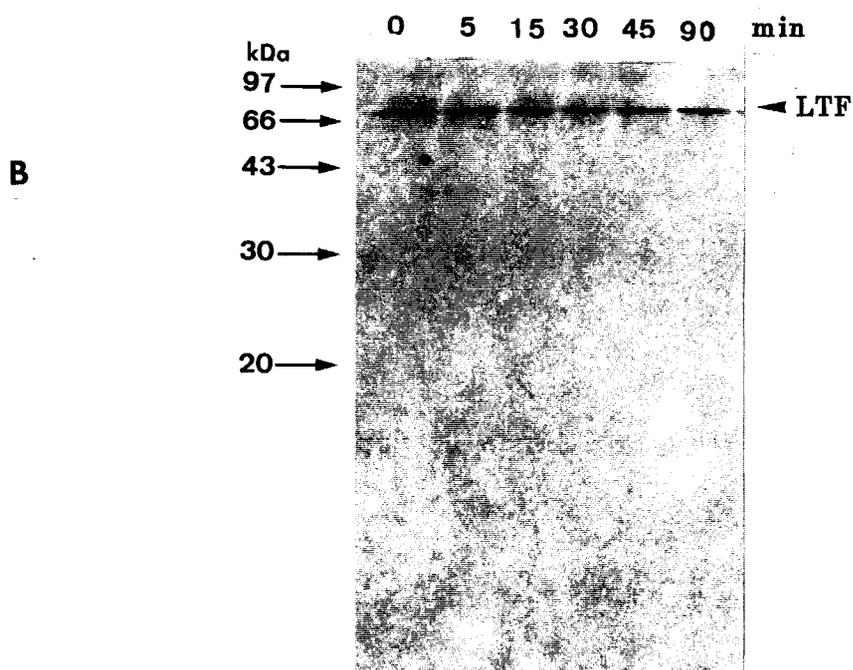
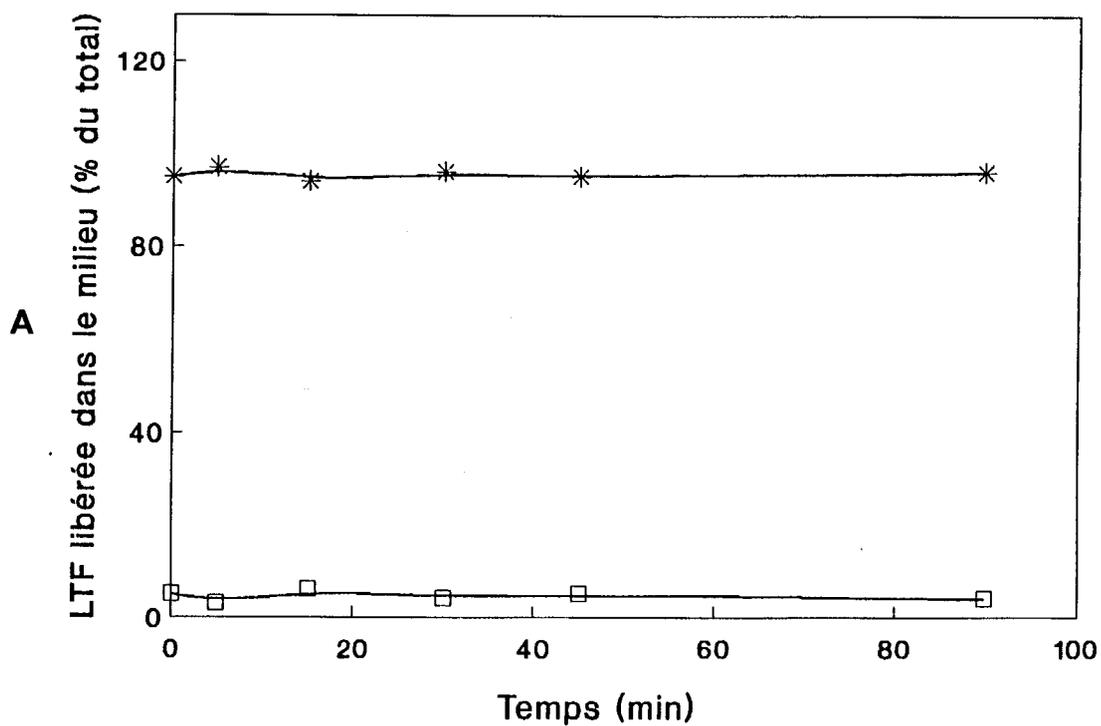


Figure 43 : Analyse de la lactotransferrine-¹²⁵I libérée à 37°C dans le milieu d'incubation, par précipitation à l'ATCA (A) et par autoradiographie (B) (fraction acido-soluble (□-□), fraction acido-précipitable (*-*)).

Le reste du milieu d'incubation est précipité à l'ATCA 10%. La fraction acido-soluble contenant des micromolécules ne constitue que 3 à 5% de la quantité totale de radioactivité présente dans le milieu. Ce pourcentage ne varie pas au cours du temps (Fig.43 A p.189). La fraction acido-précipitable qui renferme la lactotransferrine-¹²⁵I intacte, est de l'ordre de 95%. Ces résultats suggèrent que la lactotransferrine libérée dans le milieu n'a pas été dégradée par les cellules.

C- CONCLUSION

Les résultats obtenus par microscopie de fluorescence suggèrent que la lactotransferrine n'est pas endocytée dans les cellules.

Par radiomarquage de la protéine nous avons confirmé ces résultats en démontrant que 40% de la lactotransferrine reste fixée à la surface cellulaire. En tenant compte de la fixation non-spécifique de la protéine sur les cellules T47D, le faible taux de lactotransferrine internalisée mesurée (5%) pourrait être expliqué par un mécanisme d'endocytose en phase fluide. Par conséquent, la lactotransferrine non dégradée qui a été retrouvée dans le milieu n'a pas été exocytée par la cellule. Il s'agit probablement d'un simple déplacement d'équilibre d'une partie de la lactotransferrine fixée aux sites membranaires vers le milieu d'incubation qui n'en contient pas.

IV- ETUDE DE LA DESTINEE INTRACELLULAIRE DU FER FIXE A LA LACTOTRANSFERRINE

A- CINETIQUE A 37°C DE LA DESTINEE INTRACELLULAIRE DU ⁵⁹Fe DE LA LACTOTRANSFERRINE

La lactotransferrine marquée au ⁵⁹Fe a été préalablement fixée sur les cellules T47D et une cinétique a été réalisée à 37°C pour déterminer si le fer pouvait être internalisé dans les cellules. Après 5, 15, 30, 45 et 90 min à 37°C, la lactotransferrine fixée à la surface cellulaire est détachée par traitement à la trypsine afin de déterminer la quantité de lactotransferrine radioactive internalisée dans les cellules. Comme le montre la figure 44 (p.192), la radioactivité associée aux cellules est faible et n'augmente pas au cours du temps. La quantité de ⁵⁹Fe mesurée correspond au fer fixé à la lactotransferrine qui est restée attachée aux cellules après traitement à la trypsine. L'absence d'accumulation du fer dans les cellules suggère que le fer n'a pas été endocyté dans les cellules T47D.

B- LIBERATION DU FER FIXE A LA ¹²⁵I-LACTOTRANSFERRINE

L'expérience précédente ayant démontré que le fer ne pénétrait pas dans les cellules, nous avons étudié la libération du fer de la lactotransferrine fixée au récepteur, en mesurant le rapport

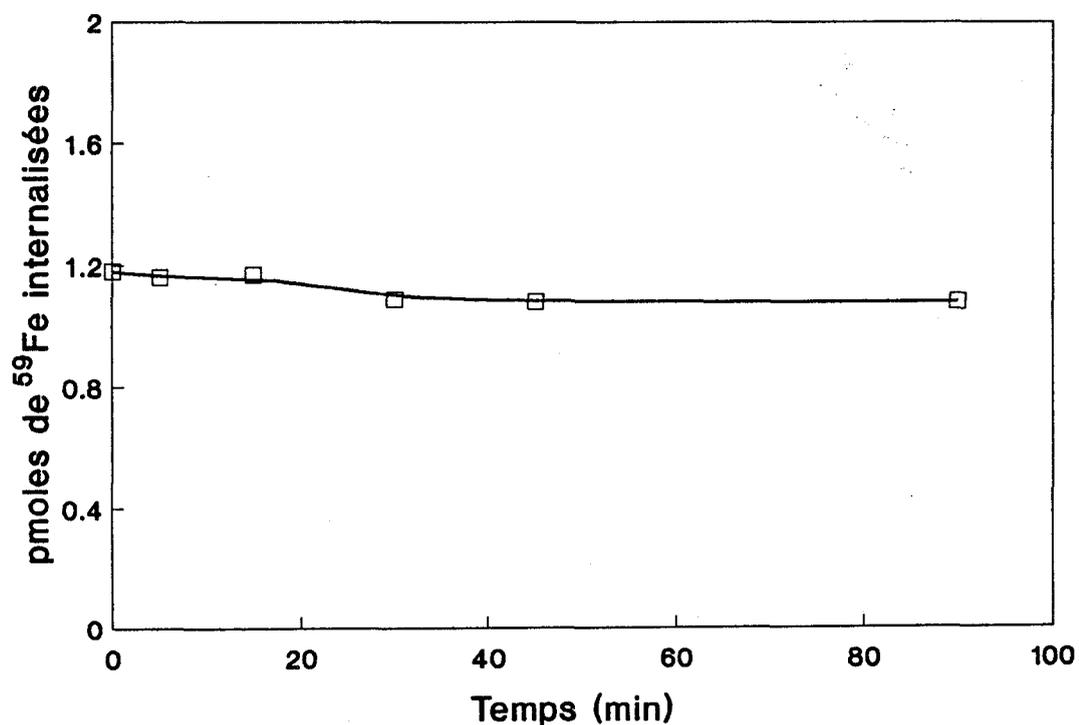


Figure 44 : Etude cinétique de la destinée intracellulaire du fer fixé à la lactotransferrine dans les cellules T47D : mesure de la radioactivité du ^{59}Fe associée aux cellules, après traitement à la trypsine.

fer/protéine associé aux membranes, à 4°C et à 37°C, par double marquage de la lactotransferrine à l'¹²⁵I et au ⁵⁹Fe, selon la technique décrite à la page 126.

A 4°C, le rapport molaire fer/protéine lié aux cellules chute rapidement, entre 0 et 5 min, de 1,6 à 1,38, ce qui indique une libération de 14% du fer de la lactotransferrine fixée au récepteur. A partir de 5 min d'incubation, le rapport molaire fer/protéine membranaire diminue progressivement et atteint un maximum de 28% de fer libéré dans le milieu à 45 min (Fig.45 A, p.194).

Lorsque les cellules sont placées à 37°C, après une préincubation à 4°C pour saturer tous les sites de fixation, une baisse rapide du rapport fer/protéine est à nouveau observée entre 0 et 10 min d'incubation (38% de fer libéré) (Fig.45 B, p.194). Au bout de 90 min un maximum de 55% du fer est relâché par la lactotransferrine humaine associée aux cellules.

Dans le but de vérifier que le nitrilotriacétate, introduit dans le milieu d'incubation pour chelater le fer, n'influçait pas la libération du fer de la lactotransferrine, la lactotransferrine (avec un rapport molaire fer/protéine de 1,6) a été incubée en présence de 100 µM de nitrilotriacétate, mais en absence de cellules. Après 90 min d'incubation, la lactotransferrine a été isolée sur colonne de SP-Séphadex C50. Le rapport molaire fer/protéine de la lactotransferrine purifiée est identique au rapport fer/protéine de la lactotransferrine introduite dans le milieu, suggérant ainsi que le ⁵⁹Fe ne s'est pas dissocié spontanément de la protéine durant l'incubation avec le nitrilotriacétate.

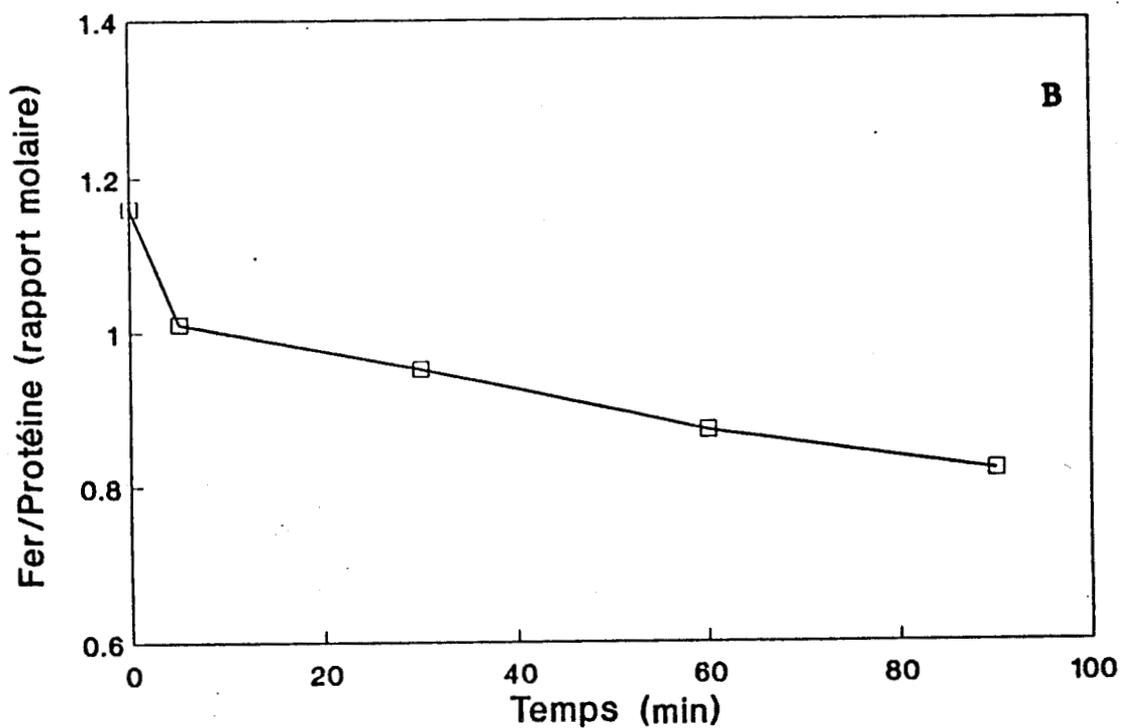
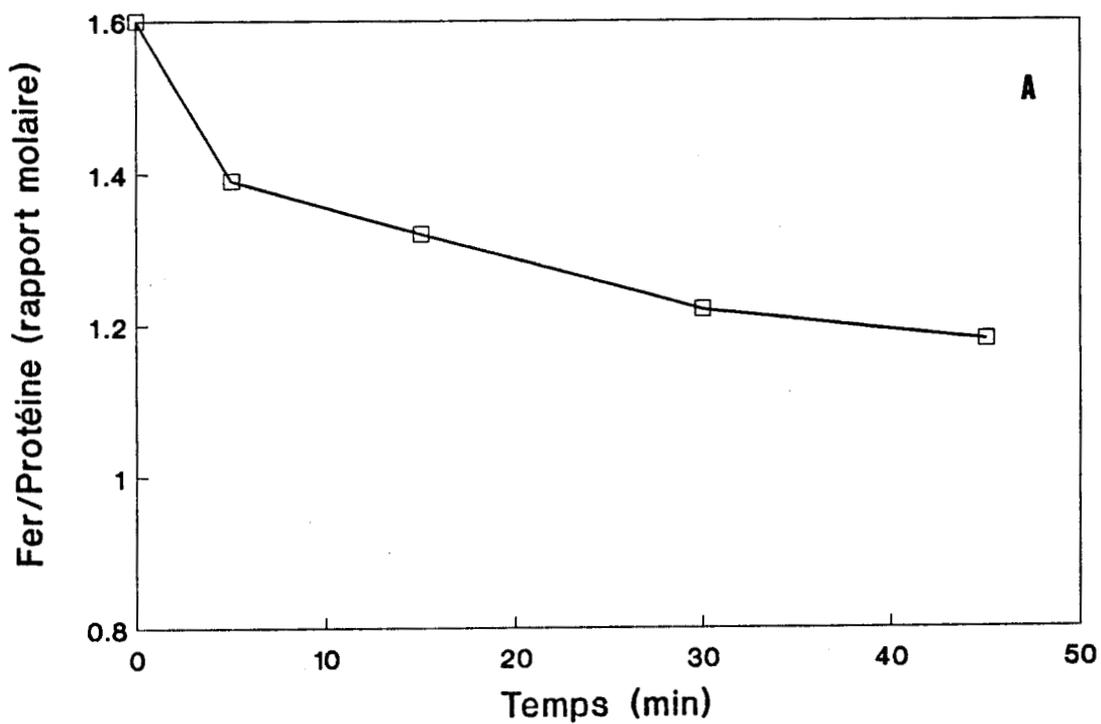


Figure 45 : Etude cinétique de la libération du fer de la lactotransferrine fixée aux cellules T47D, à 4°C (A) et à 37°C (B) : détermination du rapport molaire fer/protéine associé aux cellules.

C- CONCLUSION

Aucune accumulation du ^{59}Fe n'a été observée dans les cellules T47D, au cours du temps, ce qui suggère que le fer n'a pas été internalisé. Le rapport fer/protéine associé à la membrane plasmique diminue de 1,6 à 0,88 au bout de 90 min d'incubation à 37°C, ce qui indique une libération dans le milieu extérieur de 55% du fer de la lactotransferrine fixée au récepteur.

III- CONCLUSION

Toutes les études sur l'endocytose de la sérotransferrine démontrent clairement que le rôle majeur de cette protéine est de livrer le fer aux cellules pour leur croissance cellulaire. Deux mécanismes ont pu être mis en évidence:

- un mécanisme universel qui implique l'endocytose du complexe récepteur-sérotransferrine diférique dans les cellules, la libération du fer à pH acide dans les endosomes et le recyclage du complexe récepteur aposérotransferrine à la surface cellulaire (Klausner et al., 1983; Dautry-Varsat et al., 1983);

- un mécanisme secondaire, démontré dans certaines cellules (K562, HeLa, hépatocytes), qui repose sur la réduction du fer de la sérotransferrine au niveau de la membrane plasmique par une NADH oxydoréductase (Thorstensen 1988; Thorstensen et Romslo, 1988, 1990). Cette réaction entraîne une libération du fer fixé à la protéine et sa capture par les cellules.

Selon le type cellulaire ou le degré de saturation en fer de la protéine, l'un ou l'autre de ces mécanismes pourrait être privilégié.

En ce qui concerne la lactotransferrine, comme nous l'avons décrit

dans le chapitre des "Généralités", les résultats concernant l'étude du mécanisme d'internalisation de la lactotransferrine varient selon la nature des cellules impliquées et ceux sur les mécanismes d'internalisation du fer sont pratiquement inexistantes.

Nos résultats démontrent que la lactotransferrine, d'une part, n'est pas endocytée dans les cellules épithéliales cancéreuses T47D et que d'autre part, 40% de la protéine restent fixés spécifiquement au récepteur, après 90 min d'incubation à 37°C. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Roiron-Lagroux et Figarella (1990) qui n'ont observé aucune endocytose de la lactotransferrine humaine dans la lignée entérocytaire HT29-D4. Il semblerait donc que la lactotransferrine ne suive pas la voie classique de l'endocytose du complexe sérotransferrine-récepteur, caractérisée dans de nombreuses cellules.

L'étude de la destinée intracellulaire du fer fixé à la lactotransferrine indique que le fer n'est pas internalisé dans les cellules T47D, mais que 55% du fer est libéré de la lactotransferrine fixée au récepteur, après 90 min d'incubation à 37°C.

Deux mécanismes pourraient expliquer la libération du fer de la lactotransferrine associée au récepteur. Le premier mécanisme est fondé sur l'observation que 28% du fer de la lactotransferrine sont libérés à 4°C, suggérant ainsi que la fixation de la lactotransferrine sur son récepteur induit déjà une libération du fer même à basse température. Par diffraction des rayons X, Anderson et al. (1990) ont montré que les deux sites de fixation du fer de la lactotransferrine humaine prennent une conformation "fermée" en présence de fer. En absence de métal, le site de fixation du fer du lobe N-terminal adopte une conformation ouverte par rotation des domaines NI et NII autour de leur zone charnière. Dans les mêmes conditions expérimentales, le site du lobe C-terminal reste fermé même en absence de ligand (Anderson et al., 1990). Par conséquent, il est permis de penser que l'interaction de la

lactotransferrine avec son récepteur puisse induire un changement conformationnel de la protéine et, suite à l'ouverture du lobe N-terminal de la lactotransferrine, conduire à la libération d'un atome de fer. Dans le cas de la sérotransferrine, Bali et al. (1990) ont également observé que l'interaction de la protéine avec son récepteur facilitait à pH acide la libération du fer. Selon ces auteurs, le fer est libéré plus facilement à partir du lobe C-terminal.

De nombreuses études physicochimiques et structurales ont démontré d'une part que le lobe C-terminal libérait moins facilement son fer que le lobe N-terminal (Mazurier et al., 1981) et d'autre part que la présence d'un pont disulfure restreignait les mouvements interdomaines du lobe C-terminal qui interviennent dans l'ouverture du site de fixation du fer (Anderson et al., 1987; Baker et al., 1987). Contrairement au lobe C-terminal, le lobe N-terminal est beaucoup plus flexible (Anderson et al., 1987, 1990). Sur la base de ces observations, l'hypothèse que le lobe N-terminal de la lactotransferrine perde son fer lors de l'interaction du domaine NI de la lactotransferrine avec le récepteur, est la plus probable.

Le second mécanisme possible pour la libération du fer par la lactotransferrine est basé sur l'observation qu'une quantité de fer plus importante est libérée de la lactotransferrine à 37°C plutôt qu'à 4°C. Des études récentes ont démontré que la sérotransferrine pouvait donner son fer aux hépatocytes par un mécanisme différent de celui de l'endocytose du complexe ligand-récepteur (Thorstensen, 1988). En effet, le fer de la sérotransferrine fixée à la surface cellulaire est réduit par une NADH oxydoréductase membranaire, traverse la membrane plasmique puis est stocké dans la ferritine intracellulaire (Löv et al., 1986; Sün et al., 1987 a et b). Tout récemment, Sün et al. (1991) ont montré que le fer de la lactotransferrine était également réduit au niveau de la membrane plasmique des cellules

erythroleucémiques K562 et des cellules épithéliales de l'utérus HeLa. Cette réaction entraîne une libération du fer de la lactotransferrine, avec une vitesse supérieure à celle déterminée dans le cas de la sérotransferrine. Le métal est alors capturé par un chélateur introduit dans le milieu extérieur. Sur des membranes de foie isolées, ces auteurs ont pu démontrer que la réduction du fer de la lactotransferrine est provoquée par l'action d'une NADH oxydoréductase membranaire. Ce mécanisme d'oxydoréduction pourrait expliquer la libération à 37°C du fer de la lactotransferrine fixée aux cellules T47D. Cependant, contrairement au fer de la sérotransferrine qui peut être capturé par les cellules hépatocytaires et les cellules épithéliales HeLa (Thorstensen et Romslo, 1988, 1990), celui de la lactotransferrine n'est pas internalisé dans les cellules épithéliales T47D. Ainsi, le rôle de la lactotransferrine ne semble donc pas être celui de livrer directement le fer aux cellules.

Les expériences réalisées à 37°C en présence de lactotransferrine-¹²⁵I démontrent que la lactotransferrine qui a perdu son fer reste fixée sur son récepteur, après 20 min d'incubation. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par l'inhibition de la fixation de la lactotransferrine-¹²⁵I par l'apolactotransferrine, la lactotransferrine native ou la diférique. Ces expériences prouvent que contrairement au récepteur de la sérotransferrine qui reconnaît avec une affinité très inférieure l'aposérotransferrine par comparaison à la sérotransferrine saturée, le récepteur de la lactotransferrine possède la même affinité pour la lactotransferrine saturée en fer et celle désaturée. Ainsi, la lactotransferrine fixée au récepteur pourrait intervenir dans les mécanismes d'oxydoréduction membranaire d'une part, comme accepteur d'électrons et d'autre part, en stimulant directement l'activité de la NADH oxydoréductase membranaire. Cette

hypothèse serait en accord avec celle proposée par Sün et al. (1991), qui ont démontré que la lactotransferrine peut activer directement la réduction de fer externe, introduit dans le milieu d'incubation sous forme de citrate ferrique. Ces réactions conduisent à une oxydation du NADH^+ cytosolique en NAD^+ qui induit une libération d'ions H^+ dans le milieu extracellulaire et une entrée d'ions Na^+ , par un système antiport Na^+/H^+ , provoquant ainsi une alcalinisation du cytoplasme et une activation de la pompe ATPase Na^+/K^+ -dépendante (Sün et al. 1991). Ces différents phénomènes induisent une augmentation du potentiel membranaire des cellules. Ils sont directement ou indirectement impliqués dans la croissance cellulaire et peuvent être contrôlés par la NADH oxydoréductase (Thorstensen et Romslo, 1990).

De nombreux auteurs ont observé que la lactotransferrine humaine stimulait la croissance de différentes cellules lymphocytaires (Hashizume et al., 1983; Mazurier et al., 1989), myéloblastiques (Byatt et al., 1989), macrophagiques (Oria et al. 1988) et entérocytaires (Amouric et al. 1984; Nichols et al., 1987, 1990). Cependant, le rôle de la lactotransferrine dans la prolifération cellulaire ne semble pas être lié directement à l'apport de son fer, puisque Oria et al. (1988) démontrent que le fer fixé à la lactotransferrine n'est pas internalisé et Nichols et al. (1990), Byatt et al. (1990) observent que l'apolactotransferrine peut se substituer à la lactotransferrine saturée en fer pour stimuler la croissance. Nos résultats concernant l'étude de la destinée intracellulaire de la lactotransferrine et de son fer contribuent donc à éclaircir le rôle de la lactotransferrine dans la prolifération cellulaire et suggèrent qu'un mécanisme d'oxydoréduction membranaire, plutôt qu'une capture du fer de la lactotransferrine par la cellule, pourrait intervenir dans cette activité.

CONCLUSION

CONCLUSION GENERALE

Les travaux antérieurs réalisés au Laboratoire ont montré que le récepteur de la lactotransferrine, absent de la surface des lymphocytes au repos, apparaît sur les lymphocytes humains activés par la phytohémagglutinine et que la lactotransferrine joue alors un rôle de facteur de croissance.

Sur la base de ces résultats et sur celle des résultats acquis par d'autres auteurs à propos du rôle de la sérotransferrine dans la multiplication cellulaire et dans la cancérisation, nous avons recherché et quantifié la présence de récepteurs de la lactotransferrine à la surface de différentes cellules cancéreuses et précancéreuses de glande mammaire humaine.

Afin, d'une part, de déterminer, le rôle des récepteurs de la lactotransferrine sur des cellules cancéreuses et d'autre part, d'envisager l'utilisation de la lactotransferrine en thérapie anticancéreuse, nous avons poursuivi nos travaux par l'étude de l'interaction de la lactotransferrine avec son récepteur et par celle de la destinée intracellulaire de la protéine et de son fer dans les cellules de glande mammaire humaine T47D.

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

I - Les expériences de fixation et de cytofluorimétrie démontrent, pour la première fois, la présence d'un récepteur spécifique de la lactotransferrine dans une lignée cellulaire maligne de glande mammaire humaine, appelée T47D. Ce récepteur fixe la lactotransferrine avec des paramètres voisins ($K_d = 120 \text{ nM}$, $n = 1,2 \times 10^6$ sites/cellule) de ceux

déterminés pour les lymphocytes activés ($K_d = 80$ nM, $n = 4 \times 10^5$ sites/cellule). Le nombre de sites de fixation de la lactotransferrine, trois fois plus élevé sur les cellules épithéliales T47D que sur les lymphocytes, pourrait s'expliquer par la différence de taille entre les deux types cellulaires.

L'inhibition de la fixation de la lactotransferrine diferrique par l'apolactotransferrine indique que le degré de saturation en fer n'influence pas le mécanisme de reconnaissance de la protéine par le récepteur.

L'anticorps polyclonal anti-récepteur lymphocytaire préparé au Laboratoire par B. Leveugle reconnaît spécifiquement les cellules T47D, suggérant que le récepteur présent sur cette lignée possède des épitopes antigéniques communs à ceux du récepteur caractérisé chez les lymphocytes activés. Le protocole d'immunoprécipitation mis au point en utilisant cet anticorps a permis d'identifier le récepteur comme une protéine de 126 kDa.

II - La recherche du récepteur de la lactotransferrine s'est poursuivie à la surface d'autres cellules cancéreuses issues de métastases ou de tumeurs primaires ainsi que sur des cellules précancéreuses établies à partir de mastopathies et de tissus sains. Trois techniques cytofluorimétriques utilisant la lactotransferrine fluorescente, des anticorps anti-lactotransferrine et des anticorps anti-récepteur ont été appliquées et les paramètres de fixation ont été calculés par marquage radioactif de la lactotransferrine.

Les résultats obtenus par ces différentes méthodes peuvent se résumer de la manière suivante :

1) Les lignées cancéreuses épithéliales MCF7, BT20, VHB1 et HH9 possèdent le récepteur de la lactotransferrine dont les caractéristiques

sont identiques (en tenant compte de la taille respective des cellules), d'une part, à celles obtenues pour les cellules T47D et les lymphocytes activés et, d'autre part, à celles des cellules précancéreuses de mastoses (NPM14T, NPM21T) et de tissu sain (HBL100). Les paramètres de fixation varient de 120 nM à 350 nM pour le K_d et un nombre de sites important de $1,1 \times 10^6$ à $1,6 \times 10^6$ sites/cellule.

2) Seule la lignée MDAMB231 présente une affinité environ 6 fois plus faible que celle calculée pour les autres lignées et un nombre de sites très élevé, comparable aux valeurs obtenues par d'autres auteurs chez les macrophages. De plus, ces cellules ne sont pas reconnues par l'anticorps anti-récepteur, suggérant ainsi une fixation non-spécifique de la lactotransferrine sur la membrane cytoplasmique probablement en raison d'interactions ioniques non-spécifiques due au caractère basique de la lactotransferrine.

Nos résultats préliminaires n'ont cependant pas mis en évidence de différence concernant le nombre de récepteurs de la lactotransferrine présent dans les lignées précancéreuses et cancéreuses. La transformation de la lignée HBL100 de tissu sain en lignée tumorigène HH9 par transfection par l'oncogène hst n'a pas modifié les paramètres de fixation de la lactotransferrine sur les cellules.

Néanmoins, afin d'envisager l'utilisation de la lactotransferrine comme marqueur de cancérisation, ces études devront être confirmées par des expériences sur des primocultures de tissus sains et de carcinomes. De même, la régulation de la glande mammaire étant sous la dépendance de nombreux facteurs de croissance et d'hormones stéroïdiennes, il serait particulièrement intéressant de poursuivre ces travaux en étudiant l'influence de ces facteurs sur l'apparition du récepteur de la lactotransferrine à la surface de différentes cellules.

III - La connaissance des mécanismes d'interaction de la lactotransferrine avec son récepteur est indispensable pour, d'une part, comprendre le rôle biologique de cette protéine et, d'autre part, pour utiliser la lactotransferrine comme vecteur potentiel de drogues anti-tumorales, comme cela a été envisagé dans le cas de la sérotransferrine.

Nous avons donc étudié la nature et la localisation du site d'interaction de la lactotransferrine avec le récepteur membranaire présent sur les lymphocytes activés et les cellules T47D. Dans une première étape, différents fragments N- et C-tryptiques, correspondant respectivement aux lobes N- et C-terminaux de la lactotransferrine, ont été isolés selon le protocole décrit par Legrand et al. (1984, 1986). Par une nouvelle hydrolyse du fragment N-t par la protéase V8 de Staphylococcus aureus, de nouveaux peptides ont été purifiés.

Les expériences de fixation et de compétition réalisées en présence de ces fragments démontrent clairement, d'une part, que la fraction glycanique de la lactotransferrine n'est pas impliquée dans la reconnaissance et, d'autre part, que le site de fixation de la protéine sur le récepteur est localisé dans le lobe N-terminal de la molécule et, plus précisément, entre les résidus d'acides aminés 4 à 52 du domaine NI de la lactotransferrine humaine.

Sur la base de ces résultats et en accord avec ceux de Legrand et al. (1991 a et b), le peptide 3 à 52 a été modélisé par le Groupe du Professeur Vergoten. Ces études ont permis de démontrer que cette région de la lactotransferrine humaine était facilement accessible au solvant et qu'elle conservait la même conformation dans la lactotransferrine bovine. Néanmoins, dans la sérotransferrine, la conformation de la région en coude β comprenant les résidus d'acides aminés 30 à 35 est nettement différente de celle de la lactotransferrine,

confirmant ainsi le fait que la sérotransferrine soit incapable de se fixer au récepteur de la lactotransferrine humaine. La synthèse de ce peptide est actuellement en cours dans le Laboratoire du Professeur Tartar et devrait permettre par la suite de déterminer si ce peptide est capable de mimer les activités biologiques de la lactotransferrine et à envisager éventuellement une application en thérapie.

La mutagènèse dirigée permettra de définir plus précisément les acides aminés impliqués dans le site de fixation de la protéine sur son récepteur.

De même, à partir de la structure et de la conformation du site de fixation de la lactotransferrine sur son récepteur, la structure tridimensionnelle du site de reconnaissance du récepteur lui même, peut être envisager.

IV - Afin d'expliquer la présence du récepteur de la lactotransferrine chez les cellules T47D, nous nous sommes intéressée à la destinée intracellulaire de la lactotransferrine et de son fer dans ces cellules. Les expériences de cinétique à 37°C réalisées par microscopie de fluorescence et par techniques de radiomarquage de la protéine à ^{125}I montrent que la lactotransferrine n'est pas endocytée dans les cellules, mais reste fixée spécifiquement à la surface cellulaire. Par marquage de la lactotransferrine au ^{59}Fe , nous avons suivi la destinée du fer de la protéine fixée au récepteur et démontré que le fer n'était pas non plus internalisé dans le cytoplasme de ces cellules. L'interaction de la lactotransferrine avec son récepteur induit une libération du fer dans le milieu extérieur. Nos résultats rejoignent ceux récemment décrits par Sün et al. (1991) qui démontrent que le fer de la lactotransferrine est réduit au niveau de la membrane plasmique des cellules K562 et HeLa, puis libéré de la protéine. Ces mêmes auteurs

ont montré que la NADH oxydoréductase était impliquée dans ce mécanisme en utilisant des membranes de foie de Rat isolées, tissu où l'activité de cette enzyme est facilement détectable.

Nos travaux indiquent que le rôle de l'interaction de la lactotransferrine avec son récepteur n'est pas de livrer le fer aux cellules, comme c'est le cas pour la sérotransferrine, mais suggèrent plutôt un rôle dans les mécanismes d'oxydoréduction membranaires. Ces réactions pourraient expliquer le rôle de la lactotransferrine dans la prolifération cellulaire. Des études sont en cours au Laboratoire pour mettre en évidence une relation entre le mécanisme de libération du fer de la lactotransferrine fixée à son récepteur et la NADH oxydoréductase. Parallèlement à ces travaux, des études de la prolifération des cellules T47D en présence de lactotransferrine et sous l'influence de différents facteurs intervenant dans le développement de la glande mammaire, sont envisagées.

BIBLIOGRAPHIE

- Aisen P. et Brown EB.** (1975) Structure and function of transferrin. Prog. Haematol, 9, 26-27.
- Aisen P. et Leibman A.** (1968) Citrate mediated exchange of Fe^{3+} among transferrin molecules. Biochem. Biophys. Res. Commun., 32, 220-226.
- Aisen P. et Leibman A.** (1971) Lactoferrin and transferrin: a comparative study. Biochim. Biophys. Acta, 257, 314-323.
- Aisen P., Leibman A. et Zweier J.** (1978) Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. J. Biol. Chem., 253, 1930-1937.
- Aisen P. et Listowsky I.** (1980) Iron transport and storage. Ann. Rev. Biochem., 49, 357-393.
- Alcantera O., Javors M. et Boldt DH.** (1991) Induction of protein kinase C mRNA in cultured lymphoblastoid T cells by iron-transferrin but not by soluble iron. Blood, 77, 1290-1297.
- Ambruso DR. et Johnston RB.** (1981) Lactoferrin enhances hydroxyl radical production by human neutrophils opsonin particulate fractions and enzymatic generating system. J. Clin. Invest., 67, 352-360.
- Amouric M., Marvaldi J., Pichon J., Bellot F. et Figarella C.** (1984) Effect of lactoferrin on the growth of a human colon adenocarcinoma cell line: Comparison with transferrin. In Vitro, 20, 543-548.
- Anderson RG., Brown MS. et Goldstein JLG.** (1977) Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor bound low density lipoprotein in human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 2434-2241.
- Anderson BF., Baker HM., Dodson EJ., Norris GE., Rumball SV., Waters V. et Baker EN.** (1987) Structure of human lactoferrin at 3.2 Å resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1-5.
- Anderson BF., Baker HM., Norris GE., Rice DW. et Baker EN.** (1989) Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. J. Mol. Biol., 209, 711-734.

Anderson BF., Baker HM., Norris GE., Rumball SV., et Baker EN. (1990) Apolactotransferrin structure demonstrates ligand-induced conformational changes in transferrins. Nature, 334, 784-787.

Anghileri LJ., Ottaviani M. et Raynaud C. (1983) In vivo distribution of ^{67}Ga and ^{111}In complexes with transferrin. Uptake by sarcomas tumors. J. Nucl. Med. All. Sci., 27, 17-20.

Arnold R., Cole MF. et Mac Ghee AG. (1977) A bactericidal effect for human lactoferrin. Science, 197, 263-265.

Arnold RR., Russell JE., Champion WJ., Brewer M. et Gauthier JJ. (1982) Bactericidal activity of human lactoferrin: differentiation from the stasis of iron deprivation. Infec. Immunity, 35, 792-799.

Arnold RR., Russell JE., Champion WJ. et Gauthier JJ. (1981) Bactericidal activity for human lactoferrin: influence of physical conditions and metabolic state of the target microorganism. Infec. Immunity, 32, 655-660.

Aulbert E., Disselhoff W., Sörje H., Schulz E. et Gericke D. (1980) Lysosomal accumulation of ^{67}Ga -transferrin in malignant tumors in relation to their growth rate. Eur. J. Cancer, 16, 1217-1232.

Azari P. et Baugh RF. (1967) A simple and rapid procedure for preparation of a large quantity of pure ovotransferrin. Arch. Biochem. Biophys., 118, 138-144.

Azuma N., Mori H., Kaminogawa S. et Yamauchi K. (1989) Stimulatory effect of human lactoferrin on DNA synthesis in BALB/c 3T3 cells. Agri. Biol. Chem., 53, 31-35.

Bagby GC., McCall E. et Layman DL. (1983) Regulation of colony stimulating activity production. Interactions of fibroblasts mononuclear phagocytes and lactoferrin. J. Clin. Invest., 71, 340-344.

Bagby GC., Rigas VD. et Bennett RM. (1981) Interaction of lactoferrin monocytes and T lymphocyte subsets in the regulation of steady-state granulopoiesis in vitro. J. Clin. Invest., 68, 56-63.

Bailey S., Evans RW., Garratt RC., Gorinsky B., Hasnain S., Horsburg C., Jhoti H., Lindley PF., Mydin A., Sarra R., et watson JL. (1988) Molecular structure of serum transferrin at 3.3 Å resolution. Biochemistry, 27, 5804-5812.

Baker EN., Anderson BF., Baker HM., Haridas M., Geoffroy B., Norris JGE., Rumball SV. et Smith CA. (1991) Structure function and flexibility of human lactoferrin. Int. J. Biol. Macromol., 13, 122-129.

Baker EN. et Rumball SV. (1977) Crystallographic data for human lactoferrin. J. Mol. Biol., 111, 207-210.

Baker EN. Rumball SV et Anderson BF. (1987) Transferrins: insight into structure and function from studies on lactoferrin. Trends Biochem. Sci., 12, 350-353.

Bali PK., Zak O. et Aisen P. (1990) A new role for the transferrin receptor in the release of iron from transferrin. Biochemistry, 30, 324-328.

Barresi G. et Tuccari G. (1984) Lactoferrin in benign hypertrophy and carcinomas of the prostatic gland. Virchows Arch. A., 403, 59-66.

Barresi G. et Tuccari G. (1987) Iron binding proteins in thyroid tumors: an immunocytochemical study. Pathol. Res. Pract., 182, 344-351.

Barnes D. et Sato G. (1980) Serum free cell culture: an unifying approach. Cell, 22, 649-655.

Bartek J., Virlicky V. et Stratim A. (1985) Phylogenetically more conservative epitopes among monoclonal antibody defined antigenic sites of human transferrin are involved in receptor binding. Brit. J. Haematol., 59, 435-441.

Batey RG., Williams K. et Milson JP. (1980) A physiological model for hepatic metabolism of transferrin bound iron. Amer. J. Physiol., 238, G30-G33.

Beckerman C., Hoffer PB. et Bitran JD. (1984) The role of ⁶⁷Ga in the clinical evaluation of cancer. Semin. Nucl. Med., 14, 296-323.

Bennett RM. et Davis J. (1981) Lactoferrin binding to human peripheral blood cells: an interaction with a B-enriched population of lymphocytes and a subpopulation of adherent mononuclear cells. J. Immunol., 127, 1211-1216.

Bennett RM., Davis J., Cambell S., Portnoff S. (1983) Lactoferrin binds to cell membrane DNA. J. Clin. Invest., 71, 611-618.

Bennett RM. et Kokocinski T. (1978) Lactoferrin content of peripheral blood cells. Brit J. Haematol., 39, 509-521.

Bennett RM. et Mohla C. (1976) A solid phase radioimmunoassay for the measurement of lactoferrin in human plasma variations with age sex and disease. J. Lab. Clin. Med., 88, 156-166.

Bennett RM., Quartey AC. et Holt PJL. (1973) Lactoferrin an iron binding protein in synovial fluid. Arthritis Rhum., 16, 186-190.

Berger D. et Berger HG. (1987) Evidence for endotoxin binding capacity of transferrin. Clin. Chim. Acta, 163, 289-299.

Besançon F., Bourgeade MF. et Testa U. (1985) Inhibition of transferrin receptor expression by interferon α in human lymphoblastoid cells and mitogen induced lymphocytes. J. Biol. Chem., 260, 13074-13080.

Bezwoda WR., Baynes RD., Khan Q. et Mansoor N. (1985) Enzyme-linked immunoabsorbent assay. Plasma and tissues measurements. Clin. Chim. Acta, 151, 61-69.

Birgens HS. (1991) The interaction of lactoferrin with human monocytes. Dan. Med. Bull., 38, 244-252.

Birgens HS., Hansen NE., Karle H., Ostergaard M. et Kristensen L. (1983) Receptor binding of lactoferrin by human monocytes. Brit. J. Haematol., 54, 383-391.

Birgens HS., Karle H., Hansen NE., Kristensen L. (1984) Lactoferrin receptors in normal and leukaemic human blood cells. Scand. J. Haematol., 33, 275-280.

Birgens HS., Kristensen LO., Borregard N., Karle H. et Hansen HE. (1988) Lactoferrin mediated transfer of iron to intracellular ferritin in human monocytes. Eur. J. Haematol., 41, 52-57.

Biserte G., Havez R. et Cuvelier R. (1963) Glycoprotéines des sécrétions bronchiques. Exp. Ann. Biochem. Med., 25, 85-120.

Bjorn MJ., Larrick J., Piatak M. et Wilson J. (1984) Characterization of translational inhibitors from *Phytolacca Americana*. Amino-terminal sequence determination and antibody inhibitor conjugates. Biochim. Biophys. Acta, 790, 154-163.

Bluard-Deconinck JM., Williams J., Evans RW., van Snick J., Osinski PA. et Masson PL. (1978) Iron binding fragments from the N-terminal and C-terminal region of human lactoferrin. Biochem. J., 171, 321-327.

Bock K., Arnap J. et Lönngren J. (1982) The preferred conformation of oligosaccharides derived from the complex type carbohydrate portions of glycoprotein. Eur. J. Biochem., 129, 171-178.

Bomford AB. et Munro HN. (1985) Transferrin and its receptor: their roles in cell function. Hepatology, 5, 870-875.

Bomford A., Young SP., Nouri-Aria K. et Williams R. (1983) Uptake and release of transferrin and iron by mitogen-stimulated human lymphocytes. Brit. J. Haematol., 55, 93-101.

Bonneterre J., Peyrat JP., Beuscart R. et Demaille A. (1990) Prognostic significance of insulin-like growth factor 1 receptors in human breast cancer. Cancer Res., 50, 6931-6935.

Bridges KR. et Cudkowicz A. (1984) Effect of iron chelators on the transferrin receptor in K562 cells. J. Biol. Chem., 259, 12970-12977.

Brock JH. (1981) The effect of iron and transferrin on the response of serum free cultures of mouse lymphocytes to concanavalin A and lipopolysaccharide. Immunology, 43, 387-392.

Brock JH. (1985) The transferrins. In : "Metalloproteins" (Harrison PM., Ed.) Mac Millan, London, 183-262.

Brock JH. et Arzabe FR. (1976) Cleavage of diferric bovine transferrin into two monoferric fragments. FEBS Lett., 69, 63-66.

Brock JH., Azarbe FR., Lampraeve F. et Piniero A. (1976) The effect of trypsin on bovine transferrin and lactoferrin. Biochim. Biophys. Acta, 446, 214-255.

Brock JH., Azarbe FR., Richardson NE. et Deverson EV. (1978) Characterization of monoferric fragments obtained by tryptic cleavage of bovine transferrin. Biochem. J., 171, 73-78.

Brock JH. et Mainou-Fowler T. (1983) The role of iron and transferrin in lymphocyte transformation. Immunol. Today, 4, 347-351.

Brock JH. et Rankin CM. (1981) Transferrin binding and iron uptake by mouse lymph node cells during transformation in response to concanavalin A. Immunology, 43, 393-412.

Brock JH., Mainou-Fowler T. et Webster L. (1986) Evidence that transferrin may function exclusively as an iron donor in promoting lymphocyte proliferation. Immunology, 57, 105-110.

Brooks SC., Locke ER. et Soule HD. (1973) Estrogen receptor in a human cell line (MCF7) from breast carcinoma. J. Biol. Chem., 248, 6251-6253.

Brown-Mason A., Brown S., Butcher ND. et Woodworth RC. (1987) Reversible association of half molecules of ovotransferrin in solution. Biochem. J., 245 103-109.

Brown JP., Hewick RD., Hellstrom I., Hellstrom KE., Doolittle RF. et Dreyer WJ. (1982) Human melanoma-associated antigen P97 is structurally and functionally related to transferrin. Nature, 296, 171-173.

Brown-Mason A. et Woodworth RC. (1984) Physiological levels of binding and iron donation by complementary half-molecules of ovotransferrin to transferrin receptors of chick reticulocytes. J. Biol. Chem., 259, 1866-1873.

Broxmeyer HE., Gentile P., Bognacki J. et Ralph P. (1983)
Lactotransferrin, transferrins and isoferritins regulatory molecules with potential therapeutic value in leukaemia. Blood Cells, 9, 83-105.

Broxmeyer HE., Ralph P., Bognacki J., Kincade PW. et De Sousa M. (1990)
A subpopulation of human polymorphonuclear neutrophils contains an active form of lactoferrin capable of binding to human monocytes and inhibiting production of granulocyte-macrophage colony stimulatory activity. J. Immunol., 125, 903-909.

Broxmeyer HE., Smithyman A., Eger RR., Meyers S. et De Sousa M. (1978)
Identification of lactoferrin as the granulocyte-derived inhibitor of colony-stimulating activity production. J. Exp. Med., 148, 1052-1067.

Bullen JJ. (1981) The significance of iron in infection. Rev. Infec. Dis., 3, 1127-1137.

Bullen JJ. et Armstrong JA. (1979) The role of lactotransferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leukocytes. Immunology, 36, 781-791.

Bullen JJ. et Griffiths E. (1987) Iron and infection (Bullen JJ. et Griffiths E., Eds) Wiley J. and Sons, Chichester.

Bullen JJ., Rogers HJ. et Griffiths E. (1974) Bacterial iron metabolism in infection and immunity. In : "Microbial Iron Metabolism" (Neiland JB., Ed.) Academic Press Inc., New York, 518-522.

Bullen JJ., Rogers HJ. et Leigh L. (1972) Iron binding proteins in milk and resistance to E. Coli infection in infants. Brit. Med. J., 1, 69-75.

Butler TW., Grossi CE., Canessa A., Pistola V; et Barton JC. (1990)
Immunoreactive lactoferrin in resting, activated and neoplastic lymphocytes. Leukemia Res., 14, 441-447.

Buys SS., Keogh EA. et Kaplan J. (1984) Fusion of intracellular membrane pools with cell surfaces of macrophages stimulated by phorbol esters and calcium ionophores. Cell, 38, 569-576.

Byatt JC., Schmuke JJ., Comens PG., Johnson DA. et Collier RJ. (1990) The effect of bovine lactoferrin on muscle growth in vivo and in vitro. Biochem. Biophys. Res. Commun., 173, 548-553.

Cadroy Y., Houghten RA. et Hanson ST. (1989) RGDV peptide selectively inhibits platelet dependent thrombus formation in vivo. J. Clin. Invest., 84, 939-944.

Cailleau R., MacKay B., Young RK. et Reeves WJ. (1974) Tissue culture studies on pleural effusions from breast carcinoma patients. Cancer Res., 34 801-809.

Cambell T., Skilton R., Lugumari YA. et Coombs RC. (1990) Expression of lactoferrin in normal and malignant human breast. Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 31, 209.

Campbell EJ. (1982) Human leukocyte elastase cathepsine G and lactoferrin: family of neutrophil granule glycoproteins that bind to an alveolar macrophage receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6941-6945.

Campion B., Leger D., Wieruszeski JM., Montreuil J. et Spik G. (1989) Presence of fucosylated triantennary tetraantennary and pentaantennary glycans in transferrin synthesized by the human transferrin hepatocarcinoma cell line HepG2. Eur. J. Biochem, 184, 405-413.

Carpenter G. et Cohens B. (1979) Epidermal growth factor. Ann. Rev. Biochem., 48, 193- 220.

Caselitz J., Jaup T. et Seifert G. (1981) Lactoferrin and lysozyme in carcinomas of the parotid gland. Virchows Arch. A. Path. Anat. Hist., 394, 61-73.

Casey JL., Hentze MW., Koeller DM., Canghman SW., Rouault TA., Klausner RD. et Harford JB. (1988) Iron response elements: regulatory RNA sequence that control mRNA levels and translation. Science, 240, 924-928.

Castagnola J., MacLeod C., Sunada H., Mendelsohn J. et Taetle R. (1987) Effects of epidermal growth factor on transferrin receptor phosphorylation and surface expression in malignant epithelial cells. J. Cell. Phys., 132, 492-500.

Chalbos D., Vignon F., Keydar I. et Rochefort H. (1982) Estrogens stimulate cell proliferation and induce secretory proteins in a human breast cancer cell line T47D. J. Clin. Endocrinol. Metabol., 55, 276-283.

Charpin C., Lachard A., Pourreau-Schneider N., Jacquemier J., Lavaut MN., Andonian C., Martin P. et Toga M. (1985) Localization of lactoferrin and non specific cross-reacting antigen in human breast carcinomas. Cancer, 55, 2612-2617.

Chasteen ND. (1983) The identification of the probable locus of iron and anion binding in the transferrin. Trends Biol. Chem., 245, 4269-4275.

Chéron A., Mazurier J., et 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, 585-588.

Chitambar CR., Massey EJ. et Seligman PA. (1983) Regulation of transferrin receptor expression on human leukemic cells during proliferation and induction of differentiation: effects of Ga. J. Clin. Invest., 72, 1314-1325.

Chitambar CR., Seigneur et MC., Matthaeus WG. et Lum LG (1989) Modulation of lymphocyte proliferation and immunoglobulin production by transferrin-Ga. Cancer Res., 49, 1125-1129.

Ciechanover A., Schwartz AL. et Dautry-Varsat A. (1983) Kinetics of internalization and recycling of transferrin and the transferrin receptor in a human hepatoma cell line. J. Biol. Chem., 258, 9681-9689.

Clauser J., Edeling CJ. et Fogh J. (1974) ⁶⁷Ga binding to human serum proteins and tumor components. Cancer Res., 34, 1931-1937.

Coddeville B., Strecker G., Wieruszeski JM., Spik G., Vliegenthart JFG., van Halbeek H., Peter-Katalinic J. et Egge H. (1991) Heterogeneity of bovine lactotransferrin glycans : characterization of α -Gal(1-3)- β -Gal and α -Neu Ac-(2-6)- β -GalNAc-(1-4)- β -GlcNAc substituted N-linked glycans. Carbohydr. Res. (soumis à publication).

Cole ES. et Glass J. (1983) Transferrin binding and iron uptake in mouse hepatocytes. Biochem. Biophys. Acta, 762, 102-110.

Cotner T., Das Gupta A., Papayannopoulou T. et Stamatoyannopoulos C. (1989) Characterization of a novel form of transferrin receptor preferentially expressed on normal erythroid progenitors. Blood, 73, 214-221.

Cox TM., Mazurier J., Spik G., Montreuil J. et Peters TJ. (1979) Iron binding proteins and influx of iron across the duodenal brush border. Evidence for specific lactotransferrin receptors in the human intestine. Biochim. Biophys. Acta, 588, 120-128.

Crane FL., Sün IL., Clark MG., Grebing C. et Löw H. (1985) Transplasma membrane redox systems in growth and development. Biochim. Biophys. Acta, 821, 233-264.

Crane FL., Löw IL., Morré DJ. et Faulk WP (1990) Interaction between oxidoreductase transferrin receptor and channels in the plasma membrane. In : "Growth factors: from genes to clinical application" (Vicki RS, Ed) Raven Press, New York, 129-139.

Crichton RR. et Charlotheau-Wauters M. (1987) Iron transport and storage. Eur. J. Biochem., 164, 485-506.

Crosa JH. (1984) The relationship of plasmid mediated iron transport and bacterial virulence. Ann. Rev. Microbiol., 38, 69-89.

Dautry-Varsat A. (1986) Receptor mediated endocytosis : the intracellular journey of transferrin and its receptor. Biochimie, 62, 375-381.

Dautry-Varsat A., Ciechanover A. et Lodish HF. (1983) pH and recycling of transferrin during receptor mediated endocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 2258-2262.

Dautry-Varsat A. et Lodish HF. (1984) Les récepteurs cellulaires et l'endocytose. Pour la Science, Juillet, 78-85.

Davidson LA. et Lönnerdal B. (1986) Isolation and characterization of rhesus monkey milk lactoferrin. Pediatr. Res., 20, 197-201.

Davidson LA. et Lönnerdal B. (1987) Persistence of human milk proteins in the breast fed infants. Acta Pediat. Scand., 76, 733-744.

Davidson LA. et Lönnerdal B. (1988) Specific binding of lactoferrin to brush border membrane: ontogeny and effect of glycan chain. Amer. J. Physiol., 254, G580-G596.

Davidson LA. et Lönnerdal B. (1989) Fe-saturation and proteolysis of human lactoferrin: effect on brush-border receptor mediated uptake of Fe and Mn. Amer. Physiol. Soc., 257, 930-934.

Davis RJ., Corvera S. et Czech MP. (1986) Insulin stimulates cellular iron uptake and causes the redistribution of intracellular transferrin receptors to plasma membrane. J. Biol. Chem., 261, 8708-8711.

Debanne MT., Chindemi PA. et Regoeczi E. (1981) Binding of asialotransferrins by purified rat liver plasma membranes. J. Biol. Chem., 256 4929-4933.

Debruyne V., Montreuil J. et Spik G. (1984) Immunoaffinity electrophoresis of human transferrin in normal and cirrhotic sera. Prot. Biol. Fluids, 31, 63-68.

De Jong G., van Dijk JP. et van Eijk HG. (1990) The biology of transferrin. Clin. Chim. Acta, 190, 1-46.

Dekker CJ., Kroos MJ., Van der Heul C. et Van Eijk HG. (1985) Uptake of sialo and asialo transferrins by isolated rat hepatocytes. Int. J. Biochem., 17, 701-706.

Delettre S. (1991) Etude de la spécificité de reconnaissance du récepteur de la lactotransferrine humaine. DEA, Lille.

Derisbourg P. (1990) Etude des récepteurs entérocytaires de la lactotransferrine humaine: caractérisation des récepteurs sur les cellules entérocytaires humaines HT29; étude du mécanisme d'endocytose de la lactotransferrine. Thèse d'Université, Lille.

Derisbourg P., Wieruszkeski JM., Montreuil J. et Spik G. (1990) Primary structure of glycans isolated from human leucocyte lactotransferrin. Absence of fucose residues questions the proposed mechanism of hyposideraemia. Biochem. J., 269, 821-825.

De Souza M. (1978) Lymphoid cell positioning: a new role proposed for the mechanism of control of lymphoid cell migration. Symp. Soc. Exp. Biol., 32, 393-409.

De Souza M. et Brock JH. (1989) Iron in Immunity Cancer and Inflammation (De Souza M. et Brock JH., Eds) Wiley J. and Sons, New York.

Diamond A., Devine JM. et Cooper GM. (1984) Nucleotide sequence of a human Blym transforming gene activated in Burkitt's lymphoma. Science, 225, 516-519.

Dickson RB., Hanover JA., Willingham AC. et Pastan I. (1983) Prelysosomal divergence of transferrin and epidermal growth factor during mediated endocytosis. Biochemistry, 22, 5667-5674.

Do Su IL., Enns C. et Cummings RD. (1991) Human transferrin receptor contains O-linked oligosaccharides. J. Biol. Chem., 265, 114-125.

Dorland L., Haverkamp J., Schut BL., Vliegenthart JFG., Spik G., Fournet B. et Montreuil J. (1977) The structure of the asialocarbohydrate units of human serotransferrin as proven by 360 MHz proton magnetic resonance spectroscopy. FEBS Lett., 77, 15-20.

Drouet L., Sollier C., Cisse M., Pignaud G., Mazoyer E., Fiat AM., Jollès P. et Caen JP. (1990) The antithrombotic effect of KRDS a lactotransferrin peptide compared with RGDS. Nouv. Rev. Fr. Hematol., 32, 59-62.

Dunn KW. et Maxfield FR. (1990) Use of fluorescence microscopy. In : "The study of receptor mediated endocytosis in non invasive techniques in cell biology", Wiley-Liss Inc, New York, 153-176.

D'Zouza SE., Ginsberg MH. et Burke TA. (1988) Chemical crosslinking of peptide to an adhesion receptor on platelets. Science, 242, 91-93.

Ecarot-Charrier B., Grey VL., Wilczynska A. et Schulman HM. (1980) Reticulocytes membrane transferrin receptors. Can. J. Biochem., 58, 418-426.

Edwards CL. et Hayes RL. (1969) Tumor scanning with ⁶⁷Ga-citrate J. Nucl. Med., 10, 103-105.

Ellison RT., Giehl TJ. et Laforce FM. (1988) Damage of outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. Infect. Immun., 26, 2774-2781.

Elisson RT., Laforce FM., Giehl TJ., Boose DS. et Dunn BE. (1990) Lactoferrin and transferrin damage of the Gram negative outer membrane is modulated by Ca²⁺ and Mg²⁺. J. Mol. Microbiol., 136, 1437-1446.

Engel LW. et Young NA. (1978) Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review. Cancer Res., 38, 4327-4339.

Enns CA., Suamoulainen H., Gebhardt J., Schnoden J. et Sussman HH. (1982) Human transferrin receptor: expression of the receptor is assigned to chromosome 3. Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 3241-3245.

Enns CA. et Sussman HH. (1981) Physical characterization of the transferrin receptor in human placenta. J. Biol. Chem., 256, 9820-9823.

Enns CA. et Williams A. (1991) Proper folding of the human transferrin receptor is correlated with the glycosylation of Asn 727. Xth Int. Conf. on Iron and Iron Proteins, Oxford, 27-31 juillet 1991, Keeble College Oxford University, Oxford, 08.

Esparza I. et Brock JH. (1980) The interaction of bovine transferrin and monoferric transferrin fragments with rabbit reticulocytes. Biochim. Biophys. Acta, 624, 479-489.

Evans RW. et Williams J. (1978) Studies of the binding of different iron donors to human serum transferrin and isolation of iron binding fragments from the N- and C- terminal regions of the protein. Biochem. J., 173, 543-552.

Fava RA., Comeau RD. et Woodworth RC. (1981) Specific membranes receptors for diferric transferrin in cultured rat skeletal myocytes. Biosciences Reports, 1, 377-385.

Faulk WP., Hsi BL. et Stevens PJ. (1980) Transferrin and transferrin receptors in carcinoma of the breast. Lancet, 23, 390-392.

Fitzgerald D., Bjorn M., Ferris RJ., Winkelhake JL., Frankel AE., Hamilton TC., Ozols RF., Willingham MC. et Pastan I. (1987) Anti-tumor activity of an immunotoxin in a nude mouse model of human ovarian cancer. Cancer Res., 47, 1407-14010.

Fitzgerald D., Willingham MC. et Pastan I. (1986) Anti-tumor effects of a immunotoxin made with Pseudomonas exotoxin in a nude mouse model of human ovarian cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4134-4138.

Fletcher J. et Suter P. (1969) The transport of iron by the human placenta. Clin. Sci., 36, 209-220.

Flowers CH., Skikne BS., Covell AM. et Cook JD. (1989) The clinical measurement of serum transferrin receptor. J. Lab. Clin. Med., 114, 368-377.

Foerhle E. (1990) Etude in vitro des effets de la prolactine sur la croissance des cellules issues de mastoses. DEA, Bobigny.

Fogh J. (1971) ⁶⁷Ga accumulation in malignant tumors and in prelactating or lactating breast. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 138, 1086-1090.

Frazier JL., Caskey JH., Yoffe ME. et Seligman P. (1982) Studies of the transferrin receptor on both reticulocytes and nucleated human cells in culture. J. Clin. Invest., 69, 853-865.

Fuhrmann CG., Fehlan R., Schneider H. et Knauf PA. (1989) The effect of ferricyanide with iodoacetate in calcium free solution on passive cation permeability in red blood cells. Biochim. Biophys. Acta, 983, 179-185.

Furmanski P., Li ZP., Fortuna MP., Swamy CH. et Das MR. (1989) Multiple molecular forms of lactoferrin. Identification of a class of lactoferrins that possess ribonuclease activity and lack of iron-binding capacity. J. Exp. Med., 170, 415-429.

Furmanski P. et Li ZP. (1990) Multiple forms of lactoferrin in normal and leukemic human granulocytes. Exp. Hematol., 18, 932-935.

Galbraith RM. et Galbraith GM. (1981) Expression of transferrin receptors on mitogen stimulated human lymphocytes: relation to cellular activation and related metabolic events. Immunology, 44, 703-710.

Galbraith RM., Werner P., Arnaud P. et Galbraith GM. (1980) Transferrin binding to peripheral blood lymphocytes activated by phytohemagglutinin involves a specific receptor ligand interaction. J. Clin. Invest., 66, 1135-1143.

Gamby C., Hamelin R., Salle V., Raux H., Israel L. et Crépin M. (1991) Etablissement de lignées épithéliales humaines à partir de tissus mammaires non tumoraux ou de mastopathies bénignes. Bull. Cancer, 78, 479-483.

Garcia-Canero R. (1988) Possible rôle of transferrin membrane ferricyanide reductase in mitogenic activation of rat liver. In : "Plasma membrane oxydoreductases in control of animal and plant growth" (Crane FL., Morre DJ. et Löw H., Eds) Plenum Press, New York, 27-36.

Gardiner ME. et Morgan EH. (1974) Transferrin and iron uptake by the liver in the rat. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 52, 723-726.

Gartner TK. et Bennett JS. (1985) The tetrapeptide analogue of the cell attachment site of fibronectin inhibits platelet aggregation and fibrinogen binding to activated platelets. J. Biol. Chem., 260, 11891-11894.

Gatter KC., Brown G., Trowbridge I., Woolston RE. et Mason DY. (1983) Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance. J. Clin. Pathol., 36, 539-545.

Geisow M. (1980) Pathways of endocytosis. Nature, 288, 434-436.

Gentile P. et Broxmeyer HE. (1987) In vivo action of lactoferrin. Amer. J. Haematol., 24, 457-459.

Geuze HJ., Slot JW., Stous JAM., Lodish HA. et Schwartz AC. (1983) Intracellular site of asialoglycoprotein receptor ligand uncoupling: double-label immunoelectron microscopy during receptor mediated endocytosis. Cell, 32, 277-287.

Glass J., Nunez MT. et Robinson SH. (1980) Transferrin binding and iron binding proteins of rabbit reticulocytes plasma membranes. Biochim. Biophys. Acta, 596, 293-204.

Gnezditskaya EV., Bukhova VP., Beletskaya IV., Zakharova NA. et Shakhanina KL. (1984) Lactoferrin receptors on human thymic lymphocytes. Stimulation of expression by adenosine, theophylline and supernatant of thymic lymphocytes. Bull. Exp. Biol. Med., 98, 1547-1550.

Goavec M., Mazurier J., Montreuil J. et Spik G. (1985) Rôle des glycanes dans la fixation de la sérotransferrine et de la lactotransferrine humaines sur les macrophages alvéolaires humains. C.R. Acad. Sc. Paris, 16, 689-694.

Goding JW. (1983) Transferrin receptors on lymphocytes : structure expression evolution and function. Surv. Immunol. Res., 2, 129-136.

Goding JW. et Burns GF. (1981) Monoclonal antibody OKT9 recognises the receptor for transferrin on human acute lymphocytic leukemia cells. J. Immunol., 127, 1256-1258.

Goldstein JL. et Brown MS. (1984) Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts: comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. J. Biol. Chem., 249, 5153-5162.

Goldstein JL., Brown MS., Anderson RGW., Russel DW. et Schneider WJ. (1985) Receptor mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. Ann. Rev. Cell biol., 1, 1-35.

Goodfellow P., Banting G., Sutherland R., Greaves M., Solomon E. et Povey S. (1982) Expression of human transferrin receptor is controlled by a gene on chromosome 3. Cell Genet., 8, 197-206.

Gorinsky B., Horsburgh C., Lindley PF., Moss DS., Parkar M. et Watson JL. (1979) Evidence for the bilobal nature of diferric rabbit plasma transferrin. Nature, 281, 157-158.

Goubin G., Goldman DS., Luce J., Neiman PE. et Cooper GM. (1983) Molecular cloning and nucleotide sequence of a transforming gene detected by transfection of chicken B-cell lymphoma DNA. Nature, 302, 114-119.

Green MR. et Pastewka JV. (1978) Lactoferrin is a marker for prolactin response in mouse mammary explants. Endocrinology, 103, 1510-1513.

Griffiths E., Stevenson P. et Ray A. (1990) Antigenic and molecular heterogeneity of the transferrin binding protein of *Neisseria meningitidis*. FEMS-Lett., 69, 31-36.

Gröhlich D., Morley CGD et Bezkorovainy A. (1979) Some aspects of iron uptake by rat hepatocytes in suspension. Int. J. Biochem., 10, 792-802.

Groves ML. (1960) The isolation of a red protein from milk. J. Americ. Chem. Soci., 82, 3345-3350.

- Gunasakera SW. (1972) The behaviour of tracer ^{67}Ga towards serum proteins. Clin. Chim. Acta, 39, 401-406.
- Habeshaw JA., Lister TA., Stansfield AG. et Greaves MF. (1983) Correlation of transferrin receptor expression with histological class and outcome in non-Hodgkin's lymphomas. Lancet, 1, 498-501.
- Hamilton TA., Wada HG. et Sussman HH. (1979) Identification of the transferrin receptor distribution on the surface of human cultured cells Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 6406-6410.
- Hanover JA., Willingham MC. et Pastan IH. (1984) Kinetics of transit of transferrin and epidermal growth factor through clathrin coated membranes. Cell, 39, 283-293.
- Harris WR. (1986) Thermodynamics of ^{67}Ga complexation by human lactoferrin. Biochemistry, 25, 803-808.
- Hashizume S., Kuroda K. et Murakami H. (1983) Identification of lactoferrin as an essential growth factor for human lymphocytic cell lines in serum-free medium. Biochim. Biophys. Acta, 763, 377-382.
- Hegge FN., Mahler DJ. et Larson SM. (1977) The incorporation of ^{67}Ga into the ferritin fraction of rabbit hepatocytes in vivo. J. Nucl. Med., 18, 937-939.
- Helenius A., Mellman I., Wall D. et Hubbard A. (1983) Endosomes. Trends Biochem. Sci., 8, 245-250.
- Hemmarplardh D. et Morgan EH. (1977) The role of endocytosis in transferrin uptake by reticulocytes and bone marrow cells. Brit. J. Haematol., 36, 85-96.
- Hentze MW., Rouault TA., Caughman SW., Dauris A., Harford JB. et Klausner RD. (1987) A cis acting element is necessary and sufficient for translational regulation of ferritin expression in response to iron Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 6730-6734.

Herschman HR., Simpson DL. et Cawley DB. Toxic ligand conjugates as tools in the study of receptor-ligand interactions. J. Cell Biochem., 20, 163-176.

Heylar L. et Sherman AR. (1987) Iron deficiency and IL1 production by rat leukocytes. Amer. J. Clin. Nutr., 46, 346-352.

Hill JM., Ruff MR., Weber RJ. et Pert CB. (1985) Transferrin receptors in rat brain: neuropeptide-like pattern and relationship to iron distribution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4553-4557.

Hoffbrand AV., Ganeshaguru K., Hooston JW. et Tattersall MN. (1976) Effect of iron deficiency and desferrioxamine on DNA synthesis in human cells. Brit. J. Haematol., 33, 517-526.

Hoffer PB., Beckerman C. et Henkin RE. (1978) ⁶⁷Ga imaging (Hoffer PB., Beckerman C. et Henkin RE., Ed.), Wiley Med., New York.

Hoffer PB., Huberty J. et Khayam-Bashi H. (1977) The association of ⁶⁷Ga and lactoferrin. J. Nucl. Med., 10, 713-717.

Hoffer P., Miller-Catchpole R. et Turner D. (1979) Demonstration of lactoferrin in tumor tissue from two patients with positive Ga scans. J. Nucl. Med., 20, 424-427.

Horwitz DA., Bakke AC., Abo W. et Nishiya K. (1984) Monocyte and NK cell cytotoxic activity in human adherent cell preparation: discriminating effects of interferon and lactoferrin. J. Immunol., 132, 2370-2380.

Horwitz KB., Zava DT., Thilagar AK., Jensen EM. et Mac Guire WL. (1978) Steroid receptor analysis of nine human breast cancer cell lines. Cancer Res., 38, 2434-2437.

Hu WL., Mazurier J., Montreuil J. et Spik G. (1990) Isolation and partial characterization of a lactotransferrin receptor from mouse intestinal brush border. Biochemistry, 29, 535-541.

Hu WL., Mazurier J., Sawatzki G., Montreuil J. et Spik G. (1988) Lactotransferrin receptor of mouse small-intestinal brush border. Biochem. J., 249, 435-441.

Huebers HA., Csiba E., Josephson B., Huebers E. et Finch CA. (1981) Interaction of diferric human transferrin with reticulocytes. Proc. Natl. Sci. Acad. USA, 78, 621-625.

Huebers HA. et Finch CA. (1985) Molecular aspects of iron absorption and its control. In : "Proteins of Iron Storage and Transport" (Spik G., Montreuil J., Crichton RR., Mazurier J., Eds) Elsevier, Amsterdam, 263-274.

Huebers HA., Huebers E., Csiba E., Rummel W. et Finch CA. (1983) The significance of transferrin for intestinal iron absorption. Blood, 61, 283-290.

Huebers H., Huebers E., Rummel W. et Crichton RR. (1976) Isolation and characterization of iron binding proteins from rat intestinal mucosa. Eur. J. Biochem., 66, 447-455.

Huebers HA. et Finch CA. (1987) The physiology of transferrin and transferrin receptors. Physiol. Rev., 67, 520-582.

Hughes NR. (1972) Serum transferrin and ceruloplasmin concentrations in patients with carcinoma melanoma sarcoma and cancers of haematopoietic tissues. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 50, 97-107.

Hunt RC., Dewey A. et Davis AA. (1989b) Transferrin receptors on the surfaces of retinal pigment epithelial cells are associated with the cytoskeleton. J. Cell Sci, 92, 655-666.

Hunt RC., Riegler R. et Davis AA. (1989a) Changes in glycosylation alter the affinity of the human transferrin receptor for its ligand. J. Biol. Chem. 264 9643-9648.

Hutchings SE. et Sato G. (1978) Growth and maintenance of HeLa cells in serum-free medium supplemented with hormones. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 901-904.

Iacopetta BJ. et Morgan EH. (1983) The kinetics of transferrin endocytosis and iron uptake from transferrin in rabbit reticulocytes J. Biol. Chem., 258, 9108-9115.

Iacopetta BJ., Morgan EH. et Yech GCT. (1982) Transferrin receptors and iron uptake during erythroïd development. Biochim. Biophys. Acta, 687, 204-216.

Imber MJ. et Pizzo SV. (1983) Clearance and binding of native and defucosylated lactoferrin. Biochem. J., 212, 249-257.

Izhar M., Nuchamowitz Y. et Mirelman D. (1982) Adherence of Shigelle flexneri to guinea pig intestinal cells is mediated by a mucosal adhesion. Infec. Immunity, 35, 1110-1118.

Jandl JH., Inman JK., Simmons RL. et Allen DW. (1959) Transfer of iron from serum iron-binding protein to human reticulocytes. J. Clin. Invest., 38, 161-185.

Jandl JH. et Katz JH. (1963) The plasma to cell cycle of transferrin. J. Clin. Invest., 42, 314-326.

Jeltsch JM. et Chambon P. (1982) The complete nucleotide sequence of the chicken ovotransferrin mRNA. Eur. J. Biochem., 122, 291-295.

Jing S. et Trowbridge IS. (1990) Non acylated human transferrin receptors are rapidly internalized and mediate iron uptake. J. Biol. Chem., 265, 11555-11559.

Johansson B. (1960) Isolation of an iron containing red protein from human milk. Acta Chem. Scand., 14, 510-512.

Jollès P., Levy-Toledano S., Fiat A., Soria C., Gillessen D., Thomaidis A., Dunn FW; et Caen JP. (1986) Analogy between fibrinogen and casein: effect of an undecapeptide isolated from kappa-casein on platelet function. Eur. J. Biochem., 158, 379-382.

Jollès P., Loucheux-Lefebvre MH. et Henschen A. (1978) Structural relatness of kappa-casein and fibrinogen gamma-chain. J. Mol. Evol., 11, 271-278.

Jung G., Kohnlein W. et Luders G. (1981) Biological activity of the antitumor protein neocarzinostatin coupled to a monoclonal antibody. Biochem. Biophys. Res. Commun. 101 599-606.

Kalmar JR. et Arnold RR. (1988) Killing of Actinobacillus actinomyces by human lactoferrin. Infec. Immunity, 56, 2552-2557.

Kampschmidt RF. et Pulliam LA. (1975) Stimulation of antimicrobial activity in the rat with leucocytic endogenous mediator. Res. J. Reticuloendoth. Soc., 257, 1177-1183.

Kay JE. et Benzie CR. (1986) The role of the transferrin receptor in lymphocyte activation. Immunol. Lett., 12, 55-58.

Kenneth MP. et Alderete JF. (1984) Iron uptake and increase intracellular enzyme activity follow host lactoferrin binding by Trichomonas vaginalis receptors. J. Exp. Med., 160, 398-410.

Keung WM. et Azari P. (1982) Structure and function of ovotransferrin. J. Biol. Chem., 257, 1184-1188.

Keydar I., Chen L., Karby S., Weiss FR., Delarea J., Radu M., Chaitak S. et Brenner HJ. (1979) Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. Eur. J. Cancer, 15, 659-670.

Kiljstra A. (1984) Lactoferrin stimulates the production of leucocyte migration inhibitory factor by human peripheral mononuclear leukocytes. Clin. Exp. Immunol., 55, 459-464.

King GL. et Johnston SM. (1985) Receptor mediated transport of insulin across endothelial cells. Science, 227, 1583-1595.

Klausner RD., Harford JB. et van Renswoude J. (1983) Binding of apotransferrin to K562: explanation of the transferrin cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 2263-2266.

Klausner RD., Harford JB. et van Renswoude J. (1984) Rapid internalization of transferrin receptor in K562 cells is triggered by ligand binding or treatment with phorbol ester. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3005-3009.

Klempner MS., Dinarello CA. et Gullin JI. (1978) Human leukocytic pyrogen induces release of specific granule contents from human neutrophils. J. Clin. Invest., 61, 1330-1336.

- Kohgo Y., Niitsu Y., Nishisato T., Urushizaki Y., Kondo H., Fukushima M., Tsushima N. et Urushizaki I. (1985) Transferrin receptors of tumor cells-potential tools for diagnosis and treatment of malignant tumors. In : "Proteins of Iron Storage and Transport" (Spik G., Montreuil J., Crichton RR. et Mazurier J., Eds), Elsevier, Amsterdam, 155-169.
- Kohgo Y., Nishisato T., Kado H., Tsushima N., Niitsu Y., Urushizaki Y., (1986) Circulating transferrin receptor in human serum. Brit. J. Haematol., 64, 277-285.
- Kohgo Y., Niitsu Y. et Nishisato T. (1988) Quantification and characterization of serum transferrin receptor in patient with anemias and polycythemias. Japon J. Med., 27, 64-75.
- Kulprathipanjan S., Hantowich DJ., Beh R. et Elmaleh D. (1979) Formation constants of gallium and indium transferrin. J. Nucl. Med. Biol., 6, 138-141.
- Kvaloy S., Langholm R., Michaelsen T., Funderud S., Abrahamsen AF. et Godal T. (1984) Transferrin receptor and lymphoblast antigen. Their relationship to DNA synthesis histology and survival in B-cell lymphomas. Int. J. Cancer, 33, 173-177.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
- Larrick JW. et Cresswell P. (1979a) Modulation of cell surface iron transferrin receptors by cellular density and state activation. J. Supramol. Structure, 11, 579-586.
- Larrick JW. et Cresswell P. (1979b) Transferrin receptors on human B and T lymphoblastoid cell line. Biochim. Biophys. Acta, 583, 483-490.
- Larrick JW. et Logue G. (1980) Transferrin receptors on leukaemic cells. Lancet, 2, 862-863.
- Larson SM. (1981) Factors determining tumor affinity for ⁶⁷Ga citrate. In : "Radiopharmaceuticals: structure activity relationship" (Spencer RP., Ed.) Grune Stratton, New York, 167-181.

Larson SM. et Schall GL. (1971) ^{67}Ga concentration in human breast milk. J. Amer. Med. Assn., 218, 257-265.

Larson SM., Allen DR., Rasey JS. et Grunbaum Z. (1978) Kinetics of binding of carrier free ^{67}Ga to human transferrin. J. Nucl. Med., 19, 1245-1249.

Larson SM., Rasey JS., Allen DR. et Nelson NJ. (1979) A transferrin mediated uptake of ^{67}Ga by EMT-6 sarcoma. Studies in tissue culture. J. Nucl. Med. 20 837-842.

Larson SM., Rasey JS., Allen DR., Nelson NJ., Grumbann Z., Hayes GD. et Williams DL. (1980) Common pathways for tumor cell uptake of ^{67}Ga and ^{59}Fe via a transferrin receptor. J. Natl. Canc. Inst., 64, 41-53.

Lasfargues EY. et Ozzello L. (1958) Cultivation of human breast carcinomas. J. Natl. Cancer Inst., 21, 1131-1147.

Laurell CB. et Inglemén F. (1947) Iron binding protein of swine serum. Acta Chem. Scand., 1, 770-776.

Lebman D., Trucco M., Bottero L., Lange B., Pessano S. et Rovera G. (1982) A monoclonal antibody that detects expression of transferrin receptor in human erythroid precursor cells. Blood, 59, 671-678.

Leclercq Y. (1987) Interaction transferrines-macrophages : rôle des glycanes dans la reconnaissance des transferrines par les récepteurs membranaires du macrophage péritonéal de Souris. Thèse d'Université, Lille.

Lee BC. et Schryvers AB. (1988) Specificity of the lactoferrin and transferrin receptors in *Neisseria gonorrhoeae*. Mol. Microbiol., 2, 827-829.

Leffell MS. et Spitznagel JK. (1975) Fate of human lactoferrin and myeloperoxidase in phagocytosing human neutrophils : effects of IgG subclass and immune complexes coated on latex beads. Infec. Immunity, 12, 813-820.

Léger D. (1987) Etude des relations structure-fonction de la sérotransferrine de Lapin : influence de la modification de la chaîne peptidique, des glycanes et des sites de fixation du fer sur l'incorporation du métal par les réticulocytes de Lapin. Thèse d'Etat, Lille.

Léger D., Campion B., Decottignies JP., Montreuil J. et Spik G. (1989) Physiological significance of the marked increased branching of the glycans of human transferrin during pregnancy. Biochem. J., 257, 231-238.

Legrand D., Aubert MJ., Loucheux-Lefebvre MH., Montreuil J. et Spik G. (1986) Evidence for interaction between the 30 kDa N-t and 50 kDa C-t tryptic fragment of human lactotransferrin. Biochem. J., 236, 839-844.

Legrand D., Mazurier J., Colavizza D., Montreuil J. et Spik G. (1990) Properties of the iron-binding site of the N-terminal lobe of the human and bovine lactotransferrins. Biochem. J., 266, 575-581.

Legrand D., Mazurier J., Ellass E., Rochard E., Maes P., Montreuil J. et Spik G. (1991b) Molecular interactions between the first fifty aminoacid residus of the human lactotransferrin and the PHA-activated human lymphocytes lactotransferrin receptor. Biochemistry (soumis à publication).

Legrand D., Mazurier J., Maes P., Rochard E., Montreuil J. et Spik G. (1991a) Inhibition of the specific binding of human lactotransferrin to human peripheral blood PHA stimulated lymphocytes by fluorescein labelling and location of the binding site. Biochem. J., 276, 733-738.

Legrand D., Mazurier J., Metz-Boutique MH., Jollès J., Jollès P., Montreuil J. et Spik G. (1984) Characterization and localization of an iron binding 18 kDa glycopeptide isolated from the N-terminal half of human lactotransferrin. Biochim. Biophys. Acta, 787, 90-96.

Legrand D., Mazurier J., Montreuil J. et Spik G. (1988) Structure and spatial conformation of the iron binding sites of transferrin. Biochimie, 70, 1185-1195.

Lehrman MA., Haltiwanger RS. et Hill RL. (1986) The binding of fucose containing glycoproteins by hepatic lectins. The binding specificity of the rat liver fucose lectin. J. Biol. Chem., 261, 7426-7432.

Lesley J. et Schulte R. (1985) Inhibition of cell growth by monoclonal anti-transferrin receptor antibodies. Mol. Cell Biol., 5, 1814-1821.

Leveugle B. (1991) Interaction de la lactotransferrine avec les cellules du sang humain : étude des récepteurs lymphocytaires et plaquettaires. Thèse d'Université, Lille.

Leung BS. (1983) Hormonal regulation of mammary tumors (Leung BS Ed.) Eden Press, Montréal.

Lima MF. et Kierszenbaum F (1985) Lactoferrin effect on phagocytic cell function. J. Immunol., 134, 4176-4183.

Lineback-Zins J. et Brew K. (1980) Preparation and characterization of an NH2 terminal fragment of human serum transferrin. J. Biol. Chem., 255, 708-713.

Line WF., Sly DA. et Bezkorovainy A. (1976) Limited cleavage of human lactoferrin with pepsin. Int. J. Biochem., 7, 203-208.

Lippman ME. (1976) Hormone responsive human breast cancer in continuous culture. In : "Breast Cancer : trends in research and treatment" (Heuson JC., Ed.) Raven Press, New York, 111-140.

Lippman ME., Osborne CK., Knazek R. et Young N. (1977) Model systems for the study of hormono-dependent human breast cancer. N. Engl. J. Med., 296, 154-159.

Louache F., Testa U., Pelicci P., Thomopoulos P., Monoque T. et Rochant H. (1984) Regulation of transferrin receptors in human hematopoietic cell lines. J. Biol. Chem., 259, 11576-11585.

Loughlin KR., Gittes RF., Partridge D. et Stelos P. (1987) The relationship of lactoferrin to the anemia of renal cell carcinoma. Cancer, 59, 566-571.

Louvard D. (1988) Mécanismes moléculaires du trafic intracellulaire: sécrétion et endocytose par l'intermédiaire d'un récepteur. Médecine Sciences, Décembre, 6-20.

Löw H., Grebing C., Lindgren A., Tally M., Sün IL. et Crane FL. (1987) Involvement of transferrin in the reduction of iron by the transplasma membrane electron transport system. J. Bioenerg. Biomem., 19, 535-549

Löw H., Sün IL., Navas P., Grebing C., Crane FL. et Morre DJ. (1986) Transplasma electron transport from cells is part of a diferric transferrin reductase system. Biochem. Biophys. Res. Commun., 139, 1111-1123.

Lowry D., Rosebrough NJ., Fahr AL. et Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biochem., 193, 265-275.

Loyd JM., O'Dowd T., Driver M. et Tee D. (1984) Demonstration of an epitope of the transferrin receptor in human cervical epithelium. A potentially useful cell marker. J. Clin. Pathol., 37, 131-135.

Luk CK. (1971) Study of the nature of the metal binding sites and estimate of the distance between the metal binding sites in transferrin using trivalent lanthanide ions. Biochemistry, 16, 2838-2843.

Maacks S., Yuan HZ. et Wood WG. (1989) Development and evaluation of luminescence based sandwich assay for plasma lactoferrin as a marker for sepsis and bacterial infections in paediatric medicine. J. Biolumin. Chemilumin., 3, 2211-226.

Mac Clelland A., Kuhn LC. et Ruddle FH. (1984) The human transferrin receptor gene: genomic organization and the complete primary structure of the receptor deduced from the cDNA sequence. Cell, 39, 267-274.

Mac Gillivray RTA. et Brew K. (1975) Transferrin: internal homology in the amino acid sequences. Science, 190, 1306-1307.

Mac Gillivray RTA., Mendez E. et Brew K. (1977) Structure and evolution of serum transferrin. In : "Proteins of Iron Metabolism" (Brown EB., Aisen P., Fielding J. et Crichton RR., Eds) Grune and Stratton, New York, 133-144.

Mac Gillivray RTA., Mendez E., Sinha CK., Sutton MR., Lineback-Zins J. et Brew K. (1982) The complete amino sequence of human serum transferrin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 2504-2508.

Mac Gillivray RTA., Mendez E., Shewale JG., Sinha CK., Lineback-Zins J. et Brew K. (1983) The primary structure of human serotransferrin: the structure of seven cyanogen bromide fragments and the assembly of the complete structure. J. Biol. Chem., 258, 3543-3553.

Markowitz B., van Snick J. et Masson PL. (1979) Binding and ingestion of human lactoferrin by mouse alveolar macrophages. Thorax, 34, 209-212.

Marx JJM., Ligdeur MC., Geertsema J. et Schurman HJ. (1984) Transferrin receptors in iron absorption. Abstracts of Iron Club Meeting, 10-13 Juillet, Rennes, France.

März L., Hatton MWC., Berry LR. et Regoeczi E. (1982) The structural heterogeneity of the carbohydrate moiety of desialylated human transferrin. Can. J. Biochem., 60, 624-630.

Mason AB. et Brown S. (1987) Differential effect of iodination of ovotransferrin and its two half-molecule domains on binding to transferrin receptors on chick embryo red blood cells. Biochem. J., 247, 417-425.

Mason DY. et Taylor CR. (1978) Distribution of transferrin ferritin and lactotransferrin in human tissues. J. Clin. Pathol., 31, 316-327.

Masson PL. (1970) La lactoferrine, protéine des sécrétions externes et des leucocytes neutrophiles (S.A. Arsca Ed.) Bruxelles.

Masson PL. et Heremans JF. (1966a) Immunohistochemical localization and bacteriostatic properties of an iron binding protein from bronchial mucus. Thorax, 21, 538-544.

Masson PL. et Heremans JF. (1966b) Studies of lactoferrin: the iron-binding protein of secretions. Prot. Biol. Fluids, 14, 115-124.

Masson PL., Heremans JF. et Dive CH. (1966) An iron binding protein common to many external secretions. Clin. Chim. Acta, 14, 735-739.

- Masson PL., Heremans JP. et Schonne E. (1969) Lactoferrin an iron binding protein in neutrophilic leukocytes. J. Exp. Med., 130, 643-658.
- Matsumoto A., Yoshima H., Takasaki S. et Kobata A. (1982) Structural study of the sugar chains of human lactoferrin: finding of four novel complex type asparagine-linked sugar chains. J. Biochem., 91, 143-155.
- Mattia E., Rao K., Shapiro DS., Sussman HH. et Klausner RD. (1984) Biosynthetic regulation of the human transferrin receptor by desferrioxamine in K562 cells. J. Biol. Chem., 259, 2689-2692.
- May WS., Sahyoun N., Jacobs WM. et Cuatrecasas P. (1985) Mechanism of phorbol diester-induced regulation of surface transferrin receptor involves the action of activated protein kinase C and an intact cytoskeleton. J. Biol. Chem., 260, 9419-9425.
- Mazoyer E., Levy-Toledano S., Rendu F., Hermant L., Lu H., Fiat AM., Jollès P. et Caen J. (1990) KRDS a new peptide derived from human lactotransferrin inhibits platelet aggregation and release reaction. Eur. J. Biochem., 194, 43-49.
- Mazurier J., Dauchez M., Vergoten G., Montreuil J. et Spik G. (1991a) Modélisation moléculaire des glycanes: structure tridimensionnelle et interaction avec la fraction protéique. L'exemple de la sérotransferrine de Lapin. C.R. Acad. Sci. Paris, 313, 7-14.
- Mazurier J., Dauchez M., Vergoten G., Montreuil J. et Spik G. (1991b) Molecular modeling of a disialylated monofucosylated biantennary glycan of the N- acetyllactosaminic type. Glycoconjugate J., 8, 390-399.
- Mazurier J., Léger D., Tordera V., Montreuil J. et Spik G. (1981) Comparative studies of the iron binding properties of transferrins. Eur. J. Biochem., 119, 537-543.
- Mazurier J., Legrand D., Hu WL., Montreuil J. et Spik G. (1989) Expression of human lactotransferrin receptors in phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes. Eur. J. Biochem. 179, 481-487.

Mazurier J., Lhoste JM., Montreuil J. et Spik G. (1983) Comparative study of the iron binding properties of human transferrins. Biochim. Biophys. Acta, 745, 44-49.

Mazurier J., Montreuil J. et Spik G. (1985) Visualization of lactotransferrin brush-border receptors by ligand-blotting. Biochim. Biophys. Acta, 821, 453-460.

Mazurier J. et Spik G. (1980) Comparative study of the iron-binding properties of human transferrins. Complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactotransferrin. Biochim. Biophys. Acta, 629, 399-408.

Mead PE. et Tweedie JW. (1990) cDNA and protein sequence of bovine lactoferrin. Nucl. Acid. Res., 18, 7167-7167.

Mellman I. (1984) Membrane recycling during endocytosis. In : "Lysosomes in Biology and Pathology" (Dingle JT., Dean RT. et Sly W., Ed.) Elsevier, Amsterdam, 201-229.

Mendelsohn J., Trowbridge I. et Castagnola J. (1983) Inhibition of human lymphocyte proliferation by monoclonal antibody to transferrin receptor Blood, 62, 821-826.

Metz-Boutigue MH., Jollès J., Mazurier J., Schoentgen F., Legrand D., Spik G., Montreuil J. et Jolles P. (1984) Human lactotransferrin : amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. Eur. J. Biochem., 145, 659-676.

Metz-Boutigue MH., Mazurier J., Jollès J., Spik G., Montreuil J. et Jolles P. (1981) The present state of the human lactotransferrin sequence study and alignment of the cyanogen bromide fragments and characterization of N-t and C-t domains. Biochim. Biophys. Acta, 670, 243-254.

Mitjavila S. (1990) Importance du fer dans la prolifération tumorale. Bull. Cancer, 77, 503-504.

Mizyazawa K., Mantel C., Lu L., Morrison DC. et Broxmeyer HE. (1991) Lactoferrin-lipopolysaccharide interactions. J. Immunol., 146, 723-729.

- Moerlein SM. et Welch M.** (1981) The chemistry of Ga and Ind as related to radiopharmaceutical production. Int. J. Nucl. Med. Biol., 8, 277-287.
- Moguilevski N., Courtoy PJ. et Masson PL.** (1985) Study of lactoferrin binding sites at the surface of blood monocytes; In : "Proteins of Iron Storage and Transport" (Spik G., Montreuil, J. Crichton RR. et Mazurier J., Ed.) Elsevier, Amsterdam, 199-202.
- Moguilevski N.** (1987) La lactotransferrine : interaction avec le système réticuloendothélial en relation avec le métabolisme du fer. Thèse de Doctorat, Biochimie, Lille.
- Montreuil J.** (1980) Primary structure of glycoprotein glycans. Basis for the molecular biology of glycoproteins. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 37, 157-233.
- Montreuil J.** (1982) Glycoproteins. In : "Comprehensive Biochemistry" (Neuberger LLM et van Deener, Eds) Elsevier, Amsterdam, 19B/II, 1-188.
- Montreuil J.** (1983) Conformation of the glycoprotein glycans of the N-acetyllactosaminique type. Biochem. Soc. Trans., 11, 134-136.
- Montreuil J.** (1986) Glycoprotein : Structure and Biosynthesis. In : "Molecular and cellular basis of digestion "(Desnuelle P., Sjöstrom H. et Noren O, Eds) Elsevier, Amsterdam, 3-23.
- 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, 859-877.
- Montreuil J., Fournet B., Spik G. et Strecker G.** (1978) Etude théorique de la conformation spatiale des glycanes de la sérotransferrine humaine C.R. Acad. Sci. Paris, 287D, 837-840.
- Montreuil J., Mazurier J., Legrand D. et Spik G.** (1985) Human lactotransferrin: structure and function. In : "Proteins of Iron Storage and Transport" (Spik G., Montreuil J., Crichton RR. et Mazurier J., Ed.) Elsevier, Amsterdam, 25-38.

Montreuil J. et Mullet S. (1960) Isolement d'une lactosidérophiline du lait de Femme. C.R. Acad. Sci. Paris, 250, 1736-1737.

Montreuil J., Tonnelat J. et Mullet S. (1960) Préparation et propriétés de la lactosidérophiline (lactotransferrine) du lait de Femme. Biochim. Biophys. Acta, 45, 413-421.

Morgan EH. et Appleton TC. (1969) Autoradiographic localization of ¹²⁵I labeled transferrin in rabbit reticulocytes. Nature, 223, 1371-1372.

Morley CG., Delmastro D., Prabhu N. et Bezkorovainy A. (1983) Iron metabolism pathways in the rat hepatocytes. Clin. Physiol. Biochem., 1, 3-11.

Morley CG. et Bezkorovainy A. (1985) Cellular iron uptake from transferrin is endocytosis the only mechanism. Int. J. Biochem., 17, 553-564.

Mostov KE. et Blobel G. (1983) Intracellular transport of polymeric immunoglobulin by secretory components: a model for studying intracellular protein sorting. Ann. N. Y. Acad. Sci., 46, 613-618.

Naidu AS., Miedzobrodzki J., Andersson M., Nilsson LE., Forsgren A. et Watts JL. (1990) Bovine lactoferrin binding to six species of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. J. Clin. Microbiol., 28, 21313-21319.

Navas P., Sün IL., Morre DJ. et Crane FL. (1986) Decrease of NADH in HeLA cells in the presence of transferrin or ferricyanide. Biochem. Biophys. Res. Commun., 135, 110-115.

Neckers LM. (1991) Regulation of transferrin receptor expression and control of cell growth. Pathobiology, 59, 11-18.

Neckers LM. et Cossman J. (1983) Transferrin receptor induction in mitogen stimulated T lymphocytes is required for DNA synthesis and cell division and is regulated by IL2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3494-3498.

Newman R., Schneider C., Sutherland R., Vodinelech L. et Greaves M. (1982) The transferrin receptor. Trends Biochem. Sci., 7, 397-400.

Newman RA., Warner JF. et Dennert G. (1984) NK recognition of target structures: Is the transferrin receptor the NK target structure? J. Immunol., 133, 1841-1845.

Nichols BL., Mac Kee KS., Henry JF. et Putman M. (1987) Human lactoferrin stimulates thymidine incorporation into DNA of rat crypt cells. Pediatr. Res., 21, 563-567.

Nichols BL., Mac Kee KS. et Huebers HA. (1990) Iron is not required in the lactoferrin stimulation of thymidine incorporation into the DNA of rat crypt enterocytes. Pediatr. Res., 27, 525-528.

Niitsu Y., Khogo Y., Nishisato T., Urushizaki Y., Kondo H. et Urishizaki I. (1984) Transferrin receptors and tumor cell growth. In : "Protides of the Biological Fluids" (Peeters H., Ed) Pergamon, Press New York, 583-586.

Nishiya K. et Horwitz DA. (1982) Contrasting effects of lactoferrin on human lymphocyte and monocyte natural killer activity and antibody dependent cell mediated cytotoxicity. J. Immunol., 129, 2519-2523.

Norris GE., Baker HM. et Baker EN. (1989) Preliminary cristallographic studies on human apolactoferrin in its native and defucosylated forms. J. Mol. Biol., 209, 329-351.

Nunez MT., Cole EJ. et Glass J. (1985) The reticulocyte plasma membrane pathway of iron uptakes determined by the mechanism of α -bipyridyl inhibition. J. Biol. Chem., 258, 1146-1154.

Octave JY., Schneider RR., Crichton RR. et Trouet A. (1981) Transferrin uptake by cultured rat embryo fibroblasts. Eur. J. Biochem., 115, 611-618.

Octave JN., Schneider YJ., Trouet A. et Crichton RR. (1983) Iron uptake and utilization by mammalian cells. Trends Biochem. Sci., 7, 217-220.

- O'keefe DO. et Draper RK. (1985) Characterization of a transferrin diphtheria toxin conjugate. J. Biol. Chem., 260, 932-937.
- Omary MB. et Trowbridge IS. (1981) Covalent binding of fatty acid to the transferrin receptor in cultured cells. J. Biol. Chem., 256, 4715-4718.
- Omary MB., Trowbridge IS. et Minowada J. (1980) Human cell surface glycoprotein with unusual properties. Nature, 286, 888-891.
- Oratore A., D'Andrea G., Moreton K. et Williams J. (1989) Binding of various ovotransferrin fragments to chick-embryo red cells. Biochem. J., 301-304.
- Oria R., Alvarez-Hernandez X., Liceaga J. et Brock JH. (1988) Uptake and handling of iron from transferrin lactoferrin and immune complexes by a macrophage cell line. Biochem. J., 252, 221-225.
- Ormerod MG. (1990) Further application to cell biology. In : "Flow cytometry" (Ormerod MG., Ed.) IRL Press, Oxford, 65-273.
- Osborne CK. et Lippman ME. (1978) Human breast cancer in tissue culture. The effects of hormones. In : "Breast Cancer Advances in Research and Treatment" (Mac Guire WL, Ed) Plenum Press, New York, 103-154.
- Oseas R., Yang HH., Baehner RL. et Boxer LA. (1981) Lactoferrin: a promoter of polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. Blood, 57, 939-945.
- Panaccio M., Zalcborg JR., Thompson CH., Leyden MJ. et Mc Kenzie P. (1987) Heterogeneity of the human transferrin receptor and use of antitransferrin receptors antibodies to detect tumors in vivo. Immunol. Cell. Biol., 65, 461-471.
- Pan BT., Blostein R. et Johnston RM. (1983) Loss of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro. Biochem. J., 210, 37-47.
- Panella TJ., Liu Y., Huang AT. et Teng CT. (1991) Polymorphism and altered methylation of the lactoferrin gene in normal leukocytes leukemic cells and breast cancer. Cancer Res., 51, 3037-3043.

Papa V., Pezzino V., Costantino A., Belfiore A., Giuffrida D., Frittita L., Vannelli GB., Brand R., Goldfine ID. et Vigneri R. (1990) Elevated insulin receptor content in human breast cancer. Amer. Soc. Clin. Invest., 86, 1503-1510.

Pastan IH. et Willingham MC. (1981) Journey to the center of the cell: role of the receptosome. Science, 214, 504-509.

Pastan IH. et Willingham MC. (1983) Receptor-mediated endocytosis: coated pits receptosomes and the Golgi. Trends Biochem. Sci., 250-255.

Pastan IH. et Willingham MC. (1985) The pathway of endocytosis. In : "Endocytosis " (Pastan IH. et Willingham MC., Eds) Plenum Press, London, 131-152.

Paterson AHG., Yoxall A. et Smith I. (1976) The concentration of ⁶⁷Ga and ⁴⁵Ca in lactating mammary gland and its relevance to the tumor uptake of ⁶⁷Ga citrate. Cancer Res., 36, 452-457.

Pelicci PG., Tabillio A., Thomopoulos P., Titieux M., Vainchenker W., Rochant H. et Testa U. (1982) Hemin regulates the expression of the transferrin receptors in human haematopoietic cell lines. FEBS Lett., 145, 350-354.

Pentecost BT. et Teng CT. (1987) Lactotransferrin is the major estrogen inducible protein of mouse uterine secretions. J. Biol. Chem., 262, 1-6.

Peterson GL. (1977). A simplification of the protein assay method of lowry which is more generally applicable. Anal. Biochem., 83, 346-355.

Perraudin JP. et Prieels JP. (1982) Lactoferrin binding to lysozyme treated *Micrococcus luteus*. Biochim. Biophys. Acta, 718, 42-48.

Phillips JL. et Azari P. (1975) Effect on iron transferrin on nucleic acid synthesis un phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. Cell. Immunol., 15, 94-99.

Phillips JL., Boldt DH. et Harper J. (1987) Iron transferrin-induced increase in protein kinase C activity in CCRF-CEM cells. J. Cell Physiol., 132, 349-353.

Pierce A., Colavizza D., Benaissa M., Maes P., Tatar A., Montreuil J. et Spik G. (1991) Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. Eur. J. Biochem., 196, 177-184.

Pirker R., Fitzgerald DJP., Hamilton TC., Ozols RF., Willingham MC. et Pastan IH. (1985) Anti-transferrin receptor antibody linked to pseudomonas exotoxin as a model immunotoxin in human ovarian carcinoma cell lines. Cancer Res., 45, 751-757.

Pizzo SV., Lehrman MA., Imber MJ. et Guthrow CE. (1981) The clearance of glycoprotein in diabetic mice. Biochem. Biophys. Res. Commun., 101, 704-708.

Plow EF., McEver RP., Collier BS., Woods VL., Marguerie GA. et Ginsberg MH. (1985) Related binding mechanisms for fibrinogen fibronectin and thrombin-stimulated human platelets. Blood, 66, 724-727.

Plowman GD., Brown JP., Enns J., Schroder B. et Hellstrom I. (1983) Assignment of the gene for human melanoma associated antigen p97 to chromosome 3. Nature, 303, 70-72.

Powell MJ. et Ogden JE. (1990) Nucleotide sequence of human lactoferrin cDNA. Nucl. Acid. Res., 18, 4013-4014.

Prieels JP., Pizzo SV., Glasgow LR., Paulson JC., Hill RL. (1978) Hepatic receptor that specifically binds oligosaccharides containing fucosyl N-acetylglucosamine linkages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2215-2219.

Princiotta JV. et Zapolski EJ. (1975) Difference between the two iron binding sites of transferrin. Nature, 255, 87-88.

Rado TA., Wei X. et Benz E. (1987) Isolation of lactoferrin cDNA from a human myeloid library and expression of mRNA during normal and leukemic myelopoiesis. Blood, 70, 989-993.

Raha S., Dosquet C., Abgrall JF., Jollès P., Fiat AM. et Caen JP. (1988) KRDS a tetrapeptide derived from lactotransferrin inhibits binding of monoclonal antibody against glycoprotein IIb-IIIa on ADP-stimulated platelets and megakaryocytes. Blood, 72, 172-178.

Rammensee HG., Lesley J., Trowbridge IS. et Bevan MJ. (1985) Antibodies against the transferrin receptor block the induction of cytotoxic T lymphocytes. A new method for antigen-specific negative selection In vitro. Eur. J. Immunol., 15, 687-692.

Rao KK., Shapiro D., Mattia E., Bridges K. et Klausner R. (1985) Effects of alterations of cellular iron on biosynthesis of the transferrin receptor in K562 cells. Mol. Cell. Biol., 5, 595-600.

Raso V. et Basala M. (1984) A highly cytotoxic human transferrin-Ricin A chain conjugate used to select receptor modified cells. J. Biol. Chem., 259, 1143-1149.

Raso V. et Lawrence J. (1984) Carboxylic ionophores enhance the cytotoxic potency of ligand and antibody delivered Ricin a chain. J. Exp. Med., 160, 1234-1240.

Reckhow CL. et Enns CA. (1988) Characterization of the transferrin receptor in tunicamycin-treated A431 cells. J. Biol. Chem., 263, 7297-7301.

Reddel RR., Hedley DW. et Sutherland RL. (1985) Cell cycle effects of iron depletion on T47D human breast cancer cells. Exp. Cell Res., 161, 277-284.

Redhead K. et Hill T. (1991) Acquisition of iron from transferrin by *Bordetella pertussis*. FEMS-Lett., 77, 303-308.

Reiter B., Vrock JH. et Steel ED. (1975) Inhibition of *E. coli* by bovine colostrum and postnatal milk. Immunology, 28, 83-95.

Rey MW., Woloshuk SL., De Boer HA. et Piper FR. (1990) Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin. Nucl. Acid. Res., 18, 5288-5288.

Robinson MS. (1987) Coated vesicles and protein sorting. J. Cell Science, 87, 203-209.

Rochard E., Legrand D., Mazurier J., Montreuil J. et Spik G. (1989) The N-terminal domain of human lactotransferrin binds specifically to phytohemagglutinin-stimulated peripheral blood human lymphocyte receptors. FEBS Lett., 255, 201-204.

Roiron-Lagroux D., Amouric M., Marvaldi J. et Figarella C. (1989) Lactoferrin-binding sites at the surface of HT29-D4 cells. Eur. J. Biochem., 186, 367-373.

Roiron-Lagroux D. et Figarella C. (1990) Evidence for a different mechanism of lactoferrin and transferrin translocation on HT 29-D4 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 170, 837-842.

Rose IM., Plowman GP., Teplow DB., Dreyer WJ., Hellstrom KE. et Brown JP. (1986) Primary structure of the human melanoma associated antigen p97 deduced from the mRNA sequence. Proc. Natl. Sci. Acad. USA, 83, 1261-1265.

Rothenberger S., Iacopetta J. et Khun LC. (1987) Endocytosis of the transferrin receptor requires the cytoplasmic domain but not its phosphorylation site. Cell, 49, 423-431.

Rouault TA., Hentz MW., Caughman SW., Harford JB. et Klausner RD. (1988) Binding of a cytosolic protein to the iron responsive element of human ferritin messenger RNA. Science, 241, 1207-1210.

Rouault TA., Stout CD., Kaptain S., Harford JB. et Klausner RD. (1991) Structural relationship between an iron-regulated RNA-binding protein (IRE-BP) and aconitase : functional implications. Cell, 64, 881-883.

Rymer JC. (1981) Tissue and serum isoferritins in human pathology. Pathol. Biol., 29, 301-304.

Rumke P., Visser D., Kwa HG. et Hart AM. (1971) Radioimmunoassay for lactoferrin in blood plasma of breast cancer patients lactating and normal women: prevention of false high levels caused by leakage from neutrophil leucocytes in vitro. Folia Med. Neerl., 14, 156-168.

- Saha GB. et Boyd CM.** (1983) Tissue distribution of ^{67}Ga citrate and ^{111}In in mouse with adenocarcinoma. Int. J. Nucl. Med. Biol., 10, 223-225.
- Salle V., Raux H., Souttou B., Israel L. et Crepin M.** (1991) Primary cultures of human benign mastopathies and mammary carcinomas. Growth factor requirements. Anticancer Res., 2, 895-900.
- Salle V., Raux H., Israel L. et Crepin M.** (1991) Facteurs de croissance de mastopathies bénignes humaines en culture primaire. Bull. Cancer, 78, 479-483.
- Santoliquido PM., Southwick HW. et Olwin JH.** (1976) Trace metal levels in cancer of the breast. Surg. Genecol. Obstet, 142, 65-70.
- Sato K., Shinmoto H., Tanimoto M., Dosako S. et Nakajima I.** (1990) Uptake and resecretion of human lactoferrin by B-lymphocytes. Agri. Biol. Chem. 54 1275-1279.
- Sauvage CA., Mendelsohn JC., Lesley JF. et Trowbridge IS.** (1987) Effects of monoclonal antibodies that block transferrin receptor function on the in vivo growth of a murine leukemia. Cancer Res., 47, 747-753.
- Scatchard G.** (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci., 51, 660-672.
- Schade AL. et Caroline L.** (1944) Raw hen egg white and the role of iron in growth inhibition of Shigelle dysenteria, Staphylococcus aureus, E. coli and Saccharomyces cerevisiae. Science, 100, 14-15.
- Schade AL. et Caroline L.** (1946) An iron binding component of human blood plasma. Science, 104, 340-341.
- Schägger H. et von Jagow G.** (1987). Tricine-Sodium Dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem., 166, 368-379.
- Scheffel U., Wagner HN., Klein JL. et Tsan MF.** (1985) ^{67}Ga uptake by hepatoma : studies in cell cultures perfused livers and intact rats. J. Nucl. Med., 26, 1438-1444.

Schneider C., Kurkinen M. et Greaves M. (1983) Isolation of cDNA clones for the human transferrin receptor. EMBO J., 2, 2259-2263.

Schneider C., Owen MJ., Banville D. et Williams JG. (1984) Primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence. Nature, 311, 675-680.

Schneider C., Sutherland R., Newman R. et Greaves M. (1982) Structural features of the cell surface receptor for transferrin is recognised by the monoclonal antibody OKT9. J. Biol. Chem., 257, 8516-8522.

Schryvers AB. (1989) Identification of the transferrin and lactoferrin-binding proteins in *Haemophilus influenzae*. J. Med. Microbiol., 29, 121-130.

Schryvers AB. et Lee CB. (1989) Comparative analysis of the transferrin and lactoferrin binding proteins in the family Neisseriaceae. Can. J. Microbiol., 35, 409-415.

Schryvers AB. et Morris LJ. (1988) Identification and characterization of the human lactoferrin-binding protein from *Neisseria meningitidis*. Infec. Immunity, 56, 1144-1149.

Schulman HM., Ponka P., Wilczynska A., Gauthier Y. et Shyamala G. (1989) Transferrin receptor and ferritin levels during murine mammary gland development. Biochim. Biophys. Acta, 1010, 1-6.

Schulman HM., Wilczynska A. et Ponka P. (1981) Transferrin and iron uptake by human lymphoblastoid and K562 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 100, 1523-1530.

Sciot R., van Eyken P. et Desmet VJ. (1990) Transferrin receptor expression in benign tumors and in hepatoblasma of the liver. Histopathology, 16, 59-62.

Segami N., Fukuda M. et Manabe T. (1989) Immunohistological study of the epithelial components of Warthin's tumor. Int. J. Oral Maxillofac. Surg., 18, 133-137.

Seligman PA. (1983) Structure and function of the transferrin receptor. Prog. Haematol., 13, 137-147.

Seligman PA., Schleicher RB. et Allen RH. (1979) Isolation and characterization of transferrin receptor from placenta. J. Biol. Chem., 254, 9943-9947.

Seratini AN., Dunning W., Charyuli K. et Weinstein MB. (1971) Concentration of 111 Indium-chloride in the irradiated rat lymphosarcoma. J. Nucl. Med., 12, 464-470.

Seymour GJ., Walsh MD., Lavin MF., Strutton G. et Gardiner RA. (1987) Transferrin receptor expression by human bladder transitional cell carcinomas. Urol. Res., 15, 341-344.

Shepherd VL. (1989) Intracellular pathways and mechanisms of sorting in receptor mediated endocytosis. Trends Biochem. Sci., 10, 458-461.

Shepton RG. et Harris AW. (1981) Studies on the uptake of ^{67}Ga and ^{59}Fe and the binding of transferrin by cultured mouse tumor cells. Int. J. Nucl. Med. Biol., 8, 333-339.

Shih YJ., Baynes RD., Hudson BG. et Flowers CH. (1990) Serum transferrin receptor is a truncated form of tissue receptor. J. Biol. Chem., 265, 19077-19081.

Shindelman JE., Ortmeyer AE. et Sussman HH. (1981) Demonstration of the transferrin receptor in human breast cancer tissue. Potential marker for identifying dividing cells. Int. J. Cancer, 27, 329-334.

Shiu RPC. (1979) Prolactin receptors in hormones breast cancer cells in long term tissue culture. Cancer Res., 39, 4381-4386.

Shiu RPC. (1981) Prolactin and breast cancer. In IXth report 8. Hormones and Breast Cancer (Pike F., Ed) Welsch Sitteri, 185-196.

Sieffs C., Bicknell D., Canei G., Robinson J., Lam G. et Greaves MF. (1982) Changes in cell surface Ag expression during erythropoietic differentiation. Blood, 60, 703-713.

Siimes MA., Vuori E. et Kuitinen P. (1979) Breast milk iron. A declining concentration during the course of lactation. Acta Paediatr. Scand., 68, 29-31.

Simpson DL., Cawley DB. et Herschman HR. (1982) Killing of cultured hepatocytes by conjugates of sialofetuin and EGF linked to the A chains of ricin or diphtheria toxin. Biochem. Biophys. Res. Commun., 124, 551-557.

Slater K. et Fletcher J. (1987) Lactoferrin inhibits interleukin-2 production in mixed lymphocyte culture. In : "The inhibitors of haematopoiesis" (Najman A. et Guigon M., Eds) Colloque Inserm John Libby Eurotext, 162, 67-68.

Soda R., Hardy CL., Kataoka M. et Tavassoli M. (1989) Endothelial mediation is necessary for subsequent hepatocyte uptake of transferrin Amer. J. Med. Sci., 297, 314-320.

Soda R. et Tavassoli M. (1984) Liver endothelium and not hepatocytes or Küpffer cells have transferrin receptors. Blood, 63, 270-276.

Shoji A. et Ozawa E. (1985) Requirement of Fe for activation of RNA polymerase. Proc. Japan Acad., 61, 494-499.

Sollier CBD., Drouet L., Fiat AM., Jollès P. et Caen JP. (1990) L'effet anti-thrombotique des peptides de la lactotransferrine. C.R. Soc. Biol., 184, 201-210.

Sorokin LM., Morgan EH. et Yeoh GCT. (1988) Differences in transferrin receptor function between normal developing and transformed myogenic cells as revealed by differential effects of phorbol ester on receptor distribution and rates of iron uptake. J. Biol. Chem., 263, 14128-14133.

Soule HD., Vazquez J., Long A., Albert S. et Brennan M. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. J. Natl. Cancer Inst., 51, 1409-1413.

Spik G. (1968) Etude comparative des propriétés physico-chimiques et de la structure de la transferrine et de la lactotransferrine humaines. Procédés de dosages chromatographiques et électrophorétiques des oses constituant les glycoprotéides. Thèse de Docteur Es-Sciences Physiques, Lille.

Spik G. (1971) Formes communes et assimilation du lactofer. Etude particulière des lactotransferrines. Ann. Nutrit. Aliment., 25, A81-A134.

Spik G. (1988) Rôle de la lactotransferrine dans la nutrition martiale du nourrisson. Cah. Nutr. Diet., XXIII, 2, 121-125.

Spik G., Bayard B., Fournet B., Strecker G., Bouquelet S. et Montreuil J. (1975) Studies on glycoconjugates. Complete structure of two carbohydrate units of human serotransferrin. FEBS. Lett., 50, 296-299.

Spik G., Brunet B., Mazurier C., Fontaine G. et Montreuil J. (1982b) Characterization and properties of the human and bovine lactotransferrins extracted from the faeces of newborn infants. Acta Paediatr. Scand., 71, 979-985.

Spik G., Chéron A., Montreuil J. et Dolby J. (1978) Bacteriostasis of a milk-sensitive strain of E. coli by immunoglobulins and iron binding proteins in association. Immunology, 33, 663-671.

Spik G., Coddeville B., Legrand D., Mazurier J., Léger D., Goavec M. et Montreuil J. (1985a) A comparative study of the primary structure of glycans from various sero- lacto- and ovotransferrin glycans. In : "Proteins of Iron Storage and Transport" (Spik G., Montreuil J., Crichton RR., Mazurier J., Eds) Elsevier, Amsterdam, 45-46.

Spik G., Coddeville B. et Montreuil J. (1988) Comparative study of the primary structures of sero- lacto- and ovotransferrin glycans from different species. Biochimie, 70, 1459-1469.

Spik G., Debruyne V., Montreuil J., Van Halbeek H. et Vliegthart JFG. (1985b) Primary structure of two sialylated triantennary glycans from human serotransferrin. FEBS Lett., 183, 65-69.

Spik G., Fournet B., Bayard B., Vandersyppe R., Strecker G., Bouquelet S., Charet P. et Montreuil J. (1974) Etudes sur les groupements glycaniques de la séro- et de la lactotransferrine humaine. Arch. Int. Physiol. Biochim., 82, 791-798.

Spik G. et Montreuil J. (1983) Rôle de la lactotransferrine dans les mécanismes moléculaires de la défense antibactérienne. Bull. Europ. Physiopath. Resp., 19, 123-130.

Spik G. et Montreuil J. (1986) Structure et rôle biologique de la lactotransferrine humaine. Immunomodulateurs et thérapeutiques anti-infectieuses. (Arnette Ed.) Paris, 87-91.

Spik G., Strecker G., Fournet B., Bouquelet S., Montreuil J., Dorland L., van Halbeek H. et Vliegenthart JFG. (1982a) Primary structure of the glycans from human lactotransferrin. Eur. J. Biochem, 121, 413-419.

Stein BS. et Sussman HH. (1983) Peptide mapping of transferrin receptor in normal and transformed cells. J. Biol. Chem., 258, 2668-2679.

Stevens RG., Jones DS., Micozzi MS. et Taylor PR. (1988) Body iron stores and the risk of cancer. N. Engl. J. Med., 1047-1052.

Stratford S., May W. et Cuatrecasas P. (1985) Transferrin receptor: its biological significance. J. Membrane Biol., 88, 205-215.

Sün IL., Crane FL., Grebing C. et Löw H. (1985) Transmembrane redox in control of cell growth. Exp. Cell Res., 156, 528-536.

Sün IL., Crane FL., Morré J., Löw H. et Faulk P. (1991) Lactoferrin activates plasma membrane oxidase and Na⁺/H⁺ antiport activity. Biochem. Biophys. Res. Commun., 176, 498-504.

Sün IL., Garcia-canero R. et Liu W. (1987a) Diferric transferrin reduction stimulates the Na⁺/H⁺ antiport HeLa. Biochem. Biophys. Res. Commun., 145, 467-473.

Sün IL., Navas P., Crane F., Morre J. et Löw H. (1987b) NADH diferric transferrin reductase in liver plasma membrane. J. Biol. Chem., 262, 15915-15921.

Sunderland MC. et Mac Guire WL. (1991) Hormones and breast cancer. Trends Endocrinol. Metab., 2, 72-76.

Sussman HH. (1989) Iron and tumor cell growth. In : "Iron in Immunity Cancer and Inflammation" (De souza M., Brock JH., Ed.) Wiley J. and Sons, Chichester, England, 261-281.

Sussman HH., Stein BS. et Isavoler L. (1985) In : "Protides of Iron Transport and Storage" (Spik G., Mazurier J., Crichton RR. et Montreuil J., Ed.) Elsevier, Amsterdam, 147-155.

Sutherland R., Delia D., Schneider C., Newman R., Kemshead J. et Greaves M. (1981) Ubiquitous cell surface glycoprotein on tumor cells is proliferation associated receptor for transferrin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4515-4519.

Sutton BJ. et Phillips DC. (1983) The three dimensional structure of the carbohydrate within the Fc fragment of IgG. Biochem. Soc. Trans., 11, 130-132.

Taetle R. (1990) The role of transferrin receptors in hemopoietic cell growth. Exp. Hematol., 18, 360-365.

Taetle R. Honeysett JM. et Trowbridge I. (1983) Effects of anti-transferrin receptor antibodies on growth of normal and malignant myeloid cells. Int. J. Cancer, 32, 343-349.

Taetle R., Rhyner K., Castagnola J. et Mendelsohn J. (1985) Role of transferrin Fe and transferrin receptors in myeloid leukemia cell growth: studies with an antitransferrin receptor monoclonal antibody. J. Clin. Invest., 75, 1061-1067.

Taetle R. Smetsrud M. et Trowbridge I; (1987) Regulation of transferrin receptor expression in myeloid leukemia cells. Blood, 70, 852-860.

Taylor PG., Soyano A., Romano E. et Layrisse M. (1988) Iron and transferrin uptake by phytohemagglutinin stimulated human peripheral blood lymphocytes. Microbiol. Immunol., 32, 949-955.

Testa V. (1985) Transferrin receptor: structure and function. Curr. Top. Hematol., 5, 127-159.

Theil CE. (1990) Regulation of ferritin and transferrin receptor mRNAs. J. Biol. Chem., 265, 4771-4774.

Thorstensen K. (1988) Hepatocytes and reticulocytes have different mechanisms for the uptake of iron from transferrin. J. Biol. Chem., 263, 16837-16841.

Thorstensen K. et Romslo I. (1988) Uptake of iron from transferrin by isolated rat hepatocytes. J. Biol. Chem., 263, 8844-8850.

Thorstensen K. et Romslo I. (1990) The role of transferrin in the mechanism of cellular iron uptake. Biochem. J., 271, 1-10.

Tobin R. et Schneider PB. (1976) Uptake of ⁶⁷Ga in the lactating breast and its persistence in milk. J. Nucl. Méd., 17, 1055-1056.

Tonik SE., Shindelman JE. et Sussman HH. (1986) Transferrin receptor is inversely correlated with estrogen receptor in breast cancer. Breast Cancer Res. and Treat., 7, 71-76.

Tooles-Simms W., Sün IL., Faulk WP., Löw H., Lindgren A., Crane FL. et Morre DJ. (1991) Inhibition of transplasma membrane electron transport by monoclonal antibodies to the transferrin receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun., 176, 1437-1442.

Torney DC. et Mueller GC (1972) Biological effect of the transferrin on human lymphocytes in vitro. Exp. Cell Res., 74, 220-226.

Trowbridge IS. et Domingo DL. (1981) Anti-transferrin receptor monoclonal antibody and toxin-antibody conjugates affect growth of human tumor cells. Nature, 294, 171-173.

Trowbridge IS. et Domingo DL. (1982) Prospects for the clinical use of cytotoxic monoclonal antibody conjugates in the treatment of cancer. Cancer Surveys, 1, 543-556.

Trowbridge IS. et Lopez F. (1982) Monoclonal antibody to transferrin receptor blocks transferrin binding and inhibits human tumor cell growth in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1175-1179.

Trowbridge IS., Lesley JF., Domingo D., Schulte R. et Sauvage C. et Rammensee HG. (1988) Monoclonal antibodies to transferrin receptor and assays of their biological effects. Meth. Enzymol., 147, 265-279.

Trowbridge IS., Newman RA., Domingo DL., Sauvage C. (1984) Transferrin receptor: structure and function. J. Biol. Chem., 253, 3771-3774.

Trowbridge IS. et Omary MB. (1981) Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 3039-3043.

Tsan MF. et Scheffel U; (1986) Mechanism of ^{67}Ga accumulation in tumors. J. Nucl. Med., 27, 1215-1219.

Tsavalier L., Stein BS. et Sussman HH. (1986) Demonstration of the specific bonding of bovine transferrin to human receptor in K562 cells : evidence for interspecies transferrin internalization. J. Cell. Physiol., 128, 1-8.

Tuccari G. et Barresi G. (1985) Immunohistochemical demonstration of lactoferrin in follicular adenomas and thyroid carcinomas. Virchows Arch. A., 406, 67-74.

Tuccari G., Barresi G., Arena F. et Inferrera C. (1989) Immunocytochemical detection of lactoferrin in human gastric carcinomas and adenomas. Arch. Pathol. Lab. Med., 113, 912-915.

Tycko B. et Maxfield FR. (1982) Rapid acidification of endocytic vesicles containing 2-macroglobulin. Cell, 28, 643-654.

Tyndall RL., Chaskes SJ. et Carlton JE. (1976) ^{67}Ga distribution in pregnant mammals. J. Exp. Zool., 195, 417-423.

Uzan G., Frain M., Park I., Besmond C., Haesens G., Trepas JS., Zakin MM. et Zakin A. (1984) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human transferrin. Biochem. Biophys. Res. Commun., 119, 273-281.

Vaitukaitis J., Bobbins JB., Nieschlag E. et Ross GT. (1971). A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocrinol., 33, 988-999.

Vallabhajosula SR., Harwig JF., Siemsen JK. et Wolf W. (1980) Radiogallium localization in tumors: blood binding and transport and the role of transferrin. J. Nucl. Med., 21, 650-656.

Vallabhajosula SR., Harwig JF. et Wolf W. (1981) The mechanism of tumor localization of ⁶⁷Ga citrate: role of transferrin binding and effect of tumor pH. Int. J. Nucl. Med. Biol., 8, 363-370.

Van Agthoven A., Goridis C., Naquet A., Pierres A. et Pierres M. (1984) Structural characteristics of the mouse transferrin receptor. Eur. J. Biochem., 140, 433-440.

Vandewalle B., Collyn d'Hoghe M., Savary JB., Vilain MO., Peyrat JP., Deminatti M., Delobelle-Deroide A. et Lefebvre J. (1987) Establishment and characterization of a new cell line VHB1 derived from a primary breast carcinoma. J. Cancer Res. Clin. Oncol., 113, 550-558.

Vandewalle B., Granier AM., Peyrat JP., Bonnetterre J. et Lefebvre J. (1985) Transferrin receptors in cultured breast cancer cells. J. Cancer Res. Clin. Oncol., 110, 71-76.

Vandewalle B., Hornez L., Révillion F. et Lefebvre J. (1991) Cyclic AMP stimulation of transferrin secretion by breast cancer cells grown on extracellular matrix or in two compartment culture chambers. Biochem. Biophys. Res. Commun., 177, 1041-1048.

Vandewalle B., Revillion-Carette F. et Lefebvre J. (1988) Involvement of cell surface transferrin receptor in the assessment of oestradiol stimulating effect on cultured breast cancer cells. Anticancer Res., 8, 495-498.

Van Driel JR. et Goding JW. (1985) Heterogeneous glycosylation of murine transferrin receptor subunits. Eur. J. Biochem., 382, 1-6.

Van Snick JL., Markowitz B. et Masson PL. (1977) The ingestion of human lactoferrin by mouse peritoneal macrophages and the transfer of its iron to ferritin. J. Exp. Med., 146, 817-827.

Van Snick JL. Masson PL. et Heremans JF. (1974) The involvement of lactoferrin in the hyposideremia of acute inflammation. J. Exp. Med., 140, 1068-1084.

Van Snick JL. et Masson PL. (1976) The binding of human lactoferrin to mouse peritoneal cells. J. Exp. Med., 144, 1568-1580.

Veber N., Starzec A., Prevost G., Crepin M. et Israel L. (1990) EGF receptor level on mastopathy epithelial cells is regulated by AMPc and TPA but in a different manner. First Int. Symp. on Benign Breast Disease and Chemoprevention of Breast Cancer, 6-8 dec. 1990, Gênes, Italy.

Wada HG., Hass PE. et Sussman HH. (1979) Transferrin receptor in human placental brush border membranes. J. Biol. Chem., 254, 12629-12635.

Walker R. et Camplejohn R. (1986) DNA flow cytometry of human breast carcinomas and its relationship to transferrin and epidermal growth factor receptors. J. Pathology, 150, 37-42.

Wall DA., Wilson G. et Hubbard AC. (1980) The galactose specific recognition system of mammalian liver: the route of ligand internalization in rat hepatocyte. Cell, 21, 79-83.

Ward JH. (1987) The structure function and regulation of transferrin receptors. Invest. Radiol., 22, 74-83.

Ward JH., Jordan I., Kushner JP. et Kaplan J. (1984) Heme regulation of HeLa cell transferrin receptor. J. Biol. Chem., 259, 13231-13240.

Ward JH. et Kaplan D. (1986) Mitogenic agents induce redistribution of transferrin receptors from internal pools to the cell surface. Biochem. J., 238, 721-728.

Ward JH., Kushner JP. et Kaplan J. (1982) Regulation of HeLa cell transferrin receptors. J. Biol. Chem., 257, 10317-10323.

Warin HG., Baert F., Fouret R., Strecker G., Fournet B., Spik G. et Montreuil J. (1979) The crystal and molecular structure of O- α mannopyranosyl (1-3) O- β mannopyranosyl (1-4) amino 2 deoxy α -D glucopyranose. Carbohydr. Res., 76, 11-22.

Warren G., Woodman P., Pypaert M. et Smythe E. (1988) Cell free assays and the mechanism of receptor mediated endocytosis. Trends Biochem. Sci., 13, 462-465.

Weinberg ED. (1974) Iron and susceptibility to infectious diseases Science, 152, 172-176.

Weinberg ED. (1984) Iron withholding: a defense against infection and neoplasia. Physiol. Rev., 65, 102-108.

Weiner RE., Hoffer PB. et Thakur ML. (1978) Identification of ⁶⁷Ga binding component in human neutrophils. J. Nucl. Med., 19, 732-738.

Weiner RE., Hoffer BP. et Thakur ML. (1981b) Lactoferrin: its role as a Ga-67 binding protein in polymorphonuclear leukocytes. J. Nucl. Med., 22, 32-37.

Weiner RE. Schreiber GJ. et Hoffer PB. (1983) In vitro transfer of Gallium-67 from transferrin to ferritin. J. Nucl. Med., 24, 608-614.

Weiner RE. Schreiber GJ., Hoffer BP. et Bushberg JT. (1985) Compounds which mediate ⁶⁷Ga transfer from lactoferrin to ferritin. J. Nucl. Med., 26, 908-916.

Weiner RE., Schreiber GJ., Hoffer BP. et Shannon T. (1981a) The relative stabilities of Ga-67 complexes of lactoferrin and transferrin at various pH's. J. Nucl. Med. Biol., 8, 371-378.

Wileman T., Harding C. et Stahl P. (1985) Receptor mediated endocytosis Biochemistry, 232, 1-14.

Wiley HS. et Kaplan J. (1984) Epidermal growth factor rapidly induces a redistribution of transferrin receptor pools in human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7456-7460.

Williams J. (1975) Iron binding fragments from the carboxyl-terminal region of the ovotransferrin. Biochem. J., 149, 237-244.

Williams J., Elleman TL., Kingston IB., Wilkins AG. et Kuhn KA. (1982) The primary structure of hen ovotransferrin. Eur. J. Biochem., 122, 297-303.

Willingham MC., Hanover JA., Dickson RB. et Pastan IH. (1983) Morphologic characterization of the pathway of transferrin receptor endocytosis and recycling in human KB cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 175-179.

Willingham MC. et Pastan I. (1985) Morphologic methods in the study of endocytosis in cultured cells. In : " Endocytosis" (Pastan I. et Willingham MC. Eds.) Plenum Press, London and New-York, 281-321.

Winchell HS. (1976) Mechanism for localization of radiopharmaceuticals in neoplasms. Sem. Nucl. Med., 6, 371-378.

Wurster K., Heberling D. et Rapp W. (1980) Carcinoembryonic antigen and lactoferrin in benign and malignant disease of the breast. Geburtshilfe Frauenheilk., 40, 412-422.

Xie XS. et Stone DK. (1986) Isolation and reconstitution of the clathrin coated vesicle proton translocating complex. J. Biol. Chem., 163, 9859-9865.

Yamada Y., Amagasaki T., Jacobsen DW. et Green R. (1987) Lactoferrin binding by leukemia cell lines. Blood 70 264-270.

Yang F., Lum JB., Mac Gill JR., Moore CM., Naylor SL. et Van Bragt PH., Balwin WD. et Bowman BH. (1984) Human transferrin : cdNA characterization and chromosomal localisation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 2752-2756.

Young SP., Bomford A. et Williams R. (1984) The effect of iron saturation of transferrin on its binding and uptake by rabbit reticulocytes. Biochem. J., 219, 505-510.

Zerial M., Melancon P., Schneider C. et Garoff H. (1986) The transmembrane segment of the human transferrin receptor function as a signal peptide. EMBO J., 5, 1543-1550.

044 174985

Zimecki M., Mazurier J., Machnicki M., Wiczorek Z., Montreuil J. et Spik G. (1991) Immunostimulation activity of lactotransferrin and maturation of CD4- CD8- murin lymphocytes. Immunology Lett., 30, 119-124.

Zucali JR., Broxmeyer HE., Levy D. et Morse C. (1989) Lactoferrin decreases monocyte-induced fibroblast production of myeloid colony-stimulating activity by suppressing monocyte release of interleukin-1. Blood, 74, 1531-1536.



RESUME

Le fer, indispensable à la croissance cellulaire, est apporté aux cellules par la sérotransferrine et la lactotransferrine, qui se fixent sur des récepteurs spécifiques présents à la surface de cellules cibles. Au cours de notre étude, nous avons mis en évidence le récepteur de la lactotransferrine sur des cellules cancéreuses de glande mammaire humaine par cytofluorimétrie de flux, d'une part, à l'aide de la lactotransferrine fluorescente et d'autre part, en utilisant des anticorps anti-récepteur reconnus par des anticorps fluorescents. La lactotransferrine marquée à l' ^{125}I se fixe sur ces cellules avec un K_d voisin de 120 nM et un nombre de sites par cellule de $1.1 \cdot 10^6$. Ces paramètres de fixation sont similaires à ceux déterminés préalablement pour les lymphocytes humains activés.

Des expériences de fixation et d'inhibition, réalisées en présence de peptides purifiés, obtenus à partir d'hydrolysats enzymatiques de la lactotransferrine humaine, démontrent que le site d'interaction de la lactotransferrine avec son récepteur est localisé dans le domaine N1 (résidus d'acides aminés 4 à 52) du lobe N-terminal de la protéine. Les glycanes de lactotransferrine n'interviennent pas dans la reconnaissance de la protéine par son récepteur.

Des études, réalisées par microscopie de fluorescence et par radiomarquage de la lactotransferrine, montrent que la protéine n'est pas internalisée dans les cellules cancéreuses de glande mammaire T47D. L'interaction de la lactotransferrine avec son récepteur induit une libération du ^{59}Fe de la lactotransferrine fixée à la surface cellulaire.

