

50376
1992
87

62882

50376
1992
87

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Spécialité : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

BEATRICE LEVEUGLE

INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE AVEC
LES CELLULES DU SANG HUMAIN

ETUDE DES RECEPTEURS LYMPHOCYTAIRE ET PLAQUETTAIRE



Présentée le 13 Mars 1992 devant la Commission d'Examen

Président : Jean MONTREUIL
Rapporteurs : Jeremy BROCK
André VERBERT
Examineurs : Jean Jacques HUART
Geneviève SPIK
Joël MAZURIER



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 : Relation Structure-Fonctions des constituants membranaires; Directeur : Professeur A. Verbert). Il a bénéficié d'une Allocation de Recherche du Ministère de la Recherche et de la Technologie.

A Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL

La qualité de votre enseignement, votre dynamisme et votre passion pour la Recherche m'ont profondément marquée. Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre Laboratoire et je voudrais vous exprimer ma plus vive gratitude et mon profond respect.

A Madame le Professeur Geneviève SPIK

Je tiens à vous remercier d'avoir guidé mes premiers pas dans la Recherche. Votre compétence, votre sagesse mais aussi votre gentillesse ont transformé ces quatre années en une expérience inoubliable. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance et de mon amitié

A Monsieur le Professeur André VERBERT

Malgré vos nombreuses occupations, vous avez bien voulu me faire l'honneur de juger cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Jeremy BROCK

Grand spécialiste dans le domaine des transferrines vous avez accepté de juger ce travail. Je tiens à vous remercier sincèrement pour l'intérêt que vous avez bien voulu lui porté.

A Monsieur le Professeur Jean Jacques HUART

En nous ouvrant les portes du C.R.T.S. et en nous fournissant de nombreuses poches de sang, vous nous avez permis de mener à bien cette étude. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Joël MAZURIER

Au cours de la réalisation de cette thèse, tu m'a fais bénéficier de ton expérience scientifique et de tes précieux conseils. J'ai pu, en plus, au cours de ces quatre années, apprécier ta patience et ta gentillesse ainsi que ton certain sens de l'humour. Soit assuré de ma sincère reconnaissance et de mon amitié.

Je tiens enfin à remercier tous ceux qui par leur collaboration, leur aide et leur amitié m'ont aidée dans la réalisation de ce travail :

- L'ensemble du personnel du Laboratoire de Chimie Biologique, avec une pensée particulière à Odette LABIAUX pour son aide et ses conseils en matière de culture cellulaire, Jo CELEN pour la réalisation des photographies et la reproduction de ce travail et à tous mes camarades du 103.

- Madame le Docteur D. BREVIERE, Monsieur le Docteur J. MAILLARD et Madame F. CORBEILLE du C.R.T.S. de Lille qui nous ont fourni les poches de sang.

- Madame le Professeur M. CAPRON de l'Institut d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de Lille qui nous a procuré des éosinophiles.

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

ADN	: acide désoxyribonucléique
ADP	: adénosine diphosphate
ARN	: acide ribonucléique
ARNm	: ARN messagers
ATCA	: acide trichloroacétique
ATP	: adénosine triphosphate
BSA	: bovine serum albumin
Con A	: concanavaline A
cpm	: coups par minute
DFP	: diisopropyl fluorophosphate
EDTA	: acide éthylène diamine tétraacétique
EGF	: epidermal growth factor
ELISA	: enzyme-linked-immuno-sorbent assay
FITC	: fluorescéine isothiocyanate
GM-CSF	: granulocyte macrophage colony stimulating factor
GNA	: Galanthus nivalis agglutinine
HPLC	: high pressure liquid chromatography
HyF	: 5-(((2-(carbohydrazino)methyl)thio)acetyl)amino-fluorescein
Ig	: immunoglobuline
IGF	: insulin growth factor
IL-1	: interleukine-1
ILMA	: immunoluminometric assay
IRE-BP	: iron regulated RNA binding protein
Kd	: constante de dissociation
kDa	: kiloDalton
KRDS	: Lys-Arg-Asp-Ser
LTF	: lactotransferrine
NAD	: nicotinamide adénine dinucléotide
NBT	: nitroblue tetrazolium
NK	: natural killer
PBS	: tampon phosphate mono/disodique 10 mM, NaCl 145 mM, pH 7,4
PDGF	: platelet derived growth factor
PHA	: phytohémagglutinine
PMSF	: phenyl methyl sulfonyl fluoride
PNA	: peanut agglutinin

PVP : polyvinyl pyrrolidone
RGDS : Arg-Gly-Asp-Ser
RIA : radio-immunoassay
RNase : ribonuclease
SDS : sodium dodécylsulfate
STF : sérotransferrine
TNF : tumor necrosis factor

Arg : arginine
Asn : asparagine
Asp : acide aspartique
Cys : cystéine
His : histidine
Ser : sérine
Thr : thréonine
Tyr : tyrosine

Fuc : fucose
Gal : galactose
GlcNAc : N-acétylglucosamine
Man : mannose
NeuAc : acide N-acétylneuraminique

SOMMAIRE

INTRODUCTION

GENERALITES

LES TRANSFERRINES

I. LOCALISATION.....	4
II. STRUCTURE ET CONFORMATION.....	9
A. Structure primaire des transferrines.....	9
B. Organisation de la chaîne peptidique.....	11
C. Les sites de fixation du fer.....	13
D. Etude de la partie glycanique.....	14
III. CONCLUSION.....	20

LES RECEPTEURS DES TRANSFERRINES

I. LES RECEPTEURS DES TRANSFERRINES DES VERTEBRES.....	21
A. Le récepteur de la sérotransferrine.....	22
B. Les récepteurs de la lactotransferrine.....	44
II. LES RECEPTEURS DE TRANSFERRINES DES BACTERIES ET DES PARASITES..	54
III. CONCLUSION.....	61

INTERACTIONS DES TRANSFERRINES AVEC LES CELLULES DU SANG,

RELATIONS TRANSFERRINES-SYSTEME IMMUNITAIRE

I. LA SEROTRANSFERRINE.....	63
II. LA LACTOTRANSFERRINE.....	71
III. CONCLUSION.....	85

RESULTATS

RECHERCHE DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE A LA SURFACE DES DIFFERENTES CELLULES DU SANG HUMAIN

I. INTRODUCTION.....	87
II. MODE OPERATOIRE.....	88
A. Matériel cellulaire.....	88

B. Réactifs utilisés.....	91
C. Etude de la fixation de la lactotransferrine sur les différentes cellules du sang humain par cytofluorimétrie de flux.....	92
D. Etude de la fixation de la lactotransferrine sur les lymphocytes activés et sur les plaquettes en fonction de son degré de saturation en fer.....	94
E. Analyse des résultats.....	95
III. RESULTATS.....	97
A. Les hématies.....	98
B. Les neutrophiles.....	100
C. Les éosinophiles.....	102
D. Les lymphocytes.....	102
E. Les monocytes/macrophages.....	105
F. Les plaquettes.....	108
G. Présentation de l'ensemble des résultats.....	109
IV. CONCLUSION.....	112

**PURIFICATION DES RECEPTEURS LYMPHOCYTAIRE ET PLAQUETTAIRE DE
LA LACTOTRANSFERRINE**

I. INTRODUCTION.....	118
II. MODE OPERATOIRE.....	119
A. Réactifs.....	119
B. Purification du récepteur membranaire de la lactotransferrine..	120
C. Purification du récepteur soluble de la lactotransferrine.....	123
D. Fixation de la lactotransferrine sur les récepteurs purifiés...	125
E. Identification des protéines présentes dans les fractions purifiées.....	126
III. RESULTATS.....	126
A. Purification du récepteur membranaire de la lactotransferrine..	126
B. Purification du récepteur soluble de la lactotransferrine.....	136
VI. CONCLUSION.....	142

**MISE EN EVIDENCE DU RECEPTEUR A HAUTE AFFINITE POUR LA
LACTOTRANSFERRINE A L'AIDE D'UN ANTICORPS POLYCLONAL SPECIFIQUE**

I. INTRODUCTION.....	146
II. MODE OPERATOIRE.....	146

A. Préparation d'anticorps polyclonaux dirigés contre le récepteur lymphocytaire de la lactotransferrine.....	146
B. Etude de la spécificité des anticorps anti-récepteur lymphocytaire de la lactotransferrine.....	148
III. RESULTATS.....	150
A. Préparation d'anticorps polyclonaux dirigés contre le récepteur lymphocytaire de la lactotransferrine.....	150
B. Etude de la spécificité des anticorps anti-récepteur lymphocytaire de la lactotransferrine.....	151
IV. CONCLUSION.....	155

CONTRIBUTION A L'ETUDE STRUCTURALE DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE

I. INTRODUCTION.....	157
II. MODE OPERATOIRE.....	157
A. Détermination partielle de la structure primaire du récepteur de la lactotransferrine.....	157
B. Etude de la glycosylation du récepteur de la lactotransferrine.....	158
III. RESULTATS.....	165
A. Détermination partielle de la structure primaire du récepteur de la lactotransferrine.....	165
B. Etude de la glycosylation du récepteur de la lactotransferrine.....	167
IV. CONCLUSION.....	175

CONCLUSION GENERALE

APPENDICE TECHNIQUE

I. PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE.....	183
II. PURIFICATION DES ANTICORPS.....	185
III. MARQUAGES RADIOACTIFS.....	185
IV. TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES.....	187
V. DETECTION DES PROTEINES APRES TRANSFERT SUR NITROCELLULOSE.....	188

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Depuis la découverte de la lactotransferrine dans le lait de Femme (Montreuil et Mullet, 1960; Montreuil et al., 1960), de nombreux travaux ont été effectués, en particulier au Laboratoire, sur la structure de cette protéine, sur ses rôles biologiques et sur la recherche et l'étude de ses récepteurs.

Si la structure de la lactotransferrine humaine est maintenant bien connue, ses fonctions biologiques restent encore très controversées. Afin de mieux comprendre les rôles biologiques de la lactotransferrine, il est nécessaire de connaître les cellules cibles de cette protéine.

Après avoir été caractérisée dans de nombreux liquides biologiques et à la surface des muqueuses, la présence de la lactotransferrine fût démontrée dans les granules secondaires des leucocytes polynucléaires (Masson et al., 1969). Suite à cette observation et la mise en évidence de la libération de cette protéine dans le sang au cours de l'activation des leucocytes, de nombreux travaux ont été entrepris, en particulier, sur la présence de récepteurs spécifiques de la lactotransferrine à la surface des différentes cellules sanguines.

Au moment où nous avons commencé notre travail :

- aucune étude n'avait été réalisée sur les éosinophiles et les basophiles,
- la recherche, par la technique de Scatchard (1949), de récepteurs spécifiques de la lactotransferrine à la surface des hématies et des plaquettes s'était révélée négative,

- des récepteurs spécifiques de la lactotransferrine avaient été mis en évidence, par cette même technique, à la surface des neutrophiles, des monocytes et des lymphocytes.

Les expériences réalisées par Joël Mazurier (1989), au Laboratoire, avaient permis d'une part, de démontrer la présence de récepteurs spécifiques à la surface des lymphocytes circulants humains activés et d'autre part, de purifier et d'identifier ce récepteur. Les paramètres de fixation de la lactotransferrine, calculés pour les lymphocytes activés s'étaient révélés être très différents de ceux déterminés pour les neutrophiles et les monocytes. Une hypothèse de travail a alors été émise selon laquelle la nature du récepteur lymphocytaire pouvait être différente de celles des récepteurs exprimés à la surface des neutrophiles et des monocytes.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons, dans un premier temps, entrepris par cytofluorimétrie de flux, une étude systématique de la recherche de récepteurs de la lactotransferrine à la surface des différentes cellules du sang humain. Les résultats obtenus ont conduit, pour la première fois, à la mise en évidence d'une fixation spécifique de la lactotransferrine à la surface des plaquettes et des éosinophiles. Par cette méthode, nous avons également confirmé l'interaction de la lactotransferrine avec les lymphocytes activés, les monocytes et les neutrophiles.

Suivant le type cellulaire étudié, deux fixations différentes ont été observées: une fixation de haute affinité à la surface des lymphocytes activés et des plaquettes et une fixation de faible affinité à la surface des neutrophiles, des monocytes et des éosinophiles.

Dans un second temps, les récepteurs à haute affinité, responsables de la fixation de la lactotransferrine à la surface des

lymphocytes activés et des plaquettes ont été purifiés par chromatographie d'affinité. La caractérisation des récepteurs lymphocytaire et plaquettaire en gel de polyacrylamide et l'identification des glycanes portés par ces récepteurs à l'aide de différentes lectines et endoglycosidases nous a conduit à la démonstration de l'identité structurale de ces deux récepteurs membranaires.

Enfin, nous avons préparé, à partir du récepteur lymphocytaire, un anticorps polyclonal monospécifique. L'utilisation de cet anticorps, par cytofluorimétrie de flux et par des expériences de "Western blot", a confirmé la grande analogie structurale et immunologique des récepteurs lymphocytaire et plaquettaire. D'autre part, l'absence d'interaction de cet anticorps avec les neutrophiles, les monocytes et les éosinophiles démontre que les protéines responsables de la fixation de la lactotransferrine à la surface de ces cellules sont bien distinctes des récepteurs lymphocytaire et plaquettaire.

Les résultats que nous apportons sont donc en faveur de l'existence de deux types de récepteurs de la lactotransferrine : des récepteurs à haute affinité à la surface des lymphocytes activés et des plaquettes et des récepteurs à faible affinité à la surface des neutrophiles, des monocytes et des éosinophiles. Les récepteurs à haute affinité possèdent des propriétés structurales analogues et sont antigéniquement différents des récepteurs à faible affinité.

L'existence de deux types de récepteurs suggère que la lactotransferrine possède un mode d'action différent vis à vis des cellules cibles correspondantes et pose le problème du rôle biologique de la lactotransferrine dans ces cellules.

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

Communications :

- Leveugle B., Mazurier J., Montreuil J. and Spik G.
Study of the lactotransferrin receptor expressed by human lymphoid cell line XVII^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs en Biochimie et Biologie Moléculaire, Villeneuve d'Ascq - 3-6 Juillet 1990.

- Leveugle B., Mazurier J., Montreuil J. and Spik G.
Study of lactotransferrin receptor in human PHA-activated lymphocytes.
Xth International Conference on Iron and Iron Proteins, Oxford
27-31 Juillet 1991.

Publications :

- Leveugle B., Mazurier J., Legrand D., Montreuil J. and Spik G.
Characterization of human platelet lactotransferrin receptor,
comparison with the lymphocyte lactotransferrin receptor.
soumis à J. Cell. Biol.

- Leveugle B., Mazurier J., Montreuil J. and Spik G.
Carbohydrate analysis of the human platelet lactotransferrin receptor.
Biochem. Biophys. Res. Commun. (en préparation).

- Leveugle B., Mazurier J., Montreuil J. and Spik G.
Identification of a soluble lactotransferrin receptor in the
PHA-stimulated lymphocytes culture medium.
FEBS Letters (en préparation).

GENERALITES

LES TRANSFERRINES.

Les transferrines regroupent une famille de glycoprotéines dont le rôle est de transporter le fer chez les vertébrés (Aisen et Listowsky, 1980) et chez les invertébrés (Huebers et al., 1982; Martin et al., 1983). Elles assurent le transport de 0,15% du fer total de l'organisme et la répartition du métal entre les formes de stockage comme la ferritine et l'hémosidérine et les formes actives principalement représentées par l'hémoglobine, les cytochromes et de nombreuses enzymes metallo-dépendentes.

La famille des transferrines comprend :

- l'ovotransferrine (ou conalbumine) isolée du blanc d'oeuf d'oiseau par Schade et Caroline en 1944.
- la sérotransferrine, initialement dénommée sidérophiline, isolée du plasma par Schade et Caroline en 1946.
- la lactotransferrine (ou lactoferrine), présente dans le lait des mammifères et autres liquides de sécrétion, découverte et isolée du lait de Femme par Montreuil et Mullet, 1960; Montreuil et al., 1960 puis par Johansson la même année.
- la mélanotransferrine (ou P97) identifiée à la surface des cellules de mélanomes humains par Brown et al. (1980, 1982).

Dans ce chapitre, nous étudierons plus particulièrement la localisation de la sérotransferrine et de la lactotransferrine dans l'organisme humain et la structure de ces protéines en insistant sur les homologues structurales existant entre ces deux protéines.

I. LOCALISATION.

A. LA SEROTRANSFERRINE.

La sérotransferrine est principalement localisée dans le plasma sanguin (Schade et Caroline, 1946), elle est également présente dans d'autres liquides extracellulaires comme le lait, le liquide cérébro-spinal, le sperme et le liquide amniotique.

La sérotransferrine provient essentiellement du foie, les hépatocytes étant les principales cellules impliquées dans sa synthèse (Aisen, 1964). La synthèse de sérotransferrine a également été mise en évidence dans les cellules épendymaires du plexus choroïde (Dickson et al., 1985), les oligodendrocytes du système nerveux central (Bloch et al., 1985), les cellules de Sertoli (Skinner et Griswold, 1980), les lymphocytes (Soltys et Brody, 1970), les macrophages (Phillips et Thorbecke, 1966; Haurani et al., 1973) et les fibroblastes (Stecher et Thorbecke, 1967).

B. LA LACTOTRANSFERRINE.

Dans l'organisme humain, la lactotransferrine est présente dans deux réservoirs principaux : un pool extra-vasculaire à la surface des

muqueuses et dans les sécrétions et un pool circulant dans les leucocytes polynucléaires et le plasma sanguin.

1. Pool extra-vasculaire.

Après sa découverte dans le lait de Femme (Montreuil et Mullet, 1960; Montreuil et al., 1960), la présence de la lactotransferrine fut mise en évidence dans d'autres milieux de sécrétion comme les sécrétions bronchiques (Biserte et al., 1963), la salive (Masson et al., 1966; Masson, 1970), le plasma séminal (Hekman et Rümke, 1969), le mucus cervical et gastro-intestinal (Masson et al., 1966; Masson, 1970), le suc pancréatique (Clemente et al., 1971), le liquide synovial (Bennett et al., 1973), les larmes (Broekhuysse, 1974), la bile (van Gut et al., 1975) et le liquide céphalo-rachidien (Terent et al., 1981).

2. Pool circulant

Masson et al. (1969) ont été les premiers à découvrir la présence de la lactotransferrine dans les leucocytes polynucléaires. Celle-ci est localisée dans les granules secondaires (Baggiolini et al., 1970 ; Leffell et Spitznagel, 1972), sa concentration intracellulaire est comprise entre 1,8 à 7,7 $\mu\text{g}/10^6$ cellules (Masson et al., 1969; Rümke et al., 1971; Leffell et Spitznagel, 1972; Hansen et al., 1975; Olofson et al., 1977; de Vet et ten Hoopen, 1978).

Les leucocytes polynucléaires matures ne synthétisent pas la lactotransferrine, la biosynthèse de cette protéine commence au cours de la granulopoïèse au stade promyélocytaire et se termine au stade métamyélocytaire (Rado et al., 1984).

La présence de la lactotransferrine a également été détectée dans le sang. Le plasma provenant d'individus sains ne contient que très peu de lactotransferrine, environ 200 µg/l (tableau I, p. 7), comparée à la sérotransferrine (2 à 4g/l). Des variations de la concentration plasmatique de la lactotransferrine ont été observées dans de nombreux cas pathologiques comme les infections bactériennes, les cirrhoses du foie et certains cancers (tableau II, p. 8). La lactotransferrine plasmatique a une origine granulocytaire, sa concentration est en corrélation étroite avec le pourcentage de neutrophiles dans le sang (Hansen et al., 1975; Bezwoda et al., 1985; Rosenmund et al., 1988). L'augmentation de la concentration plasmatique de la lactotransferrine est provoquée par l'activation et la dégranulation des neutrophiles (van Snick et al., 1974 ; Leffell et Spitznagel, 1975).

Le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) joue un rôle important dans la réponse inflammatoire. Ce facteur, libéré par les monocytes activés, stimule la dégranulation des leucocytes et par conséquent la libération de la lactotransferrine dans le sang (Shalaby et al., 1985). Récemment, il a été démontré que ce facteur diminuait fortement (70%) la transcription du gène codant pour la lactotransferrine dans les cellules myéloïdes (Srivastava et al., 1991). Il est possible d'envisager une régulation par rétroaction négative de la synthèse de la lactotransferrine par le facteur TNF- α afin d'éviter une libération trop importante de lactotransferrine dans le sang.

La lactotransferrine leucocytaire diffère de la lactotransferrine isolée du lait par sa faible saturation en fer (Masson, 1970 ; van Snick et al., 1974) et par l'absence de fucose au niveau de sa structure glucidique (Derisbourg et al., 1990). Furmanski et Li (1990) montrent que la lactotransferrine des granulocytes existe sous plusieurs formes :

Tableau I : Détermination de la concentration plasmatique de la lactotransferrine humaine chez des sujets sains.

Références	Méthode	Concentration ($\mu\text{g}/\text{l}$)
Rümke <u>et al.</u> , 1971	RIA	200 à 2.390
Hansen <u>et al.</u> , 1975	RIA	1.300 à 4.000
Bennett et Mohla, 1976	RIA	1.620 \pm 77 chez l'Homme 1.070 \pm 67 chez la Femme
Estevenon et Figarella, 1983	ELISA	55 à 213
Kolsto Otnaess <u>et al.</u> , 1983	ELISA	20 à 300
Bezwoda <u>et al.</u> , 1985	ELISA	187 à 450
Birgens, 1985	ELISA	40 à 260
Vasil'ev et Avdeev, 1985	ELISA	265 \pm 21
Rosenmund <u>et al.</u> , 1988	RIA	206 \pm 60 chez l'Homme 148 \pm 60 chez la Femme
Kähler <u>et al.</u> , 1988	ELISA	90 \pm 34
Monnard et Vernet, 1988	ELISA	59 à 345
Baynes <u>et al.</u> , 1989	ELISA	191 à 448
Maacks <u>et al.</u> , 1989	ILMA	50 à 250

Tableau II : Variation de la concentration plasmatique en lactotransferrine dans différents cas pathologiques.

Références	Cas pathologique	Facteur de variation
Bennett et Mohla, 1976	Leucémie myeloïde chronique	x 10 à 20
Bezwoda <u>et al.</u> , 1985	Neutropénie	x 0,32
	Cancer du sein	x 0,8
	Arthrite rhumatoïde	x 1,7
	Tuberculose	x 2,7
	Pneumonie aiguë	x 4,2
Vasil'ev et Avdeev, 1985	Cancer gastro-intestinal	x 1,7
	Cancer des poumons	x 1,7
	Cancer du sein	x 1,7
Rosenmund <u>et al.</u> , 1988	Déficiencie en fer	x 0,53
	Infection locale	x 0,64
	Hépatite B	x 0,76
	Tumeurs sans métastases hépatiques	x 0,59
	Tumeurs avec métastases hépatiques	x 2,1
	Cirrhose du foie	x 1,6
	Septicémie	x 6
Kähler <u>et al.</u> , 1988	Psoriasis	x 1,4
Maacks <u>et al.</u> , 1989	Infection virale	x 3,2
	Infection bactérienne	x 7,8

une forme fixant le fer et une forme ne pouvant pas lier le fer mais ayant une activité ribonucléasique. Une même classe de lactotransferrine possédant une activité ribonucléasique a également été mise en évidence dans le lait humain (Furmanski et al., 1989).

II. STRUCTURE ET CONFORMATION.

A. STRUCTURE PRIMAIRE DES TRANSFERRINES.

La séquence primaire de la chaîne peptidique de la sérotransferrine humaine a été réalisée par Mac Gillivray et al. en 1982 et 1983. Cette structure a été confirmée par des études de séquences d'ADNc du foie humain, codant pour la sérotransferrine humaine (Uzan et al., 1984; Yang et al., 1984). La sérotransferrine humaine est composée d'une seule chaîne peptidique comportant 679 résidus d'acide aminés.

La séquence primaire de la lactotransferrine humaine, isolée du lait, a été déterminée au Laboratoire en collaboration avec le groupe du Professeur P. Jollès (Metz-Boutigue et al., 1984). Les séquences primaires de la lactotransferrine leucocytaire (Rado et al., 1987; Anderson et al., 1989) et de la lactotransferrine bovine (Mead et Tweedie, 1990; Pierce et al., 1991) ont ensuite été réalisées. La lactotransferrine humaine est constituée d'une seule chaîne peptidique de 692 résidus d'acides aminés (Rey et al., 1990).

L'étude comparative des séquences peptidiques de la sérotransferrine et de la lactotransferrine met en évidence 59% d'identité structurale entre ces deux protéines (Fig. 1, p. 10) (Mazurier et al., 1983b; Metz-Boutigue et al., 1984; Legrand et al., 1984).

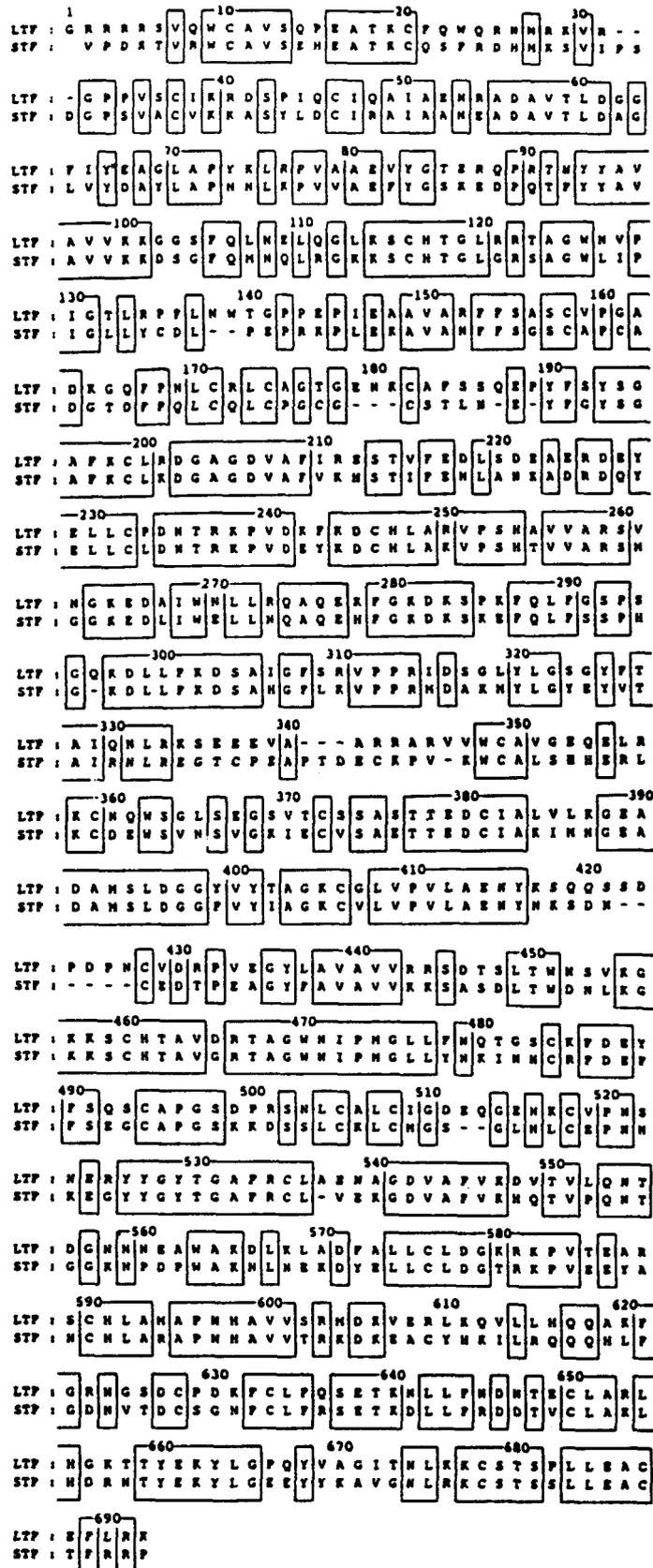
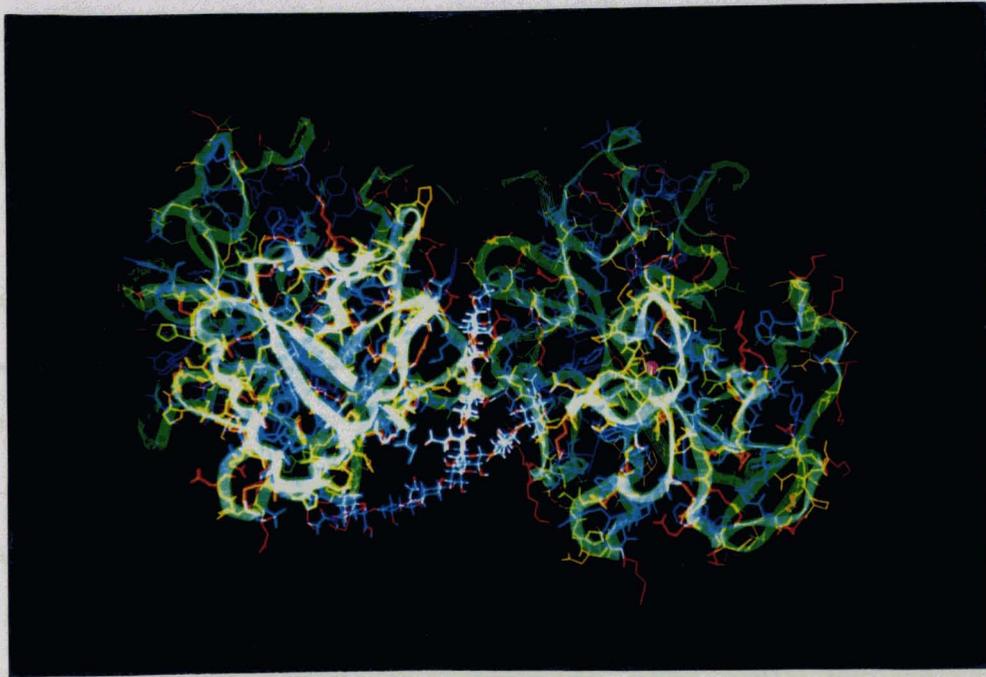


Figure 1 : Comparaison des séquences primaires des chaînes peptidiques de la lactotransferrine humaine (LTF) (Rey et al., 1990) et de la sérotransferrine humaine (STF) (Mac Gillivray et al., 1983).

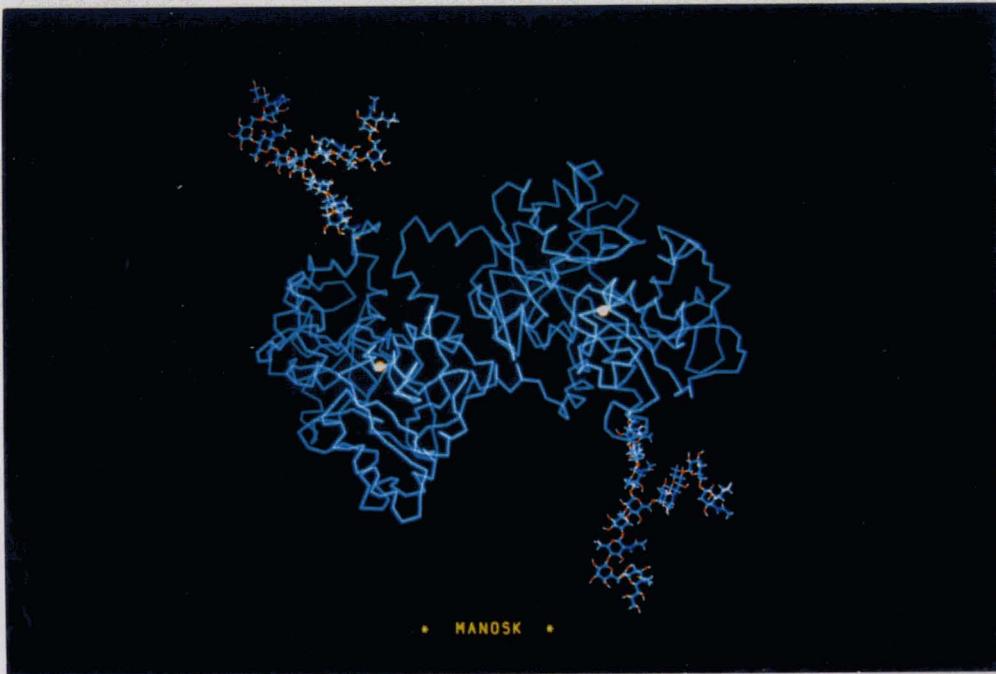
B. ORGANISATION DE LA CHAÎNE POLYPEPTIDIQUE.

Les transferrines sont des glycoprotéines globulaires composées d'une chaîne polypeptidique unique d'une masse moléculaire d'environ 80 kDa. Les différentes transferrines possèdent une structure primaire très proche et leurs organisations dans l'espace sont similaires (Fig. 2, p. 12) (Bailey et al., 1988; Anderson et al., 1987, 1989; Norris et al., 1989). La chaîne polypeptidique des transferrines s'organise en deux lobes symétriques, le lobe C-terminal et le lobe N-terminal constitués de deux domaines (N1,N2,C1,C2) à l'interface desquels se trouve le site de fixation du fer. Une zone charnière, en hélice α , de conformation différente pour la lactotransferrine et la sérotransferrine relie les deux lobes entre eux (Line et al., 1976; Bluard-Deconinck et al., 1978; Evans et Williams, 1978; Lineback-Zins et Brew, 1980; Legrand et al., 1984; Baker et al., 1987; Bailey et al., 1988, Anderson et al., 1987, 1989). Des interactions non covalentes de type hydrophobe ont été mise en évidence entre les lobes N- et C-terminaux de la lactotransferrine humaine (Legrand et al., 1986). La conformation différente de la zone charnière de la lactotransferrine et de la sérotransferrine, ainsi que le rapprochement des deux lobes de la lactotransferrine par des interactions inter-lobes, pourraient être une des causes expliquant l'incapacité de la lactotransferrine à se lier au récepteur de la sérotransferrine.

Une homologie de séquence a été mise en évidence entre les transferrines, en particulier, entre le domaine N1 et des protéines présentes à la surface de cellules cancéreuses (protéine P97 ou mélanotransferrine) (Brown et al., 1980, 1982; Rose et al., 1986) et de bactéries (Aguas et al., 1990).



A



B

Figure 2 : Modélisation moléculaire de la sérotransferrine de Lapin (A) et de la lactotransferrine humaine (B) réalisées d'après les données cristallographiques de Bailey et al. (1988) et d'Anderson et al. (1987, 1989).

C. LES SITES DE FIXATION DU FER.

Les transferrines peuvent fixer deux atomes de fer ferrique de manière réversible. La fixation du fer sur les apotransferrines entraîne une modification de la conformation des protéines ainsi qu'une résistance plus grande de ces dernières à la protéolyse (Spik et Montreuil, 1966). Les sites de fixation du fer sont localisés dans chacun des lobes à l'interface des deux domaines. Au niveau de ces sites, le fer est directement coordonné à 2 résidus de Tyr, 1 résidu d'His et 1 résidu d'Asp et indirectement coordonné à 1 résidu d'Arg par l'intermédiaire d'un ion carbonate ou bicarbonate (Aisen et Listowsky, 1980; Mazurier et al., 1983a; Metz-Boutigue et al., 1984; Montreuil et al., 1985; Anderson et al., 1987, 1989; Baker et al., 1987; Legrand et al., 1988).

Les deux sites de fixation du fer ne sont cependant pas équivalents, ils se différencient en un site "acido-labile" situé dans le lobe N-terminal et en un site "acido-stable" situé dans le lobe C-terminal. Le fer est libéré du site "acido-labile" à un pH voisin de 6 et du site "acido-stable" à un pH voisin de 5 pour la sérotransferrine et de 4 pour la lactotransferrine (Princiotta et Zapolski, 1975; Lestas, 1976; Mazurier et al., 1980). Cette différence de stabilité entre les deux lobes peut s'expliquer par la structure plus compacte du lobe C-terminal lié à la présence d'un plus grand nombre de ponts disulfure (Mazurier et al., 1981; Baker et al., 1987; Anderson et al., 1989). De plus, les études de diffraction des rayons X montrent que l'entrée du fer dans le lobe C-terminal est moins accessible que celle du lobe N-terminal proche (Anderson et al., 1987; Norris et al., 1989). L'affinité du lobe C-terminal de la sérotransferrine humaine pour le fer est supérieure à celle du lobe N-terminal (Aisen et al., 1978),

cependant, dans le sérum c'est le lobe N-terminal qui lie principalement le fer (Williams et Moreton, 1980; Zak et Aisen, 1986).

La structure tridimensionnelle des sites de fixation du fer est identique pour la sérotransferrine et la lactotransferrine; cependant, la lactotransferrine possède à un pH de 6,4 une affinité pour le fer 260 fois supérieure à celle de la sérotransferrine (Aisen et Liebman, 1971). Contrairement à la sérotransferrine, la lactotransferrine conserve particulièrement bien son fer à pH acide (Montreuil et al., 1960), il est nécessaire de descendre à un pH voisin de 2,5 pour désaturer complètement la lactotransferrine humaine.

En plus de l'ion ferrique, les transferrines fixent également d'autres ions comme : Cr^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{3+} , Mn^{2+} , Co^{3+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ga^{3+} , Ni^{2+} , Al^{3+} , Sc^{3+} , In^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} , Eu^{3+} , Er^{3+} , Pr^{3+} (Windle et al., 1963; Aasa et Aisen, 1968; Luk, 1971; Teuwissen et al., 1972; Campbell et Chasteen, 1977; Zweier, 1978; de Jong et al., 1990).

D. ETUDE DE LA PARTIE GLYCANNIQUE.

La localisation et la structure des glycanes est spécifique à chaque transferrine. Ainsi, la sérotransferrine humaine possède deux glycanes de type N-acétyl-lactosaminique localisés dans le lobe C-terminal, ces glycanes peuvent être biantennés ou triantennés (Spik et al., 1973, 1974, 1975, 1985a, 1985b; Dorland et al., 1977; Debruyne et al., 1984). La lactotransferrine humaine possède également deux glycanes de type N-acétyl-lactosaminique mais ceux-ci sont situés l'un dans le lobe C-terminal, l'autre dans le lobe N-terminal, ces glycanes sont biantennés et fucosylés (Spik et al., 1974, 1982, 1985a; Metz-Boutigue et al., 1980).

1. Détermination de la structure glycanique.

L'étude de la structure glucidique de la sérotransferrine a été entreprise au Laboratoire dès 1962 par Montreuil. La structure du glycanne biantenné a été définitivement établie par Spik et al. (1973, 1974, 1975) par des méthodes chimiques puis confirmée par l'analyse des spectres de résonance magnétique nucléaire à 360 MHz par Dorland et al. en 1977. La structure complète des glycannes triantennés a été réalisée au Laboratoire par Debruyne et al. (1984) par des méthodes chimiques et confirmée par analyse des spectres de résonance magnétique nucléaire à 500 MHz par Spik et al. (1985b). La présence d'un glycanne de structure tétraantennée a été envisagée (März et al., 1982; Spik et al., 1985b). La structure de ces glycannes est représentée dans la figure 3, p. 16.

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

Trois variants glycaniques de la sérotransferrine ont été isolés (Wong et al., 1978; Spik et al., 1982; Debruyne et al., 1984; Campion et al., 1989) :

- le variant I représente 1,5% de la sérotransferrine totale et renferme deux glycannes triantennés par molécule de sérotransferrine,
- le variant II représente 23% du total et renferme un glycanne triantenné et un glycanne biantenné par molécule de sérotransferrine,
- le variant III représente 75,5% du total et renferme deux glycannes biantennés.

Le taux de variants I et II augmente dans des cas pathologiques comme les affections hépatiques (Debruyne et al., 1984) et dans des

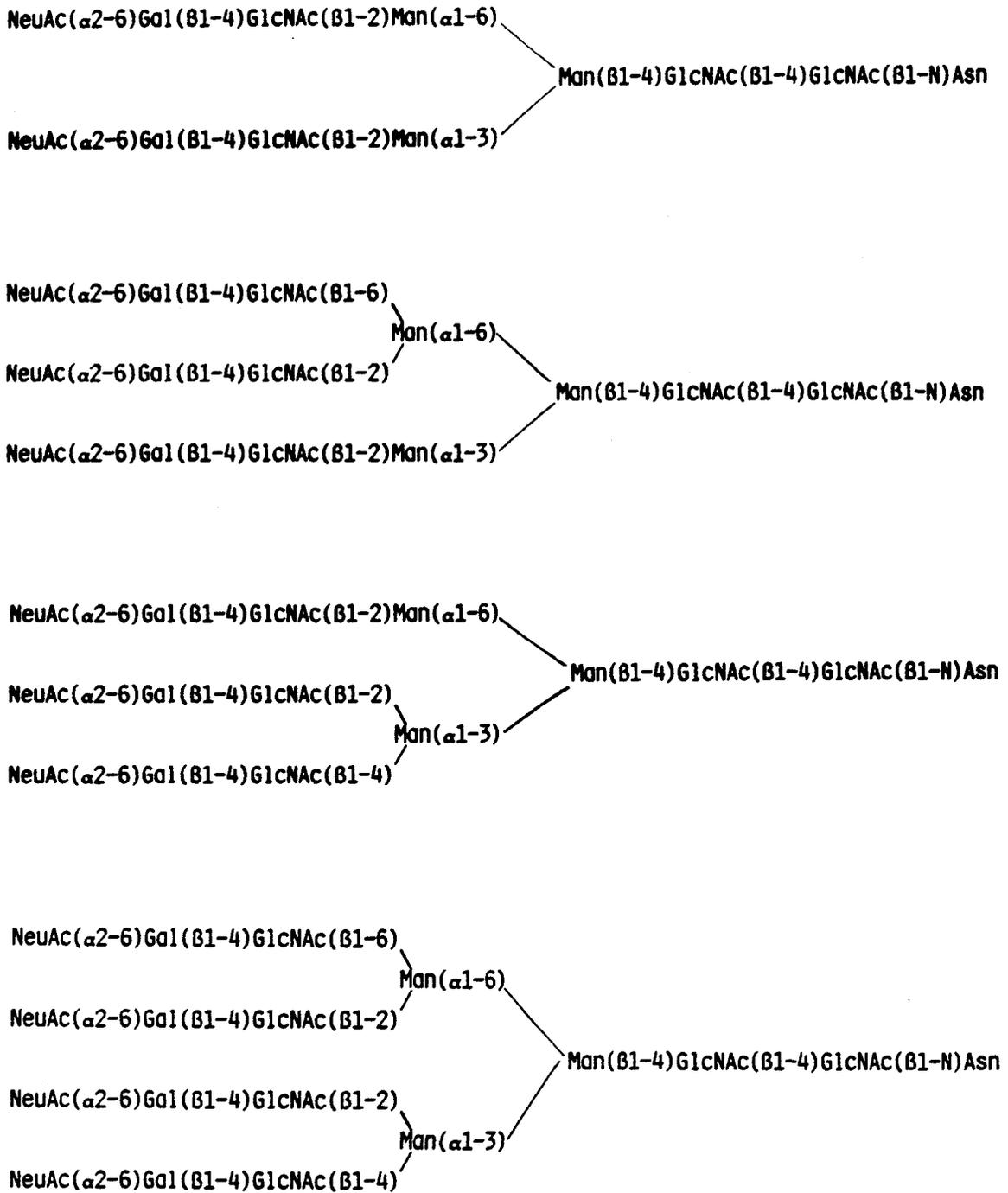


Figure 3 : Structure des glycanes de la sérotransferrine humaine (Spik et al., 1974, 1975, 1985; Dorland et al., 1977; März et al., 1982).

conditions particulières comme la gestation (Léger et al., 1989).

La nature glycoprotéinique de la lactotransferrine humaine à été démontrée par Montreuil et Mullet en 1960. Les deux glycannes de la lactotransferrine sont de type N-acétyllactosaminique fucosylés (Spik et al., 1973, 1982). Ces structures glycaniques, monosialylées ou disialylées, renfermant 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 (Fig. 4, p. 18) (Spik et al., 1982). D'autres structures plus complexes, de nature polyfucosylée, ont été trouvées en très faible quantité (Matsumoto et al., 1982).

La structure glycanique de la lactotransferrine leucocytaire humaine diffère de celle de la lactotransferrine isolée du lait de Femme par l'absence de fucose α -1,3 et α -1,6 (Derisbourg et al., 1990).

2. Conformation des glycannes.

La structure tridimensionnelle des glycannes n'est pas figée et ceux-ci peuvent adopter un nombre élevé de conformations. Les glycannes biantennés, en absence d'interaction avec la protéine, peuvent adopter une quarantaine de conformations différentes (Mazurier et al., 1991). Ces conformations sont classées en 5 conformations principales (Fig. 5, P. 19) :

- conformation en "Y" (Montreuil et al., 1975)
- conformation en "T" (Montreuil et al., 1978)
- conformation en "oiseau" (Montreuil, 1980, 1982, 1983)
- conformation en "aile brisée" (Montreuil, 1984)
- conformation en aile retournée (Mazurier et al., 1991).

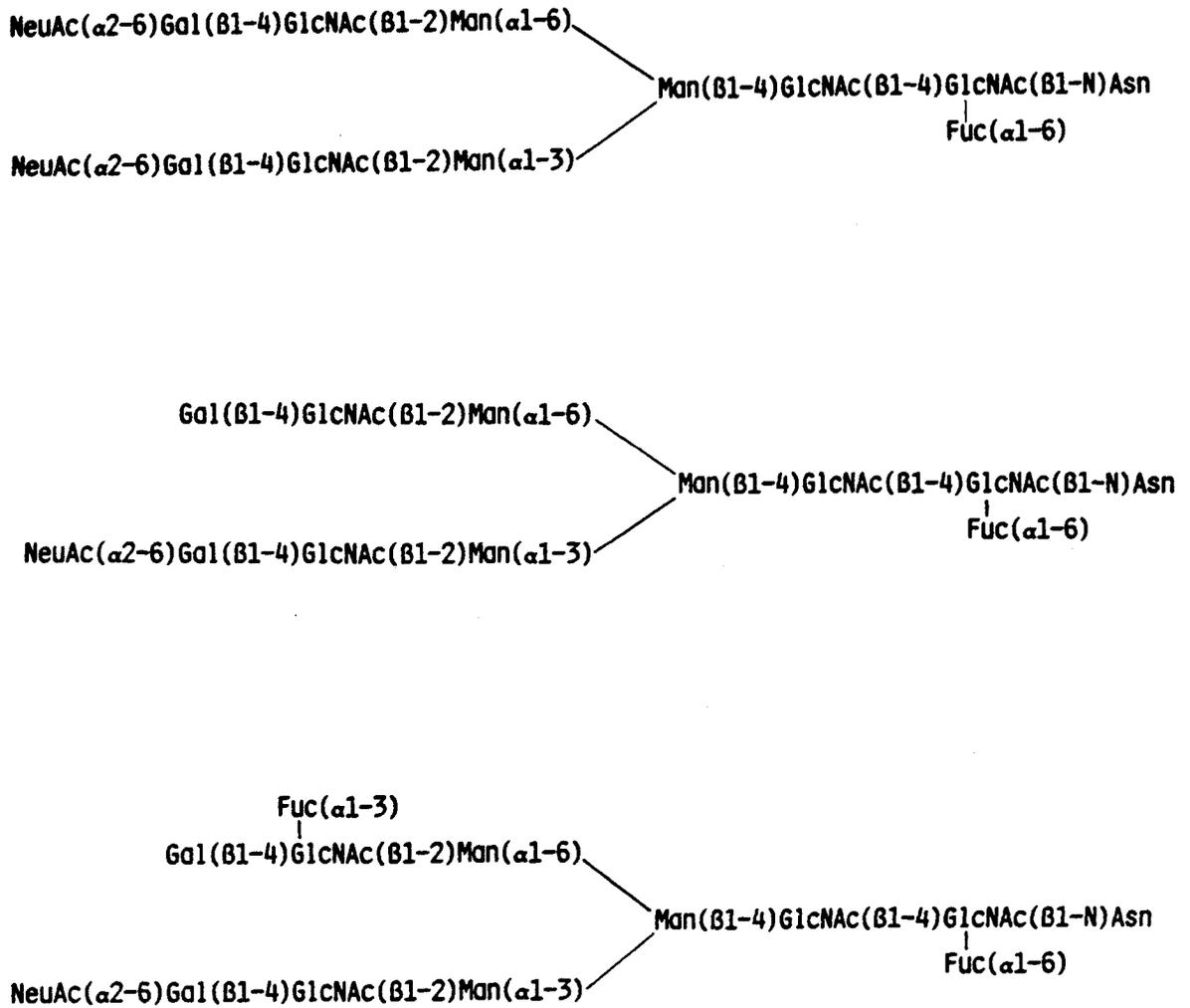


Figure 4 : Structure des glycanes de la lactotransferrine humaine (Spik et al., 1982a).

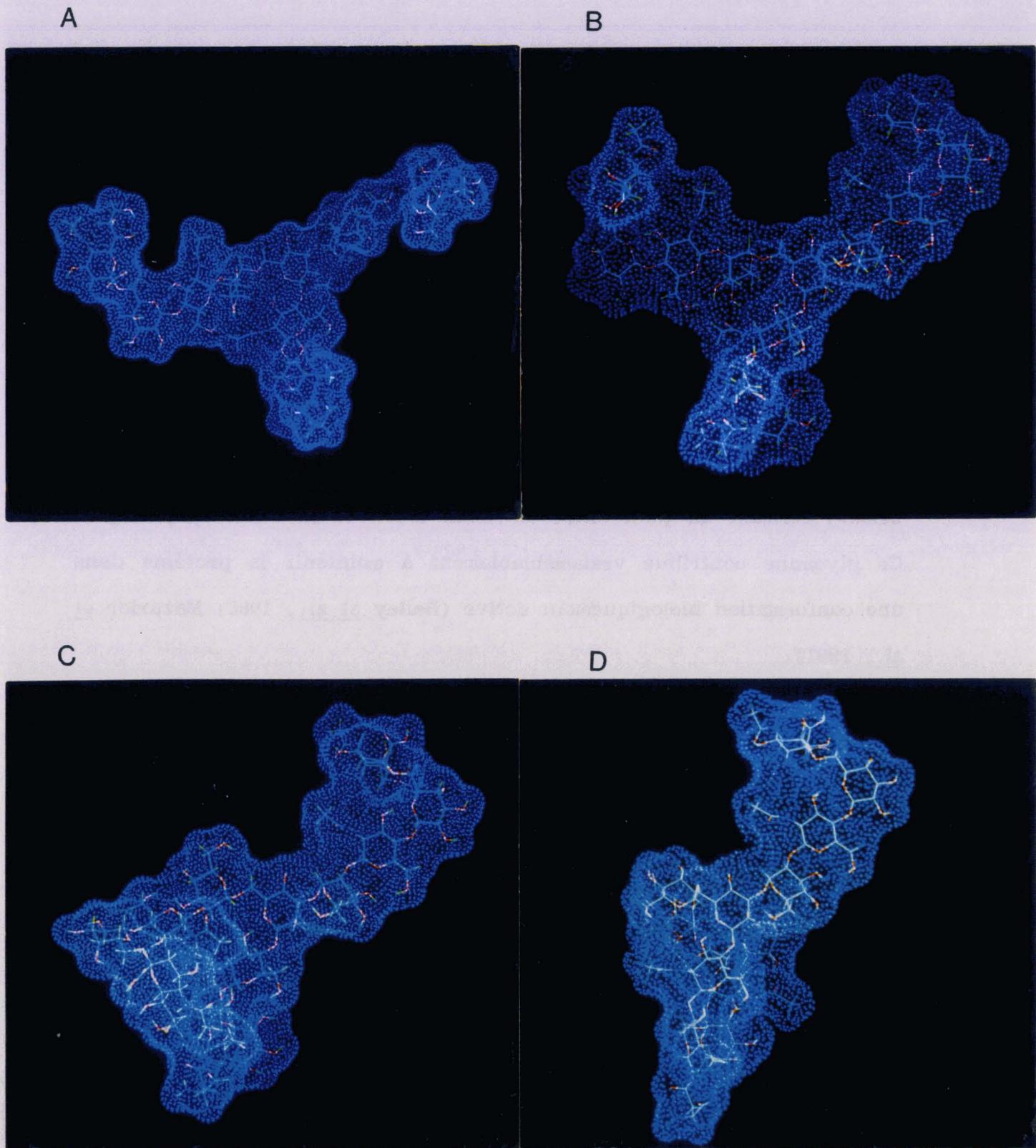


Figure 5 : Modélisation moléculaire d'un glycanne disialylé et monofucosylé de type N-acétyl lactosaminique (Mazurier et al., 1991).

A - conformation en "Y"

E - conformation en "aile brisée"

B - conformation en "T"

D - conformation en "aile retournée"

Ces conformations sont interconvertibles (Douy et al., 1980; Mazurier et al., 1991), la conformation en oiseau est énergétiquement la plus favorable.

Les glycanes de type tri- et tétraantenné peuvent adopter une conformation en parapluie (Montreuil, 1982, 1983).

Il a été démontré dans le cas de la sérotransferrine de Lapin que le glycanne pouvait interagir avec la protéine et posséder ainsi une structure figée en une seule conformation, la conformation en aile brisée, formant un pont entre les deux lobes de la chaîne peptidique. Ce glycanne contribue vraisemblablement à maintenir la protéine dans une conformation biologiquement active (Bailey et al., 1988; Mazurier et al., 1991).

III. CONCLUSION.

Les transferrines regroupent une famille de glycoprotéines capables de fixer réversiblement deux ions ferriques, dans l'organisme humain, ces transferrines sont représentées par la sérotransferrine et la lactotransferrine. La sérotransferrine est principalement localisée dans le plasma sanguin, la lactotransferrine est retrouvée la surface des muqueuses et dans les liquides biologiques.

La structure protéique de ces deux transferrines est très proche tant du point de vue de la séquence peptidique que du point de vue conformationnel. Les structures glucidiques de la sérotransferrine et de la lactotransferrine sont par contre différentes, la localisation et la nature des glycanes sont spécifiques de chaque transferrine. Enfin, l'affinité pour le fer de la lactotransferrine est plus élevée que celle de la sérotransferrine.

LES RECEPTEURS DES TRANSFERRINES

La sérotransferrine et la lactotransferrine sont les deux transferrines responsables du transport du fer dans l'organisme humain. La sérotransferrine constitue la protéine sérique responsable de l'acheminement du fer vers les tissus utilisateurs. La lactotransferrine intervient plus spécifiquement dans le cas de l'absorption intestinale du fer et dans les mécanismes de défense anti-infectieuse. Ces transferrines interagissent avec les cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

Récemment, il a été démontré que certains parasites et bactéries pouvaient capter le fer des transferrines de l'hôte qu'ils infectaient grâce à la présence de récepteurs spécifiques de ces protéines.

I. LES RECEPTEURS DES TRANSFERRINES DES VERTEBRES.

Nous avons vu précédemment que la sérotransferrine et la lactotransferrine étaient deux protéines possédant de nombreuses propriétés structurales en commun, les récepteurs spécifiques de ces transferrines sont par contre bien distincts. Le récepteur de la sérotransferrine est maintenant bien connu, les travaux concernant la structure, la fonction et la régulation du récepteur de la sérotransferrine ont fait l'objet de nombreuses revues générales (Newman et al., 1982; Goding, 1983; Seligman, 1983; Trowbridge et al., 1984; Bomford et Munro, 1985; Testa, 1985; Huebers et Finch., 1987, Ward, 1987; Neupert et al., 1991). Les travaux portant sur le récepteur de la lactotransferrine sont, par contre, beaucoup moins avancés.

A. LE RECEPTEUR DE LA SEROTRANSFERRINE.

1. Mise en évidence du récepteur membranaire de la sérotransferrine.

a. Les réticulocytes.

L'incorporation du fer par les réticulocytes a été mis en évidence par Walsh et al. dès 1949. Mais l'existence d'un récepteur spécifique sur la membrane du réticulocyte a été suggérée pour la première fois par Jandl et al. en 1958. Garret et al. (1973) ont montré que la sérotransferrine pouvait être extraite des membranes traitées aux détergents, liée à une autre macromolécule qu'ils ont identifiée comme étant le récepteur de la sérotransferrine. De nombreuses études concernant l'isolement et la caractérisation du récepteur de la sérotransferrine ont été menées par solubilisation des membranes de réticulocytes. Les premiers résultats obtenus étaient très hétérogènes, particulièrement en ce qui concerne la masse moléculaire du récepteur isolé, les extrêmes étant de 30 kDa (Light, 1977) et de 400 kDa (Leibman et Aisen, 1977).

b. Les hépatocytes.

Environ 10% du fer lié à la sérotransferrine est dirigé vers le foie pour être stocké dans la ferritine. Dans 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. (1977, 1979).

Cependant, Soda et Tavassoli (1984) et Tavassoli (1988) suggèrent que les hépatocytes ne possèdent pas de récepteurs de la sérotransferrine mais que ceux-ci sont situés sur la membrane des cellules endothéliales du foie.

Il faut signaler néanmoins qu'en 1983, Dautry-Varsat et al. ont mis en évidence le récepteur de la sérotransferrine sur une lignée cellulaire humaine provenant d'un hépatome, les cellules Hep G2.

c. Les cellules du placenta.

Durant la gestation, les besoins en fer du fœtus sont pourvus grâce à l'apport du fer lié à la sérotransferrine maternelle (Fletcher et Suter, 1969).

La présence de récepteurs spécifiques de la sérotransferrine a été mise en évidence sur les microvillosités du syncytium trophoblastique, tissu directement en contact avec le sang maternel (King, 1976; Wada et al., 1979, Galbraith et al., 1980a) et sur la membrane basale des cellules composant ce tissu : les syncytiotrophoblastes, en contact avec la circulation sanguine fœtale (Vanderpuye et al., 1986).

d. Les autres cellules.

Des récepteurs de la sérotransferrine ont été mis en évidence sur de nombreuses lignées cellulaires humaines (tableau III, p. 24). La majorité des cellules nucléées possèdent des récepteurs de la sérotransferrine (Newman et al., 1982), le nombre de récepteurs à la surface de la cellule est associé à la prolifération cellulaire (Octave et al., 1979; Larrick et Cresswell, 1979a; Sutherland et al., 1981).

Tableau III : Les paramètres de fixation de la sérotransferrine (STF) sur différentes lignées cellulaires.

Références	Cellules	Nombre de sites par cellule ($\times 10^3$)	K_d ($\times 10^{-9}$)
M)			
Larrick et Cresswell (1979b)	Lymphoblastoïdes T Lymphoblastoïdes B	60 30	10 10
Klausner et al. (1983)	K562 (érythro-leucémique)	150	2
Hamilton et al. (1979)	Choriocarcinomes	370	2,4
Ward et al. (1982)	HeLa	278	25
Dautry-Varsat et al. (1983)	HepG2 (hépatome)	60	7,1
Vandewalle et al. (1985)	MCF7 (carcinome du sein)	210	10

2. Structure du récepteur de la sérotransferrine.

Le récepteur de la sérotransferrine est une glycoprotéine d'une masse moléculaire de 180 kDa constituée de deux sous-unités identiques reliées entre elles par deux ponts disulfure. Chaque sous-unité peut fixer une molécule de sérotransferrine saturée en fer (Fig. 6, p. 26) (Wada et al., 1979; Enns et Sussman, 1981; Schneider et al., 1982).

Bien que de nombreux auteurs soient en faveur de l'universalité du récepteur de la sérotransferrine, des différences de glycosylation (Huebers et Finch, 1987; Do et al., 1990) et de réactivité antigénique (Panaccio et al., 1987; Cotner et al., 1989), entre des récepteurs provenant de différents tissus ou de différentes espèces, ont été mises en évidence.

a. La chaîne peptidique.

La séquence peptidique du récepteur de la sérotransferrine humaine a été déduite de la séquence de l'ARNm par Schneider et al. (1984) et de l'ADNc par Mac Clelland et al. (1984) et par Stearne et al. (1985). Chaque sous-unité polypeptidique est composée de 760 résidus d'acides aminés.

La région N-terminale de chaque sous-unité du récepteur de la sérotransferrine est intracellulaire, elle est composée de 61 résidus d'acides aminés dont un résidu (n°24) de sérine phosphorylé (Schneider et al., 1984, Davis et al., 1986b). Suit une région transmembranaire de 28 résidus d'acides aminés où une molécule d'acide palmitique est liée sur chaque sous-unité à un résidu de cystéine (n°62) (Omary et Trowbridge, 1981). La phosphorylation et l'acylation du récepteur de la sérotransferrine ont lieu lors de modifications post-traductionnelles et

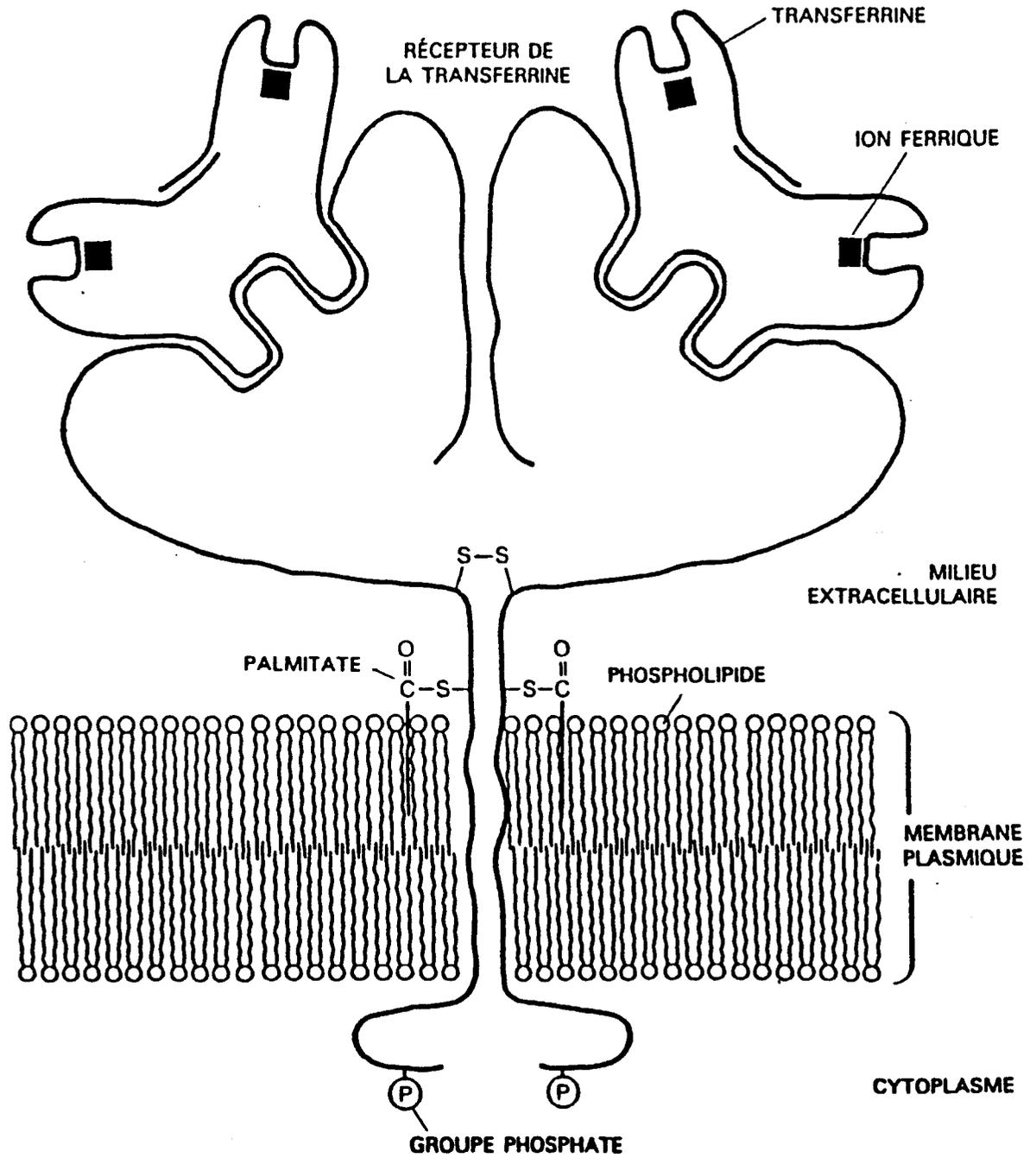


Figure 6 : Représentation schématique du récepteur de la sérotransferrine (Schneider et al., 1982).

pourraient être directement impliquées dans l'insertion et dans l'ancrage du récepteur au niveau de la membrane. La région C-terminale, de 671 résidus d'acides aminés, est extracellulaire et glycosylée (Omary et Trowbridge, 1981 ; Enns et Sussman, 1981; Schneider et al., 1982; Do et al., 1990; Do et Cummings, 1991). Les deux chaînes polypeptidiques du récepteur de la sérotransferrine sont reliées entre elles par l'intermédiaire de deux ponts disulfure au niveau des cystéines 89 et 98 de chaque sous-unité (Jing et Trowbridge, 1987).

La région extracellulaire du récepteur peut être, sous l'action de la trypsine, clivée en deux fragments de 70 kDa pouvant toujours fixer la sérotransferrine (Schneider et al., 1982; Turkewitz et al., 1988).

Les gènes codant pour le récepteur de la sérotransferrine et pour la sérotransferrine sont tous deux localisés au niveau du chromosome 3 (Enns et al., 1982; Goodfellow et al., 1982)

b. Structure glycanique.

Dès 1979, Seligman et al. démontrent la nature glycoprotéinique du récepteur de la sérotransferrine isolé du placenta humain. L'analyse de la fraction glucidique par chromatographie en phase gazeuse met en évidence la présence de 4 monosaccharides représentant 5% du poids total : mannose (1,7%), N-acétyl-glucosamine (1,3%), galactose (0,9%) et acide sialique (0,9%).

Les travaux d'Omary et Trowbridge (1981) et de Schneider et al. (1982) réalisés sur le récepteur de la sérotransferrine isolé à partir de lignées leucémiques humaines ont ensuite permis de préciser la nature N-glycosidique de ces glycannes. En effet, lorsque les cellules sont cultivées en présence de tunicamycine, un agent bloquant la N-glycosylation des protéines, la masse moléculaire du récepteur de la sérotransferrine diminue considérablement. Ces résultats seront plus

tard confirmés par Reckhow et Enns en 1988 sur la lignée A431 provenant d'un carcinome d'épiderme humain et par Ralton et al. en 1989 sur la lignée NS-1 de plasmocytes de Souris.

Omary et Trowbridge (1981) et Schneider et al. (1982) démontrent également la sensibilité du récepteur de la sérotransferrine à l'action de l'endoglycosidase H, enzyme responsable de la libération des glycannes de type oligomannosidique. La déglycosylation du récepteur de la sérotransferrine est totale lorsqu'elle est effectuée 10 min après sa synthèse, alors qu'elle n'est que partielle sur le récepteur mature. Ces résultats montrent que les glycannes portés par le récepteur immature de la sérotransferrine sont de type oligomannosidique, sur le récepteur mature, une partie de ces glycannes est convertie en glycannes de type complexe.

La détermination de la séquence primaire du récepteur de la sérotransferrine a permis de mettre en évidence la présence de trois sites potentiels de glycosylation localisés au niveau des résidus Asn 251, Asn 317 et Asn 727 (Mac Clelland et al., 1984; Schneider et al., 1984; Stearne et al., 1985). Les études réalisées sur les glycopeptides du récepteur de la sérotransferrine, isolé à partir de la lignée cellulaire NS-1 de plasmocytes de Souris, montrent que ces trois sites sont glycosylés. En effet, la séparation de ces glycopeptides par chromatographie liquide de haute pression donne trois fractions différentes correspondants aux glycopeptides spécifiques de chacun des sites. L'analyse de ces fractions par chromatographie d'affinité sur colonnes de lectines immobilisées montre que chaque site de glycosylation peut posséder un glycanne de type oligomannosidique ou un glycanne de type complexe. Les proportions relatives de glycannes de type oligomannosidique et de glycannes de type complexe sont cependant différentes pour les trois fractions : 3/1 pour la première fraction et 1/3 pour les deux autres fractions (Gleeson et Dias, 1990).

Récemment, les travaux de l'équipe de Cummings (Do et al., 1990; Do et Cummings, 1991) ont conduit à la mise en évidence de la présence de 1 ou 2 glycanes liés O-glycosidiquement sur le récepteur de la sérotransferrine isolé à partir de différentes lignées cellulaires humaines (A431, issue de carcinome d'épiderme; BeWo, issue de choriocarcinome et K562, issue de cellules leucémiques érythroïdes) ainsi que sur le récepteur isolé à partir de cellules d'ovaire de Hamster Chinois. La structure des glycanes liés N- et O-glycosidiquement au récepteur de la sérotransferrine des cellules K562 est représenté dans la figure 7, p. 30.

Le récepteur de la sérotransferrine synthétisé lorsque les cellules sont cultivées en présence de tunicamycine est dépourvu de N-glycanes. Ce récepteur isolé des cellules A431 n'est plus dimérique et ne peut plus fixer la sérotransferrine (Reckhow et Enns, 1988), par contre, ce récepteur isolé des cellules K562 et des cellules NS-1 est dimérique et fixe toujours la sérotransferrine Hunt et al., 1989a; Ralton et al., 1989). Hunt et al. (1989) précisent cependant que l'affinité du récepteur déglycosylé pour la sérotransferrine est plus faible. Des résultats récents obtenus par mutagenèse dirigée montrent que le glycanne ayant son point d'attache au niveau de l'Asn 727 est indispensable à la reconnaissance de la sérotransferrine (Enns et Williams, 1991).

3. Capture du fer par les cellules cibles.

a. L'endocytose.

La libération du fer de la sérotransferrine par un mécanisme

d'endocytose est basée sur les différences d'affinité de la sérotransferrine, à différent taux de saturation en fer, pour son récepteur aux pH neutre et acide. La sérotransferrine diferrique ($K_d = 10^{-8}$ M) ou monoferrique ($K_d = 5 \times 10^{-8}$ M) se fixe avec une forte affinité sur son récepteur à pH neutre, cette affinité est 20 fois plus faible pour l'aposérotransferrine. Inversement, aux pH acides c'est l'aposérotransferrine qui se fixe préférentiellement sur le récepteur (Wada et al., 1979; Young et al., 1984).

Au pH physiologique, la sérotransferrine lié à un ou deux ions ferriques se fixe sur son récepteur avec une forte affinité (Fig. 8, p. 33). Le complexe formé est concentré au niveau des "puits recouverts", la surface cytoplasmique de ces structures est recouverte par une protéine appelée clathrine. L'internalisation de ces structures donnera successivement les "vésicules recouvertes" puis les endosomes où le pH est voisin de 5,5. A ce pH, le fer quitte la sérotransferrine puis est transporté à travers la membrane de l'endosome vers le cytoplasme, ce mécanisme n'est pas encore élucidé et devrait nécessiter la réduction du fer ferrique en fer ferreux. Le fer libéré dans le cytoplasme se retrouve sous forme chélatée ou liée à des molécules de faibles masses moléculaires avant d'être incorporé à la ferritine (Borova et al., 1973 ; Egyed, 1983 ; Ciechanover et al., 1983; Dautry-Varsat, 1986; Bomford et al., 1986). Récemment, Cox et al. (1991) ont identifiés, dans les réticulocytes humains, une protéine de 5,6 kDa responsable du transport intracellulaire du fer initialement lié à la sérotransferrine. Par un mécanisme inconnu, l'aposérotransferrine couplée à son récepteur passe dans des vésicules d'exocytose et échappe ainsi à la dégradation lysosomale. Les vésicules d'exocytose fusionnent avec la membrane plasmique et le complexe est réexprimé à la surface. Le pH neutre permet la dissociation du complexe : l'aposérotransferrine libérée n'est

pas dégradée, elle peut de nouveau fixer deux atomes de fer ferrique et suivre un deuxième cycle (Dautry-Varsat et al., 1983; Klausner et al., 1984).

La région cytoplasmique du récepteur de la sérotransferrine joue un rôle important dans l'endocytose. La délétion des acides aminés 6-41 de la région cytoplasmique du récepteur de la sérotransferrine conduit à l'abolition de l'internalisation de ce récepteur (Rothenberger et al., 1987; Iacopetta et al., 1988). Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de montrer que la tyrosine 20 (Jing et al., 1990, McGraw et Maxfield, 1990) et les résidus Phe 13 et Phe 23 (McGraw et al., 1991) sont principalement impliqués. Collawn et al. (1990) définissent la séquence YTRF en position 20-23 comme un signal spécifique d'endocytose.

D'après certains auteurs, la phosphorylation (Tanner et Lienhard, 1987; Davis et Meisner, 1987; McGraw et al., 1988) et l'acylation (Jing et Trowbridge, 1990) du récepteur de la sérotransferrine ne sont pas nécessaires à l'endocytose. Cependant, l'hyperphosphorylation du récepteur de la sérotransferrine, induite par les esters de phorbol, entraîne une rapide internalisation de ce récepteur (May et al., 1984, 1985; May et Tyler, 1987; Klausner et al., 1984) alors que l'hyperacylation du récepteur de la sérotransferrine, induite par l'insuline, provoque une diminution de l'endocytose de ce récepteur (Alvarez et al., 1990)

b. Réactions d'oxydo-réduction.

Un deuxième mécanisme du passage du fer vers le milieu intracellulaire a été proposé : récemment, il a été démontré que le

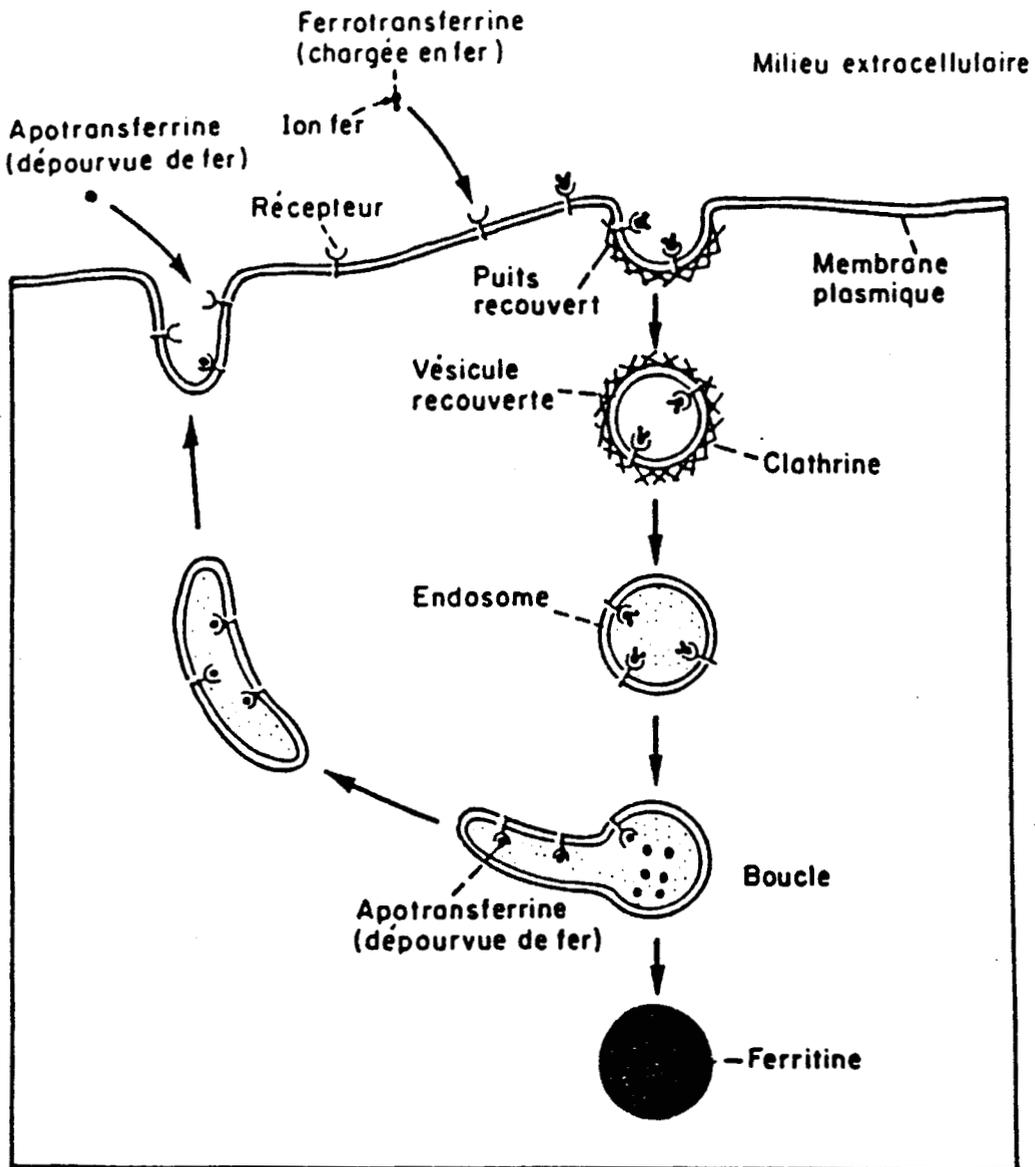


Figure 8 : Endocytose de la sérotransferrine et recyclage de son récepteur (Dautry-Varsat et Lodish, 1984).

récepteur de la sérotransferrine, présent à la surface des hépatocytes de Rat ou des cellules HeLa, était associé à une activité NADH-oxydoréductase. La fixation de la sérotransferrine saturée en fer sur son récepteur stimule l'activité NADH-oxydoréductase et provoque la conversion cellulaire du NADH en NAD^+ . Ce phénomène est accompagné par une activation de la pompe Na^+/H^+ et par un efflux de protons vers le milieu extracellulaire. La liaison du fer avec la sérotransferrine est alors destabilisée et le fer est réduit. Le fer ferreux est transporté à travers la membrane plasmique probablement par l'intermédiaire d'un canal spécifique. Il serait ensuite pris en charge par des accepteurs cytosoliques (Fig. 9, p. 35) (Sün et al., 1987a, 1987b; Thorstensen et Romslo, 1990).

4. Régulation de l'expression du récepteur de la sérotransferrine.

L'expression du récepteur de la sérotransferrine est en relation directe avec les besoins en fer de la cellule. Ainsi, elle peut être influencée par :

a. Le cycle cellulaire.

Il est bien connu que les cellules en mitose exigent un apport de fer supérieur à celui des cellules au repos. L'un des arguments avancé pour expliquer ces besoins accrus est que le fer est un co-facteur de la ribonucléotide réductase et qu'il est donc indispensable à la synthèse des ADNs. Les membranes des cellules au repos renferment peu de récepteurs de la sérotransferrine; ceux-ci apparaissent en abondance dès que les cellules se multiplient et lors de

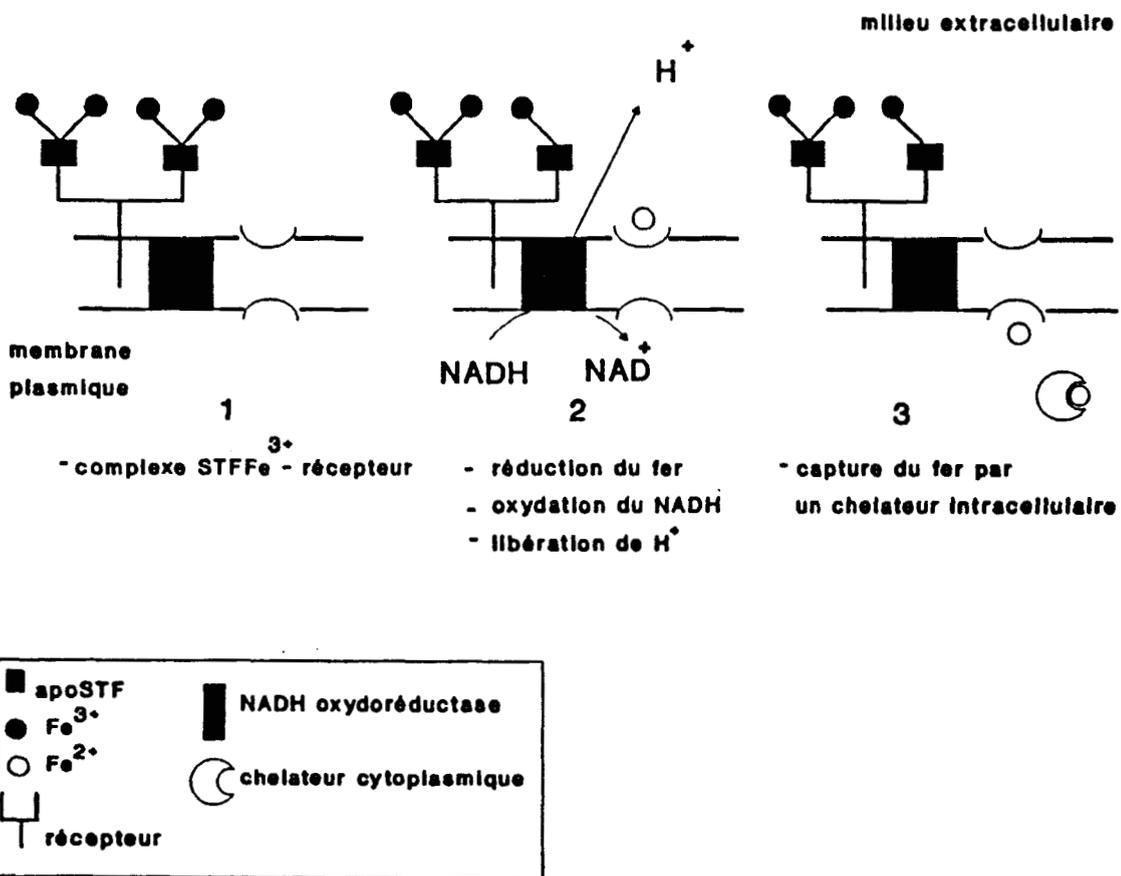


Figure 9 : Schéma de la libération du fer de la sérotransferrine par un mécanisme d'oxydoréduction et de sa capture par les cellules (Thorstensen, 1988; Thorstensen et Romslo, 1988).

leur passage de la phase G1 à la phase S (Larrick et Cresswell, 1979a; Sutherland et al., 1981; Trowbridge et Omary, 1981).

b. L'état de différenciation cellulaire.

Les cellules précurseurs des érythrocytes sont largement impliquées dans la synthèse de l'hémoglobine, elles présentent à leur surface un nombre élevé de récepteurs pour la sérotransferrine. Ce nombre va décroître graduellement au cours de la maturation des cellules en fonction de la synthèse de l'hémoglobine. Les hématies représentant le stade final de cette maturation sont dépourvues de ce récepteur (Kailis et Morgan, 1974). De même, le nombre de récepteurs de la sérotransferrine diminue brutalement après différenciation des cellules myéloïdes leucémiques HL-60 en granulocytes ou en monocytes (Taetle et al., 1987).

Les lymphocytes quiescents ne possèdent pas ou très peu de récepteurs pour la sérotransferrine, celui-ci apparaît en nombre important après transformation blastique de ces cellules et peut servir de marqueur d'activation (Larrick et Cresswell, 1979a).

c. Le taux de fer intracellulaire.

Les cellules cultivées en présence de sels de fer ou de sérotransferrine saturée en fer possèdent peu de récepteurs pour la sérotransferrine. L'addition de chélateur de fer dans le milieu provoque une augmentation du nombre d'ARNm codant pour ce récepteur et donc l'activation de sa synthèse (Mattia et al., 1984; Müllner et Kühn, 1988, 1989). C'est le taux de fer intracellulaire et non la concentration en fer du milieu extracellulaire qui régule l'expression du récepteur de la

sérotransferrine (Pelicci et al., 1982; Ward et al., 1982; Mattia et al., 1984; Rao et al., 1985). L'expression de la ferritine, protéine responsable du stockage du fer dans la cellule, est également régulée par le taux de fer intracellulaire (Zahringer et al., 1976; Schaefer et Theil, 1981; Shull et Theil, 1982, 1983). Lorsque le fer est en excès, la synthèse de la ferritine et par conséquent le stockage du fer augmentent alors que la synthèse du récepteur de la sérotransferrine et la capture du fer diminuent (Zahringer et al., 1976; Rao et al., 1985; Theil, 1990).

La régulation de la synthèse de ces protéines est permise grâce à la présence de séquences spécifiques localisées dans la région 5' non codante de l'ARNm de la ferritine et dans la région 3' non codante de l'ARNm du récepteur de la sérotransferrine. Une séquence de régulation présente dans l'ARNm de la ferritine est retrouvée répétée 5 fois dans l'ARNm du récepteur de la sérotransferrine. Chaque ARNm possède en plus des séquences de régulation spécifiques non partagées (Fig. 10, p. 38) (Hentze et al., 1987; Casey et al., 1988; Müllner et Kühn, 1988; Müllner et al., 1989; Theil, 1990).

Les éléments de séquences responsables de la régulation par le fer de l'expression du récepteur de la sérotransferrine et de la ferritine interagissent avec une protéine cytosolique appelée IRE-BP ("iron-regulated RNA binding protein") (Leibold et Munro, 1988; Rouault et al., 1988; Koeller et al., 1989). La conformation en "stem loop" du ARNm au niveau des séquences de régulation est nécessaire à l'interaction de ces éléments de séquence avec IRE-BP (Barton et al., 1990). La fixation de IRE-BP sur l'ARNm de la ferritine conduit à une inhibition de la traduction de celui-ci alors que la fixation de IRE-BP sur l'ARNm du récepteur de la sérotransferrine stabilise ce dernier. La localisation d'une séquence commune de régulation dans des régions

ARNm du récepteur de la STF

ARNm de la ferritine

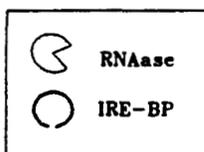
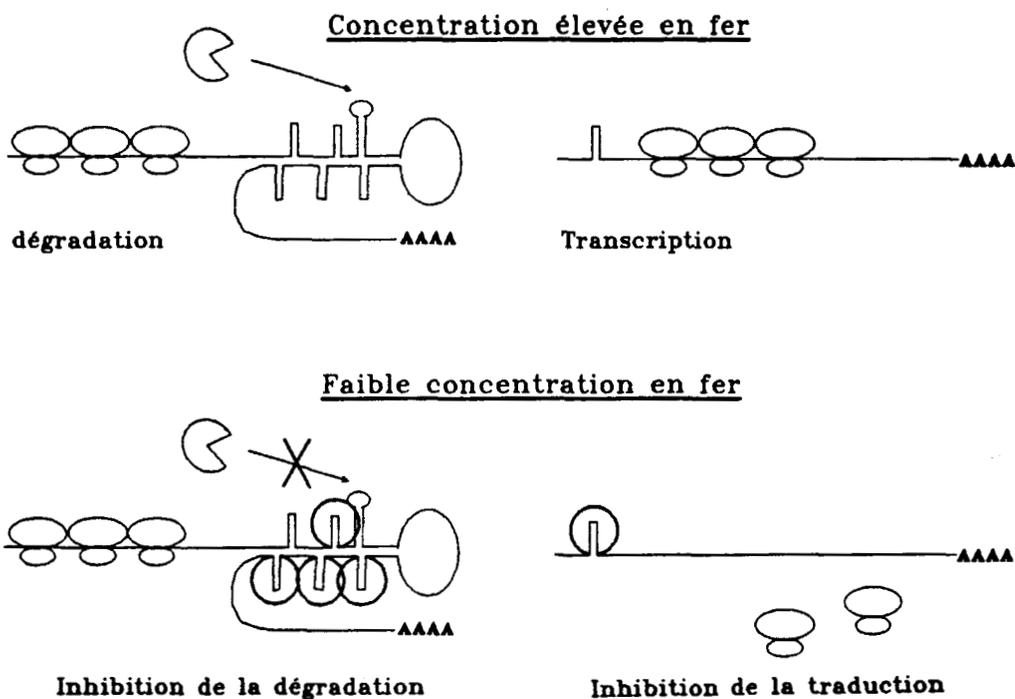


Figure 10 : Régulation des ARN messagers de la ferritine et du récepteur de la sérotransferrine par le taux de fer intracellulaire (Müllner et al., 1989).

différentes des ARNm de la ferritine et du récepteur de la sérotransferrine pourrait être responsable des effets différents observés sur ces deux ARNm. Récemment IRE-BP a été isolée du foie de Lapin (Walden et al., 1989), du foie humain (Rouault et al., 1989) et du placenta humain (Neupert et al., 1991). IRE-BP est une protéine fer-soufre d'environ 100 kDa, possédant un degré d'homologie structurale de 53-56% avec les aconitases (enzymes mitochondriales impliquées dans le cycle de Krebs) isolées du coeur de Porc ou de Saccharomyces cerevisiae. L'affinité de IRE-BP pour les séquences de régulation des ARNm est modulée par le taux de fer lié à la protéine : forte affinité pour la forme (3Fe-4S) et faible affinité pour la forme (4Fe-4S) (Rouault et al., 1991). Au cours de l'évolution, cette protéine est très conservée, elle est retrouvée chez tous les vertébrés et chez quelques insectes et vers annelides (Rothenberger et al., 1990).

d. L'interleukine-1 et le facteur de nécrose tumorale α .

L'interleukine-1 et le facteur de nécrose tumorale TNF- α induisent la synthèse du récepteur de la sérotransferrine et de la ferritine H, ces cytokines sont sans effets sur la ferritine L. Les cinétiques observées sont différentes pour ces deux protéines. La synthèse de la ferritine H atteint un maximum 8 h après le traitement des cellules (fibroblastes humains MRC5) par l'interleukine-1 ou par le TNF- α , suivie par une rapide diminution de la synthèse des ferritines L et H. Alors que la synthèse de la ferritine diminue, celle du récepteur de la sérotransferrine augmente, atteignant un maximum au bout de 24 h (Tsuji et al., 1991). C'est probablement la diminution du fer intracellulaire due à sa capture par la ferritine qui est responsable de l'induction de la synthèse du récepteur de la sérotransferrine.

e. Autres facteurs.

Généralement, les modifications du nombre de récepteurs de la sérotransferrine à la surface cellulaire sont en corrélation directe avec la synthèse du récepteur de la sérotransferrine et le taux d'ARNm codant pour ce récepteur (Taetle et al., 1987 ; Müllner et Kühn, 1988). Cependant, l'expression du récepteur de la sérotransferrine à la surface cellulaire peut être aussi régulée par des mécanismes indépendants de sa biosynthèse tels que la modification de la répartition du récepteur de la sérotransferrine entre la surface cellulaire et le pool intra-cellulaire ou la libération du récepteur dans le milieu extra-cellulaire.

α - Modification de la répartition du récepteur de la sérotransferrine entre la surface cellulaire et le pool intra-cellulaire.

L'incubation de cellules avec l'insuline, l'IGF (insulin like growth factor), le PDGF (platelet derived growth factor) ou l'EGF (epidermal growth factor), conduit à une augmentation à la surface cellulaire du récepteur de la sérotransferrine (Wiley et Kaplan, 1984; Davis et al., 1986a, 1987; Tanner et Lienhard, 1987). L'hyperacylation du récepteur de la sérotransferrine par l'insuline pourrait être responsable du maintien de ce récepteur à la surface cellulaire, en effet, il a récemment été démontré que l'endocytose du récepteur de la sérotransferrine était beaucoup plus rapide lorsque celui-ci était dépourvu d'acide palmitique (Alvarez et al., 1990). Dans le cas des cellules cultivées en absence de sérotransferrine, une redistribution très rapide du récepteur de la sérotransferrine à la surface cellulaire est observée après addition de cette protéine dans le milieu de culture (Girones et Davis, 1989).

D'autres signaux comme des esters de phorbol ou l'interferon- α entraînent une rapide internalisation du récepteur de la sérotransferrine (May et al., 1984, 1985; Klausner et al., 1984; Besançon et al., 1985). L'action des esters de phorbol est associée à la phosphorylation du récepteur par la protéine kinase C (May et al., 1985). L'activation de cette enzyme a lieu lors de la fixation de la sérotransferrine sur son récepteur ou par l'action des esters de phorbol eux mêmes (Phillips et al., 1987). Le diacylglycérol, un co-stimulant endogène de la protéine kinase C, ou la phospholipase C peuvent reproduire les effets des esters de phorbol (Neckers, 1991). Une régulation du récepteur de la sérotransferrine lié à la phosphorylation de ce récepteur a également été démontrée pour les lymphocytes activés par un agent mitogène et non traités par des esters de phorbol (Taketani et al., 1985).

Les modifications de la répartition du nombre de récepteurs de la sérotransferrine entre le pool intra-cellulaire et le pool membranaire sont calcium dépendantes (Ward et Kaplan, 1986; Neckers, 1991).

β - Libération du récepteur de la sérotransferrine dans le milieu extra-cellulaire.

Par comparaison avec le récepteur exprimé à la surface cellulaire, le récepteur libéré dans le milieu extra-cellulaire est appelé récepteur soluble.

Au cours de la maturation des réticulocytes, le récepteur de la sérotransferrine est libéré de la surface cellulaire, sous une forme non dégradée, dans des vésicules extra-cellulaires ou exosomes (Pan et Johnston, 1983, 1984). Par contre, le récepteur de la sérotransferrine présent à la surface des cellules HL60 est libéré dans le milieu de

culture de ces cellules par coupure protéolytique sous l'action de protéases membranaires (Chitambar et Zivkovic, 1989).

La formation de récepteur soluble est en corrélation étroite avec la densité de ce récepteur à la surface cellulaire et avec le taux de fer intra-cellulaire (Chitambar et Zivkovic, 1990). Ainsi, l'externalisation du récepteur de la sérotransferrine, présent à la surface des réticulocytes, peut être régulée par la concentration en hème (Ahn et Johnston, 1989).

5. Le récepteur soluble de la sérotransferrine.

De récents travaux ont conduit à la mise en évidence de la présence du récepteur de la sérotransferrine dans le sérum humain, de Mouton et de Rat, ainsi que dans les milieux de culture des lignées leucémique humaine HL-60 et K562.

Le récepteur de la sérotransferrine a été identifié sous une forme non dégradée dans le sérum de Mouton et de Rat (Pan et Johnstone, 1984 ; Beghin et al., 1988). Dans le sérum humain, les résultats sont controversés : Huebers et al. (1990) retrouvent le récepteur de la sérotransferrine non dégradé alors que Kohgo et al. (1988) le mettent en évidence sous une forme dimérique de 110 kDa et que Shih et al. (1990) l'identifient à un récepteur monomérique de 85 kDa. La région tronquée du récepteur correspondant aux domaines cytoplasmique et transmembranaire (Shih et al., 1990). En ce qui concerne le récepteur soluble de la sérotransferrine des cellules HL-60 en culture, il est libéré dans le milieu de culture par l'action de protéases membranaires sous une forme dimérique de 158 kDa (Chitambar et Zivkovic, 1989). Le récepteur de la sérotransferrine des cellules erythroleucémiques K562 en culture est retrouvé sous un forme

non dégradée dans le milieu de culture (Baynes et al., 1991). Dans tous les cas, le récepteur soluble peut toujours fixer la sérotransferrine saturée en fer.

Plusieurs auteurs ont déterminé la concentration plasmatique du récepteur de la sérotransferrine, dans des conditions normales et pathologiques (Kohgo et al., 1987, 1988 ; Flowers et al., 1989 ; Huebers et al., 1990) ; Klemow et al., 1990). Suivant les techniques utilisées les valeurs sont très hétérogènes (8.3 $\mu\text{g/l}$ à 5.5 mg/l). Par contre, les variations du taux de récepteurs solubles dans différents cas pathologiques sont remarquablement similaires : par exemple, dans le cas d'individus atteints de déficience en fer, d'anémie hémolytique, de thalassémie ou de leucémie lymphocytaire chronique, le taux de récepteurs plasmatiques de la sérotransferrine augmente alors qu'il diminue chez les sujets atteints d'anémie aplasique.

Le taux de récepteurs solubles, deux fois plus faible chez les patients atteints d'anémie aplasique ainsi que l'élévation du taux de récepteurs solubles après transplantation de moelle osseuse montrent qu'une proportion significative de ce récepteur provient des cellules de la moelle osseuse, probablement des cellules érythroïdes en développement, celles-ci possédant un très grand nombre de récepteurs de la sérotransferrine à leur surface.

Une relation étroite existe donc entre le récepteur membranaire et le récepteur soluble. Le dosage plasmatique du récepteur de la sérotransferrine pourrait, d'un point de vue clinique, donner des indices intéressants pour la surveillance de l'érythropoïèse (Flowers et al., 1989 ; Huebers et al., 1990) ; Klemow et al., 1990).

B. LES RECEPTEURS DE LA LACTOTRANSFERRINE.

Les travaux portant sur le récepteur de la lactotransferrine sont beaucoup moins avancés. Une interaction spécifique de la lactotransferrine a été mise en évidence à la surface d'un nombre limité de cellules telles que les entérocytes, les cellules du foie, les cellules de glande mammaire et les cellules du système immunitaire.

1. Le récepteur entérocytaire de la lactotransferrine.

La présence d'un récepteur entérocytaire spécifique de la lactotransferrine a tout d'abord été suggérée par Cox et al. (1979). Ces auteurs ont démontré in vitro, que la lactotransferrine était capable de céder son fer à des biopsies intestinales humaines. Par la suite, des études réalisées sur des vésicules membranaires de la bordure en brosse de l'intestin de Lapin (Mazurier et al., 1985), de Souris (Hu et al., 1988) et de Singe (Davidson et Lönnerdal, 1988) ont montré que la lactotransferrine se fixait sur la bordure en brosse de ces cellules intestinales. La fixation de la lactotransferrine a également été étudiée sur une lignée entérocytaire (HT29, HT29-D4) dérivée d'un adénocarcinome humain colique (Roiron et al., 1989; Derisbourg, 1990). La lactotransferrine se fixe spécifiquement sur les cellules HT29 différenciées en entérocytes.

Les constantes de fixation de la lactotransferrine sur ces différentes cellules sont décrites dans le tableau IV p. 45.

Les récepteurs entérocytaires de Souris et de Singe reconnaissent les lactotransferrines isolées du lait de différentes espèces (Hu et al., 1988; Davidson et Lönnerdal, 1988). La fixation de la lactotransferrine sur son récepteur ne dépend pas de son degré de

Tableau IV : Caractérisation du récepteur de la lactotransferrine (LTF) sur les entérocytes.

(1) Mazurier et al., 1985; (2) Hu et al., 1988; (3) Hu et al., 1990; (4) Davidson et Lönnerdal, 1988; (5) Derisbourg, 1990; (6) Roiron-Lagroux et al., 1989.

Réf.	Type cellulaire	Ligand	K_d (10^{-9} M)	Nombre de sites	Masse moléculaire du récepteur (kDa)
1	Entérocytes de Lapin	LTF humaine	830	$0,15 \times 10^{14}$ par mg de protéines membranaires	100
2,3	Entérocytes de Souris	LTF murine	280	$5,3 \times 10^{14}$	
		LTF humaine	380	$5,3 \times 10^{14}$	130
		LTF bovine	380	$5,3 \times 10^{14}$ par mg de protéines membranaires	
4	Entérocytes de Singe	LTF simmienne	9000	ND	ND
		LTF humaine	9000	ND	ND
	Lignées cellulaires				
5	HT29	LTF humaine	40	$0,29 \times 10^5$	ND
6	HT29D4	LTF humaine	400	40×10^5 par cellule	ND

ND : non déterminé.

saturation en fer (Hu et al., 1988; Davidson et Lönnerdal, 1989). Elle est dépendante du pH, le pH optimum étant de 5.5 pour le récepteur entérocytaire de Souris (Hu et al., 1988). Le récepteur entérocytaire a été caractérisé comme étant une protéine dont la masse moléculaire apparente varie entre 100 et 130 kDa suivant l'espèce étudiée (tableau p). Le récepteur entérocytaire est glycosylé, les glycanes sont liés N-glycosidiquement (Hu et al., 1990).

2. Interaction de la lactotransferrine avec les cellules du foie.

Tous les auteurs s'accordent à reconnaître que la lactotransferrine est avidement captée par le foie. En effet, 80 à 90% de la lactotransferrine marquée à l'iode ^{125}I , injectée par voie intraveineuse à des souris ou à des lapins, est retrouvée dans le foie (Prieels et al., 1978; Bennett et Kokocinski, 1979). S'il est maintenant bien établi que la lactotransferrine est éliminée de la circulation sanguine par le foie, la nature du récepteur et le type de cellule responsable de la capture de cette protéine ont fait l'objet de nombreuses controverses.

La capture de la lactotransferrine plasmatique a tout d'abord été attribuée à un récepteur lectinique, spécifique du fucose, localisé dans l'hépatocyte (Prieels et al., 1978; Pizzo et al., 1981). Cette hypothèse peut cependant être mise en doute. En effet, la détermination de la structure glucidique de la lactotransferrine leucocytaire, réalisée au Laboratoire, montre que celle-ci est dépourvue de fucose (Derisbourg et al., 1990).

La présence de résidu galactose terminal au niveau de la structure glucidique de la lactotransferrine a conduit certains auteurs à

suggérer que la clearance de cette protéine s'effectuait par l'intermédiaire du récepteur des asialoglycoprotéines (Pricer et Ashwell, 1971). Cependant, Imber et Pizzo (1983) écartent également cette hypothèse, l'asialo-orosomucoïde spécifique de ce récepteur n'inhibant pas la clearance de cette protéine.

Les travaux de Debanne et al. (1985) mettent en évidence une fixation spécifique de la lactotransferrine sur les membranes d'hépatocytes de Rat, mais ces auteurs démontrent que cette fixation est de type électrostatique et ne fait pas intervenir de récepteurs spécifiques.

L'injection de sulfate de dextran inhibe la capture hépatique de la lactotransferrine (Moguilevsky, 1987). Le sulfate de dextran est un agent bloquant du système réticulo-endothélial, ce qui tend à prouver que la lactotransferrine est éliminée de la circulation sanguine par les cellules de Küpffer et non par les hépatocytes.

3. Interaction de la lactotransferrine avec les monocytes/macrophages.

La capacité de fixation de la lactotransferrine sur les macrophages et monocytes décrite par de nombreux auteurs (Bennett et Davis, 1981 ; Birgens et al., 1983, 1984 ; Goavec et al., 1985 ; Bartal et al., 1987 ; Oria et al., 1988) est maintenant bien établie. Par contre, la nature de cette interaction et sa signification biologique sont beaucoup moins claires.

Des études réalisées sur des macrophages péritonéaux de Souris (van Snick et al., 1977) ou sur des monocytes humains (Birgens et al., 1988) avaient démontré que la lactotransferrine était capable de céder

son fer à la ferritine intracellulaire, suggérant la présence de récepteurs spécifiques pour cette protéine.

L'analyse de la fixation de la lactotransferrine sur les monocytes et sur les macrophages selon la méthode de Scatchard (1949) par différents auteurs montrent des constantes de fixation très variables (Tableau V, p. 49). A ce jour, le récepteur de la lactotransferrine n'a pas encore été isolé et aucun facteur pouvant réguler son expression n'a été décrit. Suivant les auteurs, l'interaction de la lactotransferrine sur les monocytes et sur les macrophages :

- est inhibée de façon compétitive par l'élastase (Moguilevsky et al., 1985a),
- met en jeu l'ADN présent à la surface des monocytes (Bennett et al., 1983 ; Moguilevsky, 1987)
- se fait par l'intermédiaire des lipopolysaccharides bactériens se fixant à la surface des macrophages (Miyazawa et al., 1991),
- ou est dépendante de la partie glycanique de la lactotransferrine (Goavec et al., 1985, Leclercq, 1987).

L'ensemble de ces données nous porte à croire que la fixation de la lactotransferrine sur les monocytes et macrophages est due soit à une interaction de type électrostatique, la lactotransferrine étant une protéine très basique, soit à la présence d'un récepteur lectinique plutôt qu'à la présence d'un récepteur spécifique de la partie protéique de la lactotransferrine.

4. Interaction de la lactotransferrine avec les neutrophiles.

Les leucocytes polynucléaires synthétisent la lactotransferrine à un stade primaire de leur maturation (Baggiolini et al., 1970; Rado et

Tableau V : Paramètres de fixation de la lactotransferrine sur les macrophages et les monocytes.

Références	Type cellulaire	K_d ($\times 10^{-9}$ M)	Sites/cellule ($\times 10^6$)
Markowitz <u>et al.</u> 1979	Macrophages alvéolaires murins	ND	2
van Snick et et Masson 1976	Macrophages péritonéaux murins	1500	22
Imber et Pizzo 1983	Macrophages péritonéaux murins	28	ND
Campbell 1982	Macrophages alvéolaires humains	1700	54
Goavec <u>et al.</u> 1985	Macrophages alvéolaires humains	500	12
Bennett et Davis 1981	Monocytes sanguins humains	1800	33
Birgens <u>et al.</u> 1983	Monocytes sanguins humains	4,5	1,6
Moguilevski <u>et al.</u> , 1985	Monocytes sanguins humains	430	10

ND : non déterminé

al., 1984). L'activation des leucocytes provoque la libération dans le milieu extracellulaire de la lactotransferrine contenue dans les granules secondaires. La lactotransferrine ainsi libérée pourrait venir se fixer à la surface des leucocytes. En effet, la démonstration d'une fixation spécifique de la lactotransferrine isolée du lait de Femme à la surface des leucocytes humains (Tableau VI, p. 51) a conduit à l'hypothèse que ces cellules posséderaient également un récepteur pour la lactotransferrine (Maneva et al., 1983; Birgens et al., 1984). Cependant, Bennett et Davis (1981) décrivent une fixation importante de la lactotransferrine à la surface des neutrophiles mais la qualifient de non spécifique.

5. Le récepteur de la lactotransferrine des cellules de glande mammaire.

Au Laboratoire, Rochard (1991) s'est intéressée à la fixation de la lactotransferrine humaine sur différentes lignées cellulaires humaines de glandes mammaires. Cette étude réalisée par cytofluorimétrie de flux ou par la méthode de Scatchard (1949) met en évidence une fixation spécifique de la lactotransferrine sur des cellules cancéreuses, de mastoses et de tissus sains de glande mammaire humaine. Les paramètres de fixation obtenus selon la technique de Scatchard (1949) sont décrits dans le tableau VII, p. 51. La lignée T47-D a été plus particulièrement étudiée, il s'agit d'une lignée cellulaire établie à partir d'une effusion pleurale de patient atteint de cancer du sein (Keydar et al., 1979). Récemment le récepteur de la lactotransferrine a été caractérisé à partir de cette lignée comme étant une protéine d'environ 126 kDa.

Tableau VI : Paramètres de fixation de la lactotransferrine sur les neutrophiles.

Références	K_d (10^{-9} M)	Sites/cellule ($\times 10^6$)
Maneva <u>et al.</u> , 1983	sites de fixation à haute affinité	
	0,44	0,04
	sites de fixation à faible affinité	
	160	0,08
Birgens <u>et al.</u> , 1984	200	4,60

Tableau VII : Paramètres de fixation de la lactotransferrine sur différentes lignées cellulaires humaines de glande mammaire (Rochard, 1991).

Cellules	K_d (10^{-9} M)	Sites/cellule ($\times 10^6$)
Cellules cancéreuses :	T47D	120
	MCF7	190
	HH9	340
	BT20	160
	VHB1	288
	MDAMB-231	960
Cellules de mastose :	NPM14T	288
	NPM21T	350
Cellules de tissus sains :	HBL100	216

6. Le récepteur lymphocytaire de la lactotransferrine.

La présence de récepteurs spécifiques de la lactotransferrine a été suggérée pour la première fois à la surface des lymphocytes péritonéaux de Souris par van Snick et Masson en 1976 et à la surface des lymphocytes humains en 1981 par Bennett et Davis. Ces auteurs précisent la localisation du récepteur de la lactotransferrine à la surface des lymphocytes B.

Buttler et al., (1990), par des expériences de cytofluorimétrie, mettent en évidence la présence de lactotransferrine à la surface des lymphocytes B isolés des amygdales ou du sang de sujets sains. Cette expérience a été réalisée sur des lymphocytes B issus de différents types de leucémie, chacune étant représentative d'un stade de maturation cellulaire. Les résultats obtenus suggèrent que la présence de lactotransferrine pourrait augmenter à certains stades de maturation cellulaire. Les cellules pré-B, représentatives d'un stade précoce de différenciation, n'expriment pas de lactotransferrine à leur surface; les lymphocytes B immatures, représentatifs d'un stade plus tardif, possèdent un taux élevé de lactotransferrine à leur surface. Ce taux diminue lors de la maturation de ces cellules en plasmocytes. Sato et al. (1990) observent, par microscopie électronique, que la lactotransferrine est internalisée par les lymphocytes B circulants puis excrétée dans le milieu extracellulaire.

L'étude comparative de la fixation de la lactotransferrine à la surface des cellules circulantes de sujets sains et de sujets leucémiques conduit, par contre, à la mise en évidence de ce récepteur à la surface des lymphocytes B et T et à une fixation beaucoup plus importante de la lactotransferrine à la surface des lymphoblastes et myéloblastes (Birgens et al., 1984).

Les travaux de Gnezditskaya et al. (1984) montrent que le thymus humain possède une sous-population de lymphocytes capables de fixer la lactotransferrine grâce à la présence de récepteurs spécifiques. L'expression de ces récepteurs dépend de la concentration intracellulaire en AMP cyclique. Récemment, il a été démontré que la lactotransferrine participait à la différenciation et à la régulation du nombre de lymphocytes $T\mu$ et $T\tau$ (possédant à leur surface des récepteurs IgM et IgG) dans le thymus (Gnezditskaya et al., 1987).

Enfin, Yamada et al. (1987) montrent que les cellules leucémiques K562 en culture possèdent également des récepteurs de la lactotransferrine à leur surface. L'expression de ces récepteurs, contrairement aux récepteurs de la sérotransferrine, n'est pas régulée par le taux de fer intracellulaire mais semble être dépendante de la prolifération cellulaire.

L'utilisation d'agents mitogènes, comme la phytohémagglutinine ou l'anticorps anti-CD3, permet de mimer l'activation des lymphocytes lors d'une infection et de transformer ainsi les lymphocytes quiescents en lymphoblastes. Les travaux entrepris au Laboratoire ont conduit à l'observation que la phytohémagglutinine induisait l'apparition de récepteurs de la lactotransferrine à la surface des lymphocytes circulants humains. Les lymphocytes quiescents ne possèdent pas de récepteurs pour la lactotransferrine, celui-ci est synthétisé au cours des deux premiers jours d'activation (Mazurier et al., 1989). 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 électrotransfert du lysat lymphocytaire et reconnaissance par la lactotransferrine marquée à l'iode ^{125}I puis purifié par chromatographie d'affinité; il se présente sous forme de deux bandes protéiques de 100 et 110 kDa.

Le site de fixation de la lactotransferrine sur son récepteur a été localisé dans le lobe N-terminal et plus précisément entre les résidus d'acides aminés 4-52. Cette région, l'une des plus basiques de la lactotransferrine, est composée de trois régions accessibles dans l'espace comprenant les résidus 4-6 , 14-27 et 28-34 (Rochard et al., 1989; Legrand et al., 1991).

Les constantes de fixation de la lactotransferrine sur les lymphocytes, déterminées par les différents auteurs cités précédemment, sont décrits dans le tableau VIII, p. 55.

II. LES RECEPTEURS DES TRANSFERRINES DES BACTERIES ET DES PARASITES.

Le fer est un élément essentiel au développement des bactéries et des parasites. Au sein du corps humain, ces organismes se retrouvent confrontés à un environnement où le taux de fer libre est très faible, celui-ci étant séquestré par la sérotransferrine dans le sang et par la lactotransferrine au niveau des muqueuses. La plupart des bactéries pathogènes synthétisent et sécrètent des sidérophores, molécules fixant le fer avec une très haute affinité, afin de capter le fer du milieu extérieur. Récemment, il a été démontré chez certaines souches bactériennes un deuxième mécanisme de capture du fer mettant en jeu la présence de récepteurs spécifiques de la sérotransferrine ou de la lactotransferrine (Tableaux IX et X, p. 56 et 57). Ces récepteurs ont également été décrits pour quelques parasites (Tableaux XI et XII, p. 58).

A. LES RECEPTEURS DES TRANSFERRINES DES BACTERIES.

Les récepteurs de la sérotransferrine et de la lactotransferrine

Tableau VIII : Paramètres de fixation de la lactotransferrine sur les lymphocytes.

Réf.	Type cellulaire	K_d (x 10 ⁻⁹ M)	Sites/cellule (x 10 ⁶)
van Snick et Masson, 1976	Lymphocytes péritonéaux de Souris	1100	6,7
Bennett et Davis, 1981	Lymphocytes B circulants humains	ND	26
Birgens <u>et al.</u> , 1984	Lymphocytes circulants humains	43	1,9
	Lymphoblastes et myeloblastes humains	20	10
Mazurier <u>et al.</u> , 1989	Lymphocytes circulants humains activés	80	2

ND : non déterminé

Tableau X : Bactéries pouvant interagir avec la sérotransferrine (STF) par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

Bactéries	Références	Caractérisation du récepteur de la STF
<u>Bordetella pertussis</u>	Redhead <u>et al.</u> , 1987	ND
	Redhead et Hill, 1991	ND
<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	McKenna <u>et al.</u> , 1988	ND
	Lee and Schryvers, 1988	ND
<u>Neisseria meningitidis</u>	Tsai <u>et al.</u> , 1988	ND
	Griffiths <u>et al.</u> , 1990	78 kDa à 83 kDa suivant la souche étudiée
	Schryvers et Morris, 1988a	65 kDa et 95 kDa
<u>Neisseria</u> (10 espèces étudiées)	Schryvers et Lee, 1989	98 kDa à 105 kDa suivant l'espèce étudiée
<u>Haemophilus influenzae</u>	Schryvers, 1988	ND
	Schryvers, 1989	58 kDa et 98 kDa
<u>Haemophilus somnus</u>	Ogunnariwo <u>et al.</u> , 1990	73 kDa, 85 kDa et 105 kDa

ND : non déterminé.

Tableau IX : Bactéries pouvant interagir avec la lactotransferrine (LTF) par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

Bactéries	Références	Caractérisation du récepteur de la LTF
<u>Bordetella pertussis</u>	Redhead <u>et al.</u> , 1987	ND
<u>Treponema pallidum</u>	Alderete <u>et al.</u> , 1988	ND
<u>Staphylocoques</u> (6 espèces étudiées)	Naidu <u>et al.</u> , 1990	ND
<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	McKenna <u>et al.</u> , 1988 Lee et Schryvers, 1988	ND ND
<u>Neisseria meningitidis</u>	Schryvers et Morris, 1988b	105 kDa
<u>Neisseria</u> (10 espèces étudiées)	Schryvers et Lee, 1989	105 kDa chez toutes les espèces étudiées
<u>Haemophilus influenzae</u>	Schryvers, 1988 Schryvers, 1989.	ND 105 kDa et 106 kDa

ND : non déterminé.

Tableau XI : Parasites pouvant interagir avec la sérotransferrine (STF) par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

Parasites	Références	Caractérisation du récepteur de la STF
<u>Leishmania</u>	Voyiatzaki et Soteriadou, 1990	ND
<u>Plasmodium falciparum</u>	Rodriguez et Jungery, 1986	93 kDa
	Haldar <u>et al.</u> , 1986	102 kDa
<u>Trypanosoma cruzi</u>	Lima et Villata, 1990	200 kDa
<u>Trypanosoma brucei</u>	Schell <u>et al.</u> , 1991	42 kDa

ND : non déterminé.

Tableau XII : Parasites pouvant interagir avec la lactotransferrine (LTF) par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

Parasites	Références	Caractérisation du récepteur de la LTF
<u>Trypanosoma brucei</u>	Lima et Kierszenbaum, 1985	ND
<u>Trichomonas vaginalis</u>	Kenneth et Alderete, 1984	178 kDa et 75 kDa

ND : non déterminé.

ont été mis en évidence sur des bactéries Gram (-) telles que Bordetella pertussis (Redhead et al., 1987, Redhead et Hill, 1991), Neisseria (Mckenna et al., 1988; Schryvers et Morris, 1988a, 1988b; Tsai et al., 1988), Haemophilus (Schryvers, 1988, 1989); le récepteur de la lactotransferrine a également été mis en évidence sur Trepanoma pallidum (Alderete et al., 1988) et sur des bactéries Gram (+) telles que les Staphylocoques (Naidu et al., 1990).

La capacité de fixer la sérotransferrine ou la lactotransferrine par les bactéries n'est observée que lorsque celles-ci sont cultivées dans un milieu dépourvu de fer (Schryvers, 1989). Elle peut être induite par addition d'un chélateur de fer et inversée par un excès de $FeCl_3$ (Schryvers et al., 1989), ce qui suggère que l'expression du récepteur de la lactotransferrine à la surface des bactéries est régulée par la quantité de fer disponible dans le milieu. Le récepteur de la sérotransferrine de Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrhoeae et d'Haemophilus influenzae fixe toujours la sérotransferrine après déglycosylation de celle-ci par la glycopeptidase F (Padda et Schryvers, 1990). Ces résultats suggèrent que le récepteur bactérien de la sérotransferrine n'est pas de nature lectinique.

A ce jour, la caractérisation du récepteur de la sérotransferrine n'a donné que des résultats très hétérogènes (Tableau IX, p. 56). Par contre, le récepteur de la lactotransferrine a été identifié à une protéine de masse moléculaire apparente de 105 kDa chez toutes les espèces étudiées (Tableau X p. 57).

La capacité des bactéries pathogènes à utiliser le fer de la sérotransferrine ou de la lactotransferrine humaine joue probablement un rôle important dans la prolifération bactérienne au moment d'une infection. Néanmoins, elle ne peut être considérée comme un critère déterminant de virulence puisqu'elle a également été retrouvée, bien

qu'en proportion plus faible, chez des souches commensales (Neisseria flavescens) (Schryvers et al., 1989).

B. LES RECEPTEURS DES TRANSFERRINES DES PARASITES.

1. Le récepteur de la sérotransferrine.

La sérotransferrine se fixe spécifiquement à la surface de Leishmania au stade amastigote et promastigote (Voyiatzaki et Soteriadou, 1990) ainsi qu'à la surface de Trypanosoma cruzi au stade amastigote (Lima et Villata, 1990).

Plasmodium falciparum peut également capter le fer de la sérotransferrine. Ces parasites possèdent une localisation intracellulaire et expriment le récepteur de la sérotransferrine à la surface des érythrocytes qu'ils infectent. L'expression du récepteur de la sérotransferrine est plus importante au stade trophozoïte du parasite (Haldar et al., 1986; Rodriguez et Jungery, 1986).

Les deux mécanismes de capture du fer de la sérotransferrine décrits chez les cellules eucaryotes (p. 29) sont également retrouvés chez les parasites. Chez Trypanosoma brucei, la sérotransferrine est internalisée par un mécanisme d'endocytose (Webster et Crab, 1988). Par contre, chez Plasmodium falciparum, c'est le second mécanisme mettant en jeu la réduction du fer lié à la sérotransferrine qui semble être impliqué. En effet, Fry (1989) démontre une activité enzymatique responsable de la réduction du fer lié à la sérotransferrine au niveau de la membrane plasmique des érythrocytes infectés par Plasmodium falciparum. Cette activité est principalement exprimée au stade trophozoïte et semble directement liée à la présence du récepteur parasitaire de la sérotransferrine.

Récemment, le gène codant pour le récepteur de Trypanosoma brucei a été localisé. Ce gène est sous le contrôle d'un promoteur régulant l'expression de divers gènes codant pour des glycoprotéines variables de surface (Schell et al., 1991).

La purification du récepteur de la sérotransferrine, donne comme dans le cas des bactéries, des résultats hétérogènes. Le récepteur de la sérotransferrine a été identifié à une protéine de 200 kDa chez Trypanosoma cruzi (Lima et Villata, 1990), de 45 kDa chez Trypanosoma brucei et de 93 kDa ou de 102 kDa chez Plasmodium falciparum (Rodriguez et Jungery, 1986; Haldar et al., 1986).

2. Le récepteur de la lactotransferrine.

Le récepteur de la lactotransferrine a été mis en évidence à la surface de Trichomonas vaginalis (Kennet et Alderete, 1984) et de Trypanosoma cruzi (Lima et Kierszenbaum, 1985).

Les monocytes possédant également un récepteur spécifique de la lactotransferrine, Lima et Kierszenbaum (1985) ont étudié l'influence de cette protéine dans l'interaction monocytes-Trypanozoma cruzi. La lactotransferrine, en se liant au récepteur monocyttaire et au récepteur parasitaire, jouerait un rôle de "pontage" et faciliterait ainsi l'interaction et la phagocytose des Trypanosomes par les monocytes.

La purification du récepteur de la lactotransferrine chez Trichomonas vaginalis a permis d'isoler deux protéines de 178 et 75 kDa (Kennet et Alderete, 1984).

III. CONCLUSION.

Les travaux portant sur le récepteur de la sérotransferrine ont conduit à la mise en évidence de celui-ci sur un grand nombre de cellules. La présence du récepteur de la sérotransferrine à la surface

cellulaire est généralement liée à un besoin en fer. Le récepteur de la sérotransferrine est une glycoprotéine composée de deux chaînes polypeptidiques reliées entre elles par un pont disulfure. Cette structure est retrouvée dans toutes les cellules des vertébrés. Toutefois, on observe des différences de glycosylation et de réactivité antigénique selon l'origine tissulaire ou animale.

Concernant le récepteur de la lactotransferrine, l'ensemble des travaux effectués ont conduit à la mise en évidence d'une fixation de la lactotransferrine sur un nombre limité de cellules telles que les entérocytes, les cellules du foie, les cellules de glande mammaire et les cellules du système immunitaire.

La fixation de la lactotransferrine sur les monocytes/macrophages et sur les cellules du foie semble être de nature non spécifique et ne devrait pas faire intervenir de récepteurs spécifiques de la partie protéique de la lactotransferrine.

La fixation de la lactotransferrine sur les leucocytes polynucléaires pourrait, par contre, faire intervenir la présence de récepteurs spécifiques de cette protéine, cependant, concernant cette étude, peu de travaux ont été effectués et aucune publication récente n'est venue confirmer cette hypothèse.

La présence de récepteurs spécifiques de la lactotransferrine à la surface des entérocytes, des lymphocytes activés et des cellules de glandes mammaires est par contre bien établie, de plus, les récepteurs entérocytaires (Mazurier et al., 1985; Hu et al., 1990) et lymphocytaires (Mazurier et al., 1989) ont été identifiés.

Récemment, il a été démontré que certaines bactéries et certains parasites placés dans un environnement dépourvu de fer exprimaient, à leur surface ou à la surface des cellules qu'ils infectaient, le récepteur de la sérotransferrine ou de la lactotransferrine.

INTERACTIONS DES TRANSFERRINES AVEC LES CELLULES DU SANG HUMAIN
RELATIONS TRANSFERRINES-SYSTEME IMMUNITAIRE

I. LA SEROTRANSFERRINE.

A. ROLE DE LA SEROTRANSFERRINE DANS LA SYNTHÈSE DE
L'HEMOGLOBINE.

Les cellules précurseurs des érythrocytes sont impliquées dans la synthèse de l'hémoglobine et présentent par conséquent un besoin accru en fer. Ces cellules possèdent à leur surface un nombre élevé de récepteurs de la sérotransferrine et captent chaque jour environ 70% du fer circulant lié à cette protéine. Le nombre de récepteurs de la sérotransferrine augmente dans les cellules de la lignée érythroïde au stade normoblaste puis diminue graduellement durant la maturation en fonction de la synthèse de l'hémoglobine. Les hématies, représentent le stade final de cette maturation, elles sont dépourvues de ce récepteur (Kailis et Morgan 1974; Sieffs et al., 1982; Lebman et al., 1982).

La diminution du taux de récepteur de la sérotransferrine, au cours de la maturation des réticulocytes, est lié, d'une part, à la diminution de sa synthèse et d'autre part, à sa libération dans des vésicules extracellulaires ou exosomes (Pan et Johnston, 1983, 1984). Ces deux facteurs sont augmentés par la présence d'hème (Ward et al., 1984; Louache et al., 1984; Ponka et al., 1988; Ahn et Johnston, 1989).

Les travaux de Thorstensen (1988) démontrent un mécanisme différent de capture du fer par les réticulocytes et les hépatocytes. Chez les réticulocytes, le fer est principalement internalisé par un mécanisme d'endocytose du complexe sérotransferrine-récepteur alors que la capture du fer lié à la sérotransferrine se fait plutôt, dans les

hépatocytes, après réduction de celui-ci, par un système NADH oxydoréductase, au niveau de la surface cellulaire.

B. ROLE DE LA SEROTRANSFERRINE DANS LA PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE.

1. Capture de la sérotransferrine par les lymphocytes activés.

Tormey et Mueller (1972) ont montré que les lymphocytes circulants cultivés en milieu dépourvu de sérum se multipliaient, en réponse à la phytohémagglutinine, lorsque la sérotransferrine était additionnée au milieu de culture. Cette prolifération n'était pas observée en présence d'aposérotransferrine ou lorsque le fer était apporté sous forme de citrate ferrique (Tormey et Mueller, 1972; Phillips et Azari, 1975) . La présence de récepteurs de la sérotransferrine a ensuite été démontrée à la surface des lymphocytes T (Larrick et Cresswell, 1979b; Galbraith et al., 1980b; Brock et Rankin, 1981).

La stimulation et la prolifération des lymphocytes B nécessitent également la fixation de la sérotransferrine par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques (Neckers, 1984)

2. Cinétique d'apparition du récepteur de la sérotransferrine.

Le récepteur de la sérotransferrine est absent des lymphocytes T quiescents (Tormey et al., 1972), il est exprimé après stimulation mitogénique (Galbraith et al., 1980b; Brock et Rankin, 1981). Le mécanisme responsable de l'induction de la synthèse du récepteur de la

sérotransferrine n'est cependant pas encore bien compris. Dans les lymphocytes circulants activés et les lignées leucémiques en culture, l'expression du récepteur de la sérotransferrine est modulée par la concentration intracellulaire en fer (Louache et al., 1984). Les lymphocytes T quiescents possèdent le gène codant pour le récepteur de la sérotransferrine mais celui-ci n'est pas exprimé dans les conditions normales ou après ferriprivation. Ces résultats suggèrent que chez les lymphocytes T quiescents, le gène codant pour le récepteur de la sérotransferrine est "bloqué" (Pelosi et al., 1986).

La stimulation mitogénique des lymphocytes T peut se diviser en deux étapes. Au cours de la première étape, l'interaction de la concanavaline A ou de la phytohémagglutinine avec les lymphocytes T déclenche une série de réactions telles que l'expression de récepteurs de l'interleukine-2 et la libération de l'interleukine-2 (Neckers et Cossman, 1983). Cette étape nécessite la présence de macrophages produisant l'interleukine-1 et conduit à la transition des lymphocytes de la phase stationnaire à la phase G1 du cycle cellulaire (Bettens et al., 1982). Dans une seconde étape, les récepteurs de la sérotransferrine sont synthétisés et les cellules entrent en phase S. La fixation de l'interleukine-2 sur son récepteur est une étape nécessaire à l'expression du récepteur de la sérotransferrine. En présence d'anticorps dirigés contre les récepteurs de l'interleukine-2, la synthèse des récepteurs de la sérotransferrine et, par conséquent, la croissance cellulaire, sont inhibées (Neckers et Cossman, 1983).

Les plasmocytes de Souris sont un exemple de cellules B différenciées continuant à se diviser. Ces cellules possèdent des récepteurs pour la sérotransferrine et leur croissance dépend de l'interleukine-6. Nous avons vu précédemment que l'interleukine-2 était indispensable à l'expression des récepteurs de la sérotransferrine sur

les lymphocytes T. De la même façon, la présence d'interleukine-6 est nécessaire à l'expression des récepteurs de la sérotransferrine par les plasmocytes de Souris (Neckers et Nordan, 1988). En absence d'interleukine-6, le cycle cellulaire est bloqué en phase G1 et les plasmocytes n'expriment plus de récepteurs pour la sérotransferrine. L'addition d'interleukine-6 conduit à la synthèse de récepteurs pour la sérotransferrine suivie d'une reprise de la prolifération cellulaire (Neckers, 1991).

3. Rôle de la sérotransferrine dans l'activation des lymphocytes.

L'apport du fer aux lymphocytes constitue le principal rôle de la sérotransferrine dans la transformation lymphoblastique. En effet, la synthèse de l'ADN et, par conséquent, la prolifération des lymphocytes fait intervenir la ribonucléotide réductase dont le fer est un cofacteur. L'internalisation du fer de la sérotransferrine peut se faire soit par un mécanisme d'endocytose soit par un mécanisme d'oxydoréduction à la surface cellulaire mettant en jeu une activité NADH-oxydoréductase (Sun et al., 1987a, 1987b). La stimulation de la NADH-oxydoréductase est associée à une libération de protons et à une alcalinisation du cytoplasme, à des changements intracellulaires de NAD^+/NADH et au maintien de composés redox au niveau de la membrane plasmique; ces phénomènes sont directement impliqués dans la croissance cellulaire (Jacobson et Jacobson, 1976; Hesketh et al., 1985).

La présence de récepteurs pour la sérotransferrine permet, en plus du fer, l'apport du zinc et du gallium aux lymphocytes activés. Le zinc lié à la sérotransferrine augmente la réponse mitogénique des lymphocytes humains (Philips et Azari, 1974). Par contre, le gallium lié

à la sérotransferrine inhibe la prolifération cellulaire dans les lymphocytes circulants humains activés par la phytohémagglutinine ou par la toxine du tétanos. D'autre part, la sérotransferrine-gallium inhibe la production d'immunoglobulines par les lymphocytes B, cet effet inhibiteur semble être indépendant de l'effet anti-prolifératif (Chitambar et al., 1983, 1989).

Une autre enzyme, la protéine kinase C, voit, en présence de sérotransferrine, son activité augmenter par un facteur 10 dans les cellules leucémiques CCRF-CEM et par un facteur 2 dans les lymphocytes humains activés. L'augmentation de l'activité enzymatique est due à une stimulation de la transcription de l'ARNm codant pour la protéine kinase C. Cette stimulation semble être liée directement à l'apport de fer puisqu'aucun effet n'est observé en présence d'apotransferrine ou de sérotransferrine complexée à un autre métal que le fer (Phillips et al., 1987; Alcantera et al., 1991).

Enfin, l'anticorps NDA9 dirigé contre la récepteur de la sérotransferrine est capable de bloquer certaines fonctions cellulaires des lymphocytes T telles que la production d'interferon-gamma et de facteurs de croissance des lymphocytes B (Suciu-Foca et al., 1987).

L'ensemble de ces observations tend à prouver que la sérotransferrine posséderait, en plus de son rôle nutritionnel, plusieurs rôles supplémentaires. Cette hypothèse est appuyée par le fait que le nombre de récepteurs de la sérotransferrine exprimés à la surface des lymphocytes activés est très important et permet un apport nutritif supérieur aux besoins cellulaires (Brock et Mainou-Fowler, 1983).

4. Synthèse de sérotransferrine par les lymphocytes.

Les lymphocytes peuvent synthétiser la sérotransferrine (Soltys

et Brody, 1970). La présence d'ARNm codant pour la sérotransferrine a été mise en évidence dans les lymphocytes CD8⁺ (Broxmeyer et al., 1983b) et dans les lymphocytes CD4⁺ activés (Lum et al., 1986).

C. ROLE DE LA SEROTRANSFERRINE ET DE SON RECEPTEUR DANS L'ACTIVITE DES CELLULES "NATURAL KILLER".

Les cellules NK constituent un groupe de lymphocytes ayant la capacité intrinsèque de reconnaître et de détruire certaines cellules tumorales et certaines cellules infectées par des virus. Les cellules tumorales possèdent un nombre très important de récepteurs pour la sérotransferrine à leur surface. De même, l'infection des lymphocytes T par le virus HIV ou le virus HTLV-1 conduit à une surexpression du récepteur de la sérotransferrine due à une inhibition de l'endocytose de ce récepteur (Uriel et al., 1990; Neckers, 1991).

Certains auteurs montrent qu'il existe une corrélation entre le taux de récepteurs pour la sérotransferrine à la surface des cellules cibles et leur sensibilité envers les cellules NK (Newman et al., 1984; Brieva et Stevens, 1984; Lazarus et Baines, 1985).

La lyse des cellules K562 par les cellules NK peut être inhibée par l'addition dans le milieu réactionnel de fragments protéolytiques du récepteur de la sérotransferrine (Vodinelich et al., 1983); le récepteur de la sérotransferrine pourrait donc être une structure cible reconnue par les cellules NK. Une deuxième hypothèse a été proposée : en effet, la capacité qu'ont les anticorps anti-sérotransferrine à inhiber l'activité natural killer amène à penser que la sérotransferrine agit en tant que "pont" entre les cellules cibles et les cellules NK, suggérant ainsi la présence de récepteurs pour la sérotransferrine à la surface des cellules NK (Baines et al., 1983; Alarcon et Fresno, 1985).

D. EXPRESSION DU RECEPTEUR DE LA SEROTRANSFERRINE PAR LES MONOCYTES/MACROPHAGES.

L'expression du récepteur de la sérotransferrine dans les cellules non érythroïdes est généralement associée à la prolifération cellulaire. Les monocytes et les macrophages ne se multiplient que peu ou pas une fois qu'ils ont quitté la moëlle osseuse et la présence de récepteurs de la sérotransferrine à la surface de ces cellules est très controversée. La fixation de la sérotransferrine à la surface des monocytes circulants humains ou sur les macrophages péritonéaux de Souris n'est que très faible ou nulle (Andreesen et al., 1984; Hamilton et al., 1984; Björn et al., 1985).

La mise en culture des monocytes humains conduit à l'expression des récepteurs de la sérotransferrine qui peut être modulée par le taux de fer intracellulaire (Andreesen et al., 1984; Testa et al., 1991). Chez les sujets atteints d'hémochromatose héréditaire, l'expression du récepteur de la sérotransferrine est plus élevée mais n'implique pas une capture de fer plus importante (Sizemore et Basset, 1984; Björn et al., 1985). Les macrophages alvéolaires possèdent également un nombre plus important de récepteurs pour la sérotransferrine (Andreesen et al., 1984;; Hirata et al., 1986) et capturent le fer de la sérotransferrine (Wyllie, 1977; Saito et al., 1986; McGowan et al., 1986).

Nishisato et Aisen (1982) montrent que les macrophages péritonéaux de rat possèdent des récepteurs fixant préférentiellement l'aposérotransferrine et suggèrent que ceux-ci sont impliqués dans la libération du fer par les macrophages. Cependant, des études ultérieures n'ont pas permis de mettre en évidence un tel mécanisme et le récepteur de l'aposérotransferrine n'a pu être caractérisé, suggérant

que l'interaction de l'aposérot transferrine avec les macrophages est due à une interaction non spécifique (Saito et al., 1986; Baynes et al., 1987).

Les macrophages, comme les lymphocytes, peuvent synthétiser la sérotransferrine (Phillips et Thorbecke, 1966, Haurani et al., 1973). La sérotransferrine endogène pourrait jouer un rôle dans la libération du fer par les macrophages.

E. FIXATION DE LA SEROTRANSFERRINE SUR LES NEUTROPHILES.

La sérotransferrine provoque l'adhérence des grains de pollen sur les neutrophiles (Sass-Kuhn et al., 1984; Mackay et al., 1986). Le mécanisme de cette interaction est spécifique dans la mesure où il n'a pas lieu sur d'autres types cellulaires ou sur des particules de latex, mais ne fait pas intervenir le récepteur de la sérotransferrine. Le degré de saturation en fer de la sérotransferrine n'a pas d'effet. Cette interaction ne provoque pas la libération d'enzymes lysosomales par les neutrophiles et il a été proposé que la sérotransferrine pourrait ainsi favoriser l'élimination des grains de pollen du tractus respiratoire (MacKay et al., 1986).

F. LIBERATION DU FER DE LA SEROTRANSFERRINE PAR LES PLAQUETTES.

Les nucléotides ADP et ATP peuvent favoriser la libération du fer de la sérotransferrine en accélérant la dissociation et l'échange de l'ion bicarbonate présent dans le site de fixation du fer (Egyed, (1975). Ces nucléotides sont libérés de façon spontanée par les plaquettes et leur sécrétion est augmentée par l'activation de ces cellules. Récemment,

Brieland et al. (1989) montrent que la libération du fer de la sérotransferrine est augmentée lorsque celle-ci est mise en présence d'extraits de plaquettes ou des produits de sécrétion de ces cellules activées ou non. Cependant, la destruction de l'ADP et de l'ATP plaquettaires par addition d'apyrase dans le milieu réactionnel ne provoque qu'une inhibition partielle de la libération du fer de la sérotransferrine. Il semble donc que la libération du fer de la sérotransferrine par les plaquettes humaines fasse intervenir deux mécanismes : un mécanisme nucléotide-dépendant et un mécanisme nucléotide-indépendant.

II. LA LACTOTRANSFERRINE.

A. ROLE DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS LA PROLIFERATION DES CELLULES HEMATOPOIETIQUES.

1. Prolifération des lignées lymphocytaires et monocytaires.

Une activité facteur de croissance de la lactotransferrine humaine a été mise en évidence sur des lignées lymphocytaires humaines B et T (Hashizume et al., 1983, 1987) et vis-à-vis d'une lignée murine macrophagique (P388DI) (Oria et al., 1988). Cette activité a également été décrite pour d'autres lignées cellulaires telles que la lignée HT29 d'adénocarcinome de colon humain (Amouric et al., 1984), la lignée BALB/c 3T3 de fibroblastes embryonnaires de Souris (Azuma et al., 1989) et la lignée myéloblastique L6 (pour la lactotransferrine bovine) (Byatt et al., 1990) ainsi que pour les cellules isolées des cryptes de l'intestin de rat (Nichols et al., 1987, 1989).

Le mécanisme d'action de la lactotransferrine est très controversé. Selon certains auteurs, la lactotransferrine agirait en apportant le fer nécessaire à la prolifération cellulaire (Azuma et al., 1989). Pour d'autres auteurs, l'activité facteur de croissance de la lactotransferrine ne serait pas liée à la présence de fer, c'est la protéine elle même qui agirait en tant que signal de prolifération (Oria et al., 1988; Byatt et al., 1990; Nichols et al., 1990). La lactotransferrine pourrait agir en tant qu'agent oxydant au niveau de la surface cellulaire. Sün et al. (1991) montrent que la lactotransferrine, comme la sérotransferrine, stimule une activité NADH-oxydoréductase à la surface cellulaire. Les réactions d'oxydoréduction au niveau de la membrane plasmique et l'alcanisation du cytoplasme résultant de ce phénomène pourrait être responsables de l'activité facteur de croissance de la lactotransferrine.

2. Prolifération des lymphocytes circulants humains.

En ce qui concerne les lymphocytes circulants humains, activés par un agent mitogène ou par une culture mixte de lymphocytes, les résultats sont controversés, l'activité facteur de croissance décrite précédemment étant retrouvée (Mazurier et al., 1989) ou non (Hashorn et al., 1986; Slater et Fletcher, 1987a, 1987b). De plus, dans certaines conditions de culture (utilisation de plaques de culture à fond arrondi), Slater et Fletcher (1987a, 1987b) montrent que la lactotransferrine inhibe la libération d'interleukine-2 et par conséquent l'activité transcriptionnelle des lymphocytes activés.

B. ROLE DE LACTOTRANSFERRINE DANS L'HYPOSIDEREMIE INFLAMMATOIRE.

Au cours de l'inflammation, la modification d'un grand nombre de paramètres régulant le métabolisme du fer (Tableau XIII, p. 74) conduit à une diminution de la concentration plasmatique en fer. L'hyposidérémie inflammatoire ainsi établie va permettre, par ferriprivation, de limiter la croissance bactérienne. L'injection intraveineuse d'apolactotransferrine chez le Rat ou la Souris provoque une diminution de la concentration plasmatique en fer (van Snick et al., 1974; Sawatzki et al., 1983). Nous avons vu précédemment que l'apolactotransferrine contenue dans les granules secondaires des leucocytes polynucléaires était libérée dans le sang au moment d'une infection. Cette protéine possède à des pH acides une capacité de fixation de fer très supérieure à celle de la sérotransferrine. L'apolactotransferrine pourrait jouer un rôle important dans l'hyposidérémie inflammatoire en captant le fer de la sérotransferrine, particulièrement au niveau des sites d'inflammation où le pH est plus faible. La lactotransferrine transférerait ensuite son fer à la ferritine des macrophages grâce à la présence de récepteurs spécifiques (Fig. 11, p. 75) (van Snick et al., 1974).

C. ROLE DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS L'ACTIVITE BACTERICIDE DES LEUCOCYTES.

La lactotransferrine, par l'intermédiaire du fer qu'elle transporte, joue un rôle dans l'activité bactéricide des leucocytes polynucléaires (Bullen et Armstrong, 1979). L'absence ou le faible taux de lactotransferrine intracellulaire, ainsi que la déficience en fer

Tableau XIII : Effet de l'inflammation sur le métabolisme du fer (De Sousa et Brock, 1989).

Libération du fer par les tissus	diminution
Stockage du fer par les tissus	augmentation
Absorption intestinale de fer	diminution
Sidérémie	diminution
Capacité totale de fixation du fer	diminution
Taux de renouvellement du fer plasmatique	diminution
Hémoglobine	diminution
Volume globulaire	diminution
Protoporphyrines des globules rouges	augmentation
Lactotransferrine plasmatique	augmentation
Ferritine plasmatique	augmentation

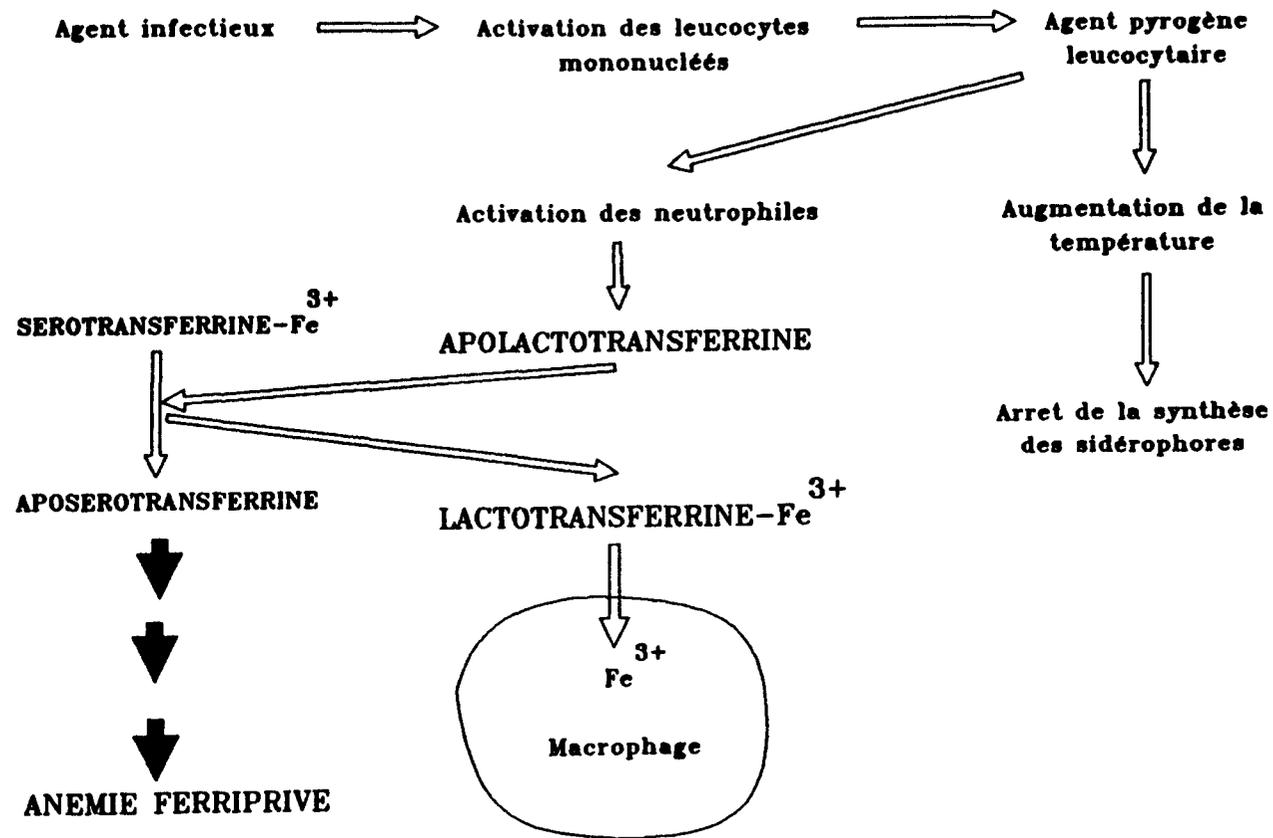
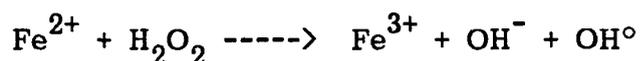


Figure 11 : Schéma récapitulatif de l'intervention des transferrines lors d'une agression microbienne (Spik et Montreuil, 1983).

provoque une diminution de cette activité bactéricide (Spitznagel et al., 1972). Lors de la phagocytose d'une bactérie, l'essentiel de la lactotransferrine contenue dans les granules secondaires des leucocytes est libérée dans le milieu extérieur, le reste de la lactotransferrine, des granules non dégradés, est déversé dans les phagolysosomes (Leffell et Spitznagel, 1975). La majorité du fer libéré dans les phagolysosomes et dans le milieu de culture, après phagocytose d'Escherichia coli, est retrouvée fixé à la lactotransferrine (Molloy et Winterbourn, 1990).

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



en augmentant la vitesse de conversion de l' O_2 en O_2^- (Haber et Weiss, 1934).

Ambruso et Johnston (1981) ont montré que la lactotransferrine pouvait augmenter la production de radicaux libres par les neutrophiles humains grâce à l'apport du fer lié à la protéine et ainsi amplifier la réponse inflammatoire et la peroxydation des lipides. Ces résultats, confirmés en 1982 par Bannister et al. et en 1990 par Klebanoff et Waltersdorff sont cependant très controversés. En effet, Gutteridge et al. (1981) ont observé que l'apolactotransferrine pouvait exercer un

effet antagoniste en captant le fer et en évitant ainsi des dommages occasionnés aux leucocytes par ces radicaux. La lactotransferrine pourrait protéger les membranes cellulaires des leucocytes en focalisant les radicaux libres sur les membranes des bactéries à lyser (Ward et al., 1983). Enfin, Winterbourn (1983) montre que la lactotransferrine saturée en fer n'augmente pas la production de radicaux libres, seule l'addition d'agents complexant le fer comme l'E.D.T.A., permettrait à la lactotransferrine d'être un catalyseur de la production de ces radicaux hydroxyles.

D. ROLE DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS LA MIGRATION DES CELLULES IMMUNOCOMPETENTES SUR LE LIEU DE L'INFLAMMATION.

Une des premières réponses de l'organisme lors de la réaction inflammatoire est l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales des petits vaisseaux sanguins et leur migration vers le lieu de l'inflammation. La lactotransferrine provenant de la dégranulation des neutrophiles provoquerait une modification des propriétés de surface des leucocytes, en particulier, en abolissant la répulsion électrostatique des membranes permettant aux leucocytes de rester en suspension (Boxer et al., 1982) et permettrait ainsi l'adhésion de ces cellules sur les vaisseaux sanguins (Oseas et al., 1981). La lactotransferrine libérée attirerait les lymphocytes et les macrophages par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. Les macrophages attireraient également les lymphocytes grâce à la sérotransferrine et à la ferritine qu'ils synthétisent, les lymphocytes possédant des récepteurs pour ces deux molécules.

E. ROLE DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS LA REGULATION DE LA MYELOPOIESE.

La lactotransferrine est un facteur granulocytaire régulant, par rétroaction négative, la production des colonies de granulocytes-macrophages. Un mécanisme d'action direct a tout d'abord été proposé : la lactotransferrine agirait directement en inhibant la production, par les macrophages, de deux facteurs : le facteur de stimulation des colonies granulocytes-macrophages (GM-CSF) et les isoferritines acides, responsables de la prolifération et de la différenciation des cellules progénitrices formant les colonies de granulocytes-macrophages (Broxmeyer et al., 1978, 1983a, 1983b, 1984).

Ce mécanisme est aujourd'hui abandonné en faveur d'un mécanisme d'action indirect de la lactotransferrine (Fig. 12, p. 79). En effet, la lactotransferrine est sans effets lorsque les monocytes sont séparés des lymphocytes. La lactotransferrine agirait en inhibant la libération d'une monokine responsable, elle même, de la libération du facteur GM-CSF par les lymphocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Bagby et al., 1981, 1983a, 1983b). Récemment, cette monokine a été identifiée à l'interleukine-1 (Bagby et al., 1986, Zucali et al., 1989).

Il est fort probable que le mécanisme d'action indirect de la lactotransferrine ne se limite pas à la production du facteur GM-GSF; l'inhibition de la synthèse d'interleukine-2 par les lymphocytes T (Slater et Fletcher, 1987b) ou de la synthèse d'anticorps par les lymphocytes B (Duncan et McArthur, 1981) pourraient également passer par ce mécanisme (Fig. 13, p. 80).

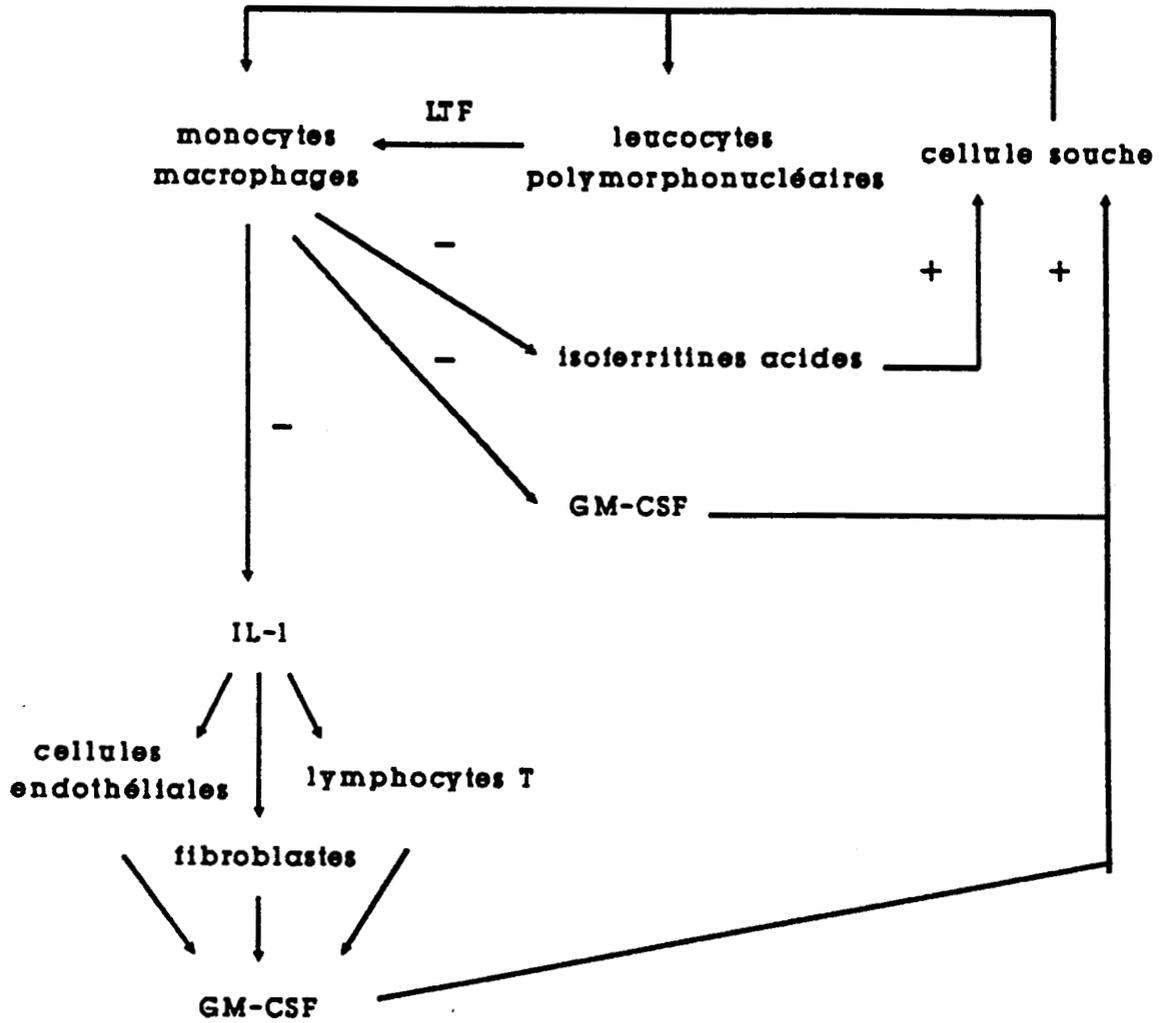


Figure 12 : Rôle de la lactotransferrine dans la régulation de la myélopoïèse (De Sousa et Brock, 1989).

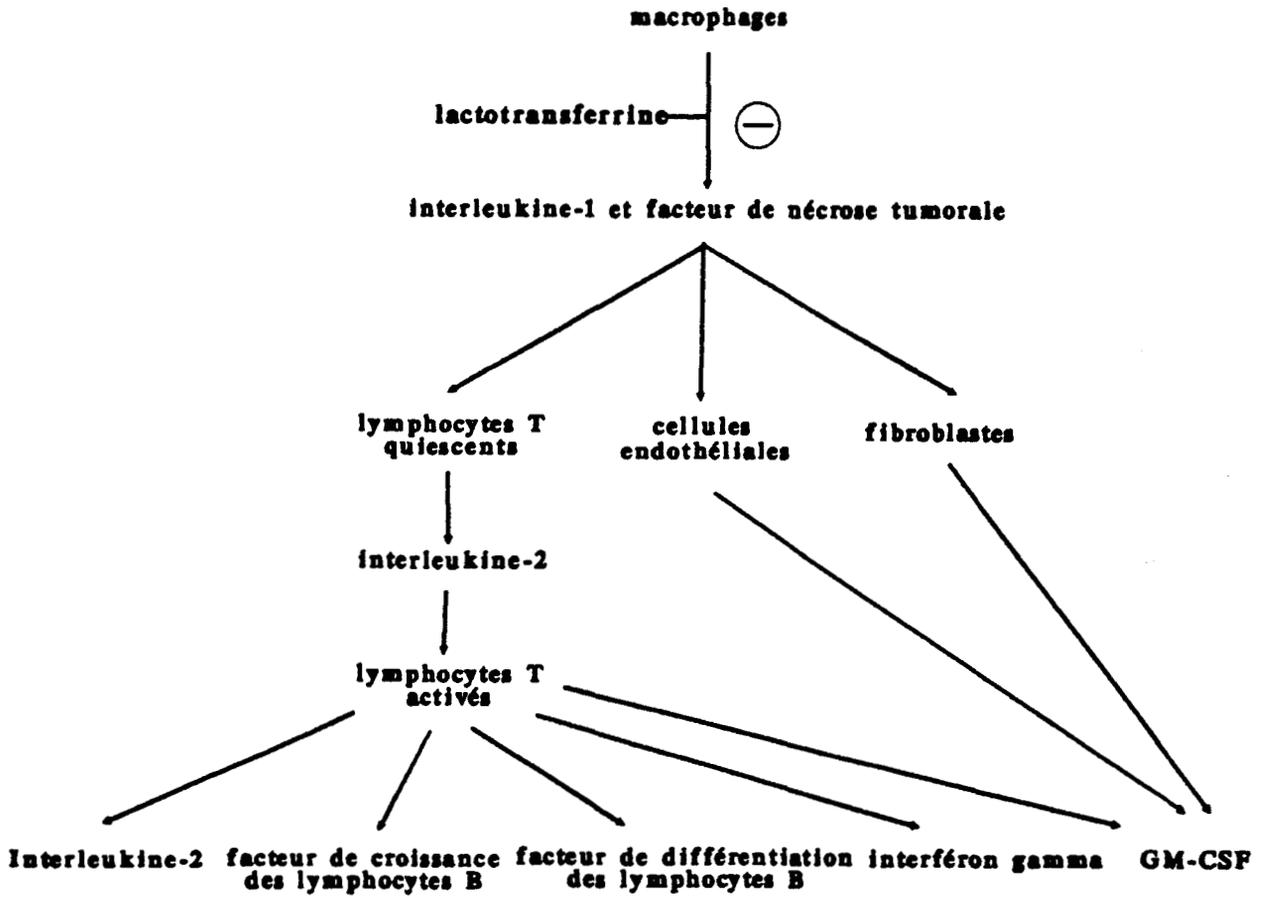


Figure 13 : Mécanisme d'action indirect de la lactotransferrine. Différentes cytokines dont l'action peut être affectée par la lactotransferrine (De Sousa et Brock, 1989).

F. ROLE DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS LA MODULATION DE LA SYNTHÈSE D'ANTICORPS.

La réponse immunitaire des cellules isolées de la rate de Souris peut être inhibée par la lactotransferrine. Lorsque les cellules sont incubées in vitro en présence de macrophages et de lactotransferrine, la synthèse d'IgM est proportionnelle à la concentration (gamme comprise entre 10^{-10} et 10^{-5} M) en lactotransferrine (Duncan et McArthur, 1981).

La lactotransferrine semble agir par l'intermédiaire des macrophages en inhibant la libération d'agents responsables de l'induction de la synthèse d'anticorps par les lymphocytes B (Duncan et McArthur, 1981). Le mode d'action de la lactotransferrine est probablement dû à un mécanisme d'action indirect identique à celui conduisant à l'inhibition de la libération du facteur GM-CSF (Fig. 13, p. 80).

Récemment, Zimecki et al. (1991) ont réalisé ce même type d'expérience mais en remplaçant les macrophages par des thymocytes. Dans ces conditions, la réponse immunitaire des cellules isolées de la rate de Souris est augmentée par un facteur 2. Ces auteurs montrent que la lactotransferrine induit, chez les thymocytes $CD4^+$ $CD8^-$, l'expression de l'antigène CD4 et par conséquent l'acquisition d'une activité de type "helper".

G. ROLE DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS L'ACTIVATION DU COMPLEMENT.

Le système du complément contient au moins 20 protéines interagissant dans un ordre de séquence donnée, sous le contrôle de

protéines de régulation. La lactotransferrine a récemment été ajoutée à la liste des protéines capable de réguler l'activation du complément. En effet, la lactotransferrine humaine isolée du lait (Morgan et al., 1975) ou des larmes (Kijlstra et Veerhuis, 1981) inhibe l'activité hémolytique du complément.

Les protéines du complément forment deux cascades enzymatiques reliées entre elles, appelées voie classique et voie alterne. Les deux voies classique et alterne du complément donnent naissance à une C3 convertase, C4b2b pour la voie classique et C3b,Bb pour la voie alterne (Fig. 14, p. 83). La lactotransferrine inhibe la formation de la convertase C3 (C4b2b) de la voie classique, elle n'a pas d'action sur la voie alterne (Fig.). Cette action est rendue réversible par addition de fer ferrique dans le milieu de culture, ce qui semble indiquer que le rôle de la lactotransferrine dans l'activation du complément est lié à la présence de fer (Kijlstra et Jeurissen, 1982).

Ces résultats sont confirmés par la démonstration d'une activité inhibitrice de la lactotransferrine dans la solubilisation, par le complément, de complexes immuns précipités; cette action faisant intervenir des composés dérivés du C3 (Kulics et Kijlstra, 1987).

H. ROLE DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS L'ACTIVITE CYTOTOXIQUE DES MONOCYTES.

La lactotransferrine stimule l'activité cytotoxique des monocytes à condition que ceux-ci ne soient pas dépourvus en estérase, elle n'a pas d'effet sur l'activité cytotoxique des lymphocytes (Nishiya et Horwitz, 1982; Horwitz et al., 1984; McCormick et al., 1991a,1991b). La lactotransferrine agit probablement par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques à la surface des monocytes puisque l'augmentation de

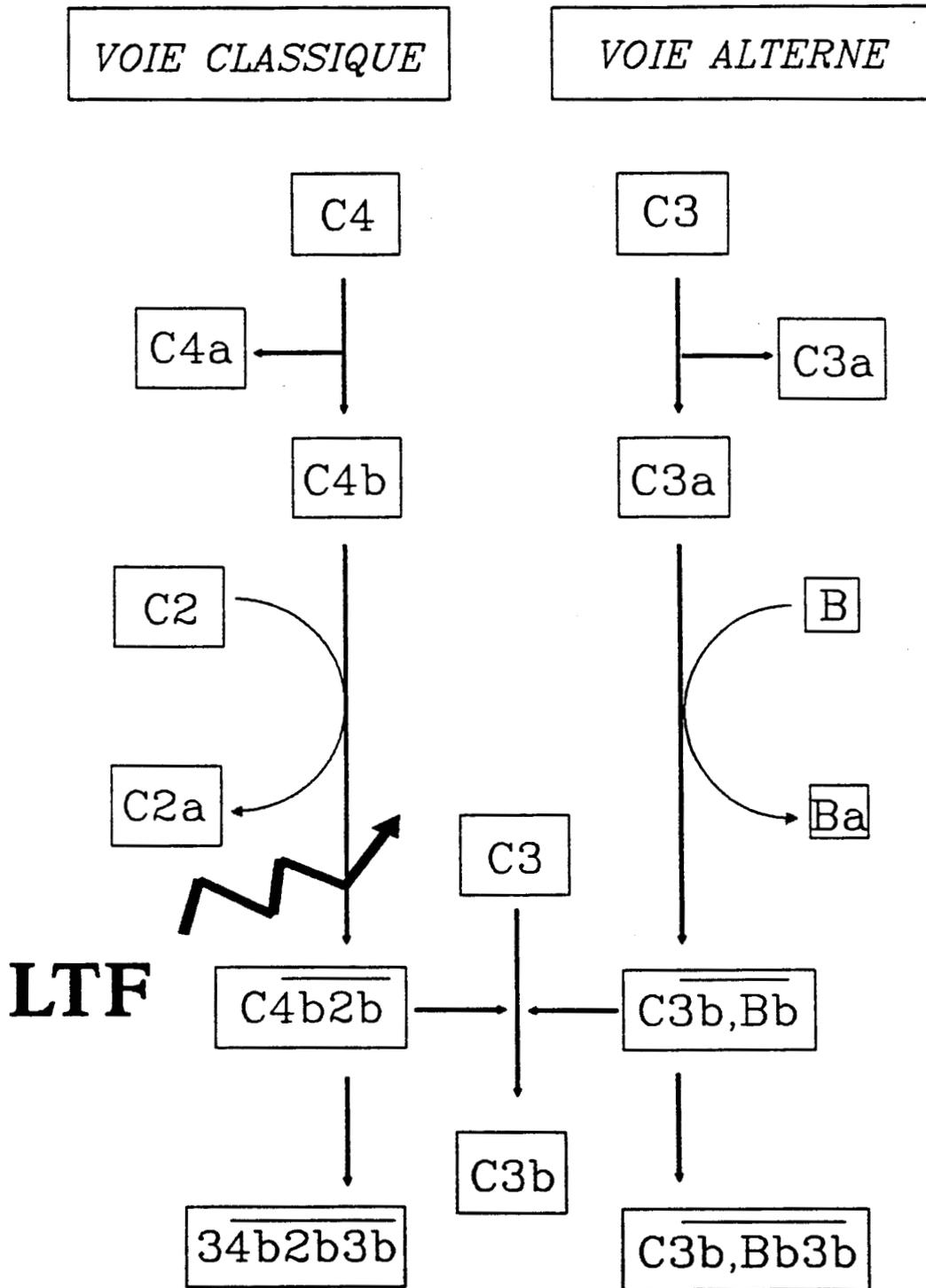


Figure 14 : Mode d'action de la lactotransferrine sur le système du complément, inhibition de la synthèse de la convertase C4b2b (Kijlstra et Jeurissen, 1982).

l'activité cytotoxique est également observée lorsque l'addition de lactotransferrine dans le milieu réactionnel est remplacée par une incubation préalable des monocytes avec cette protéine. Le degré de saturation en fer de la lactotransferrine n'a pas d'influence.

I. ACTIVITE ANTI-THROMBOTIQUE D'UN PEPTIDE DE LA LACTOTRANSFERRINE.

Un effort important porte depuis plusieurs années sur l'étude de l'activité anti-thrombotique des séquences RGDS du fibrinogène. Cependant, en plus de son activité anti-thrombotique, la séquence RGDS induit le détachement des cellules endothéliales in vitro, une toxicité générale peut donc être redoutée si ces séquences sont injectées in vivo (Bourdon et Ruoslahti, 1989). Les similarités fonctionnelles entre la coagulation du lait et celle du plasma (Jollès, 1975; Jollès et al., 1986) ainsi que les homologies moléculaires entre une protéine plasmatique (chaîne gamma du fibrinogène) et une protéine du lait (kappa caséine) (Jollès et al., 1978) ont conduit l'équipe du Pr. Caen à rechercher, dans les protéines du lait, la présence d'une séquence similaire à la séquence RGDS. Ceci dans l'espoir que cette substance naturelle serait davantage spécifique aux phénomènes de l'hémostase qu'à ceux de l'adhésion cellulaire. Le térapeptide KRDS présent dans un coude β de la lactotransferrine (en position 39-42) a ainsi été mis en évidence.

In vitro, le KRDS possède, comme le RGDS, une activité anti-plaquettaire. L'action anti-agrégante du peptide RGDS est due à l'inhibition spécifique de l'interaction des glycoprotéines GP IIb-IIIa avec les séquences RGDX du fibrinogène. Les résultats obtenus à partir

du KRDS démontrent que ce peptide possède un mode d'action différent de celui du RGDS :

- In vivo, le KRDS et le RGDS ont une activité antithrombotique synergique qui confirme la différence de mode d'action de ces 2 peptides (Drouet et al., 1990; Sollier et al., 1990),

- le KRDS est un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP, le RGDS n'a pas d'action significative (Harfenist et al., 1988; Drouet et al., 1990),

- contrairement au RGDS, le KRDS inhibe la sécrétion, induite par la thrombine, du contenu des granules de stockage des plaquettes (Mazoyer et al., 1990). De plus, cette inhibition de sécrétion s'exerce aussi sur des plaquettes de malades atteints de thrombasthénie de Glanzmann de type 1 (déficitaires en GP IIb-IIIa), excluant donc que cet effet passe par une action sur ce complexe glycoprotéinique.

Si le mode d'action du KRDS ne passe pas par le complexe GP IIb-IIIa, il peut néanmoins inhiber, mais de façon moins significative que le RGDS, la fixation du fibrinogène sur ce complexe. Le KRDS exerce également une action inhibitrice de la fixation d'un anticorps monoclonal (P2) à activité anti-glycoprotéinique IIb-IIIa sur des mégacaryocytes à un stade tardif de maturation (Raha et al., 1988). En revanche et contrairement au RGDS, il ne s'oppose pas à la fixation d'un autre anticorps monoclonal (PAC1) dirigé contre un épitope de configuration d'activation du groupe glycoprotéinique de la membrane plaquettaire GP IIb-IIIa (Mazoyer et al., 1990).

III. CONCLUSION.

La sérotransferrine et la lactotransferrine sont deux glycoprotéines possédant de nombreuses propriétés structurales en commun. Ces transferrines ont cependant des rôles bien distincts.

Dans l'organisme humain, le rôle de la sérotransferrine est principalement lié à l'apport de fer aux cellules utilisatrices. Toutefois, l'interaction de la sérotransferrine avec les cellules circulantes montre que celle-ci posséderait, en plus de son rôle nutritionnel, plusieurs rôles supplémentaires. Par contre, en ce qui concerne la lactotransferrine, bien que dans certains cas cette transferrine puisse avoir un rôle dans l'apport du fer aux cellules utilisatrices, le rôle dominant de la lactotransferrine semble être plus orienté dans la défense de l'organisme.

RESULTATS

RECHERCHE DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE A LA SURFACE
DES DIFFERENTES CELLULES DU SANG HUMAIN.

I. INTRODUCTION.

La concentration plasmatique de la lactotransferrine, normalement très faible (de l'ordre de 0,2 $\mu\text{g/ml}$, tableau I, p. 7), augmente dans certains cas pathologiques comme le cancer ou les infections bactériennes (tableau II, p. 8). Cette augmentation est consécutive à l'activation des neutrophiles qui provoque une libération dans le sang de la lactotransferrine contenue dans les granules secondaires (van Snick et al., 1974; Leffell et Spitznagel, 1975). La lactotransferrine granulocytaire est dépourvue de fer, cette protéine, en captant le fer lié à la sérotransferrine plasmatique et en le transférant aux cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques pourrait être responsable de l'hyposidérémie inflammatoire (van Snick et al., 1974; Sawatzki et al., 1983).

Afin de mieux comprendre le rôle de la lactotransferrine, nous avons recherché les cellules du sang humain capables d'interagir avec cette protéine. La lactotransferrine possède comme la sérotransferrine la capacité de fixer réversiblement deux ions ferriques, l'affinité de la sérotransferrine pour son récepteur est à pH neutre 20 fois plus élevée pour la forme diferrique que pour la forme dépourvue de fer (Wada et al., 1979; Young et al., 1984). Nous avons également étudié, sur les cellules fixant la lactotransferrine avec une haute affinité, l'influence du degré de saturation en fer de la lactotransferrine afin de savoir s'il existait, comme dans le cas de la sérotransferrine une différence d'affinité importante suivant le degré de saturation en fer.

II. MODE OPERATOIRE.

A. MATERIEL CELLULAIRE.

Les éléments figurés du sang d'un individu sain sont représentés par : - les hématies : 5 000 000/mm³

- les leucocytes : 5 000/mm³ dont

les leucocytes polynucléaires : neutrophiles 60 à 70%

éosinophiles 1 à 3%

basophiles 0 à 1%

les leucocytes mononucléaires : lymphocytes 25 à 30%

monocytes 8 à 10%

- les plaquettes : 250 000/mm³

Les cellules du sang qui existent en proportion relativement importante : hématies, neutrophiles, lymphocytes, monocytes et plaquettes, ont été préparées à partir de poches de 500 ml de sang citraté provenant d'individus sains. Ces poches nous ont été gracieusement fournies par le CRTS de Lille.

Les éosinophiles et les basophiles ne sont présents qu'en très faible pourcentage dans le sang et nous n'avons pu les préparer à partir de sang normal. Les éosinophiles nous ont été généreusement donnés par Madame le Docteur M. Capron du Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire. Ces cellules proviennent du sang d'individus atteints d'hyperéosinophilie ou de cellules de sang de cordon ombilical différenciées in vitro en éosinophiles. Seuls, les basophiles n'ont pu être obtenus.

1. Isolement des lymphocytes, des monocytes et des plaquettes.

a. Isolement des cellules mononucléaires.

La technique utilisée est celle proposée par la firme Nycomed d'après la technique mise au point par Boyüm (1968).

Le sang frais prélevé sur anticoagulant est centrifugé 30 min à 1.500 g puis le plasma est éliminé et remplacé par un même volume de tampon PBS (NaCl 0,15 M, phosphate 10 mM). Les éléments figurés en suspension (30 ml) sont déposés sur une couche (20 ml) de Ficoll, métrizoate de sodium (Lymphoprep, Nycomed). Une deuxième centrifugation (400 g, 30 min) permet de sédimenter les hématies et les neutrophiles. Les cellules (lymphocytes, monocytes et plaquettes) récupérées à l'interface PBS/Lymphoprep sont lavées 3 fois dans le PBS. Une vitesse de centrifugation de 200 g pendant 10 min permet de sédimenter les lymphocytes et les macrophages, les plaquettes restent en suspension et sont par conséquent éliminées lors des différents lavages. Les lymphocytes et les monocytes sont resuspendus, à raison de 5×10^6 cellules/ml dans du RPMI 1640 (Gibco) tamponné à pH 7,3 par 25 mM Hépès, 20 mM de bicarbonate et supplémenté par 300 mg/l de glutamine, 1 mM de pyruvate, 50 mg/l de gentamicine. Des fractions de 3 ml sont incubées dans des boîtes de culture de 6 puits (Nunc) à 37°C dans 5% CO₂/95% air. Cette étape permet de séparer les monocytes-macrophages des lymphocytes grâce à leur propriété d'adhérence. Après 2 h d'incubation, les lymphocytes en suspension sont soit directement analysés soit activés par un agent mitogène. Les monocytes-macrophages sont tout d'abord lavés plusieurs fois par du PBS puis remis en suspension par grattage mécanique et analysés directement.

b. Isolement des plaquettes.

Les plaquettes sont isolées soit selon la technique décrite précédemment soit selon la technique préconisée par Patscheke (1978).

Dans le premier cas, les plaquettes sont récupérées avec les lymphocytes et les monocytes à l'interface PBS/Lymphoprep. Le lavage de ces cellules à faible vitesse de centrifugation (200 g), permet de séparer les plaquettes des lymphocytes et des monocytes. Trois lavages de 10 min sont réalisés, les plaquettes en suspension sont récupérées dans le PBS.

Dans le second cas, le sang prélevé sur anticoagulant est centrifugé à 120 g pendant 15 min à température ambiante. Le plasma riche en plaquettes est recueilli puis centrifugé à 2.000 g pendant 15 min. Le culot plaquettaire est remis en suspension dans un tampon physiologique composé d'acide citrique (36 mM), de glucose (5 mM), de calcium (2 mM), de magnésium (1 mM), de sérum albumine bovine (0,35%) et d'apyrase (25 mg/l). Trois lavages à 2.000 g sont réalisés.

L'observation microscopique de la suspension plaquettaire montre que pour les deux techniques utilisées, la contamination des plaquettes par les autres cellules du sang ne dépasse pas 1%.

2. Activation des lymphocytes.

L'activation des lymphocytes est réalisée soit par la phytohémagglutinine (Nowell, 1960) soit par l'anticorps anti-CD3 (Yang et al., 1986). L'utilisation de l'anticorps anti-CD3 présente l'avantage de ne pas provoquer l'agglutination des lymphocytes et par conséquent de permettre leur analyse par cytofluorimétrie de flux.

Les lymphocytes isolés suivant le protocole décrit précédemment sont remis en suspension dans du RPMI 1640 de composition identique à celui décrit p. 89 mais supplémenté par 10% de sérum de Veau foetal. L'agent mitogène est additionné à raison de 5 $\mu\text{g/ml}$ pour la phytohémagglutinine (Industrie Biologique Française) et à raison de 50 ng/ml pour l'anticorps anti-CD3 (Immunotech). 200 ml de milieu de culture contenant 2×10^6 cellules/ml, sont répartis dans des boîtes de culture de 750 ml (Falcon). L'incubation dure 3 jours à 37°C dans 5% de $\text{CO}_2/95\%$ d'air. La viabilité des cellules est vérifiée par un test au bleu Trypan (Tennant, 1964).

B. REACTIFS UTILISES.

1. Ligand : la lactotransferrine.

Les quantités de lactotransferrine nécessaires à l'étude de son récepteur étant relativement importantes, nous n'avons pas utilisé la lactotransferrine provenant de la dégranulation des leucocytes polynucléaires mais la lactotransferrine isolée du lait de Femme.

La lactotransferrine est utilisée soit non fluorescente et à différents taux de saturation en fer soit fluorescente et saturée en fer.

La purification de la lactotransferrine selon le protocole décrit p. 183, permet d'obtenir une protéine saturée à 30% en fer. Le traitement de cette protéine par la méthode préconisée par Azari et Baugh (1967) (p. 183) conduit à l'obtention d'une lactotransferrine saturée en fer. La méthode mise au point par Mazurier et Spik (1980) (p. 184) permet de désaturer complètement la lactotransferrine.

Le marquage de la lactotransferrine saturée en fer par un composé fluorescent est réalisé sur la partie glycanique de cette

protéine (p. 184). En effet, au Laboratoire, Legrand et al. (1991) ont montré que le site de reconnaissance de la lactotransferrine pour le récepteur lymphocytaire (Mazurier et al., 1989) était masqué lors du couplage de la fluorescéine sur la partie protéique de la lactotransferrine. Suite à ces résultats, Legrand a mis au point une technique de couplage d'un dérivé de la fluorescéine sur la partie glucidique de la lactotransferrine et a montré que la lactotransferrine ainsi marquée (lactotransferrine-HyF) était capable de se fixer sur le récepteur lymphocytaire.

2. Anticorps polyclonaux.

Deux anticorps polyclonaux sont utilisés :

- des anticorps de Lapin anti-lactotransferrine préparés selon la technique de Vaitukaitis et al. (1971) et purifiés par chromatographie d'échange d'ions selon la méthodologie décrite p. 185,
- des anticorps de Chèvre anti-IgG de Lapin marqués à la fluorescéine. Ces anticorps sont achetés sous forme purifiés à la firme Sigma.

C. ETUDE DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LES DIFFERENTES CELLULES DU SANG HUMAIN PAR CYTOFLUORIMETRIE DE FLUX.

Les hématies représentent environ 95% des cellules circulantes et l'étude de la fixation de la lactotransferrine est réalisée sur 10 μ l de sang citraté fraîchement prélevé, dilué au 1/100^{ème}.

Dans le cas des neutrophiles, les incubations en présence de lactotransferrine sont réalisées sur 300 μ l de sang citraté. Les

neutrophiles sont ensuite analysés par cytofluorimétrie de flux après lyse des globules rouges à l'aide du tampon de lyse (FACS Brand lysing solution, Becton Dickinson).

L'étude de la fixation de la lactotransferrine sur les lymphocytes, les monocytes, les éosinophiles et les plaquettes est effectuée sur $0,5 \times 10^6$ cellules isolées selon les protocoles décrits p. 88.

Toutes les expériences sont réalisées à 4°C à l'exception de celles effectuées sur les plaquettes afin d'éviter l'activation de ces cellules.

1. Analyse de la fixation de la lactotransferrine par la technique directe.

Principe : la lactotransferrine fluorescente fixée spécifiquement à la surface des cellules est détectée par cytofluorimétrie de flux.

Les cellules sont incubées dans 100 μ l de tampon PBS en présence de 10^{-7} M ou de 5×10^{-6} M de lactotransferrine-HyF saturée en fer. De la sérotransferrine (0,2%), non reconnue par le récepteur de la lactotransferrine, est ajoutée dans le milieu d'incubation afin de diminuer les phénomènes d'adsorption non spécifiques de la lactotransferrine (Goavec et al., 1985). Les cellules sont incubées 30 min puis lavées 2 fois par du PBS et analysées en cytofluorimétrie de flux. La fixation non spécifique est estimée en incubant les cellules en présence d'un excès de lactotransferrine non marquée : 100 excès molaire lorsque la concentration initiale de lactotransferrine fluorescente est de 10^{-7} M et 20 excès molaire lorsque la concentration initiale de lactotransferrine fluorescente est de 5×10^{-6} M, dans le second cas, nous avons préféré ne pas utiliser une concentration plus importante de lactotransferrine qui aurait pu entraîner un phénomène de cytotoxicité.

2. Analyse de la fixation de la lactotransferrine par la technique indirecte.

Principe : la lactotransferrine fixée spécifiquement à la surface cellulaire est reconnue dans un premier temps par un anticorps de Lapin anti-lactotransferrine et dans un second temps par un anticorps de Chèvre anti-IgG de Lapin marqué à la fluorescéine. La fluorescence émise par les cellules est détectée par cytofluorimétrie de flux.

Les cellules sont incubées dans les conditions décrites précédemment à la différence que la lactotransferrine utilisée est non fluorescente, cette lactotransferrine purifiée selon le protocole décrit p... possède un degré de saturation en fer de 30%. Lorsque l'incubation en présence de lactotransferrine est terminée, le milieu réactionnel est aspiré et les cellules sont lavées 2 fois par du PBS, l'anticorps anti-lactotransferrine dilué au $1/40^{\text{ème}}$ est alors ajouté. Après 30 min d'incubation, les cellules sont lavées et additionnées de $100 \mu\text{l}$ d'anticorps anti-IgG de Lapin marqués au FITC et dilués au $1/80^{\text{ème}}$. La réaction se déroule pendant 30 min puis les cellules sont lavées, mises en suspension dans du PBS et analysées. La fixation non spécifique est estimée en incubant les cellules dans les mêmes conditions mais en absence de lactotransferrine.

D. ETUDE DE LA FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LES LYMPHOCYTES ACTIVES ET SUR LES PLAQUETTES EN FONCTION DE SON DEGRE DE SATURATION EN FER

Les expériences sont réalisées selon les techniques directe et

indirecte décrites précédemment. Pour chaque technique 4 mesures de fluorescence sont effectuées.

- Dans le cas de la technique directe, la première mesure correspond à la fluorescence spécifique émise par les cellules incubées en présence de 10^{-7} M de lactotransferrine-HyF saturée en fer. Les 3 autres mesures correspondent aux fluorescences non spécifiques émises par les cellules incubées dans les mêmes conditions mais en présence de 30 excès molaire de lactotransferrine non fluorescente saturée en fer pour la 2^{ème} mesure, saturée à 30% de fer pour la 3^{ème} mesure et dépourvue de fer pour la 4^{ème} mesure.

- Dans le cas de la technique indirecte, les 3 premières mesures correspondent à la fluorescence spécifique émise par les cellules incubées en présence de 10^{-7} M de lactotransferrine saturée en fer pour la 1^{ère} mesure, de lactotransferrine native saturée à 30% de fer pour la 2^{ème} mesure et d'apolactotransferrine dépourvue de fer pour la 3^{ème} mesure. La 4^{ème} mesure correspond à la fluorescence non spécifique émise par les cellules incubées en absence de lactotransferrine.

E. ANALYSE DES RESULTATS.

La fluorescence émise par les cellules est analysée grâce au cytofluorimètre FACScan Becton-Dickinson équipé d'un laser à argon émettant à 480 nm et d'un filtre à bande passante étroite, centré sur 525 nm, permettant la détection de la fluorescence verte. Les cellules en suspension sont entraînées dans une veine liquide dont la section restreinte contraint les cellules à se présenter individuellement lors de

leur interception par le faisceau lumineux. Lorsque la cellule traverse le faisceau lumineux, la lumière est diffractée selon 2 dimensions:

- diffraction axiale, proportionnelle à la taille de la cellule (Forward Scatter)
- diffraction à 90°, proportionnelle à la structure interne de la cellule (Side Scatter)

Les paramètres de taille et de structure rendent possible la distinction de différentes populations cellulaires. Sur le cytogramme, il est possible de sélectionner une population cellulaire à l'aide d'une fenêtre et d'en faire l'étude spécifique.

La fluorescence émise par les cellules est analysée sous forme d'histogrammes. Dans ces histogrammes, la surface des pics de fluorescence est proportionnelle au nombre de cellules fluorescentes, alors que la position des pics sur l'échelle de l'intensité de fluorescence est proportionnelle au nombre de molécules fluorescentes par cellule. La fixation spécifique d'un composé fluorescent à la surface des cellules analysées se caractérise par le déplacement du pic de fluorescence spécifique, vers de plus hautes intensités de fluorescence, par rapport au pic de fluorescence non spécifique. L'absence de fixation conduit à une superposition des pics de fluorescence spécifique et non spécifique.

La variation de la fluorescence moyenne du pic de fluorescence spécifique par rapport au pic de fluorescence non spécifique est calculée en utilisant la formule suivante :

$$\frac{(MFs - MFns) \times 100}{MFns}$$

MFs et MFns représentent les valeurs de fluorescence moyenne des pics de fluorescence spécifique et non spécifique.

III. RESULTATS.

Suivant la force de la liaison établie avec le ligand, les récepteurs peuvent être classés en deux catégories : les récepteurs à haute affinité dont le K_d est inférieur ou égal à 10^{-8} M et les récepteurs à faible affinité de K_d supérieur à 10^{-8} M.

Dans la littérature, les récepteurs de la lactotransferrine mis en évidence appartiennent à ces deux catégories (Tableaux IV à VIII, p. 45 à 55).

D'une façon générale, la concentration en ligand utilisée pour l'étude d'un récepteur est égale à 10 fois la valeur du K_d . Nous avons tout d'abord recherché la présence de récepteurs à haute affinité pour la lactotransferrine, pour cela, nous avons utilisé une concentration en lactotransferrine de 10^{-7} M, lorsque cette recherche s'est révélée négative, nous avons travaillé en présence de 5×10^{-6} M en lactotransferrine afin de mettre en évidence la présence de récepteurs à faible affinité.

Cette étude est réalisée par cytofluorimétrie de flux selon les techniques directes et indirectes décrites p. 93 et 94. La technique directe, qui fait intervenir la lactotransferrine couplée à un dérivé fluorescent sur la partie glycanique (lactotransferrine HyF), à pour avantage de démontrer la spécificité et la réversibilité de la fixation de la lactotransferrine. La technique indirecte fait intervenir la lactotransferrine, un premier anticorps anti-lactotransferrine et un second anticorps fluorescent. Cette technique qui démontre uniquement la spécificité de fixation à pour avantage de mettre en jeu une lactotransferrine non modifiée par un composé fluorescent, de plus cette technique beaucoup plus sensible permet de mettre en évidence des quantités très faibles de récepteurs.

L'analyse des cellules par cytofluorimétrie permet d'obtenir des résultats sous forme d'histogrammes de fluorescence (Fig. 15 à 19). Dans ces histogrammes, les pics de fluorescence spécifique et non spécifique sont représentés en fonction du nombre de cellules et de l'intensité de fluorescence émise par ces cellules.

L'ensemble des résultats a été illustré sous une autre forme d'histogrammes afin de comparer les réponses obtenues pour les différents types cellulaires étudiés (Fig. 20 et 21). Dans ces histogrammes l'augmentation de la fluorescence observée en présence de lactotransferrine est représentée pour chaque type cellulaire et pour chaque technique. L'augmentation de fluorescence est calculée selon la formule décrite p. 96.

A. LES HEMATIES.

L'étude de la fixation de la lactotransferrine à la surface des hématies a été réalisée directement à partir de sang citraté provenant d'individus sains. Les hématies représentent 95% des cellules circulantes humaines et nous avons considéré que le degré de pureté était suffisamment élevé pour ne pas délimiter ces cellules dans une fenêtre au niveau du cytogramme (Fig. 15, A; p. 99).

5 essais ont été réalisés pour chaque technique et pour chaque concentration en lactotransferrine, les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 15 p. 99. Dans cette figure, les histogrammes de fluorescence B et C représentent la fixation de la lactotransferrine, présentée à une concentration de 10^{-7} M, par la technique directe (B) et indirecte (C). Pour chacune des techniques utilisées, les pics de fluorescence spécifique (2) et non spécifique (1) sont superposables. Ces résultats démontrent l'absence de récepteurs à haute affinité pour

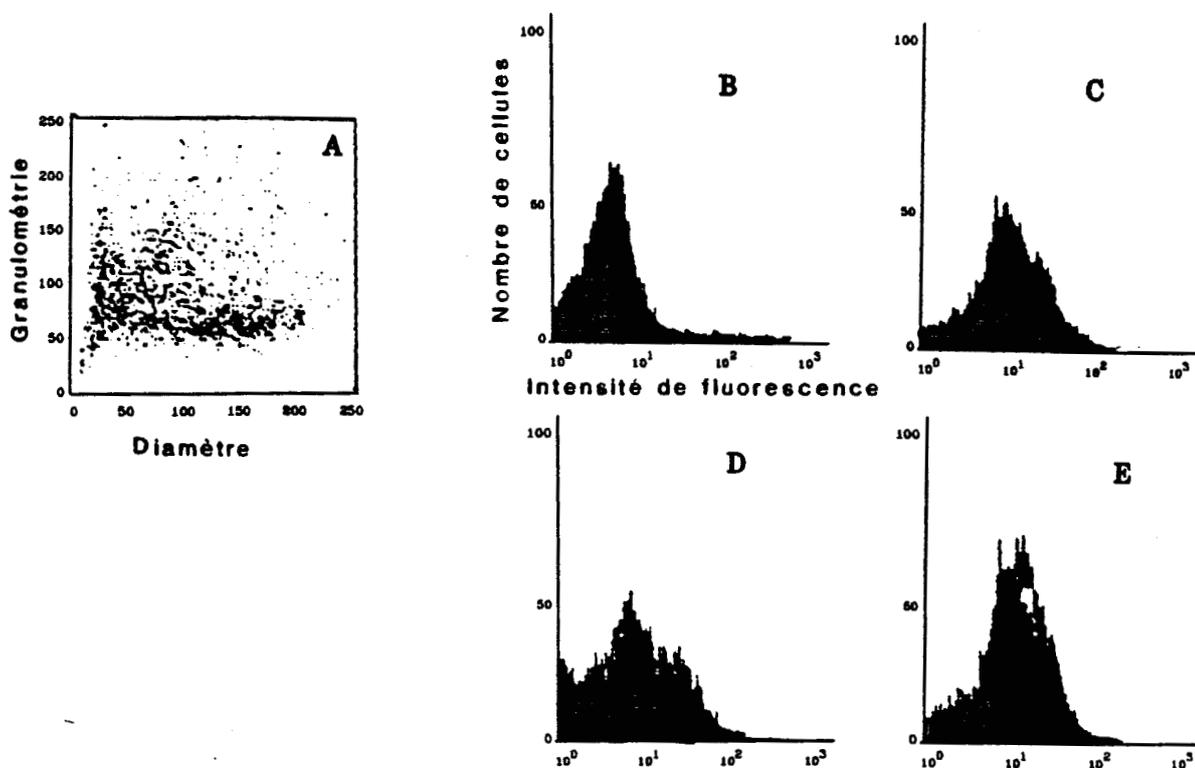


Figure 15 : Recherche, par cytofluorimétrie de flux, de la présence de récepteurs pour la lactotransferrine à haute affinité (B,C) et à faible affinité (D,E) à la surface des hématies du sang humain.

A : Cytogramme

B,D : Histogrammes de la technique directe

C,E : Histogrammes de la technique indirecte

Dans les histogrammes B,C,D,E il y a superposition des pics de fluorescence spécifique et non spécifique.

la lactotransferrine à la surface des hématies. Lorsque la lactotransferrine est présentée à une concentration de 5×10^{-6} M, les profils obtenus pour les techniques directe (D) et indirecte (E) sont similaires à ceux décrits précédemment et démontrent, par conséquent, l'absence de récepteurs à faible affinité pour la lactotransferrine.

B. LES NEUTROPHILES.

Les neutrophiles proviennent du sang d'individus sains. Les essais sont réalisés sur l'ensemble des cellules circulantes humaines selon le protocole décrit p. 92, mais seule la fluorescence émise par les neutrophiles est analysée par cytofluorimétrie de flux. Nous avons, pour cela, délimité les neutrophiles dans une fenêtre, ces cellules représentent 60 à 70% de la population leucocytaire et sont facilement repérables sur le cytogramme (Fig. 16, A; p. 101).

Lorsque la lactotransferrine est présentée à une concentration de 10^{-7} M, aucune fixation n'est observée et ceci pour les deux techniques utilisées et pour les 5 essais réalisés. Les neutrophiles ne possèdent donc pas de récepteurs à haute affinité pour la lactotransferrine. Par contre, au cours des 3 essais effectués en présence de 5×10^{-6} M de lactotransferrine une fixation est observée (Fig. 16, p. 101) par la technique directe (B) et par la technique indirecte (C). Cette fixation est caractérisée par le déplacement du pic de fluorescence spécifique vers de plus hautes intensités de fluorescence.

La technique directe fait intervenir une lactotransferrine saturée en fer alors que la technique indirecte met en jeu une lactotransferrine native saturée à 30% en fer. Ces deux lactotransferrines se fixent à la surface des neutrophiles, le degré de saturation en fer ne semble donc pas avoir d'influence sur la reconnaissance de cette protéine par les neutrophiles.

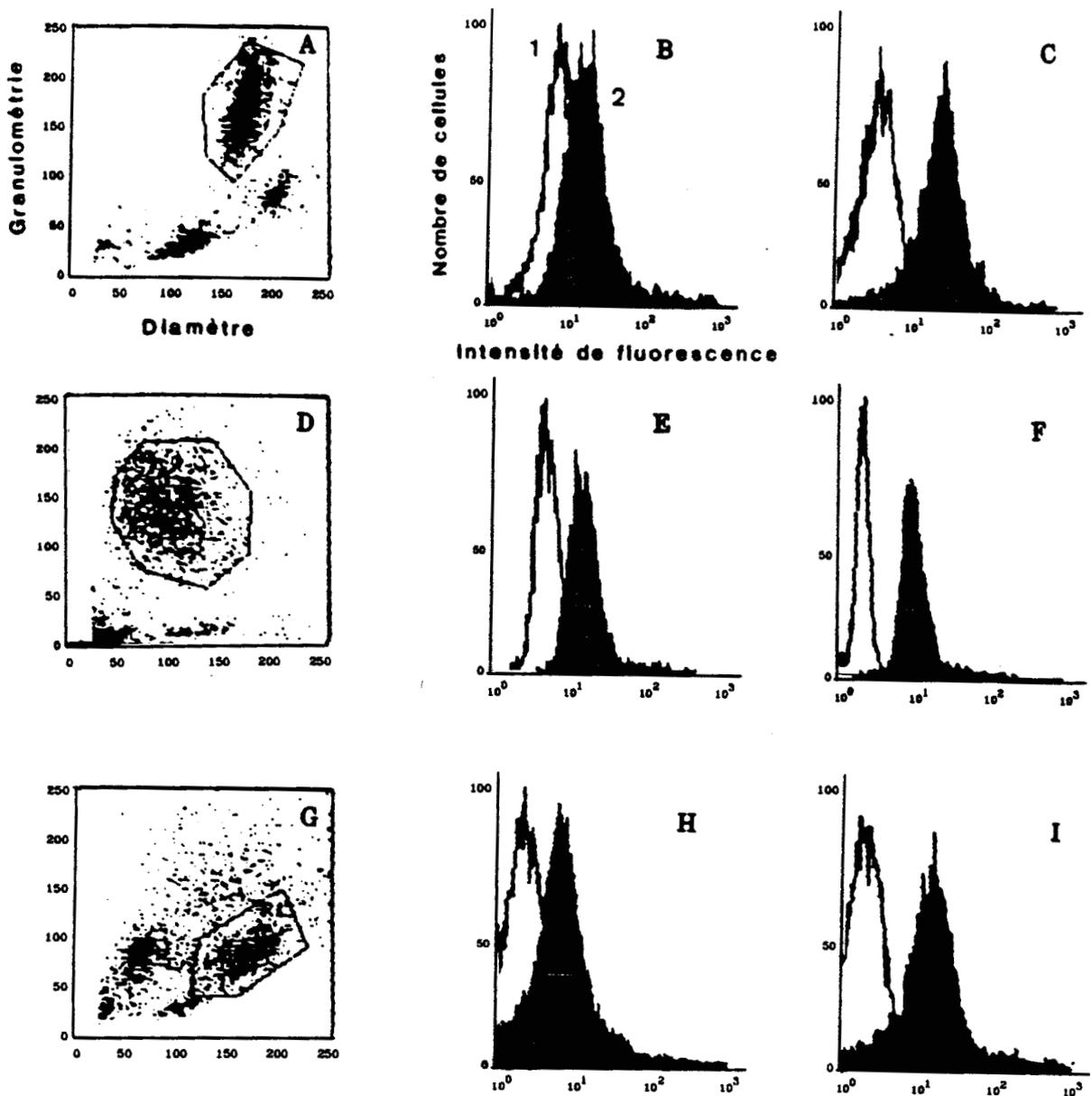


Figure 16 : Mise en évidence, par cytofluorimétrie de flux, de la présence de récepteurs à faible affinité pour la lactotransferrine à la surface des neutrophiles (B,C), des éosinophiles (E,F) et des monocytes/macrophages (H,I) du sang humain.

A,D,G : Cytogrammes

B,E,H : Histogrammes de la technique directe

C,F,I : Histogrammes de la technique indirecte

1 : Fixation non spécifique

2 : Fixation spécifique

C. LES EOSINOPHILES.

Les éosinophiles proviennent du sang d'individus atteints d'hyperéosinophilie et de cellules de sang de cordon ombilical différenciées in vitro en éosinophiles.

Lorsque le degré de pureté des éosinophiles circulants est inférieur à 95%, nous avons délimité ces cellules dans une fenêtre afin d'en faire l'étude spécifique (Fig. 16, D; p. 101).

La recherche de récepteurs à haute affinité pour la lactotransferrine a été réalisée sur les éosinophiles de 15 malades différents et sur 3 échantillons de cellules de sang de cordon différenciées en éosinophiles. Au cours de ces essais, aucune fixation spécifique de la lactotransferrine n'a été observée. Par contre, la recherche de récepteurs à faible affinité pour la lactotransferrine, réalisée sur 4 échantillons d'éosinophiles de différents malades, nous a donnée des résultats positifs. Les résultats obtenus par la technique directe (E) et par la technique indirecte (F) sont illustrés dans la figure 16 (p. 101).

D. LES LYMPHOCYTES.

L'étude de la fixation de la lactotransferrine a été réalisée sur les lymphocytes quiescents isolés du sang d'individus sains et sur ces mêmes lymphocytes activés par l'anticorps anti-CD3.

1. Lymphocytes quiescents.

5 essais ont été réalisés à partir de lymphocytes quiescents

provenant de différents individus sains. Les résultats obtenus montrent que, quelque soit la concentration utilisée, ces cellules ne fixent pas de façon significative la lactotransferrine et ne possèdent donc pas de récepteurs pour cette protéine.

2. Lymphocytes activés.

a. Mise en évidence de récepteurs à haute affinité.

Au cours de l'activation des lymphocytes, les paramètres de taille et de structure interne de ces cellules augmentent, dans le cytogramme A de la figure 17, A (p. 104), ces cellules ont été entourées par une fenêtre.

En présence d'une concentration de 10^{-7} M en lactotransferrine, les résultats obtenus par la technique directe (Fig. 17, B) et par la technique indirecte (Fig. 17, C) montrent une fixation spécifique et réversible de cette protéine à la surface des lymphocytes activés par l'anticorps-CD3.

Lorsque les expériences sont réalisées en présence d'une concentration en lactotransferrine 2 fois plus élevée, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'intensité de fluorescence émise par ces cellules. Ces résultats démontrent que, dans les conditions expérimentales utilisées, les sites de fixation à haute affinité présents à la surface des lymphocytes activés sont saturés.

Le caractère spécifique, saturable et réversible de la fixation de la lactotransferrine et la faible concentration en lactotransferrine utilisée démontrent la présence de récepteurs spécifiques et de haute affinité pour cette protéine à la surface des lymphocytes activés.

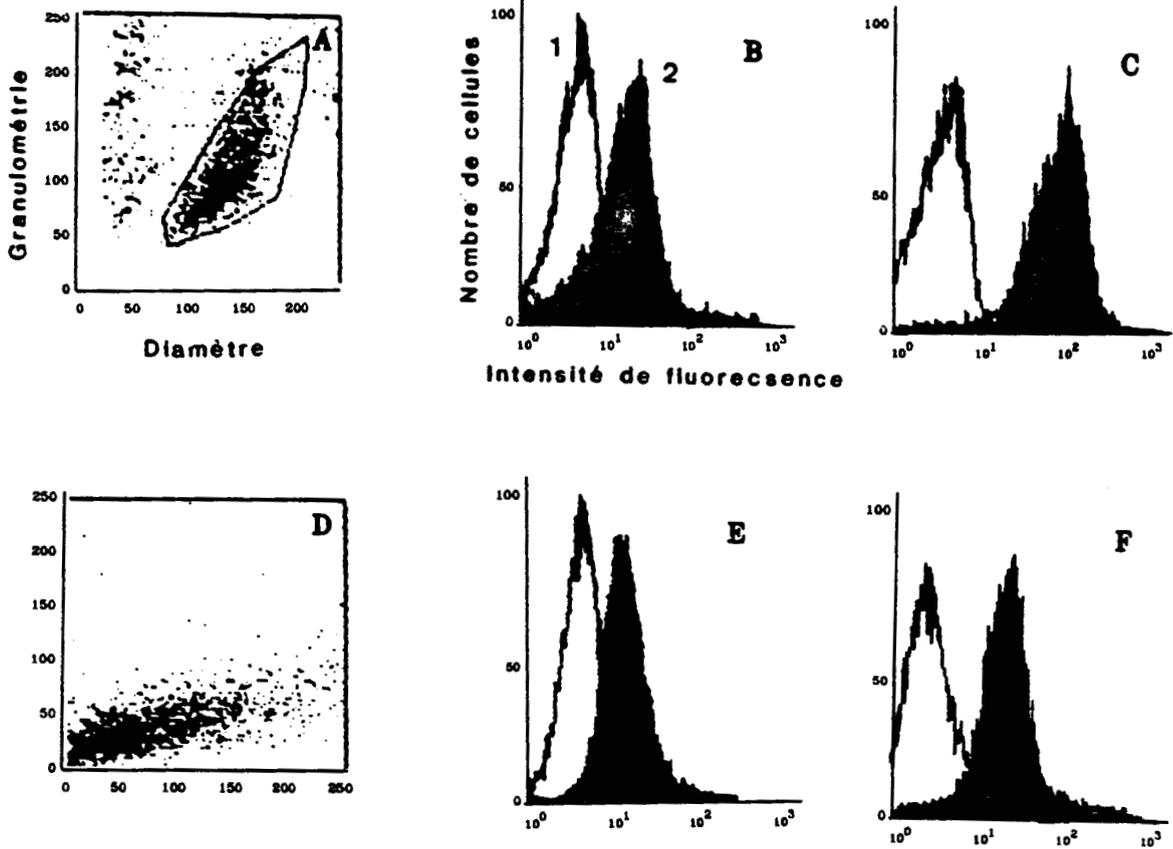


Figure 17 : Mise en évidence, par cytofluorimétrie de flux, de la présence de récepteurs à haute affinité pour la lactotransferrine à la surface des lymphocytes activés (B,C) et des plaquettes (E,F) du sang humain.

A,D : Cytogrammes

B,E : Histogrammes de la technique directe

C,F : Histogrammes de la technique indirecte

1 : Fixation non spécifique

2 : Fixation spécifique

- b. Influence de la saturation en fer de la lactotransferrine sur la reconnaissance de cette protéine par le récepteur lymphocytaire.

L'influence de la saturation en fer de la lactotransferrine a été étudiée :

- par la technique directe (p. 94), en comparant l'inhibition de la fixation la lactotransferrine-HyF saturée en fer par l'apolactotransferrine dépourvue en fer (Fig. 18, A; p. 106), la lactotransferrine native saturée à 30% en fer (Fig. 18, B) ou la lactotransferrine saturée en fer (Fig. 18, C). La superposition des trois histogrammes de fluorescence (Fig. 18, D) montre une inhibition identique de la fixation de la lactotransferrine-HyF par les trois lactotransferrine utilisées.

- par la technique indirecte (p. 94), en comparant la fixation de l'apolactotransferrine (Fig. 19, A; p. 107), de la lactotransferrine native (Fig. 19, B) et de la lactotransferrine saturée en fer (Fig. 19, C). La superposition des trois histogrammes de fluorescence (Fig. 19, D) montre que le récepteur lymphocytaire interagit avec la lactotransferrine quelque soit son degré de saturation en fer et qu'il n'existe pas de différences d'affinité importante entre les différentes formes de lactotransferrine.

E. LES MONOCYTES/MACROPHAGES.

Les monocytes/macrophages sont isolés à partir du sang d'individus sains selon la technique décrite p. 89.

Les 5 essais effectués sur ces cellules montrent que celles-ci ne possèdent pas de récepteurs à haute affinité pour la lactotransferrine.

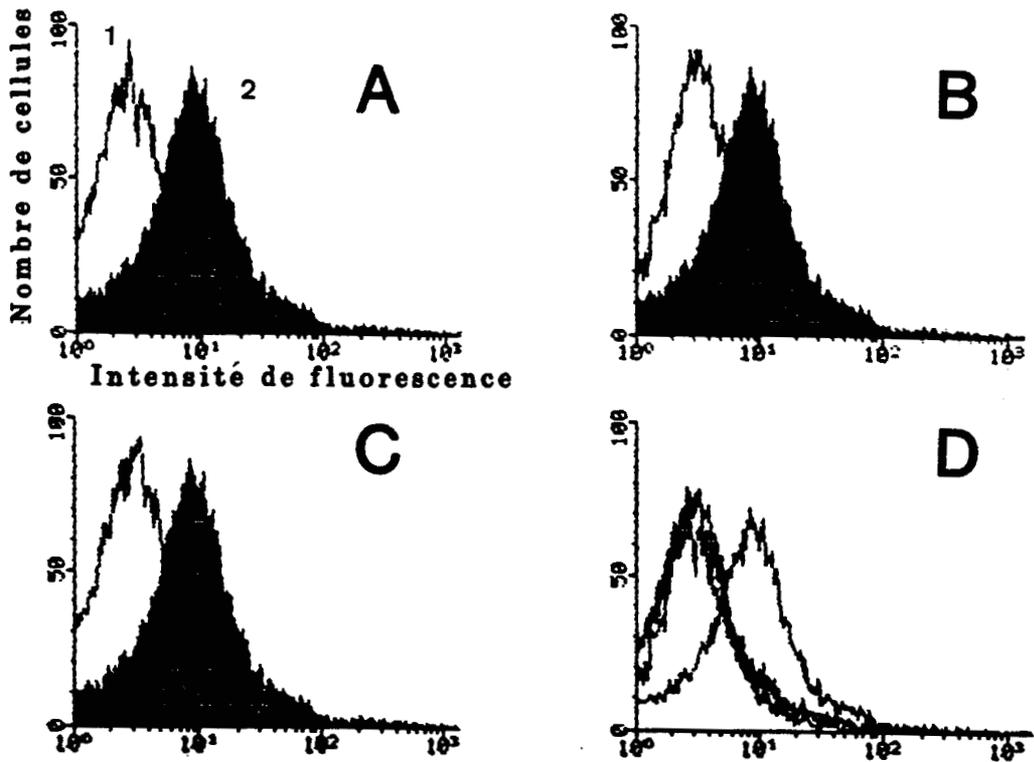


Figure 18 : Etude, par cytofluorimétrie de flux et par la technique directe, de l'inhibition de la fixation de la lactotransferrine-HyF sur le récepteur lymphocytaire par un excès de lactotransferrine non fluorescente à différents degrés de saturation en fer.

A : Lactotransferrine dépourvue de fer

B : Lactotransferrine saturée à 30% en fer

C : Lactotransferrine saturée en fer

D : Superposition des histogrammes A, B et C

1 : Inhibition de la fixation de la lactotransferrine-HyF

2 : Fixation de la lactotransferrine-HyF

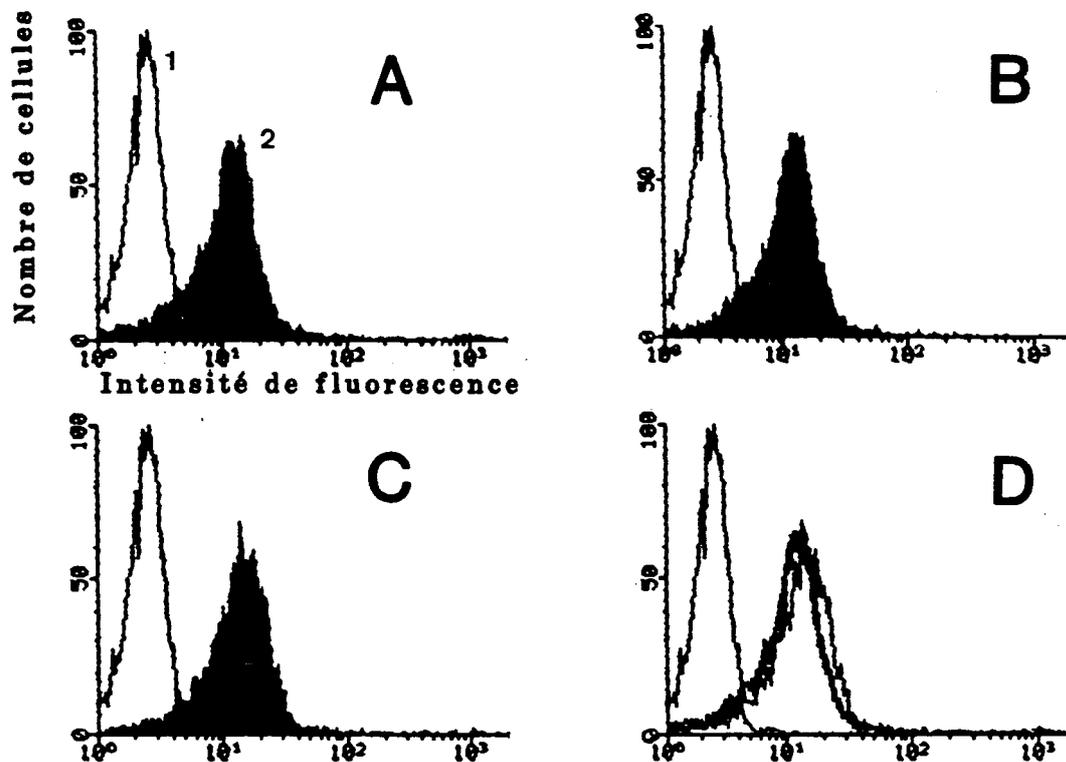


Figure 19 : Etude, par cytofluorimétrie de flux et par la technique indirecte, de la fixation de la lactotransferrine à différents degrés de saturation en fer sur le récepteur lymphocytaire.

- A : Lactotransferrine dépourvue de fer
 - B : Lactotransferrine saturée à 30% en fer
 - C : Lactotransferrine saturée en fer
 - D : Superposition des histogrammes A, B et C
- 1 : Fixation non spécifique
- 2 : Fixation spécifique.

Une fixation spécifique et réversible est, par contre, observée en présence de 5×10^{-6} M de lactotransferrine (Fig. 16, H,I; p. 101). Cette fixation démontre la présence de sites de fixation à faible affinité pour la lactotransferrine et suggère par conséquent, la présence de récepteurs à faible affinité pour cette protéine.

F. LES PLAQUETTES.

1. Mise en évidence de récepteurs à haute affinité.

Les plaquettes proviennent du sang d'individus sains. L'étude de la fixation de la lactotransferrine à la surface des plaquettes a été réalisée sur 20 échantillons de cellules.

Les histogrammes de fluorescence E et F de la figure 17 (p. 104) montrent une fixation spécifique de la lactotransferrine à la surface des plaquettes. Cette fixation observée pour une concentration en lactotransferrine de 10^{-7} M, est réversible puisqu'elle peut être déplacée par un excès de lactotransferrine non fluorescente (Histogramme E). Cette fixation est également saturable, en effet, l'intensité de fluorescence émise par les cellules et par conséquent le nombre de molécules de lactotransferrine fixé à la surface cellulaire est identique pour des incubations réalisées en présence de 10^{-7} M et de 2×10^{-7} M de lactotransferrine.

La fixation spécifique, saturable et réversible de la lactotransferrine à la surface des plaquettes et la faible concentration en lactotransferrine utilisée démontrent la présence de récepteurs à haute affinité à la surface de ces cellules.

2. Influence de la saturation en fer de la lactotransferrine sur la reconnaissance de cette protéine par le récepteur plaquettaire.

Comme dans le cas du récepteur lymphocytaire à haute affinité, nous avons recherché à savoir si le degré de saturation en fer de la lactotransferrine avait une influence sur sa fixation sur le récepteur plaquettaire, les techniques utilisées sont identiques.

Les expériences de compétition entre la lactotransferrine-HyF saturée en fer et les lactotransferrines non fluorescentes à différents degrés de saturation en fer montrent que les trois lactotransferrines utilisées, la lactotransferrine saturée en fer, la lactotransferrine saturée à 30% en fer et la lactotransferrine dépourvue de fer, inhibent de la même façon la fixation de la lactotransferrine-HyF saturée en fer sur le récepteur plaquettaire. De plus, lorsque nous étudions directement la fixation de ces trois lactotransferrines sur le récepteur plaquettaire, nous observons que l'intensité de fluorescence émise par les cellules et par conséquent le nombre de molécules de lactotransferrine fixées à la surface cellulaire est identique.

Ces résultats démontrent qu'il n'existe pas de différence d'affinité importante entre les lactotransferrines à différents degrés de saturation en fer et le récepteur plaquettaire.

G. PRESENTATION DE L'ENSEMBLE DES RESULTATS.

Pour chaque expérience, nous avons calculé, à partir des valeurs de fluorescence moyenne données par l'ordinateur, la variation de la fluorescence du pic spécifique par rapport au pic non spécifique selon la formule décrite p. 96. Dans les histogrammes des figures 20 et 21, cette variation est représentée en fonction du type cellulaire et de

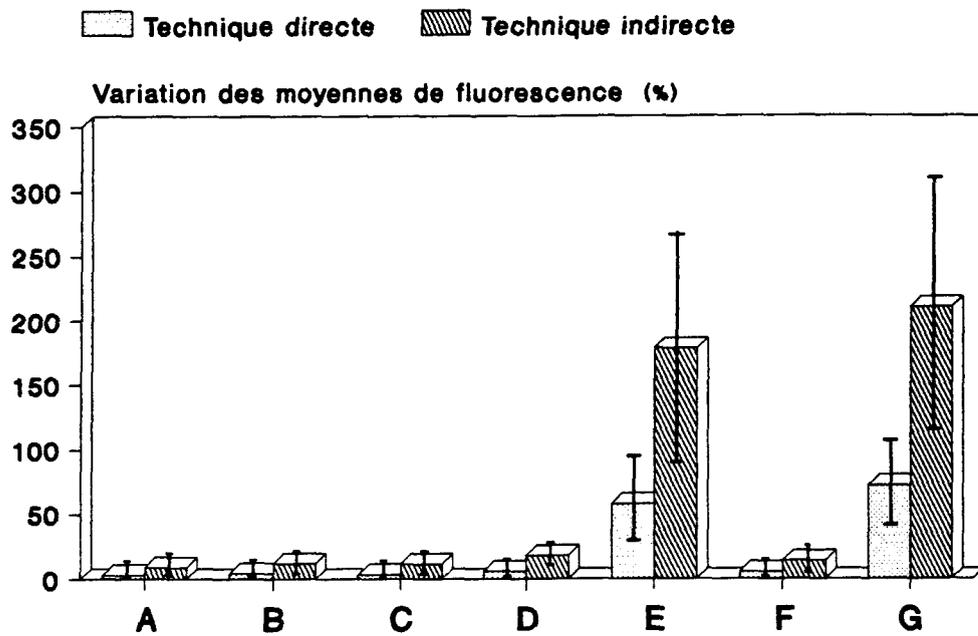


Figure 20 : Représentation des variations de fluorescence observées après incubation des cellules en présence de 10^{-7} M de lactotransferrine.

A : Hématies

B : Neutrophiles

C : Eosinophiles

D : Lymphocytes quiescents

E : Lymphocytes activés

F : Monocytes/macrophages

G : Plaquettes

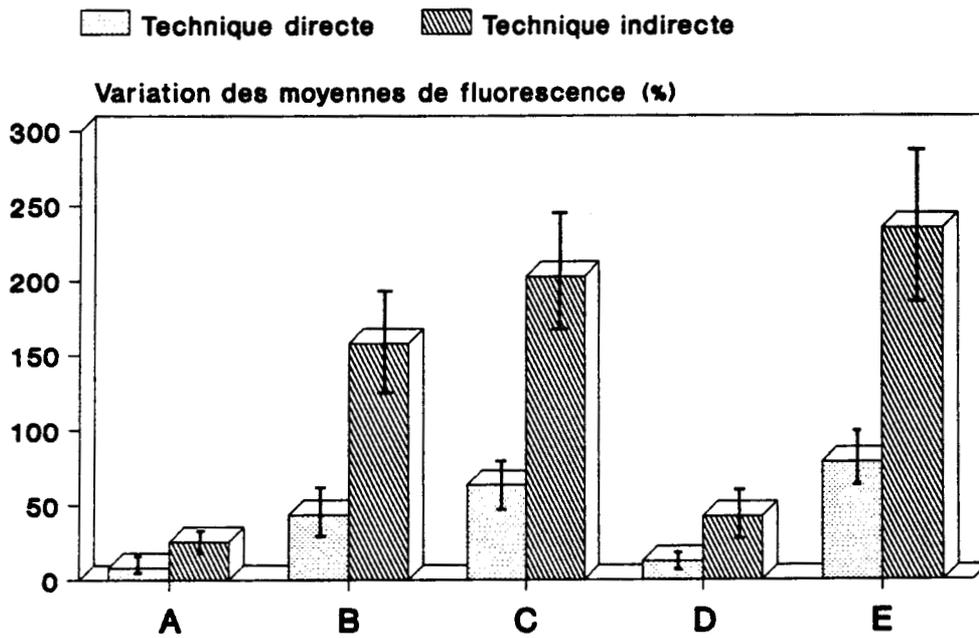


Figure 21 : Représentation des variations de fluorescence observées après incubation des cellules en présence de 5×10^{-6} M de lactotransferrine.

A : Hématies

D : Lymphocytes quiescents

B : Neutrophiles

E : Monocytes/macrophages

C : Eosinophiles

la technique utilisée.

Dans un premier temps, les expériences ont été réalisées, sur l'ensemble des cellules circulantes humaines, en présence d'une concentration de 10^{-7} M en lactotransferrine. Les résultats illustrés dans la figure 20 (p. 110) montrent qu'à cette concentration, seuls les lymphocytes activés et les plaquettes reconnaissent spécifiquement la lactotransferrine. Les variations de fluorescence calculées pour ces deux types cellulaires sont proches.

Dans un second temps, sur les cellules n'ayant pas interagit avec la lactotransferrine, nous avons réalisé ce même type d'expérience mais avec une concentration 50 fois plus importante en lactotransferrine. Dans ces conditions, une fixation spécifique de la lactotransferrine est observée à la surface des neutrophiles, des éosinophiles et des monocytes/macrophages (Fig. 21, p. 111). Les variations de fluorescence calculées sont par ordre décroissant, plus importantes à la surface des monocytes/macrophages, des éosinophiles et des neutrophiles. Ces variations sont du même ordre de grandeur que celle observée pour les lymphocytes activés.

La variation de fluorescence est proportionnelle au nombre de molécules de lactotransferrine fixées à la surface cellulaire et par conséquent au nombre de sites de fixation. Dans le cas des lymphocytes activés et des plaquettes nous avons démontré que la concentration en lactotransferrine utilisée permettait de saturer complètement les sites de fixations présents à la surface de ces cellules. Nous pouvons donc estimer que le nombre de récepteurs de la lactotransferrine exprimés à la surface des lymphocytes activés et des plaquettes est similaire.

III. CONCLUSION.

Les résultats que nous avons obtenus nous ont permis de démontrer :

1 - La présence de sites de fixation à haute affinité pour la lactotransferrine à la surface des lymphocytes activés et des plaquettes. Le caractère spécifique saturable et réversible de la fixation de la lactotransferrine à la surface de ces cellules et la faible concentration en lactotransferrine utilisée nous démontre que l'interaction de cette protéine avec les lymphocytes activés et les plaquettes fait intervenir un récepteur spécifique et de haute affinité.

Ces résultats confirment d'une part ceux obtenus par Mazurier et al. (1989) pour les lymphocytes activés et conduisent, d'autre part, à la découverte de l'existence, jusqu'à présent jamais décrite, de récepteurs à haute affinité pour la lactotransferrine à la surface des plaquettes. La mise en évidence de récepteurs à haute affinité pour la lactotransferrine à la surface des plaquettes est cependant en contradiction avec les travaux de Bennett et Davis (1981) et de Birgens et al. (1984). En effet, ces auteurs démontrent par des expériences de Scatchard (1949) que la lactotransferrine marquée à l'iode ^{125}I ne se fixe pas à la surface des plaquettes. Nous avons tenté, par des expériences de Scatchard, de déterminer avec précision les paramètres de fixation de la lactotransferrine à la surface des plaquettes, cependant, nous n'avons pas obtenus de résultats satisfaisants. En effet nous avons observé, par cette méthode, une fixation très importante de la lactotransferrine sur les plaquettes, cependant cette fixation n'a pas pu être déplacée par un excès de lactotransferrine non marquée. Les différents résultats obtenus entre nos travaux et ceux de Bennett et

Davis (1981) et de Birgens et al. (1984) pourraient donc être liés aux différentes méthodologies utilisées.

L'expression de récepteurs à la surface cellulaire est liée à un effet biologique au niveau de la cellule. Dans la littérature, de nombreux rôles ont été décrits pour la lactotransferrine, la modulation de la synthèse d'anticorps (p. 81) (Duncan et McArthur, 1981. Zimecki et al., 1991), la migration des cellules immunocompétentes sur le lieu de l'inflammation (P. 77) (Oseas et al., 1981; Boxer et al., 1982) et la prolifération des lymphocytes (p. 71) (Hashizume et al., 1983, 1987; Hashorn et al., 1986; Slater et Fletcher, 1987a, 1987b; Mazurier et al., 1989) pourraient être contrôlées, en partie, par la présence de récepteurs de la lactotransferrine que nous avons mis en évidence à la surface des lymphocytes activés. En ce qui concerne le récepteur plaquettaire, récemment, de nombreux auteurs (Harfenist et al., 1988; Mazoyer et al., 1990; Drouet et al., 1990; Sollier et al., 1990) ont démontré que le tetrapeptide KRDS présent dans un coude β de la lactotransferrine possédait une action anti-plaquettaire (p. 84), nous pouvons supposer que cette action fasse intervenir le récepteur plaquettaire que nous avons mis en évidence.

2 - La présence de sites de fixation à faible affinité pour la lactotransferrine à la surface des leucocytes polynucléaires, des monocytes/macrophages et des éosinophiles. La fixation spécifique et réversible de la lactotransferrine à la surface de ces cellules est probablement liée à la présence de récepteurs à faible affinité pour la lactotransferrine. Cependant, il ne faut pas exclure la possibilité d'une interaction de type électrostatique liée au caractère basique de la lactotransferrine et à la concentration élevée en lactotransferrine utilisée.

En ce qui concerne les leucocytes polynucléaires, Maneva et al. (1983) décrivent la présence d'un faible nombre ($0,04 \cdot 10^6$ /cellule) de récepteurs pour la lactotransferrine de très haute affinité ($K_d = 4,5 \cdot 10^{-10}$ M), la présence de ces récepteurs n'a pas été retrouvée même par la technique indirecte qui est cependant très sensible. Les résultats que nous avons obtenus confirment, par contre, la présence de récepteurs à faible affinité décrits par ces mêmes auteurs et par Birgens et al. en 1984. Ces récepteurs pourraient intervenir dans la migration des neutrophiles sur le lieu de l'inflammation (p. 77) (Oseas et al., 1981; Boxer et al., 1982) et dans l'activité bactéricide de ces cellules (p. 73) (Ambruso et Johnston, 1981; Bannister et al., 1982; Klebanoff et Waltersdorff, 1990)

Les récepteurs de faible affinité pour la lactotransferrine à la surface des monocytes/macrophages, mis en évidence au cours de cette étude, ont été préalablement décrits par de nombreux auteurs (Tableau V, p. 49). De nombreux rôles ont été attribués aux récepteurs de la lactotransferrine présents à la surface des monocytes et des macrophages dont principalement une contribution à l'hyposidérémie inflammatoire (p. 73) (van Snick et al., 1974; Sawatzki et al., 1983), la régulation de la myélopoïèse (p. 78) (Broxmeyer et al., 1978, 1983a, 1983b, 1984; Bagby et al., 1981, 1983a, 1983b, 1986; Zucali et al., 1989) et l'activité cytotoxique des monocytes (p.82) (Nishiya et Horwitz, 1982; Horwitz et al., 1984; McCornick et al., 1991a, 1991b).

La fixation à faible affinité de la lactotransferrine à la surface des éosinophiles n'avait, jusqu'à présent jamais été mise en évidence, il est important de noter que contrairement aux autres cellules étudiées, les éosinophiles ne proviennent pas du sang d'individus sains mais du sang d'individus atteints d'hyperéosinophilie. Dans la littérature nous

n'avons pas retrouvé d'articles concernant les effets biologiques liés à une interaction de la lactotransferrine avec les éosinophiles.

3 - L'absence de récepteurs de la lactotransferrine à la surface des hématies et des lymphocytes quiescents. L'absence d'interactions entre la lactotransferrine et les hématies a été décrite par Zapolski et Princiotto en 1976 puis par Cox et al. en 1979. En ce qui concerne les lymphocytes quiescents, Birgens et al. (1984) mettent en évidence, par la technique de Scatchard (1949), la présence de récepteurs à faible affinité à la surface de ces cellules. Dans la littérature, les rôles pouvant être liés à une interaction de la lactotransferrine avec les lymphocytes semblent être plutôt ciblés sur les lymphocytes activés à la surface desquels nous avons mis en évidence des récepteurs à haute affinité pour cette protéine.

4 - La partie glycanique de la lactotransferrine ne semble pas jouer de rôle clé dans le mécanisme de reconnaissance de cette protéine puisque l'utilisation d'une lactotransferrine modifiée au niveau de sa partie glycanique par couplage avec un composé fluorescent nous a permis de démontrer la fixation de cette protéine à la surface des lymphocytes activés, des plaquettes, des neutrophiles, des éosinophiles et des monocytes/macrophages.

5 - Le taux de saturation en fer de la lactotransferrine ne semble pas être un facteur prédominant dans le mécanisme de reconnaissance de cette protéine. Les études réalisées sur les récepteurs lymphocytaire et plaquettaire montrent qu'il n'existe pas de différence d'affinité importante entre les lactotransferrines saturée en fer, native ou dépourvue de fer. De même, la fixation de la lactotransferrine sur son

récepteur entérocytaire se fait indépendamment de son taux de saturation en fer (Hu et al., 1988; Davidson et Lönnerdal, 1989; Derisbourg, 1991). Le mécanisme d'interaction de la lactotransferrine avec son récepteur semble donc différent de celui décrit pour la sérotransferrine (p. 29) qui possède, à pH neutre, une différence d'affinité 20 fois supérieure pour la forme diferrique que pour la forme monoferrique. S'il n'existe pas de différence d'affinité importante entre les différentes formes de lactotransferrine, nous ne pouvons pas exclure un rôle de cette protéine lié à un apport en fer. En effet, plusieurs rôles de la lactotransferrine ont été attribués au fer qu'elle transporte : rôles dans l'activité bactéricide des neutrophiles (Bullen et Armstrong, 1979), dans l'hyposidérémie inflammatoire (van Snick et al., 1974) et dans la stimulation de la croissance des lymphocytes circulants humains activés par la phytohémagglutinine (Mazurier et al., 1989).

La suite de notre travail porte sur l'étude des récepteurs responsables de la fixation à haute affinité de la lactotransferrine : les récepteurs lymphocytaire et plaquettaire. Afin d'identifier ces récepteurs et de comparer leurs propriétés structurales nous les avons purifiés, par chromatographie d'affinité, à partir des lysats cellulaires.

Les récepteurs exprimés à la surface cellulaire peuvent être, par différents mécanismes, libérés dans le milieu extérieur (Gavin et al., 1972; Pan et Johnston, 1983, 1984; Weber et al., 1984; Rubin et al., 1985; Orchansky et al., 1988; Selveraj et al., 1988). Nous avons donc également recherché et purifié le récepteur de la lactotransferrine dans le milieu de culture des lymphocytes activés.

PURIFICATION DES RECEPTEURS LYMPHOCYTAIRE ET
PLAQUETTAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE.

I. INTRODUCTION.

Dans ce chapitre nous décrivons l'isolement, par chromatographie d'affinité, des récepteurs responsables de la fixation à haute affinité de la lactotransferrine : le récepteur des lymphocytes activés et le récepteur des plaquettes.

Dans un premier temps, la purification de ces récepteurs a été réalisée à partir de lysats cellulaires, deux techniques de purification ont été utilisées. La première technique, préconisée par Mazurier et al. (1989), met en jeu une colonne d'anticorps anti-lactotransferrine immobilisés, sur laquelle est retenu spécifiquement le complexe lactotransferrine-récepteur. Au cours de nos travaux, nous avons adapté cette technique, mise au point sur de faibles quantités de cellules, à une purification à plus grande échelle. Cette technique de purification étant relativement longue, nous avons tenté de purifier le récepteur de la lactotransferrine par une seconde technique plus rapide mettant en jeu une colonne de lactotransferrine immobilisée.

La libération, dans le milieu extracellulaire, des récepteurs de la sérotransferrine présents à la surface cellulaire a été décrite dans de nombreux cas (p. 42). Ce phénomène a été mis en évidence pour un grand nombre de récepteurs dont le récepteur de l'interleukine-2 (Rubin et al., 1985), de l'EGF (Weber et al., 1984), du PDGF (Orchansky et al., 1988), de l'insuline (Gavin et al., 1972). Dans un second temps, nous avons donc recherché et purifié le récepteur de la lactotransferrine dans le milieu de culture des lymphocytes activés.

Nous avons, pour cela, utilisé et adapté la technique de purification mettant en jeu la colonne d'anticorps anti-lactotransferrine.

Dans la suite de nos travaux, le récepteur exprimé à la surface cellulaire est appelé récepteur membranaire, le récepteur libéré dans le milieu de culture est appelé récepteur soluble.

II. MODE OPERATOIRE.

A. REACTIFS.

- Antiprotéases : Les antiprotéases ont été utilisés soit seuls et à une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ pour le diisopropyl fluorophosphate soit en mélange : - 1 mM de phenylmethylsulfonyl-fluoride ou PMSF

(Boehringer Mannheim), 1 mM phénantroline (Sigma) et 0,5 μM aprotinine (Boehringer Mannheim).

- 1 mM PMSF, 1 mM phénantroline, 0,5 μM aprotinine et 10 μM pepstatine (Boehringer Mannheim).

Les antiprotéases sont additionnés aux lysats cellulaires et dans les tampons urée 2 M et 6 M.

- Anticorps : les anticorps polyclonaux anti-lactotransferrine humaine sont préparés chez le Lapin selon la technique de Vaitukaitis et al. (1971). Les anticorps polyclonaux anti-myosine humaine, anti-actine humaine et anti-sérum albumine bovine proviennent de la firme Interchim. Les anticorps monoclonaux anti-GPIIb-IIIa proviennent de la firme Serotec.

B. PURIFICATION DU RECEPTEUR MEMBRANAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE.

1. Préparation du lysat cellulaire.

Les lymphocytes activés ou les plaquettes sont lavés dans du PBS froid puis resuspendus dans un volume minimum et placés dans la glace. Une solution de PBS, Triton X-100 2% est additionnée à la suspension cellulaire de façon à obtenir une concentration finale de 1%. Les anti-protéases sont alors immédiatement ajoutés afin d'éviter la dégradation du récepteur. Le tube est placé sous agitation rotative pendant 30 min à 4°C. Le matériel cellulaire non solubilisé est éliminé par centrifugation (10.000 g, 15 min). Les lysats cellulaires sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation, celle-ci intervenant au maximum dans les 2 mois.

2. Chromatographies d'affinité.

Toutes les chromatographies sont réalisées à 4°C, à partir de lysats cellulaires rassemblés de façon à obtenir un lysat correspondant à environ 10^8 à 10^9 cellules. Les protéines membranaires exprimées à la surface cellulaire peuvent être préalablement marquées à l'iode ^{125}I selon le protocole décrit p. 186.

a. Colonne de lactotransferrine immobilisée.

Le lysat cellulaire est déposé sur la colonne de lactotransferrine immobilisée (1,3 x 7,5 cm ou 10 ml de gel) équilibrée dans le PBS,

Triton X-100 0,1%. La colonne est ensuite lavée par 50 ml de tampon d'équilibration puis par 25 ml de ce même tampon supplémenté par de l'urée 2 M. Ce traitement permet d'éliminer les constituants fixés de façon non spécifique sur la colonne. Une concentration d'urée de 6M dans le tampon PBS, Triton X-100 0,1% (15 ml) permet ensuite de décrocher les protéines fixées spécifiquement sur la colonne. La colonne est enfin rincée par le tampon d'équilibration. Les fractions urée 2 M et urée 6 M sont dialysées contre du PBS, Triton X-100 0,1% puis congelées à - 20°C ou directement analysées en gel de polyacrylamide selon le protocole décrit p. 187 La purification du récepteur de la lactotransferrine sur colonne de lactotransferrine immobilisée est schématisée dans la figure 22 p. 122.

b. Colonne d'anticorps anti-lactotransferrine immobilisés.

La purification du récepteur de la lactotransferrine sur colonne d'anticorps anti-lactotransferrine est réalisée selon le protocole décrit par Mazurier et al. (1989).

Le lysat cellulaire est incubé pendant une nuit à 4°C en présence de lactotransferrine en concentration finale de 10^{-6} M, les protéines sont ensuite précipitées par 30% de sulfate d'ammonium. Le précipité est repris dans un volume minimum de PBS, Triton X-100 0,1% et dialysé contre ce même tampon avant d'être déposé sur la colonne d'anticorps anti-lactotransferrine immobilisés (10 ml). La colonne est d'abord rincée par 50 ml de PBS, Triton X-100 0,1%, puis par 25 ml de PBS, Triton X-100 0,1%, urée 2 M afin d'éliminer les constituants fixés de façon non spécifique. Le récepteur de la lactotransferrine est élué par 15 ml de PBS, Triton X-100 0,1%, urée 6 M. L'affinité anticorps-antigène est supérieure à l'affinité ligand-récepteur et après

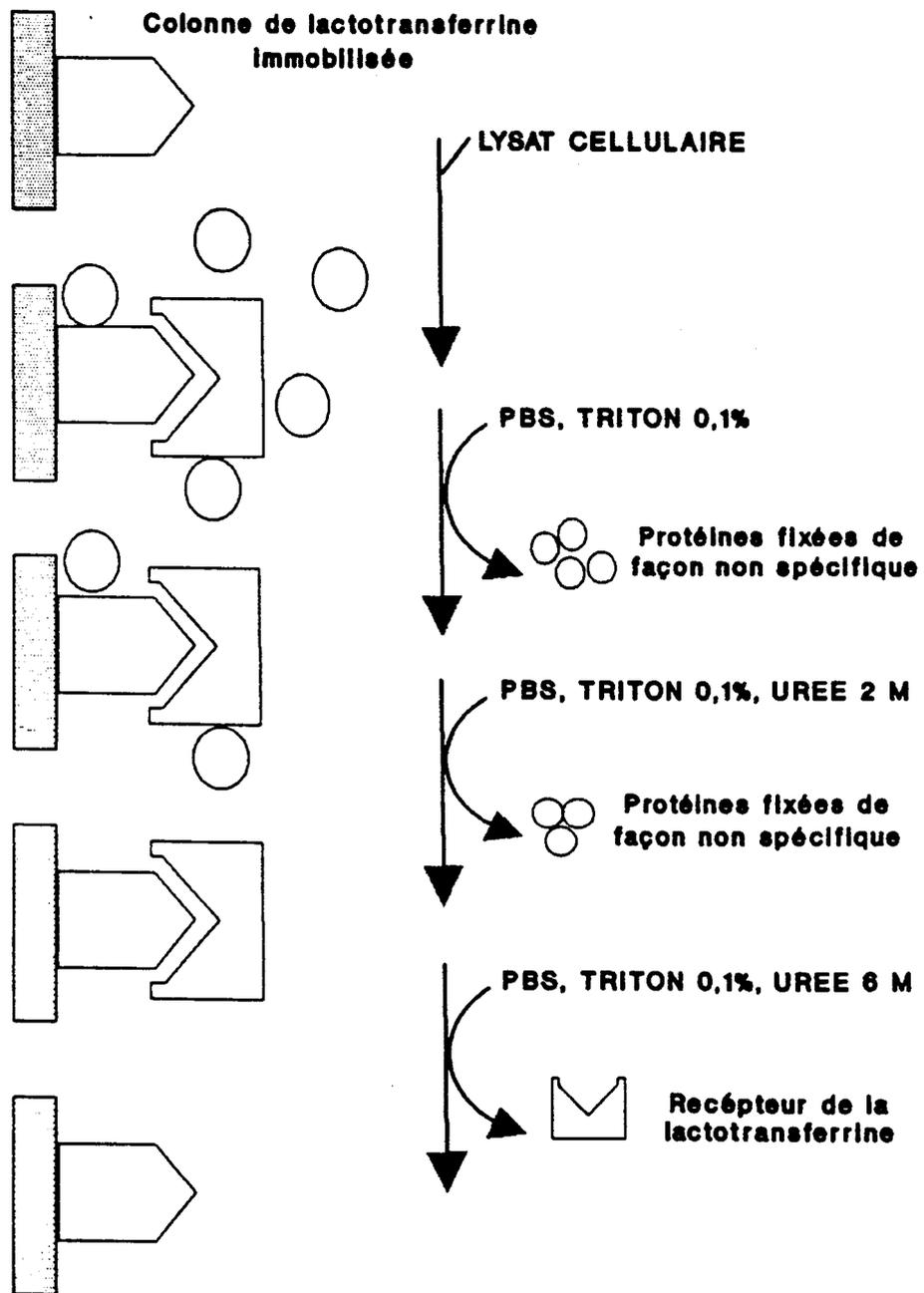


Figure 22 : Chromatographie d'affinité du récepteur de la lactotransferrine sur colonne de lactotransferrine immobilisée.

passage de la solution d'urée 6 M, la lactotransferrine est toujours liée à son anticorps, l'utilisation d'une solution de glycolle, HCl 0,1 M pH 2,8 permet de décrocher la lactotransferrine et de régénérer la colonne. Les fractions urée 2 M et urée 6 M sont dialysées contre du PBS, Triton X-100 0,1% puis congelées à - 20°C ou directement analysées en gel de polyacrylamide selon le protocole décrit p. 187. La purification du récepteur de la lactotransferrine sur colonne d'anticorps anti-lactotransferrine est schématisée dans la figure 23, p. 124.

C. PURIFICATION DU RECEPTEUR SOLUBLE DE LA LACTOTRANSFERRINE.

1. Concentration du milieu de culture.

Le milieu de culture provenant des lymphocytes circulants humains activés par la phytohémagglutinine est au fur et à mesure stocké à - 80°C en présence d'azide de sodium et de DFP (10 µg/ml). 20 litres de milieu de culture décongelés sont passés sur un filtre de 0,2 µm de porosité (Millipore) puis concentrés 20 fois sur un appareil d'ultrafiltration (Filtron) équipé d'un filtre (Oméga) dont le point de coupure est de 30 kDa.

2. Chromatographie d'affinité sur colonne d'anticorps anti-lactotransferrine immobilisés.

La purification est réalisée à 4°C en présence d'antiprotéases. 50 ml de milieu de culture concentré sont incubés, sous agitation rotative, en présence de 1 mg de lactotransferrine. Au bout d'1 h d'incubation, 15 ml d'anticorps anti-lactotransferrine couplés au Sépharose 4B sont

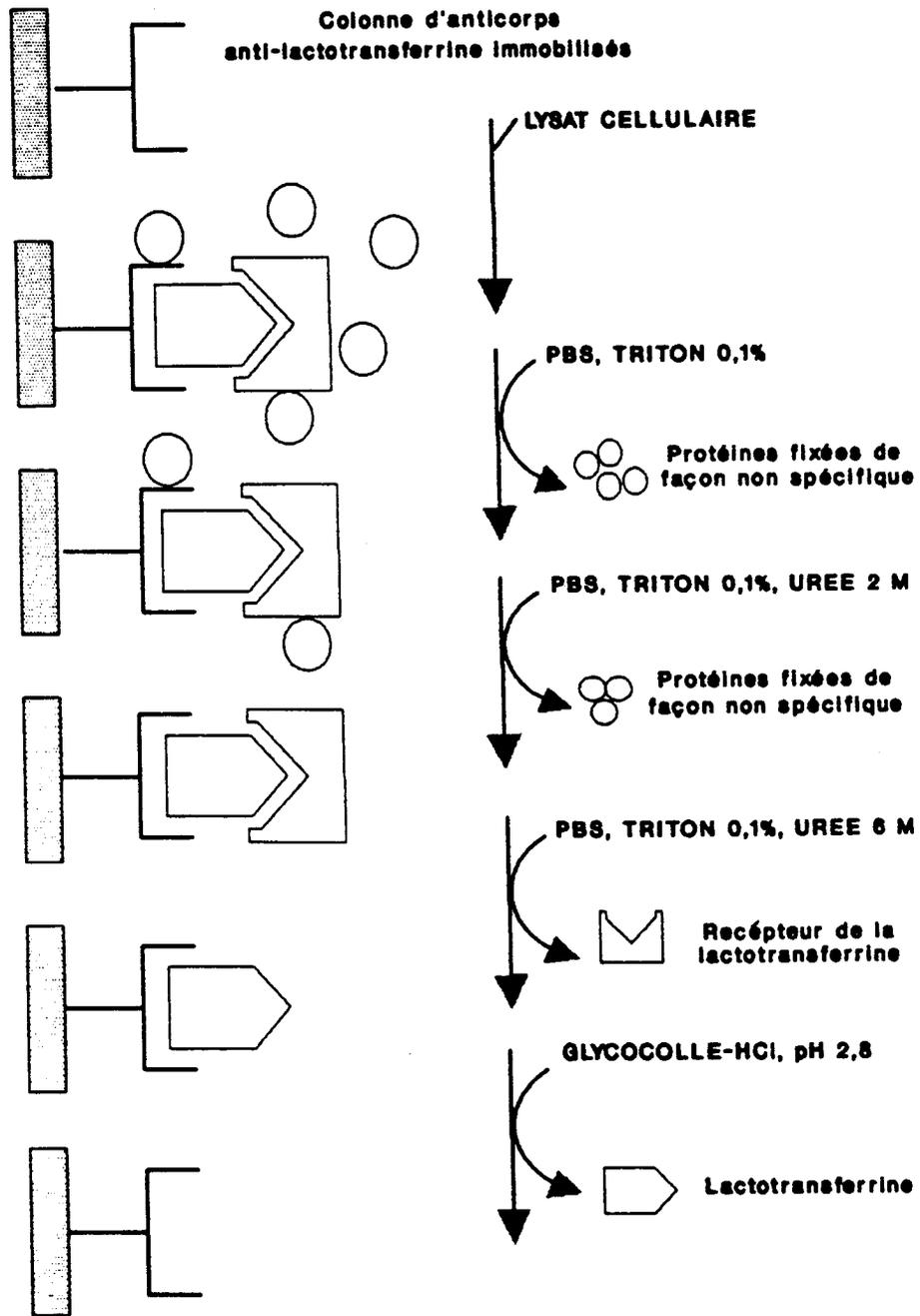


Figure 23 : Chromatographie d'affinité du récepteur de la lactotransferrine sur colonne d'anticorps anti-lactotransferrine immobilisés.

additionnés et le tout est placé sous agitation douce pendant 1 nuit à 4°C. Le gel est alors transvasé dans une colonne et lavé par 150 ml de PBS puis par 60 ml de PBS, urée 2 M. Le récepteur est enfin élué par 23 ml de PBS, urée 6 M puis dialysé contre du PBS. La fraction urée 6 M est soit directement congelée soit précipitée à l'ATCA et analysée en gel de polyacrylamide.

D. FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LES RECEPTEURS PURIFIES.

La fixation de la lactotransferrine sur les récepteurs membranaires et soluble purifiés est étudiée par des expériences de "dot blot". Deux carrés de nitrocellulose (0,7 x 0,7 cm) sont incubés pendant 1 h dans 500 µl de la fraction urée 6 M éluée de la colonne d'anticorps anti-lactotransferrine. Trois lavages sont ensuite effectués dans du PBS, sérotransferrine 0,2%. Une seconde incubation d'1 h est réalisée dans 500 µl de ce même tampon supplémenté par 10^{-7} M de lactotransferrine marquée à l'iode ^{125}I pour le premier carré de nitrocellulose et par 10^{-7} M de ^{125}I -lactotransferrine et 10^{-5} M de lactotransferrine non marquée pour le deuxième carré de nitrocellulose. Le marquage de la lactotransferrine à l'iode ^{125}I est réalisé selon le protocole décrit p. 185. Les carrés de nitrocellulose sont enfin lavés trois fois dans du PBS, sérotransferrine 0,2%, la radioactivité retenue sur la membrane de nitrocellulose est révélée par autoradiographie. Une révélation moins importante du carré de nitrocellulose témoin, incubé en présence de 100 excès molaire de lactotransferrine non marquée par rapport au carré de nitrocellulose incubé uniquement en présence de lactotransferrine radioactive, démontre une fixation spécifique et

réversible de la lactotransferrine sur les protéines contenues dans cette fraction.

E. IDENTIFICATION DES PROTEINES PRESENTES DANS LES FRACTIONS UREE 6 M.

L'identification des protéines copurifiées avec les récepteurs membranaires ou soluble de la lactotransferrine a été réalisée par des expériences de Western blot selon le protocole décrit p. 188, à l'aide des anticorps anti-lactotransferrine humaine, anti-myosine humaine, anti-actine humaine, anti-sérum albumine bovine et anti-GPIIb-IIIa.

III. RESULTATS.

A. PURIFICATION DES RECEPTEURS MEMBRANAIRES LYMPHOCYTAIRE ET PLAQUETTAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE.

1. Chromatographie d'affinité.

La purification du récepteur membranaire de la lactotransferrine est réalisée à partir des lysats de lymphocytes activés ou de plaquettes, sur colonne d'anticorps anti-lactotransferrine ou de lactotransferrine immobilisés, selon les techniques décrites p. 120.

Afin de pouvoir suivre la purification et d'augmenter la sensibilité des techniques utilisées, nous avons préalablement marqué les protéines exprimées à la surface des lymphocytes activés et des plaquettes, et par conséquent le récepteur membranaire de la lactotransferrine, par l'iode ^{125}I .

Les profils d'élution des colonnes d'anticorps anti-lactotransferrine et de lactotransferrine immobilisés sont représentés par la figure 24 p. 128. Les protéines membranaires marquées à l'iode ^{125}I et non retenues sur ces colonnes sont éluées par les tampons d'équilibration (fractions A) et urée 2 M (fractions B). La radioactivité associée au récepteur de la lactotransferrine est éluee par passage du tampon urée 6 M (fractions C). Les fractions C des lysats de lymphocytes activés (Fig. 24, 1) et des lysats de plaquettes (Fig. 24, 2) éluées de la colonne d'anticorps anti-lactotransferrine sont radioactives, par contre, aucune radioactivité n'est retrouvée dans les fractions C éluées de la colonne de lactotransferrine (Fig. 24, 3 et 4). Ces résultats indiquent que l'utilisation de la colonne de lactotransferrine ne permet pas de purifier le récepteur de la lactotransferrine, il est fort probable que le site de reconnaissance de la lactotransferrine soit masqué lors du couplage de la protéine sur le gel.

2. Fixation de la lactotransferrine sur les fractions purifiées.

Nous avons étudié, par une expérience de "dot blot" (p. 125), la fixation de la lactotransferrine marquée à l'iode ^{125}I sur les fractions C éluées des colonnes de lactotransferrine et d'anticorps anti-lactotransferrine.

Nous avons observé une fixation spécifique et réversible de la lactotransferrine sur les protéines présentes dans les fractions C lymphocytaire et plaquettaire de la colonne d'anticorps anti-lactotransferrine. Ce résultat démontre la présence de récepteurs pour la lactotransferrine dans ces fractions. Ces récepteurs sont toujours actifs après purification.

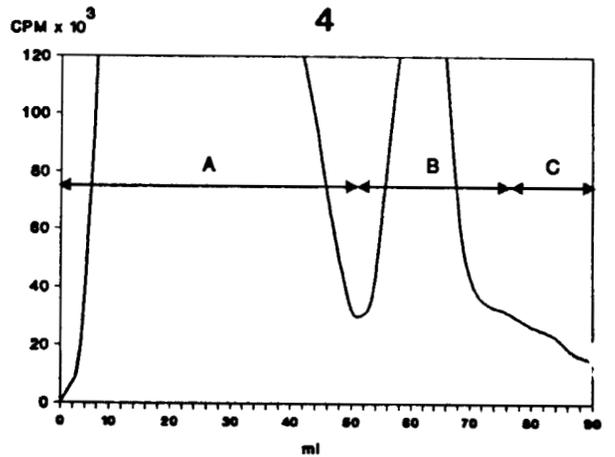
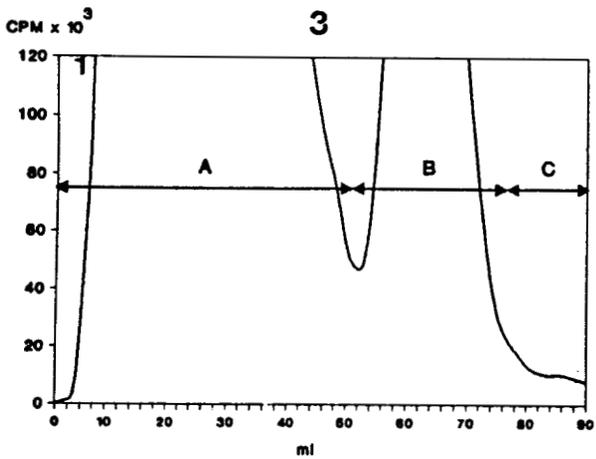
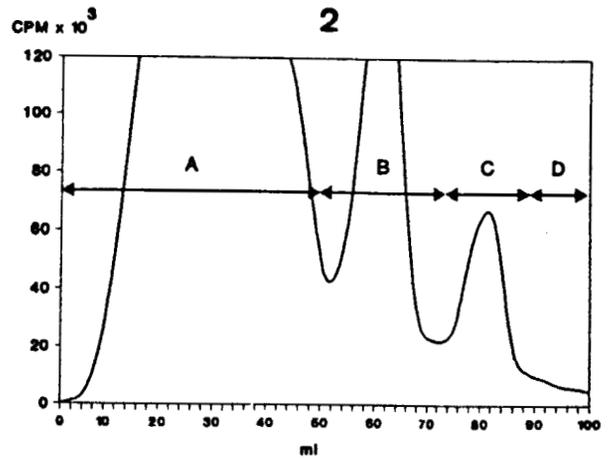
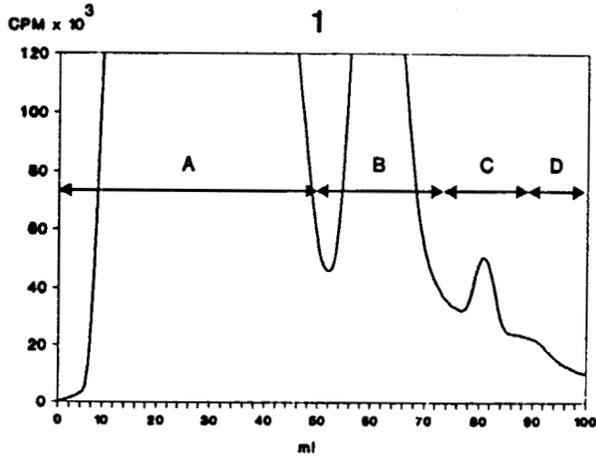


Figure 24 : Profils d'éluion des colonnes d'anticorps anti-lactotransferrine (1,2) et des colonnes de lactotransferrine (3,4).

La purification du récepteur de la lactotransferrine est réalisée à partir de lysats de lymphocytes activés (1,3) et de lysats de plaquettes (2,4). Les protéines membranaires ont été préalablement marquées à l'iode ^{125}I .

Aucune fixation n'est observée avec les fractions C éluées de la colonne de lactotransferrine. Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment en démontrant l'absence de récepteurs de la lactotransferrine dans ces fractions.

3. Identification du récepteur membranaire de la lactotransferrine.

a. Révélation du récepteur de la lactotransferrine par autoradiographie.

La figure 25 (p. 130) montre les profils d'autoradiographie des gels de polyacrylamide où ont été séparées les protéines contenues dans les fractions B et C éluées des colonnes d'anticorps anti-lactotransferrine et de lactotransferrine. La radioactivité contenue dans les fractions B lymphocytaire et plaquettaire des deux colonnes, est révélée sous forme de nombreuses bandes protéiques (Fig. 25, 1,3,5,7), alors que la radioactivité contenue dans les fractions C lymphocytaire (Fig. 25, 2) et plaquettaire (Fig. 25, 6) de la colonne d'anticorps anti-lactotransferrine est révélée sous forme d'une bande protéique unique de 105 kDa. Nous avons démontré précédemment la présence du récepteur de la lactotransferrine dans ces fractions urée 6 M, les protéines de 105 kDa exprimées à la surface des lymphocytes activés et des plaquettes correspondent donc respectivement aux récepteurs lymphocytaire et plaquettaire de la lactotransferrine. Aucune bande protéique n'est révélée dans les fractions C de la colonne de lactotransferrine (Fig. 25, 4 et 8).

La migration de ces récepteurs lymphocytaires et plaquettaires est identique dans les conditions réductrice et non réductrice (Fig. 26,

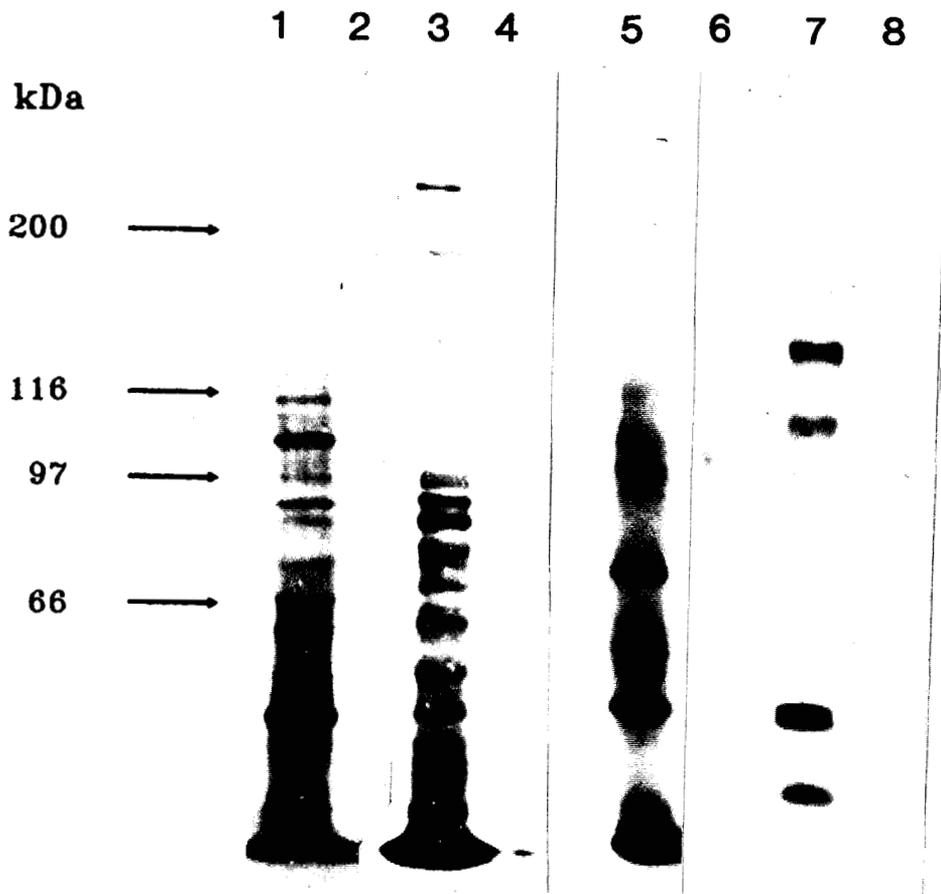


Figure 25 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide des fractions lymphocytaires (1,2,3,4) et des fractions plaquettaires (5,6,7,8) éluées des colonnes d'anticorps anti-lactotransferrine (1,2,5,6) et des colonnes de lactotransferrine (3,4,7,8).

La révélation est donnée par autoradiographie.

1,3,5,7 : fractions B (urée 2 M)

2,4,6,8 : fractions C (urée 6 M)

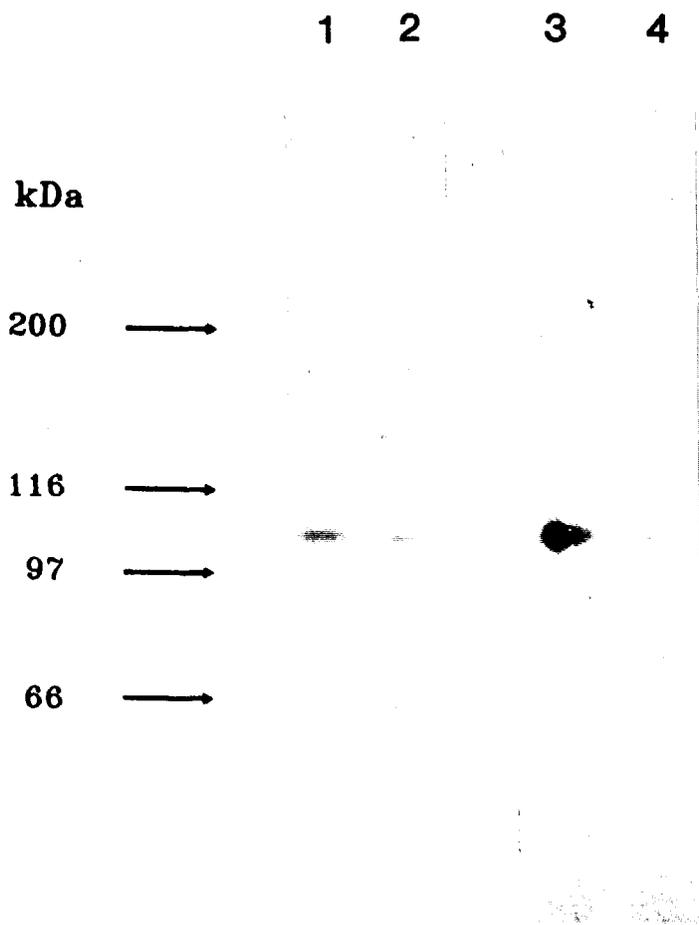


Figure 26 : Analyse en gel de polyacrylamide de la migration des récepteurs lymphocytaire (1,3) et plaquettaire (2,4) dans des conditions réductrices (1,2) et non réductrices (3,4).

La révélation est obtenue par autoradiographie.

p. 131). Ces récepteurs sont donc composés d'une chaîne polypeptidique unique de 105 kDa.

b. Révélation du récepteur de la lactotransferrine par coloration au bleu de Coomassie.

Lorsque la purification du récepteur de la lactotransferrine sur colonne d'anticorps anti-lactotransferrine est réalisée à plus grande échelle, les protéines présentes dans la fraction C sont détectées par coloration du gel de polyacrylamide au bleu de Coomassie.

Les profils obtenus pour les fractions lymphocytaire et plaquettaire sont identiques (Fig. 27, 1 et 3; p. 133). Trois protéines, de masse moléculaire apparente de 205 kDa, 95 kDa et 45 kDa, sont copurifiées avec le récepteur de la lactotransferrine de 105 kDa. Ces protéines ne sont pas retrouvées lorsque la purification est réalisée dans les mêmes conditions mais en absence de lactotransferrine ou lorsque la purification est réalisée sur colonne de lactotransferrine immobilisée. La copurification de ces trois protéines avec le récepteur de la lactotransferrine est donc ni due à une interaction avec la matrice de la colonne d'affinité ni due à une interaction avec la lactotransferrine. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la copurification de ces trois protéines est liée à une interaction de celles-ci avec le récepteur de la lactotransferrine.

4. Identification des protéines copurifiées avec le récepteur de la lactotransferrine.

Les protéines copurifiées avec le récepteur de la lactotransferrine ne sont pas révélées par l'autoradiographie du gel de

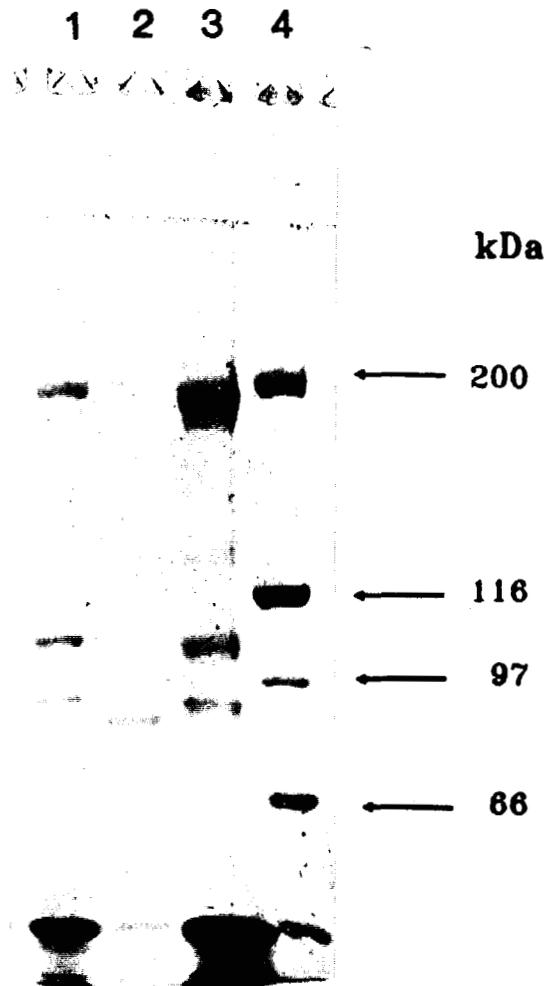


Figure 27 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide des fractions lymphocytaires et plaquettaires éluées de la colonne d'anticorps anti-lactotransferrine.

Les protéines sont révélées au bleu de Coomassie.

- | | |
|-----------------------------|---------------------------------|
| 1. fraction C lymphocytaire | 3. fraction C plaquettaire |
| 2. fraction D lymphocytaire | 4. témoins de masse moléculaire |

polyacrylamide et ne sont, par conséquent, pas exprimées à la surface cellulaire. A l'aide d'anticorps spécifiques, nous avons pu identifier la protéine de 205 kDa à la myosine, la protéine de 45 kDa à l'actine, la protéine de 95 kDa n'a pu être identifiée, la présence de lactotransferrine a également été observée dans la majorité des fractions C (Fig. 28, p. 135).

L'actine et la myosine sont deux protéines du cytosquelette présentes en forte concentration dans les lysats de lymphocytes activés et dans les lysats plaquettaires et leur copurification avec le récepteur de la lactotransferrine pourrait être de nature non spécifique. Cependant, un lavage de la colonne d'anticorps anti-lactotransferrine par un volume plus important de tampon urée 2 M (tampon B) ou par un tampon urée 3 M ne permet pas de séparer ces protéines du récepteur de la lactotransferrine.

5. Stabilité du récepteur de la lactotransferrine.

Afin d'obtenir des quantités suffisantes de récepteur de la lactotransferrine nous avons été amené à travailler des quantités plus importantes de cellules. Nous avons observé, bien que les expériences soient réalisées en présence d'un cocktail d'anti-protéases (1 mM PMSF, 1 mM phénantroline, 0,5 μ M aprotinine), une rapide dégradation du récepteur de la lactotransferrine au cours de la purification et du stockage de celui-ci. Les anti-protéases utilisés sont dirigés contre les protéases à sérine (PMSF, aprotinine) et les métallo-protéases (phénantroline), dans un premier temps, nous avons complété le cocktail d'antiprotéases par 10 μ M de pepstatine dirigée contre les protéases à acide aspartique. Cependant, au bout d'environ une à deux semaines de stockage à -20°C , une légère dégradation du récepteur est observée en

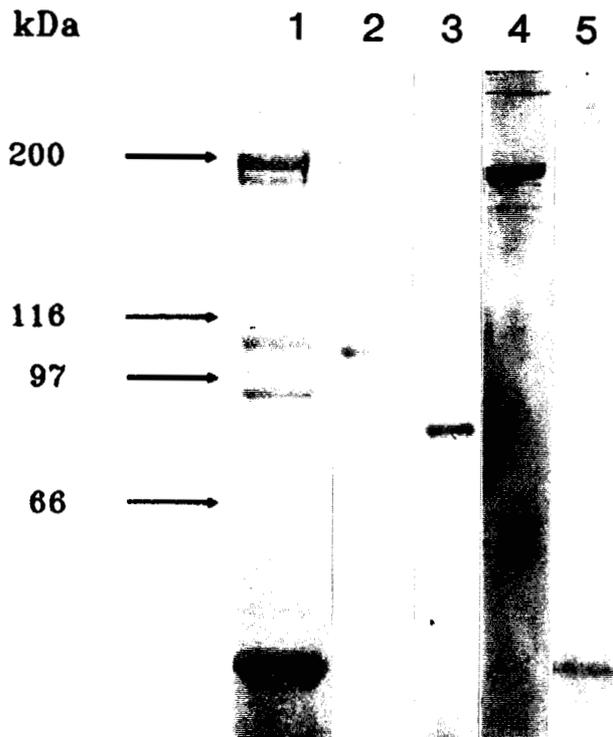


Figure 28 : Identification des protéines copurifiées avec le récepteur membranaire de la lactotransferrine.

Les protéines présentes dans la fraction C plaquettaire sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide. La révélation se fait - soit directement par coloration au bleu de Coomassie (1) ou par autoradiographie (2) du gel de polyacrylamide

- soit, après électrotransfert sur membrane de nitrocellulose, par reconnaissance immunologique à l'aide des anticorps anti-lactotransferrine (3), anti-myosine (4) ou anti-actine (5).

gel de polyacrylamide, cette dégradation se traduit par l'apparition d'une bande protéique de 103 kDa et de plusieurs bandes protéiques de plus faible masse moléculaire et de plus faible intensité (Fig. 29, p. 137). Nous avons donc, par la suite, utilisé un antiprotéase beaucoup plus puissant : le DFP, responsable de l'inhibition des protéases à sérine, des thiol-protéases et des métallo-protéases, de plus, le DFP possède un mode d'action irréversible qui n'est pas retrouvé pour la phénantroline, l'aprotinine ou la pepstatine (Quilès et al., 1991). D'autre part, nous avons également diminué de 48 h, le temps de purification en supprimant la précipitation au sulfate d'ammonium et la dialyse du lysat cellulaire qui précèdent la chromatographie d'affinité. Dans ces conditions, aucune dégradation du récepteur n'est observée après 6 mois de stockage à -20°C.

6. Quantification du récepteur purifié.

La quantité de récepteur purifié a été estimée en comparant l'intensité de coloration par le bleu de Coomassie de la bande protéique du récepteur avec l'intensité de coloration de bandes protéiques correspondant à une gamme de concentration en lactotransferrine. En moyenne, nous avons pu obtenir 10 à 20 μg de récepteur à partir de 10^9 lymphocytes activés, ce qui correspond à un rendement de purification de 15 à 30 %. La purification du récepteur plaquettaire de la lactotransferrine nous a permis d'obtenir environ 3 μg de récepteur à partir de 10^9 plaquettes.

B. PURIFICATION DU RECEPTEUR SOLUBLE DE LA LACTOTRANSFERRINE.

La faible quantité de récepteur de la lactotransferrine pouvant

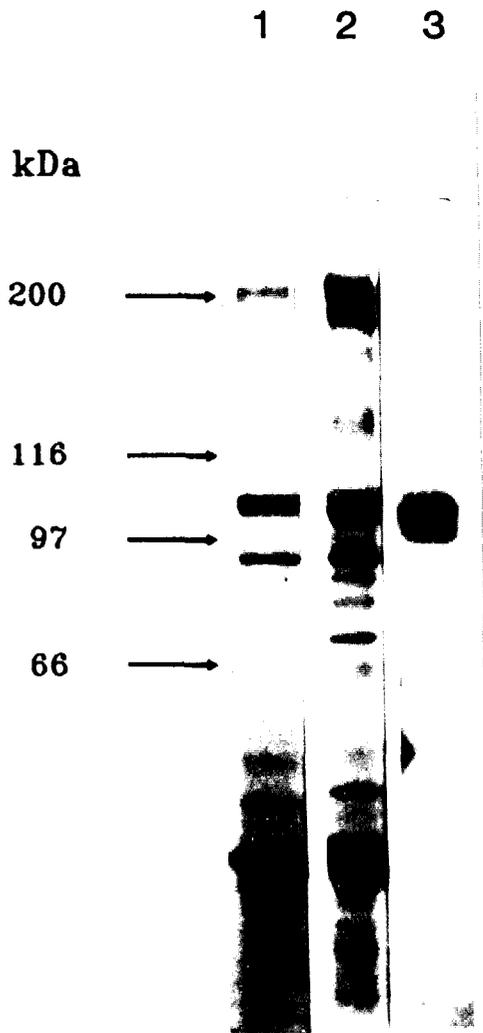


Figure 29 : Stabilité du récepteur de la lactotransferrine.

Le récepteur lymphocytaire purifié sur colonne d'anticorps anti-lactotransferrine en présence du cocktail d'anti-protéases suivant : 1 mM PMSF, 1 mM phénantroline, 0,5 μ M aprotine et 10 μ M pepstatine est analysé en gel de polyacrylamide soit immédiatement après purification (1) soit après 2 semaines de stockage à -20°C (2,3). La révélation des protéines se fait par coloration au bleu de Coomassie (1,2) ou par autoradiographie (3).

être libérée ou excrétée dans le milieu de culture, comparée à la concentration en protéine de celui-ci, ne nous a pas permis de le mettre directement en évidence par les techniques de "dot blot" que nous utilisons habituellement, nous avons donc procédé directement à son isolement.

1. Chromatographie d'affinité.

La purification du récepteur soluble de la lactotransferrine est réalisée, à partir du milieu de culture des lymphocytes activés concentré 20 fois, par chromatographie d'affinité du complexe lactotransferrine-récepteur sur colonne d'anticorps anti-lactotransferrine.

La technique utilisée, décrite p. 123, est identique à celle employée pour la purification du récepteur membranaire de la lactotransferrine, quelques modifications ont été apportées afin de l'adapter à la purification du récepteur soluble :

- Le volume de milieu de culture concentré à déposer sur la colonne étant très important, nous avons réalisé la première étape de purification en "batch".
- Les tampons de lavage et le tampon d'élution du récepteur soluble sont identiques à ceux utilisés pour la purification du récepteur membranaire de la lactotransferrine mais ne contiennent pas de Triton X-100.
- Afin de limiter la contamination de la fraction C par la sérum albumine, présente à une concentration d'environ 140 g/l de milieu concentré, les volumes des tampons de lavage ont été augmentés par 2 pour le PBS et par 1,5 pour le PBS, urée 2 M.

2. Fixation de la lactotransferrine sur les fractions purifiées.

Nous avons étudié, par une expérience de dot blot la fixation de la lactotransferrine marquée à l'iode ^{125}I sur les protéines éluées dans la fraction C. La méthodologie utilisée est décrite p. 125. Les résultats obtenus montrent que la radioactivité retenue par ces protéines peut être déplacée par un excès de lactotransferrine non marquée. Cette expérience permet de démontrer la présence du récepteur de la lactotransferrine dans la fraction C et par conséquent dans le milieu de culture des lymphocytes activés. Ce récepteur est toujours actif après purification.

3. Identification du récepteur lymphocytaire soluble de la lactotransferrine.

L'analyse en gel de polyacrylamide des protéines contenues dans la fraction C révèle, après coloration au bleu de Coomassie, la présence de 3 bandes protéiques de 100 kDa, 80 kDa et 60 kDa (Fig. 30, p. 140). L'utilisation d'anticorps spécifiques a permis d'identifier respectivement les protéines de 80 kDa et de 60 kDa à la lactotransferrine humaine et à la sérum albumine bovine (Fig.31, p. 141).

Lorsqu'un marquage métabolique, des lymphocytes activés, à la méthionine ^{35}S est réalisé, l'autoradiographie du gel de polyacrylamide ne révèle que la protéine de 100 kDa (Fig. 30, 1; p. 140). La protéine de 100 kDa a donc une origine lymphocytaire et correspond au récepteur soluble de la lactotransferrine.

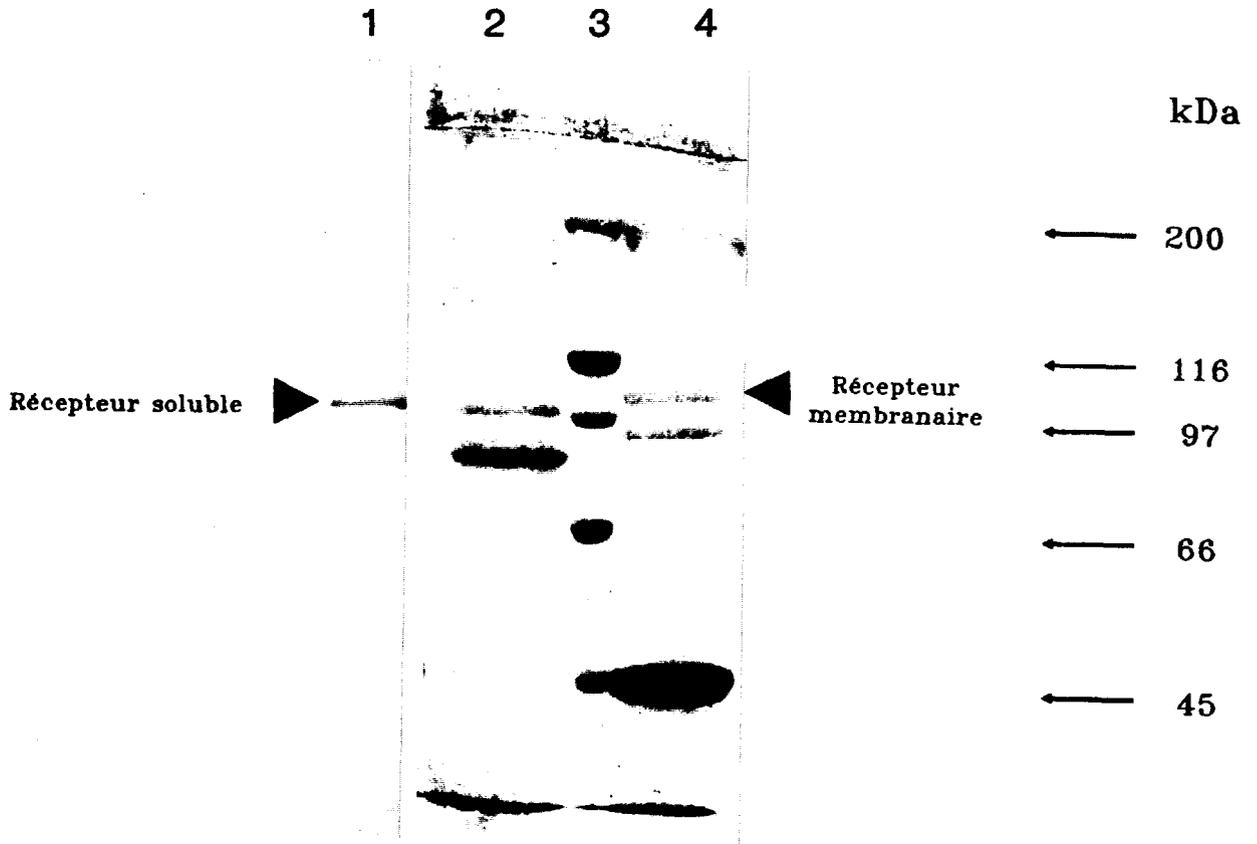


Figure 30 : Analyse en gel de polyacrylamide du récepteur lymphocytaire soluble et du récepteur lymphocytaire membranaire.

Les fractions C obtenues après chromatographie d'affinité sur colonne de lactotransferrine immobilisée du milieu de culture (1,2) ou du lysat de lymphocytes activés (4) sont analysées en gel de polyacrylamide. La révélation des protéines est réalisée soit par autoradiographie (1) soit par coloration au bleu de Coomassie (2,3,4).

(3) témoins de masse moléculaire.

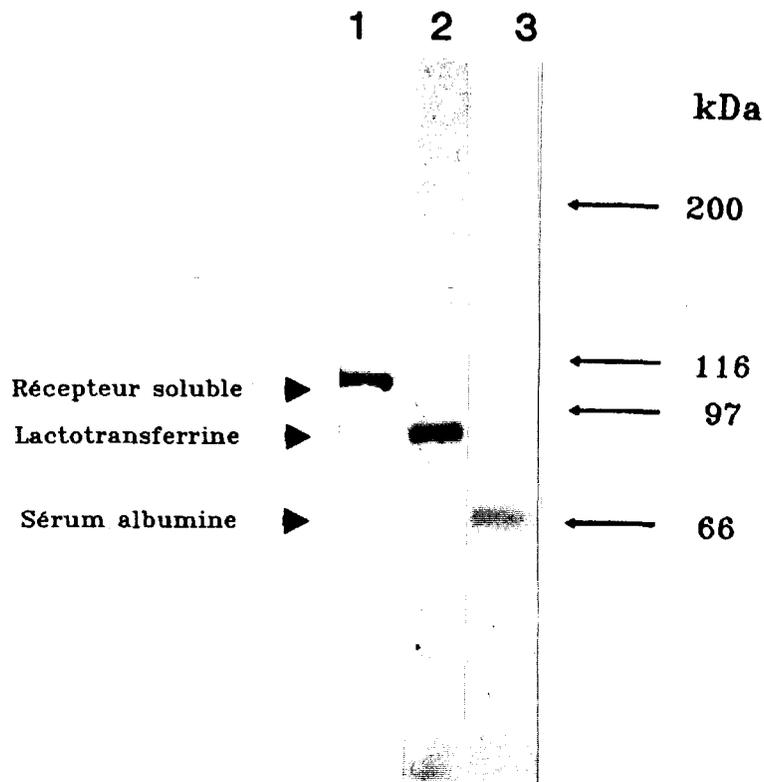


Figure 31 : Identification des protéines copurifiées avec le récepteur lymphocytaire soluble de la lactotransferrine.

La fraction C éluée de la colonne d'anticorps anti-lactotransferrine et contenant le récepteur lymphocytaire soluble est soumise à une électrophorèse en gel de polyacrylamide. Les protéines sont révélées soit directement par coloration au bleu de Coomassie (1) soit, après transfert sur membrane de nitrocellulose, par reconnaissance immunologique à l'aide des anticorps anti-lactotransferrine (2) et anti-sérum albumine (3).

4. Quantification du récepteur purifié.

Nous avons voulu estimer la concentration du récepteur de la lactotransferrine dans le milieu de culture. Pour cela, nous avons comparé l'intensité de coloration de la bande de récepteur obtenu en gel de polyacrylamide avec celles obtenues pour une gamme de concentration connue en lactotransferrine. La concentration du récepteur soluble de la lactotransferrine a été estimée à 10 $\mu\text{g/l}$ de milieu de culture.

Si l'on considère que le rendement de purification du récepteur lymphocytaire soluble est similaire à celui du récepteur lymphocytaire membranaire, nous pouvons estimer que 25 à 50 % des récepteurs présents à la surface cellulaire sont libérés dans le milieu de culture.

IV. CONCLUSION.

Au cours de cette étude, nous avons identifié les récepteurs membranaires lymphocytaire et plaquettaire de la lactotransferrine. Nous avons également démontré que les lymphocytes activés pouvaient libérer, dans le milieu de culture, une forme soluble de récepteur pour la lactotransferrine. Les récepteurs membranaires lymphocytaire et plaquettaire et le récepteur soluble lymphocytaire ont été purifiés en quantité importante.

Deux techniques de purification ont été utilisées pour isoler les récepteurs membranaires de la lactotransferrine : une purification directe sur colonne de lactotransferrine et une purification indirecte sur colonne d'anticorps anti-lactotransferrine. La purification sur colonne de lactotransferrine n'a pas permis d'isoler le récepteur de la lactotransferrine, il est fort probable que le site de reconnaissance de la lactotransferrine qui est très accessible aux modifications chimiques

(Legrand et al., 1991) soit masqué lors du couplage de cette protéine sur le gel. En effet, le couplage au bromure de cyanogène fait intervenir les groupements ε -NH₂ et le site de reconnaissance de la lactotransferrine pour le récepteur lymphocytaire localisé entre les résidus d'acides aminés 4-52 (Legrand et al., 1991) comprends 3 résidus lysines pouvant être impliqués dans ce couplage.

La purification du récepteur membranaire de la lactotransferrine sur colonne d'anticorps anti-lactotransferrine, mise au point sur de faibles quantités de cellules (Mazurier et al., 1989), a été adaptée à des quantités de cellules 10 à 100 fois plus importantes. Cette technique de purification a également été adaptée à l'isolement du récepteur soluble de la lactotransferrine. Ces récepteurs sont très sensibles à la dégradation protéolytique et la principale modification que nous avons apportée a consisté à utiliser un anti-protéase très puissant, le DFP.

L'analyse en gel de polyacrylamide des fractions contenant les récepteurs membranaires lymphocytaire et plaquettaire de la lactotransferrine montre que ces deux récepteurs ont une migration électrophorétique identique correspondant à une masse moléculaire apparente de 105 kDa. Cette migration n'est pas modifiée dans les conditions réductrice ou non réductrice, le récepteur lymphocytaire et le récepteur plaquettaire de la lactotransferrine sont donc tous deux composés d'une chaîne polypeptidique unique de 105 kDa. Ces récepteurs sont toujours actifs après purification. La purification du récepteur lymphocytaire réalisée en 1989 par Mazurier et al., selon le protocole que nous avons repris, a conduit à la mise en évidence de deux protéines de 110 et 100 kDa, la protéine de 110 kDa devrait correspondre au récepteur de 105 kDa que nous avons mis en évidence, nous avons vu précédemment que le récepteur de la lactotransferrine

était très sensible aux protéases et la protéine de 100 kDa pourrait correspondre à une légère dégradation du récepteur.

La masse moléculaire des récepteurs lymphocytaire et plaquettaire est inférieure à celle du récepteur entérocytaire (130 kDa) caractérisé chez la Souris par Hu et al. (1990). Il est intéressant de noter que chez les bactéries, le récepteur de la lactotransferrine exprimé par Haemophilus influenzae (Schryvers, 1989) et par de nombreuses espèces bactériennes appartenant à la famille Neisseriaceae (Schryvers et Lee, 1989) a été identifié à une protéine de 105 kDa.

Nous avons retrouvé dans le milieu de culture des lymphocytes activés, une forme soluble du récepteur de la lactotransferrine. Ce récepteur est toujours fonctionnel et son activité n'est pas perdue au cours de la purification. Le récepteur lymphocytaire soluble de la lactotransferrine a été identifié à une protéine de 100 kDa. La différence de 5 kDa entre le récepteur soluble et membranaire devrait correspondre à la région d'ancrage dans la membrane cytoplasmique et à la région cytosolique du récepteur. Il est possible d'envisager que la région cytosolique du récepteur de la lactotransferrine interagisse avec des protéines du cytosquelette et plus particulièrement avec l'actine et la myosine mise en évidence dans les fractions C obtenues lors de la purification du récepteur membranaire de la lactotransferrine. De telles associations ont déjà été décrites pour le récepteur de la sérotransferrine (Hunt et al., 1989b) et pour le complexe glycoprotéinique GP IIb-IIIa (Loftus et Albrecht, 1984).

La concentration du récepteur soluble de la lactotransferrine a été estimée à 10 $\mu\text{g/l}$. Cette concentration correspond à une libération de 25 à 50 % des récepteurs présents à la surface cellulaire. La libération du récepteur lymphocytaire dans le milieu de culture pourrait

être liée à la présence de protéases membranaires ou de protéases relarguées dans le milieu de culture au moment de la lyse des cellules. Dans la littérature, d'autres mécanismes ont été décrits, tels que la formation d'exosomes (Pan et Johnston, 1983, 1984), la coupure par une phospholipase C spécifique, des récepteurs ancrés dans la membrane plasmique par une liaison glycosidique phosphatidylinositol (Orchansky et al., 1988; Selveraj et al., 1988) ou encore la transcription d'un gène codant pour la forme soluble du récepteur (Gavin et al., 1972; Weber et al., 1984).

La purification en masse des récepteurs lymphocytaires et plaquettaires nous a permis d'obtenir suffisamment de récepteur pour entreprendre l'étude des propriétés structurales de ces récepteurs et préparer un anticorps polyclonal spécifique.

MISE EN EVIDENCE DU RECEPTEUR A HAUTE AFFINITE POUR LA LACTOTRANSFERRINE A L'AIDE D'UN ANTICORPS POLYCLONAL SPECIFIQU

I. INTRODUCTION.

L'utilisation d'un anticorps spécifique facilite considérablement l'étude d'un récepteur. La préparation d'anticorps polyclonaux spécifiques du récepteur de la lactotransferrine a été tentée soit à partir du récepteur lymphocytaire soluble de la lactotransferrine soit à partir du récepteur lymphocytaire membranaire. Après avoir vérifié la réactivité et la spécificité de ces anticorps vis à vis des protéines ayant servies à l'immunisation des Lapins, nous avons étudié l'interaction de ces anticorps avec les récepteurs de la lactotransferrine exprimés à la surface des plaquettes, des neutrophiles, des monocytes/macrophages et des éosinophiles.

II. MODE OPERATOIRE.

A. PREPARATION D'ANTICORPS POLYCLONaux DIRIGES CONTRE LE RECEPTEUR LYMPHOCYTAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE

1. Immunisation du Lapin par les protéines de la fraction purifiée du milieu de culture.

La technique d'immunisation du Lapin est celle préconisée par Vaitukaitis et al. (1971).

Les fractions C du milieu de culture contiennent un mélange de récepteur lymphocytaire soluble, de lactotransferrine et de sérum

albumine bovine. Ces protéines sont concentrées par précipitation à l'ATCA (0,4 mg de protéine totale). Le culot est lavé à l'éthanol, lyophilisé puis repris par 0,5 ml de sérum physiologique et 0,5 ml d'adjuvant complet de Freund. L'immunisation est réalisée par administration de la solution sous la forme de 40 injections en sous cutanée sur le dos du Lapin. Un premier rappel est effectué 3 semaines après l'immunisation, le second rappel est réalisé 6 semaines plus tard.

2. Immunisation du Lapin par le récepteur membranaire lymphocytaire.

L'immunisation du Lapin est réalisée selon la technique mise au point par Knudsen (1985).

Les fractions C contenant le récepteur membranaire lymphocytaire sont rassemblées de façon à obtenir environ 200 μg de récepteur. Ces fractions contiennent en plus du récepteur lymphocytaire membranaire de la myosine, de l'actine, de la lactotransferrine et une protéine de 95 kDa, l'ensemble de ces protéines est précipité par l'ATCA puis soumis à une électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide selon la technique décrite p. 187. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose puis colorées au rouge Ponceau. La bande de nitrocellulose correspondant au récepteur de la lactotransferrine est découpée, séchée et solubilisée dans un volume minimum de diméthyl sulfoxide. La solution additionnée d'un volume d'adjuvant complet de Freund est injectée par voie intramusculaire à un Lapin âgé de 6 mois. Deux rappels sont réalisés, dans les mêmes conditions, 3 semaines après chaque injection.

3. Purification des anticorps.

Une semaine après le premier rappel, le Lapin est saigné par incision de la veine marginale de l'oreille (10 ml de sang la première fois puis 20 à 30 ml tous les 15 jours). Le sang est laissé une nuit à 4°C puis l'immunsérum est récupéré après centrifugation.

L'immunsérum obtenu après immunisation du Lapin à l'aide de la fraction urée 6 M du milieu de culture est chromatographié sur une colonne de lactotransferrine immobilisée et sur une colonne de sérum albumine bovine immobilisée afin d'éliminer les anticorps dirigés contre ces deux protéines. Après lavage des colonnes par un tampon Tris-HCl 25mM, NaCl 35 mM, pH 8,8, les anticorps non retenus sont purifiés selon le protocole décrit p.185.

L'immunsérum obtenu après immunisation du Lapin à l'aide du récepteur membranaire lymphocytaire est directement purifié selon le protocole décrit p. 185.

B. ETUDE DE LA SPECIFICITE DES ANTICORPS ANTI-RECEPTEUR LYMPHOCYTAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE.

1. Etude de la fixation des anticorps anti-récepteur de la lactotransferrine par des expériences de Western blot.

Les expériences de Western blot sont réalisées sur le récepteur lymphocytaire soluble purifié et sur les lysats cellulaires contenant les récepteurs membranaires lymphocytaire et plaquettaire non purifiés. Le protocole utilisé est décrit p. 188.

2. Etude de la fixation des anticorps anti-récepteur de la lactotransferrine par cytofluorimétrie de flux.

a. Incubation des cellules avec l'anticorps anti-récepteur.

Les cellules en suspension dans 100 μ l de PBS, sont incubées pendant 30 min en présence de l'anticorps dirigé contre le récepteur de la lactotransferrine (dilution 1/40^{ème}). Les cellules sont ensuite lavées et l'anticorps anti-IgG de Lapin marqué au FITC et dilué au 1/80^{ème} (Sigma) est ajouté. Après 30 min d'incubation, les cellules sont lavées 2 fois puis analysées par cytofluorimétrie de flux. La fixation non spécifique est estimée en incubant les cellules dans les mêmes conditions mais en remplaçant l'anticorps anti-récepteur par un anticorps purifié provenant d'un Lapin non immunisé.

b. Expériences de compétition.

Les expériences de compétition sont réalisées à l'aide de lactotransferrine marquée à la fluorescéine selon la technique directe décrite p. 93, 3 mesures de fluorescence sont effectuées :

- la première mesure correspond à la fluorescence émise par les cellules incubées en présence de 10^{-7} M de lactotransferrine fluorescente
- la seconde mesure correspond à la fluorescence émise par les cellules incubées en présence de 10^{-7} M de lactotransferrine fluorescente et de 100 excès molaire de lactotransferrine non fluorescente
- la troisième mesure correspond à la fluorescence émise par les cellules incubées en présence de 10^{-7} M de lactotransferrine fluorescente et de l'anticorps anti-récepteur purifié dilué au 1/20^{ème}.

III. RESULTATS.

A. PREPARATION D'ANTICORPS POLYCLONAUX DIRIGES CONTRE LE RECEPTEUR LYMPHOCYTAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE

La préparation d'anticorps polyclonaux dirigés contre le récepteur lymphocytaire de la lactotransferrine a été réalisée soit à partir du récepteur soluble isolé du milieu de culture des lymphocytes activés soit à partir du récepteur membranaire purifié à partir de lysats cellulaires. Deux méthodologies différentes ont été utilisées (p. 146).

Dans le premier cas, nous avons immunisé le Lapin avec l'ensemble des protéines contenues dans la fraction C du milieu de culture, c'est à dire avec le récepteur soluble de la lactotransferrine, la lactotransferrine et la sérum albumine bovine. Les anticorps dirigés contre la lactotransferrine et la sérum albumine sont éliminés par passage de l'immunsérum sur des colonnes de lactotransferrine et de sérum albumine immobilisées.

Dans le second cas, l'immunisation du Lapin a été réalisée avec le récepteur membranaire seul. Afin d'éliminer les protéines copurifiées avec ce récepteur, la fraction urée 6 M est soumise à une électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide et les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose. La bande protéique de 105 kDa correspondant au récepteur de la lactotransferrine est excisée puis solubilisée dans le diméthyl sulfoxyde avant d'être injectée au Lapin.

B. ETUDE DE LA SPECIFICITE DES ANTICORPS ANTI-RECEPTEUR
LYMPHOCYTAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE.

1. Anticorps dirigés contre le récepteur lymphocytaire
soluble.

a. Etude de la fixation de l'anticorps sur le récepteur
lymphocytaire soluble.

La réactivité et la spécificité des anticorps purifiés ont été analysées, par des expériences de Western blot, sur les protéines ayant servies à immuniser le Lapin : le récepteur lymphocytaire soluble de la lactotransferrine, la lactotransferrine et la sérum albumine bovine. Comme le montre la figure 32, p. 152, les anticorps purifiés reconnaissent spécifiquement le récepteur soluble de 100 kDa contenu dans la fraction urée 6 M (1). La lactotransferrine et la sérum albumine présentes dans cette fraction ne sont pas révélées (4 et 5). Nous avons répété cette expérience avec des concentrations plus élevées (20 μ g) de lactotransferrine humaine et de sérum albumine bovine purifiées, l'absence de révélation démontre que les anticorps dirigés contre ces protéines ont bien été éliminés au cours de la purification des anticorps anti-récepteur (p. 148).

b. Etude de la fixation de l'anticorps sur les différentes cellules
du sang humain.

Cette étude réalisée par cytofluorimétrie de flux montre que l'anticorps préparé se fixe spécifiquement à la surface des lymphocytes activés et à la surface des plaquettes (Fig. 33, p. 153). Aucune fixation n'est observée sur les neutrophiles, les monocytes/macrophages

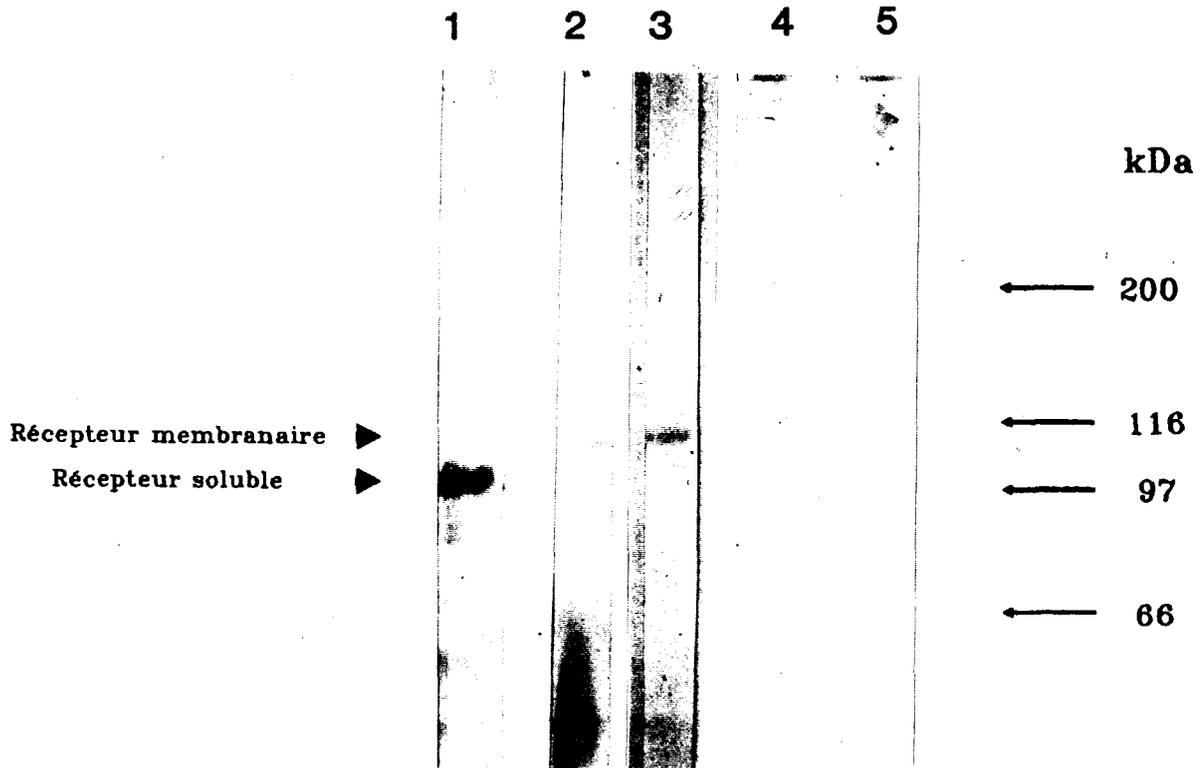


Figure 32 : Etude de la spécificité de l'anticorps préparé.

Par des expériences de Western blot, la réactivité de l'anticorps préparé à partir du récepteur lymphocytaire soluble est analysée sur :

1. les protéines de la fraction C du milieu de culture
2. les protéines d'un lysat de lymphocytes activés
3. les protéines d'un lysat de plaquettes
4. la lactotransferrine humaine
5. la sérum albumine bovine

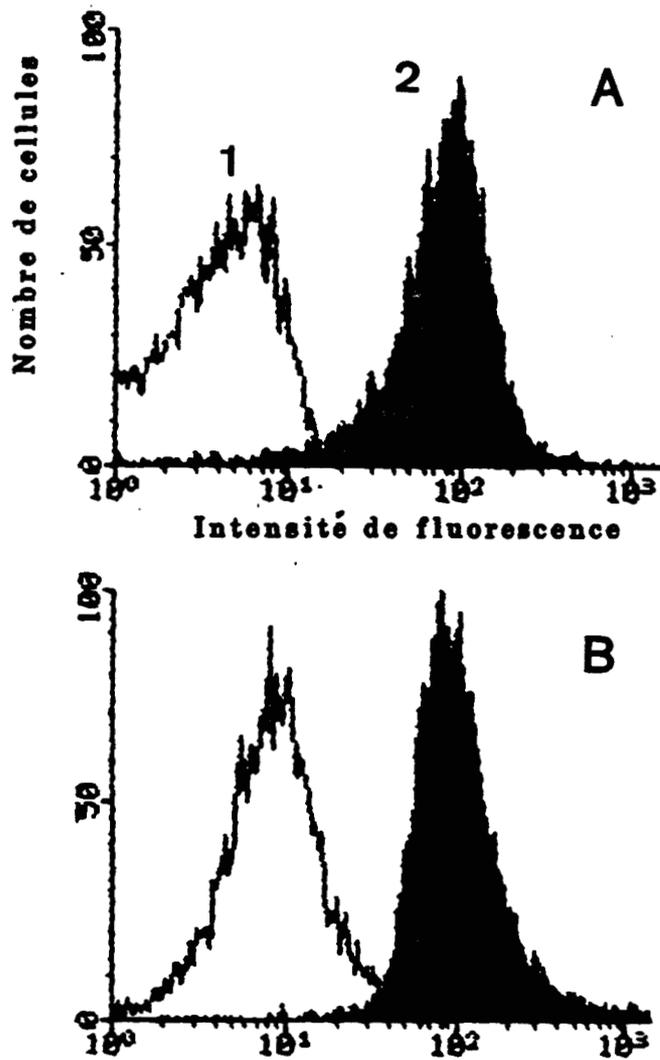


Figure 33 : Etude, par cytofluorimétrie de flux, de la fixation de l'anticorps anti-récepteur sur les lymphocytes activés (A) et sur les plaquettes (B).

1 : Fixation non spécifique

2 : Fixation spécifique

et sur les éosinophiles. La fixation de l'anticorps sur les lymphocytes activés montre que l'anticorps préparé reconnaît le récepteur lymphocytaire soluble à partir duquel il a été préparé mais aussi le récepteur lymphocytaire membranaire. La spécificité de l'anticorps n'est pas limitée au récepteur lymphocytaire puisqu'il interagit avec les plaquettes. Les expériences de Western blot effectuées sur des lysats lymphocytaires et plaquettaires montrent que, dans les deux cas, seule une bande protéique de 105 kDa correspondant respectivement aux récepteurs membranaire lymphocytaire et plaquettaire est révélée (Fig. 32, p. 152). L'anticorps préparé est donc dirigé contre les récepteurs à haute affinité pour la lactotransferrine exprimés par les lymphocytes activés et par les plaquettes, cet anticorps est monospécifique.

Nous avons également étudié, sur les récepteurs lymphocytaire et plaquettaire, l'inhibition de la fixation de la lactotransferrine par l'anticorps préparé. Aucun effet inhibiteur n'a été observé par cytofluorimétrie de flux. L'anticorps obtenu n'est donc pas dirigé contre le site de reconnaissance de la lactotransferrine. Nous avons démontré précédemment que le récepteur soluble de la lactotransferrine pouvait toujours, après purification, fixer la lactotransferrine, la présence de lactotransferrine dans la fraction urée 6 M ayant servi à immuniser le Lapin et sa complexation au récepteur de la lactotransferrine a donc probablement masqué les sites antigéniques du site de reconnaissance.

2. Anticorps dirigés contre le récepteur lymphocytaire membranaire.

Les essais réalisés par Western blot sur les fractions urée 6 M contenant le récepteur lymphocytaire membranaire purifié ou sur des lysats lymphocytaires n'ont pas permis de mettre en évidence une

interaction spécifique entre l'anticorps préparé et le récepteur lymphocytaire. De même les expériences de cytofluorimétrie de flux n'ont pas conduit à la mise en évidence d'une fixation spécifique de l'anticorps avec la surface des lymphocytes activés. L'immunisation du Lapin semble donc être infructueuse puisque les anticorps ne sont pas dirigés contre le récepteur lymphocytaire.

IV. CONCLUSION.

Nous avons préparé, à partir du récepteur lymphocytaire soluble de la lactotransferrine, un anticorps polyclonal monospécifique reconnaissant le récepteur lymphocytaire soluble et membranaire mais aussi le récepteur plaquettaire de la lactotransferrine, cet anticorps n'est pas dirigé contre le site de reconnaissance de la lactotransferrine. Le récepteur soluble provient donc bien de la libération, dans le milieu de culture, du récepteur mis en évidence à la surface des lymphocytes activés. Les récepteurs lymphocytaire et plaquettaire, responsables de la fixation à haute affinité de la lactotransferrine, possèdent des propriétés structurales et antigéniques identiques.

L'anticorps préparé, spécifique des récepteurs à haute affinité exprimés à la surface des lymphocytes activés et des plaquettes, n'interagit pas avec les récepteurs responsables de la fixation à faible affinité de la lactotransferrine mis en évidence à la surface des neutrophiles, des monocytes/macrophages et des éosinophiles. Ces deux types de récepteurs à haute affinité et à faible affinité de la lactotransferrine sont donc antigéniquement différents et par conséquent bien distincts.

Cet anticorps pourra être utilisé pour :

- vérifier l'identité immunologique du récepteur entérocytaire,

- rechercher la présence de récepteurs à haute affinité à la surface d'autres cellules normales ou cancéreuses,
- étudier l'expression du récepteur en fonction du cycle cellulaire ou de l'état de différenciation des cellules,
- rechercher la présence d'une forme soluble du récepteur dans le plasma sanguin,
- purifier le récepteur de la lactotransferrine par une technique plus rapide et un rendement plus élevé,
- cloner le récepteur.

L'obtention d'un anticorps pouvant inhiber la fixation de la lactotransferrine sur son récepteur, nous aurait permis d'étudier les relations existant entre l'interaction de la lactotransferrine avec les cellules cibles et les effets biologiques observés. Afin d'obtenir cet anticorps, nous avons immunisé un Lapin avec le récepteur de la lactotransferrine seul non complexé à la lactotransferrine. Les anticorps obtenus n'ont pas permis de mettre en évidence le récepteur de la lactotransferrine à la surface des lymphocytes activés par cytofluorimétrie de flux ni de révéler ce récepteur par des expériences de Western blot. La technique que nous avons employée, qui a donné de bons résultats pour la préparation d'un anticorps spécifique d'une glycoprotéine exprimée à la surface de fibroblastes embryonnaire de Poulet (Knudsen, 1985) n'a cependant, pas permis d'obtenir un anticorps spécifique du récepteur de la lactotransferrine.

CONTRIBUTION A L'ETUDE STRUCTURALE DU RECEPTEUR
DE LA LACTOTRANSFERRINE.

I. INTRODUCTION.

L'étude structurale du récepteur de la lactotransferrine a été menée en déterminant d'une part, la séquence peptidique partielle du récepteur lymphocytaire soluble de la lactotransferrine et en étudiant d'autre part, la glycosylation des récepteurs exprimés à la surface des lymphocytes activés et des plaquettes et du récepteur lymphocytaire libéré dans le milieu de culture.

II. MODE OPERATOIRE.

A. DETERMINATION PARTIELLE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE.

Vu les quantités très faibles de récepteur dont nous disposions, il a fallu utiliser des méthodes d'hydrolyse, de séparation et d'analyse adaptées à des micro-quantités. Cette étude a été conduite par les docteurs Carles et Riva du Laboratoire de Chimie des Protéines du CEA de Saclay.

La fraction C contenant le récepteur lymphocytaire soluble de la lactotransferrine est soumise à une électrophorèse en gel de polyacrylamide. Après coloration au bleu de Coomassie, la bande protéique correspondant à environ 50 μ g de récepteur est excisée, une seconde bande témoin, dépourvue de protéine est également excisée. L'hydrolyse trypsique est réalisée sur ces deux bandes de gel selon la méthode mise au point par Carles et Riva (1991).

Les deux hydrolysats ont été fractionnés en HPLC sur une colonne de phase reverse C18. Les pics peptidiques qui ne sont pas retrouvés dans l'hydrolysate de la bande témoin sont rechromatographiés sur la même colonne puis analysés sur un séquenceur d'acides aminés.

B. ETUDE DE LA GLYCOSYLATION DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE.

1. Mise en évidence de la présence de glycannes.

La technique employée est celle préconisée par Haselbeck et Hösel (1990). Nous avons utilisé le kit de mise en évidence des glycannes mis au point à partir de cette technique et vendu par la firme Boehringer Mannheim (ref. 1142 372).

Les glycoprotéines sont soumises à une oxydation périodique ménagée qui transforme, en fonctions aldéhydiques, les groupements α -glycols des monosaccharides constituant les glycannes. Ces fonctions aldéhydiques sont alors condensées à la digoxigénine et les glycoprotéines couplées à la digoxigénine sont transférées sur membrane de nitrocellulose après électrophorèse en gel de polyacrylamide. Finalement, la digoxigénine est révélée à l'aide d'un anticorps spécifique couplé à la phosphatase alcaline (Fig. 34, p. 159).

a. Condensation de la digoxigénine.

Un aliquote de la fraction purifiée contenant environ 5 μ g de récepteur est précipité à l'ATCA, lavé à l'éthanol distillé et séché sous azote. Le culot est suspendu dans 20 μ l de tampon acétate 0,1 M, pH 5,5. L'oxydation périodique est réalisée pendant 20 min dans le noir à

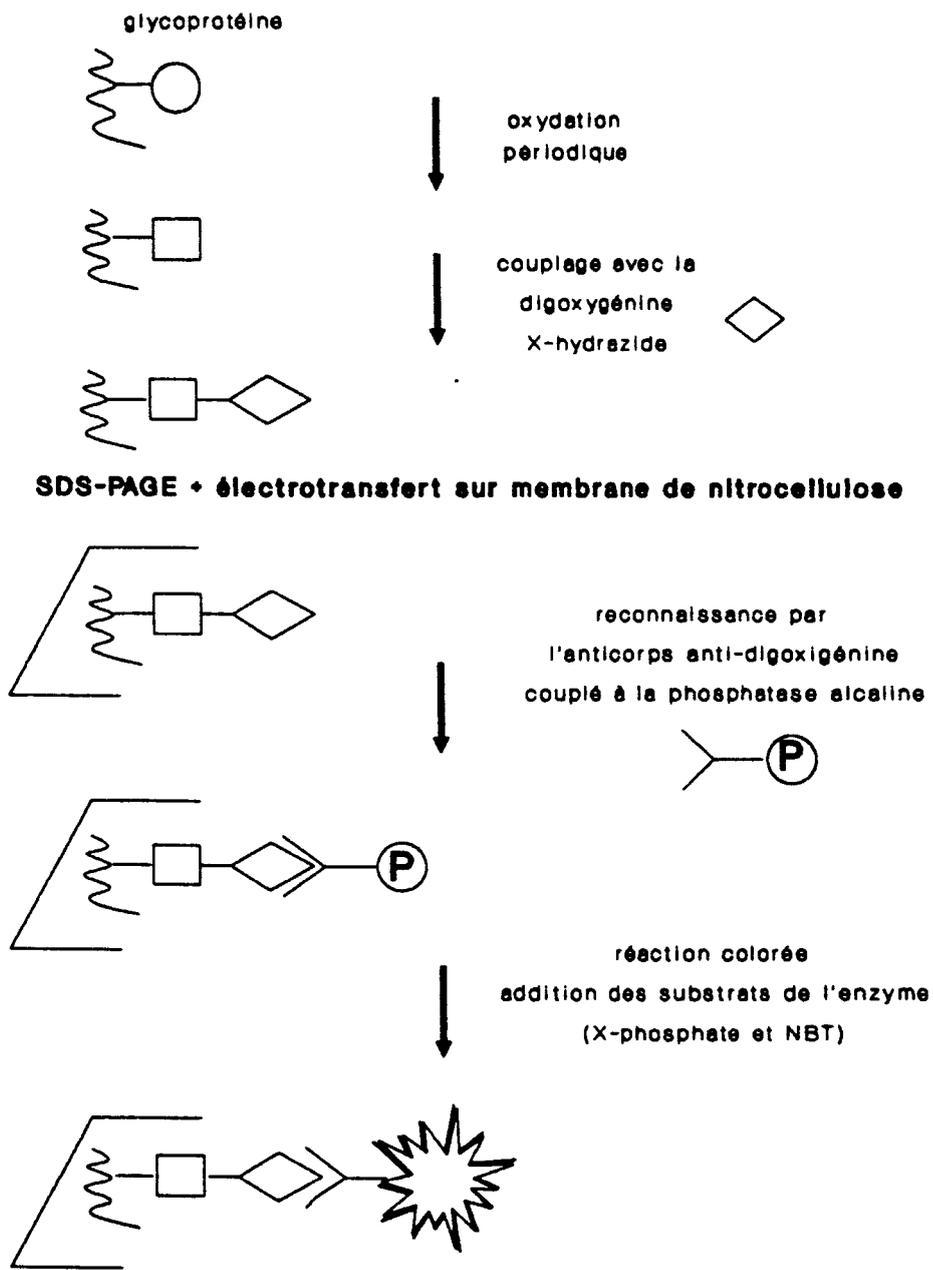


Figure 34 : Technique de détection des glycanes selon la méthode décrite par Haselbeck et Hösel (1990).

température ambiante par addition de 10 μ l d'une solution de métaperiodate de sodium à 10 mg/ml. Après réaction, l'excès de periodate est détruit par l'addition de 10 μ l de disulfite de sodium à 15 mg/ml. Finalement, 5 μ l d'une solution d'hydrazide de l'acide digoxigénine- Σ -amidocaproïque est ajouté, l'ensemble est incubé pendant 1 h à température ambiante.

b. Révélation de la digoxigénine couplée à la partie glycanique des glycoprotéines.

La révélation est réalisée sur feuille de nitrocellulose sur laquelle ont été transférées, après électrophorèse, les glycoprotéines couplées à la digoxigénine. Les sites non spécifiques de la nitrocellulose sont tout d'abord saturés par traitement avec la solution bloquante fournie par la firme Boehringer Mannheim. La feuille de nitrocellulose est ensuite incubée avec l'anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline pendant 1 h dans un tampon Tris 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 6,5. Après 3 lavages dans le tampon d'incubation, la feuille de nitrocellulose est placée dans un tampon Tris-HCl 0,1 M, MgCl₂ 0,05 M, NaCl 0,1 M, pH 9,5. La révélation se fait par addition de 50 μ l d'une solution à 50 mg/ml du substrat de la phosphatase alcaline (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) et 37,5 μ l de sel de tetrazolium à 70 mg/ml.

2. Action d'endoglycosidases.

Le récepteur purifié, marqué à l'iode ¹²⁵I est concentré par précipitation à l'ATCA puis soumis à l'hydrolyse enzymatique de la N-glycanase, de l'endoglycosidase H et de la O-glycanase selon un

protocole préconisé par la firme correspondante. Le degré de déglycosylation est estimé après gel de polyacrylamide et autoradiographie par la différence de migration entre les récepteurs mis en présence ou non des endoglycosidases

a. Action de la N-glycanase.

La N-glycanase (Genzyme) est un enzyme qui hydrolyse tous les oligosaccharides liés N-glycosidiquement à l'asparagine des glycoprotéines, incluant les chaînes glucidiques sialylées, phosphorylées ou sulfatées (Elder et Alexander, 1982; Maley et al., 1989). La coupure enzymatique se fait au niveau du point d'attache entre le résidu asparagine et le résidu GlcNAc, libérant ainsi les oligosaccharides et la protéine avec un acide aspartique au niveau du site de glycosylation.

Le protocole de déglycosylation est celui préconisé par la firme Genzyme. Brièvement, le récepteur de la lactotransferrine marqué à l'iode ^{125}I et précipité à l'ATCA est suspendu dans 30 μl d'un tampon acétate de sodium 100 mM, SDS 0,5%, β -mercaptoéthanol 50 mM, Nonidet P-40 2,5%, pH 7,5. L'échantillon est dénaturé par chauffage à 100°C pendant 5 min. L'enzyme (0,3 unité) et un antiprotéase, le PMSF 0,5 mM sont alors ajoutés à l'échantillon remis à température ambiante et le tout est incubé 48 h à 37°C. L'incubation terminée, l'échantillon est soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide et à une autoradiographie.

Un témoin positif renfermant de la sérotransferrine est hydrolysé dans les mêmes conditions.

b. Action de l'endoglycosidase H.

L'endoglycosidase H (Boehringer Mannheim) est un enzyme isolé du milieu de culture d'une souche de Streptomyces lividans recombinante. Cet enzyme hydrolyse les N-glycannes de type oligomannosidique et de type hybride (Kobata, 1979). La coupure enzymatique se fait au niveau de la liaison : GlcNAc (β 1-4) GlcNAc, libérant ainsi le glycanne et la protéine avec un résidu de GlcNAc en position réductrice.

Le récepteur purifié, marqué à l'iode ^{125}I est concentré par précipitation à l'ATCA puis suspendu dans un tampon acétate de sodium 50 mM, SDS 0,02%, β -mercaptoéthanol 100 mM, pH 5,5. L'échantillon est alors dénaturé à 100°C pendant 5 min puis placé pendant 48 h à 37°C en présence de 20 mU d'endoglycosidase H et de 0,5 mM de PMSF. Après action de l'endoglycosidase, l'échantillon est soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide et à une autoradiographie. La carboxypeptidase bovine traitée dans les mêmes conditions sert de témoin positif.

c. Action de la O-glycanase.

La O-glycanase (Genzyme) est un enzyme purifié de milieux de culture de Diplococcus pneumoniae. La O-glycanase catalyse la libération du disaccharide Gal(β 1-3)GalNAc lié à un résidu de sérine ou de thréonine. La présence d'acide sialique empêche l'action de la O-glycanase ce qui rend nécessaire la désialylation préalable de l'échantillon (Takasaki et Kobata, 1976).

L'échantillon est tout d'abord dénaturé pendant 5 min à 100°C par le SDS (0,15%) dans un tampon cacodylate de sodium 10 mM, pH 6.

6 à 7 excès molaire d'un détergent non ionique (Triton X-100) sont ajoutés avant l'addition de la neuraminidase (0,1 U, Sigma) et de la O-glycanase (2 mU) afin de les protéger de l'action dénaturante du SDS. L'incubation est réalisée pendant 48 h en présence de PMSF (0,5 mM) et de 1,10 phénantroline (1 mM). Les échantillons sont ensuite analysés en gel de polyacrylamide. La fétuine traitée dans les mêmes conditions sert de témoin positif.

3. Détermination de la structure glycanique du récepteur à l'aide de différentes lectines.

Les lectines ont la propriété de reconnaître spécifiquement des structures glycaniques particulières. L'étude de la glycosylation du récepteur de la lactotransferrine a été affinée en étudiant la fixation de plusieurs lectines: la Concanavalline A (Con A), la Galanthus nivalis agglutinine (GNA), la Phytohémagglutinine (PHA) et la Peanut agglutinine (PNA).

a. Réactifs.

La GNA et la PNA couplées à la digoxigénine proviennent de la firme Boehringer Mannheim.

La Con A (IBF) et le mélange d'isolectines PHA-L4 et PHA-E4 (IBF) ont été marquées à l'iode ^{125}I suivant le protocole décrit p. 185. Ce protocole a été modifié pour la Con A : en effet, afin de protéger le site de reconnaissance de la lectine, le marquage radioactif à l'iode ^{125}I à été réalisé sur le complexe lectine-monosaccharide (α -méthyl mannoside 0,3 M), le dessalage de la Con A a été réalisé sur une colonne de Biogel P2.

Pour chaque lectine étudiée, une glycoprotéine témoin a été utilisée :

- sérotransferrine pour la Con A
- carboxypeptidase Y pour la GNA
- thyroglobuline bovine pour la PHA
- fétuine pour la PNA

b. Mode opératoire.

La réaction de fixation des lectines a été réalisée sur le récepteur transféré sur nitrocellulose après électrophorèse en gel de polyacrylamide.

L'étude de la fixation de PHA et de la PNA est réalisée après désialylation des glycoprotéines : les glycoprotéines fixées à la nitrocellulose sont incubées 1 nuit à 37°C dans un tampon acétate de sodium 0,05 M, CaCl₂ 0,004 M, NaCl 0,06M, pH 5,6 en présence de 0,3 U de neuraminidase (Sigma).

Les incubations de chaque lectine (0,5 à 10 µg/ml) durent 4 à 5 h dans un tampon adapté à chaque activité lectinique :

- tampon Con A : acétate de sodium 50 mM, MgCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 6,5
- tampon PHA : PBS, pH 7,2
- tampon GNA et PNA : Tris-HCl 0,05 M, MgCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,5

Dans le cas de la Con A, un même essai est réalisé en présence de 0,5 M d' α -méthyl glycoside afin de démontrer la spécificité de reconnaissance.

Les révélations sont données soit par autoradiographie soit en utilisant l'anticorps spécifique de la digoxigénine et couplé à la phosphatase alcaline.

III. RESULTATS.

A. DETERMINATION PARTIELLE DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE.

En collaboration avec le Laboratoire de chimie des protéines du CEA de Saclay, nous avons réalisé la séquence primaire de plusieurs peptides du récepteur lymphocytaire soluble de la lactotransferrine.

1. Chromatogramme.

L'hydrolyse trypsique du récepteur lymphocytaire soluble de la lactotransferrine a été réalisée, selon la technique mise au point par Carles et Riva (1991), sur 50 μg de récepteur contenu dans une bande de gel de polyacrylamide, un témoin négatif est préparé dans les mêmes conditions à partir d'une bande de gel de polyacrylamide ne contenant pas de protéine. Les deux hydrolysats sont chromatographiés en HPLC sur une colonne de phase reverse C18, le chromatogramme de l'hydrolysate trypsique du récepteur de la lactotransferrine est représenté dans la figure 35, p. 166. La comparaison de ce chromatogramme avec celui obtenu pour le témoin négatif permet de définir les pics correspondants aux peptides du récepteur de la lactotransferrine. Les pics majeurs ont été rechromatographiés sur le même type de phase stationnaire.

2. Détermination de la séquence des peptides.

Après la seconde chromatographie, les peptides sont directement analysés par dégradation d'Edman (1967) sur un séquenceur, 8

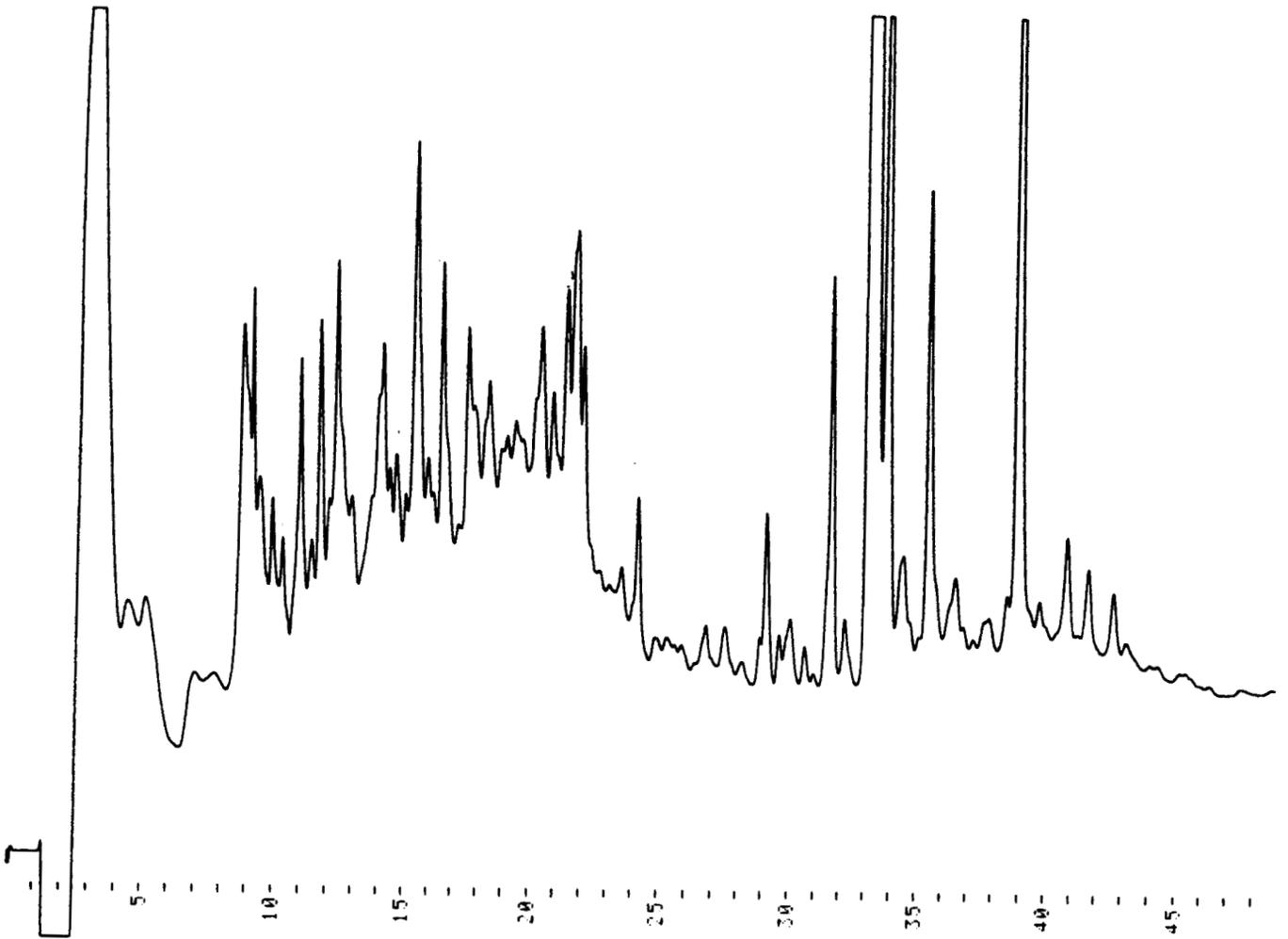


Figure 35 : Chromatogramme de l'hydrolysat trypsique du récepteur lymphocytaire soluble de la lactotransferrine.

La chromatographie est réalisée en HPLC sur colonne de phase reverse C18. La détection des peptides est effectuée par mesure de l'absorbance à 214 nm.

séquences ont été obtenues, ces séquences sont représentées dans la figure 36, p. 168, les acides aminés mis entre parenthèses ne sont pas définis avec certitude.

Chaque séquence peptidique à fait l'objet d'une recherche d'homologie dans des banques de données. Seule la séquence du peptide 7A présente une homologie totale avec une séquence connue correspondant à la région 631-639 du plasminogène bovin. Le peptide 7A est un peptide majeur or aucune homologie n'a été retrouvée entre les 7 autres séquences peptidiques et le plasminogène bovin, ces données démontrent d'une part que le peptide 7A ne provient pas d'une contamination par le plasminogène bovin, et d'autre part, que le récepteur de la lactotransferrine est bien distinct de cette protéine.

B. ETUDE DE LA GLYCOSYLATION DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE.

Nous avons tout d'abord mis en évidence la présence de glycannes sur les récepteurs lymphocytaires soluble et membranaire et sur le récepteur plaquettaire membranaire. La nature et le nombre des glycannes portés par le récepteur membranaire lymphocytaire et le récepteur membranaire plaquettaire ont ensuite été étudiés selon la sensibilité de ces récepteurs vis à vis des différentes endoglycosidases et en fonction de la reconnaissance de ces récepteurs par différentes lectines.

1. Mise en évidence de la glycosylation des récepteurs lymphocytaire et plaquettaire de la lactotransferrine.

Les essais ont été réalisés à partir des fractions C contenant le

5A : (N)QETA(VFAPGD)
6B : (S)EQTPHK
7A : EQSVQEIPV
7B : (E)SAQS
11A : XXATS
12A : XGY(Y)F(DGISR)
17A : EFTRPEEIIFL
17B : XXPYV(PP)LEETM

Figure 36 : Séquences des peptides isolés à partir d'un hydrolysate tryptique du récepteur lymphocytaire soluble de la lactotransferrine.

récepteur membranaire lymphocytaire, le récepteur soluble lymphocytaire et le récepteur membranaire plaquettaire. Les glycanes sont révélés après couplage à la digoxigénine par un anticorps anti-digoxigénine. Dans toutes les fractions étudiées, seules deux protéines ont été révélées (Fig. 37, p. 170), ces protéines de 105 kDa et 80 kDa pour les fractions membranaires lymphocytaires et plaquettaires correspondent aux récepteurs membranaires lymphocytaires et plaquettaires et à la lactotransferrine. Dans la fraction soluble lymphocytaire ces protéines de 100 kDa et 80 kDa correspondent au récepteur soluble lymphocytaire et à la lactotransferrine. Ces résultats démontrent la glycosylation des récepteurs membranaires lymphocytaires et plaquettaires et du récepteur soluble lymphocytaire.

2. Action de différentes endoglycosidases.

L'action des différentes endoglycosidases a été étudiée sur les récepteurs membranaires lymphocytaire et plaquettaire. Trois endoglycosidases ont été utilisées : l'endoglycosidase H et la N-glycanase spécifiques des N-glycanes et la O-glycanase spécifique des O-glycanes.

Le récepteur natif de la lactotransferrine est soumis à l'action de l'endoglycosidase H et de la N-glycanase, le récepteur désialylé est soumis à l'action de la O-glycanase suivant les protocoles décrits p. 162. Le degré de déglycosylation est donné par la différence de masse moléculaire, en gel de polyacrylamide, entre le récepteur natif et le récepteur soumis à l'action d'une endo-glycosidase.

Aucune différence significative n'a été observée entre la masse moléculaire du récepteur natif et celle des récepteurs soumis à l'action

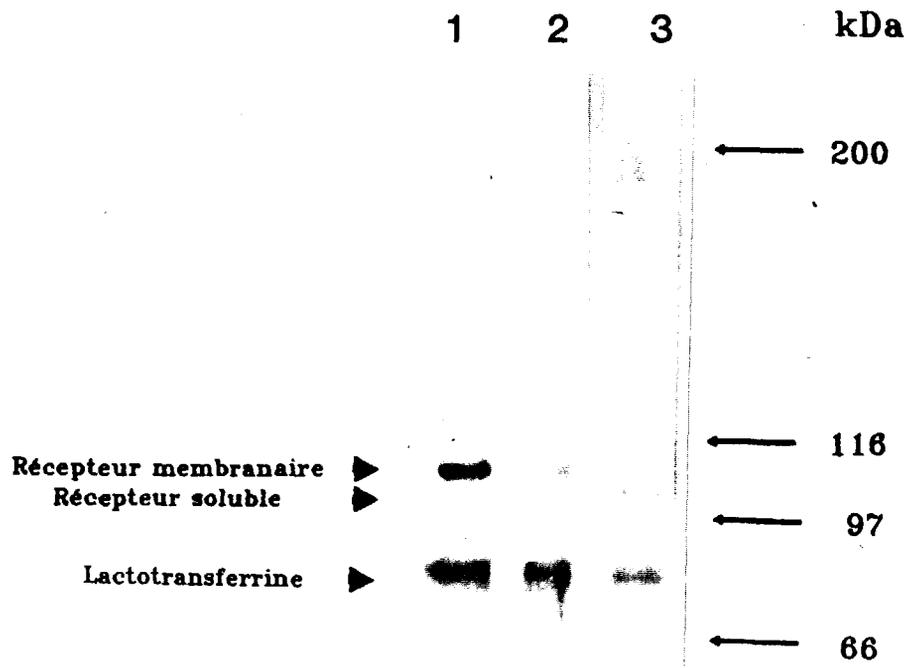


Figure 37 : Mise en évidence de la glycosylation du récepteur de la lactotransferrine.

La présence de glycanes au niveau des protéines contenues dans les fractions C lymphocytaire membranaire (1), plaquettaire membranaire (2) et lymphocytaire soluble (3) est révélée selon la technique de Haselbeck et Hösel (1990).

de l'endoglycosidase H et de la O-glycanase. Par contre, une diminution de 5 kDa est observée entre ces deux récepteurs après action de la N-glycanase (Fig. 38, p. 172).

Par la technique de Haselbeck et Hösel (1990) décrite p. 159, nous avons cherché à savoir si le récepteur de la lactotransferrine possédait encore des glycanes après déglycosylation par la N-glycanase. Le récepteur de la lactotransferrine n'est plus révélé par l'anticorps anti-digoxigénine après action de cette enzyme. La N-glycanase est responsable de la libération des oligosaccharides liés N-glycosidiquement, ces résultats indiquent donc que dans la gamme de sensibilité de la méthode, le récepteur de la lactotransferrine est, après action de la N-glycanase, totalement déglycosylé et suggère par conséquent l'absence de O-glycanes. Cette hypothèse est confirmée par les résultats obtenus précédemment avec la O-glycanase, cependant, nous devons noter que la O-glycanase n'hydrolyse qu'un nombre très restreint de O-glycanes (p. 162), de plus un faible nombre de O-glycanes pourrait ne pas être détecté par ces deux méthodes. Les glycanes liés N-glycosidiquement sur le récepteur de la lactotransferrine ne sont pas sensibles à l'action de l'endoglycosidase H spécifique des structures N-glycosidiques de type hybride et de type oligomannosidique, il est donc fort probable que leur structure soit de type N-acétyl-lactosaminique.

3. Détermination de la structure glucidique du récepteur de la lactotransferrine à l'aide de différentes lectines.

La spécificité de reconnaissance de différentes lectines (la Concanavalline A, la Phytohémagglutinine, la lectine de Galanthus nivalis

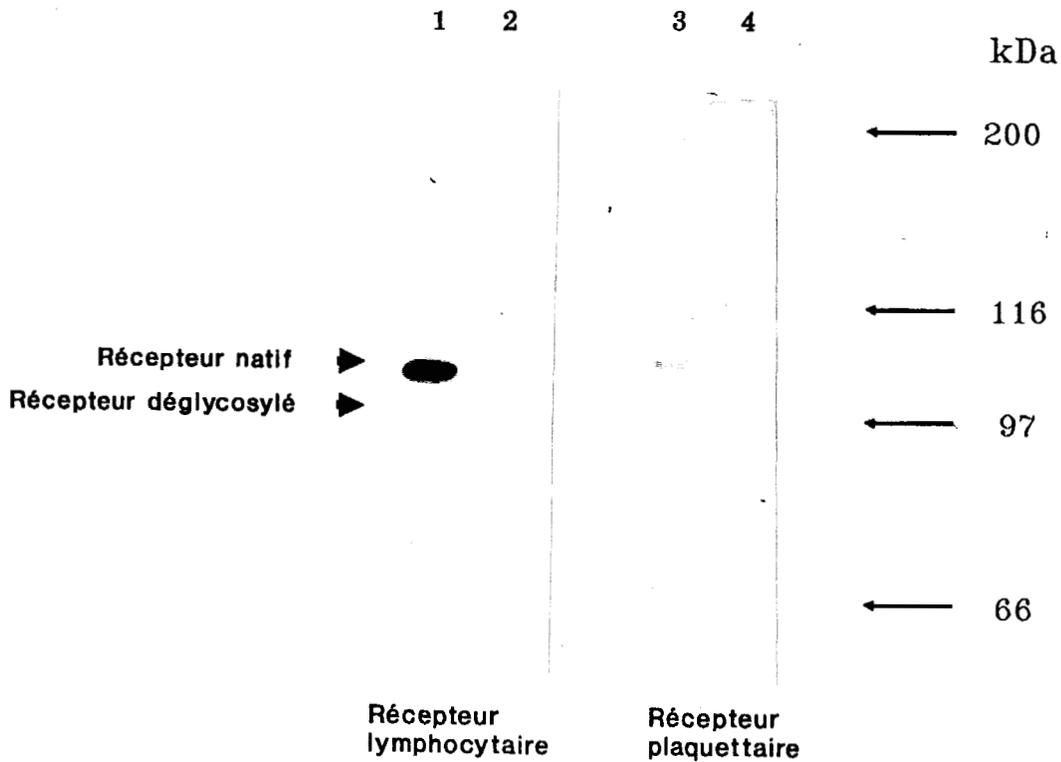


Figure 38 : Action de la N-glycanase sur le récepteur lymphocytaire et sur le récepteur plaquettaire de la lactotransferrine.

Le récepteur de la lactotransferrine marqué à l'iode ^{125}I et déglycosylé par la N-glycanase est analysé en gel de polyacrylamide. Le degré de déglycosylation est estimé par comparaison de la masse moléculaire des récepteurs natifs et déglycosylés. La révélation se fait par autoradiographie.

1. récepteur lymphocytaire natif,
2. récepteur lymphocytaire déglycosylé par la N-glycanase,
3. récepteur plaquettaire natif,
4. récepteur plaquettaire déglycosylé par la N-glycanase.

et la Peanut agglutinine) vis à vis de structures glycaniques particulières a été utilisée pour confirmer les résultats précédents et identifier la nature des glycanes portés par le récepteur de la lactotransferrine. Les expériences sont réalisées sur le récepteur membranaire lymphocytaire et sur le récepteur membranaire plaquettaire.

La Concanavoline A et la lectine de Galanthus nivalis sont incubées en présence du récepteur natif de la lactotransferrine, la phytohémagglutinine et la Peanut agglutinine sont incubées en présence du récepteur désialylé de la lactotransferrine selon le protocole décrit p. 164.

Les protéines des fractions lymphocytaires et plaquettaires ne sont pas révélées par la GNA, la PNA et par les isolectines PHA-L4 et PHA-E4. Par contre, la Con A reconnaît spécifiquement le récepteur membranaire de la lactotransferrine et la lactotransferrine présents dans ces fractions (Fig. 39, p. 174). La spécificité de reconnaissance est démontrée par l'inhibition de la fixation de la Concanavoline A en présence de 0,5 M d' α -méthyl glucoside.

La Concanavoline A est spécifique du noyau trimannosidique lié à 2 résidus de N-acétyl-glucosamine présent dans les structures N-acétyl-lactosaminiques biantennées et les α -mannoses en position terminale non réductrice présent dans les structures oligomannosidiques et hybrides (Tableau XIV, p. 174) (Debray et al., 1981). Nous pouvons exclure la présence de glycanes de type oligomannosidique ou de type hybride. En effet, dans ces structures, les résidus de mannose en position terminale liés en α 1-2, en α 1-3 et en α 1-6 à un autre mannose sont reconnus par la lectine de Galanthus nivalis (Tableau XIV, p. 174) (Shibuya et al., 1988). Or cette lectine n'interagit pas avec le récepteur de la lactotransferrine. De plus, nous avons vu précédemment que le récepteur de la lactotransferrine n'était pas sensible à l'action de l'endoglycosidase H spécifique des structures de type oligomannosidique et de type hybride. La révélation du récepteur de la lactotransferrine

Tableau XIV : Structures glycaniques reconnues spécifiquement par la Concanavaline A, par la lectine de *Galanthus nivalis* et par la Peanut agglutinine

<p>Concanavaline A (Con A)</p>	<p> $\text{NeuAc}(\alpha 2,6)\text{Gal}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,2)\text{Man}(\alpha 1,6)$ } $\text{Man}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,N)\text{Asn}$ $\text{NeuAc}(\alpha 2,6)\text{Gal}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,2)\text{Man}(\alpha 1,3)$ } $\text{Man}(\alpha 1,6)$ } $\text{Man}(\alpha 1,6)$ } $\text{Man}(\alpha 1,3)$ } $\text{Man}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,N)\text{Asn}$ $\text{Man}(\alpha 1,2)\text{Man}(\alpha 1,2)\text{Man}(\alpha 1,3)$ } $\text{Man}(\alpha 1,6)$ } $\text{Man}(\alpha 1,6)$ } $\text{Man}(\alpha 1,3)$ } $\text{GlcNAc}(\beta 1,2)$ } $\text{Man}(\alpha 1,3)$ } $\text{Gal}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,4)$ } $\text{Man}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,N)\text{Asn}$ </p>
<p>Lectine de <i>Galanthus nivalis</i> (GNA)</p>	<p> $\text{Man}(\alpha 1,6)$ } $\text{Man}(\alpha 1,6)$ } $\text{Man}(\alpha 1,3)$ } $\text{Man}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,N)\text{Asn}$ $\text{Man}(\alpha 1,2)\text{Man}(\alpha 1,2)\text{Man}(\alpha 1,3)$ } $\text{Man}(\alpha 1,6)$ } $\text{Man}(\alpha 1,6)$ } $\text{Man}(\alpha 1,3)$ } $\text{GlcNAc}(\beta 1,2)$ } $\text{Man}(\alpha 1,3)$ } $\text{Gal}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,4)$ } $\text{Man}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,N)\text{Asn}$ </p>
<p>Peanut agglutinine (PNA)</p>	<p> $\text{Gal}(\beta 1,3)\text{GalNAc}(\alpha 1,3)\text{Ser/Thr}$ </p>

— Fixation de forte affinité
 - - - Fixation de faible affinité

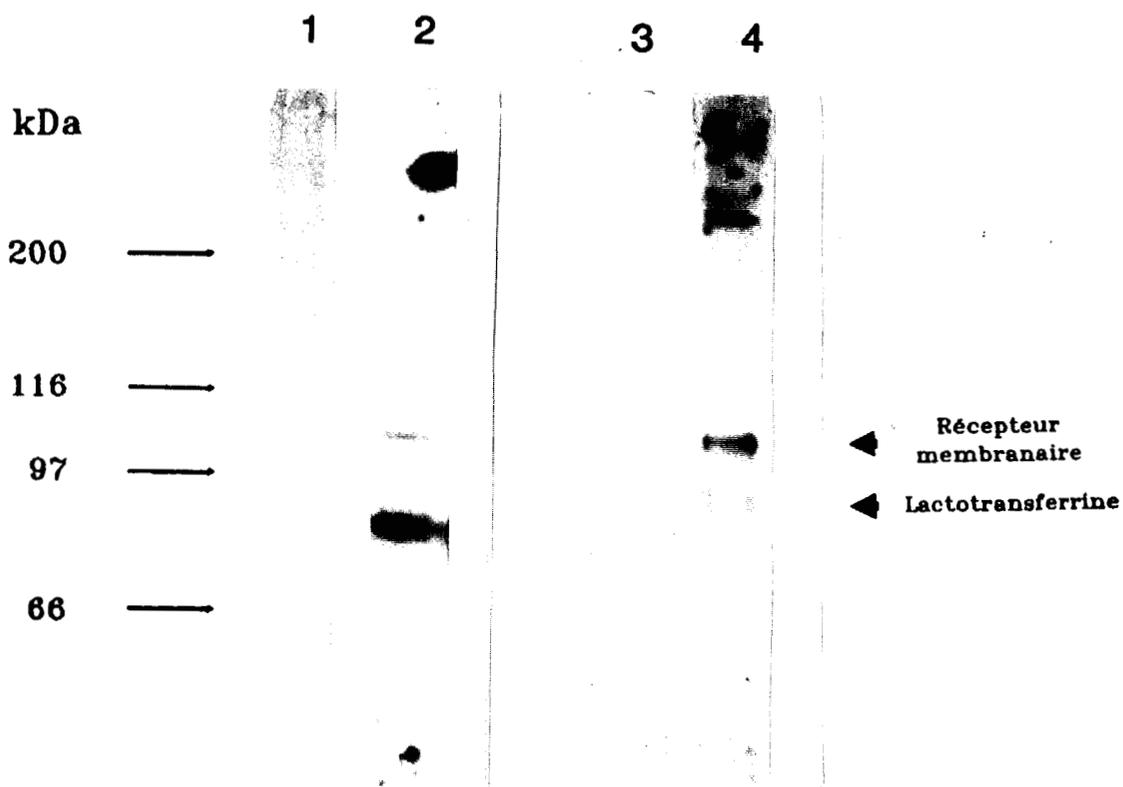


Figure 39 : Révélation du récepteur de la lactotransferrine par la concanavoline A.

Après électrophorèse en gel de polyacrylamide et électrotransfert sur membrane de nitrocellulose, les protéines contenues dans les fractions C lymphocytaire (1,2) et plaquettaire (3,4) sont révélées par la concanavoline A. Les incubations sont réalisées en présence (1,3) ou en absence de 0,5 M d' α -méthyl glucoside (2,4).

par la Concanavalline A est donc uniquement liée à la présence de glycanes de type N-acétyl-lactosaminique. La différence de masse de 5 kDa observée entre le récepteur natif et le récepteur déglycosylé par la N-glycanase devrait correspondre à la libération de deux ou trois glycanes de type N-acétyl-lactosaminique.

L'absence d'interaction entre les isolectines PHA-E4 et PHA-L4 et les récepteurs membranaires lymphocytaire et plaquettaire démontre que ces récepteurs ne possèdent pas de glycanes tétraantennés et/ou tri'-antennés reconnus spécifiquement par l'isolectine PHA-L4 ou de glycanes avec des résidus de N-acétylglucosamine intercalaire reconnus spécifiquement par l'isolectine PHA-E4 (tableau XV, p.177) (Cummings et Kornfeld, 1982).

Les récepteurs membranaires lymphocytaire et plaquettaire ne sont pas, après désialylation, reconnus par la Peanut agglutinine. Cette lectine reconnaît le "core" Gal(β 1-3)GalNAc des O-glycanes à condition qu'il ne soit pas lié à des résidus d'acide sialique, de fucose ou de galactose (tableau XIV, p. 174) (Goldstein et Hayes, 1978). Ces résultats confirment ceux obtenus avec la O-glycanase en démontrant l'absence de la structure de type Gal(β 1-3)GalNAc, sialylée ou non. La recherche de O-glycanes sur le récepteur de la lactotransferrine n'a pas été menée plus loin, nous pouvons cependant suggérer que le récepteur de la lactotransferrine est dépourvu de O-glycanes puisque la détection de glycanes selon la technique de Haselbeck et Hösel (1990) s'est révélée négative après action de la N-glycanase.

IV. CONCLUSION.

La détermination partielle de la structure primaire du récepteur de la lactotransferrine a conduit à l'identification de 8 séquences

Tableau XV : Structures glycaniques reconnues spécifiquement par la phytohémagglutinine - E4 et la phytohémagglutinine - L4

<p>Phytohémagglutinine - E4 (PHA-E4)</p>	<p> $\text{NeuAc}(\alpha 2,6)\text{Gal}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,2)\text{Man}(\alpha 1,6)$ } GlcNAc(β1,4) } $\text{Man}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,N)\text{Asn}$ $\text{NeuAc}(\alpha 2,6)\text{Gal}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,2)\text{Man}(\alpha 1,3)$ } $\text{NeuAc}(\alpha 2,3)\text{Gal}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,2)\text{Man}(\alpha 1,6)$ } GlcNAc(β1,4) } $\text{Man}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,N)\text{Asn}$ $\text{Gal}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,2)$ } Man(α1,3) } Gal(β1,4)GlcNAc(β1,4) } </p>
<p>Phytohémagglutinine - L4 (PHA-L4)</p>	<p> Gal(β1,4)GlcNAc(β1,6) } Man(α1,6) } Gal(β1,4)GlcNAc(β1,2) } Man(β1,4)GlcNAc(β1,4)GlcNAc(β1,N)Asn $\text{Gal}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,2)$ } Man(α1,3) } $\text{Gal}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,4)$ } Gal(β1,4)GlcNAc(β1,6) } Man(α1,6) } Gal(β1,4)GlcNAc(β1,2) } Man(β1,4)GlcNAc(β1,4)GlcNAc(β1,N)Asn $\text{NeuAc}(\alpha 2,6)\text{Gal}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta 1,2)\text{Man}(\alpha 1,3)$ } </p>

peptidiques. L'interrogation des banques de données a montré que les séquences obtenues, et par conséquent le récepteur de la lactotransferrine, ne peuvent pas être attribuées à une protéine dont la séquence peptidique est déjà connue. Les séquences peptidiques 6B, 7A et 17A ont été utilisées par le groupe responsable du clonage du récepteur de la lactotransferrine pour préparer des sondes oligonucléotidiques.

Les récepteurs membranaires lymphocytaire et plaquettaire et le récepteur soluble lymphocytaire sont glycosylés. L'étude de la glycosylation des récepteurs membranaires de la lactotransferrine à l'aide de différentes endoglycosidases et de différentes lectines a conduit à la mise en évidence de deux ou trois glycanes liés N-glycosidiquement et de type N-acétyl-lactosaminique.

Les récepteurs lymphocytaire et plaquettaire de la lactotransferrine semblent faiblement glycosylés lorsqu'on les compare au récepteur entérocytaire murin de la lactotransferrine. En effet, ce récepteur possède environ une dizaine de glycanes, ces glycanes liés N-glycosidiquement sont tri- ou tetraantennés et de type N-acétyl-lactosaminique (Hu et al., 1990). Il est intéressant de noter, qu'après déglycosylation, la masse moléculaire du récepteur entérocytaire murin (105 kDa) est très proche de celle des récepteurs lymphocytaire et plaquettaire humains (100 kDa). Nous pouvons imaginer que la structure protéique de ces récepteurs est très proche et qu'il existe des différences de glycosylation suivant l'origine animale ou tissulaire. Ce phénomène a été décrit pour le récepteur de la sérotransferrine (Huebers et Finch, 1987; Do et al., 1990).

CONCLUSION

CONCLUSION GENERALE

Les études portant sur la lactotransferrine ont permis de définir d'une façon très complète les propriétés structurales et conformationnelle de cette protéine, ses fonctions biologiques restent, par contre, encore très controversées. Des multiples rôles qui lui sont attribués, il ressort clairement que la lactotransferrine est principalement impliquée dans les mécanismes de défense anti-infectieuse. Le mode d'action de cette protéine est encore inconnu. La mise en évidence, par la technique de Scatchard (1949), de récepteurs spécifiques à la surface des neutrophiles, des monocytes et des lymphocytes montre qu'elle peut agir directement avec les cellules immuno-compétentes.

Les travaux réalisés au Laboratoire par Joël Mazurier ont conduit à la mise en évidence et à l'identification de récepteurs spécifiques de la lactotransferrine à la surface des lymphocytes circulants humains activés. Ces récepteurs ne sont pas exprimés par les lymphocytes quiescents, leur synthèse est induite par l'activation de ces cellules. Les paramètres de fixation calculés pour les lymphocytes activés étant très différents de ceux déterminés pour les neutrophiles et les monocytes, il a été émis l'hypothèse que le récepteur lymphocytaire était différent des récepteurs exprimés par les neutrophiles et les monocytes.

Nous avons donc entrepris nos travaux dans le but de répondre à cette hypothèse. Nos recherches ne se sont pas limitées aux lymphocytes, aux monocytes et aux neutrophiles sur lesquels des récepteurs de la lactotransferrine avaient été caractérisés mais à l'ensemble des cellules circulantes humaines. Ceci afin de vérifier les

résultats décrits dans la littérature concernant l'absence de récepteurs de la lactotransferrine à la surface des plaquettes et d'étendre les recherches sur les éosinophiles pour lesquels aucune étude n'avait été effectuée. Seuls les basophiles présents en très faible quantités dans le sang n'ont pas été analysés.

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

1 - L'utilisation de lactotransferrine marquée à la fluorescéine au niveau de ses glycanes ou encore de lactotransferrine et d'anticorps spécifiques fluorescents nous a permis, par cytofluorimétrie de flux, de mettre en évidence, pour la première fois, une fixation spécifique de cette protéine à la surface des plaquettes et des éosinophiles. Il est important de préciser que les éosinophiles, contrairement aux autres cellules analysées, ne proviennent pas du sang d'individus sains mais du sang d'individus atteints d'hyperéosinophilie. Nous avons également confirmé, par cette technique, l'interaction de la lactotransferrine avec les lymphocytes activés, les monocytes et les neutrophiles et l'absence de récepteurs pour la lactotransferrine à la surface des hématies et des lymphocytes quiescents.

2 - La fixation spécifique de la lactotransferrine à la surface des lymphocytes activés et des plaquettes, observée en présence d'une concentration de 10^{-7} M en lactotransferrine, est caractéristique de la présence de récepteurs à haute affinité. Alors qu'à cette concentration les récepteurs exprimés à la surface des lymphocytes activés et des plaquettes sont totalement saturés, aucune fixation n'est observée à la surface des autres cellules du sang humain. La fixation de la lactotransferrine à la surface des neutrophiles, des monocytes et des

éosinophiles a été mise en évidence en utilisant une concentration 50 fois plus importante en lactotransferrine. Sur ces cellules, la nature de la fixation de la lactotransferrine n'a pas été précisée, elle est probablement liée à la présence de récepteurs de faible affinité comme il a été décrit dans la littérature pour les neutrophiles et les monocytes.

Ces résultats sont donc en accord avec l'hypothèse émise précédemment selon laquelle il existerait plusieurs types de récepteurs pour la lactotransferrine. D'après les résultats obtenus, nous pouvons classer ces récepteurs en deux catégories :

- récepteurs à haute affinité à la surfaces des lymphocytes activés et des plaquettes,
- récepteurs à faible affinité à la surface des neutrophiles, des monocytes et des éosinophiles.

Etant donné les concentrations en lactotransferrine utilisées pour cette étude (10^{-7} M et 5×10^{-6} M) et les concentrations plasmatiques en lactotransferrine déterminée chez des sujets sains ($2,5 \times 10^{-9}$ M) et dans plusieurs cas pathologiques (8×10^{-10} M à 5×10^{-8} M), seule l'interaction de la lactotransferrine avec les récepteurs à haute affinité présents à la surface des lymphocytes activés et des plaquettes semble être possible au niveau de la circulation sanguine.

3 - Les récepteurs à haute affinité que nous avons mis en évidence à la surface des lymphocytes activés et des plaquettes fixent la lactotransferrine quelque soit son degré de saturation en fer. De plus, la fixation de la lactotransferrine diférique peut être inhibée par l'apolactotransferrine et par la lactotransferrine native. Ces résultats montrent que, contrairement à la sérotransferrine, le degré de saturation en fer de la lactotransferrine n'influence pas le mécanisme de reconnaissance de cette protéine par les récepteurs lymphocytaire et

plaquettaire. L'interaction de la sérotransferrine avec son récepteur est liée à un apport en fer, dans le cas de la lactotransferrine c'est donc probablement la protéine elle-même plutôt que le fer qu'elle transporte qui serait responsable de l'effet biologique.

4 - Après avoir identifié les cellules circulantes humaines possédant des récepteurs à haute affinité pour la lactotransferrine, nous avons purifié ces récepteurs afin d'étudier leurs propriétés structurales et préparer un anticorps spécifique. Pour cela, nous avons mis au point, à partir du protocole préconisé par Mazurier et al. (1989), une méthode de purification du récepteur de la lactotransferrine sur colonne d'anticorps anti-lactotransferrine.

5 - Les récepteurs lymphocytaire et plaquettaire sont après purification toujours actifs. Les propriétés structurales de ces deux récepteurs sont identiques : ils sont tous deux composés d'une chaîne polypeptidique unique de 105 kDa. Ces récepteurs sont glycosylés, l'utilisation de différentes endoglycosidases et de différentes lectines a conduit à la mise en évidence, sur ces deux récepteurs, de deux ou trois glycannes liés N-glycosidiquement et de type N-acétyl lactosaminique.

6 - Les récepteurs membranaires peuvent être par différents mécanismes libérés dans le milieu extracellulaire. Nous avons donc recherché la présence d'une forme soluble du récepteur de la lactotransferrine dans le milieu de culture des lymphocytes activés. Le récepteur lymphocytaire soluble de la lactotransferrine a été purifié par chromatographie d'affinité et identifié à une glycoprotéine monocaténaire de 100 kDa. La différence de 5 kDa entre la forme soluble et la forme

membranaire devrait correspondre à la région d'ancrage dans la membrane plasmique et à la région cytoplasmique du récepteur.

7 - La détermination partielle de la structure primaire du récepteur de la lactotransferrine nous a permis, par interrogation de banques de données, de montrer que ce récepteur ne peut pas être identifié à une protéine dont la séquence peptidique est déjà connue.

8 - Nous avons préparé un anticorps polyclonal monospécifique dirigé contre les récepteurs à haute affinité de la lactotransferrine. Cet anticorps reconnaît le récepteur lymphocytaire soluble à partir duquel il a été préparé mais aussi les récepteurs membranaires lymphocytaire et plaquettaire. Ces trois récepteurs possèdent donc des déterminants antigéniques identiques. L'identité structurale et antigénique des récepteurs lymphocytaire et plaquettaire montre qu'ils peuvent être identifiés à une même protéine. L'absence d'interaction entre l'anticorps que nous avons préparé et les cellules fixant la lactotransferrine avec une faible affinité (neutrophiles, monocytes, éosinophiles) démontre que les deux activités de reconnaissance, à haute et à faible affinité, ne sont pas portées par la même protéine.

L'anticorps que nous avons préparé et les sondes oligonucléotidiques synthétisées à partir des séquences peptidiques connues du récepteur de la lactotransferrine sont actuellement utilisés pour le clonage du récepteur.

Au Laboratoire, cet anticorps a également permis à Elisabeth Rochard (1991) de mettre en évidence la présence de récepteurs pour la lactotransferrine à la surface de différentes lignées cellulaires humaines

de glandes mammaires. D'autres expériences sont en cours de réalisation qui permettront d'identifier les cellules normales et cancéreuses qui expriment ce récepteur.

De nombreuses autres utilisations des anticorps polyclonaux que nous avons préparés et des anticorps monoclonaux qui sont en cours de préparation ont été envisagées. En particulier, suite aux travaux effectués par Gnezditskaya et al. (1984) et Zimecki et al. (1991) concernant le rôle de la lactotransferrine dans la différenciation des thymocytes, il serait intéressant d'étudier s'il existe une relation entre l'expression du récepteur de la lactotransferrine et l'état de différenciation cellulaire. Ces anticorps pourront également être utilisés pour doser le récepteur libre de la lactotransferrine dans le plasma sanguin et suivre ses variations quantitatives en fonction de différentes pathologies.

D'une manière générale, les anticorps dirigés contre le récepteur de la lactotransferrine faciliteront la recherche, l'isolement et l'étude structurale et conformationnelle de ce récepteur, de plus, ils permettront de mieux comprendre les rôles biologiques de la lactotransferrine.

APPENDICE TECHNIQUE

I. PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE.

A. PURIFICATION DE LA LACTOTRANSFERRINE.

La lactotransferrine humaine a été préparée selon le protocole mis au point au Laboratoire par Chéron et al. (1975) et Spik et al. (1982).

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

Le lactosérum est chromatographié à 4°C sur une colonne de SP-Séphadex C-50 stabilisée dans l'acétate de sodium 0,22 M. La colonne est lavée successivement par des concentrations de 0,22 et 0,4 M d'acétate de sodium. La lactotransferrine est éluée par l'acétate de sodium 1 M. Une deuxième chromatographie sur SP-Séphadex C-50 est nécessaire pour assurer la purification de la lactotransferrine. Les conditions sont identiques à celles décrites pour la première chromatographie.

B. SATURATION ET DESATURATION EN FER DE LA LACTOTRANSFERRINE.

1. Préparation de lactotransferrine saturée en fer.

La saturation en fer de la lactotransferrine est réalisée selon la méthode décrite par Mazurier et Spik (1980), en utilisant le réactif préconisé par Azari et Baugh (1967). La protéine est dissoute dans un

tampon acétate de sodium/bicarbonate de sodium 0,1 M de pH 8,2. Le fer est ajouté sous forme de citrate ferrique (en dissolvant 260 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dans 10 ml de tampon citrate de sodium/bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 8,2). La quantité de citrate ferrique ajoutée pour saturer totalement la lactotransferrine est de 1,6 μg de fer par mg de protéine, ce qui représente environ 110% de la quantité théorique. Après 3 h de repos, le fer libre est éliminé par dessalage sur une colonne de Séphadex G-25 équilibrée dans le tampon acétate.

2. Préparation d'apolactotransferrine.

L'apolactotransferrine est préparée selon la méthode mise au point et décrite par Mazurier et Spik (1980). La lactotransferrine native est dissoute dans un tampon formiate de sodium 0,2 M, phosphate de sodium 0,2 M, EDTA 40 mM de pH 4 pour obtenir une concentration maximale de 0,5%. Après un repos de 24 h, la solution est dialysée 3 jours contre de l'eau permutée.

C. COUPLAGE DE LA FLUORESCEINE SUR LES GLYCANNES DE LA LACTOTRANSFERRINE.

La méthode, mise au point au Laboratoire par Legrand, nécessite dans un premier temps l'oxydation périodique des résidus NeuAc des glycanes de la lactotransferrine humaine et dans un second temps la réaction des fonctions aldéhydiques formées avec le réactif HyF : (5-(((2-(carbohydrazino)méthyl)thio)acétyl)amino-fluorescéine).

230 μl de phosphate de sodium 0,1 M pH 5,6 contenant 5mg de lactotransferrine saturée fer, sont mélangés avec 100 μl de periodate

de sodium 0,018 M et incubés pendant 10 min à 4°C. La réaction est arrêtée par 10 μ l d'éthylène glycol et la solution est dessalée sur une colonne de Séphadex G-25 équilibrée dans le tampon phosphate de sodium 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,4. La lactotransferrine oxydée sur sa partie glycanique est ensuite incubée avec le réactif fluorescent (650 μ g de HyF dans 10 μ l de diméthylformamide) pendant 20 h à température ambiante. L'excès de réactif est ensuite éliminé par passage de la solution sur une colonne de Séphadex G-25 équilibrée dans le tampon phosphate pH 7,4 contenant 5% (v/v) de butanol et par dialyse contre du PBS. Le nombre de molécules de HyF fixées par molécule de lactotransferrine humaine est estimé à 1,5 par mesure de l'absorbance à 280 nm et à 495 nm selon la méthode de Jobbagy et Kiraly (1966).

II. PURIFICATION DES ANTICORPS.

Le sérum est, dans un premier temps, dessalé sur une colonne de Séphadex G-25 (4 x 30 cm pour un volume de 20 ml de sérum) équilibrée dans un tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 35 mM, pH 8,8. Les anticorps sont ensuite purifiés par chromatographie sur colonne d'échange d'ions, DEAE Tris-Acryl (3 x 20 cm), équilibrée dans le même tampon. Les IgG élués par le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 75 mM, pH 8,5 sont concentrés par précipitation au sulfate d'ammonium (40%), dialysés contre du PBS, aliquotés et congelés à - 20°C en présence de 50% de glycérol.

III. MARQUAGES RADIOACTIFS.

A. MARQUAGE DES PROTEINES EN SOLUTION A L'IODE ^{125}I .

L'iodogen (1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphényl glucoril, Pierce)

est dissous dans du chloroforme à raison de 1 mg/ml. Des fractions de 100 μ l sont ensuite réparties dans des tubes en verre et le chloroforme est éliminé par évaporation sous azote. La protéine à marquer (100 à 500 μ g dans 500 μ l de PBS) est placée dans le tube contenant l'Iodogen et 2 μ l d'iode radioactif sont additionnés (Na^{125}I , IMS 30, $3,7 \times 10^9$ Bq/ml, 100 mCi/ml, Amersham). La réaction est effectuée à 4°C sous agitation. Au bout de 20 min, l'iode libre est éliminé par passage de la solution sur une colonne de Séphadex G-25 (2 x 15 cm) équilibrée dans le tampon de réaction. Des fractions de 0,5 ml sont recueillies et leur radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur gamma (LKB). La concentration en protéine est déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm.

B. MARQUAGE DES PROTEINES MEMBRANAIRES A L'IODE ^{125}I .

Le marquage des protéines de la surface cellulaire est réalisé à l'aide de billes de polystyrène tapissé de dérivés de N-chloro-benzenesulfonamide (iodo-beads, Pierce). 3 iodo-beads, préalablement placée dans 500 μ l de PBS, sont ajoutées à 500 μ l de PBS contenant 3×10^8 cellules. Le tube est placé dans la glace puis 6 μ l d'iode radioactif sont additionnés. Le tube, toujours placé à 4°C, est agité avec précaution toutes les 5 min. Au bout de 30 min les cellules sont séparées des iodo-beads et lavées 3 fois dans 50 ml de PBS froid.

C. MARQUAGE METABOLIQUE A LA METHIONINE ^{35}S .

Au bout du deuxième jour d'activation, les lymphocytes sont lavés puis incubés dans du RPMI de composition identique à celui utilisé pour l'activation des lymphocytes mais dépourvu de méthionine. Après 2

h d'incubation les lymphocytes sont lavés une seconde fois puis incubés une deuxième fois dans ce même milieu à raison de 5×10^6 cellules par ml, l'incubation dure 6 h en présence de 1 mCi de ^{35}S -méthionine (1000 Ci/mme, Amersham). Les cellules sont enfin lavées trois fois dans du PBS puis remises en culture pendant 1 jour suivant les conditions décrites p ...

IV. TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES.

A. PRECIPITATION DES FRACTIONS PURIFIEES.

Avant d'être analysées en gel de polyacrylamide, les fractions purifiées obtenues par chromatographie d'affinité sur les différents types de colonnes sont concentrées par précipitation à l'ATCA. Les protéines, précipitées par 10% d'ATCA, sont centrifugées 15 min à 10.000 g puis lavées 2 fois par de l'éthanol distillé afin d'éliminer l'ATCA. Le culot est séché par évaporation de l'éthanol sous azote puis solubilisé dans le tampon échantillon d'électrophorèse (Tris-HCl 10 mM, 10% SDS, 10% glycérol, pH 8,9). Les échantillons sont centrifugés 5 min à 10.000 g avant d'être analysées en gel de polyacrylamide.

B. ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE SDS.

Les électrophorèses en gel de polyacrylamide sont réalisées dans un appareil vertical en plaques (1,5 x 140 x 180 mm ou 6 x 140 x 180 pour les électrophorèses préparatives) de marque Bio-Rad dans le système tampon préconisé par Laemmli (1970).

Le gel de séparation possède une réticulation de 5% ou de 7,5% en acrylamide dans un tampon Tris-glycocolle, HCl, pH 8,9. Le gel de concentration est à 5% en acrylamide dans un tampon Tris-glycocolle, HCl, pH 6,8. Le tampon d'électrophorèse et les gels d'acrylamide contiennent 0,1% de SDS.

Les échantillons sont solubilisés dans un tampon Tris-HCl 10 mM, pH 8,9 contenant 10% de SDS et 10% de glycérol et placés au bain marie à 100°C pendant 3 min.

L'électrophorèse réalisée à 150 V sous réfrigération d'eau froide est arrêtée lorsque le témoin de migration se trouve à 1 cm du bas de la plaque.

Après migration, les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie ou transférées sur feuille de nitrocellulose.

C. ELECTROTRANSFERT SUR MEMBRANE DE NITROCELLULOSE.

Après électrophorèse en gel de polyacrylamide, les protéines ayant migré selon leur masse moléculaire sont transférées électrophorétiquement (cellule de transfert Biorad) sur nitrocellulose (Schleicher et Schüll) selon la technique de Towbin et al. (1979). Le tampon utilisé est constitué de 25 mM Tris, 200 mM glycocolle, pH 8,4 et contient 20% de méthanol. L'électrotransfert est réalisé à 200 mA, à 4°C pendant 3 h.

Les protéines fixées à la nitrocellulose sont révélées à l'Amidoschwartz dilué au 1/10^{ème} ou par immuno-révélation.

V. DETECTION DES PROTEINES APRES TRANSFERT SUR NITROCELLULOSE.

La membrane de nitrocellulose, sur laquelle sont immobilisées les

protéines, est tout d'abord saturée de façon à bloquer tous les sites actifs restés libres et capables de réagir avec des protéines. La saturation est réalisée en plongeant la feuille de nitrocellulose dans une solution de PBS, lait en poudre 5% (w/v) ou de PBS, polivinyl pyrrolidone (PVP) 5%. Au bout d'1 h d'incubation sous agitation douce, la membrane de nitrocellulose est lavée dans une solution de PBS, PVP 2% puis placée dans le même tampon contenant un des anticorps suivant dirigés contre : le récepteur de la lactotransferrine (1:500), la lactotransferrine (1:1000), la sérum albumine (1:2000), la myosine (1:2000), l'actine (1:1000). L'incubation dure 1 h à température ambiante sous agitation douce puis la membrane de nitrocellulose est lavée 3 fois 10 min par la solution de PBS, PVP 2%. Finalement, la nitrocellulose est incubée en présence du deuxième anticorps spécifique du premier anticorps et marqué soit à l'iode ^{125}I soit couplé à la peroxydase. Lorsque l'anticorps est marqué à l'iode ^{125}I la révélation se fait par autoradiographie, lorsque l'anticorps est couplé à la peroxydase on utilise un chromogène (diamino-benzidine) oxydable par l'eau oxygénée en présence de peroxydase : la réaction colorée est réalisée dans le tampon PBS, 0,04% (p/v) diamino-benzidine par addition de 1% (v/v) d'eau oxygénée.

BIBLIOGRAPHIE

- Aasa, R. et Aisen, P.** (1968). An electron paramagnetic resonance study of the iron and copper complexes of transferrin. J. Biol. Chem., **243**, 2399-2404.
- Aguas, A. P., Esaguy, N., Sunkel, C. E. et Silva, M. T.** (1990). Cross-reactivity and sequence homology between the 65 kDa mycobacterial heat shock protein and human lactoferrin, transferrin, and DRB subsets of major histocompatibility complex class II molecules. Infect. Immun., **58**, 1461-1470.
- Ahn, J. et Johnston, R. M.** (1989). Maturation-associated loss and incomplete de novo synthesis of the transferrin receptor in peripheral Sheep reticulocytes. Response to heme and iron. J. Cell Physiol., **140**, 107-118.
- Aisen, P.** (1964). Transferrin metabolism and the liver. Semin. Liver Dis., **4**, 192-206.
- Aisen, P. et Liebman, A.** (1971). Lactoferrin and transferrin, a comparative study. Biochim. Biophys. Acta, **257**, 314-323.
- Aisen, P., Liebman, 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.
- Alarcon, B. et Fresno, M.** (1985). Specific effect of anti-transferrin antibodies on natural killer cells directed against tumor cells. Evidence for the transferrin receptor being one of the target structures recognized by NK cells. J. Immunol., **134**, 1286-1291.
- Alcantera, O., Javors, M. et Boldt, D. H.** (1991). Induction of protein kinase C mRNA in cultured lymphoblastoid T cells by iron-transferrin but not by soluble iron. Blood, **77**, 1290-1297.
- Alderete, J. F., Peterson, K. M. et Baseman, J. B.** (1988). Affinities of Trepanoma pallidum for human lactoferrin and transferrin. Genitourin. Med., **61**, 359-363.
- Alvarez, E., Girones, N. et Davis, R.** (1990). Inhibition of the receptor mediated endocytosis of diferric transferrin is associated with the covalent modification of the transferrin receptor with palmitic acid. J. Biol. Chem., **265**, 16644-16655.
- Ambruso, D. R. et Johnston, R. B.** (1981). Lactoferrin enhances hydroxyl radical production by human neutrophils, neutrophil particulate fractions, and an 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, B. F., Baker, H. M., Dodson, E. J., Norris, G. E., Rumball, S. V., Waters, J. M. et Baker, E. N. (1987). Structure of human lactoferrin at 3.2 Å resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 1-5.

Anderson, B. F., Baker, H. M., Norris, G. E., Rice, D. W. et Baker, E. N. (1989). Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. J. Mol. Biol., **209**, 711-734.

Andreesen, R., Osterholz, J., Bodemann, H., Bross, K. J., Costabel, U. et Löhr, G. W. (1984). Expression of transferrin receptors and intracellular ferritin during terminal differentiation of human monocytes. Blut, **49**, 195-202.

Ashorn, R. G., Eskola, J., Tuhkanen, P. J. et Krohn, K. J. (1986). Effect of the progesterone-inducible proteins human lactoferrin and chicken avidin on lymphocyte proliferation. Hum. Reprod., **3**, 149-152.

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

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

Bagby, G. C., Rigas, V. D. et Bennett, R. M. (1981). Interaction of lactoferrin, monocytes, and T lymphocyte subsets in the regulation of steady-state granulopoiesis *in vitro*. J. Clin. Invest., **68**, 56-63.

Bagby, G. C., McCall, E., Bergstrom, K. A. et Burger, D. (1983a). A monokine regulates colony-stimulating activity production by vascular endothelial cells. Blood, **62**, 662-668.

Bagby, G. C., McCall, E. et Layman, D. L. (1983b). Regulation of colony stimulating activity production. Interactions of fibroblasts, mononuclear phagocytes and lactoferrin. J. Clin. Invest., **71**, 340-344.

Bagby, G. C., Dinarello, C. A., Wallace, P., Wagner, C., Hefeneider, S. et McCall, E. (1986). Interleukin-1 stimulates granulocyte macrophage colony-stimulating activity release by vascular endothelial cells. J. Clin. Invest., **78**, 1316-1323.

Baggiolini, M., De Duve, C., Masson, P. L. et Heremans, J. F. (1970). Association of lactoferrin with specific granules in Rabbit heterophil leukocytes. J. Exp. Med., **131**, 559-570.

Bailey, S., Evans, R. W., Garratt, R. C., Gorinsky, B., Hasnain, S., Horsburg, C., Jhoti, H., Lindley, P. F., Mydin, A., Sarra, R., et Watson, J. L. (1988). Molecular structure of serum transferrin at 3.3 Å resolution. Biochemistry, **27**, 5804-5812.

Baines, M. G., Lafleur, F. L. et Holbein, B. E. (1983). Involvement of transferrin and transferrin receptors in human natural killer effectors target interaction. Immunol. Lett., **7**, 51-55.

Baker, E. N., Rumball, S. V. et Anderson, B. F. (1987). Transferrins : Insights into structure and function from studies on lactoferrin. Trends Biochem. Sci., 12, 350-353.

Bannister, J. V., Bannister, W. H., Hill, H. A. O. et Thornalley, P. J. (1982). Enhanced production of hydroxyl radicals by the xanthine-xanthine oxidase reaction in the presence of lactoferrin. Biochim. Biophys. Acta, 715, 116-121.

Bartal, L., Padeh, S. et Passwell, J. H. (1987). Lactoferrin inhibits prostaglandin E2 secretion by breast milk macrophages. Paediatr. Res., 21, 54-57.

Barton, H. A., Eisenstein, R. S., Bomford, A. et Munro, H. N. (1990). Determinants of the interaction between the iron responsive element binding protein and its site in Rat l-ferritin mRNA. J. Biol. Chem., 265, 7000-7008.

Baynes, R. D., Bukofzer, G., Bothwell, T. H. et Bezwoda, W. R. (1987). Apotransferrin receptors and the delivery of iron from cultured human blood monocytes. Am. J. Hematol., 25, 417-425.

Baynes, R. D., Lamparelli, R. D. V., Bezwoda, W. R., Dajee, D. et van Der Walt, L. A. (1989). Plasma lactoferrin content in pregnancy. SAMT, 76, 531-534.

Baynes, R. D., Shih, Y. J., Hudson, B. G. et Cook, J. D. (1991). The supernatant forms of transferrin receptor released by K562 cells. 10th International Conference on Iron and Iron-Proteins, July 27th-July 31st, Oxford.

Beguin, Y., Huebers, H. A., Josephson, B. et Finch, C. A. (1988). Transferrin receptor in Rat plasma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 637-640.

Bennett, R. M., Quartey, A. C. et Holt, P. J. L. (1973). Lactoferrin, an iron binding protein in synovial fluid. Arthritis Rheum, 16, 186-190.

Bennett, R. M. 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, 156-165.

Bennett, R. M. et Kokocinski, T. (1979). Lactoferrin turnover in man. Clinical Science, 57, 453-460.

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

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

Bettens, F., Kristensen, F., Walker, C. et de Week, A. L. (1982). Human lymphocyte proliferation. Formation of activated (G1) cells. Eur. J. Immunol., **12**, 948-952.

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

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

Birgens, H. S., Karle, H., Hansen, N. E. et Kristensen, L. (1984). Lactoferrin receptors in normal and leukaemic human blood cells. Scand. J. Haematol., **33**, 275-280.

Birgens, H. S. (1985). Lactoferrin in plasma measured by an ELISA technique : evidence that plasma lactoferrin is an indicator of neutrophil turnover and bone marrow activity in acute leukemia. Scand. J. Haematol., **34**, 326-331.

Birgens, H. S., Kristensen, L. O., Borregard, N., Karle, H. et Hansen, H. E. (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.

Björn-Rasmussen, E., Hageman, J., Van Den Dungen, P., Prowit-Ksiazek, A. et Biberfeld, P. (1985). Transferrin receptors on circulating monocytes in hereditary haemochromatosis. Scand. J. Haematol., **34**, 308-311.

Bloch, B., Popovici, T., Levin, M. J., Tuil, D. et Kahn, A. (1985). Transferrin gene expression visualized in oligodendrocytes of the Rat brain by using in situ hybridization and immunohistochemistry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 6706-6710.

Bluard-Deconinck, J. M., Williams, J., Evans, R. W., van Snick, J., Osinski, P. A. et Masson, P. L. (1978). Iron binding fragments from the N-terminal and C-terminal region of human lactoferrin. Biochem. J., **171**, 321-327.

Bomford, A. B. et Munro, H. N. (1985). Transferrin and its receptor : their roles in cell function. Hepatology, **5**, 870-875.

Bomford, A., Isaac, J., Roberts, S., Edwards, A., Young, S. et Williams, R. (1986). The effect of desferrioxamine on transferrin receptors, the cell cycle and growth rates of human leukaemic cells. Biochem. J., **236**, 243-249.

Borova, J., Ponka, P. et Neuwirt, J. (1973). Study on intracellular iron distribution in rabbit reticulocytes with normal and inhibited haeme synthesis. Biochim. Biophys. Acta, **320**, 143-156.

Bourdon, M. A. et Ruoslahti, M. A. (1989). Tenascin mediates cell attachment through an RGD-dependent receptor. J. Cell. Biol., **108**, 1149-1155.

Boxer, L. A., Haak, R. A., Yang, H. H., Wolach, J. B., Whitcomb, J. A., Butterick, C. J. et Baehner, R. I. (1982). Membrane bound lactoferrin alters the surface of polymorphonuclear leukocytes. J. Clin. Invest., 70, 1049-1057.

Boyüm, A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Invest., 97, 77-89.

Brieland, J. K., Vissers, M. C. M., Phan, S. M. et Fantone, J. C. (1989). Human platelets mediate iron release from transferrin by adenine nucleotide-dependent and -independent mechanisms. Biochim. Biophys. Acta, 978, 191-196.

Brieva, J. A. et Stevens, R. M. (1984). Involvement of transferrin receptor in the production of NK-induced suppression of human antibody synthesis. J. Immunol., 133, 387-392.

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

Brock, J. H. et Rankin, E. M. (1981). Transferrin binding and iron uptake by Mouse lymph node cells during transformation in response to Concanavalin A. Immunology, 43, 393-412.

Broekhuysse, R. N. (1974). Tear lactoferrin : a bacteriostatic and complexing protein. Invest. Ophthalm., 13, 550-554.

Brown, J. P., Wright, P. W., Hart, C. E., Woodbury, R. G., Hellström, K. E. et Hellström, I. J. (1980). Protein antigens of normal and malignant human cells identified by immuno-precipitation with monoclonal antibodies. J. Biol. Chem., 255, 4980-4983.

Brown, J. P., Hewick, R. D., Hällstrom, I., Hällstrom, K. E., Doolittle, R. F. et Dreyer, W. J. (1982). Human melanoma-associated antigen P97 is structurally and functionally related to transferrin. Nature, 296, 171-173.

Broxmeyer, H. E., Gentile, P., Bognacki, J. et Ralph, P. (1983a). Lactoferrin, transferrin and acidic isoferritin : regulatory molecules with potential therapeutic value in leukemia. Blood Cells, 9, 83-105.

Broxmeyer, H. E., Lu, L. et Bognacki, J. (1983b). Transferrin, derived from an OKT8-positive subpopulation of T-lymphocytes, suppresses the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factors from mitogen-activated T lymphocytes. Blood, 62, 37-50.

Broxmeyer, H. E., Gentile, P., Cooper, S., Lu, L., Juliano, L., Piacibello, W., Meyers, P. A. et Cavanna, F. (1984). Functionnal activities of isoferritins and lactoferrin in vitro and in vivo. Blood Cells, 10, 397-426.

Broxmeyer, H. E., Smithyman, A., Eger, R. R., Meyers, 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, J. J. et Armstrong, J. A. (1979). The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leucocytes. Immunology, 36, 781-791.
- Butler, T. W., Grossi, C. E., Canessa, A., Pistola, V. et Barton, J. C. (1990). Immunoreactive lactoferrin in resting activated and neoplastic lymphocytes. Leukemia Res., 14, 441-447.
- Byatt, J. C., Schmuke, J. J., Comens, P. G., Johnson, D. A. et Collier, R. J. (1990). The effect of bovine lactoferrin on muscle growth in vivo and in vitro. Biochem. Biophys. Res. Commun., 173, 548-553.
- Campbell, R. F. et Chasteen, N. D. (1977). An anion binding study of vanadyl (IV) human serotransferrin. J. Biol. Chem., 252, 5996-6001.
- Campbell, E. J. (1982). Human leukocyte elastase cathepsin G and lactoferrin: family of neutrophil granule glycoproteins that bind to an alveolar macrophage receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6941-6945.
- Campion, B., Léger, D., Wieruszkeski, J. M., 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.
- Carles, C. et Riva, M. (1992). soumis à publication.
- Casey, J. L., Hentze, M. W., Koeller, D. M., Canghman, S. W., Rouault, T. A., Klausner, R. D. et Harford, J. B. (1988). Iron response elements : regulatory RNA sequence that control mRNA levels and translation. Science, 240, 924-928.
- Chitambar, C. R., Massey, E. J. et Seligman, P. A. (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, C. R. et Zivkovic, Z. (1989). Release of soluble transferrin receptor from the surface of human leukemic HL 60 cells. Blood, 74, 602-608.
- Chitambar, C. R., Seigneuret, M. C., Matthaeus, W. G. et Lum, L. G. (1989). Modulation of lymphocyte proliferation and immunoglobulin production by transferrin-gallium. Cancer Res., 49, 1125-1159.
- Chitambar, C. R. et Zivkovic, Z. (1990). Influence of cellular iron status on the release of soluble transferrin receptor from human promyelocytic leukemic HL60 cells. J. Lab. Clin. Med., 116, 345-353.
- 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. Acad. Sci. Ser., 284, 585-588.
- Ciechanover, A., Schwartz, A. L. 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.

- Clemente, F., Ribeiro, T., Colomb, E., Rigarella, S. et Sales, H.** (1971). Comparaison des protéines des sucs pancréatiques humains normaux et pathologiques. Dosage des protéines sériques et mise en évidence d'une protéine particulière dans la pancréatite chronique calcifiante. Biochim. Biophys. Acta, **251**, 456-466.
- Collawn, J. F., Stangel, M., Kühn, L. A., Esekogwu, V., Jing, S., Trowbridge, I. S. et Tainer, J. A.** (1990). Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn structural recognition motif for endocytosis. Cell, **63**, 1061-1072.
- Cotner, T., Das Gupta, A., Papayannopoulou, T. H. et Stamatoyannopoulos, G.** (1989). Characterization of a novel form of transferrin receptor preferentially expressed on normal erythroid progenitors and precursors. Blood, **73**, 214-221.
- Cox, T. M., Mazurier, J., Spik, G., Montreuil, J. et Peters, T. J.** (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.
- Cox, T. M. et Kakepoto, G. N.** (1991). Isolation and purification of a novel iron transport protein from human reticulocytes. 10th International Conference on Iron and Iron-Proteins, July 27th-July 31st, Oxford.
- Cuatrecasas, P., Wilchek, M. et Anfinsen, C. B.** (1968). Selective enzyme purification by affinity chromatography. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **61**, 636-643.
- Cummings, R. D. et Kornfeld, S.** (1982). Characterization of the structural determinants required for the high affinity interaction of asparagin-linked oligosaccharides with immobilized Phaseolus vulgaris leucoagglutinating and erythroagglutinating lectins. J. Biol. Chem., **257**, 11230-11234.
- Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A. et Lodish, H. F.** (1983). PH and recycling of transferrin during receptor mediated endocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 2258-2262.
- Dautry-Varsat, A. et Lodish, H. F.** (1984). Les récepteurs cellulaires et l'endocytose. Pour la Science, juillet, 78-85.
- Dautry-Varsat, A.** (1986). Receptor mediated endocytosis : the intracellular journey of transferrin and its receptor. Biochimie, **62**, 375-381.
- Davidson, L. A. et Lönnnerdal, B.** (1988). Specific binding of lactoferrin to brush-border membrane : ontogeny and effect of glycan chain. Amer. J. Physiol., **254**, G580-G585.
- Davidson, L. A. et Lönnnerdal, B.** (1989). Fe-saturation and proteolysis of human lactoferrin : effect on brush-border receptor mediated uptake of Fe and Mn. Amer. Physiol. Soc., **257**, G930-G934.
- Davis, R. J., Corvera, S. et Czech, M. P.** (1986a). Insulin stimulates cellular iron uptake and causes the redistribution of intracellular

- transferrin receptors to plasma membrane. J. Biol. Chem., 261, 8708-8711.
- Davis, R. J., Johnson, G. L., Kelleher, D. J., Anderson, J. K., Mole, J. E. et Czech, M. P. (1986b). Identification of serine 24 as the unique site on the transferrin receptor phosphorylated by protein kinase C. J. Biol. Chem., 261, 9034-9041.
- Davis, R. J., Faucher, M., Racaniello, L. K., Carruthers, A. et Czech, M. P. (1987). Insulin-like growth factor I and epidermal growth factor regulate the expression of transferrin receptors at the cell surface by distinct mechanisms. J. Biol. Chem., 262, 13126-13134.
- Davis, R. J. et Meisner, H. (1987). Regulation of transferrin receptor cycling by protein kinase C is independent of receptor phosphorylation at serine 24 in Swiss 3T3 fibroblasts. J. Biol. Chem., 262, 16041-16047.
- Debanne, M. T., Regoeczi, E., Sweeney, G. D. et Krestynski, F. (1985). Interaction of human lactoferrin with the Rat liver. Am. J. Physiol., 248, 463-469.
- Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Spik, G. et Montreuil, J. (1981). Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycoproteins. Eur. J. Biochem., 117, 41-55.
- 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, J. P. et van Eijk, H. G. (1990). The biology of transferrin. Clin. Chim. Acta, 190, 1-46.
- Derisbourg, P., Wieruszkeski, J. M., 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.
- Derisbourg, P. (1990). Etude des récepteurs enterocytaires 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.
- de Souza, M. et Brock, J. H. (1989). Iron in Immunity Cancer and Inflammation (De Souza M Brock JH Eds) Wiley J. and Sons, New York.
- de Vet, B. J. C. M. et ten Hoopen, C. H. (1978). Lactoferrin in human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in relation to iron metabolism. Acta Med. Scand., 203, 197-203.
- Dickson, P. W., Aldred, A. R., Marley, P. D., Guo-Pen, T., Howlett, G. J. et Schreiber, G. (1985). High prealbumin and transferrin mRNA levels in the choroid plexus of rat brain. Biochem. Biophys. Res. Commun., 127, 890-896.
- Dorland, L., Haverkamp, J., Schut, B. L., Vliegenthart, J. F. G., 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.

Do Su, I. L., Enns, C. et Cummings, R. D. (1990). Human transferrin receptor contains O-linked oligosaccharides. J. Biol. Chem., **265**, 114-125.

Do Su, I. L. et Cummings, R. D. (1991). O-glycosylation of the human transferrin receptor. TIGG, **3**, 23-26.

Douy, A., Gervais, M. et Gallot, B. (1980). Synthesis and mesomorphic structures of new amphiphatic liposaccharides. Macromol. Chem., **181**, 1199-

Drouet, L., Sollier, C., Cisse, M., Pignaud, G., Mazoyer, E., Fiat, A. M., Jollès, P. et Caen, J. P. (1990). The antithrombotic effect of KRDS, a lactotransferrin peptide, compared with RGDS. Nouv. Rev. Fr. Hematol., **32**, 59-62.

Duncan, R. L. et McArthur, W. P. (1981). Lactoferrin-mediated modulation of mononuclear cell activities. Cell. Immun., **63**, 308-320.

Edman, P. et Begg, G. (1967). A protein sequenator. Eur. J. Biochem., **1**, 80-91.

Egyed, A. (1975). Effect of adenine nucleotides and pyrophosphate on the exchange of transferrin bound carbonate. Biochim. Biophys. Acta, **441**, 349-356.

Egyed, A. (1983). Studies on the partition on transferrin donated iron in rabbit reticulocytes. J. Haematol., **53**, 217-225.

Elder, J. H. et Alexander, S. (1982). Endo β -N-acetyl glucosaminidase F : endoglycosidase from Flavobacterium meningosepticum that cleaves both high mannose and complexe glycoproteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 4540-4544.

Enns, C. A., Suomalainen, H. A., Gebhardt, J. E., Schnoden, J. et Sussman, H. H. (1982). Human transferrin receptor : expression of the receptor is assigned to the chromosome 3. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 3241-3245.

Enns, C. A. et Sussman, H. H. (1981). Physical characterization of the transferrin receptor in human placentae. J. Biol. Chem., **256**, 9820-9823.

Enns, C. A. et Williams, A. (1991). Proper folding of the human transferrin receptor is correlated with the glycosylation of ASN 727. 10th International Conference on Iron and Iron-Proteins, July 27th-July 31st, Oxford.

Estevenon, J. P. et Figarella, C. (1983). A non competitive enzyme immunoassay of human lactoferrin in biological fluids. Clin. Chim. Acta, **129**, 311-318.

Evans, R. W. 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.

Fedail, S. S., Harvey, R. F., Salmon, P. R., Brown, P. et Read, A. E. (1979). Trypsin and lactoferrin levels in pure pancreatic juice in patients with pancreatic disease. Gut, **20**, 983-986.

Fletcher, J. et Suter, P. (1969). The transport of iron by the human placenta. Clin. Sci., **36**, 209-220.

Flowers, C. H., Skikne, B. S., Covell, A. M. et Cook, J. D. (1989). The clinical measurement of serum transferrin receptor. J. Lab. Clin. Med., **114**, 368-377.

Fry, M. (1989). Diferric transferrin reductase in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun., **58**, 469-473.

Furmanski, P., Li, Z. P., Fortuna, M. P., Swamy, C. H. et Das, M. R. (1989). Multiple molecular forms of lactoferrin. Identification of a class of lactoferrins that possesses ribonuclease activity and lack of iron-binding capacity. J. Exp. Med., **170**, 415-429.

Furmanski, P. et Li, Z. P. (1990). Multiple forms of lactoferrin in normal and leukemic human granulocytes. Exp. Hematol., **18**, 932-935.

Galbraith, G. M., Galbraith, R. M. et Faulk, W. P. (1980a). Immunological studies of transferrin and transferrin receptors of human placental trophoblasts. Placenta, **1**, 33-38.

Galbraith, R. M., Werner, P., Arnaud, P. et Galbraith, G. M. (1980b). Transferrin binding to peripheral blood lymphocytes activated by phytohemagglutinin involves a specific receptor ligand interaction. J. Clin. Invest., **66**, 1135-1143.

Gardiner, M. E. et Morgan, E. H. (1974). Transferrin and iron uptake by the liver in the Rat. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., **52**, 723-726.

Gavin, J. R., Buell, D. N. et Roth, J. (1972). Water soluble insulin receptors from lymphocytes. Science, **178**, 168-169.

Garret, N. E., Garret, N. J. B. et Archdeacon, J. W. (1973). Solubilisation and chromatography of iron binding compounds from reticulocyte stroma. Biochem. Biophys. Res. Commun., **52**, 466-474.

Girones, N. et Davis, R. J. (1989). Comparison of the kinetics of the cycling of the transferrin receptor in the presence or absence of bound diferric transferrin. Biochem. J., **264**, 35-46.

Gleeson, P. A. et Dias, V. (1990). N-linked oligosaccharides of the murine transferrin receptor from a plasmacytoma cell line. Comparison with total cellular N-glycans. Biochim. Biophys. Acta, **1036**, 47-54.

Gnezditskaya, E. V., Bukhova, V. P., Beletskaya, L. V., Zakharova, N. A. et Shakhanina, K. L. (1984). Lactoferrin receptors on human thymic lymphocytes. Stimulation of expression by adenosine, theophiline, and supernatant of thymic lymphocytes. Bull. Exp. Biol. Med., **98**, 1547-1550.

Gnezditskaya, E. V., Bukhova, V. P., Zakharova, N. A. et Malkina, L. A. (1987). Lactoferrin induced stimulation of Fc μ and Fc γ receptor expression on the surface of human thymus lymphocytes in vitro. Bull. Exp. Biol. Med., 4, 447-449.

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, J. W. (1983). Transferrin receptors on lymphocytes : structure, expression, evolution and function. Surv. Immunol. Res., 2, 129-136.

Goldstein, I. J. et Hayes, C. E. (1978). The lectins : carbohydrate-binding proteins of plants and animals. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 35, 127-340.

Goodfellow, P. N., Banting, G., Sutherland, D. R., Greaves, M., Solomon, E. et Porvey, S. (1982). Expression of human transferrin receptor is controlled by a gene on chromosome 3. Cell Genet., 8, 197-206.

Griffiths, E., Stevenson, P. et Ray, A. (1990). Antigenic and molecular heterogeneity of the transferrin binding protein of Neisseria meningitidis. FEMS Microbiol. Lett., 69, 31-36.

Gröhlich, D., Morley, C. G. D., Miller, R. J. et Bezkorovainy, A. (1977). Iron incorporation into isolated rat hepatocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 76, 682-690.

Gröhlich, D., Morley, C. G. D. et Bezkorovainy, A. (1979). Some aspects of iron uptake by rat hepatocytes in suspension. Int. J. Biochem., 10, 792-802.

Gutteridge, J. M. C., Paterson, S. K., Segal, A. W. et Halliwell, B. (1981). Inhibition of lipid peroxidation by the iron-binding protein lactoferrin. Biochem. J., 199, 259-261.

Haber, F. et Weiss, J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. Proc. R. Soc. Edinb., 147, 332-351.

Haldar, K., Henderson, C. L. et Cross, G. A. M. (1986). Identification of the parasite transferrin receptor of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and its acylation via 1,2-diacyl-glycerol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 8565-8569.

Hamilton, T. A., Wada, H. G. et Sussman, H. H. (1979). Identification of the transferrin receptor distribution on the surface of human cultured cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 6406-6410.

Hamilton, T. A., Gray, P. W. et Adams, D. O. (1984). Expression of the transferrin receptor on murine peritoneal macrophages is modulated by in vitro treatment with interferon-gamma. Cell Immunol., 89, 478-488.

Hansen, N. E., Malmquist, J. et Thorell, J. (1975). Plasma myeloperoxidase and lactoferrin measured by radioimmunoassay. Acta Med. Scand., 198, 437-443.

- Harfenist, E. J., Packham, M. A. et Mustard, J. F. (1988). Effects of the cell adhesion peptide, Arg-Gly-Asp-Ser on responses of washed platelets from Humans, Rabbits, and Rats. Blood, 71, 132-136.
- Haselbeck, A. et Hösel, W. (1990). Description and application of an immunological detection system for analyzing glycoproteins on blots. Glycoconjugate J., 7, 63-74.
- 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.
- Hashizume, S., Kuroda, K. et Murakami, H. (1987). Cell culture assay of biological activity of lactoferrin and transferrin. Methods in Enzymology, 147, 302-315.
- Haurani, F. I., Meyer, A. et O'Brien, R. (1973). Production of transferrin by the macrophages. J. Reticuloendoth. Soc., 14, 309-316.
- Hekman, A. M. et Rümke, P. (1969). The antigens of human seminal plasma with special reference to lactoferrin as a spermatozoa-coating antigen. Fert. Steril., 20, 312-323.
- Hentze, M. W., Rouault, T. A., Caughman, S. W., Dauris, A., Harford, J. B. et Klausner, R. D. (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.
- Hesketch, T. R., Moore, J. P., Morris, J. D. H., Taylor, M. V., Rogers, J., Smith, G. A. et Metcalfe, J. C. (1985). A common sequence signal of calcium and pH signals in the mitogenic stimulation of eukariotic cells. Nature, 313, 481-484.
- Hirata, T., Bitterman, P. B., Mornex, J. F. et Crystal, R. G. (1986). Expression of the transferrin receptor gene during the process of mononuclear phagocyte maturation. J. Immunol., 136, 1339-1345.
- Horwitz, D. A., Barke, A. C., 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, 2370-2373.
- Huebers, H. A., Huebers, E., Finch, C. A. et Martin, A. W. (1982). Characterization of an invertebrate transferrin from the crag Cancer magister (arthropoda). J. Comp. Physiol., 148, 101-109.
- Huebers, H. A. et Finch, C. A. (1987). The physiology of transferrin and transferrin receptors. Physiol. Rev., 67, 520-582.
- Huebers, H. A., Beguin, Y., Pootrakul, P., Einspahr, D. et Finch, C. A. (1990). Intact transferrin receptors in human plasma and their relation to erythropoiesis. Blood, 75, 102-107.
- Hunt, R. C., Riegler, R. et Davis, A. A. (1989a). Changes in glycosylation alter the affinity of the human transferrin receptor for its ligand. J. Biol. Chem., 264, 9643-9648.

- Hunt, R. C., Dewey, A. et Davis, A. A. (1989b). Transferrin receptors on the surfaces of retinal pigment epithelial cells are associated with the cytoskeleton. J. Cell Sci, **92**, 655-666.
- Hu, W. L., 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, W. L., Mazurier, J., Sawatzki, G., Montreuil, J. et Spik, G. (1988). Lactotransferrin receptor of Mouse small-intestinal brush border. Biochem. J., **249**, 435-441.
- Iacopetta, B. J., Rothenberger, S. et Kühn, L. C. (1988). A role for the cytoplasmic domain in transferrin receptor sorting and coated pit formation during endocytosis. Cell, **54**, 485-489.
- Imber, M. J. et Pizzo, S. V. (1983). Clearance and binding of native and defucosylated lactoferrin. Biochem. J., **212**, 249-257.
- Jacobson, E. L. et Jacobson, M. K. (1976). Pyridine nucleotide levels as a function of growth in normal and transformed 3T3 cells. Arch. Biochem. Biophys., **175**, 627-634.
- Jandl, J. H., Inman, J. K., Simmons, R. L. et Allen, D. W. (1958). Transfer of iron from serum iron-binding protein to human reticulocytes. J. Clin. Invest., **38**, 161-185.
- Jing, S. et Trowbridge, I. S. (1987). Identification of the intermolecular disulfide bonds of the human transferrin receptor and its lipid attachment site. EMBO J., **6**, 327-331.
- Jing, S., Spencer, T., Miller, K., Hopkins, C. et Trowbridge, I. S. (1990). Role of the human transferrin receptor cytoplasmic domain in endocytosis: localization of a specific signal sequence for internalization. J. Cell Biol., **110**, 283-294.
- Jing, S. et Trowbridge, I. S. (1990). Nonacylated human transferrin receptors are rapidly internalized and mediate iron uptake. J. Biol. Chem., **265**, 11555-11559.
- Jobbagy, A. et Kiraly, K. (1966). Chemical characterization of fluorescein isothiocyanate-protein conjugates. Biochim. Biophys. Acta, **124**, 166-175.
- Johansson, B. (1960). Isolation of an iron containing red protein from human milk. Acta Chem. Scand., **14**, 510-512.
- Jollès, P., Loucheux-Lefebvre, M. H. et Henschen, A. (1978). Structural relatness of K-casein and fibrinogen gamma-chain. J. Mol. Evol., **11**, 271-278.
- Jollès, P. (1975). Structural aspects of milk clotting process. Comparative features with the blood clotting process.. Mol. Cell. Biochem., **7**, 73-85.
- Jollès, P., Levy-Toledano, S., Fiat, A., Soria, C., Gillessen, D., Thomaidis, A., Dunn, F. W. et Caen, J. P. (1986). Analogy between

fibrinogen and casein : effect of an undecapeptide isolated from K-casein on platelet function . Eur. J. Biochem., **158**, 379-382.

Kälher, S., Christophers, E. et Schröder, J. M. (1988). Plasma lactoferrin reflects neutrophil activation in psoriasis. Brit. J. Dermatol., **119**, 289-293.

Kallis, S. G. et Morgan, E. H. (1974). Transferrin and iron uptake by Rabbit bone marrow cells in vitro. Brit. J. Haem., **28**, 37-52.

Kenneth, M. P. et Alderete, J. F. (1984). Iron uptake and increase intracellular enzyme activity follow host lactoferrin binding by Trichomonas vaginalis receptors. J. Exp. Med., **160**, 398-410.

Keydar, I., Chen, L., Karby, S., Weiss, F. R., Delarea, J., Radu, M., Chaitak, S. et Brenner, H. J. (1979). Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. Eur. J. Cancer, **15**, 659-670.

Kijlstra, A. et Veerhuis, R. (1981). The effect of an anti-complementatry factor on human tears. Am. J. Ophtalmol., **92**, 24-28.

Kijlstra, A. et Jeurissen, H. M. (1982). Modulation of classical C3 convertase of complement by tear lactoferrin. Immunology, **47**, 263-270.

King, B. F. (1976). Localization of transferrin on the surface of the human placenta by electron microscopic immunocytochemistry. Anat. Records, **186**, 151-160.

Klausner, R. D., Harford, J. B. et van Renswoude, J. (1983). Binding of apotransferrin to K562: explanation of the transferrin cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 2263-2266.

Klausner, R. D., Harford, J. et van Renswoude, J. (1984). Rapid internalization of the transferrin receptor in K562 cells is triggered by ligand binding or treatment with phorbol ester. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**, 3005-3009.

Klebanoff, S. J. et Waltersdorff, A. M. (1990). Prooxidant activity of transferrin and lactoferrin. J. Exp. Med., **172**, 1293-1303.

Klemow, D., Einsphar, D., Brown, T. A., Flowers, C. H. et Skikne, B. S. (1990). Serum transferrin receptor measurements in haematologic malignancies. Am. J. Haem., **34**, 193-198.

Knudsen, A. K. (1985). Proteins transferred to nitrocellulose for use as immunogens. Anal. Biochem., **147**, 285-288.

Kobata, A. (1979). Use of endo- and exo-glycosidases for structural studies of glycoconjugates. Anal. Biochem., **100**, 1-14.

Koeller, D. M., Casey, J. L., Hentze, M. W., Gerhardt, E. M., Chan, L. N. L., Klausner, R. D. et Harford, J. B. (1989). A cytosolic protein binds to structural elements within the iron regulatory region of the transferrin receptor mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 3574-3578.

- Kohgo, Y., Niitsu, Y. et Kondo, H.** (1987). Serum transferrin receptor as a new index of erythropoiesis. Blood, **70**, 1955-1958.
- Kohgo, Y., Niitsu, Y. et Nishisato, T.** (1988). Quantitation and characterization of serum transferrin receptor in patient with anemias and polycythemias. Japon J. Med., **27**, 64-75.
- Kolsto Otnaess, A. B., Meberg, A. et Sande, H. A.** (1983). Plasma lactoferrin measured by an enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). Scand. J. haematol., **31**, 235-240.
- Kulics, J. et Kijlstra, A.** (1987). The effect of lactoferrin on complement mediated modulation of immune complexe size. Immunol. Lett., **14**, 349-353.
- Laemmli, UK.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227**, 680-685.
- Larrick, J. W. et Cresswell, P.** (1979a). Modulation of cell surface iron transferrin receptors by cellular density and state activation. J. Supramol. Struct., **11**, 579-586.
- Larrick, J. W. et Cresswell, P.** (1979b). Transferrin receptors on human B and T lymphoblastoid cell line. Biochim. Biophys. Acta, **583**, 483-490.
- Lazarus, A. H. et Baines, M. G.** (1985). Studies on the mechanism of specificity of the human natural killer cells for tumor cells: correlation between target cell transferrin receptor expression and competitive activity. Cell. Immunol., **96**, 255-266.
- 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**, 671-677.
- Leclercq, Y.** (1987). Interactions transferrines-macrophages : rôle des glycannes dans la reconnaissance par les récepteurs membranaires du macrophage péritonéal de Souris. Thèse d'Université, Lille.
- Lee, E. Y. H., Lee, W. H., Kaetzel, C. S., Parry, G. et Bissell, M.J.** (1985). Interaction of Mouse mammary epithelial cells with collagen substrate : regulation of casein gene expression and secretion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 1419-1423.
- Lee, B. C. et Schryvers, A. B.** (1988). Specificity of the lactoferrin and transferrin receptors in Neisseria gonorrhoeae. Mol. Microbiol., **2**, 827-829.
- Leffell, M. S. et Spitznagel, J. K.** (1972). Association of human lactoferrin with lysozyme in granules of human polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun., **6**, 761-765.
- Leffel, M. S. et Spitznagel, J. K.** (1975). Fate of human lactoferrin and myeloperoxidase in phagocytosing human neutrophils : effects of immunoglobulin G subclass and immune complexes coated on latex beads. Infect. Immun., **12**, 813-820.

- Léger, D., Campion, B., Decottignies, J. P., 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., Mazurier, J., Metz-Boutigue, M. H., 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., Aubert, M. J., Loucheux-Lefebvre, M. H., 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., Montreuil, J. et Spik, G. (1988). Structure and spatial conformation of the iron-binding sites of transferrins. Biochimie, **70**, 1185-1195.
- Legrand, D., Mazurier, J., Maes, P., Rochard, E., Montreuil, J. et Spik, G. (1991). 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.
- Leibman, A. et Aisen, P. (1977). Transferrin receptor of Rabbit reticulocytes. Biochemistry, **16**, 1268-1272.
- Leibold, E. A. et Munro, H. N. (1988). Cytoplasmic protein binds in vitro to a highly conserved sequence in the 5' untranslated region of ferritin heavy- and light-subunit mRNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 2171-2175.
- Lestas, A. (1976). The effect of pH on human transferrin : selective labelling of the two iron binding sites. Brit. J. Haematol., **32**, 341-350.
- Light, N. D. (1977). The isolation and partial characterization of transferrin binding components of Rabbit reticulocyte plasma membranes. Biochim. Biophys. Acta, **495** 46-75.
- Lima, M. F. et Kierszenbaum, F. (1985). Lactoferrin effects on phagocytic cell function. I. Increased uptake and killing of an intracellular parasite by murine macrophages and human monocytes. J. Immunol., **134**, 4176-4183.
- Lima, M. F. et Villata, F. (1990). Trypanosoma cruzi receptors for human transferrin and their role. Mol. Biochem. Parasitol., **38**, 245-252.
- Line, W. F., Sly, D. A. et Bezkorovainy, A. (1976). Limited cleavage of human lactoferrin with pepsin. Int. J. Biochem., **7**, 203-208.
- 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.

Loftus, J. C. et Albrecht, R. M. (1984). Redistribution of the fibrinogen receptor of human platelet after surface activation. J. Cell Biol., **99**, 822-829.

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.

Lowry, D., Rosebrough, N. J., Fahr, A. L. et Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biochem., **193**, 265-275.

Luk, C. K. (1971). Study of the nature of metal binding sites and estimate of the distance between the metal binding sites in transferrin using trivalent lanthanide ions. Biochemistry, **10**, 2838-2843.

Lum, J. B., Infante, A. J., Makker, D. M., Yang, F. et Bowman, B. H. (1986). Transferrin synthesis by inducer T lymphocytes. J. Clin. Invest., **77**, 841-849.

Maacks, S., Yuan, H. Z. et Wood, W. G. (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., Kühn, L. C. et Ruddle, F. H. (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, R. T. A., Mendez, E., Sinha, C. K., Sutton, M. R., 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, R. T. A., Mendez, E., Shewale, J. G., Sinha, C. K., 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.

Mackay, J. A., Sass-Khun, S., Moqbel, R., Walsh, G. M. et Kay, A. B. (1986). The requirements for transferrin-dependent adherence of human granulocytes to pollen grains. Allergy, **41**, 169-178.

Maneva, A. I., Sirakov, L. M. et Manev, V. V. (1983). Lactoferrin binding to neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. Int. J. Biochem., **15**, 981-984.

March, S. C., Parikh, I. et Cuatrecasas, P. (1974). A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. Anal. Biochem., **60**, 149-152.

Markowitz, B., Van Snick, J. L. et Masson, P. L. (1979). Binding and ingestion of human lactoferrin by Mouse alveolar macrophages. Thorax, **34**, 209-212.

Martin, A. W., Huebers, E. et Webb, J. (1983). In "Proteins of iron storage and transport" (Urushizaki I., Aisen P., Listowsky I., Drysdale J. W., Eds) Elsevier Biomedical New-York, 259-260.

März, L., Hatton, M. W. C., Berry, L. R. et Regoeczi, E. (1982). The structural heterogeneity of the carbohydrate moiety of desialylated human transferrin. Can. J. Biochem., 60, 624-630.

Masson, P. L., Heremans, J. F. et Dive, C. H. (1966). An iron binding protein common to many external secretions. Clin. Chim. Acta, 14, 735-739.

Masson, P. L., Heremans, J. F. et Schonne, E. (1969). Lactoferrin an iron binding protein in neutrophilic leukocytes. J Exp. Med., 130, 643-658.

Masson, P. L. (1970). La lactoferrine protéine des sécrétions externes et des leucocytes neutrophiles. In : Collection "Medico-Monographies d'agrégés"(Ed Arscia) Bruxelles, 93-165.

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, D. S., Sussman, H. H. et Klausner, R. D. (1984). Biosynthetic regulation of the human transferrin receptor by desferrioxamine in K562 cells. J. Biol. Chem., 259, 2689-2692.

May, W. S., Jacobs, S. et Cuatrecasas, P. (1984). Association of phorbol ester induced hyperphosphorylation and reversible regulation of transferrin membrane receptors in HL-60 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 2016-2020.

May, W. S., Sahyoun, N., Jacobs, S., Wolf, M. 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, 9419-9426.

May, S. et Tyler, G. (1987). Phosphorylation of the surface transferrin receptor stimulates receptor internalization in HL-60 leukemic cells. J. Biol. Chem., 262, 16710-16718.

Mazoyer, E., Levy-Toledano, S., Rendu, F., Hermant, L., Lu, H., Fiat, A., Jollès, P. et Caen, J. P. (1990). KRDS a new peptide derived from human lactotransferrin inhibits platelet aggregation and release reaction. Eur. J. Biochem., 194, 43-49.

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.

Mazurier, J., Léger, D., Tordera, V., Montreuil, J. et Spik, G. (1981). Comparative studies of the iron binding properties of transferrins. Differences in the involvement of histidine residues as revealed by carbethoxylation. Eur. J. Biochem., 119, 537-543.

Mazurier, J., Lhoste, J. M., Montreuil, J. et Spik, G. (1983a). Comparative study of the iron binding properties of human transferrins. Biochim. Biophys. Acta, **745**, 44-49.

Mazurier, J., Metz-Boutigue, M. H., Jollès, J., Spik, G., Montreuil, J. et Jollès, P. (1983b). Human lactotransferrin : molecular, functional and evolutionary comparisons with human serum transferrin and hen ovotransferrin. Experimentia, **39**, 135-141.

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., Legrand, D., Hu, W. L., 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., Dauchez, M., Vergoten, G., Montreuil, J. et Spik, G. (1991). 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.

McCormick, J. A., Markey, G. M. et Morris, T. C. M. (1991a). Lactoferrin inducible monocyte cytotoxicity for K562 cells and decay of natural killer lymphocyte cytotoxicity. Clin. Exp. Immunol., **83**, 154-156.

McCormick, J. A., Markey, G. M., Morris, T. C. M., Auld, P. W. et Alexander, H. D. (1991b). Lactoferrin inducible monocyte cytotoxicity defective in esterase deficient monocytes. Brit. J. Haematol., **77**, 287-290.

McGowan, S. E., Murray, J. J. et Parrish, M. G. (1986). Iron binding, internalization and fate in human alveolar macrophages. J. Lab. Clin. Med., **108**, 587-595.

McGraw, T. E., Dunn, K. W. et Maxfield, F. R. (1988). Phorbol ester treatment increases the exocytic rate of the transferrin receptor recycling pathway independent of serine-24 phosphorylation. J. Cell Biol., **106**, 1061-1066.

McGraw, T. E. et Maxfield, F. R. (1990). Human transferrin receptor internalization is partially dependent upon an aromatic amino acid on the cytoplasmic domain. Cell Regul., **1**, 369-377.

McGraw, T. E., Pytowski, B., Arzt, J. et Ferrone, C. (1991). Mutagenesis of the human transferrin receptor : two cytoplasmic phenylalanines are required for efficient internalization and a second-site mutation is capable of reverting an internalization-defective phenotype. J. Cell. Biol., **112**, 853-861.

McKenna, W. R., Mickelsen, P. A., Sparling, P. F. et Dyer, D. W. (1988). Iron uptake from lactoferrin and transferrin by Neisseria gonorrhoeae. Infect. Immun., **56**, 785-791.

Mead, P. E. et Tweedie, J. W. (1990). cDNA and protein sequence of bovine lactoferrin. Nucl. Acid. Res., **18**, 7167-7167.

Metz-Boutigue, M. H., Jollès, J., Jollès, P., Mazurier, J., Spik, G. et Montreuil, J. (1980). Amino acid sequence, location and phylogenetic aspects of the glycopeptides of human lactotransferrin. Biochim. Biophys. Acta, 622, 308-314.

Metz-Boutigue, M. H., Jollès, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J. et Jollès, P. (1984). Human lactotransferrin : amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. Eur. J. Biochem., 145, 659-676.

Miyazawa, K., Mantel, C., Lu, L., Morrison, D. C. et Broxmeyer, H. E. (1991). Lactoferrin-lipopolysaccharide interactions . Effect on lactoferrin binding to monocyte/macrophage differentiated HL-60 cells. J. Immunol., 146, 723-729.

Moguilevsky, N., Courtoy, P. J. et Masson, P. L. (1985a). Study of lactoferrin binding sites at the surface of blood monocytes. In : "Proteins of Iron Storage and Transport" (Spik G., Montreuil J., Crichton R.R., Mazurier J., Eds) Elsevier, 199-202.

Moguilevsky, N., Retegui, L. A. et Masson, P. L. (1985b). Comparison of human lactoferrins from milk and neutrophilic leucocytes. Biochem. J., 229, 353-359.

Moguilevsky, N. (1987). Thèse d'Université, Lille.

Molloy, A. L. et Winterbourn, C. C. (1990). Release of iron from phagocytosed Escherichia coli and uptake by neutrophil lactoferrin. Blood, 75, 984-989.

Monnard, C. et Vernet, M. (1988). Détermination de la lactoferrine plasmatique par une méthode immunoenzymatique "double sandwich" en phase hétérogène. Path. Biol., 36, 941-944.

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.

Montreuil, J. et Spik, G. (1975). In "Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine" (RR Crichton, ed) Elsevier North Holland, Amsterdam

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. (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 van Deenen eds) Elsevier, Amsterdam 19B 1-188

- Montreuil, J.** (1983). Conformation of the glycoprotein glycans of the N-acetyllactosaminique type. Biochem. Soc. Trans., **11**, 134-136.
- 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., 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 R.R., Mazurier J. Ed) Elsevier Amsterdam, 25-38.
- Morgan, O. S., Bankay, J. et Quash, G. A.** (1975). The effect of lactoferrin, an iron binding protein, on complement activity. West. Indian. Med., **24**, 46-54.
- Müllner, E. W. et Kühn, L. C.** (1988). A stem-loop in the 3'untranslated region mediates iron-dependent regulation of the transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm. Cell, **53**, 815-825.
- Müllner, E. W., Neupert, B. et Kühn, L. C.** (1989). A specific mRNA binding factor regulates the iron-dependent stability of cytoplasmic transferrin receptor mRNA. Cell, **58**, 373-382.
- Naidu, A. S., Miedzobrodzki, J., Andersson, M., Nilsson, L. E., Forsgren, A. et Watts, J. L.** (1990). Bovine lactoferrin binding to six species of coagulase-negative Staphylococci isolated from bovine intramammary infections. J. Clin. Microbiol., **28**, 21313-21319.
- Neckers, L. M. et Cossman, J.** (1983). Transferrin receptor induction in mitogen-stimulated human T lymphocytes is required for DNA synthesis and cell division and is regulated by interleukin 2 . Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 3494-3498.
- Neckers, L. M.** (1984). Transferrin receptor regulation of proliferation in normal and neoplastic B cells. Curr. Top. Microbiol. Immunol., **113**, 62-68.
- Neckers, L. M. et Nordan, R. P.** (1988). Regulation of murine plasmacytoma transferrin receptor expression and G1 traversal by plasmacytoma cell growth factor (IL-6). J. Cell Physiol., **135**, 495-501.
- Neckers, L. M.** (1991). Regulation of transferrin receptor expression and control of cell growth. Pathobiology, **59**, 11-18.
- Neupert, B., Müllner, E., Rothenberger, S., Seiser, C., Teixeira, S., Thompson, N. A., Emery-Goodman, A. et Kühn, L. C.** (1991). Expression of human transferrin receptor. In "Biotechnology of plasma proteins" (Albertini A., Lenfant C. L., Mannucci P. M., Sixma J. J., Eds) Curr. Stud. Hematol. Blood Transf. Basel Karger, **58**, 109-114.
- Newman, R., Schneider, C., Sutherland, R., Vodinelich, L. et Greaves, M.** (1982). The transferrin receptor. Trends Biochem. Sci., **7**, 397-400.
- Newman, R. A., Warner, J. F. et Dennert, G.** (1984). NK recognition of target structures. Is the transferrin receptor the NK target structure?. J. Immunol., **133**, 1841-1845.

Nichols, B. L., Mac kee, K. S., Henry, J. F. et Putman, M. (1987). Human lactoferrin stimulates thymidine incorporation into DNA of rat crypt cells. Pediatr. Res., 21, 563-567.

Nichols, B. L., Mac Kee, K. S., Henry, J. F. et Nichols, V. N. (1989). Human lactoferrin supplementation of infant formulas increases thymidine incorporation into DNA rat crypt cells. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 8, 102-109.

Nichols, B. L., Mac Kee, K. S. et Huebers, H. A. (1990). Iron is not required in the lactoferrin stimulation of thymidine incorporation into the DNA of rat crypt enterocytes. Pediatr. Res., 27, 525-528.

Nishisato, T. et Aisen, P. (1982). Uptake of transferrin by rat peritoneal macrophages. Br. J. Haematol, 52, 631-640.

Nishiya, K. et Horwitz, D. A. (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, G. E., Baker, H. M. et Baker, E. N. (1989). Preliminary cristallographic studies on human apolactoferrin in its native and defucosylated forms. J. Mol. Biol., 209, 329-351.

Nowell, P. C. (1960). Phytohemagglutinin : an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res., 20, 462-

Octave, J. N., Schneider, Y. J., Hoffman, P., Trouet, A. et Crichton, R. R. (1979). Transferrin protein and iron uptake by cultured Rat fibroblasts. FEBS Lett., 108, 127-130.

Ogata, S., Muramatsu, T. et Kobata, A. (1975). Fractionation of glycopeptides by affinity chromatography on concanavalin A Sepharose. J. Biochem., 78, 687-696.

Ogunnariwo, J. A., Cheng, C., Ford, J. et Schryvers, A. B. (1990). Response to Haemophilus somnus to iron limitation: expression and identification of a bovine-specific transferrin receptor. Microb. Pathog., 9, 397-406.

Olofson, T., Olsson, I., Verge, P. et Elgefors, B. (1977). Serum myeloperoxidase and lactoferrin in neutropenia. Scand. J. Haem., 18, 73-80.

Omary, M. B. et Trowbridge, I. S. (1981). Covalent binding of fatty acid to the transferrin receptor in cultured cells. J. Biol. Chem., 256, 4715-4718.

Orchansky, P. L., Escobedo, J. A. et Williams, L. T. (1988). Phosphatidylinositol linkage of a truncated form of the platelet-derived growth factor receptor. J. Biol. Chem., 263, 15159-15165.

Oria, R., Alvarez-Hernandez, X., Liceaga, J. et Brock, J. H. (1988). Uptake and handling of iron from transferrin, lactoferrin and immune complexes by a macrophage cell line. Biochem. J., 252, 221-225.

Oseas, R., Yang, H. H., Baehner, R. L. et Boxer, L. A. (1981). Lactoferrin: a promoter of polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. Blood, 57, 939-945.

Padda, J. S. et Schryvers, A. B. (1990). N-linked oligosaccharides of human transferrin are not required for binding to bacterial transferrin receptors. Infect. Immun., 58, 2972-2976.

Pan, B. T., Blostein, R. et Johnston, R. M. (1983). Loss of the transferrin receptor during maturation of Sheep reticulocytes in vitro. Biochem. J., 210, 37-47.

Pan, B. T. et Johnston, R. M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of Sheep reticulocytes in vitro : selective externalization of the receptor. Cell, 33, 967-977.

Pan, B. T. et Johnston, R. (1984). Selective externalization of the transferrin receptor by Sheep reticulocytes in vitro. J. Biol. Chem., 259, 9776-9782.

Panaccio, M., Zalcborg, J. R., Thompson, C. H., Leyden, M. J. et McKenzie, 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.

Patscheke, H. et Wörner, P. (1978). Platelet activation detected by turbidometric shape-change analysis. Differential influence of cytochalasin B and prostaglandin E. Thrombos. Res., 12, 485-496.

Pellicci, P. G., 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.

Pelosi, E., Testa, U., Louache, F., Thomopoulos, P., Salvo, G., Samoggia, P. et Peschle, C. (1986). Expression of transferrin receptors in phytohemagglutinin-stimulated human T lymphocytes. J. Biol. Chem., 261, 3036-3042.

Phillips, J. L. et Thorbecke, G. J. (1966). Studies on the serum proteins of chimeras. I. Identification and study of the site of origin of donor type serum proteins in Rat-into-Mouse chimeras. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 29, 553-567.

Phillips, J. L. et Azari, P. (1974). Zinc transferrin : enhancement of nucleic acid synthesis in phytohemagglutinin-stimulated and unstimulated human lymphocytes. Cell Immun., 10, 31-37.

Phillips, J. L. et Azari, P. (1975). Effect of iron transferrin on nucleic acid synthesis in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. Cell. Immun., 15, 94-99.

Phillips, J. L., Boldt, D. H. 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., Benaïssa, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J. et Spik, G. (1991). Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. Eur. J. Biochem., **196**, 177-184.
- Pizzo, S. V., Lehrman, M. A., Imber, M. J. et Guthrow, C. E. (1981). The clearance of glycoprotein in diabetic Mice. Biochem. Biophys. Res. Commun., **101**, 704-708.
- Ponka, P., Schulman, H. M. et Martinez-Medellin, J. (1988). Haem inhibits iron uptake subsequent to endocytosis of transferrin in reticulocytes. Biochem. J., **251**, 105-109.
- Pricer, W. E. et Ashwell, G. (1971). The binding of desialylated glycoproteins by plasma membranes of rat liver. J. Biol. Chem., **246**, 4825-4833.
- Prieels, J. P., Pizzo, S. V., Glasgow, L. R., Paulson, J. C. et Hill, R. L. (1978). Hepatic receptor that specifically binds oligosaccharides containing fucosyl N-acetylglucosamine linkages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 2215-2219.
- Princiotto, J. V. et Zapolski, E. J. (1975). Difference between the two iron binding sites of transferrin. Nature, **255**, 87-88.
- Quilès, E., Perball, M. C. et Egly, J. M. (1991). Purification des protéines. Biofutur, **98**, supplément n°42.
- Rado, T. A., Bollekens, J., St Laurent, G., Parker, L. et Benz, E. J. (1984). Lactoferrin biosynthesis during granulocytogenesis. Blood, **64**, 1103-1109.
- Rado, T. A., 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, J. F., Jollès, P., Fiat, A. M. et Caen, J. P. (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.
- Ralton, J. E., Jackson, H. J., Zanoni, M. et Gleeson, P. A. (1989). Effect of glycosylation inhibitors on the structure and function of the murine transferrin receptor. Eur. J. Biochem., **186**, 637-647.
- Rao, K. K., 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.
- Raphael, G. D., Jeney, E., Baraniuk, J. N., Kim, I., Meredith, D. et Kaliner, M. A. (1989). Pathophysiology of rhinitis. J. Clin. Invest., **84**, 1528-1535.
- Reckhow, C. L. et Enns, C. A. (1988). Characterization of the transferrin receptor in tunicamycin-treated A431 cells. J. Biol. Chem., **263**, 7297-7301.

- Redhead, K., Hill, T. et Chart, H.** (1987). Interaction of lactoferrin and transferrins with the outer membrane of Bordetella pertussis. J. Gen. Microbiol., **133**, 891- 898.
- Redhead, K. et Hill, T.** (1991). Acquisition of iron from transferrin by Bordetella pertussis. FEMS Microbiol. Lett., **77**, 303-308.
- Rey, M. W., Woloshuk, S. L., de Boer H. A et Piper, F. R.** (1990). Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin. Nucl. Acids Res., **18**, 5288-5288.
- 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.
- Rochard, E.** (1991). Thèse d'Université, Lille.
- Rodriguez, M. H. et Jungery, M.** (1986). A protein on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes functions as a transferrin receptor. Nature, **324**, 388-391.
- 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.
- Rose, T. M., Plowman, G. D., Teplow, D. B., Dreyer, W. J., Hellström, K. E. et Brown, J. P.** (1986). Primary structure of the human melanoma associated antigen P97 deduced from mRNA sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 1261-1265.
- Rosenmund, A., Friedli, J., Bebié, H. et Werner, P.** (1988). Plasma lactoferrin and plasma lactoferrin/neutrophil ratio. Acta Haemat., **80**, 40-48.
- Rothenberger, S., Iacopetta, B. J. et Kühn, L. C.** (1987). Endocytosis of the transferrin receptor requires the cytoplasmic domain but not its phosphorylation site. Cell, **49**, 423-431.
- Rothenberger, S., Müllner, E. W. et Kühn, L. C.** (1990). The mRNA-binding protein which controls ferritin and transferrin receptor expression is conserved during evolution. Nucl. Acids Res., **18**, 1175-1179.
- Rouault, T. A., Hentze, M. W., Caughman, S. W., Harford, J. B. et Klausner, R. D.** (1988). Binding of a cytosolic protein to the iron responsive element of human ferritin mRNA. Science, **241**, 1207-1210.
- Rouault, T. A., Hentze, M. W., Haile, D. J., Harford, J. B. et Klausner, R. D.** (1989). The iron responsive element binding protein : a method for the affinity purification of a regulatory RNA binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 5768-5772.
- Rouault, T. A., Stout, C. D., Kaptain, S., Harford, J. B. et Klausner, R. D.** (1991). Structural relationship between an iron-regulated RNA-binding protein (IRE-BP) and aconitase: functional implications. Cell, **64**, 881-883.

- Rubin, L. A., Kurman, C. C., Fritz, M. E., Bidisson, W. E., Boutin, B., Yarchoan, R. et Nelson, D. L. (1985). Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro. J. Immunol., 135, 3172-3177.
- Rümke, P., Visser, D., Kwa, H. G. et Hart, A. M. (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 leukocytes in vitro. Folia Med. Neerl., 14, 156-168.
- Saito, K., Nishisato, T., Grasso, J. A. et Aisen, P. (1986). Interaction of transferrin with iron-loaded Rat peritoneal macrophages. Br. J. Haematol., 62, 275-286.
- Sass-Kuhn, S. P., Moqbel, R., MacKay, J. A., Cromwell, O. et Kay, A. B. (1984). Human granulocyte/pollen binding protein. Recognition and identification of transferrin. J. Clin. Invest., 73, 202-210.
- 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.
- Sawatzki, G., Hoffmann, F. et Kubanek, B. (1983). The role of iron binding proteins, lactoferrin and transferrin, in Salmonella typhimurium infections in mice. In : "Structure and Function of Iron Storage and Transport Proteins" (Urushizaki, I., Aisen, P., Listowsky, I. and Drysdale, J. W., Eds.), Elsevier Science Publishers, 435-439.
- Scatchard, G. (1949). The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci., 51, 660-672.
- Schade, A. L. et Caroline, L. (1944). Raw hen egg white and the role of iron in growth inhibition of Shigella dysenteria, Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae. Science, 100, 14-15.
- Schade, A. L. et Caroline, L. (1946). An iron binding component of human blood plasma. Science, 104, 340-341.
- Schaefer, F. V. et Theil, E. C. (1981). The effect of iron on the synthesis and amount of ferritin in red blood cells during ontogeny. J. Biol. Chem., 256, 1711-1715.
- Schell, D., Evers, R., Preis, D., Ziegelbauer, K., Kiefer, H., Lottspeich, F., Cornelissen, A. et Ovarath, P. (1991). A transferrin binding protein of Trypanosoma brucei is encoded by one of the genes in the variant surface glycoprotein gene expression site. EMBO J., 10, 1061-1066.
- Schneider, C., Sutherland, R., Newman, R. et Greaves, M. (1982). Structural feature of the cell surface receptor for transferrin is recognized by the monoclonal antibody OKT9. J. Biol. Chem., 257, 8516-8522.
- 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, M. J., Banville, D. et Williams, J. G. (1984). Primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence. Nature, **311**, 675-680.

Schryvers, A. B. (1988). Characterization of the transferrin and lactoferrin receptors in Haemophilus influenzae. Mol. Microbiol., **2**, 467-472.

Schryvers, A. B. et Morris, L. J. (1988a). Identification and characterization of the transferrin receptor from Neisseria meningitidis. Mol. Microbiol., **2**, 281-288.

Schryvers, A. B. et Morris, L. J. (1988b). Identification and characterization of the human lactoferrin-binding protein from Neisseria meningitidis. Infect. Immun., **56**, 1144-1149.

Schryvers, A. B. (1989). Identification of the transferrin- and lactoferrin-binding proteins in Haemophilus influenzae. J. Med. Microbiol., **29**, 121-130.

Schryvers, A. B., Craig, A. et Lee, B. (1989). Comparative analysis of the transferrin and lactoferrin binding proteins in the family Neisseriaceae. Can. J. Microbiol., **35**, 409-415.

Seligman, P. A., Schleicher, R. B. et Allen, R. H. (1979). Isolation and characterization of transferrin receptor from placenta. J. Biol. Chem., **254**, 9943-9947.

Seligman, P. A. (1983) Structure and function of the transferrin receptor. Prog. Haematol., **13**, 137-147.

Selvaraj, P., Rosse, W. F., Silber, R. et Springer, T. A. (1988). The major Fc receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Nature, **333**, 565-567.

Shalaby, M. R., Aggarwal, B. B., Rinderknecht, E., Svedersky, L. P., Finkle, B. S. et Palladino, M. A. (1985). Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. J. Immunol., **135**, 2069-2074.

Shibuya, N., Goldstein, I. J., Van Damme, E. J. M. et Pneumans, W. J. (1988). Binding properties of mannose specific lectin from the snowdrop (Galantus nivalis) bulb. J. Biol. Chem., **263**, 728-734.

Shih, Y. J., Baynes, R. D., Hudson, B. G. et Flowers, C. H. (1990). Serum transferrin receptor is a truncated form of tissue receptor. J. Biol. Chem., **265**, 19077-19081.

Shull, G. E. et Theil, E. C. (1982). Translational control of ferritin synthesis by iron in embryonic reticulocytes of the Bullfrog regulation of ferritin mRNA : a possible gene sparing phenomenon. J. Biol. Chem., **257**, 14187-14191.

Shull, G. E. et Theil, E. C. (1983). Regulation of ferritin mRNA : a possible gene sparing phenomenon. J. Biol. Chem., **258**, 7921-7923.

Sieffs, C., Bicknell, D., Canei, G., Robinson, J., Lam, G. et Greaves, M. F. (1982). Changes in cell surface Ag expression during erythropoietic differentiation. Blood, **60**, 703-713.

Sizemore, D. J. et Basset, M. L. (1984). Monocyte transferrin-iron uptake in hereditary haemochromatosis. Am. J. Haematol., **16**, 347-354.

Skinner, M. K. et Griswold, M. D. (1980). Sertoli cells synthesize and secrete a transferrin-like protein. J. Biol. Chem., **255**, 9523-9525.

Slater, K. et Fletcher, J. (1987a). Lactoferrin derived from neutrophils inhibits the mixed lymphocyte reaction. Blood, **69**, 1328-1333.

Slater, K. et Fletcher, J. (1987b). Lactoferrin inhibits interleukin-2 production in mixed lymphocyte culture. In : "The inhibitors of haematopoiesis" (Najman A., Guigon M., Ed) Colloque INSERM John Libby Eurotext Ltd

Soda, R. et Tavassoli, M. (1984). Liver endothelium and not hepatocytes or Kupffer cells have transferrin receptors. Blood, **63**, 270-276.

Sollier, C. B. D., Drouet, L., Fiat, A. M., Jollès, P. et Caen, J. P. (1990). L'effet anti-thrombotique des peptides de la lactotransferrine. C. R. Soc. Biol., **184**, 201-210.

Soltys, H. D. et Brody, J. I. (1970). Synthesis of transferrin by human peripheral blood lymphocytes. J. Lab. Clin. Med., **75**, 250-257.

Spik, G. et Montreuil, J. (1966). Etudes comparatives de la structure de la transferrine et de la lactotransferrine humaines "finger printing" des hydrolysats protéasiques des deux glycoprotéides. C. R. Soc. Biol. Paris, **160**, 94-98.

Spik, G., Vandersyppe, R., Fournet, B., Bayard, B., Charet, P., Bouquelet, S., Strecker, G. et Montreuil, J. (1973). In "Actes du Colloque n°221 sur les Glycoconjugués", CNRS, Paris, 111-130.

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., Bayard, B., Fournet, B., Strecker, G., Bouquelet, S. et Montreuil, J. (1975). Studies on glycoconjugates. Complete structure of two carbohydrate units of human transferrin. FEBS. Lett., **50**, 296-299.

Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dorland, L., van Halbeek, H. et Vliegthart, J. F. G. (1982). Primary structure of the glycans from human lactotransferrin. Eur. J. Biochem., **121**, 413-419.

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., 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 R.R., Mazurier J., Eds) Elsevier, 47-52.

Spik, G., Debruyne, V., Montreuil, J., van Halbeek, H. et Vliegenthart, J. F. G. (1985b). Primary structure of two sialylated triantennary glycans from human serotransferrin. FEBS. Lett., **183**, 65-69.

Spik, G., Coddeville, B. et Montreuil, J. (1988). Comparative study of the primary structure of sero-, lacto- and ovotransferrin glycans from different species. Biochimie, **70**, 1459-1469.

Spitznagel, J. K., Cooper, M. R., McCall, A. E., Decatelet, L. R. et Welsh, I. R. H. (1972). Selective deficiency of granules with lysozyme and lactoferrin in human polymorphonuclear leucocytes (PMN) with reduced microbicidal capacity. J. Clin. Invest., **51**, 93-97.

Srivastava, C. H., Rado, T. A., Bauerle, D. et Broxmeyer, H. E. (1991). Regulation of human bone marrow lactoferrin and myeloperoxidase gene expression by tumor necrosis factor-. J. Immunol., **146**, 1014-1019.

Stearne, P. A., Pieters, G. A. et Goding, J. W. (1985). cDNA cloning of the murine transferrin receptor : sequence of trans-membrane and adjacent regions. J. Immunol., **134**, 3474-3479.

Stecher, V. J. et Thorbecke, G. J. (1967). Site of synthesis of serum proteins. J. Immunol., **99**, 660-668.

Suciu-Foca, N., Rosochacki, S. J., Cai, J., Reed, E., Rubinstein, P. et King, D. (1987). Immunological and biochemical characterization of an epitope of the transferrin receptor involved in the production of interferon-gamma and B-cell growth factor. Cell. Immunol., **110**, 265-281.

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.

Sün, I. L., Navas, P., Crane, F. L., Morré, D. J. et Löw, H. (1987a). NADH diferric transferrin reductase in liver plasma membrane. J. Biol. Chem., **262**, 15915-15921.

Sün, I. L., Garcia-canero, R. et Liu, W. (1987b). Diferric transferrin reduction stimulates the Na⁺/H⁺ antiport HeLa. Biochem. Biophys. Res. Commun., **145**, 467-473.

Sün, I. L., Crane, F. L., 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.

Taetle, R., Smedsrud, M. et Trowbridge, I. (1987). Regulation of transferrin receptor expression in myeloid leukemia cells. Blood, **70**, 852-860.

Takasaki, S. et Kobata, A. (1976). Purification and characterization of an endo- β -galactosidase produced by Diplococcus pneumoniae. J. Biol. Chem., **251**, 3603-3609.

Taketani, S., Kohno, H. et Tonunaga, R. (1985). Expression and phosphorylation of transferrin receptors in mitogen-activated peripheral blood lymphocytes. J. Biochem., **98**, 1639-1646.

Tanner, L. I. et Lienhard, G. E. (1987). Insulin elicits a redistribution of transferrin receptors in 3T3-L1 adipocytes through an increase in the rate constant for receptor externalization. J. Biol. Chem., **262**, 8975-8980.

Tavassoli, M. (1988). The role of endothelium in the transfer of iron from transferrin to hepatocytes. Ann. N.Y. Acad. Sci., **526**, 83-92.

Tennant, J. R. (1964). Transplantation, **2**, 685-687.

Terent, A., Hallgren, R., Venge, P. et Bergstrom, K. (1981). Lactoferrin, lysozyme and B2-microglobulin in cerebrospinal fluid. Elevated levels in patients with acute cerebrovascular lesions as indices of inflammation. Stroke, **12**, 40-46.

Testa, U. (1985). Transferrin receptors : structure and function. Curr. Top. Hematol., **5**, 127-159.

Testa, U., Kühn, L., Petrini, M., Quaranta, M. T., Pelosi, E. et Peschle, C. (1991). Differential regulation of iron regulatory element-binding protein(s) in cell extracts of activated lymphocytes versus monocytes-macrophages. J. Biol. Chem., **266**, 13925-13930.

Teuwissen, B., Masson, P. L., Osinski, P. et Heremans, J. F. (1972). Metal combining properties of human lactoferrin. Eur. J. Biochem., **31**, 239-245.

Theil, E. C. (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. (1990). The role of transferrin in the mechanism of cellular iron uptake. Biochem. J., **271**, 1-10.

Tormey, D. C., Imrie, R. C. et Mueller, G. C. (1972). Identification of transferrin as a lymphocyte growth promoter in human serum. Exp. Cell Res., **74**, 163-169.

Tormey, D. C. et Mueller, G. C. (1972). Biological effects of transferrin on human lymphocytes in vitro. Exp. Cell Res., **74**, 220-226.

Towbin, H., Staehelin, T. et Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 4350-4354.

Trowbridge, I. S. et Omary, M. B. (1981). Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 3039-3043.

Trowbridge, I. S., Newman, R. A., Domingo, D. L., Sauvage, C. (1984). Transferrin receptor : structure and function. J. Biol. Chem., 253, 3771-3774.

Tsai, J., Dyer, D. W. et Sparling, P. F. (1988). Loss of transferrin receptor activity in Neisseria meningitidis correlates with inability to use transferrin as an iron source. Infect. Immun., 3, 437-443.

Tsuji, Y., Miller, L. L., Miller, S. C., Torti, S. V. et Torti, F. (1991). Tumor necrosis factor and interleukin-1 regulate transferrin receptor in human diploid fibroblasts. J. Biol. Chem., 266, 7227-7261.

Turkewitz, A. P., Amatruda, J. F., Borhani, D., Harrisson, S. C. et Schartz, A. L. (1988). A high yield purification of the human transferrin receptor and properties of its major extracellular fragment. J. Biol. Chem., 263, 8318-8325.

Uriel, J., Lunardi-iskandar, Y., Laborda, J., Torres, J. M., Naval, X., Georgoulas, V., Lowi, R., Jasmin, C. et Mishal, Z. (1990). Defective uptake of alpha-fetoprotein and transferrin by PHA-activated peripheral blood lymphocytes from patients with AIDS and related syndromes. AIDS Research and human retroviruses, 6, 401-410.

Uzan, G., Frain, M., Park, I., Besmond, C., Haesens, G., Trepas, J. S., Zakin, M. M. et Zakin, A. (1984). Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human transferrin. Biochem. Biophys. Res. Commun., 119, 273-281.

Vaitukaitis, J., Robbins, J. B., Nieschlag, E. et Ross, G. T. (1971). A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocrinol. Metab., 33, 988-991.

van Brockmeer, F. M. et Morgan, E. H. (1982). Comparative aspects of transferrin-reticulocyte interactions : membrane receptors and iron uptake. Comp. Biochem. Physiol., 71A, 211

Vanderpuye, O. A., Kelley, L. K. et Smith, C. H. (1986). Transferrin receptors in the basal plasma membrane of the human placental syncytiotrophoblast. Placenta, 7, 391-404.

Vandewalle, B., Granier, A. M., Peyrat, J. P., Bonneterre, J. et Lefebvre, J. (1985). Transferrin receptors in cultured breast cancer cells. J. Cancer Res. Clin. Oncol., 110, 71-76.

van Gut, H., Van Gool, J., Ladiges, N. C. J. J. et Boers, W. (1975). Lactoferrin in Rabbit bile : its relation to iron metabolism. J. Exp. Physiol., 60, 79-88.

van Snick, J. L., Masson, P. L. et Heremans, J. F. (1974). The involvement of lactoferrin in the hyposideremia of acute inflammation. J. Exp. Med., 140, 1068-1084.

van Snick, J. L. et Masson, P. L. (1976). The binding of human lactoferrin to Mouse peritoneal cells. J. Exp. Med., 144, 1568-1580.

van Snick, J. L., Markowitz, B. et Masson, P. L. (1977). The ingestion of human lactoferrin by mouse peritoneal macrophages and the transfer of its iron to ferritin. J. Exp. Med., 146, 817-827.

Vasil'ev, M. Y. et Avdeev, G. I. (1985). Quantitative immunoenzyme determination of lactoferrin and α -lactalbumin in the blood serum of cancer patients. Eksp. Onkol., 5, 56-60.

Vodinelich, L., Sutherland, R., Shneider, C., Newman, R. et Greaves, M. (1983). Receptor for transferrin may be a target structure for natural killer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 835-839.

Voyiatzaki, C. S. et Soteriadou, K. P. (1990). Evidence of transferrin binding sites on the surface of Leishmania promastigotes. J. Biol. Chem., 265, 22380-22385.

Wada, H. G., Hass, P. E. et Sussman, H. H. (1979). Transferrin receptor in human placental brush border membranes. J. Biol. Chem., 254, 12629-12635.

Walden, W. E., Patino, M. et Gaffield, L; (1989). Purification of a specific repressor for ferritin mRNA translation from Rabbit liver. J. Biol. Chem., 264, 13765-13769.

Walsh, R. J., Thomas, E. D., Chow, S. K., Fluharty, R. G. et Finch, C. A. (1949). Iron metabolism. Heme synthesis in vitro by immature erythrocytes. Science, 110, 396-398.

Ward, J. H., Kushner, J. P. et Kaplan, J. (1982). Regulation of HeLa cell transferrin receptors. J. Biol. Chem., 257, 10317-10323.

Ward, P. A., Till, G. O., Kunkell, R. et Beauchamp, C. (1983). Evidence for the role of hydroxyl radical in complement and neutrophil dependent tissue injury. J. Clin. Invest., 72, 789-801.

Ward, J. H., Jordan, I., Kushner, J. P. et Kaplan, J. (1984). Heme regulation of HeLa cell transferrin receptor. J. Biol. Chem., 259, 13231-13240.

Ward, M. V. et Kaplan, D. (1986). Mitogenic agents induce redistribution of transferrin receptors from internal pools to the cell surface. Biochem. J., 238, 721-728.

Ward, J. H. (1987). The structure, function, and regulation of transferrin receptors. Invest. radiol., 22, 74-83.

Weber, W., Gill, G. et Spiess, J. (1984). Production of an epidermal growth factor receptor related protein. Science, 178, 294-295.

Webster, P. et Crab, D. J. (1988). Intracellular colocalization of variant surface glycoprotein and transferrin-gold in Trypanosoma brucei. J. Cell. Biol., 106, 279-288.

Wiley, H. S. 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. et Moreton, K. (1980). The distribution of iron between the metal binding sites of transferrin in human serum. Biochem. J., **185**, 483-488.

Williams, A. M. et Enns, C. A. (1991). A mutated transferrin receptor lacking asparagin-linked glycosylation sites shows reduced functionality and an association with binding immunoglobulin protein. J. Biol. Chem., **266**, 17648-17654.

Windle, J. J., Wiersema, A. K., Clark, J. R. et Feeney, R. E. (1963). Investigation of the iron and copper complexes of avian conalbumins and human transferrins by electron paramagnetic resonance. Biochemistry, **216**, 1341-1346.

Winterbourn, C. C. (1983). Lactoferrin-catalysed hydroxyl radical production : additional requirement for a chelating agent. Biochem. J., **210**, 15-19.

Wong, K. L., Debanne, M. T., Hatton, N. W. C. et Regoeczi, E. (1978). Human transferrin, asialotransferrin and the intermediate forms. Int. J. Peptide Protein Res., **12**, 27-37.

Wyllie, J. C. et Kaufman, N. (1971). A study of storage iron in the pregnant Rat. Brit. J. Haematol., **20**, 312-327.

Wyllie, J. C. (1977). Transferrin uptake by rabbit alveolar macrophages *in vitro*. Brit. J. Haematol., **37**, 17-24.

Yamada, Y., Amagasaki, T., Jacobsen, D. W. et Green, R. (1987). Lactoferrin binding by leukemia cell lines. Blood, **70**, 264-270.

Yang, F., Lum, J. B., Mac Gill, J. R., Moore, C. M., Naylor, S. L., Van Bragt, P. H., Baldwin, W. D. et Bowman, B. H. (1984). Human transferrin : cDNA characterization and chromosomal localization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**, 2752-2756.

Yang, S. Y., Chovaito, S. et Dupont, B. (1986). A common pathway for T lymphocyte activation involving both the CD3-Ti complex and CD2 erythrocyte receptor determinants. J. Immunol., **137**, 1097-1100.

Young, S. P., 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.

Zahringer, J., Baliga, B. S. et Munro, H. N. (1976). Novel mechanism for translational control in regulation of ferritin synthesis by iron. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 857-861.

Zak, O. et Aisen, P. (1986). Nonrandom distribution of iron in circulating human transferrin. Blood, **68**, 157-161.

Zapolski, E. J. et Princiotto, J. V. (1976). Failure of Rabbit reticulocytes to incorporate conalbumin or lactoferrin iron. Biochim. Biophys. Acta, **421**, 80-86.

Zimecki, M., Mazurier, J., Machnicki, M., Wiczorek, Z., Montreuil, J. et Spik, G. (1991). Immunostimulation activity of lactotransferrin and

maturation of CD4- CD8- murine lymphocytes. Immunology Lett., **30**, 119-124.

Zucali, J. R., Broxmeyer, H. E., 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.

Zweier, J. L. (1978). An electron paramagnetic resonance study of single site copper complexes of transferrin. J. Biol. Chem., **253**, 7616-7621.



PPN 03611846 X

La libération, dans de nombreux cas inflammatoires, de la lactotransferrine leucocytaire dans le plasma sanguin nous a amenée à rechercher, parmi les cellules du sang humain, les cellules cibles de cette protéine, afin de mieux comprendre le rôle joué par la lactotransferrine plasmatique. Cette étude nous a conduit d'une part, à la mise en évidence de récepteurs à haute affinité pour la lactotransferrine à la surface des lymphocytes activés et des plaquettes et à démontrer d'autre part, que ces deux récepteurs possèdent des propriétés structurales et antigéniques identiques. Chacun de ces récepteurs a été identifié à une protéine transmembranaire de 105 kDa sur laquelle sont branchés 2 ou 3 glycanes de type N-acétyllactosaminique. De plus, nous avons montré que le récepteur membranaire lymphocytaire était libéré dans le milieu de culture sous la forme d'une glycoprotéine soluble de 100 kDa qui correspond à la région extracellulaire de ce récepteur.

Des récepteurs de faible affinité ont également été caractérisés à la surface des neutrophiles, des monocytes et des éosinophiles. Ces récepteurs sont antigéniquement différents des récepteurs lymphocytaire et plaquettaire.