

50376  
1993  
181

50376  
1993  
181

présentée à

**L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE**

pour l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE**

**Option : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

59206

par

***Takashi MIKOGAMI***

**ROLE DE LA LACTOTRANSFERRINE ET DE  
SON RECEPTEUR DANS L'ABSORPTION  
INTESTINALE DU FER**

ETUDE DU TRANSPORT TRANSEPITHELIAL DE LA LACTOTRANSFERRINE

MISE EN EVIDENCE DE L'EXPRESSION FER-DEPENDANTE DE SON

RECEPTEUR AU NIVEAU DE ~~CELLULES~~ **CELLULES** INTESTINALES EN CULTURE



Soutenue le 27 Mai 1993 devant la commission d'examen :

Président	: André VERBERT	Professeur, USTL
Rapporteurs	: Jehan-François DESJEUX Catherine FIGARELLA	Professeur, CNAM (INSERM U290, Paris) Directeur de Recherche de l'INSERM, Marseille
Examineurs	: Martine HEYMAN Jean MONTREUIL Geneviève SPIK	Directeur de Recherche de l'INSERM, Paris Professeur, USTL Professeur, USTL

**A Odile**

**A ma famille**

**A mes amis**

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie Biologique à l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Unité Mixte de Recherche n° 111; Directeur: Professeur André Verbert) sous la direction de Madame le Professeur Geneviève Spik et dans l'unité 290 INSERM (Directeur: Professeur Jehan Desjeux) sous la direction de Madame le Docteur Martine Heyman.

J'exprime tous mes remerciements à

**Monsieur le professeur André Verbert.**

Vous m'avez permis de mener à bien mes travaux en me prodiguant vos conseils et vos encouragements. Vous me faites l'honneur de présider ce Jury. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon amitié.

**Madame le Professeur Geneviève Spik.**

Vous m'avez accueilli dans votre équipe de recherche. Vous m'avez accordé votre confiance en me permettant d'établir une collaboration avec l'équipe de Monsieur Desjeux. Je tiens à vous exprimer une reconnaissance toute particulière pour m'avoir soutenu tout au long de ces années dans une ambiance faite d'amitié et de confiance réciproque.

**Monsieur le Professeur Jehan Desjeux.**

J'ai énormément apprécié vos conseils scientifiques, votre dynamisme permanent ainsi que la chaleur de votre accueil lors de mes séjours à Paris. Votre venue en tant que rapporteur de cette Thèse est pour moi un grand honneur. Veuillez trouver ici l'expression de ma vive gratitude et de ma profonde reconnaissance.

**Madame le Docteur Catherine Figarella.**

Vous m'avez fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma vive gratitude et ma profonde reconnaissance pour l'intérêt que vous avez porté à cette Thèse.

**Madame le Docteur Martine Heyman.**

Vous m'avez apporté vos connaissances et votre aide au cours de mon travail à Paris. Je vous suis très reconnaissant pour le soutien constant que vous avez apporté à ces recherches et pour la collaboration fructueuse que nous avons pu établir ensemble. Vous avez accepté de juger cette Thèse. Je tiens à vous en remercier et vous assurer de ma gratitude et de mon amitié.

**Monsieur le professeur Jean Montreuil.**

Vous êtes à l'origine de la collaboration franco-japonaise qui a rendu ce travail possible. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de ma vive gratitude pour m'avoir fait l'honneur de juger cette Thèse.

Enfin, je tiens à remercier tous les membres du laboratoire 103 pour l'accueil, la sympathie et les encouragements qu'ils m'ont prodigués durant ces quatre années et plus particulièrement Thérèse, Mazu et Dominique, pour leur disponibilité, leur gentillesse et leurs précieux conseils.

A tous mes amis qui m'ont toujours soutenu pendant mes années de Laboratoire: Fabrice, Thierry, Franck, "Marcel", Hubert, Christophe....



# *Sommaire*

---

<b>SOMMAIRE</b>	2
<b>INTRODUCTION</b>	5
<b>GENERALITES</b>	10
I. Les protéines contenant du fer	11
A. Les protéines fonctionnelles contenant du fer	11
B. Les protéines de stockage du fer	14
C. Les protéines de transport du fer	15
D. La lactotransferrine	18
II. Incorporation du fer par les cellules et homéostasie	36
A. Incorporation du fer à partir de la sérotransferrine	36
B. Homéostasie cellulaire du fer	42
III. Absorption intestinale du fer	54
A. Morphologie de la muqueuse intestinale.	54
B. Absorption intestinale du fer – phase intraluminaire.	61
C. Phase d'incorporation du fer par la bordure en brosse des entérocytes.	62
D. Phase intracellulaire: passage du fer à travers les entérocytes	71
E. Phase de transfert du fer des entérocytes vers le plasma	73
F. Régulation de l'absorption intestinale du fer	73
<b>TRAVAUX PERSONNELS</b>	79
I. Etude du récepteur de la lactotransferrine sur les cellules intestinales en culture	80
A. Introduction	80
B. Matériel et méthodes	86
C. Résultats et discussion	89
D. Conclusion	92
II. Etude du transport transépithélial de la lactotransferrine et de son fer à travers les monocouches cellulaires différenciées en entérocytes	93
A. Introduction	93
B. Article soumis à publication dans American Journal of Physiology	101
C. Conclusion	126
III. Etude de l'effet de la carence intracellulaire en fer sur le récepteur de la lactotransferrine dans une lignée cellulaire intestinale	128
A. Introduction	128
B. Article soumis à publication dans Biochemical Journal	129
C. Conclusion	153
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	154
<b>REFERENCES</b>	159
<b>TABLE DES MATIERES</b>	184

## ABREVIATIONS

ADN	: acide désoxyribonucléique
ADNc	: acide désoxyribonucléique complémentaire
ALAS	: 5-aminolevulinic acid synthase
Arg	: arginine
ARNm	: acide ribonucléique messenger
Asn	: asparagine
Asp	: acide aspartique
ATP	: adénosine triphosphate
DMEM	: Dulbecco modified Eagle's medium
DPBS+	: Dulbecco's phosphate buffered saline containing 1 mM Ca <sup>2+</sup> , 0.5 mM Mg <sup>2+</sup> , pH 7.3
FBS	: fetal bovine serum
Gly	: glycine
His	: histidine
IgA	: immunoglobuline A
IgG	: immunoglobuline G
IRE	: iron-responsive element
IRE-BP	: iron-responsive element-binding protein
hLf	: human lactoferrin
hTf	: human transferrin
NAD	: nicotinamide adénine dinucléotide
PAGE	: polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	: phosphate buffered saline
PD	: potential difference
SDS	: sodium dodecyl sulfate
Ser	: sérine
sIgA	: secretory immunoglobulin A
SVF	: sérum de veau foetal
TEER	: transepithelial electrical resistance
TfR	: transferrin receptor
Tyr	: tyrosine

# ***Introduction***

---

Le fer est un élément essentiel à la croissance et au bien-être de pratiquement tous les organismes vivants, et il est impliqué dans un grand nombre de fonctions biologiques. L'absorption intestinale du fer est le processus clé pour maintenir l'homéostasie du fer dans l'organisme, et elle est régulée en fonction des besoins corporels en fer. Malgré de nombreuses études réalisées depuis plus de 50 ans, peu de choses sont connues en ce qui concerne le mécanisme de la régulation de l'absorption intestinale du fer.

Depuis la découverte de la lactotransferrine comme protéine majeure fixant le fer dans le lait humain (Montreuil *et al.*, 1960), une série de travaux ont été entrepris dans notre laboratoire. Ceux-ci portent sur les études des structures protéique et glycanique de la lactotransferrine, des rôles biologiques de la lactotransferrine, et du récepteur de la lactotransferrine au niveau de différents types de cellules.

Le rôle possible de la lactotransferrine dans l'absorption intestinale du fer a aussi été proposé par notre laboratoire (Montreuil *et al.*, 1960). Cette possibilité a été renforcée par les découvertes suivantes:

- 1) la démonstration que la lactotransferrine pouvait céder son fer aux cellules de la muqueuse intestinale provenant de biopsies de duodénum humain (Cox *et al.*, 1979),
- 2) la grande résistance de la lactotransferrine humaine aux protéolyses gastrointestinales (Spik *et al.*, 1982).

De plus, le récepteur de la lactotransferrine a été mis en évidence au niveau des membranes de bordure en brosse de Lapin (Mazurier *et al.*, 1985) et de Souris (Hu *et al.*, 1988). Les propriétés physicochimiques du récepteur isolé de membranes de bordure en brosse intestinales de Souris ont été déterminées (Hu *et al.*, 1990). Il reste à savoir comment la lactotransferrine et son récepteur participent au processus de l'absorption intestinale du fer et comment les cellules intestinales régulent ce phénomène en fonction des besoins en fer de l'organisme.

Nos travaux ont pour but d'avoir une meilleure compréhension du rôle de la lactotransferrine et de son récepteur dans l'absorption intestinale du fer. Pour cela, nous avons

utilisé, comme modèle d'épithélium intestinal humain, des lignées cellulaires provenant d'adénocarcinome de colon humain, capables de se différencier en entérocyte. La présence du récepteur de la lactotransferrine à la surface de plusieurs lignées cellulaires a déjà été mise en évidence (Roiron *et al.*, 1989; Derisbourg *et al.*, 1990a). Le modèle des lignées cellulaires nous a permis d'étudier les phénomènes caractéristiques des cellules polarisées (c'est-à-dire l'endocytose, la diacytose et la transcytose), ainsi que la régulation cellulaire fer-dépendante dans un système homologue (c'est-à-dire l'entérocyte humain et la lactotransferrine humaine).

Dans un premier temps, nous avons examiné l'évolution de la fixation de la lactotransferrine au cours de la différenciation d'une lignée cellulaire en entérocyte. Ensuite, nous avons comparé en phase bien différenciée, les caractéristiques de fixation de la lactotransferrine sur les cellules intestinales humaines en culture, provenant de différentes lignées.

Dans un second temps, nous avons étudié la transcytose du côté apical vers le côté basolatéral de la lactotransferrine et du fer qui lui est lié. Pour cela, nous avons utilisé des cellules intestinales humaines en culture, qui ont été cultivées sur filtre.

Enfin, nous avons examiné l'effet de la carence intracellulaire en fer sur l'expression et sur la fonction du récepteur de la lactotransferrine dans une lignée cellulaire humaine capable de se différencier en entérocyte.

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

### **Communications:**

– Spik G., Legrand D., Mazurier J., **Mikogami T.**, Montreuil J. and Rochard, E.

Characterization of two kinds of lactotransferrin receptors on different target cells.

First International Symposium on Lactoferrin Structure and Function

Honolulu, Hawaii, 19–24 septembre 1992.

– **Mikogami T.**, Heyman M., Spik G. et Desjeux J.–F.

Mécanisme de transport de la lactoferrine humaine par les cellules du clone cancéreux colique humain HT29–Cl.19A.

Club d'Etudes des Cellules Epithéliales Digestives, 11ème Réunion

Dijon, 3–4 décembre 1992

– **Mikogami T.**, Heyman M., Spik G. and Desjeux J.–F.

Human lactoferrin and iron transport across human colon carcinoma cell monolayers HT29 cl.19A.

American Gastroenterological Association

Boston, Massachusetts, 16–19 mai 1993

et

XXVI Annual Meeting of the European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition

Göteborg, 27–30 juin 1993

## **Publications:**

– Spik G., Legrand D., Leveugle B., Mazurier J., **Mikogami T.**, Montreuil J., Pierce A. and Rochard E.

Binding properties of different lactotransferrins to human lactotransferrin receptor.

In "New Perspectives in Infant Nutrition: Symposium Antwerpen" edited by Sawatzki, G.

Stuttgart: Georg Thieme Verlag

sous presse.

– Spik G., Legrand D., Mazurier J., **Mikogami T.**, Montreuil J., Pierce A. and Rochard E.

Characterization of two kinds of lactotransferrin receptors on different target cells.

In "Proceedings of the First International Symposium on Lactoferrin Structure and Function"

(Honolulu, Hawaii, September 19–24, 1992)

sous presse.

– **Mikogami T.**, Heyman M., Spik G. and Desjeux J.-F.

Apical to basolateral transcytosis of human lactoferrin in the human differentiated colon carcinoma cell line HT29 cl.19A.

American Journal of Physiology (soumis à publication)

– **Mikogami T.**, Marianne T. and Spik G.

Effect of intracellular iron depletion by picolinic acid on the lactoferrin receptor in the human colon carcinoma cell subclone HT29–18–C<sub>1</sub>.

Biochemical Journal (soumis à publication)



## ***Généralités***

---

## I. Les protéines contenant du fer

Le fer est relativement abondant dans l'environnement. Néanmoins, il tend à être biologiquement inaccessible aux organismes vivants du fait des deux propriétés chimiques suivantes:

- 1) en solution aqueuse, le fer existe dans deux états d'oxydation qui sont  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$ ,
- 2) en présence d'oxygène et à un pH physiologique,  $\text{Fe}^{2+}$  est facilement oxydé en  $\text{Fe}^{3+}$  qui est lui-même hydrolysé et polymérisé, formant ainsi des hydroxydes ferriques insolubles .

De plus, le fer libre peut être toxique pour les cellules à cause de sa capacité à catalyser la formation de radicaux libres qui détruisent les membranes lipidiques et d'autres constituants cellulaires. C'est pourquoi les organismes vivants doivent trouver des moyens de capter le fer sous forme chélatée soluble, de le transporter vers les voies métaboliques et de détoxifier le fer libre par stockage intracellulaire sous forme non toxique.

Les différentes protéines contenant du fer chez les Mammifères ont été bien analysées dans la revue de Crichton (1991). Elles peuvent être classées en trois groupes: les protéines fonctionnelles contenant du fer, les protéines de stockage du fer et les protéines de transport du fer.

### A. Les protéines fonctionnelles contenant du fer

Beaucoup de protéines essentielles dans les processus biologiques requièrent la présence de fer pour leur activité. Les principales protéines de ce type sont classées dans le **TABLEAU 1** (voir p. 12) selon la nature de l'interaction fer-protéine.

**TABEAU 1 Exemples de Protéines contenant du fer chez les Mammifères**

Classification selon les formes du fer	Fonctions	Nom des protéines	Localisation
Protéines hémiques	oxydoréduction	catalase	peroxysome
		cytochrome oxydase	mitochondrie
		cytochrome P-450	microsome, mitochondrie
	transfert d'électrons	cytochrome b	mitochondrie
		cytochrome c	"
	transport d'oxygène	hémoglobine	cytosol (érythrocyte)
		myoglobine	cytosol (muscle)
transport du fer	hémopexine	sérum	
Protéines Fer-Soufre	oxydoréduction	complexe I (NADH-coenzyme Q réductase)	mitochondrie
		complexe II (succinate-coenzyme Q réductase)	"
	isomérisation du citrate	aconitase (aconitate hydratase)	"
Protéines non hémiques et non Fer-Soufre	réduction des ribo- en déoxyribonucléotides	ribonucléotide réductase	noyau
	transport du fer	transferrines	fluides extracellulaires
		transferrine lactotransferrine	sérum sécrétion externe
	stockage du fer	ferritine	cytosol
hémossidérine		lysosome	

### **A-1. Les protéines héminiques**

La première classe de protéines est composée de celles qui contiennent un hème c'est-à-dire une ferroporphyrine ou ferroprotoporphyrine. Les fonctions des hémoprotéines sont les suivantes:

- 1) oxydo-réduction (catalase, peroxydase, cytochrome-oxydase et cytochrome P-450 extra-mitochondrial),
- 2) transfert d'électron (cytochrome b et c mitochondriaux),
- 3) transport de l'oxygène (hémoglobine et myoglobine).

### **A-2. Les protéines Fer-Soufre**

La deuxième classe de protéines contenant du fer est constituée de protéines qui possèdent des "cluster" Fer-Soufre liés à la chaîne polypeptidique par des groupements thiols de résidus de cystéine. Comme les cytochromes, les protéines Fer-Soufre mitochondriales telles le complexe I (NADH-coenzyme Q réductase) et le complexe II (succinate-coenzyme Q réductase) sont impliquées dans les mécanismes d'oxydo-réduction nécessaires à la production d'ATP. L'aconitase (aconitate hydratase) qui est un enzyme mitochondrial du cycle de Krebs, contient aussi un "cluster" Fer-Soufre. Son activité enzymatique varie selon les états du "cluster", c'est-à-dire qu'elle est supprimée lors de la conversion de [4Fe-4S] en [3Fe-4S] (Beinert *et al.*, 1983).

### **A-3. Les protéines non héminiques et non Fer-Soufre**

Cette troisième classe est constituée de protéines hétérogènes qui contiennent du fer nécessaire à leur activité biologique. La ribonucléotide-réductase des mammifères est constituée de deux sous-unités appelées M1 et M2. La protéine M2 contient deux ions ferriques par molécule. Le rôle essentiel que joue le fer dans la prolifération cellulaire pourrait ainsi s'expliquer, puisque le fer est indispensable à l'activité de la ribonucléotide-réductase, enzyme qui catalyse la réaction limitante de la synthèse d'ADN, c'est-à-dire la réaction qui

produit les 4 désoxyribonucléotides à partir des ribonucléotides correspondants (Thelander, 1990).

## **B. Les protéines de stockage du fer**

Le fer libre est toxique pour les cellules. C'est pourquoi les cellules doivent détoxifier et stocker l'excès de fer intracellulaire sous une forme non toxique. Chez les mammifères, deux protéines sont responsables du stockage du fer intracellulaire: la ferritine et l'hémosidérine. Ce sont toutes les deux des protéines non-héminiques et non Fer-Soufre.

### **B-1. La ferritine**

Il s'agit d'une protéine ubiquitaire, qui stocke le fer cytosolique. Elle est constituée d'un noyau minéral d'hydroxydes ferriques entouré d'une coquille protéique de 24 sous-unités. La ferritine peut fixer jusqu'à 4.500 atomes de fer par molécule (Fischbach *et al.*, 1969) et ce taux varie d'un organe à l'autre. Ainsi, dans le foie et la rate, la ferritine fixe 2.000 à 3.000 atomes de fer par molécule, tandis que dans le cerveau et le coeur elle incorpore 1.000 à 2.000 atomes de fer par molécule. La plupart des ferritines sont des hétéropolymères composés de deux types de sous-unités: un type lourd (type H; 22-24kDa) et un type léger (type L; 20-22kDa). La proportion de ces deux types de sous-unités intervient dans les propriétés métaboliques de l'apoprotéine assemblée. En effet, les sous-unités H qui possèdent une activité ferroxidasique (Lawson *et al.*, 1991), permettent plutôt une circulation intracellulaire dynamique du fer, tandis que les sous-unités L sont impliquées dans le stockage du fer à long terme (Boyd *et al.*, 1985). Ainsi, les ferritines riches en sous-unités L sont prédominantes dans les organes de stockage du fer comme le foie et la rate, alors que les ferritines riches en sous-unités H sont majoritaires dans les tissus érythropoïétiques (Theil, 1987).

## **B-2. L'hémosidérine**

C'est une protéine insoluble, de masse moléculaire supérieure à 4.000 kDa et qui possède un rapport fer/protéine très élevé. L'hémosidérine résulte probablement de dégradations lysosomales de ferritine (Iancu & Neustein, 1977) et elle est localisée essentiellement au niveau des lysosomes. A l'inverse de la ferritine, impliquée dans le métabolisme cellulaire normal du fer, l'hémosidérine semble participer au métabolisme pathologique du fer. En effet, cette protéine est présente en petite quantité dans les tissus normaux mais s'accumule lors des syndromes cliniques de surcharge en fer comme l'hémochromatose primaire et secondaire (Selden *et al.*, 1980).

## **C. Les protéines de transport du fer**

Comme l'ion ferrique est l'espèce majoritaire et possède une solubilité extrêmement faible dans les liquides oxygénés à pH physiologique, le transport du fer est effectué par l'intermédiaire de chélateurs organiques. Les bactéries sécrètent des sidérophores (chélateur de fer, de faible masse moléculaire) lorsqu'elles se trouvent dans un milieu carencé en fer. Parallèlement, elles synthétisent un certain nombre d'autres protéines impliquées dans la capture des ferrisidérophores tels que les récepteurs spécifiques de ces sidérophores. Chez les animaux, les protéines fixant le fer comme les transferrines et la ferritine extracellulaires, ont pour fonction de transporter le fer à la surface de la cellule.

### **C-1. Les transferrines**

#### ***a) La famille des transferrines***

Les protéines de la famille des transferrines sont des glycoprotéines monomériques, d'une masse moléculaire d'environ 80 kDa. Elles fixent très fortement mais réversiblement deux ions ferriques et simultanément deux anions carbonates. Ces protéines font partie de la classe des protéines non-héminiques et non Fer-Soufre. Les membres de cette famille sont les suivants :

- 1) LA SEROTRANSFERRINE (SIDEROPHILINE) est une  $\beta$ -globuline du sérum et d'autres liquides extracellulaires de vertébrés et d'invertébrés.
- 2) L'OVOTRANSFERRINE (CONALBUMINE) est présente dans les sécrétions de l'oviducte des oiseaux et des reptiles. Elle constitue un glycovariant de la sérotransferrine.
- 3) LA LACTOTRANSFERRINE (LACTOFERRINE) est une  $\beta$ -globuline qui est présente d'une part, dans les sécrétions extracellulaires des mammifères tels le lait, les sucs pancréatiques ou les larmes, et d'autre part, dans les leucocytes.
- 4) LA MELANOTRANSFERRINE (p97) est une protéine transmembranaire des cellules malignes de mélanome humain (Brown *et al.*, 1982; Rose *et al.*, 1986).

La sérotransferrine est la principale protéine responsable du transport du fer. Néanmoins, par ses propriétés de fixation du fer, la lactotransferrine peut également intervenir dans ce transport. La mélanotransferrine est supposée amener le fer à l'intérieur de la cellule. Dans le paragraphe suivant, nous détaillons les propriétés de la sérotransferrine. Celles de la lactotransferrine seront décrites ultérieurement.

#### ***b) Propriétés de la sérotransferrine***

Les études de cristallographie aux rayons X de la sérotransferrine de Lapin ont montré que la chaîne polypeptidique est disposée en deux domaines globulaires (Gorinski *et al.*, 1979; Bailey *et al.*, 1988). Dans chaque lobe se trouve un site de fixation du fer et dans les conditions normales de circulation sanguine, les lobes N- et C-terminaux fixent un ion ferrique avec une affinité ( $K_a$ ) respective de 1 et  $6.10^{22} \text{ M}^{-1}$  (Evans & Williams, 1978). La synthèse de la sérotransferrine a lieu principalement dans les hépatocytes. D'autres cellules comme les cellules de Sertoli, les cellules endothéliales de capillaire cérébral et les oligodendrocytes du cerveau produisent constitutivement de la sérotransferrine en moindre quantité. Dans le sérum humain sain, les concentrations en sérotransferrine varient de 2 à 3,5 mg/ml et son degré de saturation en fer est d'environ 30%.

#### ***c) Régulation de la biosynthèse de la sérotransferrine***

La concentration en sérotransferrine augmente lors d'une anémie due à une carence en fer et durant la grossesse. Elle diminue lors de l'hémochromatose. La régulation de la synthèse

de la sérotransferrine dans le foie a été étudiée. Les hormones stéroïdes accroissent la transcription de l'ADN et augmentent la synthèse protéique dans le foie de Poulet (McKnight *et al.*, 1980). La carence alimentaire en fer augmente aussi la transcription dans le foie de Poulet (McKnight *et al.*, 1980) et dans une moindre mesure, dans le foie de Rat (Idzerda *et al.*, 1986). A l'inverse, l'étude avec la sérotransferrine de Rat, réalisée par Tuil et coll. (1985) indique que l'expression de la sérotransferrine dans le foie est constitutive et n'est donc pas soumise à une régulation par d'autres stéroïdes ou par le taux de fer dans l'organisme. Bien que des éléments régulés par un métal aient été mis en évidence dans la région promoteur de la sérotransferrine (Tuil *et al.*, 1985; Brunel *et al.*, 1988; Schaeffer *et al.*, 1989), les mécanismes impliqués dans la régulation transcriptionnelle et traductionnelle de la synthèse de sérotransferrine n'ont pas été complètement élucidés.

## C-2. La ferritine

Comme décrit précédemment, la ferritine se trouve principalement dans le cytosol et possède des fonctions de détoxification et de stockage du fer à l'intérieur de la cellule. Cependant, la ferritine est aussi présente à l'extérieur de la cellule dans le sérum et certaines de ces ferritines extracellulaires diffèrent en nature des ferritines intracellulaires (Worwood, 1986). En effet, d'une part, elles contiennent beaucoup moins de fer (2% de la protéine au lieu de 10 à 30%) et d'autre part, elles sont glycosylées. En outre, les récepteurs de ferritine ont été trouvés dans de nombreux tissus et cellules, incluant les hépatocytes humains, de Rat et de Porc (Mack *et al.*, 1983; Adams *et al.*, 1988a, b), les réticulocytes de Cochon d'Inde (Blight & Morgan, 1983) et les cellules en culture K562 (Takami *et al.*, 1986). Au niveau de l'hépatocyte, le récepteur de ferritine, dont la fonction est d'éliminer la ferritine sérique, possède une masse moléculaire voisine de 53 kDa et fixe à la fois les ferritines H et L. En revanche, le récepteur de ferritine des autres cellules fixe spécifiquement la ferritine H et possède une masse moléculaire d'environ 100 kDa. Il est supposé servir d'intermédiaire à l'activité suppressive de la ferritine H dans l'hématopoïèse (Moss *et al.*, 1992), liée à l'activité ferroxidasique de cette ferritine H (Broxmeyer *et al.*, 1991).



### C-3. L'hémopexine

Il s'agit d'une  $\beta$ -globuline fixant un hème. C'est une glycoprotéine du sérum de mammifères possédant une masse moléculaire d'environ 70 kDa. Sa concentration dans le sang varie de 0,5 à 1 mg/ml. L'hémopexine intervient dans le métabolisme de l'hème. Celui-ci, libre dans le sang, fixe l'hémopexine à un taux de 1 pour 1 et le complexe hème-hémopexine est capturé par les hépatocytes puis endocyté par l'intermédiaire de récepteur avec une élimination de l'hème et un recyclage de l'apohémopexine (Smith et Morgan, 1979).

## D. La lactotransferrine

Comme décrit dans le paragraphe I-C-1, la lactotransferrine est une protéine fixant le fer appartenant à la famille des transferrines. Depuis sa mise en évidence en 1939, ses propriétés biochimiques et biophysiques ainsi que ses rôles biologiques ont été étudiés de façon approfondie.

### D-1. Localisation

#### a) Le lait

Une protéine contenant du fer a été décrite dans le lait pour la première fois par Sørensen et Sørensen (1939) et a été isolée comme protéine majeure fixant le fer dans le lait de Femme (Montreuil & Mullet, 1960; Montreuil *et al.*, 1960; Johansson, 1960) et dans le lait de Vache (Groves, 1960). Un bon nombre d'études ultérieures ont montré que la lactotransferrine et la sérotransferrine étaient toutes les deux présentes dans le lait, mais à des concentrations variant selon les espèces (Masson & Heremans, 1971; Nagasawa *et al.*, 1972; Underwood, 1977; Suzuki *et al.*, 1977; Lønnerdal & Forsum, 1985). Comme décrit dans le TABLEAU 2 (voir p. 19), il existe une relation inverse entre la concentration du fer dans différents organismes et celle de lactotransferrine, et entre la concentration de lactotransferrine et celle de sérotransferrine. En particulier, la concentration de lactotransferrine dans le lait humain est largement plus élevée que dans le lait des autres espèces. Cette concentration varie aussi au cours de la lactation: elle est, par exemple, de 5 à 7 mg/ml dans le colostrum et de 2 à 3 mg/ml dans le lait mature.

**TABLEAU 2 Concentrations en fer, en lactotransferrine et en sérotransferrine dans le lait de différentes espèces animales (Fransson *et al.*, 1983b)**

$\mu\text{g/ml}$	Fer
0.3–1.6	Femme, Vache, Chèvre
1.4–2.4	Truie
2.0–4.0	Lapine
3.0–14	Rat, Chienne

$\mu\text{g/ml}$	Lactotransferrine	Sérotransferrine
< 50	Rat, Lapine, Chienne	Chienne, Femme
20–200	Vache, Chèvre, Truie	Truie, Vache, Chèvre, Jument
200–2000	Cochon d'Inde, Souris, Jument	Cochon d'Inde, Souris
> 2000	Femme	Lapine, Rat

### *b) Autres sécrétions externes*

La lactotransferrine est présente dans la plupart des milieux d'excrétion comme les larmes, les sécrétions gastrointestinales et le mucus.

#### *Les sécrétions gastrointestinales*

La lactotransferrine se trouve dans la salive, la bile, le suc pancréatique et les sécrétions de l'intestin grêle de nombreuses espèces incluant l'Homme (pour revue générale, voir Masson *et al.*, 1966).

De Vet et van Gool (1974) ont montré que le liquide duodéal des sujets normaux contient de la lactotransferrine à une concentration d'environ 10  $\mu\text{g/ml}$ . Ils ont aussi mis en évidence une corrélation inverse entre le taux de fer plasmatique et la concentration en lactotransferrine dans le liquide duodéal. Notamment, chez les patients présentant une surcharge en fer, la concentration en lactotransferrine dans le liquide duodéal est 2 à 4 fois plus faible que chez les sujets normaux.

Van Vugt et coll. (1975) ont réexaminé, en utilisant le modèle du lapin, la relation entre la concentration biliaire de lactotransferrine et le taux de fer dans l'organisme. La concentration biliaire en lactotransferrine chez le Lapin normal est de 1,6 mg/ml et celle-ci augmente 2 à 3 fois lorsque le Lapin est anémié ou traité à la desferrioxamine. De plus, la concentration revient à un niveau normal en comblant le manque de fer. Ces résultats indiquent que la concentration de lactotransferrine dans la bile est régulée négativement en réponse à une variation du taux de fer dans le corps.

#### *Le mucus*

La lactotransferrine se trouve dans la plupart des mucus: les sécrétions bronchiques (Biserte *et al.*, 1963), et les sécrétions vaginales, nasales, et intestinales (Masson *et al.*, 1966 & 1968), dans lesquelles elle est systématiquement associée à des IgA sécrétoires, au lysozyme et à un facteur antitrypsique (pour revue générale, voir Montreuil *et al.*, 1985). Au niveau de la muqueuse intestinale, la lactotransferrine semble être sécrétée par les cellules caliciformes (Lorimier, 1987).

### *c) Les leucocytes neutrophiles polymorphonucléaires*

La lactotransferrine est aussi présente dans les leucocytes neutrophiles polymorphonucléaires (Masson *et al.*, 1969), et est localisée dans les granules secondaires de ces cellules, ne possédant pas de myéloperoxydase. Quand elles reçoivent des stimuli, les cellules dégranulent et en conséquence libèrent la lactotransferrine.

### *d) Le sang*

La concentration plasmatique normale en lactotransferrine est beaucoup plus faible (0,4 à 2  $\mu\text{g/ml}$ ) que celle de la sérotransferrine (environ 2 à 3,5  $\text{mg/ml}$ ). Cette concentration varie considérablement selon la pathologie: elle est, par exemple, de 12 à 22  $\mu\text{g/ml}$  lors de leucémie myéloïde chronique (Bennett & Mohla, 1976). Cette lactotransferrine plasmatique provient probablement des leucocytes polymorphonucléaires comme décrit ci-dessus.

Récemment, des études ont montré que la concentration plasmatique de lactotransferrine était légèrement plus élevée chez les enfants prématurés que chez les enfants nés à terme (Scott, 1989a, b). De plus, la lactotransferrine intacte trouvée dans l'urine des enfants prématurés provient principalement du lait humain ingéré (Hutchens *et al.*, 1991a, b). Ces résultats indiquent que le lait maternel peut être partiellement à l'origine de la lactotransferrine plasmatique chez les nourrissons.

## **D-2. Propriétés de fixation du métal et structure de la lactotransferrine**

La structure de la lactotransferrine a été étudiée de façon approfondie en ce qui concerne la protéine et les structures glycaniques. Plus particulièrement, de récentes études cristallographiques aux rayons X ont révélé un certain nombre d'informations extrêmement intéressantes.

### *a) Activité de fixation du métal*

La lactotransferrine, comme la sérotransferrine, est connue pour fixer très fortement deux ions ferriques par molécule, simultanément avec deux ions carbonates. L'affinité de

fixation du fer par la lactotransferrine est 260 fois plus forte que celle de la sérotransferrine, ce qui suggère que la lactotransferrine fixe le fer préférentiellement à la sérotransferrine lorsque les deux protéines sont présentes (Aisen & Listowsky, 1980). *In vitro*, la libération du fer est réalisée en diminuant le pH. Alors que la sérotransferrine commence à libérer son fer à pH 6, la lactotransferrine garde son fer fixé jusqu'à pH 2 (Montreuil & Mullet, 1960; Montreuil *et al.*, 1960; Mazurier & Spik, 1980). De plus, d'autres métaux comme  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , et  $\text{Co}^{2+}$  peuvent se substituer à  $\text{Fe}^{3+}$  (Ainscough *et al.*, 1979). De même une variété d'anions carboxylates peuvent se substituer à  $\text{CO}_3^{2-}$ .

### ***b) Structure primaire de la protéine***

La lactotransferrine comme la sérotransferrine, est une glycoprotéine constituée d'une seule chaîne polypeptidique et possède une masse moléculaire d'environ 80 kDa. La séquence complète en acides aminés de la lactotransferrine humaine a été déterminée et a révélé 59% d'homologie avec celle de la sérotransferrine humaine et 37% d'homologie interne c'est-à-dire d'homologie entre les moitiés N- et C-terminales de chaque protéine (Metz-Boutigue *et al.*, 1984). Cette séquence a été revue et corrigée selon les observations cristallographiques (Anderson *et al.*, 1989) et la séquence complète de l'ADNc de la lactotransferrine humaine a été récemment élucidée (Powell & Ogden, 1990; Rey *et al.*, 1990). Celle des lactotransferrines murine (Pentecost & Teng, 1987) et bovine (Mead & Tweedie, 1990; Pierce *et al.*, 1991) ont également été déterminées. Selon les séquences d'acides aminés des lactotransferrines humaine, murine et bovine, la chaîne polypeptidique est constituée respectivement de 692, 688 et 689 acides aminés et les identités de séquences entre ces trois lactotransferrines sont de l'ordre de 60 à 70%.

### ***c) Les glycannes***

De nombreuses études sur la structure des glycannes de la lactotransferrine ont été réalisées au Laboratoire. Une grande diversité a été mise en évidence d'une part, au niveau du nombre et de la localisation des sites de glycosylation, et d'autre part, au niveau de la structure des glycannes entre les différentes espèces (Spik *et al.*, 1982b, 1988 & 1993).

### *Sites de glycosylation*

D'après les séquences en acides aminés des lactotransférines humaine, murine et bovine, elles possèdent respectivement 3, 2 et 5 sites potentiels de N-glycosylation. En fait, les seuls qui sont glycosylés sont: 2 sites pour la lactotransférine humaine, l'un (Asn 138) dans le lobe N-terminal et l'autre (Asn 478) dans le lobe C-terminal; 2 sites pour la lactotransférine murine, l'un (Asn 99) dans le lobe N-terminal et l'autre (Asn 475) dans le lobe C-terminal; 4 sites pour la lactotransférine bovine, un (Asn 233) dans le lobe N-terminal et trois (Asn 368, Asn 476, Asn 545) dans le lobe C-terminal (Spik *et al.*, 1993).

### *Structure des glycannes*

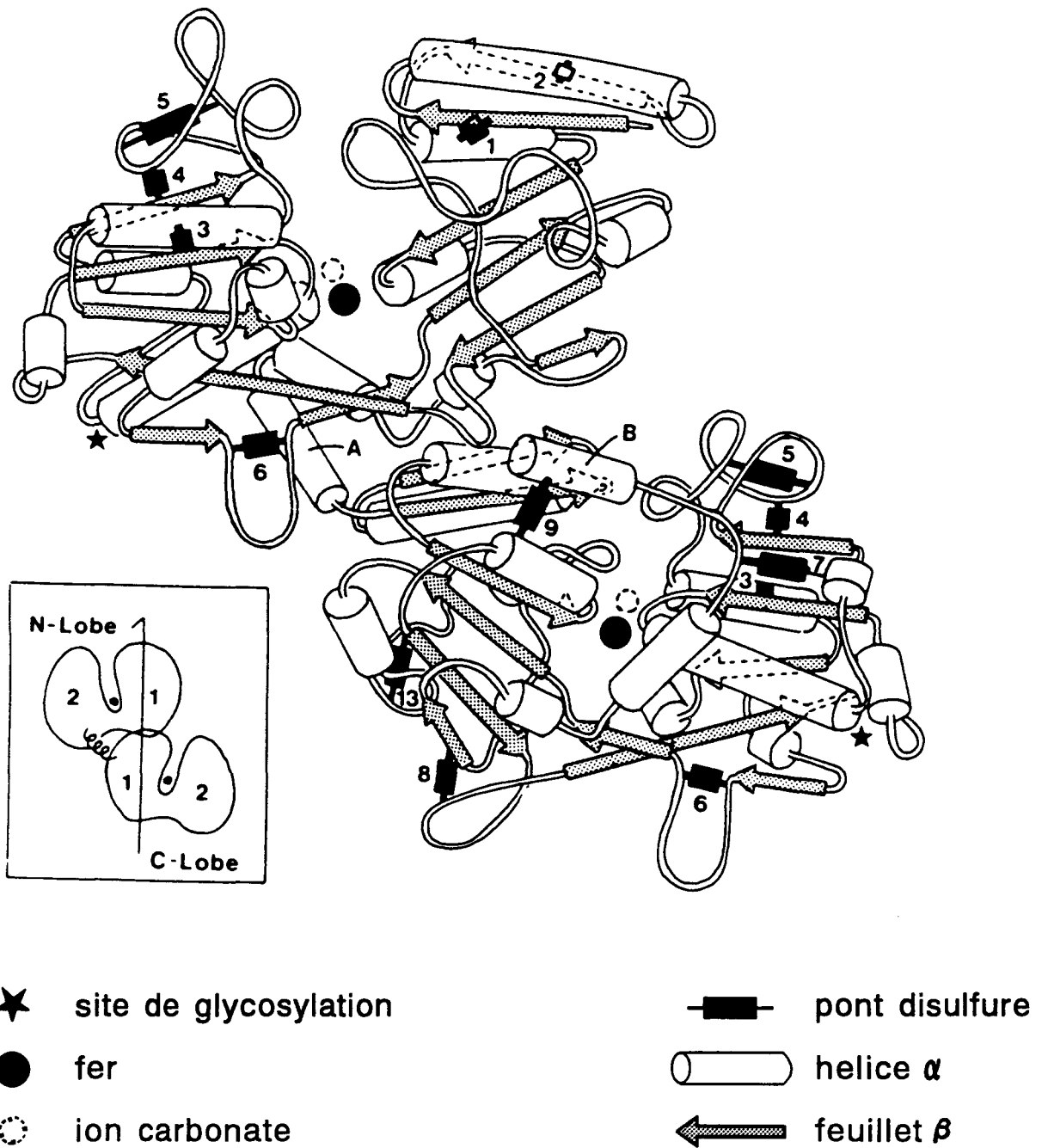
Des glycannes biantennés de type N-acétyllactosaminique ont été trouvés pour les lactotransférines des trois espèces et des glycannes de type oligomannosidique ont été trouvés dans la lactotransférine bovine (van Halbeek *et al.*, 1981; Spik *et al.*, 1982b & 1988; Coddeville *et al.*, 1992). Les glycannes de la lactotransférine humaine sont particulièrement hétérogènes c'est-à-dire que les glycannes biantennés de type N-acétyllactosaminique contiennent 1 ou 2 acides sialiques et/ou 1 ou 2 résidus de fucose. D'autre part, aucun résidu de fucose n'a été trouvé dans la lactotransférine isolée des leucocytes neutrophiles polymorphonucléaires (Derisbourg *et al.*, 1990).

### *d) Structure cristallographique*

Une série de déterminations de structure de cristaux aux rayons X a été effectuée par Baker *et coll.*, et les relations structure-fonction ont été examinées par comparaison avec la sérotransférine (Baker *et al.*, 1987; Baker and Lindley, 1992).

### *Structure bilobée*

L'analyse de la structure cristallographique de la lactotransférine humaine saturée en fer a été réalisée à 3,2 et 2,8 Å (Anderson *et al.*, 1987 & 1989). Comme prévu par l'homologie interne de séquence en acide aminés, les moitiés N- et C-terminales sont repliées en deux lobes globulaires séparés, qui sont reliés par une courte chaîne polypeptidique en hélice  $\alpha$ . Chaque lobe est subdivisé en deux domaines différents avec un site de fixation du fer localisé dans la zone intermédiaire (voir **FIG. 1**, p. 24).



**FIG. 1** Représentation schématique de la molécule de lactotransferrine humaine (Baker *et al.*, 1987)

### *Site de fixation du fer*

Les sites de fixation du fer sont remarquablement similaires dans les deux lobes. Chaque atome de fer est relié à quatre résidus d'acides aminés et à l'ion carbonate spécifique. Trois ligands anioniques, 2 résidus de tyrosine et 1 résidu d'acide aspartique, interagissent avec les trois charges positives de l'ion ferrique et le quatrième ligand est une histidine neutre. L'ion carbonate occupe une poche entre l'atome de fer et deux groupements du site de fixation, chargés positivement: il s'agit de la chaîne latérale du résidu d'arginine et de l'extrémité N-terminale de l'hélice  $\alpha$ . L'ion carbonate pourrait servir à neutraliser cette charge positive avant la fixation du fer.

Selon les études cristallographiques de l'apolactotransferrine humaine (Anderson *et al.*, 1990), les deux lobes subissent différents changements conformationnels du fait de la fixation du fer. La zone intermédiaire de fixation du lobe N-terminal est largement ouverte en absence de fer et est fermée lorsque le fer est fixé, alors que la zone intermédiaire de fixation du lobe C-terminal est fermée dans les deux cas (voir FIG. 2, p. 26). Cette observation de la flexibilité du lobe N-terminal semble rejoindre le fait que la fixation du fer sur le lobe N-terminal soit labile en milieu acide et possède une affinité plus faible que celle du lobe C-terminal.

### *Autres observations*

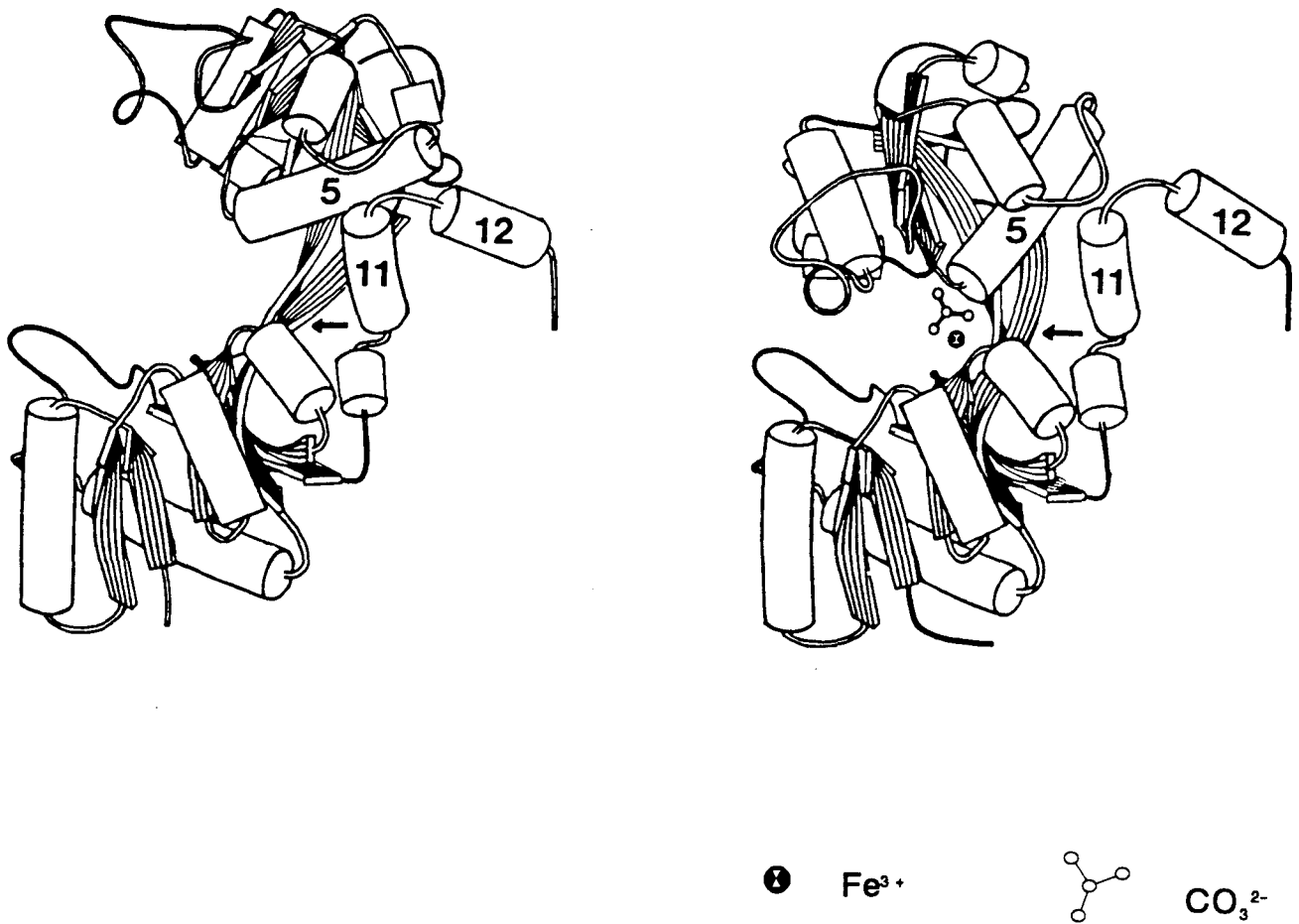
A cause de la microhétérogénéité de la chaîne glycanique, peu d'informations ont été obtenues pour définir la structure des sucres. La partie glycanique ne semble pas affecter la structure protéique ou les propriétés de fixation du métal.

La substitution du métal et de l'anion ont aussi été étudiées. Il a été montré que la substitution de  $\text{Fe}^{3+}$  par  $\text{Cu}^{2+}$  dans les deux lobes et du carbonate par l'oxalate dans le lobe C-terminal se déroulait sans changement de la structure d'ensemble de la protéine. Ces résultats suggèrent que cette lactotransferrine cuivrique pourrait se fixer à son récepteur spécifique de la même façon que la lactotransferrine ferrique (Smith *et al.*, 1992; Shongwe *et al.*, 1992).

## **D-3. Rôles de la lactotransferrine au niveau du tractus gastrointestinal**

Au niveau du tractus gastrointestinal, des rôles biologiques variés de la





**FIG. 2** Représentation schématique des changements conformationnels provoqués par la fixation du fer sur le lobe N-terminal de la lactotransferrine (Anderson *et al.*, 1990)

lactotransferrine ont été proposés, et plus particulièrement des rôles dans l'absorption intestinale du fer, dans la défense antibactérienne de la muqueuse et dans le développement du tractus gastrointestinal (Brock, 1980; Spik & Montreuil, 1983; Montreuil *et al.*, 1985; Németh & Simonovits, 1985; Spik, 1988; Sánchez *et al.*, 1992).

#### ***a) Résistance de la lactotransferrine aux dégradations protéolytiques***

La lactotransferrine doit faire preuve d'une certaine résistance aux dégradations protéolytiques afin de pouvoir posséder des rôles biologiques au niveau du tractus gastrointestinal. Beaucoup d'études *in vitro* imitant les dégradations protéolytiques gastrointestinales, ont montré que la lactotransferrine, et surtout la lactotransferrine saturée en fer, possédait une grande résistance à de telles dégradations (Spik & Montreuil, 1966; Line *et al.*, 1976; Suzuki *et al.*, 1978 & 1989; Brines & Brock, 1983). Ces résultats ont été confirmés par la découverte de lactotransferrine non dégradée dans les selles de nouveau-nés nourris au lait de vache supplémenté avec de la lactotransferrine (Spik *et al.*, 1982a). Plus récemment, comme décrit dans le paragraphe I-D-1-d, une certaine quantité de lactotransferrine intacte a également été trouvée dans l'urine d'enfants prématurés et provient essentiellement du lait humain ingéré (Hutchens *et al.*, 1991a, b). Ces résultats indiquent que les lactotransferrines endogène et exogène c'est-à-dire les lactotransferrines provenant des sécrétions gastrointestinales et du lait, peuvent résister toute les deux aux dégradations protéolytiques et donc jouer un rôle au niveau du tractus gastrointestinal.

#### ***b) Rôles dans l'absorption intestinale du fer***

La mise en jeu de la lactotransferrine au niveau de l'absorption intestinale du fer a été proposée en premier par Montreuil et coll. (1960). Cependant, cette hypothèse est encore controversée. Nous détaillons ce sujet ultérieurement dans la section III-C-4.

#### ***c) Rôles dans la défense antibactérienne de la muqueuse***

Un grand nombre d'études ont démontré l'existence d'un effet bactériostatique, et même dans quelques cas d'un effet bactéricide, de la lactotransferrine pour un grand nombre

de microorganismes incluant la souche entéropathogénique d'*Escherichia coli* (Bullen *et al.*, 1972; Reiter *et al.*, 1975; Spik *et al.*, 1978), *Staphylococcus aureus*, *S. albus*, *Pseudomonas aeruginosa* (Masson & Heremans, 1966), *Bacillus stearothermophilus*, *B. subtilis* (Oram & Reiter, 1968) *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutants* (Arnold *et al.*, 1980) et *Candida albicans* (Kirkpatrick *et al.*, 1971).

#### *Activité bactériostatique de la lactotransferrine par ferriprivation*

Tous les microorganismes exceptés *Lactobacillus* et certaines souches de *Bacillus* ont besoin de fer pour leur croissance (Neilands, 1980). Les bactéries secrètent des sidérophores (chélateurs de fer de faible masse moléculaire) dans des conditions de déficience en fer, afin de faciliter l'incorporation du fer. Comme montré pour la transferrine (Carrano & Raymond, 1979), la lactotransferrine est susceptible d'entrer en compétition avec les sidérophores pour capter le fer et ainsi empêcher l'utilisation du fer par la bactérie.

#### *Activités bactéricides de la lactotransferrine par déstabilisation de la paroi bactérienne*

Il a été mis en évidence que les activités bactéricides de la lactotransferrine sur *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutants*, *Legionella pneumophila* et *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sont indépendantes des conditions de ferriprivation (Arnold *et al.*, 1982; Bortner *et al.*, 1986; Kalmar & Arnold, 1988). Ces effets bactéricides résultent en fait de la capacité de la lactotransferrine à disloquer les membranes externes (Ellison *et al.*, 1988, 1990; Ellison & Giehl, 1991). Récemment, des régions N-terminales constituées de 47 et 25 acides aminés ont été identifiées comme les domaines ultrastructuraux responsables des activités bactéricides des lactoferrines humaine et bovine (Tomita *et al.*, 1992; Bellamy *et al.*, 1992b). Qu'il s'agisse de la lactotransferrine intacte ou de peptides de la région N-terminale, l'activité bactéricide diminue de la même façon en présence des cations divalents tels que  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  (Ellison & Giehl, 1991; Bellamy *et al.*, 1992a). Ces peptides, qui contiennent une forte proportion de résidus d'acides aminés basiques, sont susceptibles de se lier à la membrane bactérienne et augmentent ainsi sa perméabilité comme certains autres peptides antimicrobiens (Boman & Hultmark, 1987; Bevins & Zasloff, 1990; Lehrer *et al.*, 1991). Plus récemment, un domaine plus restreint, responsable des propriétés bactéricides a été déterminé

(Tomita *et al.*, 1993). Ce domaine est constitué d'une boucle de 18 acides aminés formée par un pont disulfure entre les résidus de cystéine, correspondant aux résidus 20 et 37 de la lactotransferrine humaine et aux résidus 19 et 39 de la lactotransferrine bovine.

#### *Effet synergique du lysozyme et des IgA sécrétoires*

La lactotransferrine est présente à la fois dans le lait et dans les sécrétions des muqueuses intestinales simultanément avec les immunoglobines A sécrétoires (sIgA) et le lysozyme. Il a été montré que les activités antibactériennes de la lactotransferrine se trouvent augmentées par leur présence:

- 1) sIgA augmente l'effet bactériostatique de l'apo-lactotransferrine, probablement en bloquant la fixation entre les sidérophores et leurs récepteurs membranaires spécifiques (Bullen *et al.*, 1974, Spik *et al.*, 1978; Stephens *et al.*, 1980).
- 2) Les glycanes des sIgA, simultanément avec ceux de la lactotransferrine, inhibent l'adhésion de la bactérie sur la muqueuse (Izhar *et al.*, 1982). Il est probable que le résidu de L-fucose des glycanes soit impliqué dans ces effets inhibiteurs (Pierce-Cretel *et al.*, 1983).
- 3) La lactotransferrine, même saturée en fer, présente des activités bactériostatiques en présence du lysozyme, qui résultent de l'agglutination par la lactotransferrine de bactéries dont la paroi a été modifiée par le lysozyme (Perraudin & Prieels, 1982; Suzuki *et al.*, 1989).

#### *d) Activité de stimulation de la croissance*

Un intérêt considérable a été porté sur le rôle des facteurs trophiques, contenus dans le lait et surtout le colostrum, dans la stimulation de la muqueuse intestinale et dans son développement (voir Revue générale de Reeds, 1988). Plusieurs facteurs trophiques ont été identifiés tels que le facteur de croissance de l'épiderme (EGF; Carpenter, 1980), le facteur de croissance "insulin-like" I (IGF-I; Baxter *et al.*, 1984) et le facteur de croissance des plaquettes sanguines (PDGF; Shing & Klagsbrun, 1987). Récemment, Nichols *et coll.* (1987 & 1989) ont montré que la lactotransferrine humaine stimulait l'incorporation de thymidine

dans les cellules cryptiques de Rat. Ils ont aussi suggéré que la stimulation de la croissance par la lactotransferrine ne semble pas nécessiter de fer (Nichols *et al.*, 1990).

#### **D-4. Rôles de la lactotransferrine dans les mécanismes de défense immunitaire**

Comme décrit dans le paragraphe I-D-1-c, la lactotransferrine est présente dans les granules secondaires des leucocytes polymorphonucléaires. Le rôle biologique de ces cellules est essentiellement la participation à la phagocytose au niveau des sites d'inflammation, qui est un mécanisme important pour la défense de l'hôte contre les bactéries. Au niveau du site d'inflammation, l'interleukine-1 libérée par les leucocytes activés, provoque la dégranulation des leucocytes polymorphonucléaires (Kampschmidt & Pulliam, 1975), entraînant ainsi la libération d'environ 60% de la lactotransferrine contenue dans les granules secondaires (Leffell & Spitznagel, 1972).

##### *a) Rôle de la lactotransferrine dans l'activité bactéricide des leucocytes polymorphonucléaires*

###### *Activité bactéricide de la lactotransferrine libérée*

La lactotransferrine et le lysozyme, qui sont libérés des granules secondaires, possèdent tous les deux une activité bactéricide au niveau des sites d'inflammation. L'effet synergique de ces deux protéines a déjà été exposé dans le paragraphe précédent.

###### *Activité bactéricide de la lactotransferrine au niveau des phagolysosomes*

Il est bien établi que les phagosomes fusionnent avec les lysosomes et les granules secondaires non dégranulés formant ainsi des phagolysosomes. L'apo- et la ferri-lactotransferrine pourraient présenter une activité bactéricide selon différents mécanismes. En effet, il est possible que l'apo-lactotransferrine capture le fer et empêche ainsi la croissance des bactéries phagocytées (Bullen & Armstrong, 1979). D'autre part, la ferrilactotransferrine peut libérer son fer qui peut alors catalyser la production de radicaux libres possédant une forte activité bactéricide au niveau des phagolysosomes (Ambruso & Johnston, 1981; Lima &

Kierszenbaum, 1987). La capacité de la lactotransferrine à promouvoir la formation de radicaux libres est probablement limitée aux conditions acides, comme c'est le cas dans les phagolysosomes, puisque la lactotransferrine semble inhiber la formation de radicaux libres à pH physiologique et protéger ainsi les neutrophiles et le milieu tissulaire inflammatoire (Gutteridge *et al.*, 1981; Aruoma & Halliwell, 1987).

***b) Rôle de la lactotransferrine dans l'hyposidérémie inflammatoire***

Il est bien établi que le taux de fer sérique diminue brutalement lors d'infections bactérienne ou virale, tandis que le taux de fer stocké augmente dans le système réticuloendothélial (Weinberg, 1974). Van Snick et coll. (1974) ont suggéré que la lactotransferrine libérée des leucocytes polymorphonucléaires jouerait un rôle de médiateur dans cette hyposidérémie, en captant le fer de la sérotransferrine et en l'apportant aux macrophages du système réticuloendothélial, où le fer serait incorporé dans la ferritine. Bien qu'un certain nombre d'études aient démontré la présence de lactotransferrine fixée aux macrophages et aux monocytes, la nature de cette fixation reste obscure en ce qui concerne l'implication des résidus de fucose des glycanes de la lactotransferrine et l'implication de l'ADN et des lipopolysaccharides fixés sur la membrane plasmique des monocytes et des macrophages (van Snick & Masson, 1976; Imber & Pizzo, 1983; Birgens *et al.*, 1983; Moguevski *et al.*, 1985; Miyazawa *et al.*, 1991).

***c) Rôle de la lactotransferrine dans la régulation de la myélopoïèse***

La lactotransferrine a été identifiée comme inhibiteur ("colony inhibiting activity" ou CIA) synthétisé par les granulocytes neutrophiles. Cette activité provoque la diminution de la production et/ou la libération de "granulocyte/macrophage colony-stimulating factor" (GM-CSF) synthétisés par les monocytes et les macrophages (Broxmeyer *et al.*, 1976 & 1978). Il semble certain que la lactotransferrine agisse indirectement en diminuant la synthèse d'interleukine-1, elle-même nécessaire à la production de GM-CSF (Bagby *et al.*, 1983; Broxmeyer, 1989). La ferrilactotransferrine a un effet plus important que l'apo-lactotransferrine (Broxmeyer *et al.*, 1978) mais le rôle que joue le fer dans ce mécanisme n'est pas connu.

#### ***d) Rôle de la lactotransferrine dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire***

L'agrégation des plaquettes nécessite une interaction avec le fibrinogène réalisée par l'intermédiaire d'une glycoprotéine de la membrane plaquettaire, la GP IIb-IIIa (Phillips *et al.*, 1991). Deux épitopes différents du fibrinogène, qui sont impliqués dans la fixation sur la GP IIb-IIIa, ont été identifiés (Andrieux *et al.*, 1989). L'un des deux est une structure RGDS (c'est-à-dire Arg-Gly-Asp-Ser), et la présence d'une séquence de structure similaire KRDS (c'est-à-dire Lys-Arg-Asp-Ser), a été mise en évidence dans le lobe N-terminal de la lactotransferrine humaine (Raha *et al.*, 1988). Le térapeptide RGDS et le térapeptide correspondant KRDS, présents dans la lactotransferrine humaine, sont tous les deux des inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP, ainsi que de la fixation du fibrinogène sur les plaquettes (Drouet *et al.*, 1990; Mazoyer *et al.*, 1990). Récemment, il a aussi été démontré que la lactotransferrine se fixait aux plaquettes et inhibait l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP. De plus, la protéine fixant la lactotransferrine, purifiée à partir des plaquettes, est distincte de la GP IIb-IIIa, ce qui indique que d'autres interactions pourraient être impliquées dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire par la lactotransferrine (Leveugle *et al.*, 1993).

#### ***e) Interactions de la lactotransferrine avec les lymphocytes***

D'autres rôles biologiques ont été proposés pour la lactotransferrine en tant que facteur stimulant la migration des cellules lymphoïdes (de Sousa, 1978), facteur de prolifération pour les lymphocytes (Hashizume *et al.*, 1983; Mazurier *et al.*, 1989), ou encore facteur de différenciation pour les lymphocytes T (Zimecki *et al.*, 1991).

### **D-5. Relations structure-fonction de la lactotransferrine**

Récemment, des quantités croissantes d'informations ont été données concernant les relations structure-fonction de la lactotransferrine.

#### ***a) Les domaines fixant le récepteur***

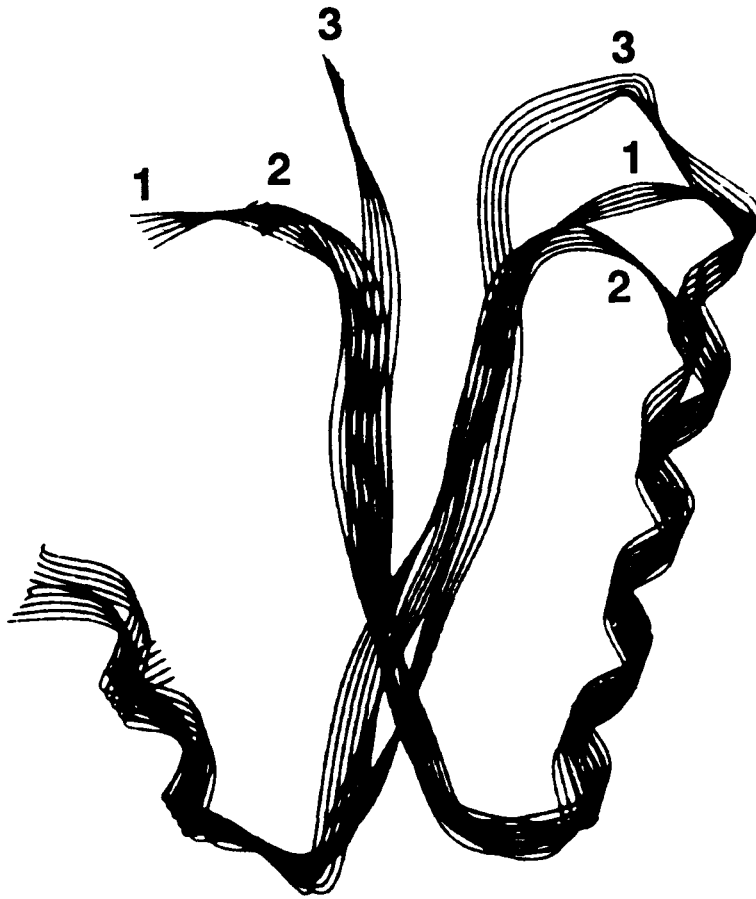
Au Laboratoire, une série d'expériences ont été menées afin d'identifier le domaine de la lactotransferrine responsable de la fixation du récepteur exprimé à la surface des

lymphocytes humains stimulés par la phytohématine (Mazurier *et al.*, 1989; Rochard *et al.*, 1989; Legrand *et al.*, 1991, 1992). Les expériences d'inhibition compétitive ont révélé qu'un peptide protéolytique de 6 kDa est encore capable d'inhiber la fixation de la lactotransferrine intacte sur son récepteur. Ce peptide correspond au résidu 4–52 de la lactotransferrine, situé dans le domaine N-terminal I (Legrand *et al.*, 1992). Ce domaine forme un motif  $\beta\alpha\beta$  (c'est-à-dire un motif de structure feuillets plissés  $\beta \rightarrow$  hélice  $\alpha \rightarrow$  feuillets plissés  $\beta$ ; voir FIG. 3, p. 34), qui est facilement accessible aux solvants et par conséquent aux interactions avec le récepteur (Baker & Lindley, 1992). De plus, d'après les résultats obtenus après quelques modifications chimiques, deux régions encore plus limitées, responsables de la reconnaissance du récepteur, ont été déterminées. L'une comprend les résidus 4–6 et 28–34, et l'autre comprend les résidus 38–42. En particulier, les résidus 28–34, qui forment un coude  $\beta$ , possèdent des caractères structuraux spécifiques du lobe N-terminal de la lactotransferrine humaine différents de ceux des régions homologues du lobe C-terminal de la lactotransferrine humaine et du lobe N-terminal de la sérotransferrine humaine (Legrand *et al.*, 1992). Ce résultat explique que ces deux lobes ne sont pas reconnus par le récepteur de la lactotransferrine.

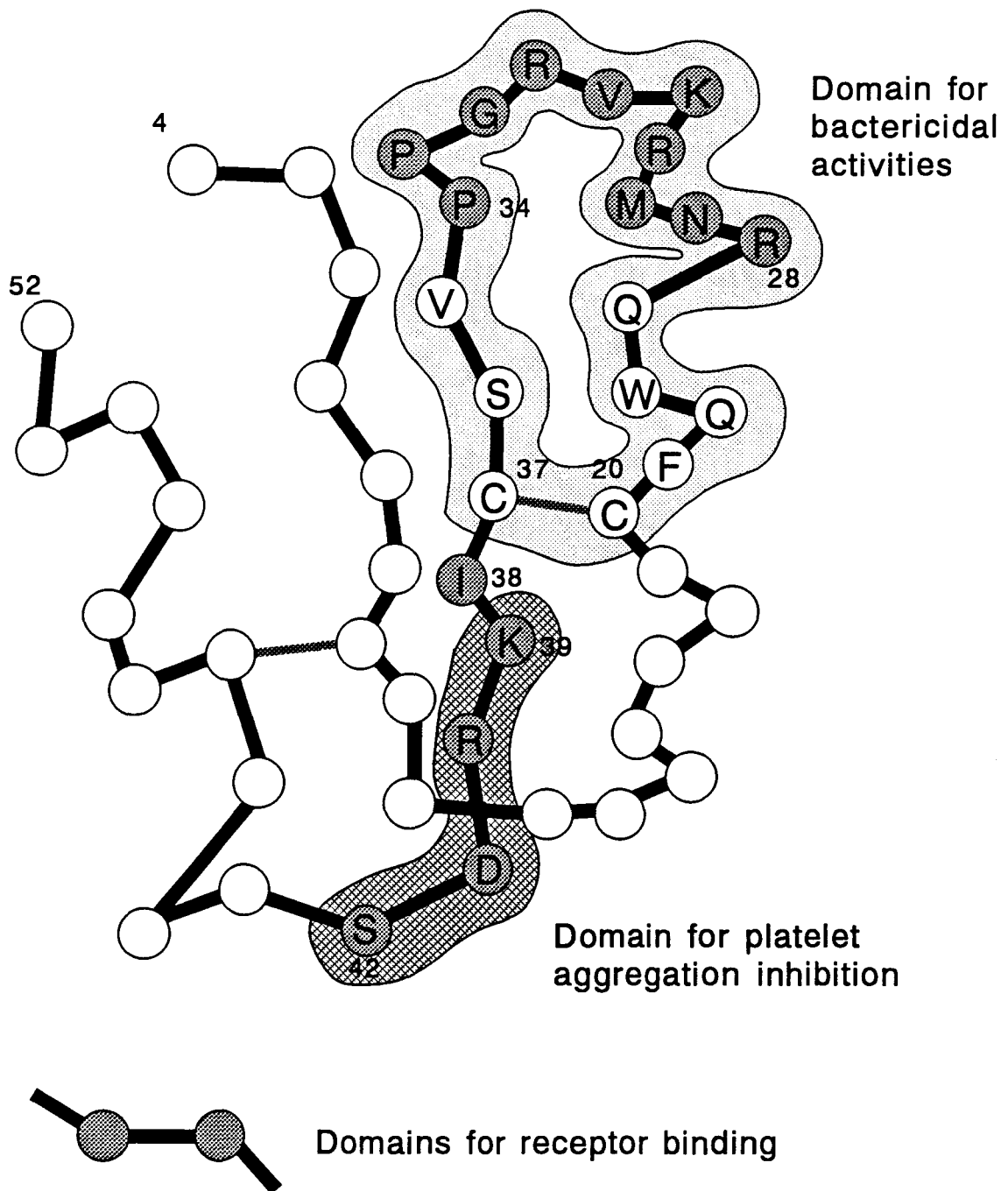
***b) Les domaines responsables des propriétés bactéricides et des propriétés d'inhibition de l'agrégation plaquettaire***

Il est très intéressant de constater que les domaines fixant le récepteur se superposent avec les domaines responsables des propriétés bactéricides et des propriétés d'agrégation plaquettaire décrits respectivement dans les paragraphes I-D-3 et 4 (voir FIG. 4, p. 35). Le premier domaine de fixation du récepteur (résidus 28–34), est inclus dans le domaine des propriétés bactéricides (résidus 20–37), tandis que le deuxième domaine de fixation du récepteur, (résidus 38–42), se superpose avec le térapeptide KRDS, correspondant aux résidus 39–42, qui inhibe l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP. L'implication de ce domaine de la lactotransferrine dans d'autres fonctions biologiques reste encore à élucider.





**FIG. 3** Structure tridimensionnelle du fragment 4-52 (lobe N-terminal) de la lactotransferrine humaine (1), responsable de la fixation de son récepteur: superposition avec le fragment 343-387 (lobe C-terminal) de la lactotransferrine humaine (2) et avec le fragment correspondant du lobe N-terminal de la sérotransferrine humaine (3) (Legrand *et al.*, 1992)



**FIG. 4** Relations structure–fonction de la lactotransferrine humaine : Localisation des domaines fixant le récepteur et des domaines responsables des propriétés bactéricides et des propriétés d'agrégation plaquettaire de la lactotransferrine

## II. Incorporation du fer par les cellules et homéostasie

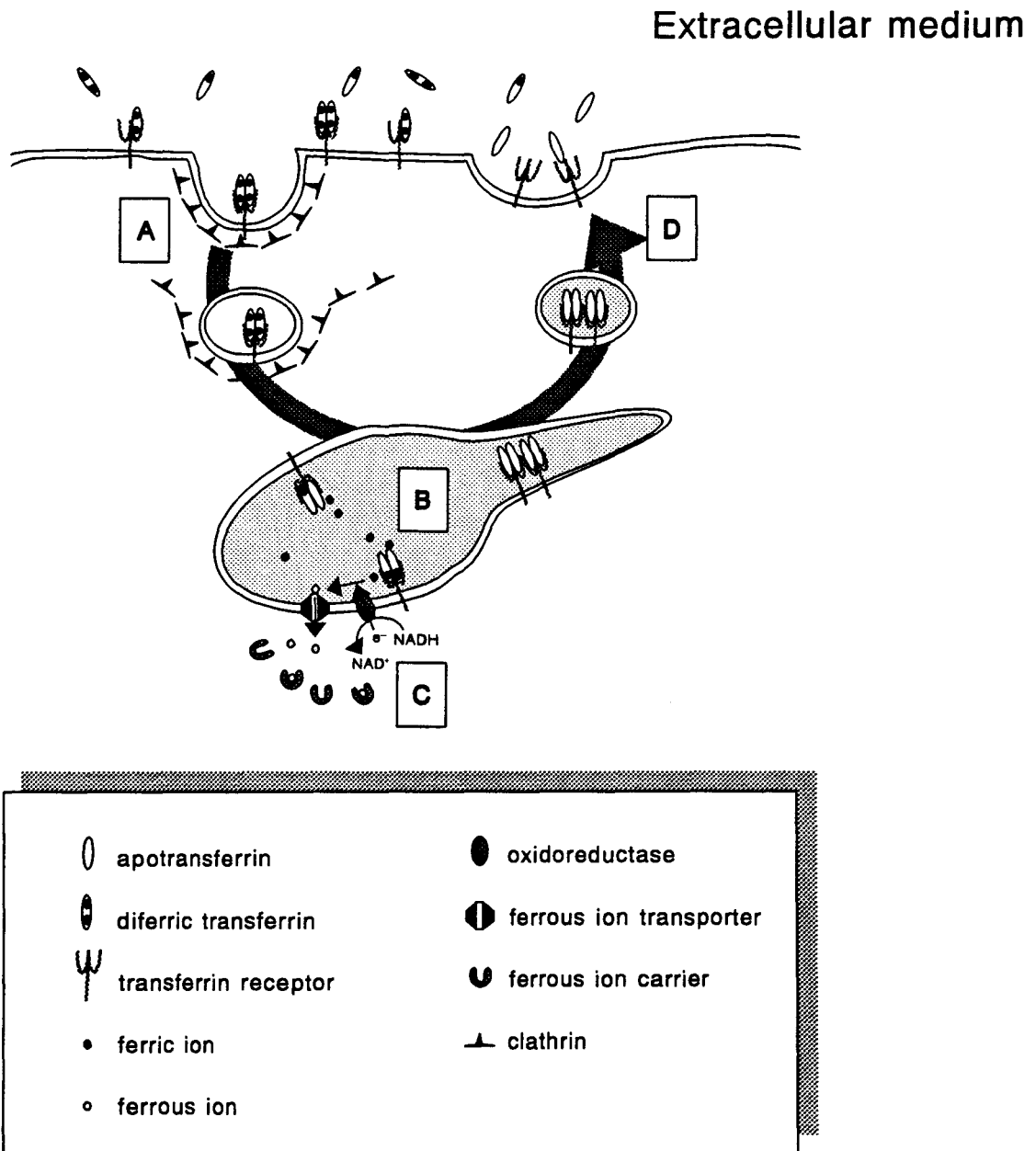
### A. Incorporation du fer à partir de la sérotransferrine

Comme décrit dans le chapitre I, le fer extracellulaire est fixé essentiellement à la sérotransferrine et est échangé entre les différents tissus. Il est bien établi que l'incorporation du fer à partir de la sérotransferrine est réalisée par l'intermédiaire du récepteur spécifique de la sérotransferrine (TfR). Cependant, le modèle d'endocytose par récepteur a été décrit selon des travaux principalement effectués sur des cellules érythrocytaires immatures et sur des lignées cellulaires établies en culture. Il paraît donc peu probable que ce modèle puisse s'appliquer à tous les types cellulaires. En particulier, au niveau des hépatocytes, des mécanismes autres que l'endocytose par récepteur semblent intervenir dans l'incorporation du fer à partir de la sérotransferrine.

#### A-1. Endocytose par le récepteur de la sérotransferrine

Le mécanisme d'incorporation du fer (voir FIG. 5, p. 37) est fondé principalement sur trois faits:

- 1) la sérotransferrine fixe les ions ferriques avec une très forte affinité à pH neutre mais le perd à pH légèrement acide,
- 2) à pH neutre, le TfR fixe les sérotransferrine diferrique, monoferrique et l'aposérotransferrine avec une affinité décroissante,
- 3) à pH acide, le TfR fixe très fortement les sérotransferrine diferrique, monoferrique et l'aposérotransferrine avec une affinité similaire.



**FIG. 5** Incorporation du fer par le mécanisme d'endocytose par l'intermédiaire du récepteur de la sérotransferrine

**a) Internalisation du complexe ligand-récepteur (FIG. 5-A)**

L'incorporation du fer par la cellule débute par la fixation de la sérotransferrine à son récepteur à la surface cellulaire. Le complexe sérotransferrine-TfR est alors concentré dans des puits recouverts ("coated pits") aux membranes tapissées de clathrine. Ces puits se détachent de la surface de la cellule pour former des vésicules recouvertes ("coated vesicle"). Celles-ci perdent alors leur revêtement de clathrine et fusionnent avec des structures vésiculaires plus grandes appelées endosomes primaires ("early endosome") ou CURL ("compartment of uncoupling receptor and ligand"; Geuze *et al.*, 1983).

**b) Effet de l'acidification de l'endosome (FIG. 5-B)**

Le lumen de la vésicule est rapidement acidifié (pH 6,0-6,2) par l'action d'une pompe à proton ATPasique (Mellman *et al.*, 1986). Un triple rôle de ce pH acide a récemment été proposé :

- 1) l'acidification facilite la dissociation du fer de la sérotransferrine,
- 2) la diminution du pH augmente la fixation de l'aposérotransferrine au TfR,
- 3) le pH acide induit une transition conformationnelle du TfR, qui conduit à son agrégation (Turkewitz *et al.*, 1988).

**c) Libération du fer lié à la sérotransferrine (FIG. 5-B)**

Dans l'endosome où la sérotransferrine ne reste que quelques minutes, la libération du fer est assez efficace. Cependant, à un pH légèrement acide *in vitro*, la vitesse de libération spontanée du fer de la sérotransferrine est trop faible pour expliquer le taux élevé de libération du fer observé dans l'endosome. Récemment, des études ont montré que le taux de dissociation du fer était sensiblement augmenté quand la sérotransferrine était liée à son récepteur comparé au taux observé pour la sérotransferrine diferrique libre (Bali *et al.*, 1991; Sipe & Murphy, 1991), suggérant que le TfR pourrait faciliter la dissociation du fer de la sérotransferrine.

***d) Devenir du fer libéré (FIG. 5-C)***

Le fer libéré dans l'endosome est ensuite transporté vers le cytoplasme par des mécanismes encore inconnus, afin d'être incorporé soit dans un hème et par conséquent dans un certain nombre de protéines cytoplasmiques, soit dans la ferritine afin d'y être stocké. Le mécanisme de translocation du fer à travers les membranes des endosomes n'est pas clairement élucidé. Núñez et coll. (1990) ont proposé une participation de la NADH oxydo-réductase associée au TfR. Les ions ferriques sont réduits en ion ferreux par cette oxydo-réductase, puis ces ions traversent la membrane à l'aide d'un transporteur spécifique des ions ferreux.

***e) Recyclage du complexe ligand-récepteur (FIG. 5-D)***

Grâce à l'agrégation du TfR, le complexe aposérotransferrine-TfR peut être dirigé vers les vésicules d'exocytose et ainsi échapper à la dégradation lysosomale. La vésicule d'exocytose fusionne avec la membrane plasmique et le complexe aposérotransferrine-TfR se retrouve exposé au pH neutre extracellulaire ce qui provoque la dissociation du complexe et le récepteur est alors prêt pour un nouveau cycle.

**A-2. Libération réductive du fer**

***a) Rôle dans l'incorporation du fer***

Au niveau de l'hépatocyte, la réduction du fer lié à la sérotransferrine par une NADH oxydo-réductase de la membrane plasmique associée au TfR intervient dans le mécanisme d'incorporation du fer à partir de la sérotransferrine (Thorstensen & Romslo, 1988 & 1990 ; Thorstensen, 1989). Le modèle proposé est décrit dans la FIG. 6 (voir p. 40) :

- 1) la sérotransferrine diferrique se fixe à son récepteur,
- 2) l'ion ferrique est réduit en ion ferreux par la NADH oxydo-réductase associée au TfR,
- 3) les ions ferreux sont incorporés dans les cellules par leurs transporteurs potentiels.

Extracellular

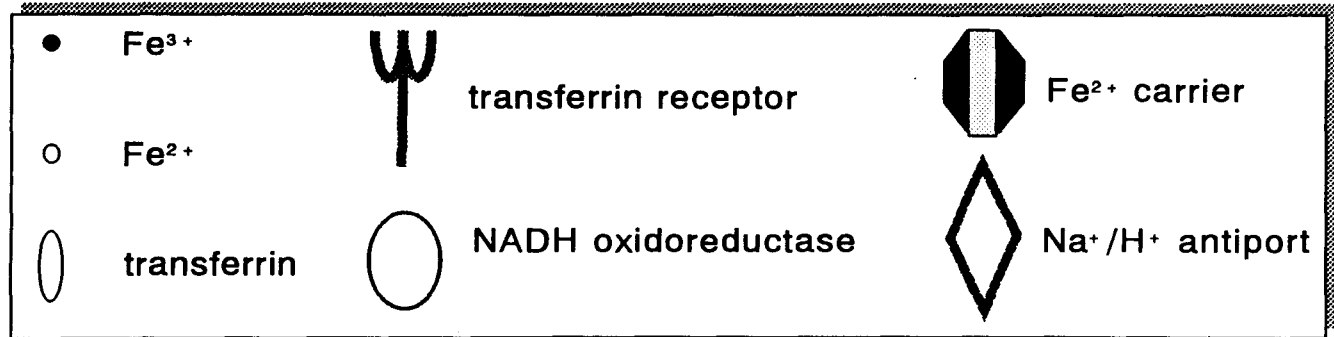
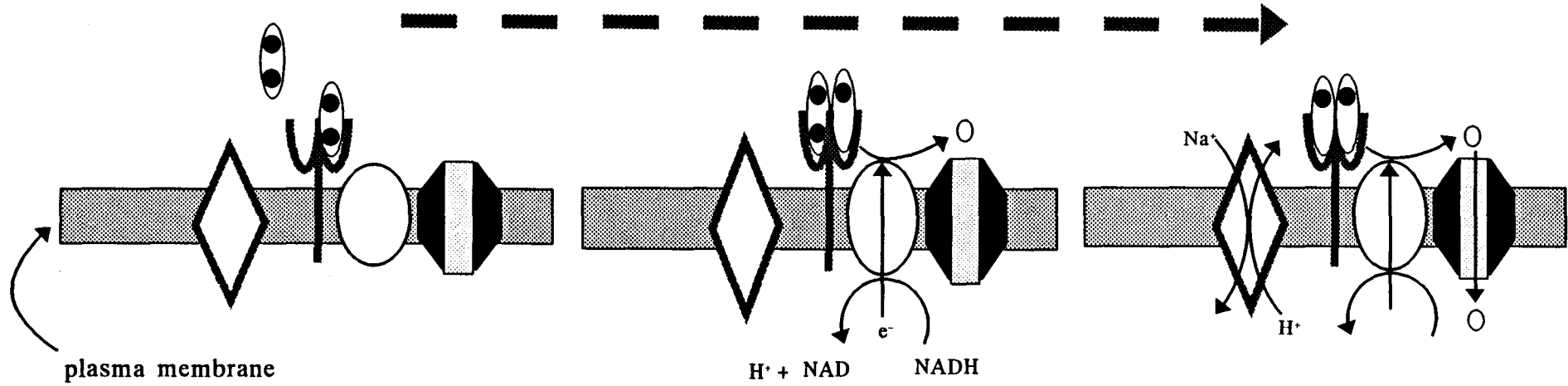


FIG. 6 Incorporation du fer par le mécanisme de libération réductive

### ***b) Rôle dans la stimulation de la croissance cellulaire***

Le système de transport d'électrons à travers la membrane plasmique associé au TfR a été décrit pour la première fois à la surface des cellules HeLa (Löw *et al.*, 1987). La réduction des ions ferriques liés à la sérotransferrine est accompagnée d'une stimulation marquée de l'activité antiport de la pompe Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. De cette stimulation résulte probablement une alcalinisation transitoire du cytoplasme (Sun *et al.*, 1988), qui semble nécessaire à l'initiation de la synthèse d'ADN (Solotoff & Cantley, 1988). Ainsi, la sérotransferrine peut servir d'accepteur d'électrons et déclencher une réaction de prolifération.

## **A-3. Autres mécanismes**

A côté des deux modèles précédents, d'autres sont candidats à l'incorporation du fer à partir de la sérotransferrine dans les hépatocytes.

### ***a) Endocytose non-spécifique***

Il s'agit de l'incorporation du fer lié à la sérotransferrine par endocytose de phase fluide ou adsorptive. Ce modèle est basé sur le fait que l'incorporation du fer par l'hépatocyte augmente proportionnellement avec la concentration en sérotransferrine extracellulaire même si celle-ci est telle que les TfR à la surface cellulaire se trouvent saturés (Page *et al.*, 1984; Holmes & Morgan, 1989).

### ***b) Endocytose par le récepteur d'asialoglycoprotéines***

Cet autre modèle intervient dans les relations entre l'hépatocyte et la cellule endothéliale du foie. Tout d'abord, la sérotransferrine est internalisée dans la cellule endothéliale par endocytose par TfR mais le fer n'est pas dissocié de la sérotransferrine. A la place, la sérotransferrine diferrique est désialylée puis exocytée de la cellule endothéliale. L'asialosérotransferrine diferrique est alors fixée à la surface de l'hépatocyte par le récepteur spécifique des asialoglycoprotéines puis incorporée par endocytose par le récepteur. Le fer est libéré de l'asialo-sérotransferrine qui subit alors soit une dégradation lysosomale, soit une exocytose après avoir été resialylée dans le *trans*-Golgi (Irie *et al.*, 1988; Soda *et al.*, 1989).



## B. Homéostasie cellulaire du fer

L'incorporation du fer par les cellules et sa compartimentation intracellulaire sont deux évènements qui doivent être parfaitement contrôlés afin de maintenir l'homéostasie cellulaire du fer. Pendant les dix dernières années, de nombreuses études ont révélé comment les cellules organisent l'acquisition du fer, son stockage intracellulaire dans la ferritine et son utilisation dans les processus de biosynthèse.

### B-1. Régulation de la biosynthèse du TfR et de la ferritine

#### a) Expression du TfR

L'échange du fer entre les différents tissus est principalement effectué par la sérotransferrine saturée en fer et la fixation à son récepteur spécifique à la surface cellulaire. Comme décrit précédemment, la synthèse de la sérotransferrine semble être régulée en réponse à un certain taux de fer. Cependant, dans les conditions physiologiques, la concentration de sérotransferrine diférique (environ  $10 \mu\text{M}$ ) est au moins 100 fois plus élevée que la constante de dissociation du complexe sérotransferrine-TfR (1–10 nM). Ainsi, l'incorporation du fer par la cellule est sans doute essentiellement régulée par le niveau d'expression du TfR.

#### *Expression de TfR dans les cellules prolifératives et non-prolifératives*

De nombreuses études ont montré que l'expression du TfR était en étroite corrélation avec la prolifération cellulaire de la plupart des types de cellules (Larrick & Cresswell, 1979 ; Galbraith *et al.*, 1980). Cette corrélation résulte principalement de la nécessité de la présence de fer pour la synthèse des protéines contenant du fer, en particulier la ribonucléotide-réductase, indispensable à la prolifération cellulaire (Kühn *et al.*, 1990). De plus, comme décrit dans le paragraphe précédent, le système de transport transmembranaire d'électrons associé au TfR, où la sérotransferrine joue le rôle d'accepteur d'électrons, est aussi impliqué dans la croissance cellulaire. Toutefois, une forte expression de TfR a lieu également dans un certain nombre de cellules non prolifératives telles les cellules érythroïdes matures (Iacopetta

*et al.*, 1982), les hépatocytes (Young & Aisen, 1981), les cellules de Sertoli (Morales & Clermont, 1986) et les cellules trophoblastiques du placenta (Seligman *et al.*, 1979 ; Wada *et al.*, 1979). Ces cellules non prolifératives ont besoin d'une forte teneur en fer pour synthétiser leur hème ou à des fins de transports spécialisés de fer. Qu'il s'agisse de cellules prolifératives ou non, dans les deux cas, l'exigence d'une quantité importante de fer se traduit par un taux d'expression élevé du TfR.

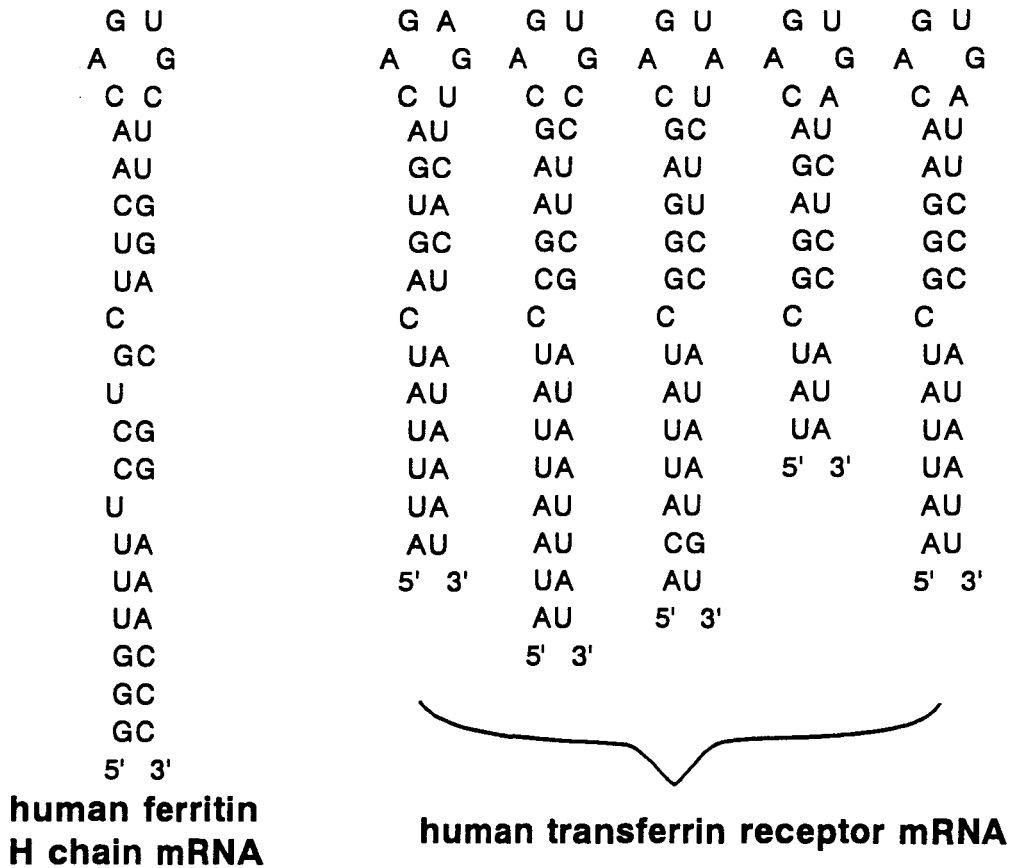
### *Expression fer-dépendante*

De récentes recherches approfondies ont révélé que l'expression du TfR est régulée de façon post-transcriptionnelle en réponse à une variation du taux de fer intracellulaire. Tout d'abord, il a été montré que la quantité de fer disponible dans les cellules est régulée par le niveau de biosynthèse du TfR. En effet, la chélation du fer intracellulaire par la desferrioxamine ou l'acide picolinique augmente au moins 3 fois l'expression du TfR (Louache *et al.*, 1984; Bridges & Cudkowicz, 1984; Mattia *et al.*, 1984; Testa *et al.*, 1985; Bottomley *et al.*, 1985), tandis que l'addition d'hémine ou de sels de fer réduit cette expression (Ward *et al.*, 1982 & 1984; Louache *et al.*, 1984). Ensuite, cette régulation fer-dépendante a été mise en évidence dans le cytosol et consiste principalement à changer la stabilité de l'ARNm du TfR (Rao *et al.*, 1986; Owen & Kühn, 1987). La présence d'une région 3' non traduite de l'ARNm est nécessaire à cette régulation. Cette région contient cinq éléments de séquence/structure en "stem-loop" très semblables (Müllner & Kühn, 1988; Casey *et al.*, 1988a, b). Chacun de ces éléments est similaire à celui trouvé précédemment dans la région 5' non traduite de l'ARNm de la ferritine, appelé élément sensible au fer ("iron responsive element" ou IRE; voir Fig. 7, p. 44).

### *b) Expression de la ferritine*

Après que les cellules aient incorporé le fer par l'intermédiaire du complexe sérotransferrine-TfR, elles doivent coordonner son stockage et son utilisation. L'expression de la ferritine, principale protéine de stockage du fer, est également régulée par les changements de disponibilité en fer dans la cellule. La régulation positive de la biosynthèse de la ferritine

## Examples of IREs



## Consensus IRE

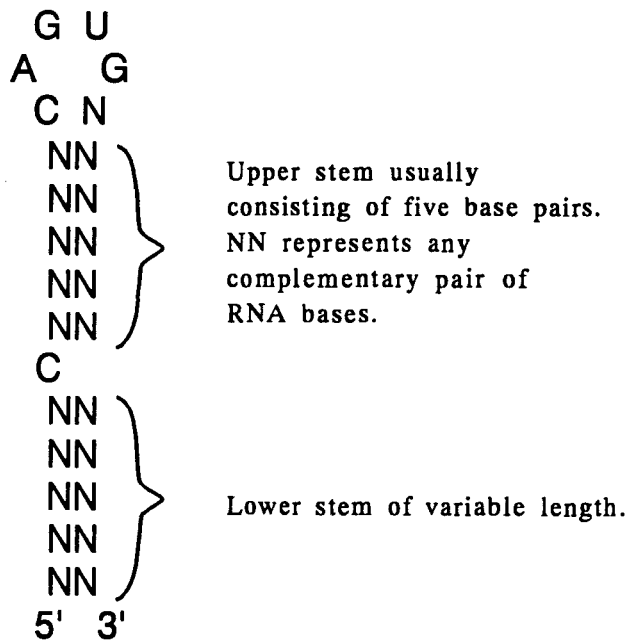


FIG. 7 Les structures proposées et les séquences des IRE

en réponse au taux de fer, se produit sans changements de taux d'ARNm cytoplasmique (Zähringer *et al.*, 1976; Walden & Thach, 1986; Rogers & Munro, 1987). Dans la région 5' non traduite de cet ARNm se trouve une région responsable de cette régulation traductionnelle fer-dépendante (Hentze *et al.*, 1987b; Caughman *et al.*, 1988). Cette région essentielle de 28 nucléotides qui semblent former une structure secondaire en "stem-loop", a été appelée élément sensible au fer ("iron responsive element" ou IRE; voir Fig. 7, p. 44; Aziz & Munro, 1987; Hentze *et al.*, 1987a).

## **B-2. Coordination de la biosynthèse des protéines intervenant dans le métabolisme du fer**

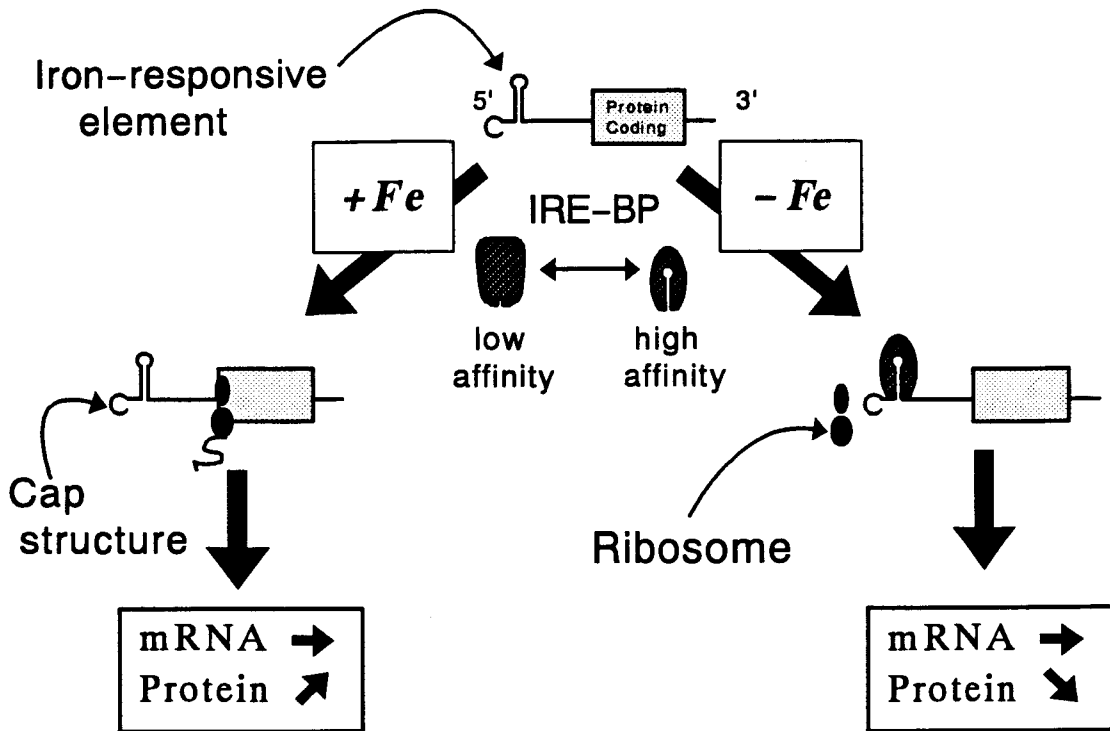
Comme décrit précédemment, les expressions du TfR et de la ferritine sont régulées respectivement négativement et positivement en réponse au taux de fer intracellulaire. De plus, des éléments très semblables de structure/séquence en "stem-loop" (IRE) sont responsables de cette régulation d'expression par le fer. Un élément est situé dans la région 5' non traduite de l'ARNm de la ferritine et cinq éléments se trouvent dans la région 3' non traduite de l'ARNm du TfR. Il est maintenant bien établi que la fixation de la même protéine cytosolique sur ces IRE intervient dans la régulation post-transcriptionnelle fer-dépendante de la biosynthèse du TfR et de la ferritine ainsi que de l'acide 5-aminolévulinique synthase de l'érythroïde (revues par Klausner & Harford, 1989; Theil, 1990; Harford & Klausner, 1990; Eisenstein & Munro, 1990; Kühn, 1991; Kühn & Hentze, 1992; Rouault *et al.*, 1992).

### ***a) Fixation fer-dépendante d'une protéine cytosolique sur les IRE (voir FIG. 8, p. 46)***

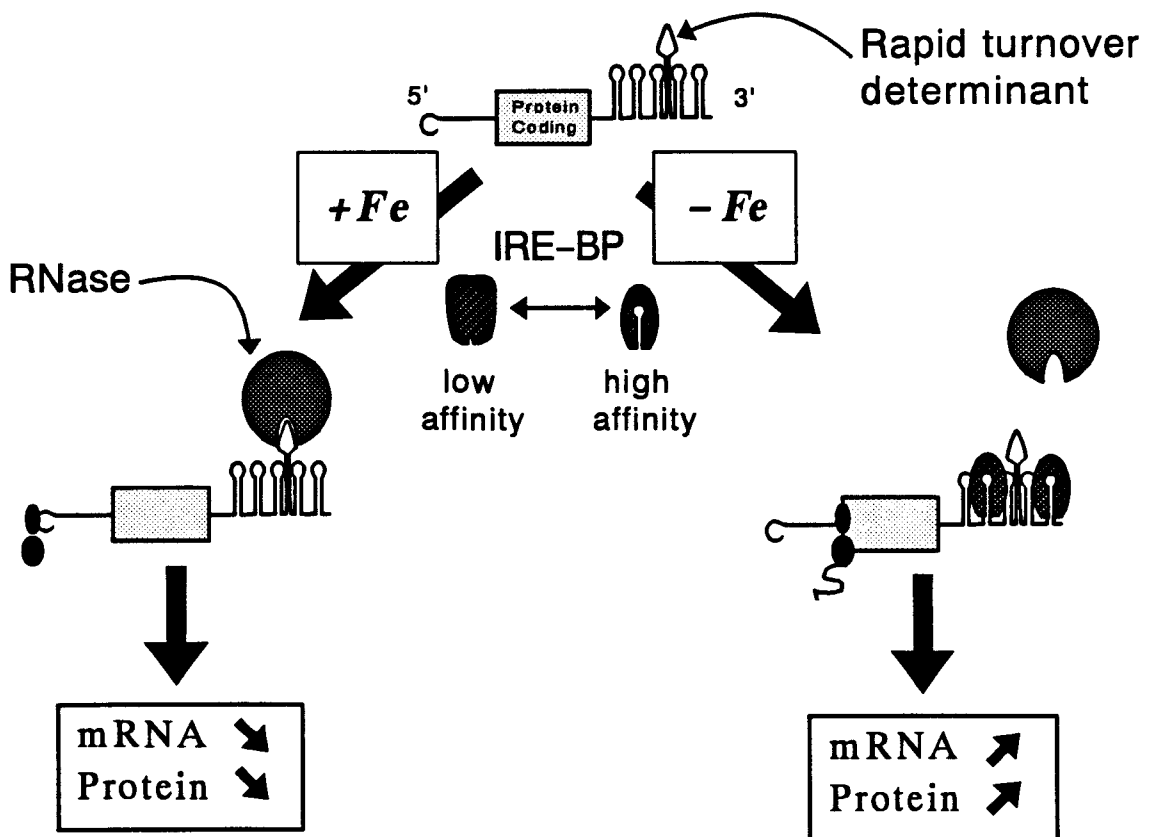
#### ***Régulation traductionnelle de l'expression de ferritine***

Tout d'abord, des études ont mis en évidence la fixation d'une protéine cytosolique de 90 kDa sur l'IRE de la ferritine (Leibold & Munro, 1988; Walden *et al.*, 1988). Cette protéine se fixant sur l'IRE (IRE-BP) aussi appelée protéine répresseur de ferritine, modifie son affinité pour l'IRE en fonction du taux de fer intracellulaire (Rouault *et al.*, 1988) et cette fixation réprime la traduction de l'ARNm de la ferritine (Brown *et al.*, 1989). De plus, la

## Ferritin & erythroid ALAS mRNA



## Transferrin receptor mRNA



**FIG. 8** Régulation fer dépendante de l'expression de la ferritine, l'ALAS (acide 5-aminolévulinique synthase) et du récepteur de la sérotransferrine par l'IRE-BP ("iron-responsive element-binding protein")

capacité de l'IRE à servir d'élément *cis*-régulateur de la traduction est strictement dépendante de la position de l'IRE dans la région 5' non traduite, c'est-à-dire à proximité de la structure 5' "cap" ou coiffe (Goossen *et al.*, 1990; Goossen & Hentze, 1992). Ces résultats indiquent que la formation fer-dépendante du complexe IRE/IRE-BP inhibe la fixation sur l'ARNm de protéines spécifiques de la structure "cap", fixation indispensable à l'initiation de la traduction dans les cellules eucaryotes (Goossen *et al.*, 1990).

#### *Régulation post-transcriptionnelle de l'expression du TfR*

Ensuite, d'autres études ont montré qu'une protéine cytosolique se fixait à au moins deux des cinq IRE dans la région 5' non traduite de l'ARNm du TfR. De plus, ces IRE du TfR entrent en compétition avec l'IRE de la ferritine pour fixer cette protéine, ce qui signifie qu'il s'agit de la même protéine dans les deux cas (Koeller *et al.*, 1989). La fixation de l'IRE-BP sur les IRE dépend aussi du taux de fer intracellulaire et elle augmente le taux d'ARNm du TfR ainsi que son expression (Casey *et al.*, 1989; Müllner *et al.*, 1989). En outre, certaines délétions au niveau de la région régulatrice qui n'affectent pas l'interaction IRE/IRE-BP *in vitro*, conduisent à un ARNm stable et à des niveaux d'expression du TfR relativement hauts. Ces résultats suggèrent que la fixation de l'IRE-BP sur les IRE protègerait l'ARNm du TfR de rapides dégradations provoquées par une région déterminant le "turn-over" rapide, située à l'intérieur de la région régulatrice.

#### *Régulation traductionnelle de l'expression de l'acide 5-aminolévulinique synthase*

Récemment une séquence d'ARN très proche de celle de l'IRE de la ferritine a été trouvée dans la région 5' non traduite de l'ARNm de l'acide 5-aminolévulinique synthase (ALAS) de l'érythroïde mais elle n'a pas été trouvée au niveau de l'ARNm de l'ALAS ubiquitaire ("housekeeping") (May *et al.*, 1990). Cet enzyme est probablement un enzyme limitant de la voie de biosynthèse de l'hème dans l'érythroïde, où une grande quantité d'hème et de sous-unités de globine sont synthétisées pour s'assembler en hémoglobine. Ce motif dans l'ARNm de l'ALAS de l'érythroïde est également spécifiquement reconnu par l'IRE-BP (Cox *et al.*, 1991; Dandekar *et al.*, 1991) et semble intervenir dans la régulation fer-dépendante de la traduction de l'ALAS de l'érythroïde (Dandekar *et al.*, 1991).

### ***b) La protéine fixant l'IRE ou IRE-BP***

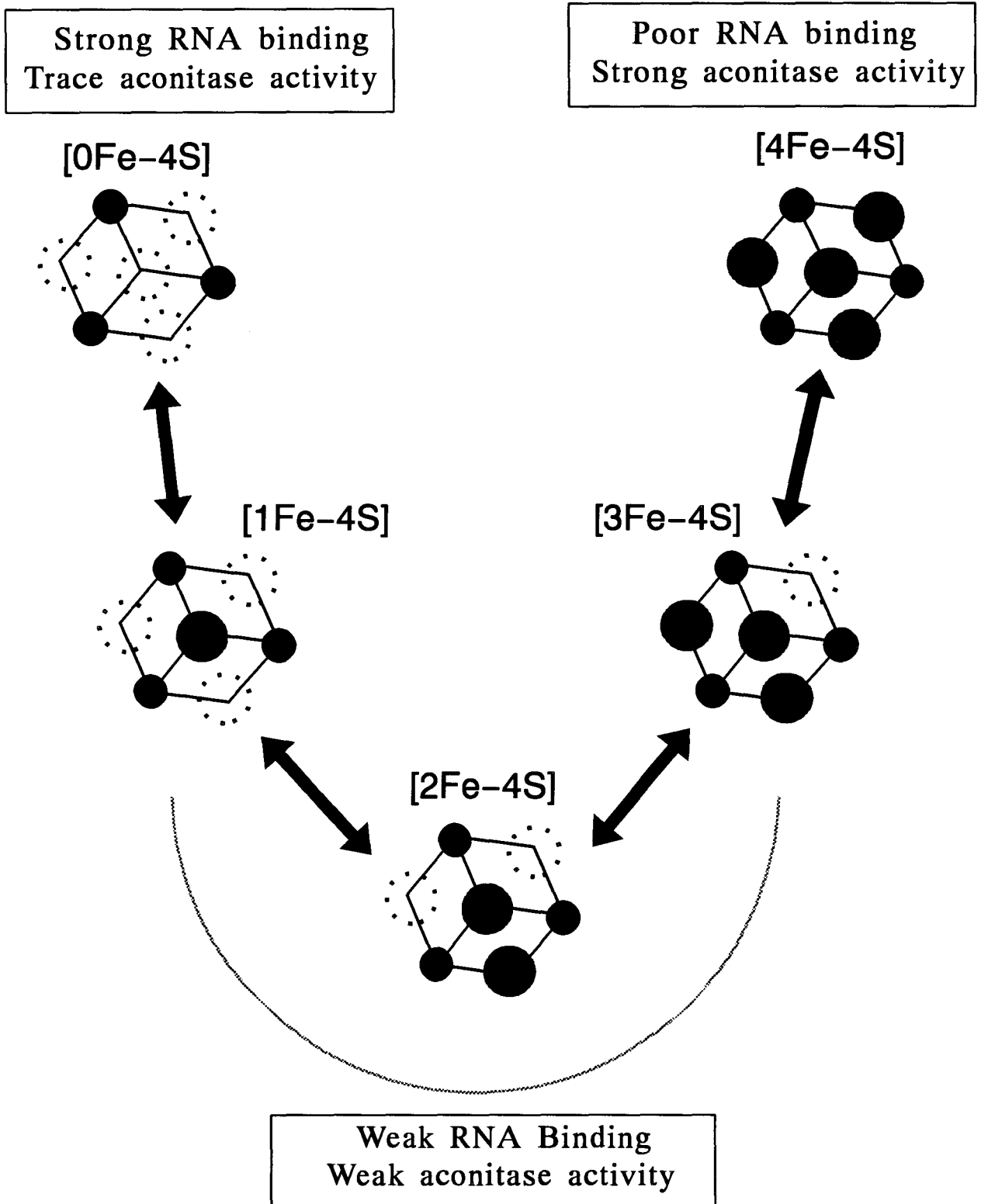
Cette protéine joue un rôle central dans la régulation fer-dépendante de la biosynthèse des protéines essentielles dans le métabolisme du fer cellulaire. De récentes études ont révélé que l'IRE-BP est une aconitase cytosolique dont le "cluster" Fer-Soufre sert de détecteur du taux de fer cellulaire (voir FIG. 9, p. 49).

#### *Fonction de détection du taux de fer*

Il est bien établi que la fixation de l'IRE-BP sur les IRE varie en fonction du taux de fer tandis que la quantité d'IRE-BP est indépendante de ce taux. Dans le cas de carence en fer, l'IRE-BP présente une haute affinité pour l'IRE ( $K_d \approx 10$  pM) alors qu'elle présente une faible affinité pour l'IRE ( $K_d \approx 5$  nM) lors d'une surcharge en fer (Rouault *et al.*, 1988; Haile *et al.*, 1989). L'activité de fixation est complètement rétablie par un traitement *in vitro* avec des concentrations élevées en agents réducteurs tels le  $\beta$ -mercaptoéthanol et le dithiothréitol (Hentze *et al.*, 1989; Haile *et al.*, 1989; Barton *et al.*, 1990).

#### *Activité aconitase et mécanisme de détection du taux de fer*

L'IRE-BP a été purifiée à partir du placenta humain (Neupert *et al.*, 1990), du foie humain (Rouault *et al.*, 1989), du foie de Lapin (Walden *et al.*, 1989) et de Rat (Yu *et al.*, 1992). Des séquences d'ADNc de Souris, de Rat et d'ADNc humain codant pour l'IRE-BP ont été clonées (Kaptain *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1992; Rouault *et al.*, 1990). Une remarquable similarité a été observée entre la séquence d'IRE-BP et la séquence de l'aconitase mitochondriale (Hentze & Argos, 1991; Rouault *et al.*, 1991). Comme décrit dans le paragraphe I-1-1, l'aconitase est un enzyme mitochondrial du cycle de Krebs et a déjà été purifié, cloné à partir de la Levure (Gangloff *et al.*, 1990), du coeur de Porcin (Zengh *et al.*, 1990), d'*E. Coli* (Prodromou *et al.*, 1992) et cristallisé (coeur de Porc: Robbins & Stouts, 1989; coeur de Porcin: Lauble *et al.*, 1992). Cet enzyme contient un "cluster" Fer-Soufre et la conversion [4Fe-4S] en [3Fe-4S] supprime son activité. En particulier, les résidus des sites de coordination du "cluster" et ceux du site fonctionnel sont identiques dans l'IRE-BP et l'aconitase ce qui suggère que l'IRE-BP posséderait un "cluster" Fer-Soufre et une activité



**FIG. 9** Activité aconitase / activité de fixation de l'ARNm de l'IRE-BP ("iron-responsive element-binding protein") en fonction de l'état du "cluster" Fer-Soufre



aconitase (Hentze & Argos, 1991; Rouault *et al.*, 1991). En fait, il est prouvé que l'IRE-BP possède une activité aconitase (Kaptain *et al.*, 1991), qui est modulée en réponse au taux de fer intracellulaire (Constable *et al.*, 1992; Haile *et al.*, 1992b). Plus récemment, il a été confirmé que l'IRE-BP est identique à l'aconitase cytosolique (Kennedy *et al.*, 1992; Zheng *et al.*, 1992). De plus, il a été montré que la perte du quatrième fer labile du "cluster" Fer-Soufre résulte de la perte de l'activité aconitase, mais qu'une alteration plus importante du "cluster", tel le désassemblage du "cluster" cubique, est nécessaire à l'acquisition de la capacité à fixer l'IRE avec une forte affinité (FIG. 10, p. 51; Haile *et al.*, 1992a). Lors d'une surcharge en fer, l'IRE-BP est une aconitase pleinement active qui se fixe faiblement aux IRE. A l'inverse, la carence en fer produit une IRE-BP sans activité aconitase mais qui se fixe aux IRE avec une forte affinité. La relation entre le métabolisme cellulaire du fer et le métabolisme du citrate cytosolique reste à élucider.

### **B-3. Résumé de la régulation de l'homéostasie cellulaire**

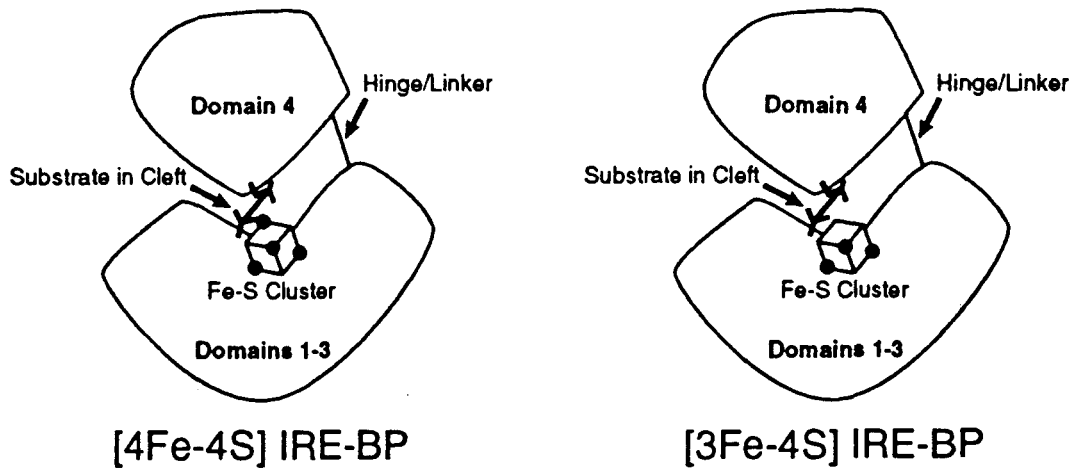
Comme résumé dans la FIG. 11 (voir p. 52), l'incorporation du fer par la cellule, son stockage intracellulaire et la synthèse de l'hème dans l'érythroïde sont coordonnés par le taux de fer à l'aide de la fonction régulatrice d'une protéine cytosolique : l'IRE-BP.

#### ***a) Homéostasie cellulaire du fer***

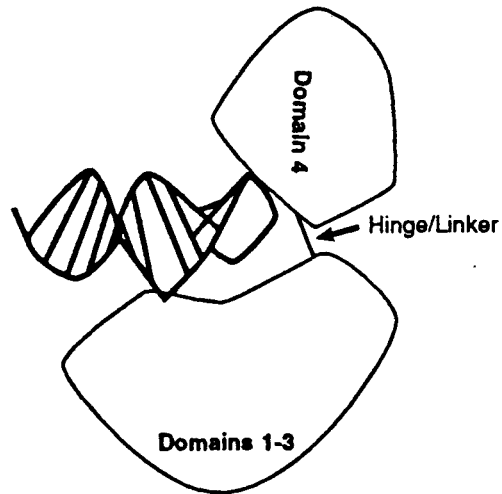
Lors d'une surcharge en fer, le "cluster" Fer-Soufre de l'IRE-BP se trouve saturé en fer c'est-à-dire sous la forme [4Fe-4S] en raison du taux élevé de fer intracellulaire. Dans cet état, l'IRE-BP ne fixe pas les IRE situés dans les régions respectives 5' et 3' non traduites des ARNm de la ferritine et du TfR. La traduction de la ferritine est réalisée de façon très efficace ce qui permet à la cellule d'éviter la toxicité potentielle de cet excès de fer en le stockant dans la molécule de ferritine. En revanche, le TfR est peu traduit du fait de la dégradation rapide de son ARNm ce qui conduit à une diminution de l'incorporation du fer par la cellule.

Inversement, lors d'une carence en fer, l'IRE-BP perd les atomes de fer de son "cluster" et se fixe alors avec une forte affinité aux IRE. Cette fixation dans la région 3' non

## Forms of the IRE-BP that Do Not Bind RNA

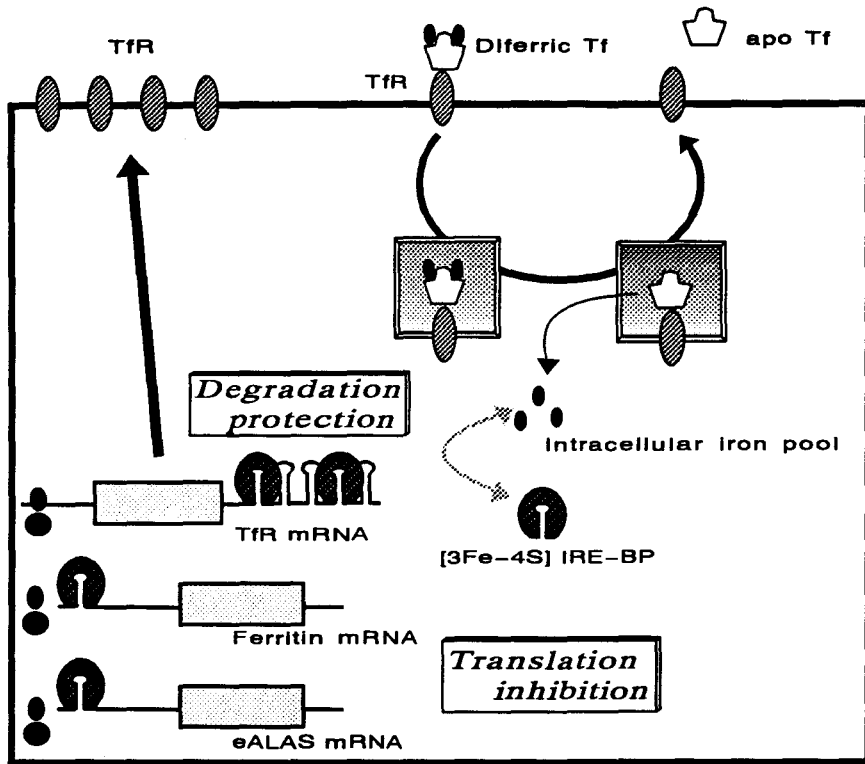


## Cluster Disassembly & Loss of Substrate Results in Conformational Change

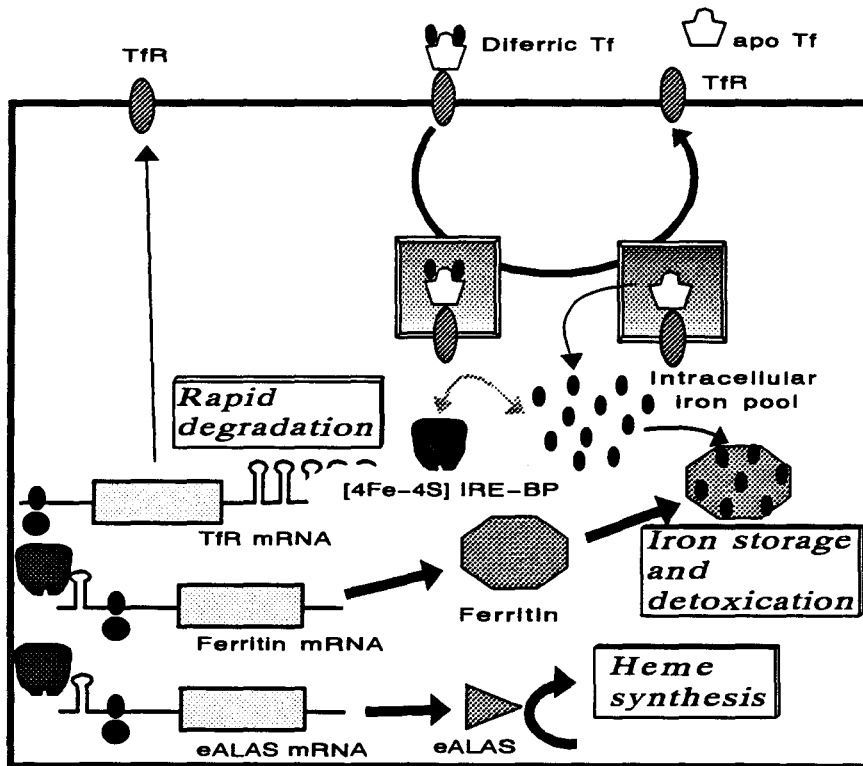


IRE-BP Binding RNA

**FIG. 10** Les activités de l'IRE-BP sont régulées par des changements conformationnels dus aux modifications de son "cluster" (Klausner *et al.*, 1993)



### Iron starvation



### Iron repletion

FIG. 11 Coordination du métabolisme cellulaire du fer par régulation post-transcriptionnelle

traduite de l'ARNm du TfR induit une forte expression de celui-ci à la surface cellulaire. Simultanément, la fixation de l'IRE-BP à l'IRE de la région 5' non traduite de l'ARNm de la ferritine inhibe sa traduction par blocage de l'extrémité 5' "cap". En conséquence, les cellules peuvent incorporer plus de fer et son stockage est diminué afin de maintenir la fonction cellulaire normale.

***b) Implication dans le métabolisme tissulaire du fer***

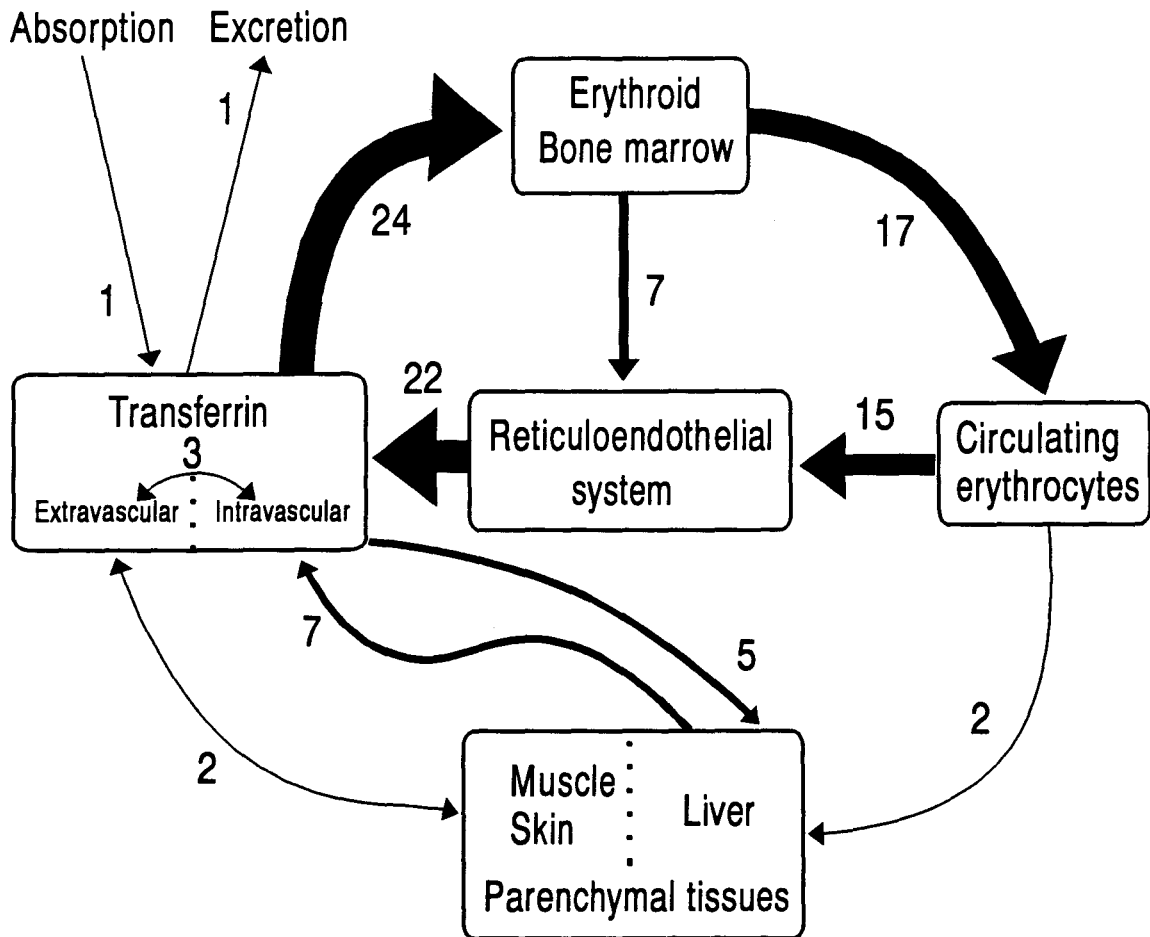
Il devient possible que la fonction régulatrice de l'IRE-BP pour l'homéostasie ne soit pas seulement impliquée au niveau cellulaire mais aussi au niveau systémique, c'est-à-dire entre les tissus. De récentes études indiquent que la biosynthèse de l'acide 5-aminolévulinique synthase (ALAS) spécifique des cellules érythroïdes et probablement l'enzyme limitant de la biosynthèse de l'hème, soit également régulée négativement par l'IRE-BP de la même façon que la ferritine. Il est bien connu qu'environ 80% de fer circulant (fixé à la sérotransferrine) est intégré dans l'hème, lui-même servant à synthétiser une nouvelle hémoglobine et que les 20% environ restant sont disponibles pour les besoins des autres tissus. C'est pourquoi l'IRE-BP semble probablement réguler le taux de biosynthèse de l'hème dans les érythroïdes qui est lui-même un facteur majeur influençant la disponibilité du fer pour les autres tissus.

### III. Absorption intestinale du fer

Le corps d'un adulte moyen (environ 70 kg) contient 3 à 4 g de fer. La plupart de ce fer se trouve au niveau des globules rouges dans l'hémoglobine (environ 2 g) et dans les tissus de stockage comme le foie et la rate au niveau de la ferritine et de l'hémosidérine (0,7–0,8 g). Comme décrit dans la FIG. 12 (voir p. 55), il existe un remarquable échange interne de fer entre les différents compartiments du corps. Cet échange est principalement lié à la destruction et au remplacement des érythrocytes (Bothwell *et al.*, 1979). La perte du fer représente seulement une petite partie du fer total (environ 1 mg) du fait du manque de capacité d'excrétion importante du fer. Cette perte est due aux sécrétions biliaires ainsi qu'au renouvellement de l'épithélium et du tractus gastrointestinal, aux saignements, etc.... Chez la Femme, 30 à 60 mg de fer sont perdus au cours de la menstruation et environ 500 mg pour chaque grossesse. L'absorption intestinale du fer est le processus clé pour maintenir l'équilibre du fer dans l'organisme. Il y a une relation inverse entre la réserve de fer et son absorption intestinale : une petite réserve va induire une forte absorption et réciproquement. Le taux d'érythropoïèse est aussi le déterminant principal de cette absorption (Bothwell *et al.*, 1979). En fait, l'absorption intestinale journalière de fer chez un adulte représente environ 1 mg alors que l'apport alimentaire varie de 12 à 18 mg/jour pour la plupart des adultes. Cela signifie que l'absorption intestinale du fer est étroitement régulée et compense exactement la quantité de fer excrétée et les autres besoins en fer de l'organisme.

#### A. Morphologie de la muqueuse intestinale.

Avant d'aborder la discussion sur l'absorption intestinale, nous aimerions donner un aperçu de la structure de la muqueuse intestinale afin de bien comprendre le mécanisme de l'absorption du fer. Ce sujet a été entièrement examiné dans la revue générale de Madara et Trier (1987).



**FIG. 12** Echanges internes de fer (en mg/jour) entre les différents compartiments du corps d'un adulte de 70 kg (Bothwell *et al.*, 1979)

La surface luminale de l'intestin grêle est organisée de façon à ce que la surface de contact avec le contenu intestinal soit considérablement amplifiée. Des plis concentriques circulaires ou en spirale, appelés *plicae circulares*, contribuent à cette amplification de surface. Il s'agit de plis de 1 cm de hauteur et 5 cm de largeur chez l'Homme. De plus, de nombreuses villosités microscopiques (de 0,5–0,8 mm de hauteur dans le duodénum et le jejunum humains) augmentent la surface d'absorption de 7 à 14 fois. La FIG. 13 (voir p. 57) présente le schéma de la muqueuse intestinale qui peut être divisée en trois couches distinctes: la *muscularis mucosa*, la *lamina propria* et l'épithélium.

### **A-1. La *muscularis mucosa***

La *muscularis mucosa* est la couche la plus profonde, une fine couche continue de muscle lisse, de 3 à 10 cellules d'épaisseur, qui sépare la muqueuse de la sous-muqueuse. La *muscularis mucosa* pourrait faciliter le mouvement des villosités et vider le contenu luminal de l'épithélium cryptique.

### **A-2. La *lamina propria***

La *lamina propria* est la couche du milieu, un espace de tissu conjonctif. Elle est constituée de vaisseaux sanguins et lymphatiques, de cellules musculaires lisses, de fibroblastes, de cellules plasmatiques, de lymphocytes, macrophages, cellules éosinophiles et mastocytes. La *lamina propria* possède un certain nombre de fonctions importantes:

- 1) elle constitue un excellent support de l'épithélium et ses vaisseaux sanguins nourrissent l'épithélium.
- 2) Ses chaînes vasculaires lymphatiques et sanguines sont un moyen de transport des substances absorbées par l'épithélium.
- 3) Ses cellules plasmatiques, constituées d'une population variée de lymphocytes et macrophages, présentent des fonctions immunologiques importantes.

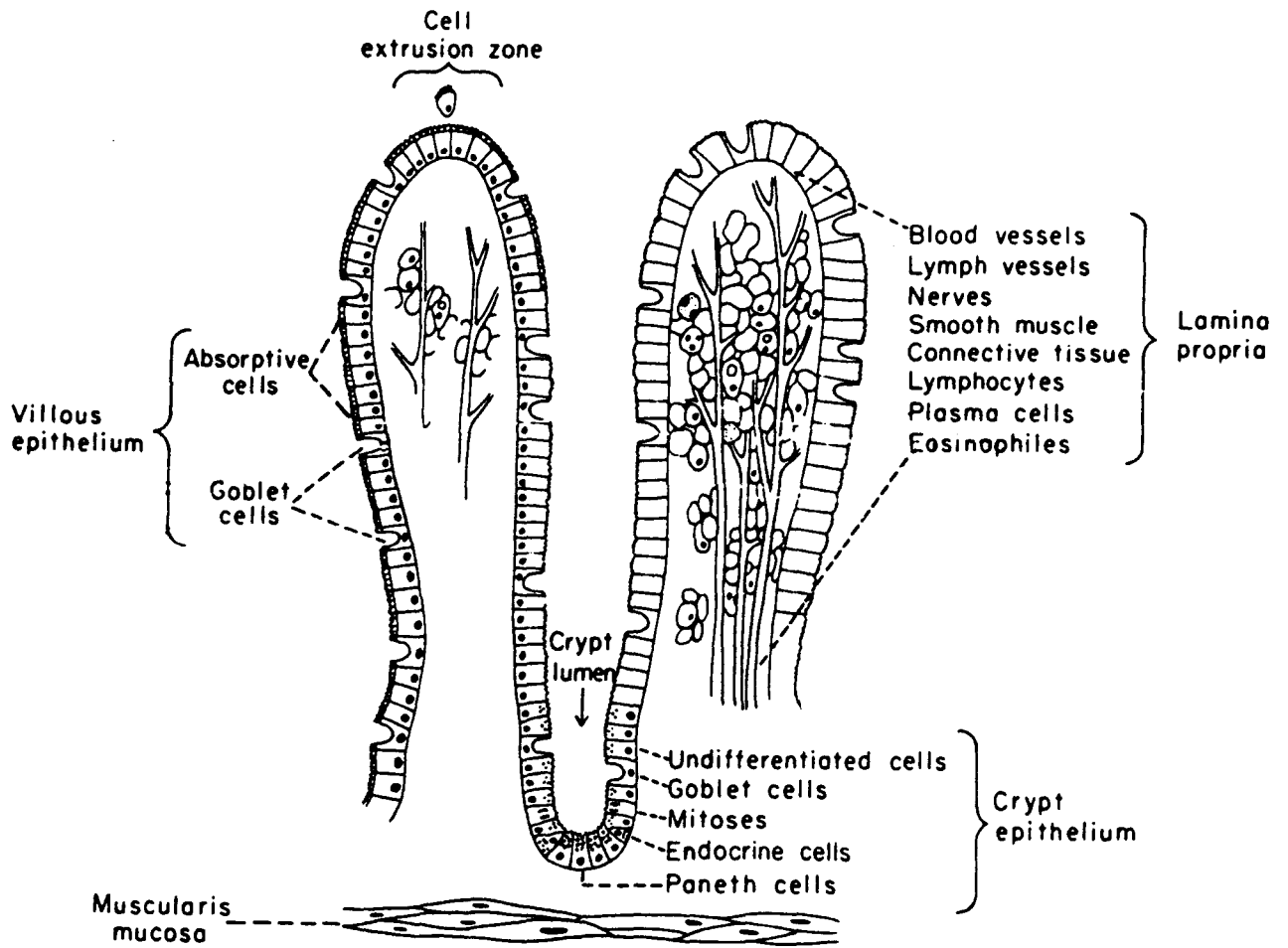


FIG. 13 Représentation schématique de l'organisation histologique de la muqueuse de l'intestin grêle (Madara & Trier, 1987)



### A-3. L'épithélium

L'épithélium est la troisième couche de la muqueuse intestinale, et est en contact direct avec le contenu luminal. Il s'agit d'un feuillet continu de cellules épithéliales, d'une cellule d'épaisseur, constitué de villosités et d'épithélium cryptique.

#### a) L'épithélium cryptique

L'épithélium cryptique est formé par différents types cellulaires comprenant les cellules non différenciées qui prolifèrent constamment, les cellules caliciformes sécrétant du mucus, une variété de cellules épithéliales endocrines différentes, et les cellules de Paneth. Les fonctions principales de l'épithélium cryptique sont les suivantes:

- 1) le renouvellement de l'épithélium par les cellules non différenciées,
- 2) les sécrétions exocrines, dans la lumière de l'épithélium cryptique, par les cellules caliciformes, indifférenciées et les cellules de Paneth,
- 3) les sécrétions d'eau et d'électrolytes par les cellules non différenciées,
- 4) les sécrétions endocrines dans la *lamina propria* et dans la lumière de l'épithélium cryptique.

#### b) Les villosités

Les villosités formées par l'épithélium contiennent un grand nombre de cellules absorbatives (appelées aussi entérocytes), des cellules caliciformes sécrétant du mucus et quelques cellules épithéliales endocrines. De plus, des cellules M, cellules épithéliales spécialisées, sont situées à l'apex des plaques de Peyer dans l'ileum. La fonction majeure de ces villosités est l'absorption des nutriments par les entérocytes.

#### c) Les entérocytes

L'entérocyte est une cellule en forme de colonne fortement polarisée dont la principale fonction est l'absorption des nutriments. La FIG. 14 (voir p. 59) représente schématiquement un entérocyte.

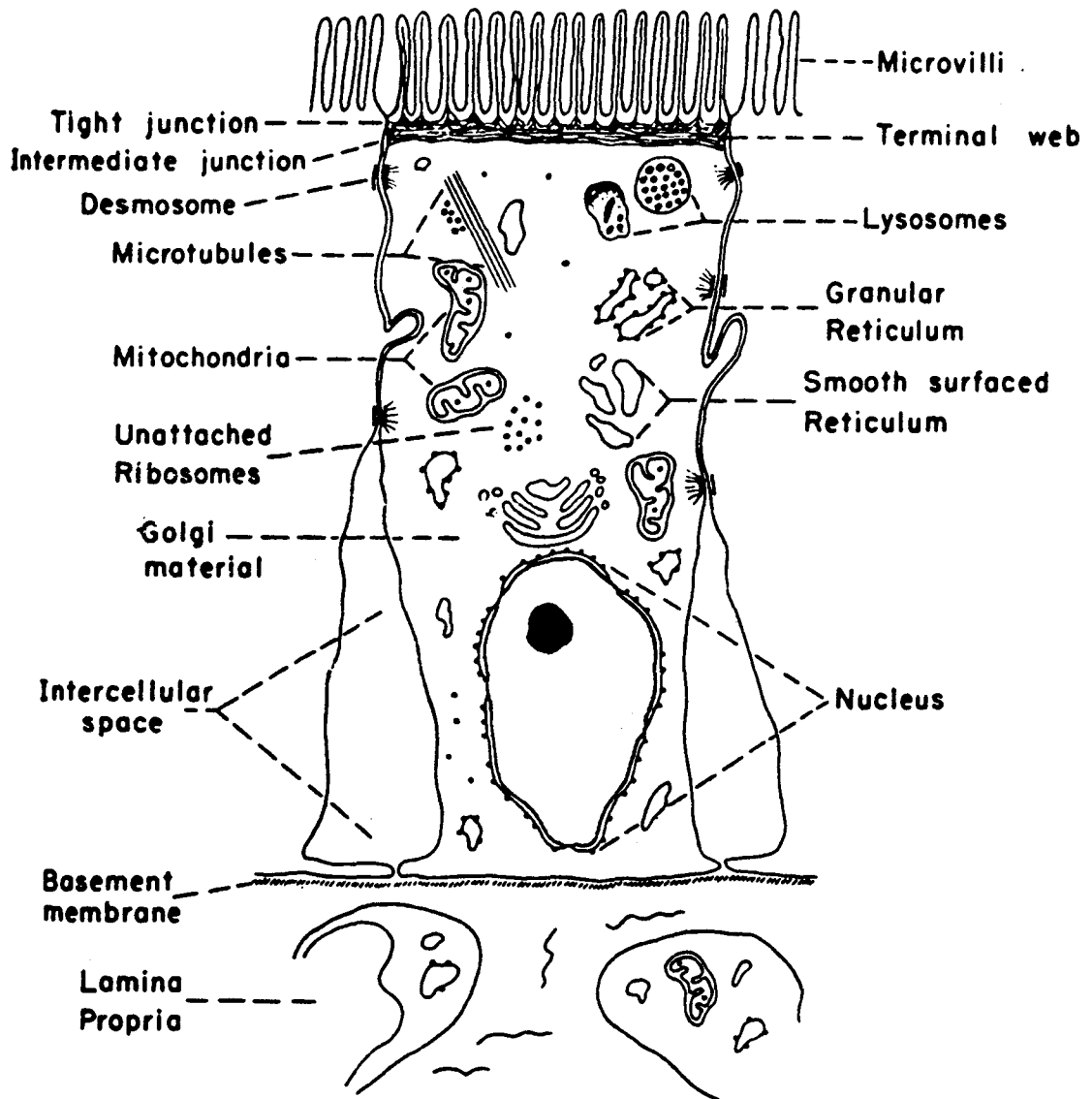


FIG. 14 Représentation schématique d'un entérocyte (Madara & Trier, 1987)

Le pôle apical est caractérisé par une bordure en brosse d'environ 0,5 à 1,5  $\mu\text{m}$  de hauteur qui est constitué de nombreuses microvillosités serrées de 0,1  $\mu\text{m}$  de largeur. Ces microvillosités augmentent la surface apicale de 14 à 40 fois environ. La membrane de la bordure en brosse est riche en protéines et glycoprotéines qui ont des fonctions spécifiques. Il s'agit d'une part de protéines enzymatiques comprenant des disaccharidases et des peptidases qui jouent un rôle crucial dans la digestion terminale des sucres et peptides alimentaires avant leur absorption. D'autre part, des protéines non-enzymatiques se trouvent également associées avec la membrane de la bordure en brosse. Il s'agit de récepteurs comme par exemple la protéine fixant le complexe cobalamine-facteur intrinsèque et de protéines de transport responsables du cotransport de  $\text{Na}^+$ / D-glucose, et  $\text{Na}^+$ / acides aminés.

Une zone d'attachement spécialisée, entre les cellules épithéliales adjacentes, appelée jonction serrée ou *zonula occludens*, sépare la membrane de la bordure en brosse de la membrane basolatérale. Ces jonctions serrées jouent un rôle majeur dans la régulation de la perméabilité de l'épithélium, en influençant le flux intracellulaire des fluides et des solutés. De plus, elles constituent une barrière contre le passage des macromolécules.

L'apparence morphologique, la composition biologique et la fonction de la partie basolatérale de la membrane plasmique des entérocytes diffèrent de façon frappante de celles de la membrane de la bordure en brosse. La localisation des ATPases à  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  au niveau de la membrane basolatérale souligne l'importance de cette membrane dans le transport intestinal de l'eau et des électrolytes.

#### ***d) Différenciation des cellules de l'épithélium intestinal***

Tous les types de cellules de l'épithélium intestinal exceptées les cellules de Paneth, migrent du fond de l'épithélium cryptique vers l'extrémité des villosités d'où elles sont exfoliées. Ainsi, les cellules épithéliales sont continuellement renouvelées et de façon très rapide (48 à 72 h pour un renouvellement total).

La différenciation en entérocyte se produit au cours de cette migration vers l'extrémité des villosités. Les cellules cryptiques non différenciées sont situées au niveau de la moitié inférieure de l'épithélium cryptique. Elles migrent vers la partie supérieure de l'épithélium

cryptique où elles commencent à se différencier en des types cellulaires variés. Les trois principaux types de cellules, les entérocytes, les cellules caliciformes et les cellules endocrines intestinales, acquièrent leur caractère différencié et exercent leurs importantes fonctions physiologiques lorsqu'elles sont encore au niveau de l'épithélium cryptique. Par exemple, les entérocytes cryptiques sécrètent des ions chlorure et effectuent la transcytose des IgA sécrétoires par l'intermédiaire de récepteur (voir détails p. 95), et les cellules caliciformes cryptiques produisent une sécrétion de mucines régulée par l'acétylcholine.

Lorsque ces cellules migrent hors de l'épithélium cryptique et arrivent au niveau des villosités, elles subissent une deuxième phase de différenciation. Ainsi, à la base de la villosité, les entérocytes développent des microvillosités apicales fortement organisées et expriment des enzymes membranaires pour la digestion terminale, tandis que les cellules caliciformes perdent leur sensibilité cholinergique.

## **B. Absorption intestinale du fer – phase intraluminale.**

L'absorption intestinale du fer a lieu essentiellement dans la partie supérieure de l'intestin grêle, c'est-à-dire le duodénum et le jejunum proximal. Malgré de longues années d'études intensives, le mécanisme et la régulation de cette absorption restent encore à élucider. Le processus peut être divisé en 4 étapes :

- 1) la phase intraluminale c'est-à-dire la distribution du fer alimentaire au niveau de la bordure en brosse des entérocytes,
- 2) la phase d'incorporation du fer à travers la membrane de la bordure en brosse,
- 3) la phase intracellulaire, c'est-à-dire le passage transcellulaire du fer à travers les entérocytes,
- 4) la phase de transfert c'est-à-dire la libération du fer de la membrane basolatérale des entérocytes.

De nombreux facteurs influencent la disponibilité du fer dans l'alimentation (TABLEAU 3, voir p. 63). Durant la digestion, le fer alimentaire interagit non seulement avec d'autres composants de l'alimentation mais aussi avec des substances provenant de sécrétions gastrointestinales. La forme chimique du fer passant dans la lumière de l'intestin grêle est un déterminant important de sa disponibilité. Dans les conditions acides de l'estomac, la majorité du fer alimentaire est solubilisé. Le fer héminique, principalement dérivé de l'hémoglobine ou de la myoglobine contenues dans la viande n'est pas influencé par d'autres ligands. Il possède donc une grande biodisponibilité. D'un autre côté, le fer non-héminique interagit avec des facteurs luminaux. Comme décrit précédemment, les ions ferreux ont tendance à s'oxyder en ions ferriques qui précipitent sous forme d'hydroxyde ferrique dans l'environnement aqueux neutre oxygéné de l'intestin grêle. En fait, le fer non-héminique ne précipite pas car il se fixe à des substances complexantes et chélatantes qui favorisent ou diminuent sa disponibilité (Fairweather-Tait, 1989).

### **C. Phase d'incorporation du fer par la bordure en brosse des entérocytes.**

Les entérocytes semblent utiliser différentes voies afin d'incorporer le fer du lumen intestinal à travers leur membrane. Beaucoup d'études récentes ont essayé d'identifier et de caractériser les transporteurs ou les récepteurs responsables de ce transport à travers la membrane de la bordure en brosse.

#### **C-1. Absorption du fer héminique**

Sous forme d'hème, le fer est incorporé par les entérocytes par une voie distincte de celle du fer inorganique car l'absorption du fer héminique est beaucoup moins influencée par le stock de fer dans l'organisme que l'absorption du fer inorganique (Bothwell, 1979). Le récepteur intestinal spécifique de l'hème a été partiellement caractérisé à partir des membranes de la bordure en brosse de l'Homme et du Porc (Grasbeck *et al.*, 1979 & 1982), mais le mécanisme de cette absorption reste à élucider.

**TABLEAU 3 Facteurs influençant l'absorption intestinale du fer**


---

<b>Aliments</b>	
- quantité de fer	
- forme chimique du fer	
héminique	
non-héminique	
ferrique	
ferreux	
- composants de l'alimentation	
acides organiques .....	(+)
acides ascorbique, citrique, lactique, etc...	
acides aminés, peptides .....	(+)
cystéine, lysine, histidine	
phénols .....	(-)
tannins, polyphénols	
phosphates, phytates .....	(-)
<b>Sécrétions gastrointestinales</b>	
- sucs gastriques	
acide chlorhydrique .....	(+)
- sécrétion pancréatique	
- bile	
acide ascorbique .....	(+)
lactotransferrine .....	(?)
sérotansferrine .....	(?)

---

(+): activateur, (-): inhibiteur, (?): activateur potentiel

## C-2. Absorption du fer inorganique

Bien que Marx et Aisen (1981) aient suggéré que la membrane de la bordure en brosse ne joue qu'un rôle passif dans l'absorption intestinale du fer, un bon nombre d'autres résultats ont démontré l'implication de transporteurs spécifiques dans l'absorption intestinale du fer à travers la membrane de la bordure en brosse.

### a) Implication de transporteurs spécifiques du fer inorganique

Des études avec des vésicules membranaires de bordure en brosse de Souris et de Lapin montrent que la fixation du fer inorganique sur ces vésicules dépend du temps et de la concentration et qu'elle est sensible à la fois à la température et au pH (Cox & O'Donnell, 1981; Muir *et al.*, 1984; Simpson & Peters, 1984). De plus, cette fixation est localisée dans la partie supérieure de l'intestin grêle, et elle est régulée en fonction de l'importance du stock de fer dans l'organisme (Cox & O'Donnell, 1980; Muir & Hopfer, 1985).

### b) Etude des différents transporteurs de fer inorganique

#### *Glycoprotéine membranaire de la bordure en brosse fixant Fe<sup>2+</sup>*

O'Donnell et Cox (1982) ont purifié une glycoprotéine de 100 kDa fixant Fe<sup>2+</sup>, à partir de bordure en brosse de l'intestin de Lapin. Ils ont suggéré que cette glycoprotéine jouerait un rôle dans la régulation de l'absorption du fer puisqu'elle a été trouvée en quantité plus importante chez les Lapins anémiés.

#### *Acide gras non estérifié*

Simpson, Peters et coll. ont examiné intensivement *in vivo* et *in vitro* le transport des ions ferriques et ferreux à travers la membrane de la bordure en brosse du Lapin et de la Souris. Ils ont proposé l'existence d'au moins deux transporteurs. Le premier est un lipide membranaire de la bordure en brosse contenant un taux élevé d'acide gras non estérifié (3-10% du lipide total). L'ion ferrique se fixe à ces acides gras ce qui provoque la perméabilisation de la membrane (Simpson & Peters, 1987a, b; Simpson *et al.*, 1988 & 1989).

Le deuxième est un transporteur spécifique du fer nécessitant de l'énergie. Il pourrait être impliqué dans l'absorption intestinale des ions ferriques (Raja *et al.*, 1987 & 1989).

#### *Glycoprotéine membranaire de la bordure en brosse fixant Fe<sup>2+</sup> et Fe<sup>3+</sup>*

Stremmel et coll. (1987) ont montré à l'aide de vésicules membranaires de bordures en brosse humaine et de Rat, que le transport transmembranaire des ions ferriques et ferreux dépendait du temps, de la concentration et de la température. De plus, en utilisant une chromatographie d'affinité sur gel chélateur de fer, ils ont purifié deux protéines fixant le fer de 160 et 52 kDa à partir respectivement de bordures en brosse humaine et de Rat. La protéine de 160 kDa isolée de la bordure en brosse d'origine humaine, semble être glycosylée et assemblée en un trimère composé de monomères de 54 kDa. Un anticorps monospécifique dirigé contre cette sous-unité de 54 kDa inhibe le transport transmembranaire du fer d'environ 50% suggérant que cette glycoprotéine intervient au moins en partie dans l'absorption des ions ferriques et ferreux par la bordure en brosse des entérocytes (Teichmann & Stremmel, 1990).

### **C-3. Rôle de la sérotransferrine dans l'absorption du fer luminal**

Comme décrit dans le paragraphe II-A, dans la plupart des cellules, le fer de la sérotransferrine est incorporé par endocytose du complexe sérotransferrine-TfR. Cependant, l'hypothèse de l'implication de la sérotransferrine dans l'absorption intestinale du fer fait encore l'objet de controverses.

#### *a) Rôle présumé de la sérotransferrine dans l'absorption du fer*

En utilisant des anses ligaturées ("ligated loops") d'intestin de Rat, Huebers et coll. (1983) ont mesuré l'absorption du fer et de la sérotransferrine à l'aide de sérotransferrine doublement marquée à l'<sup>125</sup>I et au <sup>59</sup>Fe placée dans la lumière intestinale. Ils ont observé uniquement au niveau des segments de duodénum qu'il y avait plus de fer absorbé que de sérotransferrine et que la déficience en fer augmentait cette absorption spécifique de fer. D'après ces résultats, ils ont supposé que la sérotransferrine de la lumière intestinale était une protéine "navette" dans l'absorption du fer c'est-à-dire:



- 1) l'apوسérottransferrine est sécrétée par les entérocytes,
- 2) elle fixe le fer dans la lumière intestinale,
- 3) la sérotransferrine est incorporée dans les entérocytes,
- 4) le fer est libéré de la sérotransferrine puis transféré dans le plasma,
- 5) la sérotransferrine libérée de son fer retourne vers la membrane de la bordure en brosse pour y être recyclée.

### ***b) Résultats controversés***

Le modèle ci-dessus semble fortement similaire à celui bien établi de la capture du fer de la sérotransferrine par endocytose du complexe sérotransferrine-TfR. Néanmoins, des études ultérieures ont produit des résultats contradictoires avec le modèle de la protéine "navette".

#### *Origine de la sérotransferrine localisée dans la lumière intestinale*

Ce premier argument montre qu'il est peu probable que la sérotransferrine soit sécrétée par les entérocytes. Bien que la sérotransferrine ait été trouvée dans les cellules de duodénum humain (Isobe *et al.*, 1978; Mason & Taylor, 1978; Fracanzani *et al.*, 1989), aucun ARNm de sérotransferrine n'a été détecté dans les tissus gastrointestinaux humains (Idzerda *et al.*, 1986; Pietrangelo *et al.*, 1992). La sérotransferrine de la lumière intestinale semble donc provenir du plasma (Osterloh *et al.*, 1986), mais il n'est pas exclu qu'elle provienne de la bile dans laquelle elle se trouve en faibles concentrations (10–20 µg/ml; Schumann *et al.*, 1986a, b).

#### *Localisation du TfR dans les entérocytes*

Ce deuxième argument montre qu'il est peu probable que le TfR soit présent au niveau de la membrane de la bordure en brosse des entérocytes. De nombreuses études utilisant des méthodes immunocytochimiques n'ont pas localisé le TfR sur la membrane de la bordure en brosse (Parmley *et al.*, 1985) mais l'ont mis en évidence au niveau de la membrane basolatérale des entérocytes (Levine & Seligman, 1984; Banerjee *et al.*, 1986; Lombard *et al.*, 1990), et plus particulièrement de celle des cellules cryptiques (Anderson *et al.*, 1991). Ces résultats indiquent que les entérocytes sont incapables d'incorporer le fer de la sérotransferrine par le mécanisme établi d'endocytose par récepteur.

*La sérotransferrine facilite-t-elle réellement l'absorption intestinale du fer?*

Finalement, le modèle d'absorption du fer par l'intermédiaire de la sérotransferrine proposé par Huebers et coll. (1983) n'a pas été confirmé par d'autres travaux. Cox et coll. (1979) ont montré que le fer lié à la sérotransferrine n'est pas incorporé dans les tissus de duodénum humain. Simpson et coll. (1986) ont montré que la sérotransferrine inhibe l'absorption du fer inorganique par les cellules duodénales de Souris et Flanagan et coll. (1987) ont montré que l'absorption du fer de la sérotransferrine luminale est beaucoup plus faible que celle du fer inorganique.

**C-4. Rôle de la lactotransferrine dans l'absorption du fer luminal**

Depuis la découverte de la lactotransferrine dans le lait humain comme protéine majeure fixant le fer, son rôle dans l'absorption du fer a été proposé (Montreuil *et al.*, 1960).

*a) Grande biodisponibilité du fer contenu dans le lait humain*

L'alimentation au lait maternel est bien connue pour la prévention de déficience en fer chez le nourrisson. En effet, des études sur les enfants ont montré qu'environ 50% du fer provenant du lait maternel était absorbé alors que l'absorption du fer à partir de lait industriel ou de lait de Vache varie de 5 à 20% (Saarinen *et al.*, 1977). Il a été montré que les bébés nourris exclusivement au lait maternel maintiennent un taux de fer correct plus longtemps que les bébés nourris avec du lait industriel qui contient un taux de fer similaire à celui du lait humain (Saarinen, 1977; Lönnerdal *et al.*, 1981; Siimes *et al.*, 1984). Ces résultats ont fortement suggéré l'implication de la lactotransferrine dans l'absorption du fer, dont le taux est élevé dans le lait humain et très faible dans le lait de Vache ou le lait industriel.

*b) Présence de lactotransferrine à la surface luminale des entérocytes*

Comme décrit dans la section I-D-3, la lactotransferrine ingérée par les nourrissons est relativement résistante aux dégradations protéolytiques au niveau du tractus

gastrointestinal et garde son activité de fixation du fer (Spik *et al.*, 1982a; Davidson & Lönnerdal, 1987).

Chez les adultes, beaucoup d'études immunocytochimiques réalisées sur des biopsies de duodénum humain ont mis en évidence la présence de lactotransferrine à la surface luminale des entérocytes (Mason & Taylor, 1978; Isobe *et al.*, 1978; Tedeshi *et al.*, 1987; Lorimier, 1987). La lactotransferrine a été trouvée plus particulièrement à la surface des villosités, et aussi en moins grande quantité à la surface des cellules cryptiques. Les origines possibles de la lactotransferrine à la surface luminale sont la bile (de Vet & van Gool, 1974; van Vugt *et al.*, 1975) et les sécrétions des cellules caliciformes (Lorimier, 1987).

### *c) Présence de récepteurs de lactotransferrine sur les membranes de la bordure en brosse des entérocytes*

Contrairement au TfR, les récepteurs de lactotransferrine (ou les protéines qui fixent spécifiquement la lactotransferrine) ont été mis en évidence au niveau de la membrane de la bordure en brosse des entérocytes de différentes espèces. Ils ont été mis en évidence à partir de membranes de bordure en brosse d'entérocytes de Lapin (Mazurier *et al.*, 1985), de Souris (Hu *et al.*, 1988, 1990), de macaque Rhésus (Davidson & Lönnerdal, 1988), et de foetus humain (Kawakami & Lönnerdal, 1991). De plus, l'activité de fixation spécifique de la lactotransferrine a été mise en évidence aussi dans les cellules intestinales en culture (Roiron *et al.*, 1989; Roiron-Lagroux & Figarella, 1990; Derisbourg, 1990). Les propriétés de ces récepteurs de lactotransferrine sont décrites dans le TABLEAU 4 (voir p. 69).

#### *Affinité de la lactotransferrine pour son récepteur*

Les affinités de la lactotransferrine diférique pour son récepteur sont exprimées en constante de dissociation, variant de  $2,9 \times 10^{-7}$  à  $9,0 \times 10^{-6}$  M, ce qui est beaucoup plus faible que celles de la sérotransferrine pour son récepteur ( $10^{-9}$  à  $10^{-8}$  M). A la différence de la sérotransferrine, la saturation en fer de la lactotransferrine ne semble pas changer son affinité pour son récepteur (Hu *et al.*, 1988; Derisbourg, 1990).

**TABEAU 4. Caractéristiques de fixation de la lactotransferrine dans différents systèmes intestinaux.**

MBBI* / Cellules	Origine de la Lf	$K_d$ (M)	site de fixation	Référence
MBBI de Rat	Lf humaine	$8.3 \times 10^{-7}$	$1.5 \times 10^{13}$ **	(1)
MBBI de Souris	Lf de Souris	$2.9 \times 10^{-7}$	$5.3 \times 10^{14}$ **	(2)
MBBI de Macaque Rhésus	Lf de Singe	$9.0 \times 10^{-6}$	$1.8 \times 10^{15}$ **	(3)
MBBI de foetus humain	Lf humaine	$3.3 \times 10^{-6}$	$4.3 \times 10^{14}$ **	(4)
HT29-D4	Lf humaine	$4.1 \times 10^{-7}$	$4.1 \times 10^6$ ***	(5)
		$8.5 \times 10^{-6}$	$2.6 \times 10^7$ ***	

\* MBBI, membranes de bordure en brosse intestinale

\*\* Nombre de sites de fixation par mg de protéine membranaire de bordure en brosse

\*\*\* Nombre de sites de fixation par cellule

Références: (1) Mazurier *et al.*, 1985; (2) Hu *et al.*, 1988; (3) Davidson & Lönnerdal, 1988; (4) Kawakami & Lönnerdal, 1991; (5) Roiron *et al.*, 1989

### *Spécificité d'espèce de la fixation de la lactotransferrine*

La spécificité d'espèces des interactions entre la lactotransferrine et son récepteur a été proposée. Les lactotransferrines humaine et de Singe mais pas la lactotransferrine bovine se fixent aux membranes de la bordure en brosse de l'intestin de Singe (Davidson & Lönnerdal, 1988). La lactotransferrine humaine mais pas la lactotransferrine bovine se fixe aux membranes de bordure en brosse d'intestin de fœtus humain (Kawakami & Lönnerdal, 1991). Cependant, les lactotransferrines humaine, bovine et de Souris se fixent toutes de façon similaire aux membranes de bordure en brosse d'intestin de Souris (Hu *et al.*, 1988).

### *Implication des glycanes de la lactotransferrine sur la fixation à son récepteur*

Des résultats contradictoires ont été obtenus concernant la participation des glycanes de la lactotransferrine aux interactions ligand-récepteur. Dans le modèle du Singe, il a été montré que la présence de résidus de fucose dans les chaînes glycaniques était essentielle à la fixation de la lactotransferrine sur son récepteur (Davidson & Lönnerdal, 1988), mais pas dans le modèle de la Souris (Hu *et al.*, 1988). Au niveau des membranes de bordure en brosse d'intestin de fœtus humain, la déglycosylation de la lactotransferrine ne modifie pas la fixation à son récepteur (Kawakami & Lönnerdal, 1991).

### *d) Effets de la lactotransferrine sur l'absorption du fer*

Bien que la présence de lactotransferrine et de son récepteur ait été montrée au niveau des membranes de la bordure en brosse, le rôle joué par la lactotransferrine est encore très controversée.

#### *Effet inhibiteur*

Deux groupes ont montré que l'addition d'apolactotransferrine diminuait l'absorption intestinale du fer inorganique. De Laey *et coll.* (1968) ont montré, dans des études *in vitro* utilisant le duodénum de Rat et de Cochon d'Inde, que l'apolactotransferrine humaine inhibait l'absorption du fer et que la lactotransferrine saturée en fer n'avait aucun effet. De Vet *et van Gool* (1974) ont démontré que la lactotransferrine humaine (présentant 80% de saturation en fer) diminuait l'absorption du fer inorganique chez les sujets normaux. Il faut noter que l'effet

inhibiteur de la lactotransferrine n'a pas été observé chez les patients ayant une surcharge en fer.

### *Effet activateur*

Cox et coll. (1979) ont montré à l'aide d'études *in vitro* avec des tissus de duodénum humain, que la lactotransferrine, mais pas la sérotransferrine, pouvait délivrer le fer aux entérocytes. Kawakami et coll. (1988) ont montré que chez le Rat carencé en fer, l'administration de lactotransferrine saturée en fer améliore le taux de fer dans l'organisme de façon plus efficace que l'administration de sulfate de fer.

Fransson et coll. (1983a, b) ont montré chez les Souris et les Porcs en cours de sevrage, que le fer fixé à la lactotransferrine était absorbé de façon aussi efficace que le fer inorganique. Plus récemment, Fairweather-Tait et coll. (1987) et Schulz-Lell et coll. (1991) ont comparé la rétention du fer chez les nourrissons nourris au lait industriel supplémenté ou non avec de la lactotransferrine bovine. En fait, ils ont trouvé une légère amélioration avec la supplémentation mais la différence n'était pas significative statistiquement.

## **D. Phase intracellulaire: passage du fer à travers les entérocytes**

L'hème incorporé par les entérocytes est dégradé par une hème oxygénase présente en concentration relativement élevée dans le duodénum, comparée aux autres parties de l'intestin. Le fer libéré de l'hème est alors susceptible d'entrer dans un "pool" de fer intracellulaire comprenant le fer d'origine héminique et le fer inorganique. Très peu d'informations ont été obtenues jusqu'à maintenant en ce qui concerne le mécanisme du passage transépithélial du fer.

### **D-1. "pool" intracellulaire de fer**

Beaucoup d'études ont montré que le fer nouvellement incorporé se trouve dans le cytosol lié à la sérotransferrine, la ferritine et à des substances de faible masse moléculaire.

### **a) La sérotransferrine**

Alors qu'il semble peu probable que la sérotransferrine luminale soit impliquée dans l'absorption du fer à travers la membrane de la bordure en brosse, la sérotransferrine intracellulaire, elle, fixe le fer nouvellement incorporé (Huebers *et al.*, 1976), surtout lors de carence en fer (Topham *et al.*, 1992). Cette sérotransferrine provient sans doute du plasma via le TfR de la membrane basolatérale. Aucun résultat direct n'a encore été obtenu afin de prouver le rôle éventuel de cette sérotransferrine dans le transport transépithélial du fer.

### **b) La ferritine**

Depuis longtemps il est connu que la ferritine intègre le fer nouvellement incorporé (Granick, 1946; Huebers *et al.*, 1976). La proportion de fer capturé par la ferritine intracellulaire augmente lors de surcharge en fer (Topham *et al.*, 1992). La théorie du "blocage par la muqueuse" de Granick (1946) c'est-à-dire que la ferritine bloque le passage du fer à travers l'entérocyte, reste toujours attractive. Le fer incorporé dans la ferritine est perdu lorsque les entérocytes sont exfoliés à la surface des villosités.

### **c) Autres substances**

Conrad et coll. (1990) ont isolé récemment à partir de la muqueuse duodénale de rat, une protéine de 56 kDa fixant le fer. Cette protéine diffère de la sérotransferrine et de la ferritine aux niveaux immunologique et biochimique. Elle est présente uniquement dans le cytosol apical des cellules de l'intestin grêle proximal. Son rôle dans l'absorption du fer reste à élucider.

Une partie du "pool" de fer intracellulaire a été mise en évidence au niveau de substances de faible masse moléculaire. Il peut s'agir de pyrophosphates, de différents acides aminés, d'ATP, d'AMP etc..., mais presque rien n'est connu à leur sujet (Crichton & Ward, 1992).

## **E. Phase de transfert du fer des entérocytes vers le plasma**

Bien qu'il ait été montré que pratiquement tout le fer absorbé dans l'entérocyte passe directement dans la circulation portale (Morgan, 1980), très peu de choses sont connues sur la façon dont le fer est transféré à travers la membrane basolatérale. D'après les observations suivantes, la sérotransferrine et son récepteur sont susceptibles de jouer un rôle dans ce transfert:

- 1) le fer nouvellement incorporé se trouve fixé à la sérotransferrine,
- 2) le TfR est localisé au niveau de la membrane basolatérale,
- 3) lors de déficience en fer, le taux de TfR augmente considérablement (Pietrangelo *et al.*, 1992).

Néanmoins la mise en jeu de la sérotransferrine et de son récepteur dans le transfert du fer est sujet à controverses. Il existe différentes observations contradictoires:

- 1) la sérotransferrine saturée en fer ne peut se dissocier du récepteur dans le liquide séreux du fait de leur forte affinité à pH neutre,
- 2) le transfert du fer vers le plasma continue même si les quantités transférées dépassent la capacité de fixation du fer de la sérotransferrine plasmatique (Schumann *et al.*, 1986a),
- 3) chez les Souris hypotransferrinémiques, le fer administré oralement est facilement transporté vers le foie malgré l'absence relative de sérotransferrine. Toutefois, le fer s'y accumule et devient inutilisable pour les souris (Craven *et al.*, 1987).

Par conséquent, le TfR est supposé servir uniquement à la capture du fer de la sérotransferrine nécessaire essentiellement à la prolifération des cellules cryptiques.

## **F. Régulation de l'absorption intestinale du fer**

Comme décrit précédemment, l'absorption intestinale du fer est étroitement régulée en fonction du taux de fer dans l'organisme. En effet, l'absorption du fer augmente lors de



carence en fer (c'est-à-dire lorsque la réserve en fer est faible) et durant l'érythropoïèse accélérée ou la grossesse (c'est-à-dire quand les besoins en fer de l'organisme sont importants). Malgré les nombreuses études effectuées depuis plus de 50 ans, le mécanisme de cette régulation n'est pas encore bien compris. Les entérocytes doivent être capables de détecter les variations du taux de fer dans le corps afin de pouvoir réguler l'absorption du fer. Cette information pourrait être transmise aux entérocytes par des facteurs humoraux qui induisent des changements non identifiés dans le mécanisme d'absorption du fer.

### **F-1. Facteurs humoraux**

Les principaux candidats sont la ferritine sérique, la sérotransferrine et son récepteur, dont les concentrations dans le plasma ou le degré de saturation en fer varient en fonction de l'importance des réserves en fer dans le corps et/ou du taux d'érythropoïèse.

#### **a) La ferritine sérique**

La concentration en ferritine est connue pour être un indicateur du niveau de réserve en fer dans le corps (Cook *et al.*, 1974), ce qui pourrait être expliqué par le mécanisme de régulation post-transcriptionnelle fer-dépendante décrit dans le paragraphe II-B-2. De plus, une étroite relation inverse a été démontrée entre la ferritine sérique et l'absorption intestinale du fer chez les sujets sains (Walters *et al.*, 1975; Baynes *et al.*, 1987; Cook *et al.*, 1990). Ces observations confirment que l'absorption du fer est régulée en fonction de l'importance du stock de fer dans l'organisme. Cependant, la présence de récepteur de ferritine sérique au niveau de la membrane basolatérale n'a pas encore été démontrée et aucune autre preuve n'a été apportée indiquant l'implication directe de la ferritine sérique dans l'absorption du fer au niveau des entérocytes.

#### **b) Récepteur sérique de la sérotransferrine**

Le récepteur soluble de la sérotransferrine a été mis en évidence dans la circulation sanguine (Kohgo *et al.*, 1986; Beguin *et al.*, 1988; Flowers *et al.*, 1989) et semble être présent

dans le plasma sous forme de complexe avec la sérotransferrine (Huebers *et al.*, 1990). Ce récepteur soluble correspond au domaine extracytoplasmique libéré par clivage protéolytique du TfR membranaire (Chitambar & Zivkovic, 1989). Il a été montré que sa concentration dans le plasma est un indice fiable de la quantité totale de TfR tissulaire dont la majorité se trouve dans la moëlle érythrocytaire, et est sensible aux variations se produisant lors de l'érythropoïèse et lors de déficience en fer (Kohgo *et al.*, 1987; Trowbridge, 1989). Ces observations suggèrent que le TfR sérique peut être un facteur influant sur l'absorption intestinale du fer. Néanmoins, de récentes études sur l'absorption du fer alimentaire inorganique et non héminique chez les sujets sains, ont montré que la corrélation entre l'absorption du fer et la concentration en TfR sérique est beaucoup moins évidente que la corrélation entre l'absorption du fer et la concentration en ferritine sérique (Cook *et al.*, 1990).

### *c) La sérotransferrine*

Il est bien établi que le degré de saturation en fer de la sérotransferrine varie en fonction de la quantité de fer stocké dans l'organisme et/ou de l'érythropoïèse (Massey, 1992). Bien que la sérotransferrine ne semble pas influencer directement l'absorption du fer comme décrit précédemment, la disponibilité du fer pour la prolifération des cellules cryptiques varie selon le degré de saturation en fer de la sérotransferrine. Ainsi, la sérotransferrine pourrait modifier indirectement les propriétés des entérocytes.

## **F-2. Rôle des entérocytes**

En réponse à de potentiels facteurs humoraux, les entérocytes changent leur propriété d'absorption du fer par un mécanisme encore inconnu. L'une des plus anciennes hypothèses, mais certainement encore intéressante, a été proposée par Conrad et Crosby (1963).

### *a) Mise en condition des cellules cryptiques pour moduler la capacité d'absorption intestinale du fer*

Cette hypothèse est basée sur des observations expérimentales chez le Rat. Conrad et Crosby (1963) ont observé un temps de latence de quelques jours entre les stimuli diminuant

la réserve de fer dans l'organisme comme le saignement ou la déficience en fer, et la réponse de l'absorption intestinale du fer. Les auteurs ont supposé que ce temps de latence correspondait au temps nécessaire aux cellules cryptiques nouvellement formées pour se différencier en entérocytes fonctionnels possédant une capacité accrue d'absorption du fer. Cette capacité serait définie par la quantité de fer fournie par le plasma lorsque les cellules sont encore des cellules cryptiques non différenciées.

De ce point de vue, les observations suivantes indiquent que la sérotransferrine peut être un facteur humoral pour la mise en condition des cellules cryptiques:

- 1) le degré de saturation en fer de la sérotransferrine reflète le taux de fer dans l'organisme,
- 2) le TfR est particulièrement bien exprimé à la surface de la membrane basolatérale des cellules intestinales,
- 3) les cellules cryptiques sont sensibles au fer apporté par la sérotransferrine puisque lors de leur prolifération, leur besoin en fer est satisfait uniquement à partir du fer nouvellement incorporé dans la cellule et non pas à partir du fer intracellulaire stocké.

#### ***b) Modulation de la capacité d'absorption du fer des entérocytes***

Après avoir détecté le besoin en fer de l'organisme, comment les entérocytes modulent-ils leur capacité d'absorption du fer?

#### ***Régulation fer-dépendante de l'absorption du fer***

Comme décrit dans le paragraphe III-C-2, les synthèses de transporteurs de fer inorganique, situés au niveau de la membrane de la bordure en brosse, et de ferritine intracellulaire (paragraphe III-D) sont probablement régulées en fonction des réserves corporelles en fer. D'après ces observations, un modèle de régulation de l'absorption du fer a pu être proposé (Flanagan, 1989 & 1990).

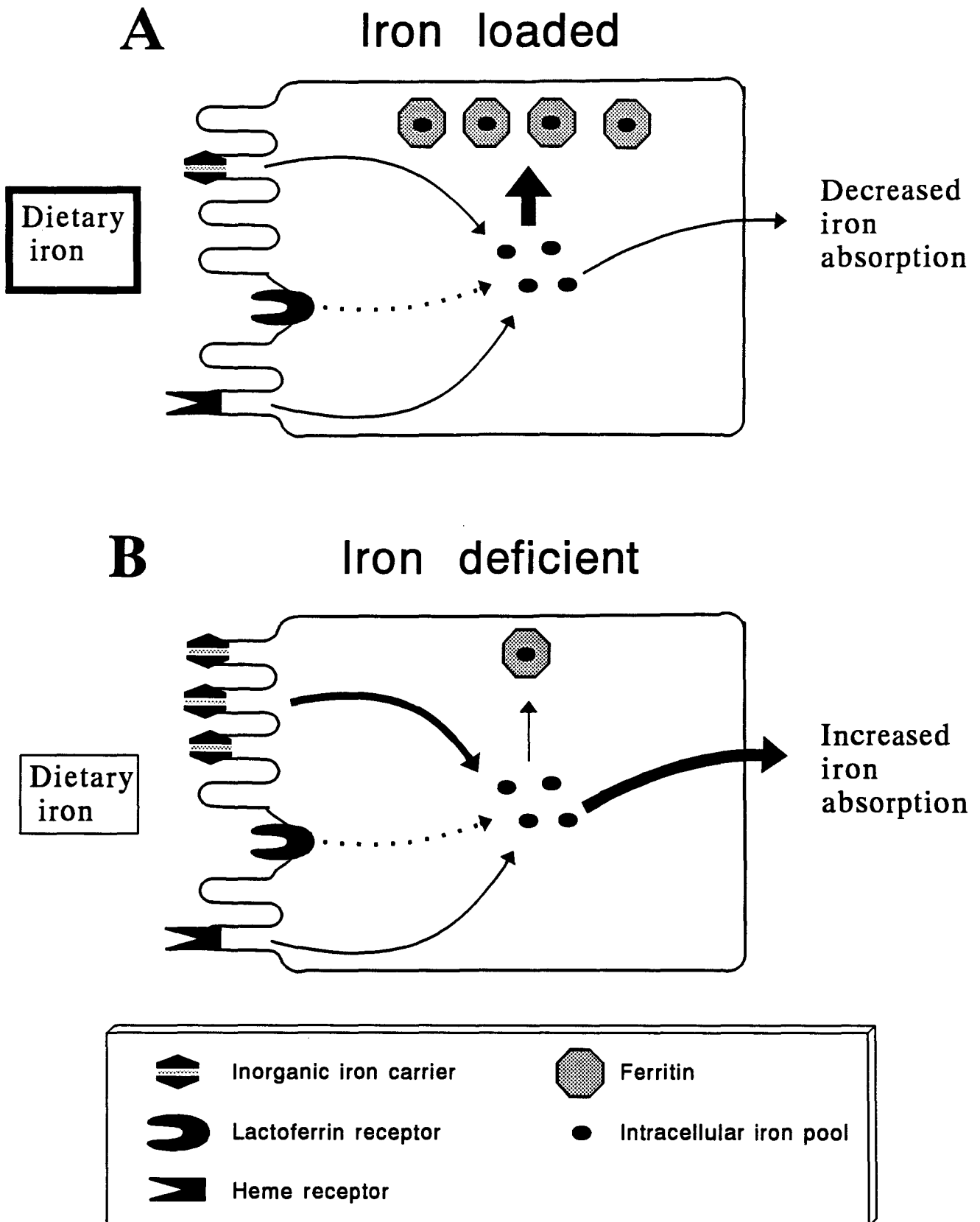
Dans des conditions de surcharge en fer, une quantité minimale de fer est incorporée dans les entérocytes, du fait de la faible expression de transporteurs de fer au niveau de la bordure en brosse. La majeure partie de ce fer incorporé est stocké dans la ferritine synthétisée

en grande quantité, puis est perdu lors de l'exfoliation des entérocytes à l'extrémité des villosités. Le reste de ce fer incorporé est éliminé dans la circulation via un transporteur intracellulaire potentiel de fer (FIG. 15-A, p. 78).

Dans des conditions de carence en fer, une grande quantité de fer est incorporée dans les entérocytes via les transporteurs de fer très nombreux cette fois au niveau de la membrane de la bordure en brosse. Seule une petite partie de ce fer incorporé est intégrée dans la ferritine synthétisée en faibles quantités alors que la majeure partie est libérée dans la circulation portale via des transporteurs intracellulaires potentiels (FIG. 15-B).

#### *Implication de l'IRE-BP dans la régulation de l'absorption du fer*

Les expressions de la ferritine et du TfR dans les entérocytes sont régulées positivement et négativement en réponse aux variations du taux de fer dans l'organisme. Bien que la présence de l'IRE-BP n'ait pas encore été démontrée dans les entérocytes, ces observations impliquent l'existence d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle lié à l'IRE-BP comme décrit dans le paragraphe II-B-3. Il reste à savoir si ce mécanisme est responsable de la biosynthèse d'autres protéines impliquées dans l'absorption intestinale du fer comme par exemple, les transporteurs potentiels de fer au niveau de la membrane de la bordure en brosse.



**FIG. 15** Régulation fer-dépendante de l'absorption du fer dans l'entérocyte (Flanagan, 1989)

## *Travaux Personnels*

---

# I. Etude du récepteur de la lactotransferrine sur les cellules intestinales en culture

## A. Introduction

Nos travaux ont pour but d'étudier les différents rôles de la lactotransferrine au cours de son passage dans le tractus gastrointestinal et, en particulier, de déterminer le rôle de la lactotransferrine dans l'absorption intestinale du fer chez l'Homme. Comme décrit dans les généralités, le processus de l'absorption intestinale du fer se déroule en trois étapes: 1) le passage à travers la membrane de la bordure en brosse, 2) le transport dans l'entérocyte, 3) le passage à travers la membrane basolatérale. Ceci montre donc que des systèmes cellulaires polarisés sont nécessaires à la compréhension du mécanisme d'absorption du fer. De plus, au cours des études démontrant l'existence de récepteur de lactotransferrine au niveau de la membrane de la bordure en brosse de cellules de plusieurs espèces incluant l'Homme, des résultats différents ont été obtenus suggérant que la spécificité de l'interaction de la lactotransferrine avec son récepteur est liée à l'espèce étudiée. Par conséquent, il apparaît nécessaire de travailler en système homologue, c'est-à-dire utiliser de la lactotransferrine humaine et des cellules intestinales humaines, afin d'élucider le rôle de la lactotransferrine et de son récepteur au niveau de l'absorption intestinale du fer.

### A-1. Systèmes de culture de cellules épithéliales intestinales

Afin d'élucider le mécanisme complexe de l'absorption du fer, les chercheurs ont utilisé trois systèmes différents: 1) les vésicules membranaires de bordure en brosse, 2) les cellules épithéliales intestinales séparées, 3) les tissus intestinaux. Bien qu'un nombre considérable d'informations aient été obtenues grâce aux deux premiers systèmes, tel que la présence de récepteurs de fer inorganique, peu d'informations ont été acquises concernant le

mécanisme d'absorption du fer au niveau des cellules polarisées et sa régulation. Le troisième système semble idéal mais les tissus intestinaux intacts ne peuvent être maintenus *in vitro* plus de 24 h (Neutra, 1980) et de plus, il est difficile de s'en procurer.

Récemment, il a été montré que des lignées cellulaires d'adénocarcinome de colon humain présentaient une différenciation en entérocyte soit spontanément, soit lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu dépourvu de glucose. En raison de leur différenciation morphologique et/ou fonctionnelle, ces lignées cellulaires ont été utilisées pour un grand nombre d'études comme la différenciation cellulaire, la polarité cellulaire ou le transport transépithélial des ions et des macromolécules (revue générale par Neutra & Louvard, 1989).

#### **a) Les cellules Caco-2**

Les cellules Caco-2 sont dérivées d'un adénocarcinome de colon humain relativement bien différencié. Après la confluence, elles forment spontanément, c'est-à-dire dans un milieu standard, des monocouches bien polarisées reliées par des jonctions serrées, avec des microvillosités bien développées à leur surface apicale (Pinto *et al.*, 1983). Bien que les cellules Caco-2 soient dérivées de colon humain adulte qui normalement n'exprime pas les hydrolases membranaires de la bordure en brosse, elles expriment deux disaccharidases (lactase et sucrase-isomaltase), deux peptidases (dipeptidylpeptidase IV et aminopeptidase N) et une phosphatase alcaline, typiques des cellules normales des villosités de l'intestin grêle (Pinto *et al.*, 1983; Zweibaum *et al.*, 1984; Chantret *et al.*, 1988). Les cellules Caco-2 transportent des ions et de l'eau de la surface apicale vers la surface basolatérale, formant ainsi des dômes quand elles sont cultivées sur des supports imperméables (Pinto *et al.*, 1983).

#### **b) Les cellules T84**

La lignée cellulaire T84, dérivée d'une métastase pulmonaire d'adénocarcinome de colon humain, ressemble aux cellules Caco-2 par sa capacité à former spontanément des monocouches polarisées avec des jonctions serrées (Dharmasathaphorn *et al.*, 1984, 1985). A l'inverse des cellules Caco-2, les cellules T84 sont incapables d'exprimer des hydrolases membranaires de bordure en brosse (Madara & Dharmasathaphorn, 1985).



**c) Les cellules HT29 cultivées dans du milieu sans glucose**

La lignée cellulaire HT29, comme beaucoup d'autres lignées cellulaires dérivées d'adénocarcinome de colon humain, ne présente pas les caractéristiques de différenciation des cellules intestinales lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu standard, c'est-à-dire contenant du glucose. Cependant, les phénotypes ressemblant aux cellules caliciformes et aux entérocytes fortement différenciés, apparaissent dans les monocouches de cellules HT29 quand le glucose est substitué par le galactose, l'inosine ou l'uridine comme source de carbone (Pinto *et al.*, 1982; Wice *et al.*, 1985), ou même en l'absence de ces additifs (Zweibaum *et al.*, 1985). Quatre enzymes membranaires de la bordure en brosse: la sucrase-isomaltase, l'aminopeptidase N, la dipeptidylpeptidase IV et la phosphatase alcaline sont exprimées dans les cellules HT29 différenciées comme la souche HT29 Glc<sup>-</sup> Ino<sup>+</sup>, qui a été adaptée au milieu contenant de l'inosine et dépourvu de glucose (Wice *et al.*, 1985).

**d) Les clones et sous-clones isolés de la lignée cellulaire HT29**

L'hétérogénéité de la lignée cellulaire différenciée HT29 a conduit à l'isolement de différents clones et sous-clones.

**HT29 clone 16E et 19A**

Augeron et Laboisse (1984) ont obtenu, par traitement avec du butyrate de sodium, des lignées cellulaires différenciées en permanence à partir de lignées HT29 non différenciées, même dans un milieu standard, et ils les ont clonées par dilution limite. HT29 clone 16E possède les caractéristiques des cellules caliciformes différenciées, type cellulaire très spécialisé pour les sécrétions exocrines de mucine. HT29 clone 19A présente une différenciation de type entérocytaire et une capacité de transport transépithélial des solutés (Augeron *et al.*, 1986; Rouyer-Fessard *et al.*, 1989; Nath *et al.*, 1991; Bajnath *et al.*, 1992a, b; van den Berghe *et al.*, 1992). Cette capacité est représentée par la formation de dômes comme les cellules Caco-2. Néanmoins, ces formes de lignées cellulaires développent très peu de microvillosités et n'expriment pas les hydrolases membranaires de la bordure en brosse (Laboisse, communication personnelle).

*HT29-D4 et HT29-D9*

Fantini *et al.* (1986) ont sélectionné deux sous-clones (HT29-D4 et HT29-D9) à partir de cellules HT29 cultivées dans un milieu sans glucose et contenant du galactose. Les deux sous-clones présentent une différenciation de type entérocytaire, formant des dômes après confluence. La présence de glucose induit la disparition du phénotype différencié.

*HT29-18-C<sub>1</sub> et HT29-18-N<sub>2</sub>*

Huet *et al.* (1987) ont isolé deux sous-clones qui gardent leur phénotype différencié même en présence de glucose dans le milieu. Ils ont d'abord obtenu un clone désigné HT29-18, qui est similaire aux cellules souche, c'est-à-dire qui conduit à la fois aux cellules caliciformes et aux entérocytes. Ensuite le sous-clonage des cellules HT29-18 différenciées, par dilution limite et réensemencement dans un milieu contenant du glucose, a produit un phénotype unique, soit d'entérocyte (HT29-18-C<sub>1</sub>), soit de cellules caliciformes (HT29-18-N<sub>2</sub>). Les cellules HT29-18-C<sub>1</sub> possèdent les caractéristiques morphologiques des cellules entérocytaires polarisées, lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu contenant à la fois du glucose et du galactose mais la sucrase-isomaltase est exprimée uniquement lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu contenant du glucose et dépourvu de galactose (Huet *et al.*, 1987).

## **A-2. Utilisation des cellules intestinales en culture pour étudier les rôles de la lactotransferrine humaine dans l'absorption intestinale du fer**

Comme décrit précédemment, certaines lignées cellulaires dérivées d'adénocarcinome de colon humain, présentent une différenciation de type entérocytaire. De nombreuses études ont démontré que ces lignées cellulaires peuvent être un bon modèle de l'épithélium intestinal (revue générale par Neutra & Louvard, 1989). Concernant l'étude des rôles de la lactotransferrine dans l'absorption intestinale du fer, nous aimerions souligner les points suivants:

***a) La différenciation des cellules cryptiques au cours de leur migration vers l'extrémité de la villosité***

Comme décrit dans les Généralités (p. 60), les cellules cryptiques se différencient au cours de leur migration vers l'extrémité des villosités. Les lignées cellulaires capables de se différencier en entérocytes, semblent imiter ce processus de différenciation (Neutra & Louvard, 1989). Juste après leur confluence, les cellules ressemblent à des cellules cryptiques indifférenciées qui deviendront soit des entérocytes pour la lignée HT29-18-C<sub>1</sub> ou soit des cellules caliciformes pour la lignée HT29-18-N<sub>2</sub> (Huet *et al.*, 1987). Environ deux semaines après la confluence, les cellules deviennent analogues aux cellules intestinales complètement différenciées, situées à l'extrémité des villosités (Pinto *et al.*, 1983).

***b) Le transport transépithélial***

Le transport transépithélial est l'une des plus importantes fonctions des entérocytes. Certaines lignées cellulaires différenciées qui sont cultivées sur des supports perméables, possèdent une résistance électrique similaire à celle de l'épithélium intestinal (Grasset *et al.*, 1984). En effet, en utilisant ces modèles, les propriétés de transport transépithélial de différentes substances sont analogues à celles des entérocytes. Ainsi, c'est le cas pour les électrolytes (Laburthe *et al.*, 1987), des acides aminés et des peptides (Hidalgo & Borchardt, 1990; Dantzig & Bergin, 1990; Smith *et al.*, 1991; Burton *et al.*, 1992) et le complexe cobalamine (vitamin B<sub>12</sub>)- facteur intrinsèque (Muthiah & Seetharam, 1987; Ramanujam *et al.*, 1991). L'absorption du fer inorganique a également été mise en évidence dans les cellules Caco-2 cultivées sur filtre (Alvarez-Hernandez *et al.*, 1991).

***c) Le récepteur de la lactotransferrine dans les lignées cellulaires en culture***

La fixation spécifique de la lactotransferrine a été mise en évidence au niveau des cellules HT29-D4 cultivées dans un milieu contenant du glucose (Roiron *et al.*, 1989) et au niveau des cellules HT29 Glc<sup>-</sup> Ino<sup>+</sup> (Derisbourg, 1990). La nature de la fixation de la lactotransferrine était comparable à celle trouvée au niveau des membranes intestinales de

bordure en brosse (Mazurier *et al.*, 1985; Hu *et al.*, 1988, 1990; Davidson & Lönnerdal, 1988; Kawakami & Lönnerdal, 1991, voir TABLEAU 4, p. 69).

***d) Limitation de l'utilisation des cellules intestinales en culture comme modèle de l'épithélium intestinal***

Quand on applique les données *in vitro*, obtenues à l'aide de lignées cellulaires différenciées, aux phénomènes *in vivo*, nous devons garder à l'esprit les deux points suivants:

- 1) ces lignées cellulaires dérivent de cellules tumorales et non de cellules normales,
- 2) ces lignées cellulaires proviennent du colon et non de l'intestin grêle, bien qu'elles expriment des hydrolases membranaires typiques de bordure en brosse intestinale. En fait, les entérocytes du colon de fœtus humain âgé de quinze semaines, expriment de façon transitoire de telles hydrolases (Grand *et al.*, 1976).

***e) Conclusion***

Certaines lignées cellulaires dérivées d'adénocarcinome de colon humain, qui présentent une différenciation de type entérocytaire, peuvent être un bon modèle d'étude des rôles de la lactotransferrine dans l'absorption intestinale du fer.

Dans la première partie de nos travaux, nous avons essayé, en utilisant les lignées cellulaires différenciées en entérocytes Caco-2, HT29 Glc- Ino<sup>+</sup>, HT29 clone 19A et HT29-18-C<sub>1</sub>, de déterminer les points suivants:

- 1) évolution de la nature de la fixation de la lactotransferrine sur une lignée cellulaire en fonction de l'âge des cellules,
- 2) comparaison des modalités de fixation de la lactotransferrine sur différentes lignées cellulaires différenciées,
- 3) spécificité de la fixation de la lactotransferrine sur ces cellules.

## B. Matériel et méthodes

### B-1. Culture cellulaire

#### a) Conditions générales

Les cellules sont cultivées dans les milieux spécifiés ci-dessous pour chaque lignée cellulaire, à 37°C dans une atmosphère humide composée de 90% d'air et 10% de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont repiquées chaque semaine etensemencées à  $4 \times 10^4$  cell./cm<sup>2</sup> dans des flacons de 25 cm<sup>2</sup> (Becton-Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, U.S.A.), et le milieu est changé chaque jour. L'absence de contamination par les mycoplasmes est régulièrement vérifiée à l'aide de la méthode de Chen (Chen, 1977). Pour les études de fixation, les cellules sontensemencées à  $4 \times 10^4$  cell./cm<sup>2</sup> dans des plaques Linbro de 24 puits (Flow Laboratories, Puteaux, France).

#### b) Les cellules Caco-2

Les cellules Caco-2\* sont utilisées entre les passages 62 et 66. Le milieu de culture est le milieu essentiel minimum de Eagle modifié par Dulbecco, dépourvu de pyruvate, contenant 25 mM de glucose (DMEM; Gibco BRL, Cergy Pontoise, France) qui est complété par 20% de sérum de veau foetal (SVF) inactivé par la chaleur, 1% de solution d'acides aminés non essentiels (Gibco BRL), et 50 µg/ml de gentamicine (Gibco BRL).

#### c) Les cellules HT29 Glc- Ino+

Les cellules HT29 Glc- Ino+\* sont utilisées entre les passages 17 et 19. Le milieu de culture est le milieu essentiel minimum de Eagle modifié par Dulbecco, dépourvu de pyruvate et de glucose (Eurobio, Paris, France) qui est complété par 2,5 mM d'inosine (Sigma), 50 µg/ml de gentamicine et 10% de SVF qui a été inactivé par la chaleur et dialysé contre 0,9% de NaCl froid (renouvelé une fois par jour) pendant trois jours.

---

\* Nous remercions le Dr. G. Trugnan (INSERM U178, Villejuif, France) de nous avoir fourni les cellules Caco-2 et les cellules HT29 Glc- Ino+.

**d) Les cellules HT29 cl.19A**

Les cellules HT29 cl.19A\* sont utilisées entre les passages 10 et 30. Le milieu de culture est du DMEM dépourvu de pyruvate, contenant 25 mM de glucose et complété par 10% SVF inactivé par la chaleur et 50 µg/ml de gentamicine.

**e) Les cellules HT29-18-C<sub>1</sub>**

Les cellules HT29-18-C<sub>1</sub>\*\* sont utilisées entre les passages 10 et 30. Le milieu de culture est du DMEM dépourvu de pyruvate, contenant 25 mM de glucose et complété par 10% SVF inactivé par la chaleur et 50 µg/ml de gentamicine.

**B-2. Protéines et marquage de protéines****a) La lactotransferrine**

La lactotransferrine humaine est purifiée à partir du lait humain comme décrit par Spik et coll. (1982b) et son degré de saturation en fer est inférieur à 10%. Cette lactotransferrine humaine native est saturée en fer comme décrit par Mazurier et Spik (1980) en utilisant un tampon citrate de sodium 0,1 M/ bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 8,2, contenant des quantités appropriées de FeCl<sub>3</sub> (Azari & Baugh, 1967). La lactotransferrine humaine saturée en fer est équilibrée dans un tampon approprié à l'aide d'une colonne de Séphadex G-25M (PD-10; Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden).

**b) Radioiodination de la lactotransferrine**

La lactotransferrine humaine diférique est radioiodinée en utilisant de l'Iodo-Gen (Pierce, Rockford, IL, U.S.A.) selon les instructions du fabricant. Un mg de lactotransferrine humaine et 400 µCi de Na<sup>125</sup>I (100 mCi/ml; Amersham, U.K.) sont incubés dans un tube de

---

\* Nous remercions le Dr C. Labois (INSERM U239, Paris, France) de nous avoir fourni les cellules HT29 cl.19A.

\*\* Nous remercions le Dr D. Louvard (Institut Pasteur, Paris, France) de nous avoir fourni les cellules HT29-18-C<sub>1</sub>.

verre dont les parois sont tapissées avec 100  $\mu\text{g}$  d'Iodo-Gen, pendant 30 min. à 4°C dans un volume final de 200  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate 0,1 M, pH 7,2. Après l'incubation, la lactotransferrine humaine diférique marquée est séparée de l' $^{125}\text{I}$  par gel filtration sur une colonne de Séphadex G-25M PD-10 équilibrée avec une solution saline de tampon phosphate de Dulbecco contenant  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM,  $\text{Mg}^{2+}$  0,5 mM, pH 7,3 (DPBS+)

### **B-3. Fixation de la lactotransferrine**

Les cellules sont cultivées dans des plaques de 24 puits pendant 2 à 21 jours, rincées trois fois avec du DPBS+ froid et équilibrées à 4°C. Les milieux d'incubation sont préparés avec du DPBS+ contenant 5 mg/ml de sérum albumine bovine avec des concentrations variées de lactotransferrine humaine diférique marquée à l' $^{125}\text{I}$ . La fixation est commencée en aspirant la solution de rinçage et en ajoutant 0,2 ml de milieu d'incubation dans chaque puits. Après 90 min. d'incubation à 4°C, 100  $\mu\text{l}$  du milieu d'incubation sont collectés et le reste est aspiré. Les monocouches cellulaires sont rincées avec 0,4 ml de DPBS+ cinq fois et détachées dans le DPBS+. Les radioactivités fixées à la cellule et non fixées à la cellule sont déterminées par comptage des cellules détachées et du milieu d'incubation collecté, à l'aide d'un LKB 1282 CompuGamma  $\gamma$ -counter. Les constantes de dissociation et les nombres de sites de fixation sont déterminés selon Scatchard (1949) avec l'aide d'un programme d'analyse de données de régression non-linéaire (Elsevier-BIOSOFT, Cambridge, UK). Afin de vérifier la spécificité de fixation de la lactotransferrine humaine, les expériences d'inhibition sont effectuées comme ci-dessus, sauf que les monocouches cellulaires sont incubées avec des mélanges de lactotransferrine diférique marquée à l' $^{125}\text{I}$  et de concentrations variées de lactotransferrine humaine diférique, native, de sérotransferrine humaine diférique, de lysozyme et de glycopeptides de lactotransferrine humaine.

## **C. Résultats et discussion**

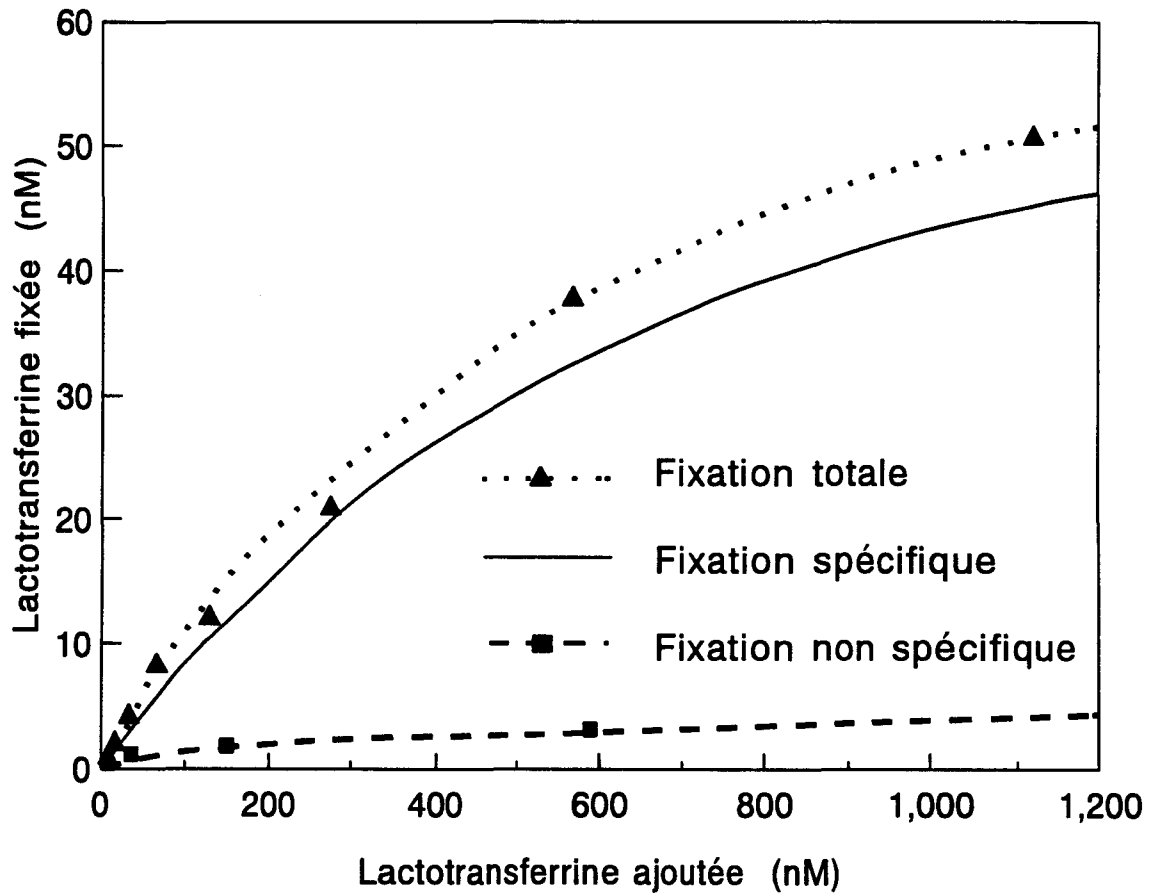
### **C-1. Evolution de la fixation de la lactotransferrine en fonction de l'âge des cellules**

Premièrement, nous avons examiné les variations de la nature de la fixation de la lactotransferrine en fonction de l'âge des cellules, en utilisant les cellules HT29-18-C<sub>1</sub>. Quatre états de culture cellulaire ont été utilisés pour ces expériences: les cellules cultivées pendant 2, 8, 15 et 22 jours après l'ensemencement, représentant respectivement des cellules en phase exponentielle de croissance, des cellules à peine différenciées, modérément différenciées et complètement différenciées. Dans chaque état, les cellules présentent une fixation concentration-dépendante de la lactotransferrine. La FIG. 16 (voir p. 90) montre un exemple de fixation de la lactotransferrine sur les cellules cultivées, dans ce cas, pendant 2 jours après l'ensemencement. La nature de la fixation sur les cellules dans différents états a été analysée selon Scatchard (1949) et résumée dans le TABLEAU 5 (voir p. 91). Alors que l'affinité de fixation reste inchangée ou légèrement affaiblie au cours la différenciation, le nombre de récepteurs augmente considérablement (environ 7 fois) au début de la différenciation. Ces résultats suggèrent que l'expression du récepteur de la lactotransferrine est régulée en fonction de la prolifération, comme le récepteur de la transferrine (voir Généralités, p. 42). Cependant, il faut noter que le récepteur de la lactotransferrine est exprimé à un faible taux à la surface apicale des cellules différenciées en entérocytes.

### **C-2. Comparaison des modalités de la fixation de la lactotransferrine sur différentes lignées cellulaires différenciées**

Deuxièmement, nous avons comparé la fixation de la lactotransferrine sur quatre lignées cellulaires différentes complètement différenciées, c'est-à-dire les cellules cultivées pendant 21 jours ou plus, après l'ensemencement. Le TABLEAU 6 (voir p. 91) montre les résultats de l'analyse de Scatchard, indiquant que la fixation de la lactotransferrine sur les quatre lignées cellulaires semble similaire et qu'elle est comparable à celle trouvée sur les cellules HT29-D4, un autre clone de HT29, ainsi que sur les cellules intestinales de





**FIG. 16** Fixation de la lactotransferrine sur les cellules HT29 clone 18C<sub>1</sub> prédifférenciées. Les cellules sont cultivées pendant 2 jours après l'ensemencement.

**Tableau 5 Evolution de la nature de la fixation de la lactotransferrine sur les cellules HT29-18-C<sub>1</sub> en fonction de l'âge des cellules**

Age des cellules (jours)	$K_d$ (M)	Nombre de sites de fixation (par cellule)	$n^*$
2	$7.29 \pm 0.72 \times 10^{-7}$	$2.18 \pm 0.02 \times 10^7$	2
8	$8.75 \pm 1.63 \times 10^{-7}$	$5.71 \pm 1.41 \times 10^6$	4
15	$9.21 \pm 2.05 \times 10^{-7}$	$3.21 \pm 0.86 \times 10^6$	4
22	$1.03 \pm 0.30 \times 10^{-6}$	$3.04 \pm 0.86 \times 10^6$	3

\*  $n$ : nombre d'expériences indépendantes

**Tableau 6 Comparaison de la fixation de la lactotransferrine sur différentes lignées cellulaires différenciées en entérocytes\***

Lignée cellulaire	$K_d$ (M)	Nombre de sites de fixation (par cellule)	$n^{**}$
Caco-2	$1.67 \pm 0.05 \times 10^{-6}$	$2.44 \pm 0.95 \times 10^6$	2
HT29 Glc- Ino+	$1.20 \pm 0.15 \times 10^{-6}$	$7.16 \pm 3.16 \times 10^6$	3
HT29 cl.19A	$1.40 \pm 0.79 \times 10^{-6}$	$2.41 \pm 1.14 \times 10^6$	2
HT29-18-C <sub>1</sub>	$1.03 \pm 0.30 \times 10^{-6}$	$3.04 \pm 0.86 \times 10^6$	3

\* Les cellules sont cultivées pendant plus de 21 jours après l'ensemencement.

\*\*  $n$ : nombre d'expériences indépendantes

différentes espèces (voir TABLEAU 4, p. 69).

### **C-3. Spécificité de la fixation de la lactotransferrine sur les lignées cellulaires en culture**

Finalement, la spécificité de fixation de la lactotransferrine sur la lignée cellulaire différenciée HT29 clone 19A, a été examinée par fixation compétitive avec différents ligands. Les résultats détaillés sont exposés dans le chapitre II des Travaux Personnels (voir p. 113). Brièvement, la fixation de la lactotransferrine humaine diferrique marquée à l'<sup>125</sup>I est inhibée de la même façon par la lactotransferrine humaine native (dont le degré de saturation en fer est environ 10%) et par la lactotransferrine diferrique non marquée. Ceci suggère que les deux lactotransferrines humaines (native et diferrique) se fixent avec la même affinité sur les mêmes sites à la surface apicale des cellules HT29 clone 19A. De plus, d'après les expériences de fixation compétitive réalisées avec la sérotransferrine humaine diferrique, le lysozyme et les glycopeptides de la lactotransferrine humaine, il est peu probable que la sérotransferrine se fixe sur les mêmes sites que la lactotransferrine et que les interactions électrostatiques ou lectiniques soient impliquées dans la fixation de la lactotransferrine humaine.

### **D. Conclusion**

L'expression du récepteur de la lactotransferrine sur les cellules intestinales en culture semble être régulée en fonction du degré de prolifération. Néanmoins, le récepteur est aussi exprimé, en moindre quantité, à la surface apicale des cellules différenciées en entérocytes. Dans la phase différenciée, la fixation de la lactotransferrine sur les quatre lignées cellulaires utilisées est similaire, et aussi comparable la fixation de la lactotransferrine sur les cellules intestinales de plusieurs espèces incluant l'Homme. Il est probable que cette fixation soit spécifique, et ne résulte pas d'interactions non spécifiques de type électrostatique ou lectinique. Ces résultats confirment que les lignées cellulaires intestinales humaines en culture sont un bon modèle pour étudier les rôles de la lactotransferrine dans l'absorption intestinale du fer.

## II. Etude du transport transépithélial de la lactotransferrine et de son fer à travers les monocouches cellulaires différenciées en entérocytes

### A. Introduction

La fixation spécifique de la lactotransferrine a été mise en évidence sur les membranes de bordure en brosse intestinales de plusieurs espèces animales incluant l'Homme (Mazurier *et al.*, 1985; Hu *et al.*, 1988, 1990; Davidson & Lönnnerdal, 1988; Kawakami & Lönnnerdal, 1991). De plus, les récepteurs de la lactotransferrine ont été isolés à partir de membrane de bordure en brosse d'intestin de Souris (Hu *et al.*, 1990) et de foetus humain (Kawakami & Lönnnerdal, 1991). Cependant, peu de choses sont connues en ce qui concerne les fonctions du récepteur de la lactotransferrine au niveau des cellules intestinales.

#### A-1. Destinée de la lactotransferrine fixée sur les membranes de bordure en brosse

Cox *et coll.* (1979) ont démontré en utilisant des biopsies de duodénum humain, que le fer, mais pas la lactotransferrine, s'accumulait à l'intérieur des cellules quand elles étaient incubées avec de la lactotransferrine humaine diferrique. Roiron-Lagroux et Figarella (1990) ont montré qu'aucune internalisation de la lactotransferrine fixée à la surface des cellules, ne se produisait dans les cellules HT29-D4. A l'inverse de ces résultats, des observations *in vivo* ont suggéré que la lactotransferrine luminale pouvait se retrouver dans la circulation sanguine, en particulier chez les enfants prématurés (Scott, 1989a, b). Cette possibilité a été confirmée par la découverte de lactotransferrine humaine intacte, provenant du lait maternel, dans l'urine d'enfants prématurés (Hutchens *et al.*, 1991a, b). Néanmoins, le transport à travers

l'épithélium intestinal reste à élucider pour savoir s'il s'agit d'un transport transcellulaire ou paracellulaire.

## A-2. La transcytose

Les macromolécules peuvent être transportées à travers les cellules endothéliales et épithéliales polarisées par un procédé appelé transcytose, découvert par l'équipe de Simionescu (Vasile *et al.*, 1983) et pour revues générales, voir Mostov & Simister (1985) et Rodman *et al.* (1990). Une grande variété de macromolécules pénètrent dans la cellule par endocytose: il peut s'agir d'un processus effectué par l'intermédiaire d'un récepteur qui est extrêmement efficace ou bien d'un processus qui ne fait pas intervenir de récepteur c'est-à-dire une endocytose adsorptive non spécifique ou une endocytose en phase fluide (Shen *et al.*, 1992). Les macromolécules internalisées se retrouvent dans l'endosome et peuvent avoir trois destinées différentes. Beaucoup de protéines comme la transferrine et son récepteur sont recyclées vers la surface cellulaire d'origine. D'autres, comme le facteur de croissance de l'épiderme (EGF) et son récepteur sont dirigés vers les lysosomes où ils sont dégradés. Seule une petite partie des macromolécules sont orientées vers des vésicules transcytotiques, qui migrent vers le pôle opposé de la cellule et fusionnent avec la membrane plasmique, libérant ainsi leur contenu dans une forme non-dégradée.

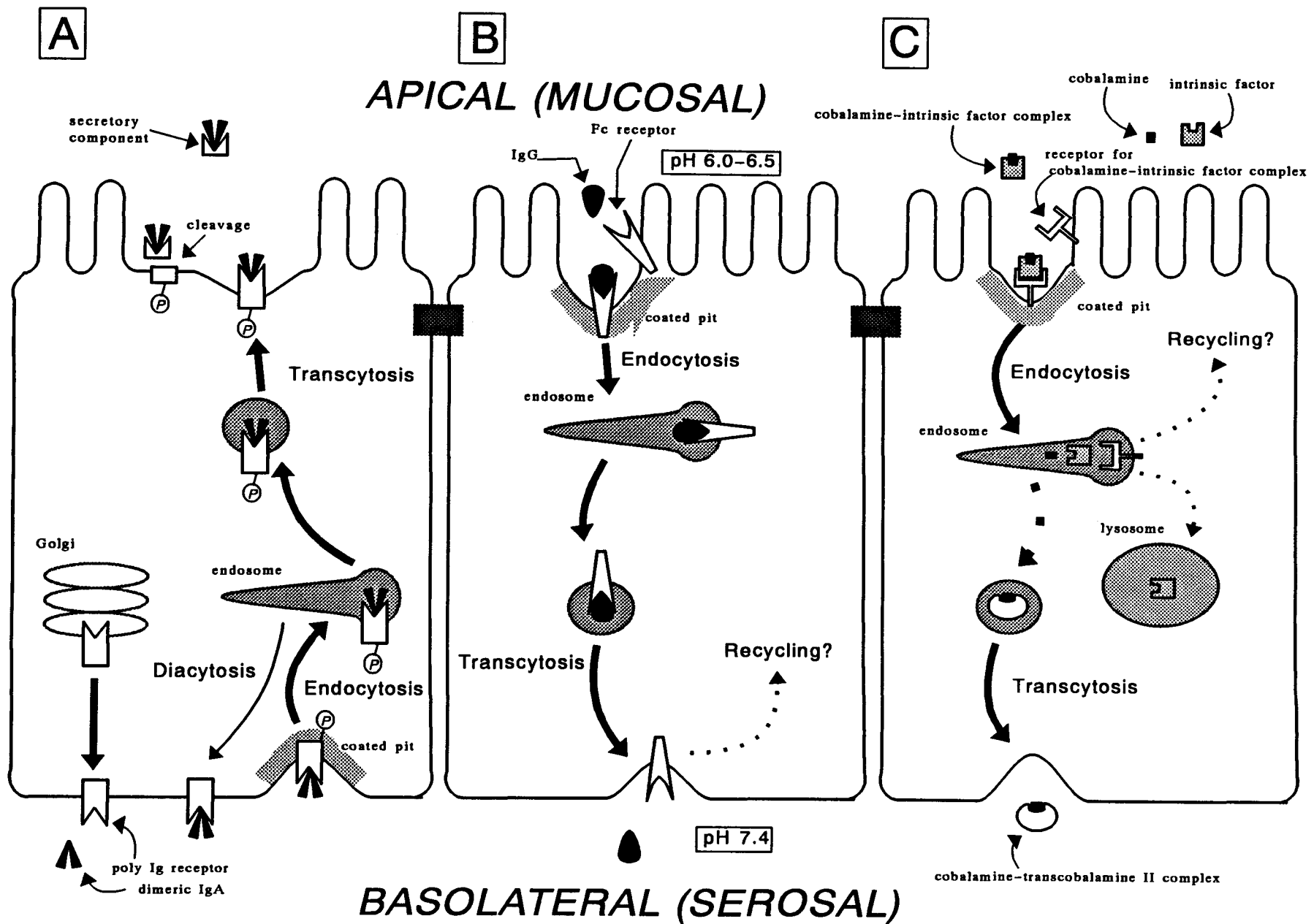
La transcytose peut s'effectuer à partir du côté apical vers le côté basolatéral des cellules polarisées et inversement. La transcytose a été mise en évidence dans différentes cellules épithéliales ou endothéliales: c'est le cas pour le transport de l'insuline et de la sérum albumine à travers les cellules endothéliales (King & Johnson, 1985; Ghitescu *et al.*, 1986), l'EGF à travers les cellules épithéliales de rein (Marotos-Flier *et al.*, 1987; Brandli *et al.*, 1991), la sérotransferrine à travers les cellules endothéliales de capillaires cérébraux (barrière cérébrale sanguine; Fishman *et al.*, 1987), l'immunoglobuline G (IgG) à travers les syncytiotrophoblastes du placenta (barrière placentaire; Stuart *et al.*, 1989) et les cellules épithéliales intestinales.

*a) La transcytose à travers les cellules de l'épithélium intestinal par l'intermédiaire de récepteur*

La transcytose effectuée par l'intermédiaire de récepteur de plusieurs solutés a lieu à travers les cellules de l'épithélium intestinal dans les deux directions: de la surface apicale vers la surface basolatérale et inversement.

*Transcytose d'IgA dimérique par l'intermédiaire du récepteur d'immunoglobuline polymérique*

Le transport d'immunoglobulines polymériques à travers différents épithélia incluant l'épithélium intestinal, est l'un des exemples les mieux étudiés de transcytose (revue générale par Apodaca *et al.*, 1991). Il est bien établi que le processus de transcytose du côté basolatéral vers le côté apical s'effectue par l'intermédiaire du récepteur spécifique des immunoglobulines polymériques. Ce récepteur possède une partie extracellulaire fixant le ligand et un domaine C-terminal cytoplasmique de 103 acides aminés. La partie extracellulaire est constituée de cinq domaines homologues qui se répètent, comprenant chacun 100–110 résidus d'acides aminés et appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Mostov *et al.*, 1984). Le mécanisme de transcytose est résumé dans la FIG. 17-A (voir p. 96). L'immunoglobuline A (IgA) dimérique sécrétée par les plasmocytes sous-muqueux se fixe au récepteur des immunoglobulines polymériques qui est exprimé spécifiquement à la surface basolatérale des cellules de l'épithélium intestinal. Le complexe récepteur-ligand est alors endocyté, pénètre dans les endosomes basolatéraux puis est incorporé dans des vésicules de transcytose qui le conduisent à la surface apicale. La libération de l'IgA dimérique dans la lumière intestinale est réalisée par clivage de la partie extracellulaire, fixant le ligand, du récepteur d'immunoglobuline polymérique. Le fragment libéré, appelé pièce sécrétoire, reste associé avec l'IgA ce qui permet de la stabiliser contre la dénaturation ou la protéolyse dans la lumière intestinale. Les IgA sécrétoires (sIgA) c'est-à-dire l'IgA dimérique associée avec la pièce sécrétoire, représentent la première défense immunologique spécifique contre l'infection.



**FIG.17** Transcytoses à travers les cellules de l'épithélium intestinal par l'intermédiaire de récepteur: A) transcytose de l'IgA, B) transcytose du l'IgG, C) transcytose de la cobalamine

*La transcytose des IgG maternelles par l'intermédiaire du récepteur de Fc existe chez les Rats nouveau-nés*

Il est bien établi que l'immunité passive, c'est-à-dire le transfert sélectif des immunoglobulines du lait maternel dans le sang des nouveau-nés, a lieu pour certaines espèces incluant les Rongeurs. Beaucoup d'études ont été réalisées sur la transcytose des IgG par l'intermédiaire de récepteur chez les Rats nouveau-nés (Jones & Waldmann, 1972; Rodewald & Kraehenbuhl, 1984; Solari *et al.*, 1984; Mackenzie, 1984; Hasegawa *et al.*, 1987). Le récepteur spécifique de la partie Fc des immunoglobulines est exprimé à la surface des membranes de bordure en brosse intestinales, uniquement chez les nouveau-nés. Les IgG maternelles se fixent sur ce récepteur à pH légèrement acide (6-6,5), correspondant au pH du lumen intestinal. Les IgG sont alors transcytosées sous la forme d'un complexe récepteur-ligand stable, de la surface apicale vers la surface basolatérale. Le complexe est dissocié lorsqu'il se trouve exposé au pH neutre (environ 7,4) du plasma et le récepteur peut alors être recyclé afin de recommencer un nouveau transport (FIG. 17-B, voir p.96). La structure du récepteur spécifique de Fc a été analysée à partir de l'intestin grêle de Rats nouveau-nés (Simister & Rees, 1985; Simister & Mostov, 1989). Ce récepteur est un hétérodimère composé d'une petite sous-unité (14 kDa) qui n'est autre que la  $\beta_2$ -microglobuline et d'une grande sous-unité (51 kDa) qui possède 50% d'identité avec les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I.

*La transcytose de la cobalamine alimentaire par l'intermédiaire du récepteur spécifique du complexe cobalamine-facteur intrinsèque*

Il est également bien établi que chez les espèces plus évoluées, incluant l'Homme, l'absorption intestinale de la cobalamine alimentaire (vitamine B<sub>12</sub>) fixée à un facteur intrinsèque gastrique est réalisée par l'intermédiaire d'un récepteur localisé sur les membranes de bordure en brosse des cellules iléales (Seetharam & Alpers, 1985). Après l'internalisation du complexe cobalamine-facteur intrinsèque par l'intermédiaire de son récepteur, la cobalamine est libérée du facteur intrinsèque probablement dans les vésicules acides (Robertson & Gallager, 1985). La cobalamine est alors transportée vers la surface basolatérale



fixée à un transporteur plasmatique, la transcobalamine II, synthétisé par la cellule même (Rothenberg *et al.*, 1978). La FIG. 17-C (voir p. 96) résume le mécanisme de transcytose de la cobalamine. Néanmoins, l'étape de fixation de la cobalamine sur la transcobalamine II reste à élucider.

***b) Les transcytoses à travers les cellules de l'épithélium intestinal ne faisant pas intervenir de récepteur***

La plupart des macromolécules comme les protéines alimentaires ne passent pas la barrière de l'épithélium intestinal. Néanmoins, une petite partie de ces macromolécules est transportée, sous forme intacte, de la surface apicale vers la surface basolatérale des cellules de l'épithélium intestinal (revue générale par Heyman & Desjeux, 1992). Le transport transépithélial de la  $\beta$ -lactoglobuline, une protéine du lait, et de la peroxydase de Raifort, un marqueur de phase fluide, a été étudié à partir de fragments intestinaux de mammifères incluant l'Homme (Heyman *et al.*, 1982, 1986a, b, 1988, 1989, 1990a; Marcon-Genty *et al.*, 1989). L'ensemble des résultats (TABLEAU 7, voir p. 99) a montré que, quand les macromolécules sont placées du côté apical de la couche épithéliale à une concentration de 1 mg/ml, elle sont transportées vers le côté basolatéral à une vitesse de 2-4  $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ . De plus, plus de 90% des macromolécules transportées vers le côté basolatéral ont été trouvées sous forme dégradée, suggérant une intervention des lysosomes, tandis que moins de 10% ont été transcytosées sous forme intacte. Le mécanisme de transcytose de macromolécules sous forme intacte est encore obscur, mais il est peu probable qu'il s'agisse, dans les conditions normales, d'un transport paracellulaire puisque des inhibiteurs métaboliques ou un inhibiteur de l'assemblage des microtubules inhibe fortement le transport (Heyman *et al.*, 1982; Marcon-Genty *et al.*, 1989). Il est possible que le transport transépithélial de protéine sous forme dégradée et intacte possède une importance physiologique au niveau de la fonction de présentation d'antigènes des entérocytes (Heyman & Desjeux, 1992). Ceci est envisageable dans la mesure où les entérocytes sont capables d'exprimer l'antigène du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II à leur surface basolatérale (Cerf-Bensussan *et al.*, 1984; Mayrhofer *et al.*, 1989; Kaiserlian *et al.*, 1989).



**TABLEAU 7 Comparaison de la transcytose de différentes protéines à travers des épithélia intestinaux**

Modèle	Protéine	Conc. apicale ( $\mu\text{g/ml}$ )	Flux total ( $\text{ng}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	Flux de protéine intacte (% de flux total)	Réf. *
Caecum de Souris	HRP	400	425	2	(1)
Jejunum de Souris	HRP	400	2.191	15	(2)
Jejunum de Lapin	HRP	400	4.500	3	(3)
Jejunum de Cochon d'Inde	HRP	400	791	3	(4)
Jejunum d'enfants	HRP	400	1.027	12	(5)
Ileum de Lapin	$\beta$ -Lg	1.000	6.210	6	(6)
Caco-2	HRP	400	1.132	3	(7)
HT29 clone 19A	HRP	400	1.223	13	(8)

Le transport transépithélial a été mesuré à l'aide de chambres d'Ussing.

HRP (horseradish peroxidase): peroxydase de Raifort

$\beta$ -Lg:  $\beta$ -lactoglobuline

\* Références: (1) Heyman *et al.*, 1989; (2) Heyman *et al.*, 1986a; (3) Heyman *et al.*, 1982; (4) Heyman *et al.*, 1990a; (5) Heyman *et al.*, 1988; (6) Marcon-Genty *et al.*, 1989; (7) Heyman *et al.*, 1990b; (8) Hirribaren *et al.*, 1993.

### **A-3. Conclusion**

Bien que la fixation spécifique de la lactotransferrine sur les membranes de bordure en brosse intestinales soit démontrée, les devenir de la lactotransferrine et du fer qui lui est lié après la fixation sur les membranes de bordure en brosse restent à élucider. Toutefois, les études *in vivo* indiquent que de la lactotransferrine provenant du lait maternel se retrouve dans la circulation sanguine.

Un grand nombre de macromolécules différentes sont transportées à travers les cellules épithéliales et endothéliales. Cependant, le mécanisme précis du processus transcytotique n'est pas encore élucidé. Dans les cellules de l'épithélium intestinal, seuls quelques exemples de macromolécules transportées par l'intermédiaire de récepteur ont été mis en évidence, alors que des quantités immunologiquement significative, de différentes protéines alimentaires semblent être transportées sous forme intacte par des processus ne faisant pas intervenir de récepteur.

## **B. Article soumis à publication dans *American Journal of Physiology***

Dans la deuxième partie de nos travaux, nous avons tenté d'étudier le transport transépithélial, du côté apical vers le côté basolatéral des cellules intestinales, de la lactotransferrine et du fer qui lui est lié. Pour cela, nous avons utilisé des monocouches de cellules HT29 clone 19A cultivées sur filtre pour les raisons suivantes:

- 1) la lignée cellulaire HT29 clone 19A présente une différenciation de type entérocytaire et une capacité de transport transépithélial des solutés comme décrit dans le paragraphe I-A-1-d des Travaux Personnels (cf. page 82),
- 2) les cellules différenciées HT29 clone 19A fixent spécifiquement la lactotransferrine de la même manière que les entérocytes, comme démontré dans le paragraphe I-C des Travaux Personnels,
- 3) des études de transcytose ne faisant pas intervenir de récepteur ont déjà été réalisées avec les cellules HT29 clone 19A en utilisant la peroxydase de Raifort comme marqueur de phase fluide (Hirribaren *et al.*, 1993). Ces travaux constitueront donc pour nous un excellent point de comparaison.

**APICAL TO BASOLATERAL TRANSCYTOSIS OF HUMAN  
LACTOFERRIN IN THE HUMAN DIFFERENTIATED COLON  
CARCINOMA CELL LINE HT29 cl.19A**

**Takashi Mikogami\* , Martine Heyman§, Geneviève Spik\* and Jehan-François Desjeux§**

**\*Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille, Unité Mixte de Recherche du CNRS n° 111, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France and §INSERM Unité n° 290, Hôpital Saint-Lazare, 75010 Paris, France**

**Abbreviated title: Intestinal Transcytosis of Lactoferrin**

## B-1. Abstract

The role of human lactoferrin (hLf) in alimentary iron absorption across intestinal cells was explored by using a human differentiated colon carcinoma cell line HT29 cl. 19A. The apical surface of HT29 cl. 19A cell monolayers exhibited  $1.5 \times 10^6$  specific binding sites per cell for both diferric and native hLf (<10% iron saturation) with similar affinities ( $K_d = 8.3 \times 10^{-7}$  M). The apical to basolateral transcytosis of  $^{125}\text{I}$ -labeled diferric hLf ( $^{125}\text{I}$ -hLf) or dual-labeled  $^{125}\text{I}$ - $^{59}\text{Fe}$ -diferric hLf ( $^{125}\text{I}$ - $^{59}\text{Fe}$ -hLf) was investigated using filter-grown HT29 cl.19A cell monolayers mounted in Ussing chambers. Transcytosis of total hLf (intact plus degraded) measured by the  $^{125}\text{I}$ -flux, was concentration-dependent and not saturable up to an apical hLf concentration of  $12.5 \mu\text{M}$ . This total hLf flux was inhibited both at  $4^\circ\text{C}$  by  $\sim 77\%$  and after the addition of  $500 \mu\text{M}$  colchicine by  $\sim 30\%$ . At an apical concentration of  $3.75 \mu\text{M}$  diferric  $^{125}\text{I}$ - $^{59}\text{Fe}$ -human hLf, the intact hLf flux ( $64.6 \pm 14.3 \text{ ng}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) constituted  $\sim 12\%$  of the total hLf flux ( $552.0 \pm 61.6 \text{ ng}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), indicating considerable intracellular processing, and was similar to the  $^{59}\text{Fe}$  hLf-equivalent flux ( $77.0 \pm 12.3 \text{ ng}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). This suggests that iron might be transported across the cell monolayers by the intact hLf. Electrophoretic characterization of the basolateral compartment contents showed that after transcytosis,  $^{125}\text{I}$ -hLf consisted of intact hLf and two types of degraded fragments (<2 and 10–20 kDa). These results suggest that hLf may be transported across the intestinal epithelial cell via two intracellular pathways: a major degradative pathway transporting  $\sim 90\%$  and leading to iron release from hLf, subsequent intracellular iron retention and the transcellular transport of degraded fragments, and a minor pathway transporting  $\sim 10\%$  that allows the passage of intact hLf and its bound iron. The role of specific hLf-receptors in these two pathways is not yet clear.

## INDEX TERMS

lactotransferrin, enterocyte, intestine, fluid-phase endocytosis, receptor-mediated endocytosis, iron absorption, human milk

## B-2. Introduction

Human lactoferrin (hLf), also called lactotransferrin (Montreuil *et al.*, 1960), is a ~80 kDa bi-lobed protein (Anderson *et al.*, 1989) that reversibly binds two ferric ions. Its single polypeptide chain (Metz-Boutigue *et al.*, 1984) contains two N-acetyllactosaminic type glycans (Spik *et al.*, 1982b). The high concentration of lactoferrin (Lf) in human milk (~1 g/l), the higher iron bioavailability in human milk than cow's milk formula (Saarinen *et al.*, 1977) and the high resistance of hLf to gastrointestinal proteolysis (Spik *et al.*, 1982a) suggest that it might be involved in intestinal iron absorption. This possibility was strengthened by the demonstration that hLf can deliver iron to intestinal mucosal cells from human duodenal biopsies (Cox *et al.*, 1979). Furthermore, unlike transferrin receptors, which are specifically localized at the basolateral membrane of the enterocyte (Banerjee *et al.*, 1986), specific Lf receptors were found in the brush border membranes of rabbit (Mazurier *et al.*, 1985), mouse (Hu *et al.*, 1988; Hu *et al.*, 1990), rhesus monkey (Davidson & Lönnerdal, 1988) and human fetal enterocytes (Kawakami & Lönnerdal, 1991). However, the biological role of Lf receptors is not yet clear. Recently, intact hLf of maternal origin was found in the urine of human milk-fed preterm infants (Hutchens *et al.*, 1991a), indicating that significant transepithelial transport of hLf occurs in the intestine of such infants. The transepithelial transport route of hLf (i.e., its transcellular or paracellular pathway), has not yet been characterized, and neither have the nature of Lf receptor involvement in the transepithelial transports of hLf and the iron bound by hLf, nor the biological importance of the hLf absorbed by the intestine.

The aims of the present study were to ascertain how hLf is transported across intestinal epithelial cell monolayers, and the fate of the iron bound by hLf, using filter-grown HT29 cl.19A cells as the model of intestinal epithelia. We report here that hLf specifically binds to the apical surface of differentiated HT29 cl.19A cell monolayers and exhibits apical to basolateral transcytosis across these monolayers.

### B-3. Materials and methods

#### a) Materials

Dulbecco's phosphate buffered saline containing 1 mM calcium and 0.5 mM magnesium, pH 7.3 (DPBS+), bovine serum albumin (BSA), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), pepstatin, *o*-phenylenediamine dihydrochloride and hen egg lysozyme were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO). Iodo-Gen was from Pierce (Rockford, IL). Na<sup>125</sup>I (100 mCi/ml), <sup>59</sup>FeCl<sub>3</sub> (1–50 mCi/mg Fe) and Hyperfilm-MP autoradiography films were from Amersham (Amersham, UK). PD-10 prepacked Sephadex G-25 M columns were from Pharmacia LKB Biotechnology (Uppsala, Sweden). Bio-Gel P2 and Chelex 100 were from Bio-Rad (Brussels, Belgium) and DEAE-Trisacryl was from IBF (Villeneuve-la-Garenne, France). Centricon-30 centrifugal microconcentrators (30 kDa cutoff) were from Grace (Amicon; Danvers, MA). N-[Tris-(hydroxymethyl)methyl]glycine (Tricine) was from Fluka Chimie (Buchs, Switzerland). Human transferrin (hTf) was purchased from Hoechst-Behring (Rueil-Malmaison, France).

Human lactoferrin (hLf) was purified from human milk as described earlier (Spik *et al.*, 1982b) and its iron saturation rate was <10%. This native hLf was saturated with iron as described elsewhere (Mazurier & Spik, 1980) using *the saturating solution* (0.1 M sodium citrate and 0.1 M sodium bicarbonate, pH 8.2) containing appropriate amounts of FeCl<sub>3</sub> (Azari & Baugh, 1967). hLf glycopeptides (average molecular mass: ~3 kDa), consisting of small peptides (4–6 residues) and intact hLf glycans, were prepared by three successive 24 h pronase hydrolyses followed by purification by gel filtration on Bio-Gel P2 (Spik *et al.*, 1982b).

#### b) Cell culture

HT29 cl.19A, a permanently differentiated cell clone isolated from the human colon carcinoma cell line HT29 treated with sodium butyrate (Augeron & Laboisie 1984), was a gift from Dr. C. Laboisie (INSERM U239, Paris, France) and was used between passages 10 and 30. HT29 cl.19A cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Boehringer



Mannheim, Germany) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) at 37°C in a humidified atmosphere of 94% air and 6% CO<sub>2</sub>. Cells were subcultured weekly and seeded at 4 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> in 25 cm<sup>2</sup> Falcon flasks (Becton-Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ), and the medium was changed daily. Cells were routinely screened for the absence of mycoplasma contamination, using Chen's method (Chen, 1977).

For experimental purposes, cells were cultured in the above medium supplemented with 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. For the binding studies, they were plated at 4 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> in 24-well Linbro plates (Flow Laboratories, Puteaux, France) and for the transport studies, at 8 × 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> in Transwell polycarbonate filter tissue culture inserts (Costar, Cambridge, MA) with a pore size of 0.45 µm and a diameter of 12 mm or 24.5 mm. On reaching confluence, they progressively formed monolayers polarized with tight junctions. Well-differentiated monolayers that had been cultured at least 21 days were used for the experiments. Their transepithelial electrical resistance (TEER) at 37°C was 124 ± 11 Ω·cm<sup>2</sup>.

### *c) Human lactoferrin labeling*

Diferric hLf was iodinated using Iodo-Gen, which was coated on the walls of a glass vial, according to the manufacturer's instructions. One mg of hLf and 400 µCi of Na<sup>125</sup>I were incubated in the tube, which had been coated with 100 µg of Iodo-Gen, for 30 min at 4°C in a final volume of 200 µl 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2. After incubation, diferric <sup>125</sup>I-hLf was separated from free <sup>125</sup>I by gel filtration on a PD-10 Sephadex G-25 M column equilibrated with DPBS+. To eliminate the remaining free <sup>125</sup>I, three successive concentration-dilution procedures were done using membrane ultrafiltration, as described by Lipford *et al.* (Lipford *et al.*, 1990) with some modifications: the diferric <sup>125</sup>I-labeled hLf fraction eluted from the Sephadex column was centrifuged in a Centricon-30 microconcentrator at 4500 g for 30 min, and 1.5 ml of DPBS+ was added to the concentrate, a procedure that was repeated three times. The specific activity of the diferric <sup>125</sup>I-hLf ranged from 4 to 7 × 10<sup>7</sup> cpm/nmol.

For dual labeling with  $^{59}\text{Fe}$  and  $^{125}\text{I}$ , native hLf was first saturated with  $^{59}\text{Fe}$  and then radioiodinated. Twenty-five nmol of  $^{59}\text{FeCl}_3$  in 0.1 M HCl and 200  $\mu\text{l}$  of *the saturating solution* were mixed, incubated for 10 min at room temperature and adjusted to pH 8.2 with 1 M HCl. One mg (12.5 nmol) of hLf in *the saturating solution* was added to this  $^{59}\text{Fe}$  citrate solution, which was then incubated for 3 h at room temperature. Unbound  $^{59}\text{Fe}$  was removed by adding to the mixture 50  $\mu\text{l}$  of Chelex 100 pre-equilibrated with *the saturating solution*, and stirring gently for 5 min. This diferric  $^{59}\text{Fe}$ -hLf solution was transferred to the Iodo-Gen-coated tube and iodinated with  $\text{Na}^{125}\text{I}$  as described above. The  $^{125}\text{I}$ - and  $^{59}\text{Fe}$ -specific activities of diferric  $^{125}\text{I}$ - $^{59}\text{Fe}$ -hLf ranged from 1 to  $2 \times 10^7$  cpm/nmol and from  $3$  to  $8 \times 10^5$  cpm/nmol, respectively.

***d) Human lactoferrin binding to the apical surface of HT29 cl.19A cells***

HT29 cl.19A cell monolayers were cultured in 24-well plates for over 21 days, rinsed three times with cold DPBS+ and equilibrated at 4°C. Incubation media were prepared in DPBS+ with 5 mg/ml BSA so as to contain the required final concentrations of diferric  $^{125}\text{I}$ -hLf. Binding was initiated by aspirating the rinsing solution and adding 0.2 ml of the incubation medium to each well. After 90 min incubation at 4°C, 100  $\mu\text{l}$  of the incubation medium was collected and the remainder was aspirated. Cell monolayers were rinsed with 0.4 ml ice-cold DPBS+ five times and scraped off in DPBS+. Cell-bound and cell-unbound radioactivities were determined by counting the scraped cells and the collected incubation medium in an LKB 1282 CompuGamma  $\gamma$ -counter. Dissociation constants and numbers of binding sites were determined according to Scatchard (Scatchard, 1949) with the aid of the Enzfitter non-linear regression data analysis program (Elsevier-BIOSOFT, Cambridge, UK). Specific and nonspecific binding were estimated using the fitting program for two binding sites included in Enzfitter. To check the specificity of hLf binding to HT29 cl.19A monolayers, inhibition assays were performed as above, except that cell monolayers were incubated with mixtures of 50 nM diferric  $^{125}\text{I}$ -hLf and various concentrations of diferric hLf, native hLf, diferric hTf, lysozyme and hLf glycopeptides.

## ***e) Human lactoferrin transport studies in Ussing chambers***

### ***1. Measurement of electrical parameters in Ussing chambers***

The transepithelial potential difference (PD) and TEER across the cell monolayers were measured as previously described (Grasset *et al.* 1984, Heyman *et al.* 1990b). Briefly, the bathing solutions in the apical and basolateral compartments were connected via 3 M KCl agar bridges to calomel electrodes for measurement of PD, and to Ag–AgCl electrodes for the passage of current through the system. Monolayers were maintained under open-circuit conditions and pulses of 10  $\mu$ A current were periodically applied to the system for measurement of TEER, using the PD deflection, except when recording short-circuit current. The offset of the electrodes was regularly checked by short-circuiting and disconnecting them from the chamber.

### ***2. Studies of apical to basolateral transport of $^{125}$ I-labeled diferric human lactoferrin***

Filter-grown HT29 cl.19A cell monolayers were used for hLf transport studies in Ussing chambers with an exposed surface area of 0.15 cm<sup>2</sup>. Chambers were coated with FBS to minimize nonspecific hLf binding to the chamber surface by incubation for 1 h at 37°C with 10% FBS in Ringer solution (in mM, 140 Na<sup>+</sup>, 5.2 K<sup>+</sup>, 120 Cl<sup>-</sup>, 25 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 2.4 HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 0.4 H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, 1.2 Ca<sup>2+</sup> and 1.2 Mg<sup>2+</sup>, pH 7.4 in 5% CO<sub>2</sub>) and then rinsed with Ringer at least five times. Cell monolayers were rinsed with Ringer, gently cut out from Transwells and mounted in the chambers. Silicon paste was used to minimize edge damage. Ringer (1.5 ml) was added to each compartment of the chambers, which were maintained at either 4 or 37°C, and oxygenated and circulated with a 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> gas lift. After 15 min equilibration, diferric  $^{125}$ I-hLf (final concentration:  $\sim 2 \times 10^7$  cpm/ml) and unlabeled diferric hLf were added to the apical compartments at a final concentration of 0.13, 1.25, 3.75 or 12.5  $\mu$ M (i.e., 10, 100, 300 or 1000  $\mu$ g/ml). At 10, 30, 50, 70, 90, 110 and 130 min, 800  $\mu$ l aliquots were removed from the basolateral compartments and replaced with fresh Ringer. The  $^{125}$ I-radioactivities of 500  $\mu$ l aliquots were measured in a Kontron Gammamatic  $\gamma$ -counter and immunologically reactive hLf was determined by ELISA in the remainder 300  $\mu$ l as described

below. The  $^{125}\text{I}$  hLf-equivalent flux, calculated from the  $^{125}\text{I}$ -flux according to the  $^{125}\text{I}$ -specific radioactivities of hLf, was assumed to represent the total hLf flux (i.e., intact plus degraded). The hLf flux measured by ELISA was assumed to represent the intact hLf flux. In some experiments, the cell monolayers mounted in Ussing chambers were preincubated in the presence of  $500\ \mu\text{M}$  colchicine for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ , and the same procedures as above were performed, except that the basolateral compartment solution was replaced by Ringer containing  $500\ \mu\text{M}$  colchicine.

### ***3. Studies of apical to basolateral transport of diferric human lactoferrin, dual-labeled with $^{125}\text{I}$ and $^{59}\text{Fe}$***

HT29 cl.19A cell monolayers grown on 24.5 mm diameter Transwells were directly mounted in specially modified Ussing chambers that had an exposure surface area of  $3.8\ \text{cm}^2$ , and had been precoated with silicon and FBS. Ringer (14 ml) were added to each compartment, and native hTf was added as an iron acceptor to the final concentration of  $25\ \mu\text{M}$  in the basolateral compartments. The solutions were maintained at  $37^\circ\text{C}$ , and oxygenated and circulated with a 95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$  gas lift. After 15 min equilibration, the transport studies were initiated by adding to the apical compartments diferric  $^{125}\text{I}$ - $^{59}\text{Fe}$ -hLf (final concentration:  $\sim 8 \times 10^6$  cpm/ml for  $^{125}\text{I}$ -radioactivity and  $\sim 3 \times 10^5$  cpm/ml for  $^{59}\text{Fe}$ -radioactivity) and unlabeled diferric hLf at a final concentration of  $3.75\ \mu\text{M}$  (i.e.,  $300\ \mu\text{g/ml}$ ). At 10, 40, 70, 100 and 130 min, 4 ml aliquots were withdrawn from the basolateral compartments and replaced with fresh Ringer containing  $25\ \mu\text{M}$  native hTf. The  $^{125}\text{I}$ - and  $^{59}\text{Fe}$ -radioactivities of these aliquots were measured in a Kontron Gammamatic  $\gamma$ -counter with double windows, and immunologically reactive hLf was determined by ELISA as described below. Total and intact hLf fluxes were estimated as indicated above, and the  $^{59}\text{Fe}$  hLf-equivalent flux was calculated from the  $^{59}\text{Fe}$ -flux according to the  $^{59}\text{Fe}$ -specific radioactivity of hLf.

### ***4. Analysis by ELISA of intact human lactoferrin transcytosis.***

To measure the transcytosis of intact hLf, 96-well Maxisorb microplates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with rabbit polyclonal anti-hLf IgG, which had been purified from

rabbit anti-hLf antiserum by chromatography on DEAE-Trisacryl, by incubation at 4°C overnight in 0.01 M bicarbonate buffer, pH 9.5. The remaining well surface was saturated for 30 min at room temperature with 2% Tween-20 in phosphate-buffered saline (PBS: 0.1 M sodium phosphate and 0.15 M NaCl, pH 7.2). After 2 h incubation at 37°C with sampled basolateral compartment solution, the microplates were incubated for 2 h in PBS at 37°C, first with mouse monoclonal anti-human hLf IgG, and then with peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Diagnostic Pasteur, Marnes-la-Coquette, France) in PBS at 37°C for 2 h. Staining was initiated by adding *o*-phenylenediamine dihydrochloride in 0.1 M acetate/citrate buffer, pH 5.0, and stopped by adding 20% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Optical density was measured at 490 nm using a Metertech microplate reader, Model Σ960. Microplates were rinsed with PBS containing 0.05% Tween-20 five times between every two steps.

##### ***5. Electrophoretic characterization of human lactoferrin after transcytosis.***

The procedures described above in section 3 for 3.8 cm<sup>2</sup> Ussing chambers were used with some modifications. Diferric <sup>125</sup>I-hLf was added to the apical compartment at a final concentration of 0.67 μM in 12 ml of Ringer. At 60 min, the apical and basolateral compartment solutions were collected, and PMSF, pepstatin and EDTA were added at final concentrations of 2 mM, 0.1 μM and 2 mM, respectively. They were analyzed by Tricine-sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (Tricine-SDS-PAGE) according to the method of Schägger & von Jagow (Schägger & von Jagow, 1987), which exhibits high resolving power, especially in the molecular mass range of 1 to 20 kDa. Samples were mixed with the same volume of twofold-concentrated sample buffer (8% SDS, 12% glycerol, 4% (v/v) β-mercaptoethanol and 50 mM Tris-HCl, pH 6.8) incubated at 40°C for 30 min and submitted to electrophoresis on SDS-polyacrylamide gel (proportion of total monomers, i.e., acrylamide plus bisacrylamide: 10%, and proportion of bisacrylamide monomers relative to total monomers: 3%). After electrophoresis, the gel was dried and exposed at -80°C to a Hyperfilm-MP with a Cronex Lightning Plus intensifying screen (DuPont, Wilmington, DE).

### *f) Statistical analysis*

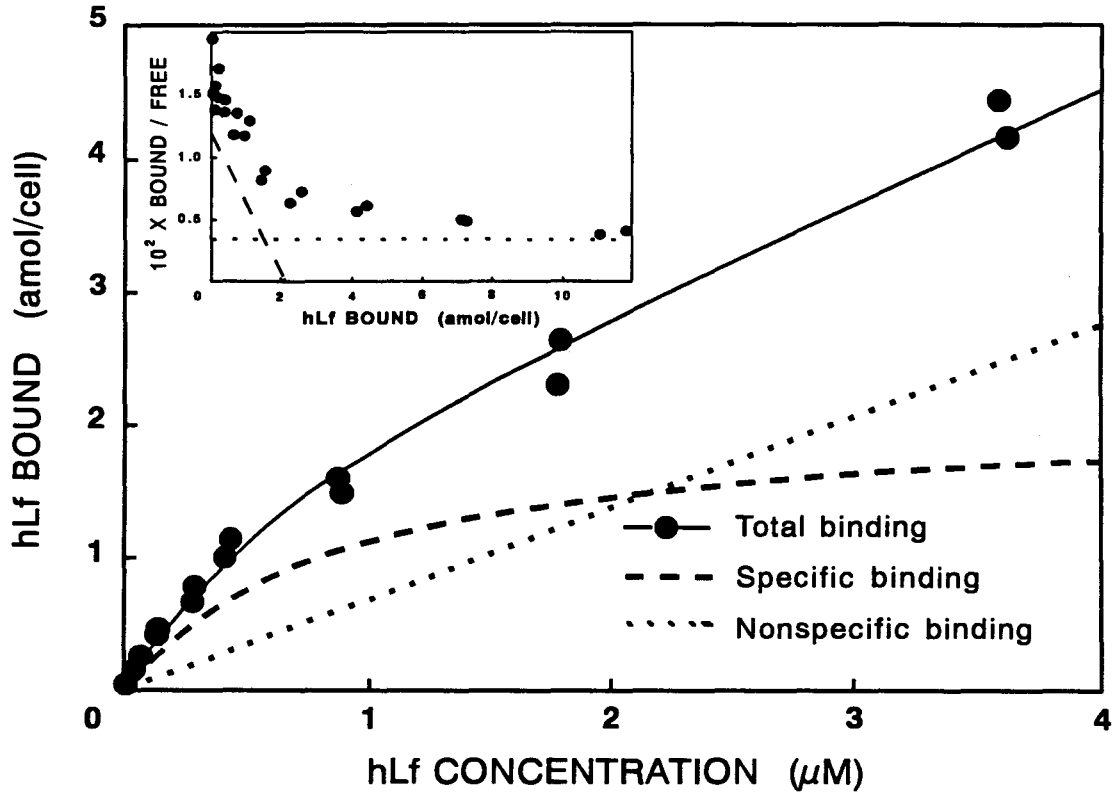
Data were analyzed by the SAS software package (SAS Institute, NC). Student's t-test was used to compare means and ranges. The Wilcoxon and Kruskal-Wallis nonparametric tests were also used for small series. Results are expressed as means  $\pm$  SE.

## **B-4. Results**

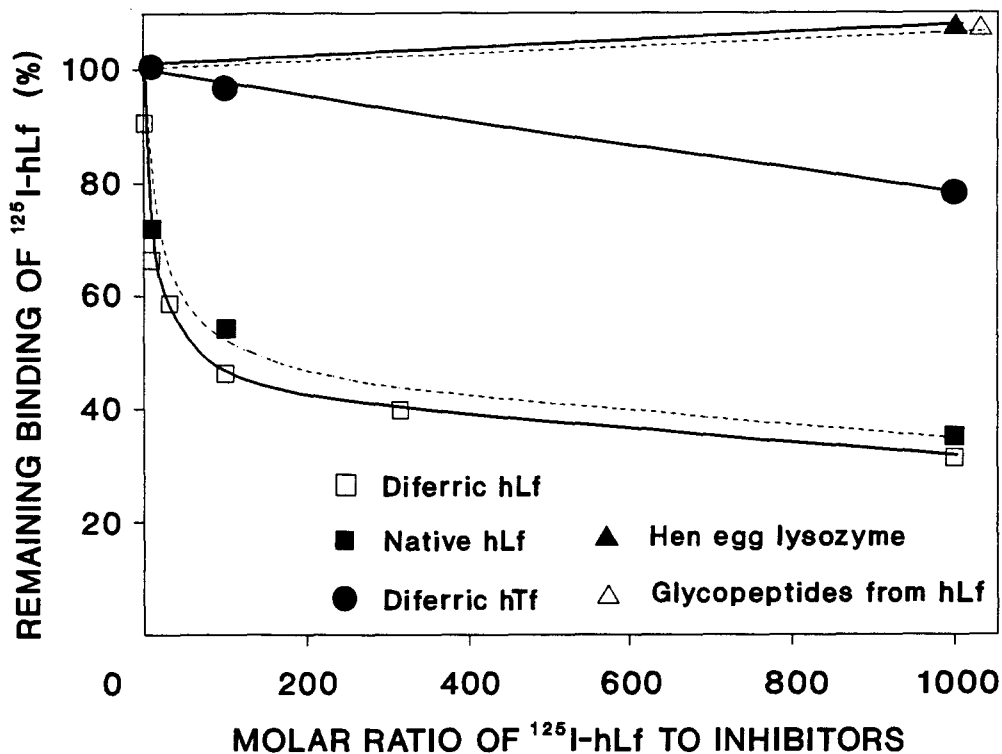
### *a) Human lactoferrin binding to apical surface of HT29 cl.19A cells*

The parameters of hLf binding to the apical surface of differentiated HT29 cl.19A cells were determined by incubating the cell monolayers with diferric  $^{125}\text{I}$ -hLf at 4°C. The apical surface of differentiated HT29 cl.19A cells exhibited  $(1.47 \pm 0.19) \times 10^6$  binding sites per cell for hLf, with relatively low affinity ( $K_d = (8.33 \pm 0.68) \times 10^{-7}$  M, FIG. 18, p. 112). As the ratio of nonspecific to total binding was fairly high (38% at  $K_d$ , 48% at  $2K_d$ ), total binding was not saturable.

The specificity of hLf binding was examined by competitive binding with different ligands. In the first experiments, HT29 cl.19A cell monolayers were incubated with diferric  $^{125}\text{I}$ -hLf in the presence of unlabeled diferric or nonsaturated hLf. As shown in FIG. 19 (voir p. 113), diferric  $^{125}\text{I}$ -hLf binding was inhibited by 55 and 69% when incubated with 100- and 1000-fold molar excesses of unlabeled diferric hLf, respectively. Native hLf inhibited diferric  $^{125}\text{I}$ -hLf binding in a similar fashion to diferric hLf, suggesting that both hLfs bind with similar affinities to the same sites on the apical surface of HT29 cl.19A cells. In other experiments, HT29 cl.19A cell monolayers were incubated with diferric  $^{125}\text{I}$ -hLf in the presence of diferric human serum transferrin (hTf), to see whether hTf, which is structurally very similar to hLf, binds to these hLf binding sites on HT29 cl.19A cells. Moreover, as hLf is a basic protein, its binding might result from nonspecific electrostatic interactions with the cell surface. To explore this possibility, lysozyme, another basic protein, was used as inhibitor. Lastly, to determine to what extent hLf glycans participate in the binding of hLf to HT29 cl.19A cells, hLf glycopeptides were used. As seen in FIG. 19, a 1000-fold molar



**FIG. 18** Concentration dependence of diferric human lactoferrin binding to differentiated HT29 cl.19A cell monolayers. Monolayers were incubated at 4°C with the indicated concentration of diferric  $^{125}\text{I}$ -hLf in DPBS+ containing 0.5% BSA. Inset shows Scatchard plot analysis. The results are typical of two separate experiments.



**Fig. 19** Competitive binding of  $^{125}\text{I}$ -labeled diferric human lactoferrin (hLf) to differentiated HT29 cl.19A cell monolayers. Monolayers were incubated at  $4^\circ\text{C}$  with 50 nM diferric  $^{125}\text{I}$ -hLf in the presence of the indicated molar excess of unlabeled diferric human hLf, native human hLf, diferric human transferrin, hen egg lysozyme or hLf glycopeptides in DPBS+ containing 0.5% BSA. Values are expressed as the ratio of cell-bound radioactivities to those without competitors. Each point represents the mean of triplicate samples.



excess of hTf only reduced diferric  $^{125}\text{I}$ -hLf binding by 22%, and no decrease in the amount of diferric  $^{125}\text{I}$ -hLf binding was observed, even in the presence of a 1000-fold molar excess of lysozyme and hLf glycopeptides.

## ***b) Human lactoferrin transport in Ussing chambers***

### ***1. Electrical parameters of HT29 cl.19A cell monolayers***

PD and TEER were constantly recorded during the transport experiments, to check the viability and integrity of the cell monolayers, respectively. Steady-state mean values were calculated for each monolayer. As shown in TABLE 8 (voir p. 115), TEER was  $124 \pm 11 \Omega\cdot\text{cm}^2$  in the control monolayers at  $37^\circ\text{C}$  without colchicine. The presence of  $500 \mu\text{M}$  colchicine only reduced TEER by  $\sim 25\%$ , indicating subtle rearrangement of the monolayers. As expected, lowering the temperature to  $4^\circ\text{C}$  induced a large increase in TEER and a decrease in PD.

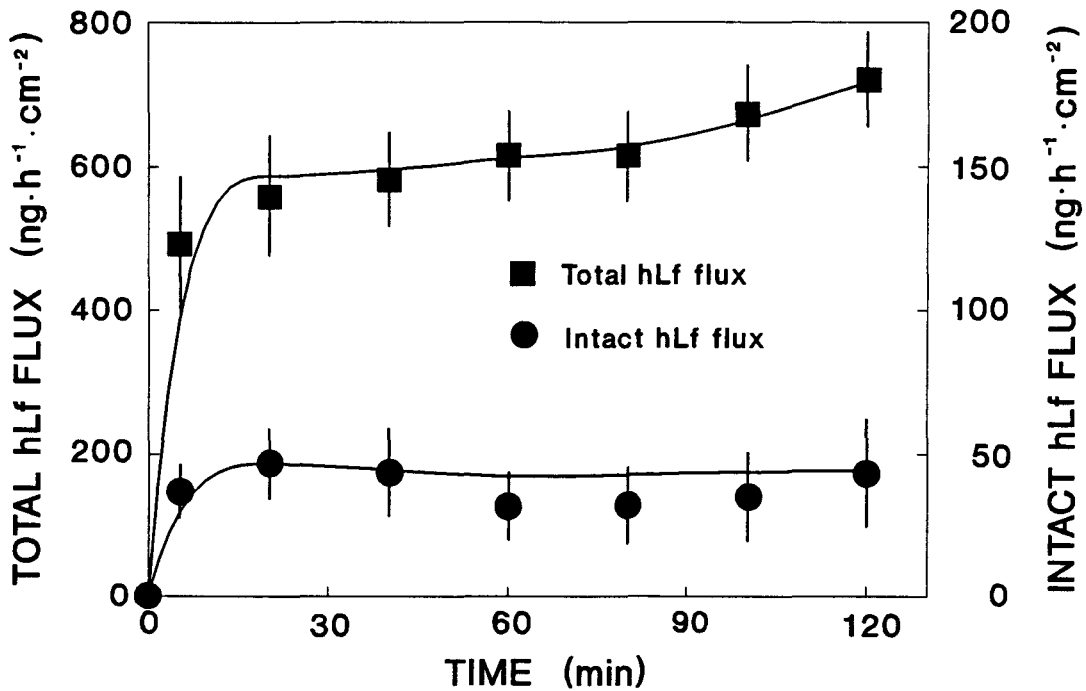
### ***2. Apical to basolateral transport of $^{125}\text{I}$ -labeled diferric human lactoferrin***

Transepithelial transport across cell monolayers of total hLf (i.e., intact plus degraded) was measured as the  $^{125}\text{I}$  hLf-equivalent flux. In some experiments, intact hLf fluxes were estimated by measuring immunologically reactive hLf using ELISA. FIG. 20 (voir p. 116) shows total and intact hLf flux values as a function of time at an apical hLf concentration of  $3.75 \mu\text{M}$ . As steady-state values were observed early, after only 30-min incubation, subsequent results were expressed as the mean flux values observed between 50 and 130-min incubation. The intact hLf flux was substantially lower than the total hLf flux, indicating that most of the protein is degraded during transepithelial transport. FIG. 21 (voir p. 117) shows that the total hLf flux was not saturable by increasing hLf apical concentration of up to  $12.5 \mu\text{M}$ , whereas the intact hLf flux was saturable at  $3.75 \mu\text{M}$  hLf. Colchicine ( $500 \mu\text{M}$ ) significantly reduced the total hLf flux by 30% ( $p < 0.05$ ) and the intact hLf flux almost completely. Lowering the temperature to  $4^\circ\text{C}$  also significantly reduced the total flux by 77% ( $p < 0.002$ ) and the intact flux by 90% ( $p < 0.05$ , TABLE 8), suggesting that hLf transcytosis is dependent on the cytoskeleton and energy, and that paracellular transport of hLf is negligible.

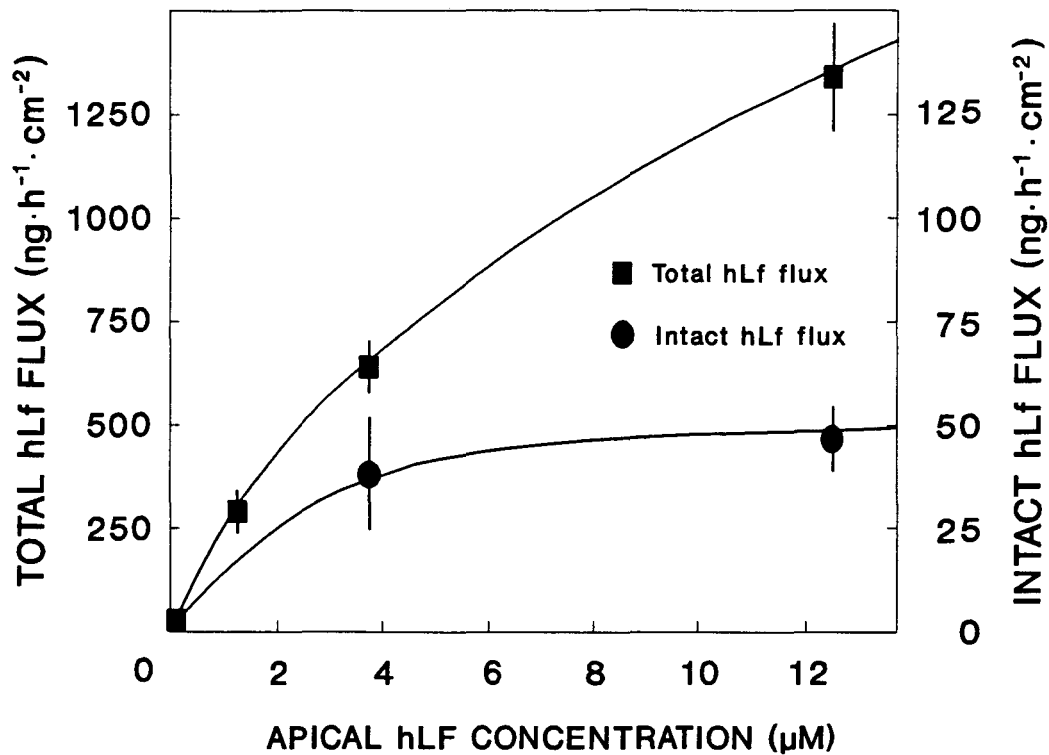
**TABLE 8 Electrical parameters of HT29 cl.19A cell monolayers and apical-to-basolateral human lactoferrin (hLf) fluxes in Ussing chambers.**

		Control	4°C	500 $\mu$ M Colchicine
PD	(mV)	0.39 $\pm$ 0.06 (n = 26)	0.03 $\pm$ 0.02 * (n = 7)	1.29 $\pm$ 0.22 (n = 14)
TEER	( $\Omega$ ·cm <sup>2</sup> )	124 $\pm$ 11 (n = 26)	340 $\pm$ 49 * (n = 7)	93 $\pm$ 7 (n = 14)
Total hLf flux	(ng·h <sup>-1</sup> ·cm <sup>-2</sup> )	641.5 $\pm$ 63.8 (n = 26)	144.9 $\pm$ 14.6 ** (n = 6)	452.9 $\pm$ 86.5 * (n = 14)
Intact hLf flux	(ng·h <sup>-1</sup> ·cm <sup>-2</sup> )	38.2 $\pm$ 13.6 (n = 7)	4.0 $\pm$ 2.5 * (n = 3)	not detectable (<1.0) (n = 2)

Apical-to-basolateral total and intact lactoferrin fluxes were measured in Ussing chambers at an apical concentration of 3.75  $\mu$ M diferric hLf containing <sup>125</sup>I-hLf. Control experiments were performed at 37°C in the absence of colchicine. Results are expressed as means  $\pm$  SE. Significantly different from control: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.002$ . PD, potential difference; TEER, Transepithelial electrical resistance.



**FIG. 20** Time dependence of apical-to-basolateral total and intact human lactoferrin (hLf) fluxes across filter-grown differentiated HT29 cl.19A cell monolayers. Assays were performed at 37°C at an apical diferric hLf concentration of 3.75  $\mu$ M. For the total and intact hLf fluxes, each point represents the mean of 26 and 7 separate experiments, respectively.



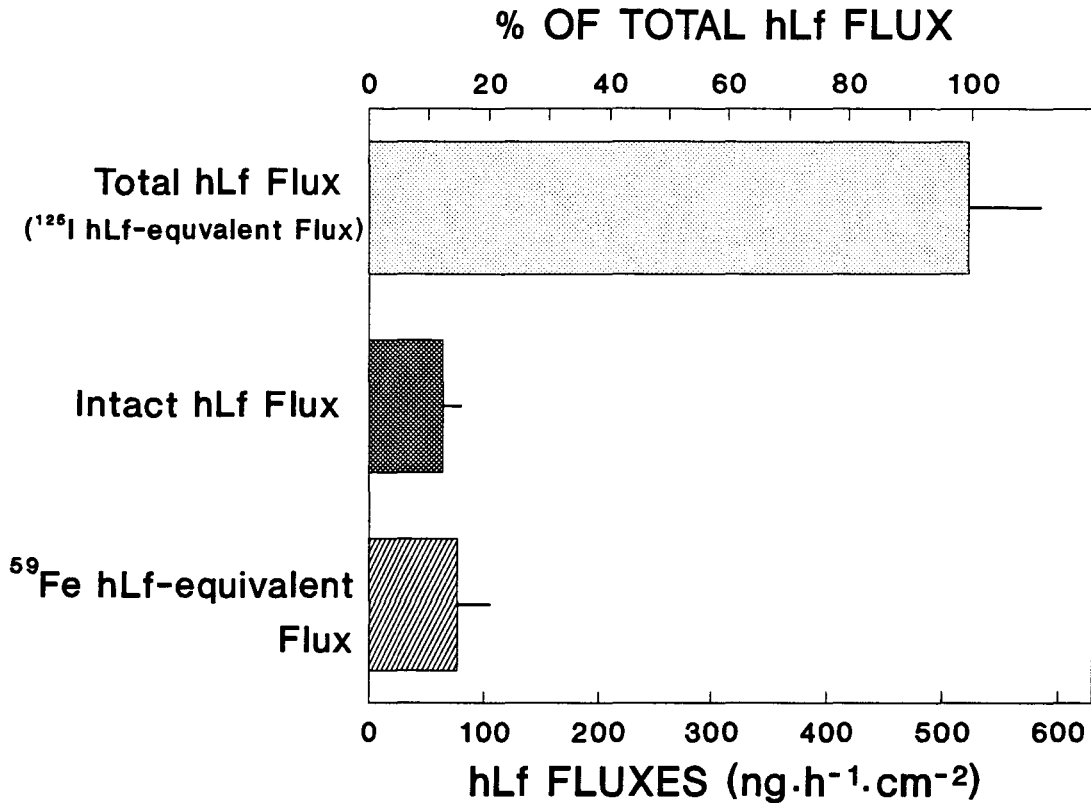
**Fig. 21** Steady-state values of apical-to-basolateral total and intact human lactoferrin (hLf) fluxes across filter-grown differentiated HT29 cl.19A cell monolayers. Steady-state values for the fluxes at  $37^{\circ}\text{C}$ , at apical diferric hLf concentrations of 0.13, 1.25, 3.75 and  $12.5 \mu\text{M}$ , were expressed as the means of the flux values observed between 50 min and 130 min incubations. Each symbol represents the mean of 6 to 26 experiments.

### **3. *Trans epithelial iron transport studies using dual-labeled $^{125}\text{I}$ - $^{59}\text{Fe}$ -diferric human lactoferrin***

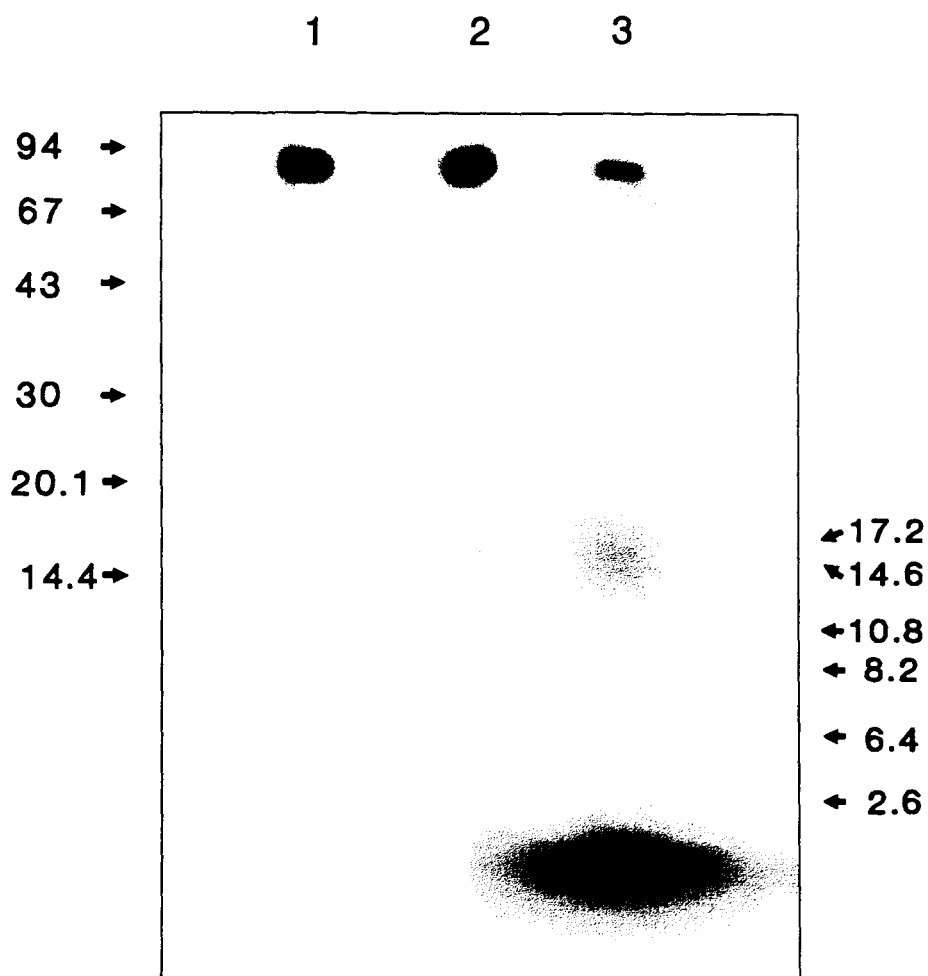
Five experiments were done in Ussing chambers with an exposure area of  $3.8 \text{ cm}^2$  to measure transepithelial iron transport using diferric  $^{125}\text{I}$ - $^{59}\text{Fe}$ -hLf (FIG. 22, p. 119). The total hLf flux, i.e. the  $^{125}\text{I}$  hLf-equivalent flux, was  $522.0 \pm 61.6 \text{ ng}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  or  $6.53 \text{ pmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  and was significantly greater than the  $^{59}\text{Fe}$  hLf-equivalent flux of  $77.0 \pm 27.6 \text{ ng}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ , calculated from  $^{59}\text{Fe}$ -flux, which was  $1.93 \pm 0.31 \text{ pmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ . This result indicates that after transcytosis,  $\sim 85\%$  of the hLf released its bound iron during transepithelial transport, and that this released iron was taken up and stored inside the cells. Furthermore, the intact hLf flux ( $64.6 \pm 14.3 \text{ ng}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  or  $0.81 \pm 0.18 \text{ pmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) constituted only  $\sim 12\%$  of the total hLf flux, and was about the same as the  $^{59}\text{Fe}$  hLf-equivalent flux, suggesting that iron release inside the cells might result from the lysosomal degradation of hLf, and that iron undergoes transcytosis along with the intact hLf.

### **4. *Characterization of hLf after transcytosis***

To determine in what form the hLf appeared in the basolateral compartment of the Ussing chambers after transcytosis, a basolateral compartment sample was analyzed by Tricine-SDS-PAGE. Whereas the hLf in the apical compartment did not undergo degradation during the 1 h experimental period (Lane 2, FIG. 23, p. 120), only a little of the hLf in the basolateral compartment was recovered intact and most of it was recovered in degraded form as 10–20 and  $<2 \text{ kDa}$  fragments (Lane 3, FIG. 23). Despite the high resolving power of Tricine-SDS-PAGE for small proteins, the 10–20 kDa fragments did not form clear bands, suggesting great heterogeneity of these fragments, probably due to degradation by lysosomal endo- and exopeptidases. A very large band near the migration front might have resulted from poor resolution during migration because of very low molecular mass ( $<2 \text{ kDa}$ ) and/or great heterogeneity of the fragments. These results indicate the existence of two different hLf transepithelial pathways in differentiated HT29 cl.19A cells: a major degrading pathway and a minor intact pathway.



**FIG. 22** Apical-to-basolateral total and intact human lactoferrin (hLf) fluxes compared to the <sup>59</sup>Fe hLf-equivalent flux across filter-grown differentiated HT29 cl.19A cell monolayers. Assays were performed at 37°C at an apical concentration of 3.75 μM diferric hLf containing <sup>125</sup>I-<sup>59</sup>Fe-hLf. The <sup>59</sup>Fe hLf-equivalent flux was calculated from the <sup>59</sup>Fe-flux according to the <sup>59</sup>Fe-specific radioactivity of hLf. Each bar represents the mean of 5 separate experiments.



**FIG. 23** Electrophoretic characterization of human lactoferrin (hLf) after transcytosis across filter-grown differentiated HT29 cl.19A cell monolayers. Samples were analyzed by Tricine-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions on 10% SDS-polyacrylamide gel. The gel was then dried and autoradiographed. Lane 1, diferric  $^{125}\text{I}$ -hLf before its addition to the apical compartment of the Ussing chamber; lane 2, the apical compartment solution after 60 min incubation; lane 3, the basolateral compartment solution after 60 min incubation. Molecular mass standards (Pharmacia-LKB Biotechnology): phosphorylase b (94 kDa), BSA (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (20.1 kDa), soybean trypsin inhibitor (17.2 kDa),  $\alpha$ -lactalbumin (14.4 kDa), whale sperm myoglobin (17.2 kDa), myoglobin CNBr-fragment "1+2" (14.6 kDa), myoglobin CNBr-fragment "1+3" (10.8 kDa), myoglobin CNBr-fragment "1" (8.2 kDa), myoglobin CNBr-fragment "2" (6.4 kDa) and myoglobin CNBr-fragment "3" (2.6 kDa).

## B-5. Discussion

The present results confirm that hLf can be transported across the human intestinal epithelium in intact and degraded forms. They also show that iron crosses the intestinal barrier linked to hLf, and that much of this iron is probably retained inside the enterocyte after the intracellular breakdown of hLf.

The role of hLf in mucosal iron absorption is still controversial, according to the results of *in vivo* experiments: thus, iron-saturated Lf feeding improved iron status more efficiently than ferrous sulfate feeding in the iron-deficient rat (Kawakami *et al.*, 1988), whereas no significant improvements in iron bioavailability were observed in infants fed an infant formula supplemented with bovine Lf (Fairweather-Tait *et al.*, 1987 and Schulz-Lell *et al.*, 1991). Recent studies on preterm human infants fed human milk showed that intact hLf of maternal origin was found in the urine (Hutchens *et al.*, 1991a), indicating that significant transepithelial transport of hLf occurs in the intestine of preterm infants. Small quantities of food proteins can generally be absorbed in the intestine by a non-specific transcytotic process, allowing minor transepithelial transport of the intact proteins and a large transfer of the peptide fragments probably formed during the passage of these proteins through the lysosomal pathway (Heyman & Desjeux, 1992). Nevertheless, the role of intestinal brush border membrane specific receptors in the transepithelial transport of proteins is poorly understood. Little is known about the cellular functions of specific Lf-receptors, even though such receptors were found in rabbit ( $K_d = 8.3 \times 10^{-7}$  M,  $1.5 \times 10^{13}$  specific binding sites per mg brush-border membrane proteins, Mazurier *et al.*, 1985), mouse ( $K_d = 2.9 \times 10^{-7}$  M,  $5.3 \times 10^{14}$  specific binding sites per mg brush-border membrane proteins, Hu *et al.*, 1988; Hu *et al.*, 1990), rhesus monkey ( $K_d = 9.0 \times 10^{-6}$  M, Davidson & Lönnerdal, 1988) and human fetal intestinal brush-border membranes ( $K_d = 3.3 \times 10^{-6}$  M,  $4.3 \times 10^{14}$  specific binding sites per mg brush-border membrane proteins, Kawakami & Lönnerdal, 1991). Furthermore, species specificity in Lf-receptor interactions was postulated in these studies. Monkey and human Lfs, but not bovine Lf, bind to monkey intestinal brush-border membranes (Davidson &



Lönnerdal, 1988), and human Lf but not bovine Lf binds to human fetus intestinal brush-border membranes (Kawakami & Lönnerdal, 1991), whereas mouse, human and bovine Lfs all bound similarly to mouse intestinal brush-border membranes (Hu *et al.*, 1988). Therefore homologous intestinal polarized cell systems might help to characterize hLf intestinal transepithelial transport and determine the role of specific hLf receptors in that transport and in iron absorption.

In the present study, we used the differentiated human colon carcinoma cell line HT29 cl.19A to characterize the transepithelial transport of hLf across human intestinal epithelia and to ascertain the fate of hLf-bound iron in a homologous system (i.e., hLf vs. human intestinal cells). The HT29 cl.19A cell is a clone isolated from the human colon carcinoma cell line HT29 treated with sodium butyrate, and permanently undergoes enterocytic differentiation (Augeron & Laboisse 1984). The secretory properties of HT29 cl.19A cells have been extensively studied (Nath *et al.*, 1991; Bajnath *et al.*, 1992a, b). Furthermore, when cultured on permeable supports, these form well-polarized monolayers whose TEER ( $124 \pm 11 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) is within the range of those reported for rabbit small intestine ( $60 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) and colon ( $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , Frizzell *et al.*, 1972).

Here, the apical surface of differentiated HT29 cl.19A cell monolayers exhibited  $1.5 \times 10^6$  specific binding sites per cell for both diferric and native hLf (<10% iron saturation) with similar affinities ( $K_d = 8.3 \times 10^{-7} \text{ M}$ ). No electrostatic interaction seems to be involved in this hLf-binding and hTf is unlikely to bind to these hLf binding sites. In these cells, as reported for HT29-18-C1 cells, another clone from the same cell line (Godefroy *et al.*, 1990), hTf receptors may be localized mainly on the basolateral membrane after differentiation, in the same way as intestinal absorptive cells. The presence of specific hLf receptors has been reported in HT29-D4 cells ( $K_d = 4.1 \times 10^{-7} \text{ M}$ ,  $4.1 \times 10^6$  specific binding sites per cell), another clone from the same cell line (Roiron *et al.*, 1989). These HT29 cl.19A and HT29-D4 clones have similar hLf-binding characteristics, which are also comparable to those found in intestinal brush-border membranes of various species.

Conflicting results have been obtained concerning the participation of hLf glycans in receptor–ligand interactions. In the monkey model, the presence of fucose molecules in the carbohydrate chains of Lf was found to be essential for receptor binding (Davidson & Lönnnerdal, 1988), but not in the mouse model (Hu *et al.*, 1988). In human fetal intestinal brush–border membranes, hLf deglycosylation did not modify hLf binding to its receptors (Kawakami & Lönnnerdal, 1991). In HT29 cl.19A cells, hLf glycans are unlikely to be involved in this binding since we did not find here that it was inhibited by hLf glycopeptides.

Most of the hLf (~90%) was transported transcellularly across differentiated HT29 cl.19A monolayers in degraded forms and the remainder (~10%) in intact form. Total hLf transcytosis (i.e., intact plus degraded) was concentration–dependent and unsaturable up to an apical hLf concentration of 12.5  $\mu\text{M}$ , whereas intact hLf transcytosis was saturable at 3.75  $\mu\text{M}$ . Apical surface binding of hLf showed that hLf–specific binding sites may be saturated up to an apical hLf–concentration of ~2.5  $\mu\text{M}$  (~3 $K_d$ ). This similarity of the saturable features is compatible with the involvement of apical hLf receptors in intact hLf transcytosis. However, the hLf flux is very similar to that of horseradish peroxidase (HRP), a fluid phase marker of endocytosis, which is transported by a mechanism that does not involve specific binding. Thus, when the HRP fluxes were measured at an apical HRP concentration of 400  $\mu\text{g/ml}$  across human infant jejunal epithelium (Heyman *et al.*, 1988), Caco–2 cells (Heyman *et al.*, 1990b) or HT29 cl.19A cells (Hirribaren *et al.*, in press) using the same Ussing chamber system, they were equal to 1027, 1132 and 1223  $\text{ng}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ , with ratios of intact to total protein transport of 12, 3 and 13%, respectively. In addition, a study of HT29–D4 cells (Roiron–Lagroux *et al.*, 1990) showed that cell–surface–bound hLf is unlikely to undergo rapid and efficient internalization (i.e., the clathrin–dependent endocytotic process). Therefore a non–specific transport rather than a receptor–mediated process seems to play the major role in hLf transcytosis.

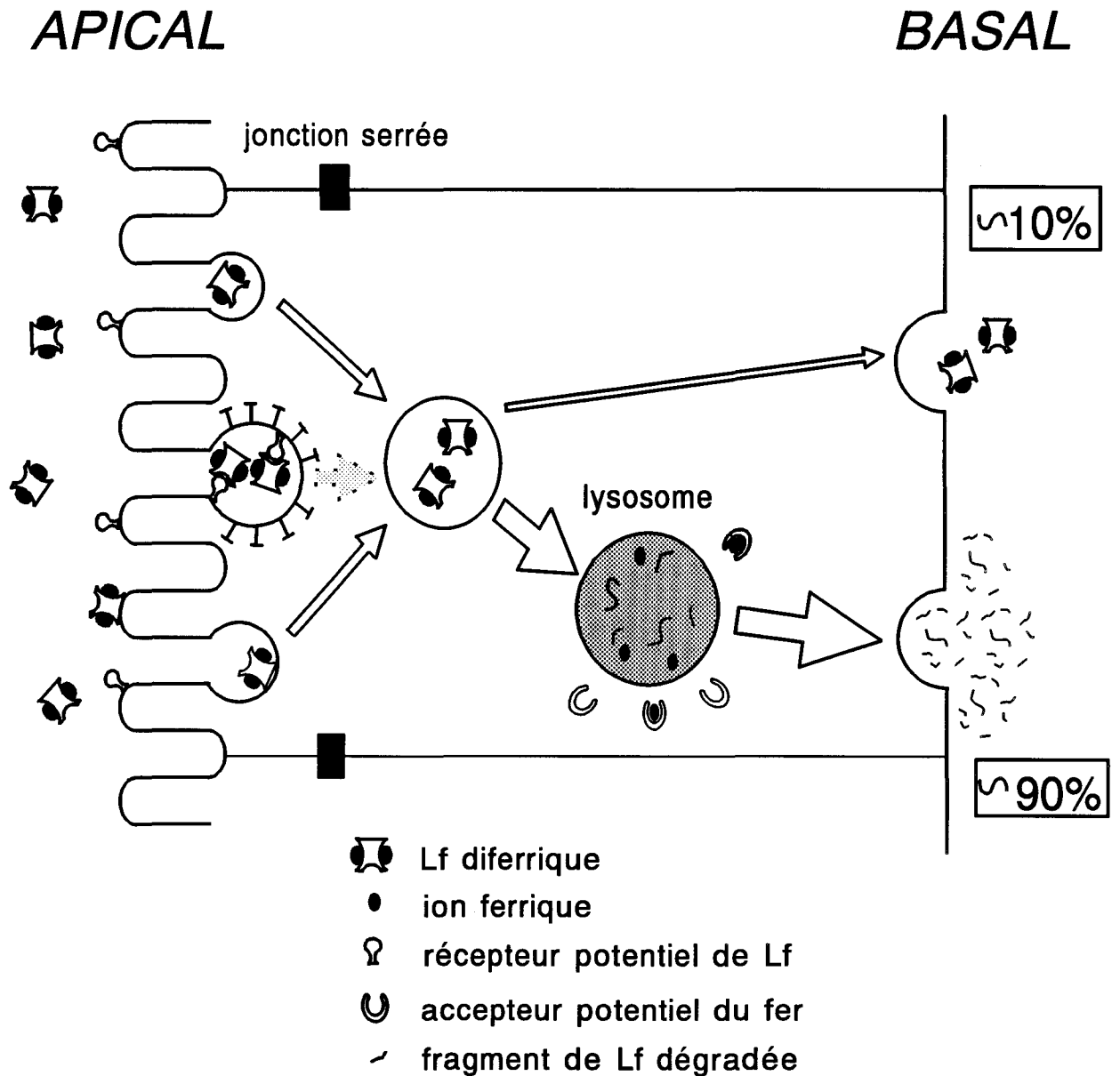
Lowering the temperature to 4 °C strikingly reduced the transepithelial transport of both intact and degraded hLf (77 and 90% for total and intact hLf fluxes, respectively), indicating that neither transport is due to any damage nor leakage of the cell monolayers but occurs via a truly transcytotic process. This indication is confirmed by the fact that colchicine, a microtubule assembly inhibitor, inhibited total hLf transcytosis partially (30%) and intact hLf transcytosis almost totally (>97%). This difference between the inhibition by colchicine of total and intact transcytosis suggests the existence of two different intracellular pathways for degraded and intact hLf transepithelial transport. Although the inhibitory effect of colchicine on intestinal transepithelial transport of HRP and  $\beta$ -lactoglobulin has already been reported in rabbit jejunum (Heyman *et al.*, 1982) and rabbit ileum (Marcon-Genty *et al.*, 1989), its molecular mechanism is not well understood.

Electrophoresis revealed that after transcytosis, hLf was composed of intact hLf and degraded fragments of <2 and 10–20 kDa. Furthermore, the experiments using diferric  $^{125}\text{I}$ - $^{59}\text{Fe}$ -hLf that even though native hTf was added to the basolateral compartments as a putative basolateral iron acceptor, the amount of iron remaining after transcytosis was much smaller, by ~15%, than the amount transported by total hLf, and was close to that carried by intact hLf. Endocytotic vesicles have been reported to acidify soon after their formation at the cell surface, and their pH ranges from 6.0 to 6.2 for early endosomes, 5.3 for prelysosomes and 4.5 to 5.0 for lysosomes (Mellman *et al.*, 1986). Whereas hTf loses iron at pH 6, hLf retains it at pH 4 (Montreuil *et al.*, 1960; Mazurier and Spik, 1980), suggesting that unlike hTf, hLf does not release its bound iron inside intracellular vesicles solely by acidification. These results raise the possibility that hLf is transported across the intestinal epithelial cell along two intracellular pathways, one of which might be a major lysosomal degradative pathway. This pathway would lead to lysosomal degradation of hLf resulting in iron release from degraded hLf, subsequent iron retention inside the cell and the transcellular transport of degraded fragments. The other minor pathway would allow the passage of intact hLf and its bound iron.

In the present HT29 cl.19A cell model, the iron released from hLf seems to be retained inside the cells. Long ago, mucosal ferritin was suggested to regulate intestinal iron absorption by acting as an iron acceptor and blocking the passage of iron through the enterocytes (Granick, 1949). It is well known that in iron deficiency, the ferritin concentration in enterocytes is low and that in secondary iron overload, it is high. In addition, it was recently confirmed that the biosynthetic rate of ferritin and the Tf receptor is regulated at the post-transcriptional level by the iron status of cells (Kühn & Hentze, 1992). Cells cultured in standard culture medium usually contain abundant iron and their ferritin concentration is high. Therefore the iron released from hLf might be captured inside the cells by this abundant ferritin and be unable to pass through them.

## C. Conclusion

La FIG. 24 (voir p. 127) résume les résultats obtenus. Nous avons mis en évidence le transport transépithélial de la lactotransferrine à travers les monocouches cellulaires HT29 clone 19A. Il s'agit d'un transport transcellulaire et non paracellulaire. La lactotransferrine transportée vers le compartiment basolatéral est constituée d'une majorité de fragments dégradés (environ 90%) et d'une minorité de protéine intacte (environ 10%) ayant probablement gardé son fer fixé. De plus, il y a peu ou pas de fer, libéré par dégradation intracellulaire de la lactotransferrine, qui est transporté vers le compartiment basolatéral. Le transport de la lactotransferrine intacte apparaît saturable en fonction des concentrations apicales de lactotransferrine, ce qui suggère une éventuelle implication dans la transcytose, du récepteur de la lactotransferrine exprimé à la surface apicale. Cependant, la quantité totale de lactotransferrine transportée et la proportion de protéine intacte par rapport à la protéine dégradée sont toutes les deux comparables à celles obtenues avec la  $\beta$ -lactoglobuline ou la peroxydase de Raifort. Ce serait donc un processus ne faisant pas intervenir de récepteur, qui jouerait un rôle majeur dans la transcytose de la lactotransferrine. Toutefois, ces résultats sont d'une part compatibles avec les observations *in vivo* de la présence de lactotransferrine d'origine maternelle dans le sang des nouveau-nés. D'autre part, ils suggèrent que la lactotransferrine et son récepteur peuvent jouer un rôle mineur dans l'absorption du fer dans ce modèle.



**FIG. 24** Etude du transport transépithélial de la lactotransferrine et de son fer à travers les cellules HT29 clone 19A différenciées

### III. Etude de l'effet de la carence intracellulaire en fer sur le récepteur de la lactotransferrine dans une lignée cellulaire intestinale

#### A. Introduction

Dans la deuxième partie des Travaux Personnels, nous avons mis en évidence le transport transépithélial de la lactotransferrine et du fer, probablement fixé à la lactotransferrine intacte, à travers les monocouches cellulaires HT29 clone 19A cultivées sur filtre. De plus, il y a peu ou pas de fer libéré par dégradation intracellulaire de la lactotransferrine, qui est transporté vers le compartiment basolatéral. Ces résultats suggèrent que la lactotransferrine et son récepteur jouent un rôle mineur dans l'absorption du fer au niveau des cellules HT29 clone 19A cultivées dans un milieu de culture standard, dans lequel le fer est assez abondant.

D'autre part, les expériences *in vivo* chez le Rat, indiquent que l'administration de lactotransferrine saturée en fer améliore le taux de fer dans l'organisme de façon plus efficace que l'administration de fer inorganique, en particulier dans les conditions de déficience en fer (Kawakami *et al.*, 1988; voir Généralités, p. 70). Ces observations suggèrent que la lactotransferrine et peut-être son récepteur, pourraient manifester leur fonction dans des conditions de carence en fer. Comme décrit dans le chapitre II des généralités, nous avons maintenant une quantité considérable d'informations concernant la régulation de la biosynthèse de deux protéines importantes dans le métabolisme du fer: le récepteur de la sérotransferrine et la ferritine. Cette régulation fer-dépendante de la biosynthèse est effectuée par l'intermédiaire de l'IRE-BP (iron-responsive element-binding protein, ou aconitase cytosolique). Il est possible que l'expression d'autres protéines impliquées dans le métabolisme du fer soient régulées de la même façon. De ce point de vue, comme nous avons observé dans la première partie des Travaux Personnels, que l'expression prolifération-

dépendante du récepteur de la lactotransferrine était similaire à celle du récepteur de la sérotransferrine, nous avons été amené à nous poser la question suivante: l'expression du récepteur de la lactotransferrine est-elle régulée en fonction du taux de fer dans l'organisme?

## **B. Article soumis à publication dans *Biochemical Journal***

Afin de vérifier l'hypothèse de l'expression fer-dépendante de la lactotransferrine, nous avons examiné, dans la troisième partie de notre étude, l'effet de la carence intracellulaire en fer sur l'expression du récepteur de la lactotransferrine.

Pour cela, nous avons utilisé les cellules HT29-18-C<sub>1</sub>, un sous-clone des cellules HT29, qui présentent les caractéristiques morphologiques des entérocytes même dans un milieu contenant du glucose.



**EFFECT OF INTRACELLULAR IRON DEPLETION BY PICOLINIC ACID ON THE LACTOFERRIN RECEPTOR IN THE HUMAN COLON CARCINOMA CELL SUBCLONE HT29-18-C<sub>1</sub>**

Takashi MIKOGAMI, Thérèse MARIANNE, and Geneviève SPIK

Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille, Unité Mixte de Recherche du CNRS n° 111, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France

Short title: Effect of picolinic acid on intestinal lactoferrin receptor

## **B-1. Synopsis**

The lactoferrin receptor has been found on the brush-border membrane of intestinal epithelial cells in several species including human. Its role on intestinal iron absorption, which is well regulated in response to the body iron store, has been proposed. We investigated the effect of intracellular iron depletion by picolinic acid, an iron chelator, on cell surface-binding of human lactoferrin to human enterocytes and its intracellular uptake, using HT29-18-C<sub>1</sub> cells, an enterocyte-like differentiable cell line. The confluent cells exhibited  $7.4 \times 10^6$  specific binding sites per cell for diferric human <sup>125</sup>I-labelled lactoferrin with relatively low affinity ( $K_d = 8.2 \times 10^{-7}M$ ). The addition of picolinic acid exhibited a concentration- and time-dependent increase in lactoferrin binding in accordance with a decrease in intracellular iron contents. The maximum effect on lactoferrin binding (approx. 70% increase), which appeared between 12 h and 18 h after the addition of picolinic acid, was obtained at a picolinic acid concentration of 2 mM. The scatchard analysis showed that the enhanced lactoferrin binding resulted from an increase in the number of the lactoferrin receptor rather than an alteration in the binding affinity for lactoferrin. The time-dependent effect of picolinic acid was completely abolished in the presence of 1  $\mu$ M anisomycin, a protein synthesis inhibitor, indicating that ongoing protein synthesis is involved in this effect. The enhanced lactoferrin binding induced by acid picolinic, produced an increase in uptake of lactoferrin-bound <sup>59</sup>Fe, indicating a functional receptor. These results suggest that the biosynthesis of the lactoferrin receptor in intestinal epithelial cells may be regulated in response to the levels of intracellular chelatable iron, and that the induced lactoferrin receptor might be involved in intestinal iron absorption particularly in iron deficiency.

### **ABBREVIATIONS FOOTNOTE**

Abbreviations used: DPBS+, Dulbecco's phosphate buffered saline containing 1 mM Ca<sup>2+</sup> and 0.5 mM Mg<sup>2+</sup>, pH 7.3; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; TBS, 150 mM NaCl/ 20 mM Tris/ HCl, pH 7.4

## B-2. Introduction

Human lactoferrin, also called lactotransferrin (Montreuil *et al.*, 1960), is an 80-kDa transferrin family glycoprotein that binds reversibly two ferric ions concomitantly with two carbonate ions per molecule. Human lactoferrin consists of a single polypeptide chain (Metz-Boutigue *et al.*, 1984), which folds into two separate lobes (Anderson *et al.*, 1989), and two N-acetyllactosaminic type glycans (Spik *et al.*, 1982b). Lactoferrin is secreted from most of exocrine glands (Masson *et al.*, 1966) and present in the secondary granules of polymorphonuclear neutrophils (Masson *et al.*, 1969). Several biological roles have been proposed such as the bacteriostatic effect, the regulation of myelopoiesis, the modulation of the immune system and cell growth promotion (reviewed by Sánchez *et al.*, 1992). Its role in promoting intestinal iron absorption has also long been proposed (Montreuil *et al.*, 1960). This hypothesis was supported by higher iron bioavailability in human milk than cows' milk-based infant formula (Saarinen *et al.*, 1977) and the gastrointestinal presence of intact functional lactoferrin owing to high resistance of human lactoferrin against gastrointestinal digestion (Spik *et al.*, 1982a; Davidson & Lönnnerdal, 1987). Furthermore, the *in vitro* experiment using human duodenal biopsies demonstrated that human lactoferrin can donate iron to intestinal mucosal cells (Cox *et al.*, 1979). Recently, the existence of the specific lactoferrin receptor has been demonstrated in rabbit (Mazurier *et al.*, 1985), mouse (Hu *et al.*, 1988, 1990), rhesus monkey (Davidson & Lönnnerdal, 1988) and human fetal intestinal brush border membranes (Kawakami & Lönnnerdal, 1991) as well as in human phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes (Mazurier *et al.*, 1989) and human platelets (Leveugle *et al.*, 1993). The presence of the lactoferrin receptor on intestinal brush-border membranes, unlike the transferrin receptor that is localized on basolateral membranes of intestinal epithelial cells (Banerjee *et al.*, 1986), reinforces a possible role of lactoferrin in the intestinal iron absorption.

It is well known that the intestinal iron absorption in human is regulated in response to total body iron status, *i.e.*, iron deficiency or blood loss leads to an increase in iron absorption from intestinal lumen, and excess iron stores results in a decreased iron absorption (Bothwell

*et al.*, 1979). Although recent intensive studies have revealed that the biosynthesis of at least two proteins important in iron metabolism, the transferrin receptor and ferritin, is regulated post-transcriptionally by a common mechanism (reviewed by Klausner *et al.*, 1993), little is known about the regulation mechanism of intestinal iron absorption. In the present study, we tried to examine the iron-depleting effect on the intestinal lactoferrin receptor using a cultured enterocyte-like differentiable cell line, HT29-18-C<sub>1</sub> cells, as a model of intestinal absorptive cells. The iron-depletion from the cells was realized by an addition of picolinic acid to the medium of cultured cells. Picolinic acid, an iron chelator naturally occurring in the tryptophan metabolism, has been shown to inhibit the growth of cultured normal or transformed mammalian cells by a selective depletion of iron in the cells (Fernandez-Pol, 1977; Fernandez-Pol *et al.*, 1977). It also induces a marked increase in number of the transferrin receptor in human haematopoietic cell lines (Louache *et al.*, 1984; Testa *et al.*, 1985). In this model, we studied the effect of picolinic acid: 1) on the intracellular iron content, 2) on the nature of lactoferrin binding, 3) on the biosynthesis of the lactoferrin receptor, and 4) on the uptake of lactoferrin and the lactoferrin-bound iron.

### **B-3. Materials and methods**

#### ***a) Materials***

Dulbecco's phosphate buffered saline containing 1 mM Ca<sup>2+</sup> and 0.5 mM Mg<sup>2+</sup>, pH 7.3 (DPBS+), BSA and anisomycin were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, U.S.A.). Iodo-Gen was from Pierce (Rockford, IL, U.S.A.). Na<sup>125</sup>I (100 mCi/ml) and <sup>59</sup>FeCl<sub>3</sub> (1-50 mCi/mg Fe) were from Amersham (Amersham, U.K.). PD-10 prepacked Sephadex G-25 M columns were from Pharmacia LKB Biotechnology (Uppsala, Sweden). Chelex 100 was from Bio-Rad (Brussels, Belgium).

Lactoferrin was purified from human milk as described earlier (Spik *et al.*, 1982b) and was saturated with iron as described elsewhere (Mazurier & Spik, 1980) using 0.1 M sodium citrate/ 0.1 M sodium bicarbonate, pH 8.2 (saturating solution) containing appropriate amounts of FeCl<sub>3</sub> (Azari & Baugh, 1967).

### ***b) Cell culture***

HT29-18 is a clone isolated from HT29 cells derived from human colon carcinoma cell line (Huet *et al.*, 1987). HT29-18-C<sub>1</sub>, a subclone isolated from HT29-18 clone growing in a galactose-containing, glucose-depleted medium according to characteristics of intestinal absorptive cells (Huet *et al.*, 1987), was a gift from Dr. Louvard (Institut Pasteur, Paris, France) and was used between passage 10 and 30. This subclone undergoes absorptive enterocyte-like differentiation even in a glucose-containing medium (Huet *et al.*, 1987; Godefroy *et al.*, 1988). HT29-18-C<sub>1</sub> cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 50 µg/ml gentamicin (Gibco BRL) at 37°C in a humidified atmosphere of 90% air and 10% CO<sub>2</sub>. Cells were subcultured weekly and seeded at 4 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> in 25-cm<sup>2</sup> Falcon flasks (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, U.S.A.) and the medium was changed daily. For experimental purposes, cells were plated at 8 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> in 6-well Falcon plates, 12- or 24-well Linbro plates (Flow Laboratories, Puteaux, France) or 8-chamber slides (Nunc, Roskilde, Denmark). Cells reach confluence 6 days after plating in this condition. For the experiments in iron-depleting condition, cells were cultured in DMEM without added iron (Eurobio, Paris, France) supplemented with 10% heat-inactivated, iron-depleted FBS, and 50 µg/ml gentamicin. Iron-depletion from FBS was performed as described by Alvarez-Hernandez *et al.* (1991): briefly, heat-inactivated FBS was acidified using 1 M HCl to pH 4.5 in the presence of 300 g/l Chelex 100 and incubated at room temperature with stirring gently for 2 h. Then, it was readjusted pH to 7.3 with 1 M NaOH, incubated at 4°C overnight and filtered using a 0.22-µm membrane filter (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.).

### ***c) Human lactoferrin labelling***

Diferrous lactoferrin was iodinated by using Iodo-Gen, which was coated on the walls of a glass vial, according to the manufacturer's instructions. One mg of lactoferrin and 400 µCi of Na<sup>125</sup>I were incubated in the tube coated with 100 µg of Iodo-Gen for 30 min at 4°C in a

final volume of 200  $\mu$ l of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2. After the incubation, diferric  $^{125}\text{I}$ -labelled lactoferrin ( $^{125}\text{I}$ -lactoferrin) was separated from the free  $^{125}\text{I}$  by gel filtration on a Sephadex G-25 M column PD-10 equilibrated with DPBS+. The specific activity of the diferric  $^{125}\text{I}$ -lactoferrin ranged from 4 to  $7 \times 10^7$  cpm/nmol.

For dual-labelling with  $^{59}\text{Fe}$  and  $^{125}\text{I}$ , native lactoferrin was first saturated with  $^{59}\text{Fe}$  and then radioiodinated. Twenty-five nmol of  $^{59}\text{FeCl}_3$  in 0.1 M HCl and 200  $\mu$ l of the saturating solution were mixed, incubated for 10 min at room temperature and adjusted to pH 8.2 with 1 M HCl. One mg (12.5 nmol) of lactoferrin in the saturating solution was added to this  $^{59}\text{Fe}$  citrate solution, which was then incubated 3 h at room temperature. Unbound  $^{59}\text{Fe}$  was removed by adding to the mixture 50  $\mu$ l of Chelex 100 pre-equilibrated with the saturating solution, and stirring gently for 5 min. This diferric  $^{59}\text{Fe}$ -labelled lactoferrin solution was transferred to the Iodo-Gen coated tube and iodinated with  $\text{Na}^{125}\text{I}$  as described above. The  $^{125}\text{I}$  and  $^{59}\text{Fe}$ -specific activities of diferric  $^{59}\text{Fe}$ - $^{125}\text{I}$ -dual-labelled lactoferrin ( $^{59}\text{Fe}$ - $^{125}\text{I}$ -lactoferrin) ranged from 1 to  $2 \times 10^7$  cpm/nmol and from 3 to  $8 \times 10^5$  cpm/nmol, respectively.

***d) Human lactoferrin binding to the apical surface of HT29-18-C<sub>1</sub> cells***

Confluent HT29-18-C<sub>1</sub> cells, cultured in 24-well plates for 9 days, were rinsed three times with cold DPBS+ and equilibrated at 4°C. Incubation media were prepared in DPBS+ containing 0.5% BSA so as to contain the required final concentrations of diferric  $^{125}\text{I}$ -lactoferrin. Binding was initiated by aspirating the rinsing solution and adding 0.2 ml of the incubation medium to each well. After 90-min incubation at 4°C, 100  $\mu$ l of the incubation medium was collected and the remainder was aspirated. The cell monolayers were rinsed with 0.4 ml of ice-cold DPBS+ five times and scraped off in DPBS+. Cell-bound and cell-unbound radioactivities were determined by counting the scraped cells and the collected incubation medium in an LKB 1282 CompuGamma  $\gamma$ -counter. Dissociation constants and numbers of binding sites were determined according to Scatchard (1949) with the aid of Enzfitter, a computer program for non-linear regression data analysis (Elsevier-BIOSOFT, Cambridge, U.K.). Nonspecific binding was estimated by incubation in the presence of a 100-fold molar excess of unlabelled diferric lactoferrin.

*e) Effect of picolinic acid on lactoferrin binding to HT29-18-C<sub>1</sub> cells*

First, binding of lactoferrin to the cell monolayers was examined after incubation with varying concentrations of picolinic acid. Cells were cultured in 24-well plates in standard DMEM. Seven days after plating, the medium was replaced by iron-depleted DMEM containing 0.1 to 4 mM picolinic acid. The cell monolayers were incubated for 48 h in the presence of picolinic acid with internal (*i.e.*, 24 h after the replacement) change of medium containing the same concentrations of picolinic acid. Then, the lactoferrin binding assay was carried out as described above using 500 nM as a concentration of diferric <sup>125</sup>I-lactoferrin. Nonspecific binding was estimated by incubation in the presence of a 100-fold molar excess of unlabelled diferric lactoferrin.

Secondly, alteration of binding of lactoferrin to the cell monolayers was determined as a function of time of incubation with picolinic acid. Cells were cultured in 24-well plates in standard DMEM. Seven days after plating, the medium was replaced by iron-depleted DMEM containing 2 mM picolinic acid. At 6, 12, 18, 24, 30, or 36 h after the first replacement, the medium of other wells was replaced in the same manner at each time. At 42 h (*i.e.*, cells were incubated in the presence of 2 mM picolinic acid for 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 or 42 h), lactoferrin binding assay was carried out as described above using 500 nM as a concentration of diferric <sup>125</sup>I-lactoferrin. Nonspecific binding was estimated by incubation in the presence of a 100-fold molar excess of unlabelled diferric lactoferrin. To examine the effect of anisomycin, which reversibly inhibits the protein biosynthesis, cell monolayers were incubated in the presence of 1  $\mu$ M anisomycin for 12 h within the incubation period of picolinic acid: between 6 and 18 h after the replacement of standard DMEM by iron-depleted DMEM containing 2 mM picolinic acid. Concentrated solution of anisomycin (10  $\mu$ M) was added to a final concentration of 1  $\mu$ M at 6 after the replacement. At 18 h after the replacement, the cell monolayers were rinsed twice with iron-depleted DMEM and were reincubated in the presence of 2 mM picolinic acid until the lactoferrin binding assay carried out as described above.

Lastly, the nature of lactoferrin binding was determined after incubation with picolinic acid. Cells were cultured in 24-well plates in standard DMEM for 8 days, and incubated for 24 h in iron-depleted DMEM containing 2 mM picolinic acid. Then, the lactoferrin binding assay was carried out as described above with varying concentrations of diferric  $^{125}\text{I}$ -lactoferrin.

*f) Measurements of intracellular iron contents of HT29-18-C<sub>1</sub> cells*

Intracellular iron contents were measured to verify the iron-chelating activity of picolinic acid. Cells cultured in 6-well plates were treated with acid picolinic as described in the previous section. The cell monolayers were rinsed five times with 150 mM NaCl/ 20 mM Tris/ HCl, pH 7.4 (TBS), which had been passed through a Chelex 100 column to remove traces of iron, and were scraped off with a Costar cell scraper in iron-depleted TBS. The cells were concentrated by centrifuging, and resuspended twice with iron-depleted TBS. Then, cells were resuspended with 20 mM Tris/ HCl, pH 7.65, which had been also passed through a Chelex 100 column, and were homogenized with an acid-washed tight fitting Dounce homogenizer. The homogenate was centrifuged for 1 h at 4 °C and 19 000 g in a Sigma centrifuge. The aliquots of the supernatant were used for iron determinations. Iron was determined by graphite-furnace atomic absorption spectroscopy with a Perkin-Elmer Model 2380 spectrometer, an HGA 500 programmer, and an AS-40 sampler\*.

*g) Measurements of lactoferrin uptake into HT29-18-C<sub>1</sub> cells*

Cells were cultured in 12-well plates for 7 days, and were incubated in iron-depleted DMEM in the presence or in the absence of 2 mM picolinic acid for 24 h. Two different experimental procedures were performed to study the effect of picolinic acid on the uptake of lactoferrin into the cells. In the first procedure, cells were rinsed with ice-cold DPBS+ three times and equilibrated at 4°C, followed by aspirating the rinsing solution. To each well, 0.4 ml of 500 nM diferric  $^{125}\text{I}$ -lactoferrin in DPBS+ containing 0.5% BSA were added. After a 90-min

---

\* We are grateful to Prof. M. Wartel and co-workers (Université des Sciences et Technologies de Lille) for his advice and use of the atomic absorption spectrometer.



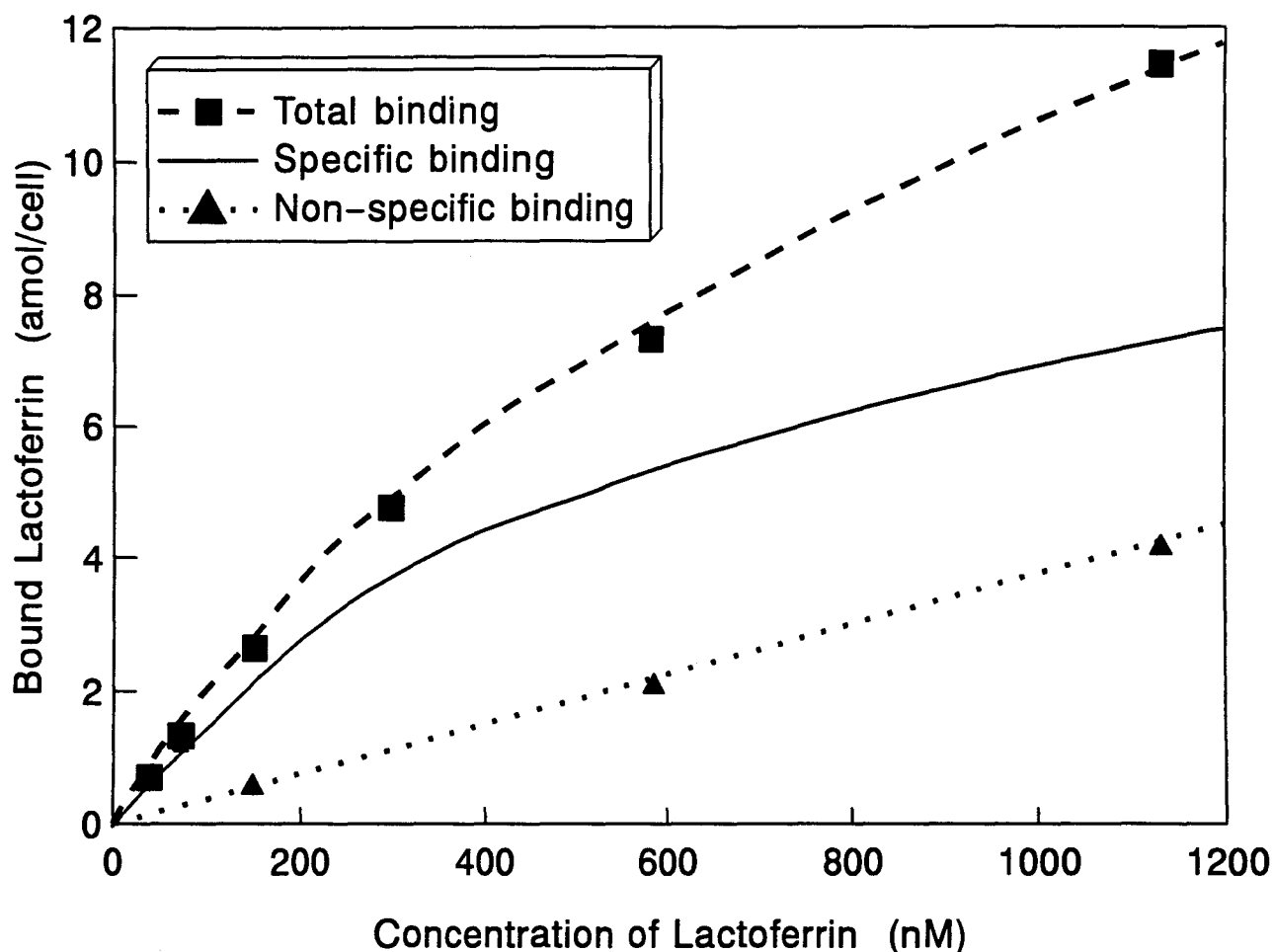
incubation at 4°C, 100 µl of the incubation medium was aspirated, and cells were rinsed with 0.5 ml of ice-cold DPBS+ four times. The lactoferrin uptake assay was initiated by adding 0.4 ml of prewarmed DPBS+ containing 0.1% BSA to each well. After 10, 20, 30, 45, 65, and 90-min incubations at 37°C, the incubation medium and a rinse of 0.5 ml of ice-cold DPBS+ were collected. To remove cell surface-bound lactoferrin, a dissociating solution: 0.5 ml of ice-cold 0.2 M acetic acid/ 0.5 M NaCl, pH 2.5, was added to each well, followed by 10-min incubation on ice. This dissociating solution and a 0.5-ml rinse of the same solution were collected, and cells were scraped off in DPBS+. Medium-dissociated, cell surface-bound and intracellular <sup>125</sup>I-radioactivities were determined by counting the collected medium, the collected dissociating solution, and the scraped cells in an LKB 1282 CompuGamma γ-counter, respectively.

In the second procedure, cells were rinsed with DPBS+ prewarmed at 37°C and incubated with prewarmed DPBS+ containing 0.1% BSA. The lactoferrin uptake assay was initiated by aspirating DPBS+ containing 0.1% BSA and adding 0.4 ml of 400 nM diferric <sup>59</sup>Fe-<sup>125</sup>I-lactoferrin in DPBS+ containing 0.1% BSA to each well. After 10, 30, 60, and 120-min incubations at 37°C, the incubation medium was aspirated, and cells were rinsed with 0.5 ml of ice-cold DPBS+ four times. To remove cell surface-bound lactoferrin, 0.5 ml of the ice-cold dissociating solution was added to each well, followed by 10-min incubation on ice. This dissociating solution and a 0.5-ml rinse of the same solution were collected, and cells were scraped off in DPBS+. Cell surface-bound and intracellular <sup>125</sup>I- and <sup>59</sup>Fe-radioactivities were determined by counting the collected dissociating solution and the scraped cells in an LKB 1282 CompuGamma γ-counter, respectively.

### **B-3. Results**

#### ***a) Binding of human lactoferrin to the apical surface of HT29-18-C<sub>1</sub> cells***

The binding parameters of lactoferrin to HT29-18-C<sub>1</sub> cells were determined by incubating the cell monolayers with diferric <sup>125</sup>I-lactoferrin at 4°C. According to the Scatchard analysis of the results shown in FIG. 25 (voir p. 139), the cell monolayers exhibited  $7.4 \times 10^6$  binding



**FIG. 25** Binding of  $^{125}\text{I}$ -labelled diferric human lactoferrin to HT29-18-C<sub>1</sub> cell monolayers as a function of lactoferrin concentration.

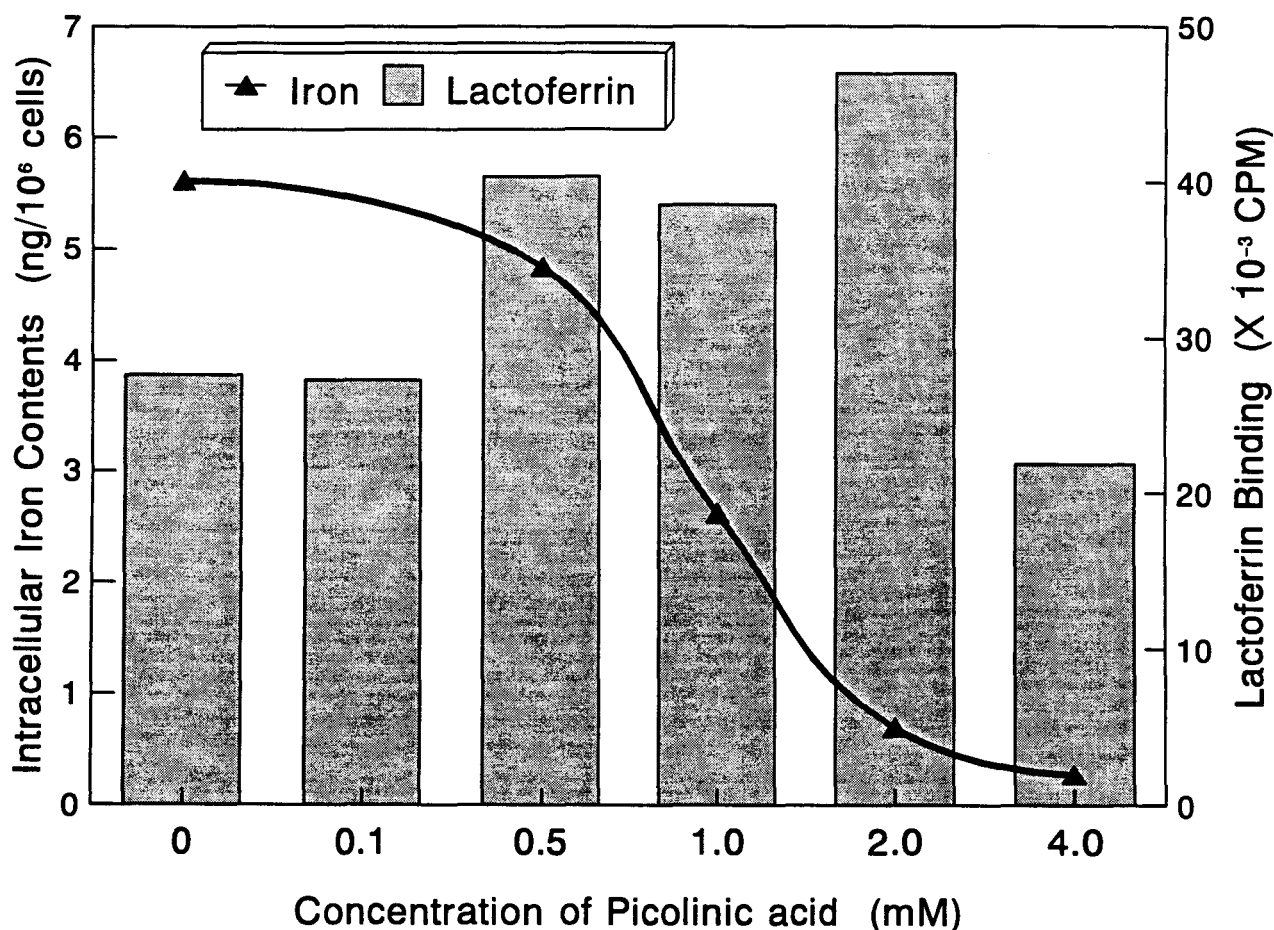
Confluent HT29-18-C<sub>1</sub> cells were incubated with the indicated concentrations of diferric  $^{125}\text{I}$ -lactoferrin for 90 min at 4°C. Cell-bound and cell-unbound radioactivities were determined by counting the scraped cells and the collected incubation medium in a g-counter. Nonspecific binding was estimated by incubation in the presence of a 100-fold molar excess of unlabelled diferric lactoferrin. The results are typical of two separate experiments.

sites for lactoferrin per cell with relatively low affinity ( $K_d = 8.2 \times 10^{-7}M$ ). These binding parameters are similar to those found in other clones from the HT29 cell line, HT29-D4 cells (Roiron *et al.*, 1989) and HT29 clone 19A (Mikogami *et al.*, unpublished work), which are  $K_d = 4.1 \times 10^{-7}$ ,  $8.3 \times 10^{-7}$  M, and  $4.1 \times 10^6$ ,  $1.5 \times 10^6$  specific binding sites per cell, respectively. Furthermore the binding affinity is also comparable to those found in intestinal brush-border membranes of rabbit ( $K_d = 8.3 \times 10^{-7}$  M; Mazurier *et al.*, 1985), mouse ( $K_d = 2.9 \times 10^{-7}$  M; Hu *et al.*, 1988, 1990), rhesus monkey ( $K_d = 9.0 \times 10^{-6}$  M; Davidson & Lönnnerdal, 1988) and human fetus ( $K_d = 3.3 \times 10^{-6}$  M; Kawakami & Lönnnerdal, 1991).

***b) Effect of picolinic acid on intracellular iron and binding of human lactoferrin to HT29-18-C<sub>1</sub> cells***

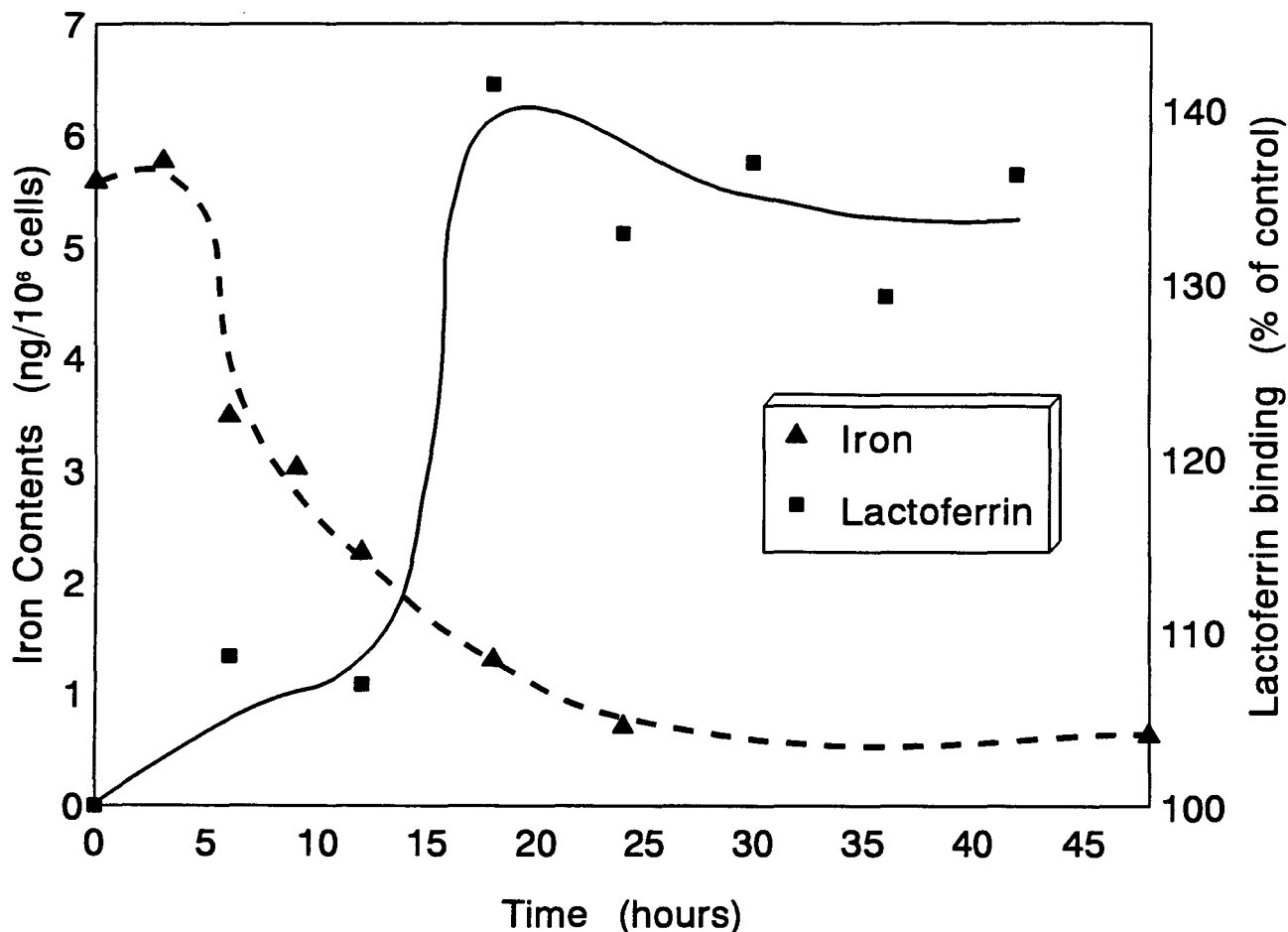
The concentration-dependence of the effect of picolinic acid on intracellular iron contents and binding of human lactoferrin to the cell monolayers was examined in the first place. As shown in **FIG. 26** (voir p. 141), intracellular iron contents were decreased after 48-h incubation with picolinic acid concentration-dependently. **FIG. 26** also shows that 48-h incubations with increasing amounts of picolinic acid resulted in enhanced lactoferrin binding to the cell surface. The maximum specific binding, which exhibited approx. 70% increased binding compared with control experiments, was obtained at 2 mM picolinic acid. The adverse effect on binding of lactoferrin was observed at 4 mM picolinic acid, which is unlikely to result from cytotoxic effect of this reagent since cell viabilities estimated by trypan blue exclusion showed only a slight decrease (*i.e.*, 97% in control, 92.4% at 4.0 mM picolinic acid). Therefore the following experiments were carried out at a picolinic acid concentration of 2 mM.

Secondly, we examined the time course of the effect of picolinic acid treatment on binding of lactoferrin to the cell monolayers in parallel with intracellular iron contents. As shown in **FIG. 27** (voir p. 142), increased lactoferrin binding by approx. 40% appeared between 12 and 18 h after addition of 2 mM picolinic acid, and steady-state increased binding was observed after 18 h. Intracellular iron contents started to decrease 3 h after addition of picolinic acid and continued to decrease to about 13% of the control levels till 24 h.



**FIG. 26** Binding of <sup>125</sup>I-labelled diferric human lactoferrin to HT29-18-C<sub>1</sub> cell monolayers and intracellular iron contents after incubation with varying concentrations of picolinic acid.

Confluent HT29-18-C<sub>1</sub> cells were incubated at 37 °C in 10% CO<sub>2</sub> for 48 h with iron-depleted DMEM containing the indicated concentrations of picolinic acid. The cell monolayers were incubated for 90 min at 4°C with 500 nM diferric <sup>125</sup>I-lactoferrin. Cell-bound radioactivities were determined by counting the scraped cells in a g-counter. Nonspecific binding was estimated by incubation in the presence of a 100-fold molar excess of unlabelled diferric lactoferrin. The results were expressed as specific binding of <sup>125</sup>I-lactoferrin to cells. Intracellular iron contents were determined by measurement of iron concentrations in cytosolic fractions using an atomic absorption spectrometer.



**FIG. 27** Alteration of binding of  $^{125}\text{I}$ -labelled diferric human lactoferrin to HT29-18-C<sub>1</sub> cell monolayers and intracellular iron contents as a function of time of incubation with picolinic acid.

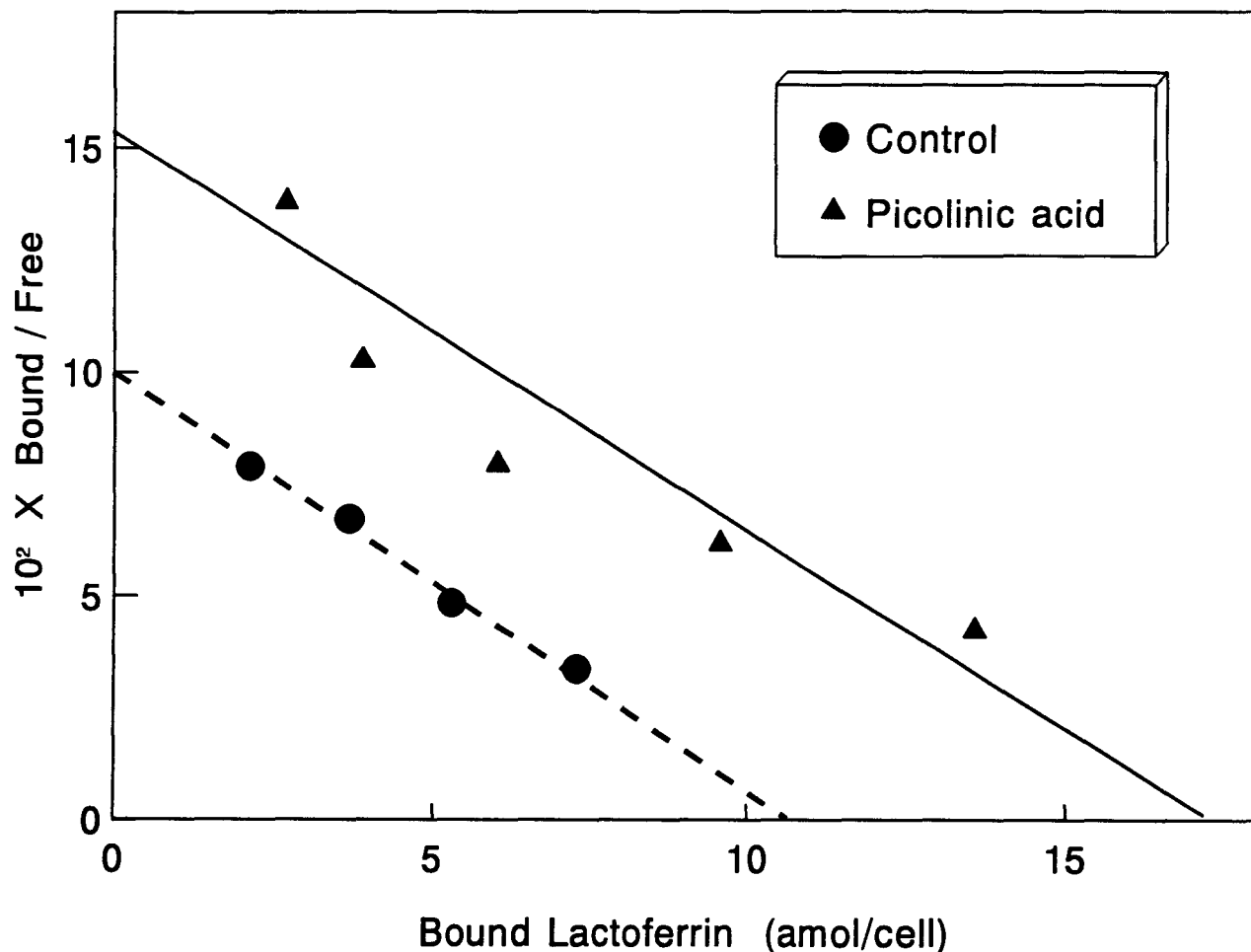
Confluent HT29-18-C<sub>1</sub> cells were incubated at 37 °C in 10% CO<sub>2</sub> for the indicated times in iron-depleted DMEM containing 2mM picolinic acid. The cell monolayers were incubated for 90 min at 4°C with 500 nM diferric  $^{125}\text{I}$ -lactoferrin. Cell-bound radioactivities were determined by counting the scraped cells in a g-counter. Nonspecific binding was estimated by incubation in the presence of a 100-fold molar excess of unlabelled diferric lactoferrin. The results were expressed as a percentage of specific binding of  $^{125}\text{I}$ -lactoferrin to treated cells compared with specific binding of  $^{125}\text{I}$ -lactoferrin to cells incubated in standard DMEM alone. Intracellular iron contents were determined by measurement of iron concentrations in cytosolic fractions using an atomic absorption spectrometer.

Fernandez-Pol (1977) has clearly demonstrated that picolinic acid not only inhibits cellular iron uptake but also removes intracellular iron, concentration- and time-dependently. In the present study, we also observed iron-depleting effect of picolinic acid from HT29-18-C<sub>1</sub>. Furthermore, the increasing patterns of binding of lactoferrin to HT29-18-C<sub>1</sub> cells were observed to be quite similar to the decreasing patterns of intracellular iron contents in both concentration and time-dependent manners. These results strongly suggested the involvement of intracellular iron levels in binding of lactoferrin to the surface of HT29-18-C<sub>1</sub> cells.

***c) Nature of increased binding of human lactoferrin to HT29-18-C<sub>1</sub> cells by picolinic acid treatment***

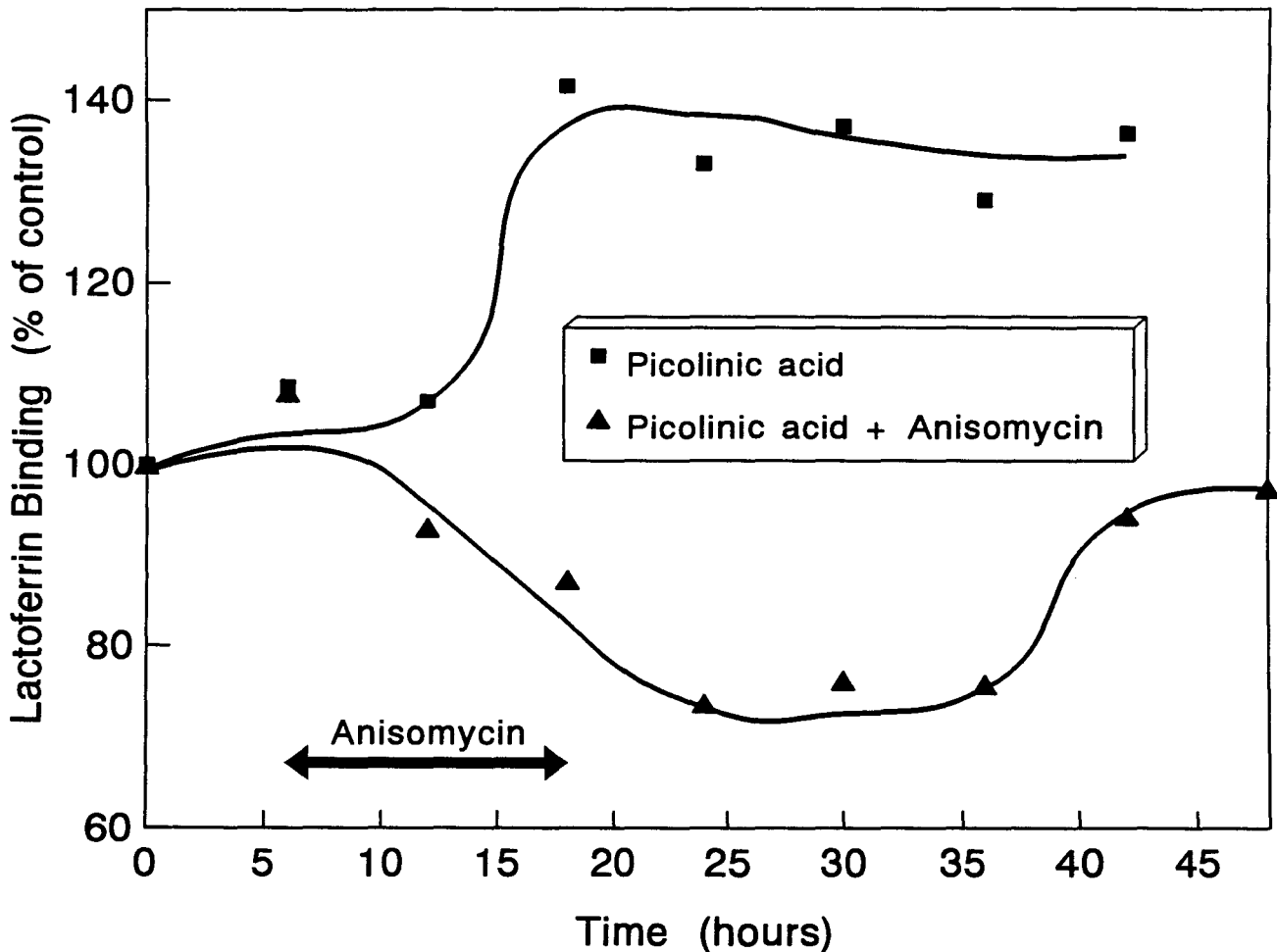
The nature of increased binding of lactoferrin induced by picolinic acid was examined first by the binding assay with various concentrations of lactoferrin. FIG. 28 (voir p. 144) shows the Scatchard analysis of binding of lactoferrin to HT29-18-C<sub>1</sub> cell monolayers cultured in the presence or absence of 2 mM picolinic acid. This analysis showed that picolinic acid treated cells exhibited  $1.2 \times 10^7$  binding sites for lactoferrin per cell with affinity of  $K_d = 8.5 \times 10^{-7}$  M, indicating an approx. 1.6-fold increase in number of lactoferrin binding sites and unmodified binding affinity for lactoferrin. These results mean that increased binding of lactoferrin resulted from the enhanced expression of the lactoferrin receptor on the surface of the cell, but not the alteration of binding affinity.

The effect of anisomycin, a reversible protein biosynthesis inhibitor, was investigated on the time course of binding of lactoferrin by the picolinic acid treatment shown in FIG. 29 (voir p. 145). The presence of anisomycin between 6 h and 18 h after the addition of picolinic acid totally abolished the induction of increased binding of lactoferrin by picolinic acid treatment, and binding of lactoferrin was decreased by approx. 20%. These results indicate that the increased binding of lactoferrin after incubation with picolinic acid was not due to a shift of lactoferrin receptor from the intracellular pool to the cell surface, but due to enhanced *de novo* lactoferrin receptor biosynthesis. In addition, the decreased binding of lactoferrin during and after the presence of anisomycin seems unlikely owing to the cytotoxic effect of



**FIG. 28** Scatchard analysis of binding of  $^{125}\text{I}$ -labelled diferric human lactoferrin to HT29-18-C<sub>1</sub> cell monolayers after incubation with picolinic acid.

Confluent HT29-18-C<sub>1</sub> cells were incubated at 37 °C in 10% CO<sub>2</sub> for 24 h in iron-depleted DMEM containing 2mM picolinic acid. Diferric  $^{125}\text{I}$ -lactoferrin binding experiments were done as described in FIG. 25. Scatchard analysis was carried out for specific binding. The results were expressed in comparison with those obtained for cells incubated in standard DMEM alone.



**FIG. 29** Effect of anisomycin on alteration of binding of  $^{125}\text{I}$ -labelled diferric human lactoferrin to HT29-18-C<sub>1</sub> cell monolayers as a function of time of incubation with picolinic acid.

The same experimental procedures were performed as described in FIG. 26 except incubation in the presence of 2mM picolinic acid and 1  $\mu\text{M}$  anisomycin at the period indicated in the figure. The results were expressed as a percentage of specific binding of  $^{125}\text{I}$ -lactoferrin to treated cells compared with specific binding of  $^{125}\text{I}$ -lactoferrin to cells incubated in standard DMEM alone.

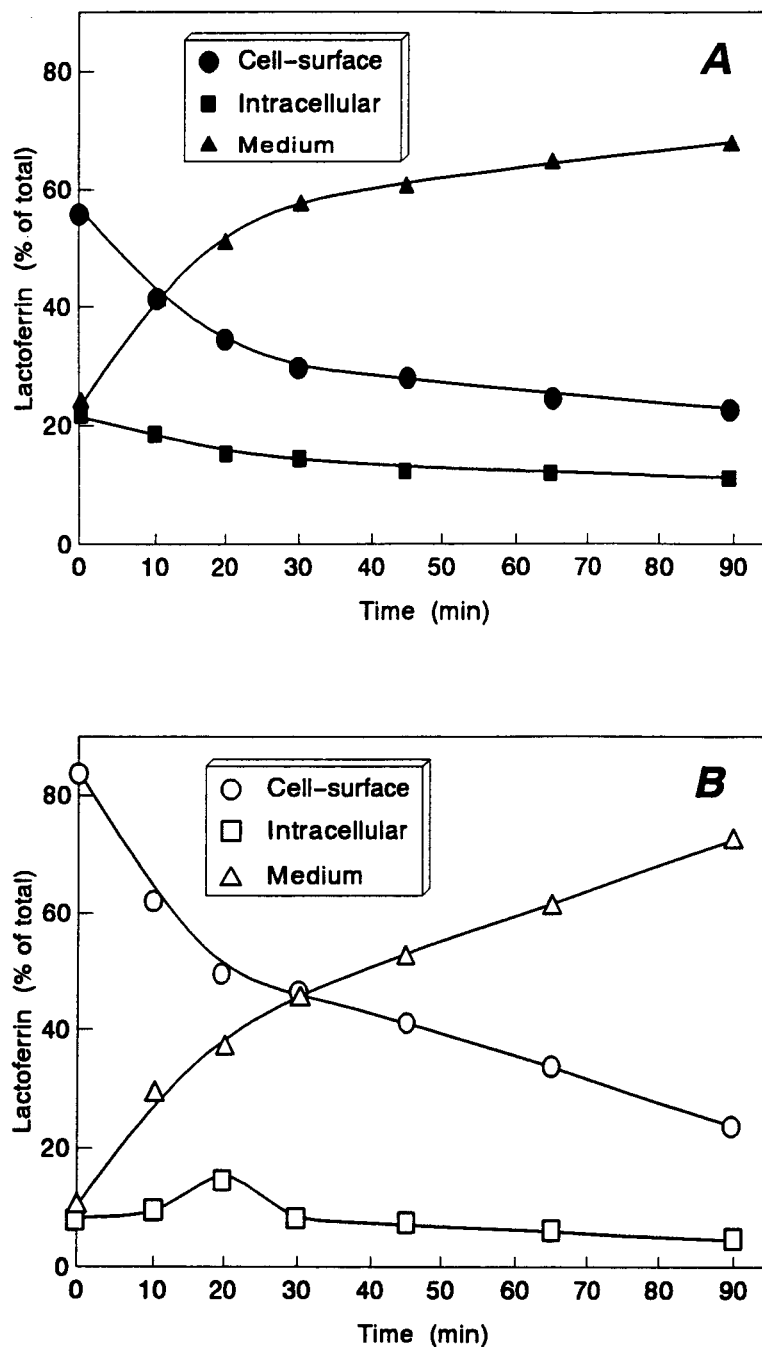


anisomycin. It might result from the unbalanced lactoferrin receptor turnover, *i.e.*, the reduced lactoferrin biosynthesis plus lactoferrin receptor degradation, since binding of lactoferrin returned to the control levels at 42 h after the addition of picolinic acid, *i.e.*, 24 h after the removal of anisomycin.

It has been shown that iron depletion by picolinic acid or desferrioxamine induces the increase in number of the surface-expressed transferrin receptor at least three times (Mattia *et al.*, 1984; Testa *et al.*, 1985). The observed iron-dependent expression of the lactoferrin receptor appears comparable to that of the transferrin receptor.

#### ***d) Effect of picolinic acid on the uptake of lactoferrin***

Two different experimental procedures were performed to examine whether the lactoferrin receptor is functional and whether picolinic acid affects the functions of the receptor. In the first procedure, to determine the fates of cell surface-bound lactoferrin, the cell monolayers were incubated with 500 nM diferric  $^{125}\text{I}$ -lactoferrin at 4°C, rinsed with DPBS+ to remove unbound labelled lactoferrin, and then incubated at 37°C. **FIG. 30-A and 30-B** (voir p. 147) show the distribution of initially surface-bound lactoferrin after incubation at 37 °C for the cells without and with picolinic acid treatment. In the cells without picolinic acid treatment, cell surface-bound lactoferrin decreased rapidly, 35 and 20% of total lactoferrin at 20, 65 min, respectively. Conversely, lactoferrin in the medium increased rapidly, 50 and 60% of total lactoferrin at 20, 65 min, respectively. Intracellular lactoferrin, *i.e.*, cell-associated lactoferrin resistant against the acid-treatment, continued to decrease progressively throughout incubation at 37°C, 20 and 10% of total lactoferrin at 0 and 65 min, respectively. These results suggest that very little internalization of surface-bound lactoferrin occurred in the cells without picolinic acid treatment. In the picolinic acid treated cells, the similar tendency of the lactoferrin distribution was observed except that a small increase peaking at 20 min was obtained for intracellular lactoferrin, *i.e.*, 7, 15 and 7% of total lactoferrin at 0, 20, and 30 min, respectively. These results suggest that a small part of surface-bound lactoferrin was internalized in the picolinic acid treated cells.



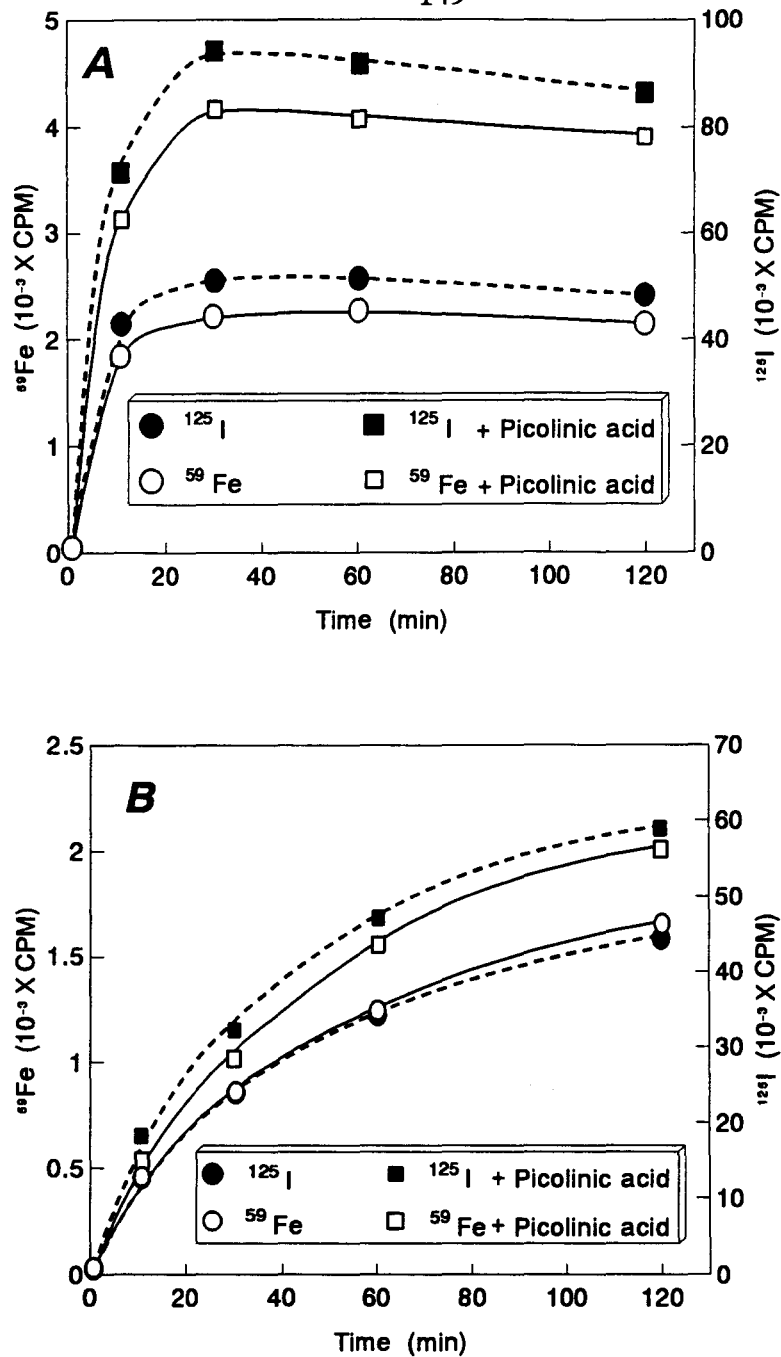
**FIG. 30** Time course of distribution of  $^{125}\text{I}$ -labelled diferric human lactoferrin bound to the HT29-18-C<sub>1</sub> cell surface with or without preincubation with picolinic acid.

Confluent HT29-18-C<sub>1</sub> cells were incubated for 90 min at 4°C with 500 nM diferric  $^{125}\text{I}$ -lactoferrin. After removal of unbound lactoferrin, the cell monolayers were incubated at 37 °C. Medium-dissociated, cell surface-bound and intracellular  $^{125}\text{I}$ -radioactivities were determined in a g-counter at the indicated times (A). The same experimental procedure was performed for the confluent HT29-18-C<sub>1</sub> cells preincubated at 37 °C in 10% CO<sub>2</sub> for 24 h in iron-depleted DMEM containing 2mM picolinic acid (B).

The present results of untreated cells are well consistent with the previously obtained results with HT29-D4 (Roiron-Lagroux & Figarella, 1990). In these cells, surface-bound lactoferrin was unlikely to be internalized by clathrin-dependent receptor-mediated endocytotic processes, which are very efficient processes on account of concentration of ligands in clathrin-coated pits (Shen *et al.*, 1992). Owing to the relatively low affinity binding, surface-bound lactoferrin might be dissociated rapidly in the equilibration with newly changed medium, thus no internalization of lactoferrin could be observed even by clathrin-independent endocytotic processes. In picolinic acid-treated cells, a small part of surface-bound lactoferrin was seen to be internalized. Preliminary microscopic observations using fluorescein-labelled lactoferrin revealed that minor populations (approx. 30%) of treated cells internalized lactoferrin in considerable amount, which might account for the observed partial internalization of surface-bound lactoferrin. These results suggest that the cells responsive to picolinic acid treatment express two to three-fold more number of the lactoferrin receptor than non-responsive cells, and that these responsive cells could internalize lactoferrin more efficiently. The involvement of clathrin-dependent procedures in the responsive cells remains to be investigated.

*e) Effect of picolinic acid on uptake of lactoferrin-bound iron*

In the second procedure, cells were incubated at 37 °C in the presence of 400 nM diferric  $^{59}\text{Fe}$ - $^{125}\text{I}$ -lactoferrin to examine whether the induced lactoferrin receptor functions to deliver iron into cells. FIG. 31-A and 31-B (voir p. 149) show the alteration of cell surface-bound and intracellular lactoferrin as a function of time. Surface-bound lactoferrin reached steady-state values by 30 min for cells both with and without picolinic acid treatment. About 2-fold more binding of lactoferrin was observed for treated cells also in this procedure. The ratio of cell-surface  $^{125}\text{I}$ - to  $^{59}\text{Fe}$ -radioactivities was unchanged throughout incubation at 37 °C (31-A). Continuous increases in intracellular  $^{125}\text{I}$ - and  $^{59}\text{Fe}$ -radioactivities were observed for both picolinic acid treated and untreated cells, and treated cells internalized 20-30% more both lactoferrin and iron than untreated cells. The ratio of intracellular  $^{125}\text{I}$ - to  $^{59}\text{Fe}$ -radioactivities were also unchanged throughout incubation at 37 °C (31-B). The uptake



**FIG. 31 Uptake of  $^{59}\text{Fe}$ - $^{125}\text{I}$ -dual-labelled diferric human lactoferrin bound to the HT29-18-C<sub>1</sub> cell surface with or without preincubation with picolinic acid.**

Confluent HT29-18-C<sub>1</sub> cells were incubated at 37 °C with 400 nM diferric  $^{59}\text{Fe}$ - $^{125}\text{I}$ -lactoferrin. Cell surface-bound and intracellular  $^{59}\text{Fe}$  and  $^{125}\text{I}$ -radioactivities were determined in a g-counter at the indicated times. The same experimental procedure was performed for the confluent HT29-18-C<sub>1</sub> cells preincubated at 37 °C in 10% CO<sub>2</sub> for 24 h in iron-depleted DMEM containing 2mM picolinic acid. (A) Cell surface-bound radioactivities; (B) intracellular radioactivities.

process of lactoferrin-bound iron is likely to be different from that of transferrin-bound iron. In the receptor-mediated endocytosis process, transferrin releases its iron in early endosomes and then recycles back to plasma membrane, whereas released iron accumulates inside cells. These results suggest that the lactoferrin receptor induced by picolinic acid treatment is able to mediate the cellular uptake of lactoferrin-bound iron by a mechanism different from endocytotic process of transferrin mediated by the transferrin receptor.

#### **B-4. Discussion**

The present study showed that the biosynthesis of the lactoferrin receptor is regulated in response to the levels of intracellular iron in enterocytes, and that the lactoferrin receptor induced by intracellular iron depletion facilitates the uptake of lactoferrin-bound iron into enterocytes. In our previous study, using HT29 clone 19A cells growing on the permeable membranes, we showed the transepithelial transports of lactoferrin and lactoferrin-bound iron from apical to basolateral sides (Mikogami *et al.*, unpublished work). These results suggest that the transepithelial transport of lactoferrin in intestine epithelial cells might be increased in iron-depleted conditions.

The biosynthesis of at least three proteins important in iron cellular metabolism, the transferrin receptor, ferritin and erythroid 5-aminolevulinic acid synthase, have been revealed to be regulated post-transcriptionally by a common mechanism (Klausner *et al.*, 1993). It has been first found that intracellular iron levels modulate the biosynthesis of such proteins. The biosynthesis of the transferrin receptor is increased when iron is scarce, experimentally induced by adding the iron chelators, desferrioxamine or picolinic acid, to the medium of cultured cells (Mattia *et al.*, 1984; Testa *et al.*, 1985), whereas it is decreased when iron is abundant, experimentally achieved by adding diferric transferrin, iron salt or hemin (Louache *et al.*, 1984). Conversely, the biosynthesis of ferritin, a major iron storage protein, is decreased by iron depletion, and increased by iron repletion (Zahringer *et al.*, 1976). It is now well understood that the mechanism of iron-dependent biosynthesis regulation of these proteins is based on the regulated binding of a cytoplasmic protein termed iron-responsive

element binding protein (Klausner & Harford, 1989) to mRNA stem-loop sequence/ structure motifs, iron-responsive elements or iron-regulatory elements (Hentze *et al.*, 1987a; Casey *et al.*, 1988b). The IRE-BP, which is identical with cytosolic aconitase (Kennedy *et al.*, 1992), can sense intracellular iron levels by changing the oxidation states of its iron-sulfur cluster (Haile *et al.*, 1992a). Consequently, iron starvation induces increased expression of transferrin receptors and subsequent enhanced iron uptake, and simultaneously represses the synthesis of ferritin, which is involved in iron storage. Recent findings of the involvement of this iron-dependent regulation mechanism in the biosynthesis of erythroid 5-aminolevulinic acid synthase mRNA (Cox *et al.*, 1991) suggest the possibilities that the biosynthesis of proteins concerning iron metabolism might be extensively regulated by the same mechanism.

It seems likely that the iron-dependent biosynthetic regulation mediated by the IRE-BP also occurs in the levels of intestinal epithelial cells. It is well known that in iron deficiency, the ferritin concentration in intestinal epithelial cells is low and that it is high in secondary iron overload (Halliday *et al.*, 1978). Mucosal ferritin has long been suggested to regulate intestinal iron absorption by acting as an iron acceptor and by blocking the passage of iron through the enterocytes (Granick, 1946). The blocking function of mucosal ferritin in iron absorption is supported by abnormally low levels of mucosal ferritin expression in patients with genetic haemochromatosis whose intestinal iron absorption is still highly efficient in spite of high body iron store (Pietrangelo *et al.*, 1992). The number of the mucosal transferrin receptor also reflects the body iron store. Nevertheless, the transferrin receptor is unlikely to play a role in the transport of iron across the enterocytes since the transferrin receptor is found specifically localized on basolateral membranes of enterocytes, particularly those of crypt cells (Anderson *et al.*, 1991). The expression of undefined inorganic iron carriers on brush-border membranes, which are thought to facilitate the iron uptake across the brush-border membranes, has been also regulated according to the body iron status (Muir *et al.*, 1984). However, the mechanism of the regulation remains unclear.

Despite the findings of the lactoferrin receptor on intestinal brush-border membranes, its role in intestinal iron absorption is still a subject of controversy. Some clinical studies failed to demonstrate the improved iron absorption by lactoferrin supplementation

(Fairweather-Tait *et al.*, 1987; Schulz-Lell *et al.*, 1991). Another clinical study found the inhibitory effect of lactoferrin on iron absorption in normal subjects, whereas no such effect was found in patients with idiopathic haemochromatosis (de Vet & van Gool, 1974). In these patients, mucosal expression of the transferrin receptor and ferritin has been found unlikely to be regulated in response to body iron store (Pietrangelo *et al.*, 1992). On the other hand, the *in vivo* study in rat also showed that lactoferrin supplementation improved the body iron status particularly in anaemia rat (Kawakami *et al.*, 1988). These observations and our present study suggest that the biosynthesis of the lactoferrin receptor in intestinal epithelial cells may be regulated in response to the iron levels, possibly in a fashion analogous to the post-transcriptional regulation of the transferrin receptor, and that the lactoferrin receptor may play a role in iron absorption, particularly in iron deficiency.

## C. Conclusion

La carence intracellulaire en fer provoquée par l'acide picolinique, un chélateur de fer, induit une augmentation de la biosynthèse du récepteur de la lactotransferrine au niveau des cellules HT29-18-C<sub>1</sub>. L'augmentation du nombre de récepteurs à la surface cellulaire permet une amélioration de l'incorporation du fer fixé à la lactotransferrine. Ces résultats suggèrent que la biosynthèse du récepteur de la lactotransferrine au niveau des cellules de l'épithélium intestinal, pourrait être régulée en fonction du taux de fer intracellulaire. Ainsi, le récepteur de la lactotransferrine pourrait être impliqué dans l'absorption intestinale du fer, plus particulièrement dans des conditions de déficience en fer.



## *Conclusion Générale*

---

Les travaux dont nous rapportons les résultats dans ce mémoire font suite à ceux réalisés dans notre laboratoire par Mazurier et coll. (1985), Hu et coll. (1988, 1990) et Derisbourg (1990). Ils ont démontré la présence du récepteur de la lactotransferrine au niveau des membranes de bordure en brosse intestinale de Lapin (Mazurier *et al.*, 1985) et de Souris (Hu *et al.*, 1988), et à la surface apicale de cellules en culture présentant une différenciation de type entérocytaire, HT29 Glc<sup>-</sup> Ino<sup>+</sup> (Derisbourg, 1990).

Dans le but d'élargir nos connaissances sur le rôle de la lactotransferrine et de son récepteur dans l'absorption intestinale du fer, nous avons utilisé des lignées cellulaires capables de se différencier en entérocyte (Caco-2, HT29 Glc<sup>-</sup> Ino<sup>+</sup>, HT29-18-C<sub>1</sub> et HT29 clone 19A) comme modèle de cellules de l'épithélium intestinal humain. Ce modèle nous a permis d'étudier les phénomènes caractéristiques des cellules polarisées et la régulation cellulaire fer-dépendante dans un système homologue (c'est-à-dire l'entérocyte humain et la lactotransferrine humaine). Les conclusions que nous pouvons tirer de nos travaux sont les suivantes:

**1) La lactotransferrine se fixe spécifiquement sur les lignées cellulaires intestinales en culture.**

Une affinité de fixation relativement faible ( $K_d \approx 1 \times 10^{-6}$  M) a été observée sur les cellules intestinales en culture. D'après les expériences d'inhibition compétitive, la fixation de la lactotransferrine ne semble pas modifiée selon son degré de saturation en fer. De plus, cette fixation apparaît spécifique, et ne résultant pas d'interactions électrostatiques ou lectiniques. En phase différenciée, la fixation de la lactotransferrine sur les quatre lignées cellulaires utilisées, est similaire à la fixation de la lactotransferrine sur les cellules intestinales de plusieurs espèces incluant l'Homme.

**2) L'expression du récepteur de la lactotransferrine dans les lignées cellulaires intestinales en culture semble être régulée en fonction du degré de prolifération.**

Une forte corrélation inverse a été observée entre l'expression du récepteur de la lactotransferrine et la prolifération des cellules de la lignée HT29-18-C<sub>1</sub>. Les cellules HT29-18-C<sub>1</sub> prédifférenciées expriment le récepteur de la lactotransferrine environ sept fois plus que les cellules HT29-18-C<sub>1</sub> bien différenciées. Cette corrélation est comparable à la corrélation inverse entre l'expression du récepteur de la sérotransferrine et la prolifération cellulaire observée dans différents types de cellules.

**3) Le transport transépithélial de la lactotransferrine à travers les monocouches de cellules HT29 clone 19A est un transport transcellulaire et non paracellulaire.**

Lors des expériences avec les chambres d'Ussing, la lactotransferrine est transportée du côté apical vers le côté basolatéral des monocouches cellulaires HT29 clone 19A via deux voies intracellulaires: une première voie majeure de dégradation transportant environ 90% et conduisant à la libération du fer de la lactotransferrine humaine, ce fer étant alors retenu dans la cellule, tandis que les fragments dégradés sont transportés vers le compartiment basolatéral. Une deuxième voie mineure transporte environ 10% et permet le passage dans le compartiment basolatéral, de la lactotransferrine intacte et du fer qui lui est lié.

Bien que le transport de la lactotransferrine intacte apparaisse saturable en fonction de la concentration apicale en lactotransferrine, la quantité totale de protéine transportée et la proportion de protéine intacte par rapport à la protéine dégradée sont toutes les deux similaires à celles obtenues dans le même modèle avec la peroxydase de Raifort, un marqueur de phase fluide. Ces résultats, d'une part, sont compatibles avec les observations *in vivo* de la présence de lactotransferrine d'origine maternelle dans le sang des nouveau-nés. D'autre part, ils suggèrent que la lactotransferrine et son récepteur pourraient jouer un rôle mineur dans l'absorption du fer dans ce modèle.

#### **4) L'expression du récepteur de la lactotransferrine au niveau des cellules intestinales semble être régulée en fonction du taux de fer intracellulaire.**

Le traitement des cellules HT29-18-C<sub>1</sub> avec de l'acide picolinique, un chélateur de fer, induit une augmentation d'environ deux fois de l'expression du récepteur de la lactotransferrine avec une diminution concomitante du taux de fer intracellulaire. L'augmentation de l'expression du récepteur de la lactotransferrine à la surface cellulaire produit une augmentation de l'incorporation du fer fixé à la lactotransferrine.

Ces résultats suggèrent que la biosynthèse du récepteur de la lactotransferrine dans les cellules de l'épithélium intestinal pourrait être régulée en fonction du taux de fer dans l'organisme. Ainsi, le récepteur synthétisé pourrait être impliqué dans l'absorption intestinale du fer, en particulier lors des conditions de déficience en fer.

#### **5) Perspectives**

L'ensemble des travaux suggère la possibilité du rôle de régulation de la lactotransferrine dans l'absorption intestinale du fer. Cette régulation serait effectuée par l'intermédiaire de l'expression fer-dépendante du récepteur de la lactotransferrine dans les entérocytes. Cependant, de nombreuses questions restent posées:

- 1) L'augmentation de l'internalisation du fer fixé à la lactotransferrine, induite par la carence intracellulaire en fer, produit-elle réellement une augmentation du transport du fer vers la surface basolatérale, et comment? Nous possédons très peu d'informations sur le devenir de la lactotransferrine internalisée et du fer qui lui est lié.
- 2) Comment l'expression du récepteur de la lactotransferrine est-elle régulée dans les entérocytes, en fonction du taux de fer dans l'organisme? Récemment, il a été mis en évidence que l'expression du récepteur de la sérotransferrine et de la ferritine subissait une régulation post-transcriptionnelle en fonction du taux de fer dans l'organisme. L'expression fer-dépendante du récepteur de la lactotransferrine est-elle régulée par un tel mécanisme?

- 3) Pourquoi le récepteur de la lactotransferrine est-il fortement exprimé dans les cellules en croissance? Il est bien établi que le récepteur de la sérotransferrine intervient dans l'acquisition du fer et/ou la réduction du fer fixé à la sérotransferrine, qui sont nécessaires à la prolifération cellulaire. Le récepteur de la lactotransferrine semble posséder une fonction similaire si l'on considère le fait que la lactotransferrine stimule la prolifération des cellules cryptiques.

## *Références*

---

- Adams, P. C., Mack, U., Powell, L. W., Halliday, J. W. (1988a) Solid phase immunoradiometric assay for porcine serum ferritin. *Comp. Biochem. Physiol.* 90:837.
- Adams, P. C., Powell, L. W., Halliday, J. W. (1988b) Isolation of a human hepatic ferritin receptor. *Hepatology* 8:719.
- Ainscough, E. W., Brodie, A. M., Plowman, J. E. (1979) The chromium, manganese, cobalt and copper complexes of human lactoferrin. *Inorg. Chim. Acta* 33:149–153.
- Aisen, P., Listowsky, I. (1980) Iron transport and storage protein. *Ann. Rev. Biochem.* 357–393.
- Alvarez-Hernandez, X., Nichols, G. M., Glass, J. (1991) Caco-2 cell line – A system for studying intestinal iron transport across epithelial cell monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1070:205–208.
- Ambruso, D. R., Johnston, R. B. (1981) Lactoferrin enhances OH radical production by human neutrophils, neutrophil particulate fractions and an enzymatic generating system. *J. Clin. Invest.* 67:352–360.
- Anderson, B. F., Baker, H. M., Norris, G. E., Rumball, S. V., Baker, E. N. (1990) Apolactoferrin structure demonstrates ligand-induced conformational changes in transferrins. *Nature* 344:784–787.
- Anderson, B. F., Baker, H. M., Dodson, E. J., Norris, G. E., Rumball, S. V., Waters, J. M., Baker, E. N. (1987) Structure of human lactoferrin at 3.2 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1769–1773.
- Anderson, B. F., Baker, H. M., Norris, G. E., Rice, D. W., Baker, E. N. (1989) Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 209:711–734.
- Anderson, G. J., Walsh, M. D., Powell, L. W., Halliday, J. W. (1991) Intestinal transferrin receptors and iron absorption in the neonatal rat. *Br. J. Haematol.* 77:229–236.
- Andrieux, A., Hudry-Clergeon, G., Ryckwaert, J. J., Chapel, A., Ginsberg, M. H., Plow, E. F., Marguerite, G. (1989) Amino acid sequences in fibrinogen mediating its interaction with its platelet receptor, GP IIb–IIIa. *J. Biol. Chem.* 264:9258–9265.
- Apodaca, G., Bomsel, M., Arden, J., Breitfeld, P. P., Tang, K., Mostov, K. E. (1991) The polymeric immunoglobulin receptor – A model protein to study transcytosis. *J. Clin. Invest.* 87:1877–1882.
- Arnold, R. R., Brewer, M., Gauthier, J. J. (1980) Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect. Immun.* 28:893–898.
- Arnold, R. R., Russel, J. E., Champion, W. J., Brewer, M., Gauthier, J. J. (1982) Bactericidal activity of human lactoferrin. Differentiation from the stasis of iron deprivation. *Infect. Immunity* 35:792–799.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B. (1987) Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Are lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl-radical generation? *Biochem. J.* 241:273–278.
- Augeron, C., Laboisie, C. L. (1984) Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res.* 44:3961–3969.

- Augeron, C., Madret, J. J., Laboisse, C. L., Grasset, E. (1986) Permanently differentiated cell clones isolated from the human colonic adenocarcinoma cell line HT29: possible models for the study of ion transport and mucus production. In "Ion Gradient-Coupled Transport - INSERM Symposium No. 26" edited by Alvarado, F., van Os, C. H. Amsterdam: Elsevier Sciences publishers, p. 363-366.
- Azari, P., Baugh, R. F. (1967) A simple and rapid procedure for preparation of large quantities of pure ovotransferrin. *Arch. Biochem. Biophys.* 118:138-144.
- Aziz, N., Munro, H. N. (1987) Iron regulates ferritin mRNA translation through a segment of its 5' untranslated region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:8478-8482.
- Bagby, G. C., McCall, E., Layman, D. L. (1983) Regulation of colony-stimulating activity production. Interaction of fibroblasts, mononuclear phagocytes and lactoferrin. *J. Clin. Invest.* 71:340-344.
- Bailey, S., Evans, R. W., Garrat, R. C., Gorinsky, B., Hasnain, S., Horsburgh, C., Jhoti, H., Lindley, P. F., Mydin, A., Sarra, J. L., Watson, J. L. (1988) Molecular structure of serum transferrin at 3,3 Å resolution. *Biochemistry* 27:5804-5812.
- Bajnath, R. B., Dekker, K., Vaandrager, A. B., Dejonge, H. R., Groot, J. A. (1992a) Biphasic increase of apical Cl<sup>-</sup> conductance by muscarinic stimulation of HT-29 cl.19A human colon carcinoma cell line - Evidence for activation of different Cl<sup>-</sup> conductances by carbachol and forskolin. *J. Membr. Biol.* 127:81-94.
- Bajnath, R. B., Vanhoeve, M. H., Dejonge, H. R., Groot, J. A. (1992b) Regulation of apical Cl<sup>-</sup> conductance and basolateral K<sup>+</sup> conductances by phorbol esters in HT-29cl.19A cells. *Am. J. Physiol.* 263:C759-C766.
- Baker, E. N., Lindley, P. F. (1992) New perspectives on the structure and function of transferrins. *J. Inorg. Biochem.* 47:147.
- Baker, E. N., Rumball, S. V., Anderson, B. F. (1987) Transferrins: insights into structure and function from studies on lactoferrin. *Trends Biochem. Sci.* 12:350-353.
- Bali, P. K., Zak, O., Aisen, P. (1991) A new role for the transferrin receptor in the release of iron from transferrin. *Biochemistry* 30:324-328.
- Banerjee, D., Flanagan, P. R., Cluett, J., Valberg, L. S. (1986) Transferrin receptors in the human gastrointestinal tract. Relationship to body iron stores. *Gastroenterology* 91:861-869.
- Barton, H. A., Eisenstein, R. S., Bonford, A., Munro, H. N. (1990) Determinants of the interaction between the iron-responsive element-binding protein and its binding site in rat L-ferritin mRNA. *J. Biol. Chem.* 265:7000-7008.
- Baxter, R. C., Zaltsman, Z., Turtle, J. R. (1984) Immunoreactive somatomedin-C/insulin-like growth factor I and its binding protein in human milk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 58:955-959.
- Baynes, R. D., Bothwell, T. H., Bezwoda, W. R., MacPhail, A. P., Derman, D. P. (1987) Relationship between absorption of inorganic and food iron in field studies. *Ann. Nutr. Metab.* 31:109-116.
- Beguin, Y., Huebers, H. A., Josephson, B., Finch, C. A. (1988) Transferrin receptors in rat plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:637-640.



- Beinert, H., Emptage, M. H., Dreyer, J.-L., Scott, R. A., Hahn, J. E., Hodgson, K. O., Thomson, A. J. (1983) Iron-sulfur stoichiometry and structure of iron-sulfur clusters in three-iron proteins: Evidence for [3Fe-4S] clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:393-396.
- Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., Tomita, M. (1992) Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 1121:130-136.
- Bennett, R. M., Mohla, C. (1976) A solid-phase radioimmunoassay for the measurement of lactoferrin in human plasma: variations with age, sex and disease. *J. Lab. Clin. Med.* 88:156-166.
- Bevins, C. L., Zasloff, M. (1990) Peptides from frog skin. *Annu. Rev. Biochem.* 59:395-414.
- Birgens, H. S., Hansen, N. E., Karle, H., Kristensen, L. Ø. (1983) Receptor binding of lactoferrin by human monocytes. *Br. J. Haematol.* 54:383-391.
- Biserte, G., Havez, R., Cuvelier, R. (1963) Les glycoprotéides des sécrétions bronchiques. *Exposés Annuels de Biochimie Médicale* 24:85-120.
- Blight, G. D., Morgan, E. H. (1983) Ferritin and iron uptake by reticulocyte. *Br. J. Haematol.* 55:59.
- Boman, H. G., Hultmark, D. (1987) Cell-free immunity in insects. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:103-126.
- Bortner, C. A., Miller, R. D., Arnold, R. R. (1986) Bactericidal effect of lactoferrin on *Legionella pneumophila*. *Inf. Immun.* 51:373-377.
- Bothwell, T. H., Charlton, R. W., Cook, J. D., Finch, C. A. (1979) In "Iron Metabolism in Man" Oxford: Blackwell, p. 1-576.
- Bottomley, S. S., Wolfe, L. C., Bridges, K. R. (1985) Iron metabolism in K562 erythroleukemic cells. *J. Biol. Chem.* 260:6811-6815.
- Boyd, D., Vecoli, C., Belker, D. M., Jain, S. K., Drysdale, J. W. (1985) Structural and functional relationships of human ferritin H and L chains deduced from cDNA clones. *J. Biol. Chem.* 260:11755-11761.
- Brandli, A. W., Adamson, E. D., Simons, K. (1991) Transcytosis of epidermal growth factor - The epidermal growth factor receptor mediates uptake but not transcytosis. *J. Biol. Chem.* 266:8560-8566.
- Bridges, K. R., Cudkowicz, A. (1984) Effect of iron chelators on the transferrin receptor in K562 cells. *J. Biol. Chem.* 259:12970-12977.
- Brines, R. D., Brock, J. H. (1983) The effect of trypsin and chymotrypsin on the in vitro antimicrobial and iron-binding properties of lactoferrin in human milk and bovine colostrum: unusual resistance of human apolactoferrin to proteolytic digestion. *Biochim. Biophys. Acta* 759:229-235.
- Brock, J. H. (1980) Lactoferrin in human milk: its role in iron absorption and protection against enteric infection in the new born infant. *Arch. Dis. Child.* 55:417-421.
- Brown, J. P., Infante, A. J., Makker, D. M., Yang, F., Bowmen, B. A. (1982) Human melanoma-associated antigen p97 is structurally and functionally related to transferrin. *Nature* 296:171.

- Brown, P. H., Daniels-McQueen S., Walden, W. E., Patino, M. M., Gaffield, L., Bielser, D., Thach, R. E. (1989) Requirements for the translational repression of ferritin transcripts in wheat germ extracts by 90-kDa protein from rabbit liver. *J. Biol. Chem.* 264:13383-13386.
- Broxmeyer, H. E. (1989) Iron-binding proteins and the regulation of hematopoietic proliferation/differentiation. In "Iron and Immunity, Cancer and Inflammation" edited by de Sousa, M., Brock, J.H. Chichester: John Wiley & Sons, p. 199-221.
- Broxmeyer, H. E., Cooper, S., Levi, S., Arosio P. (1991) Mutated recombinant human heavy-chain ferritins and myelosuppression in vitro and in vivo: a link between ferritin ferroxidase activity and biological fonction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:770-774.
- Broxmeyer, H. E., Moore, M. A. S., Ralph, P. (1976) Cell-free granulocyte colony inhibiting activity derived from human polymorphonuclear neutrophils. *Exp. Hematol.* 5:87-102.
- Broxmeyer, H. E., Smithyman, A., Eger, R. R., Meyers, P. A., de Sousa, M. (1978) Identification of lactoferrin as the granulocyte-derived inhibitor of colony stimulating activity (CSA)-production. *J. Exp. Med.* 148:1052-1067.
- Brunel, F., Ochoa, A., Schaeffer, E., Boissier, F., Guillou, Y., Cereghini, S., Cohen, G. N., Zakin, M. M. (1988) Interactions of DNA-binding proteins with the 5' region of the human transferrin gene. *J. Biol. Chem.* 263:10180-10185.
- Bullen, J. J., Armstrong, J. A. (1979) The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* 36:781-791.
- Bullen, J. J., Rogers, H. J., Griffiths, E. (1974) Bacterial iron metabolism in infection and immunity. In "Microbial Iron Metabolism" edited by Nielsands, J. B. New-York: Academic Press, p. 517-551.
- Bullen, J. J., Rogers, H. J., Leigh, L. (1972) Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants. *Brit. Med. J.* 1:69-75.
- Burton, P. S., Conradi, R. A., Hilgers, A. R., Ho, N. F. H., Maggiora, L. L. (1992) The relationship between peptide structure and transport across epithelial cell monolayers. *J. Controlled Release* 19:87-98.
- Carpenter, G. (1980) Epidermal growth factor is a major growth-promoting agent in human milk. *Science* 210:198-199.
- Carrano, C. J., Raymond, K. N. (1979) Ferric ion sequestering agents. 2. Kinetics and mechanism of iron removal from transferrin by enterobactin and synthetic triccatechols. *J. Amer. Chem. Soc.* 101:5401-5404.
- Casey, J. L., Di Jeso, B., Rao, K., Klausner, R. D., Harford, R. B. (1988a) Two genetic loci participate in the regulation by iron of the gene for the human transferrin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:1787-1791.
- Casey, J. L., Hentze, M. W., Koeller, D. M., Caughman, S. W., Rouault, T. A., Klausner, R. D., Harford, J. B. (1988b) Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. *Science* 240:924-928.
- Casey, J. L., Koeller, D. M., Ramin, V. C., Klausner, R. D., Harford, J. B. (1989) Iron regulation of transferrin receptor mRNA levels requires iron-responsive elements and a rapid turnover determinant in the 3' untranslated region of the mRNA. *EMBO J.* 8:3693-3699.

- Caughman, S. W., Hentze, M. W., Rouault, T. A., Harford, J. B., Klausner, R. D. (1988) The iron-responsive element is the single element responsible for iron-dependent translational regulation of ferritin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 263:19048–19052.
- Cerf-Bensussan, N., Quaroni, A., Kurnick, J. T., Bhan, A. K. (1984) Intraepithelial lymphocytes modulate Ia expression by intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 132:2244–2252.
- Chantret, I., Barbat, A., Dussaulx, E., Brattain, M., Zweibaum, A. (1988) Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res.* 48:1936–1942.
- Chen, T. R. (1977) In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33528 stain. *Exp. Cell Res.* 104:255–262.
- Chitambar, C. R., Zivkovic, Z. (1989) Release of soluble transferrin receptor from the surface of human leukemic HL60 cells. *Blood* 74:602–608.
- Coddeville, B., Strecker, G., Wieruszkeski, J.-M., Vliegenthart, J. F. G., van Halbeek, H., Peter-Katalinic, J., Egge, H., Spik, G. (1992) Heterogeneity of bovine lactotransferrin glycans. Characterization of a-D-Galp-(1 $\leftarrow$ 3)-b-D-Gal- and a-NeuAc-(2 $\leftarrow$ 6)-b-D-GalpNac-(1 $\leftarrow$ 4)-b-D-GlcNac-substituted N-linked glycans. *Carbohydr. Res.* 236:145–164.
- Conrad, M. E., Crosby, W. H. (1963) Intestinal mucosal mechanisms controlling iron absorption. *Blood* 22:406–415.
- Conrad, M. E., Umbreit, J. N., Moore, E. G., Peterson, R. D. A., Jones, M. B. (1990) A newly identified iron binding protein in duodenal mucosa of rats – Purification and characterization of mobilferrin. *J. Biol. Chem.* 265:5273–5279.
- Constable, A., Quick, S., Gray, N. K., Hentze, M. W. (1992) Modulation of the RNA-binding activity of a regulatory protein by iron in vitro – Switching between enzymatic and genetic function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4554–4558.
- Cook, J. D., Dassenko, S., Skikne, B. S. (1990) Serum transferrin receptor as an index of iron absorption. *Br. J. Haematol.* 75:603–609.
- Cook, J. D., Lipschitz, D. A., Miles, L. E., Finch, C. A. (1974) Serum transferrin as a measure of iron stores in normal subjects. *Am. J. Clin. Invest.* 27:681–687.
- Cox, T. C., Bawden, M. J., Martin, A., May, B. K. (1991) Human erythroid 5-aminolevulinate synthase – Promoter analysis and identification of an iron-responsive element in the messenger RNA. *EMBO J.* 10:1891–1902.
- Cox, T. M., Mazurier, J., Spik, G., Montreuil, J., 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., O'Donnel, M. W. (1980) Kinetics of iron binding by intestinal microvillus membranes isolated from iron-deficient and iron-repleted rabbits. *Biochem. Int.* 1:446.
- Cox, T. M., O'Donnel, M. W. (1981) Studies on the binding of iron rabbit intestinal microvillus membranes. *Biochem. J.* 194:753.
- Craven, C. M., Alexander, J., Eldridge, M., Kushner, J. P., Bernstein, S., Kaplan, J. (1987) Tissue distribution and clearance kinetics of non-transferrin bound iron in the hypotransferrinemic mouse: a recent model for hemochromatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3457.

- Crichton, R. R. (1991) In "Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism" Chichester: Ellis Horwood
- Crichton, R. R., Ward, R. J. (1992) Iron Metabolism – New Perspectives in View. *Biochemistry* 31:11255–11264.
- Dandekar, T., Stripecke, R., Gray, N. K., Goossen, B., Constable, A., Johansson, H. E., Hentze, M. W. (1991) Identification of a novel iron-responsive element in murine and human erythroid d-aminolevulinic acid synthase mRNA. *EMBO J.* 17:1903–1909.
- Dantzig, A. H., Bergin, L. (1990) Uptake of the cephalosporin, cephalixin, by a dipeptide transport carrier in the human intestinal cell line, Caco-2. *Biochim. Biophys. Acta* 1027:211–217.
- Dautry-Varsat, A. (1986) Receptor-mediated endocytosis: the intracellular journey of transferrin and its receptor. *Biochimie* 68:375–381.
- Davidson, L. A., Lönnerdal, B. (1987) Persistence of human milk proteins in the breast-fed infant. *Acta Paediatr. Scand.* 76:733–740.
- Davidson, L. A., Lönnerdal, B. (1988) Specific binding of lactoferrin to brush-border membrane: ontogeny and effect of glycan chain. *Am. J. Physiol.* 254:G580–G585.
- De Laey, P., Masson, P., Heremans, J. F. (1968) The role of lactoferrin in human absorption. *Prot. Biol. Fluids* 16:627.
- de Sousa, M. (1978) Lymphoid cell positioning. A new proposal for the mechanism of control of lymphoid cell migration. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 32:393–409.
- de Vet, B. J. C.M., van Gool, J. (1974) Lactoferrin and iron absorption in the small intestine. *Acta med. scand.* 196:393–402.
- Derisbourg, P. (1990) Etude des récepteurs enterocytaires de la lactotransferrine humaine. In "Thèse de doctorat" Lille: Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois.
- Derisbourg, P., Wieruski, J. M., Montreuil, J., 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.
- Dharmasathaphorn, K., Mandel, K. G., Masui, H., McRoberts, J. A., Tisdale, L. D., Masui, H. (1984) A human colonic tumor cell line that maintains vectorial electrolyte transport. *Am. J. Physiol.* 246:G204–G208.
- Dharmasathaphorn, K., Mandel, K. G., Masui, H., McRoberts, J. A. (1985) VIP-induced chloride secretion by a colonic epithelial cell line: direct participation of a basolaterally localized Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> cotransport system. *J. Clin. Invest.* 75:462–471.
- Drouet, L., Bal dit Solier, C., Cisse, M., Pignaud, G., Mazoyer, E., Fiat, A.-M., Jollès, P., Caen, J. (1990) The antithrombotic effect of KRDS, a lactotransferrin peptide, compared with RGDS. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 32:59–62.
- Eisenstein, R. S., Munro, H. N. (1990) Translational regulation of ferritin synthesis by iron. *Enzyme* 44:42–58.
- Ellison, R. T., Giehl, T. J., Laforge F.M. (1988) Damage of the outer membrane of enteric Gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Inf. Immun.* 56:2774–2781.
- Ellison, R. T., Giehl, T. J. (1991) Killing of Gram negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin. Invest.* 88:1080–1091.

- Ellison, R. T., Laforge F.M., Giehl, T. J., Boose, D. S., Dunn, B. E. (1990) Lactoferrin and transferrin damage of the Gram-negative outer membrane is modulated by Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. *J. Gen. Microbiol.* 136:1437-1446.
- Evans, R. W., 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.* 173:543-553.
- Fairweather-Tait, S. J. (1989) Iron in food and its availability. *Acta Paediatr. Scand. Suppl.* 361:12-20.
- Fairweather-Tait, S. J., Balmer, S. E., Scott, P. H., Minski, M. J. (1987) Lactoferrin and iron absorption in newborn infants. *Pediatr. Res.* 22:651-654.
- Fantini, J., Abadie, B., Tirard, A., Remy, L., Ripert, J. P., El Battari, A., Marvaldi, J. (1986) Spontaneous and induced dome formation by two clonal cell populations derived from a human adenocarcinoma cell line HT29. *J. Cell Sci.* 83:235-249.
- Fernandez-Pol, J. A. (1977) Iron: possible cause of the G1 arrest induced in NRK cells by picolinic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78:136-143.
- Fernandez-Pol, J. A., Bono, V. H., Johnson, G. S. (1977) Control of growth by picolinic acid: Differential response of normal and transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:2889-2893.
- Fischbach, F. A., Harrison, P. M., Hoy, T. G. (1969) Structural relation between ferritin protein and its mineral core. *J. Mol. Biol.* 39:235-238.
- Fishman, J. B., Handrahan, J. V., Connor, J. R., Fine, R. E. (1987) Receptor-mediated transcytosis of transferrin across the blood brain barrier. *J. Neurosci.* 18:299-304.
- Flanagan, P. R. (1989) Mechanisms and regulation of intestinal uptake and transfer of iron. *Acta Paediatr. Scand. Suppl.* 361:21-30.
- Flanagan, P. R. (1990) Intestinal iron metabolism and absorption. In "Iron Transport and Storage" edited by Ponka, P., Schulman, H. M., Woodworth, R. C. CRC Press, p. 247-261.
- Flanagan, P. R., Haist, J., Valberg, L. S. (1987) The mechanism of intestinal iron absorption in the mouse: does luminal transferrin play a role? *Fed. Proc.* 46:1161.
- Flowers, C. H., Skikne, B. S., Covell, A. M., Cook, J. D. (1989) The clinical measurement of serum transferrin receptor. *J. Lab. Clin. Med.* 114:368-377.
- Fracanzani, A. L., Fargion, S., Romano, R., Piperno, A., Arosio, P., Ruggeri, G., Ronchi, G., Fiorelli, G. (1989) Immunohistochemical evidence for a lack of ferritin in duodenal absorptive epithelial cells in idiopathic hemochromatosis. *Gastroenterology* 96:1071-1078.
- Fransson, G.-B., Keen, C. L., Lönnnerdal, B. (1983a) Supplementation of milk with iron bound to lactoferrin using weanling mice: I. Effects on haematology and tissue iron. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2:693-700.
- Fransson, G.-B., Thorén-Tolling, K., Jones, B., Hambraeus, L., Lönnnerdal, B. (1983b) Absorption of lactoferrin-iron in suckling pigs. *Nutr. Res.* 3:373-384.
- Frizzell, R. A., Schultz, S. G. (1972) Ionic conductances of extracellular shunt pathway in rabbit ileum. Influence of shunt in transmural sodium transport and electrical potential differences. *J. Gen. Physiol.* 59:319-346.

- Galbraith, R. M., Werner, P., Arnaud, P., Galbraith, R. M. P. (1980) Transferrin binding to peripheral blood lymphocytes activated by phytohemagglutinin involves a specific receptor. *J. Clin. Invest.* 16:1135.
- Gangloff, S. P., Marguet, D., Lauquin, G. J.-M. (1990) Molecular cloning of the yeast mitochondrial aconitase gene (ACO1) and evidence of a synergistic regulation of expression by glucose plus glutamate. *Mol. Cell Biol.* 10:3551-3561.
- Geuze, H. J., Slot, J. W., Strous, G. J., Lodish, H. F., Schwartz, A. L. (1983) Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis. *Cell* 32:277-287.
- Ghitescu, L., Fixman, A., Simionescu, M., Simionescu, N. (1986) Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemmal vesicles of continuous capillary endothelium: receptor-mediated transcytosis. *J. Cell Biol.* 102:1304-1311.
- Godefroy, O., Huet, C., Blair, L. A. C., Sahuquillo-Mérino, C., Louvard, D. (1988) Differentiation of a clone isolated from the HT-29 cell line: polarized distribution of histocompatibility antigens (HLA) and of transferrin receptors. *Biol. Cell.* 63:41-55.
- Godefroy, O., Huet, C., Ibarra, C., Dautry-Varsat, A., Louvard, D. (1990) Establishment of polarized endocytosis in differentiable intestinal HT29-18 subclones. *The New Biologist* 2:875-886.
- Goossen, B., Caughman, S. W., Harford, J. B., Klausner, R. D., Hentze, M. W. (1990) Translational repression by a complex between the iron-responsive element of ferritin mRNA and its specific cytoplasmic binding protein is position-dependent. *EMBO J.* 9:4127-4133.
- Goossen, B., Hentze, M. W. (1992) Position is the critical determinant for function of iron-responsive elements as translational regulators. *Mol. Cell Biol.* 12:1959-1966.
- Gorinski, B., Horsburgh, C., Lindley, P. F., Moss, D., Parker, M., Watson, J. L. (1979) Evidence for the bilobal nature of rat diferric rabbit plasma transferrin. *Nature* 281:157-158.
- Grand, R. J., Watkins, J. B., Torti, E. M. (1976) Development of the human gastrointestinal tract: a review. *Gastroenterology* 70:790-810.
- Granick, S. (1946) Ferritin. IX. Increase of the protein apoferritin in the gastrointestinal mucosa as a direct response to iron feeding. The function of ferritin in the regulation of iron absorption. *J. Biol. Chem.* 164:737-746.
- Grasbeck, R., Kouvonon, I., Lundberg, M., Tenhunen, R. (1979) An intestinal receptor for heme. *Scand. J. Haematol.* 23:5-9.
- Grasbeck, R., Majuri, R., Kouvonon, I., Tenhunen, R. (1982) Spectral and other studies on the intestinal haeme receptor of the pig. *Biochem. Biophys. Acta* 700:137-142.
- Grasset, E., Pinto, M., Dussault, E., Zweibaum, A., Desjeux, J.-F. (1984) Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: electrical parameters. *Am. J. Physiol.* 247:C260-C267.
- Groves, N. L. (1960) The isolation of a red protein from milk. *J. Am. Chem. Soc.* 82:3345-3350.
- Gutteridge J.M.C., Paterson, S. K., Segal, A. W., Halliwell, B. (1981) Inhibition of lipid peroxidation by the iron binding protein lactoferrin. *Biochem. J.* 199:259-261.

- Haile, D. J., Hentze, M. W., Rouault, T. A., Harford, J. B., Klausner, R. D. (1989) Regulation of interaction of the iron-responsive element binding protein with iron-responsive RNA elements. *Mol. Cell. Biol.* 9:5055-5061.
- Haile, D. J., Rouault, T. A., Harford, J. B., Kennedy, M. C., Blondin, G. A., Beinert, H., Klausner, R. D. (1992a) Cellular regulation of the iron-responsive element binding protein – disassembly of the cubane iron-sulfur cluster results in high-affinity RNA binding. *Proc. Ntl Acad. Sci. USA* 89:11735-11739.
- Haile, D. J., Rouault, T. A., Tang, C. K., Chin, J., Harford, J. B., Klausner, R. D. (1992b) Reciprocal control of RNA-binding and aconitase activity in the regulation of the iron-responsive element binding protein – Role of the iron-sulfur cluster. *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA* 89:7536-7540.
- Halliday, J. W., Mack, U., Powell, L. W. (1978) Duodenal ferritin content and structure. Relationship with body iron stores in man. *Arch. Intern. Med.* 138:1109-1114.
- Harford, J. B., Klausner, R. D. (1990) Coordinate post-transcriptional regulation of ferritin and transferrin receptor expression – The role of regulated RNA-protein interaction. *Enzyme* 44:28-41.
- Hasegawa, H., Nakamura, A., Watanabe, K., Brown, W. R., Nagura, H. (1987) Intestinal uptake of IgG suckling rats: distinction between jejunal and ileal epithelial cells demonstrated by simultaneous ultrastructural localization of IgG and acid phosphatase. *Gastroenterology* 92:186-191.
- Hashizume, S., Kuroda, K., 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.
- Hentze, M. W., Argos, P. (1991) Homology between IRE-BP, a regulatory RNA-binding protein, aconitase, and isopropylmalate isomerase. *Nucleic Acids Res.* 19:1739-1740.
- Hentze, M. W., Caughman, S. W., Rouault, T. A., Barriocanal, J. G., Dancis, A., Harford, J. B., Klausner, R. D. (1987a) Identification of the iron-responsive element for the translational regulation of human ferritin mRNA. *Science* 238:1570-1573.
- Hentze, M. W., Rouault, T. A., Caughman, S. W., Dancis, A., Harford, J. B., Klausner, R. D. (1987b) A cis-acting element is necessary and sufficient for translational regulation of human ferritin expression in response to iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6730-6734.
- Hentze, M. W., Rouault, T. A., Harford, J. B., Klausner, R. D. (1989) Oxidation-reduction and the molecular mechanism of a regulatory RNA-protein interaction. *Science* 244:357-359.
- Heyman, M., Desjeux, J.-F. (1992) Significance of intestinal food protein transport. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 15:48-57.
- Heyman, M., Andriantsoa, M., Crain-Denoyelle, A.-M., Desjeux, J.-F. (1990a) Effect of oral and parenteral sensitization to cow's milk on mucosal permeability in guinea pigs. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 92:242-246.
- Heyman, M., Corthier, G., Lucas, F., Meslin, J. C., Desjeux, J.-F. (1989) Evolution of the caecal epithelial barrier during *Clostridium difficile* infection in the mouse. *Gut* 30:1087-1093.

- Heyman, M., Crain-Denoyelle, A.-M., Corthier, G., Morgat, J. L., Desjeux, J.-F. (1986a) Postnatal development of protein absorption in conventional and germe-free mice. *Am. J. Physiol.* 251:G326-G331.
- Heyman, M., Crain-Denoyelle, A.-M., Nath, S. K., Desjeux, J.-F. (1990b) Quantification of protein transcytosis in the human colon carcinoma cell line CaCo-2. *J. Cell. Physiol.* 143:391-395.
- Heyman, M., Ducroc, R., Desjeux, J.-F., Morgat, J. L. (1982) Horseradish peroxidase transport across adult rabbit jejunum in vitro. *Am. J. Physiol.* 242:G558-G564.
- Heyman, M., Dumontier, A. M., Desjeux, J.-F. (1986b) The intestinal barrier to intact peroxidase in experimental secretory diarrhea. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 5:463-466.
- Heyman, M., Grasset, E., Ducroc, R., Desjeux, J.-F. (1988) Antigen absorption by the jejunal epithelium of children with cow's milk allergy. *Pediatr. Res.* 24:197-202.
- Hidalgo, I. J., Borchard, R. T. (1990) Transport of a large neutral amino acid (phenylalanine) in a human intestinal epithelial cell line: Caco-2. *Biochim. Biophys. Acta* 1028:25-30.
- Hirribaren, A., Heyman M., L'Helgouac'h, A., Desjeux, J.-F. (1993) Effect of cytokines on the epithelial function of the human colon carcinoma cell line HT29 cl.19A. *Gut* (in press).
- Holmes, J. M., Morgan, E. H. (1989) Uptake and distribution of transferrin and iron in perfused iron-deficient rat liver. *Am. J. Physiol.* 256:G1022-G1027.
- Hu, W.-L., Mazurier, J., Montreuil, J., Spik, G. (1990) Isolation and partial characterization of a lactotransferrin receptor from mouse intestinal brush border. *Biochemistry* 29:535-541.
- Hu, W.-L., Mazurier, J., Sawatzki, G., Montreuil, J., Spik, G. (1988) Lactotransferrin receptor of mouse small-intestinal brush border. *Biochem. J.* 249:435-441.
- Huebers, H. A., Beguin, Y., Pootrakul, P., Einspahr, D., Finch, C. A. (1990) Intact transferrin receptors in human plasma and their relation to erythropoiesis. *Blood* 75:102-107.
- Huebers, H. A., Huebers, E., Csiba, E., Rummel, W., Finch, C. A. (1983) The significance of transferrin for intestinal iron absorption. *Blood* 61:283-290.
- Huebers, H. A., Huebers, E., Rummel, W., Crichton, R. R. (1976) Isolation and characterization of iron-binding proteins from rat intestinal mucosa. *Eur. J. Biochem.* 66:447-455.
- Huet, C., Sahuquillo-Merino, C., Coudrier, E., Louvard, D. (1987) Absorptive and mucus-secreting subclones isolated from a multipotent intestinal cell line (HT-29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation. *J. Cell Biol.* 105:345-357.
- Hutchens, T. W., Henry, J. F., Yip, T. T., Hachey, D. L., Schanler, R. J., Motil, K. J., Garza, C. (1991a) Origin of intact lactoferrin and its DNA-binding fragments found in the urine of human milk-fed preterm infants - Evaluation by stable isotopic enrichment. *Pediatr. Res.* 29:243-250.
- Hutchens, T. W., Henry, J. F., Yip, T. T. (1991b) Structurally intact (78-kDa) forms of maternal lactoferrin purified from urine of preterm infants fed human milk - Identification of a trypsin-like proteolytic cleavage event in vivo that does not result in fragment dissociation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2994-2998.
- Iacopetta, B. J., Morgan, E. H., Yeoh, G. C. T. (1982) Transferrin receptors and iron uptake during erythroid cell development. *Biochim. Biophys. Acta* 687:204.



- Iancu, T. C., Neustein, H. B. (1977) Ferritin in human liver cells of homozygous  $\beta$ -thalassemia: ultrastructural observations. *Br. J. Haematol.* 37:527-535.
- Idzerda, R. I., Huebers, H., Finch, C. A., McKnight, G. S. (1986) Rat transferrin gene expression: tissue specific regulation by iron deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3723-3727.
- Imber, M. J., Pizzo, S. V. (1983) Clearance and binding of native and defucosylated lactoferrin. *Biochem. J.* 212:249-257.
- Irie, S., Kishimoto, T., Tavassoli, M. (1988) Desialation of transferrin by rat liver endothelium. *J. Clin. Invest.* 82:508-513.
- Isobe, K., Sakurai, T., Isobe, Y. (1978) Studies on iron transport in human intestine by immunoperoxidase technique. I. The localization of ferritine, lactoferrin and transferrin in human duodenal mucosa. *Acta Haematol. (Jpn)* 41:294-299.
- Izhar, M., Nuchamowitz, Y., Mirelman, D. (1982) Adherence of *Shigella flexneri* to guinea pig intestinals cells is mediated by a mucosal adhesin. *Infect. Immunity* 35:1110-1118.
- Johannson, B. (1960) Isolation of an iron containing red protein from milk. *Acta Chem. Scand.* 14:510-516.
- Jones, E. A., Waldmann, T. A. (1972) The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat. *J. Clin. Invest.* 51:2916-2927.
- Kaiserlian, D., Vidal, K., Revillard, J. P. (1989) Murine enterocytes can present soluble antigen to specific class II-restricted CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur. J. Immunol.* 19:1513-1516.
- Kalmar, J. R., Arnold, R. R. (1988) Killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by human lactoferrin. *Inf. Immun.* 56:2552-2557.
- Kampschmidt, R. F., Pulliam, L. A. (1975) Stimulation of antimicrobial activity in the rat with leucocytic endogenous mediator. *Res. J. Reticuloendoth. Soc.* 17:162-169.
- Kaptain, S., Downey, W. E., Tang, C., Philpott, C., Haile, D., Orloff, D. G., Harford, J. B., Rouault, T. A., Klausner, R. D. (1991) A regulated RNA binding protein also possesses aconitase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10109-10113.
- Kawakami, H., Hiratsuka, M., Dosako, S. (1988) Effects of iron-saturated lactoferrin on iron absorption. *Agric. Biol. Chem.* 52:903-908.
- Kawakami, H., Lönnerdal, B. (1991) Isolation and function of a receptor for human lactoferrin in human fetal intestinal brush-border membranes. *Am. J. Physiol.* 261:G841-G846.
- Kennedy, M. C., Mendemüller, L., Blondin, G. A., Beinert, H. (1992) Purification and characterization of cytosolic aconitase from beef liver and its relationship to the iron-responsive element binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11730-11734.
- King, G. L., Johnson, S. M. (1985) Receptor-mediated transport of insulin across endothelial cells. *Science* 227:1583-1586.
- Kirkpatrick, C. H., Green, L., Rich, P. R., Schade, A. L. (1971) Inhibition of growth of *Candida albicans* by iron-unsaturated lactoferrin: relation to host defense mechanisms in chronic muco-cutaneous candidiasis. *J. Infect. Dis.* 124:539-544.
- Klausner, R. D., Harford, J. B. (1989) Cis-trans models for post-transcriptional gene regulation. *Science* 246:870-872.

- Klausner, R. D., Rouault, A. T., Harford, J. B. (1993) Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell* 72:19–28.
- Koeller, D. M., Casey, J. L., Hentze, M. W., Gerhardt, E. M., Chan, L. L., Klausner, R. D., 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., Kondo, H., Kato, J., Tsushima, N., Sasaki, K., Hirayama, M., Numata, T., Nishisato, T., Urushizaki, I. (1987) Serum transferrin receptor as a new index of erythropoiesis. *Blood* 70:1955–1958.
- Kohgo, Y., Nishisato, T., Kondo, H., Tsushima, N., Niitsu, Y., Urushizaki, I. (1986) Circulating transferrin in human serum. *Br. J. Haematol.* 64:277–281.
- Kühn, L. C. (1991) mRNA–protein interactions regulate critical pathways in cellular iron metabolism. *Br. J. Haematol.* 79:1–5.
- Kühn, L. C., Hentze, M. W. (1992) Coordination of cellular iron metabolism by post–transcriptional gene regulation. *J. Inorg. Biochem.* 47:183–195.
- Kühn, L. C., Schulman, H. M., Ponka, P. (1990) Iron–transferrin requirements and transferrin receptor expression in proliferation cells. In "Iron Transport and Storage" edited by Ponka, P., Schulman, H. M., Woodworth, R. C. CRC Press, p. 149–191.
- Laburthe, M., Rousset, M., Rouyer-Fessard, C., Couvineau, A., Chantret, I., Chevalier, G., Zweibaum, A. (1987) Development of vasoactive intestinal peptide–responsive adenylate cyclase during enterocytic differentiation of Caco–2 cells in culture. Evidence for an increased receptor level. *J. Biol. Chem.* 262:10180–10184.
- Larrick, J. W., Cresswell, P. (1979) Transferrin receptors on human B and T lymphoblastoid cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* 583:483.
- Lauble, H., Kennedy, M. C., Beinert, H., Stout, C. D. (1992) Crystal structures of aconitase with isocitrate and nitroisocitrate bound. *Biochemistry* 31:2735–2748.
- Lawson, D. M., Artymiuk, P. J., Yewdall, S. J., Smith, A. M. A., Livingstone, J. C., Treffy, A., Luzzago, A., Levi, S., Arosio, P., Cesareni, G., Thomas, C. D., Shaw, W. V., Harrison, P. M. (1991) Solving the structure of human H ferritin genetically engineering intermolecular crystal contacts. *Nature* 349:541–543.
- Leffel, M. S., Spitznagel, J. K. (1972) Association of lactoferrin with lysozyme in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immunity* 6:761–765.
- Legrand, D., Mazurier, J., Ellass, A., Rochard, E., Vergoten, G., Maes, P., Montreuil, J., Spik, G. (1992) Molecular interactions between human lactotransferrin and the phytohemagglutinin–activated human lymphocyte lactotransferrin receptor lie in 2 loop–containing regions of the N–terminal domain–I of human lactotransferrin. *Biochemistry* 31:9243–9251.
- Legrand, D., Mazurier, J., Maes, P., Rochard, E., Montreuil, J., Spik, G. (1991) Inhibition of the specific binding of human lactotransferrin to human peripheral–blood phytohaemagglutinin–stimulated lymphocytes by fluorescein labelling and location of the binding site. *Biochem. J.* 276:733–738.
- Lehrer, R. I., Ganz, T., Selsted, M. E. (1991) Defensins: endogenous antibiotic peptides of animals cells. *Cell* 64:229–230.

- Leibold, E. A., Munro, H. (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.
- Leveugle, B., Mazurier, J., Legrand, D., Mazurier, C., Montreuil, J., Spik, G. (1993) Binding of lactotransferrin to platelet-receptor induces inhibition of platelet aggregation. *Eur. J. Biochem.* in press.
- Levine, J. S., Seligman, P. A. (1984) The ultrastructural immunocytochemical localization of transferrin receptor (TfR) and transferrin (Tf) in the gastrointestinal tract of man. *Gastroenterology* 86:1161.
- Lima, M. F., Kierszenbaum, F. (1987) Lactoferrin effects on phagocytic cell function. II. The presence of iron is required for the lactoferrin molecule to stimulate intracellular killing by macrophages but not to enhance uptake particles and microorganisms. *J. Immunol.* 139:1647-1651.
- Line, W. F., Sly, D. A., Bezkorovainy, A. (1976) Limited cleavage of human lactoferrin with pepsin. *Int. J. Biochem.* 7:203-208.
- Lipford, G. B., Feng, Q., Wright, J. G. L. (1990) A method for separating bound versus unbound label during radioiodination. *Anal. Biochem.* 187:133-135.
- Lombard, M., Bomford, A. B., Polson, R. J., Bellingham, A. J., Williams, R. (1990) Differential expression of transferrin receptor in duodenal mucosa in iron overload. Evidence for a site-specific defect in genetic hemochromatosis. *Gastroenterology* 98:976-984.
- Lönnerdal, B., Forsum, E. (1985) Casein content of human milk. *Am. J. Clin. Nutr.* 41:113-120.
- Lönnerdal, B., Keen, C. L., Hurley, L. S. (1981) Iron, copper, zinc and manganese in milk. *Annu. Rev. Nutr.* 11:149-174.
- Lorimier, P. (1987) In "Thèse de Doctorat de 3ème cycle" Paris: Université Pierre et Marie Curie
- Louache, F., Testa, U., Pelici, P., Thomopoulos, P., Titeux, M., Rochant, H. (1984) Regulation of transferrin receptors in human hematopoietic cell lines. *J. Biol. Chem.* 259:11576-11582.
- Löw, H., Grebing, C., Lindgren, A., Tally, M., Sun, I. L., Crane, F. L. (1987) Involvement of transferrin in the reduction of iron by the transplasma membrane electron transport system. *J. Bioenerg. Biomembr.* 19:535.
- Mack, U., Powell, L. W., Halliday, J. W. (1983) Detection and isolation of a hepatic membrane receptor for ferritin. *J. Biol. Chem.* 258:4672.
- Mackenzie, N. (1984) Fc receptor-mediated transport of immunoglobulin across the intestinal epithelium of the neonatal rodent. *Immunol. Today* 5:364-366.
- Madara, J. L., Dharmasathaphorn, K. (1985) Occluding junction structure-function relationships in a cultured epithelial monolayer. *J. Cell Biol.* 101:2124-2133.
- Madara, J. L., Trier, J. S. (1987) Functional morphology of the mucosa of the small intestine. In "Physiology of the Gastrointestinal Tract, Second Edition" edited by Johnson, L. R. New York: Raven Press, p. 1209-1249.
- Maratos-Flier, E., Yang Kao, C.-Y., Verdin, E. M., King, G. L. (1987) Receptor-mediated vectorial transcytosis of epidermal growth factor by Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* 105:1595-1601.

- Marcon-Genty, D., Tome, D., Kheroua, O., Dumontier, A.-M., Heyman, M., Desjeux, J.-F. (1989) Transport of b-lactoglobulin across rabbit ileum in vitro. *Am. J. Physiol.* 256:G943-G948.
- Marx, J. J. M., Aisen, P. (1981) Iron uptake by rabbit intestinal mucosal membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 649:297.
- Mason, D. Y., Taylor, C. R. (1978) Distribution of transferrin, ferritin, and lactoferrin in human tissues. *J. Clin. Pathol.* 31:316-327
- Massey, A. C. (1992) Microcytic anemia: differential diagnosis and management of iron deficiency anemia. *Anemia* 76:3
- Masson, P. L., Heremans, J. F. (1966) Studies on lactoferrin, the iron-binding protein of secretions. In "Protids of Biological Fluids" edited by Peeters. Amsterdam: Elsevier, p. 115-142.
- Masson, P. L., Heremans, J. F. (1971) Lactoferrin in milk from different species. *Comp. Biochem. Physiol.* 39B:119-129.
- Masson, P. L., Heremans, J. F., Dive, C. (1966) An iron-binding protein to many external secretions. *Clin. Chim. Acta* 14:735-739.
- Masson, P. L., Heremans, J. F., Schonke, E. (1969) Lactoferrin, an iron binding protein in neutrophilic leucocytes. *J. Exp. Med.* 130:643-657.
- Masson, P. L., Heremans, J. F., Schonke, E., Crabbé, P. A. (1968) New Data on lactoferrin, the iron-binding protein of secretions. In "Protids of Biological Fluids" edited by Peeters, H. Oxford: Pergamon Press, p. 633-638.
- Mattia, E., Rao, K., Shapiro, D. S., Sussman, H. H., Klausner, R. D. (1984) Biosynthetic regulation of the human transferrin receptor by desferrioxamine in K562 cells. *J. Biol. Chem.* 259:2689-2692.
- May, B. K., Bhasker, C. R., Bawden, M. J., Cox, T. C. (1990) Molecular regulation of 5-aminolevulinic acid synthase - Diseases related to heme biosynthesis. *Mol. Biol. Med.* 7:405-421.
- Mayrhofer, G., Spargo, D. J. (1989) Subcellular distribution of class II major histocompatibility antigens in enterocytes of the human and rat small intestine. *Immunol. Cell Biol.* 67:251-260.
- Mazoyer, E., Levy-Toledano, S., Rendu, F., Hermant, L., Lu He, Fiat A.-M., Jollès, P., Caen, J. (1990) KRDS, a new peptide derived from human lactotransferrin, inhibits platelet aggregation and release reaction. *Eur. J. Biochem.* 194:43-49.
- Mazurier, J., Spik, G. (1980) Comparative study of the iron-binding properties of human transferrins. I. Complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactotransferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 629:399-408.
- Mazurier, J., Legrand, D., Hu, W. L., Montreuil, J., Spik, G. (1989) Expression of human lactotransferrin receptors in phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Eur. J. Biochem.* 179:481-487.
- Mazurier, J., Montreuil, J., Spik, G. (1985) Visualization of lactotransferrin brush-border receptors by ligand-blotting. *Biochim. Biophys. Acta* 821:453-460.
- McKnight, G. S., Lee, D. C., Palmiter, R. D. (1980) Transferrin gene expression. *J. Biol. Chem.* 255:148-153.

- Mead, P. E., Tweedie, J. W. (1990) cDNA and protein sequence of bovine lactoferrin. *Nucleic Acids Res.* 18:7167.
- Mellman, I., Fuchs, R., Helenius, A. (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 55:663-700.
- Metz-Boutigue, M.-H., Jollès, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J., 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., 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., Retegui, L. A., Masson, P. L. (1985) Comparison of human lactoferrins from milk and neutrophilic leucocytes. Relative molecular mass, isoelectric point, iron-binding properties and uptake by the liver. *Biochem. J.* 229:353-359.
- Montreuil, J., Mazurier, J., Legrand, D., Spik, G. (1985) Human lactoferrin: structure and function. In "Proteins of Iron Storage and Transport" edited by Spik, G., Montreuil, J., Crichton, R. R., Mazurier, J. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 25-38.
- Montreuil, J., Mullet, S. (1960) Isolement d'une lactosédéphiline du lait de Femme. *C. R. Acad. Sci. Paris* 250: 1736-1737.
- Montreuil, J., Tonnelat, J., Mullet, S. (1960) Préparation et propriétés de la lactosidéphiline (lactotransferrine) du lait de Femme. *Biochim. Biophys. Acta* 45:413-421.
- Morales, C., Clermont, Y. (1986) Receptor-mediated endocytosis of transferrin by Sertoli cells of the rat. *Biol. Reprod.* 35:393.
- Morgan, E. H. (1980) The role of plasma transferrin in iron absorption in the rat. *Q. J. Exp. Physiol.* 65:239.
- Moss, D., Fargion, S., Fracanzani, A. L., Levi, S., Capellini, M. D., Arosio, P., Powell, L. W., Halliday, J. W. (1992) Functional roles of the ferritin receptors of human liver, hepatoma, lymphoid and erythroid cells. *J. Inorg. Biochem.* 47:219-227.
- Mostov, K. E., Friedlander, M., Blobel, G. (1984) The receptor for transepithelial transport of IgA and IgM contains multiple immunoglobulin-like domains. *Nature* 308:37-43.
- Mostov, K. E., Simister, N. E. (1985) Transcytosis. *Cell* 43:389-390.
- Muir, W. A., Hopfer, U., King, M. (1984) Iron transport across brush-border membranes from normal and iron-deficient mouse upper small intestine. *J. Biol. Chem.* 259:4896.
- Muir, W. A., Hopfer, U. (1985) Regional specificity of iron uptake by small intestinal brush border membranes from normal and iron deficient mice. *Am. J. Physiol.* 248:G376.
- Müllner, E. W., Kühn, L. C. (1988) A stem-loop in the 3' untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm. *Cell* 53:815-825.
- Müllner, E. W., Neupert, B., Kühn, L. C. (1989) A specific mRNA binding factor regulates the iron-dependant stability of cytoplasmic transferrin receptor mRNA. *Cell* 58:373-382.

- Muthiah, R., Seetharam, B. (1987)  $^{57}\text{Co}$ -cyanocobalamin uptake by human colon adenocarcinoma cell line. *J. Cell Biol.* 105:235a.
- Nagasawa, T., Kiyosawa, I., Kuwahara, K. (1972) Amounts of lactoferrin in human colostrum and milk. *J. Dairy Sci.* 55:1651-1659.
- Nath, S. K., Huang, X., L'Helgouac'h, A., Rautureau, M., Bisalli, A., Heyman, M., Desjeux, J.-F. (1991) Time-relationship between chloride secretion and intracellular messengers in HT29 cl.19A. *Gastroenterology* 100:A604.
- Neilands, J. B. (1980) Microbial metabolism of iron. In "Iron in Biochemistry and Medicine" edited by Jacobs, A., Worwood, M. London and New York: Academic Press, p. 529-572.
- Német, K., Simonovits, I. (1985) The biological role of lactoferrin. *Haematologia* 18:3-12.
- Neupert, B., Thompson, N. A., Meyer, C., Kühn, L. C. (1990) A high yield affinity purification method for specific RNA-binding proteins: isolation of the iron regulatory factor from human placenta. *Nucleic Acids Res.* 18:51-55.
- Neutra, M. R. (1980) The use of human intestinal mucosa in organ culture for the study of birth defects. In "In Vitro Epithelia and Birth Defects" edited by Danes, B. S. New York: Alan R. Liss, p. 261-273.
- Neutra, M., Louvard, D. (1989) Differentiation of intestinal cells in vitro. In "Functional Epithelial Cells in Culture" edited by Matlin, K. S., Valentich, J. D. New York: Alan R. Liss, p. 363-398.
- Nichols, B. L., McKee, K. S., Henry, J. F., Putman, M. (1987) Human lactoferrin stimulates thymidine incorporation into DNA of rat crypt cells. *Pediatr. Res.* 21:563-567.
- Nichols, B. L., McKee, K. S., Huebers, H. A. (1990) Iron is not required in the lactoferrin stimulation of thymidine incorporation into the DNA of rat crypt cells. *Pediatr. Res.* 27:525-528.
- Nichols, B. L., McKee, K. S., Putman, M., Henry, J. F., Nichols, V. N. (1989) Human lactoferrin supplementation of infants formulas increases thymidine incorporation into the DNA of rat crypt cells. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 8:102-109.
- Núñez, M.-T., Gaete, V., Watkins, J. A., Glass, J. (1990) Mobilization of iron from endocytic vesicles. The effect of acidification and reduction. *J. Biol. Chem.* 265:6688-6692.
- O'Donnel, M. W., Cox, T. M. (1982) Microvillar iron-binding glycoproteins isolated from the rabbit small intestine. *Biochem. J.* 202:107.
- Oram, J. D., Reiter, B. (1968) Inhibition of bacteria by lactoferrin and other chelating agents. *Biochim. Biophys. Acta* 170:351-366.
- Osterloh, K., Schumann, K., Ehtechami C., Forth, W., Snape, S., Simpson, R. J., Peters, T. J. (1986) Location and origin of mucosal transferrin in rat small intestine. *Biochem. Soc. Trans.* 14:118.
- Owen, D., Kühn, L. C. (1987) Noncoding 3' sequences of the transferrin receptor gene are required for mRNA regulation by iron. *EMBO J.* 6:1287-1293.
- Page, M. A., Baker, E., Morgan, E. H. (1984) Transferrin and iron uptake in rat hepatocytes in culture. *Am. J. Physiol.* 246:G26-G33.

- Parmley, R. T., Barton, J. C., Conrad, M. E. (1985) Ultrastructural localization of transferrin, transferrin receptor and iron-binding sites on human placental and duodenal microvilli. *Br. J. Haematol.* 60:81.
- Pentecost, B. T., Teng, C. T. (1987) Lactotransferrin is the major estrogen inducible protein of mouse uterine secretions. *J. Biol. Chem.* 262:10134–10139.
- Perraudin, J. P., Prieels, J. P. (1982) Lactoferrin binding to lysozyme treated *Micrococcus luteus*. *Biochim. Biophys. Acta* 718:42–48.
- Phillips, D. R., Charo, I. F., Scarborough, R. M. (1991) GP IIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell* 65:359–362.
- Pierce, A., Colavizza, D., Benaissa, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J., Spik, G. (1991) Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* 196:177–184.
- Pierce-Cretel, A., Izhar, M., Nuchamowitz, Y., Strecker, G., Montreuil, J., Spik, G., Mirelman, D. (1983) Oligosaccharide structural specificity of the soluble agglutinin released from guinea pig colonic epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 20:237–242.
- Pietrangelo, A., Rocchi, E., Casalgrandi, G., Rigo, G., Ferrari, A., Perini, M., Ventura, E., Cairo, G. (1992) Regulation of transferrin, transferrin receptor, and ferritin genes in human duodenum. *Gastroenterology* 102:802–809.
- Pinto, M., Appay, M. D., Simon-Assmann, P., Chevalier, G., Dracopoli, N., Fogh, J., Zweibaum, A. (1982) Enterocytic differentiation of cultured human cancer cells by replacement of glucose by galactose in the medium. *Biol. Cell* 44:193–196.
- Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M. D., Kedinger, M., Triadou, N., Dussault, E., Lacroix, B., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J., Zweibaum, A. (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell* 47:323–330.
- Powell, M. J., Ogden, J. E. (1990) Nucleotide sequence of human lactoferrin cDNA. *Nucleic Acids Res.* 18:4013.
- Prodromou, C., Artymiuk, P. J., Guest, J. R. (1992) The aconitase of *Escherichia coli* – Nucleotide sequence of the aconitase gene and amino acid sequence similarity with mitochondrial aconitases, the iron-responsive-element-binding protein and isopropylmalate isomerases. *Eur. J. Biochem.* 204:599–609.
- Raha, S., Dosquet, C., Abgrall, J. F., Jollès, P., Fiat, A.-M., Caen, J. (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.
- Raja, K. B., Simpson, R. J., Peters, T. J. (1987) Effect of  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  on the uptake of  $Fe^{3+}$  in mouse intestinal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* 923:46–51.
- Raja, K. B., Simpson, R. J., Peters, T. J. (1989) Membrane potential dependence of Fe(III) uptake by mouse duodenum. *Biochim. Biophys. Acta* 984:262–266.
- Ramanujam, K. S., Seetharam, S., Ramasamy, M., Seetharam, B. (1991) Expression of cobalamin transport proteins and cobalamin transcytosis by colon adenocarcinoma cells. *Am. J. Physiol.* 260:G416–G422.

- Rao, K., Harford, J. B., Rouault, T., McClelland, A., Ruddle, F. H., Klausner, R. D. (1986) Transcriptional regulation by iron of the gene for the transferrin receptor. *Mol. Cell Biol.* 6:236-240.
- Reeds, P. (1988) Milk proteins and tissue nitrogen equilibrium. In "Milk Proteins: Nutritional, Clinical, Functional and Technological Aspects" edited by Barth, C. A., Schlimme, E. Darmstadt: Steinkopff Verlag, p. 37-48.
- Reiter, B., Brock, J. H., Steel, E. D. (1975) Inhibition of *Escherichia coli* by bovine colostrum and post-colostrum milk. II. The bacteriostatic effect of lactoferrin on a serum-susceptible and serum-resistant strain of *Escherichia coli*. *Immunology* 28:83-95.
- Rey, M. W., Woloshuk, S. L., de Boer, H. A., Pieper, F. R. (1990) Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin. *Nucleic Acids Res.* 18:5288.
- Robbins, A. H., Stout, C. D. (1989) Structure of activated aconitase: formation of the [4Fe-4S] cluster in the crystal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3639-3643.
- Robertson, K. A., Gallager, M. D. (1985) In vivo evidence that cobalamin is absorbed by receptor-mediated endocytosis in the mouse. *J. Cell Biol.* 100:1499-1507.
- Rochard, E., Legrand, D., Mazurier, J., Montreuil, J., 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.
- Rodewald, R., Kraehenbuhl, J.-P. (1984) Receptor-mediated transport of IgG. *J. Cell Biol.* 99:159S-164S.
- Rodman, J. S., Mercer, R. W., Stahl, P. D. (1990) Endocytosis and transcytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2:664-672.
- Rogers, J., Munro, H. (1987) Translation of ferritin light and heavy subunit mRNAs is regulated by intracellular chelatable iron levels in rat hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2277-2281.
- Roiron, D., Amouric, M., Marvaldi, J., Figarella, C. (1989) Lactoferrin-binding sites at the surface of HT29-D4 cells. *Eur. J. Biochem.* 186:367-373.
- Roiron-Lagroux, D., Figarella, C. (1990) Evidence for a different mechanism of lactoferrin and transferrin translocation on HT 29-D4 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170:837-842.
- Rose, T. M., Plowmen, G. D., Teplow, D. B., Dreyer, W. J., Hellström, K. E., Brown, J. P. (1986) Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97 (melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:1261.
- Rothenberg, S. P., Weiss, J. P., Cotter, R. (1978) Formation of transcobalamin II-vitamin B<sub>12</sub> complex by guinea pig ileal mucosa in organ culture after in vivo incubation with intrinsic factor-vitamin B<sub>12</sub>. *Br. J. Haematol.* 40:401-414.
- Rouault, T. A., Haile, D. J., Downey, W. E., Philpott, C. C., Tang, C., Samaniego, F., Chin, J., Paul, I., Orloff, D., Harford, J. B., Klausner, R. D. (1992) An iron-sulfur cluster plays a novel regulatory role in the iron-responsive element binding protein. *Biometals* 5:131-140.



- Rouault, T. A., Hentze, M. W., Caughman, S. W., Harford, J. B., Klausner, R. D. (1988) Binding of a cytosolic protein to the iron-responsive element of human ferritin messenger RNA. *Science* 241:1207-1210.
- Rouault, T. A., Hentze, M. W., Haile, D. J., Harford, J. B., 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., Klausner, R. D. (1991) Structural relationship between an iron-regulated RNA-binding protein (IRE-BP) and aconitase - Functional implications. *Cell* 64:881-883.
- Rouault, T. A., Tang, C. K., Kaptain, S., Burgess, W. H., Haile, D. J., Samaniego, F., McBride, O. W., Harford, J. B., Klausner, R. D. (1990) Cloning of the cDNA encoding an RNA regulatory protein - the human iron-responsive element-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7958-7962.
- Rouyer-Fessard, C., Augeron, C., Grasset, E., Maoret, J. J., Labois, C., Laburthe, M. (1989) VIP receptors and control of short circuit current in the human intestinal clonal cell line Cl.19A. *Experientia* 45:1102-1105.
- Saarinen, U. M., Siimes, M. A., Dallman, P. R. (1977) Iron absorption in infants: high bioavailability of breast milk iron as indicated by the extrinsic tag method of iron absorption and by the concentration of serum ferritin. *J. Pediatr.* 91:36-39.
- Sanchez, L., Calvo, M., Brock, J. H. (1992) Biological role of lactoferrin. *Arch. Dis. Child.* 67:657-661.
- Scatchard, G. (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51:660-672.
- Schaeffer, E., Boissier, F., Py, M.-C., Cohen, G. N., Zakin, M. M. (1989) Cell type-specific expression of the human transferrin gene. *J. Biol. Chem.* 264:7153-7160.
- Schägger, H., von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166:368-379.
- Schulz-Lell, G., Dörner, K., Oldigs, H.-D., Sievers, E., Schaub, J. (1991) Iron availability from an infant formula supplemented with bovine lactoferrin. *Acta Paediatr. Scand.* 80:155-158.
- Schumann, K., Osterloh, K., Forth, W. (1986a) Independence of in vitro iron absorption from mucosal transferrin content in rat jejunal and ileal segments. *Blut* 53:391.
- Schumann, K., Shafer, S. G., Forth, W. (1986b) Iron absorption and biliary excretion. *Res. Exp. Med.* 186:215.
- Scott, P. H. (1989a) Enzyme immunoassay of lactoferrin in newborn term infants: reference values influence of diet. *Ann. Clin. Biochem.* 26:407-411.
- Scott, P. H. (1989b) Plasma lactoferrin levels in newborn preterm infants: effect of infection. *Ann. Clin. Biochem.* 26:412-415.
- Seetharam, B., Alpers, D. H. (1985) Cellular uptake of cobalamin. *Nutr. Rev.* 43:97-102.

- Selden, C., Seymour, C., Peters, T. J. (1980) Activities of some free-radical scavenging enzymes and glutathione concentrations in human and rat liver and their relationship to the pathogenesis of tissue damage in iron overload. *Clin. Sci.* 58:211–219.
- Seligman, P. A., Schleicher, R. B., Allen, R. A. (1979) Isolation and characterization of the transferrin receptor from human placenta. *J. Biol. Chem.* 254:9943.
- Shen, W. C., Wan, J. S., Ekrami, H. (1992) Enhancement of polypeptide and protein absorption by macromolecular carriers via endocytosis and transcytosis. 3. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 8:93–113.
- Shing, Y., Klagsbrun, M. (1987) Purification and characterization of a bovine colostrum-derived growth factor. *Mol. Endocrinol.* 1:335–338.
- Shongwe, M. S., Smith, C. A., Ainscough, E. W., Baker, H. M., Brodie, A. M., Baker, E. N. (1992) Anion binding by human lactoferrin – Results from crystallographic and physicochemical studies. *Biochemistry* 31:4451–4458.
- Siimes, M. A., Salmenpera, L., Perheentupa, J. (1984) Exclusive breast-feeding for 9 months: risk of iron deficiency. *J. Pediatr.* 104:196–199.
- Simister, N. E., Mostov, K. E. (1989) An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature* 337:184–187.
- Simister, N. E., Rees, A. R. (1985) Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. *Eur. J. Immunol.* 15:733–738.
- Simpson, R. J., Peters, T. J. (1987a) Iron-binding lipids of rabbit duodenal brush-border membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 898:181–186.
- Simpson, R. J., Peters, T. J. (1984) Studies of Fe<sup>3+</sup> transport across isolated intestinal brush-border membrane of the mouse. *Biochim. Biophys. Acta* 772:220.
- Simpson, R. J., Peters, T. J. (1987b) Transport of Fe<sup>2+</sup> across lipid bilayers : possible role of fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 898:187–195.
- Simpson, R. J., Moore, R. P., Peters, T.J. (1988) Significance of non-esterified fatty acids in iron uptake by intestinal brush-border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 941:39.
- Simpson, R. J., Osterloh, K. R., Raja, K. B., Snape, S. D., Peters, T. J. (1986) Studies on the role of transferrin and endocytosis on the uptake of Fe<sup>3+</sup> from Fe-nitrilotriacetate by mouse duodenum. *Biochim. Biophys. Acta* 884:166.
- Simpson, R. J., Venkatesan, S., Peters, T. J. (1989) Brush-border membrane non-esterified fatty acids. Physiological levels and significance for mucosal iron uptake in mouse proximal intestine. *Cell Biochem. Funct.* 7:165.
- Sipe, D. M., Murphy, R. F. (1991) Binding to cellular receptors results in increased iron release from transferrin at mildly acidic pH. *J. Biol. Chem.* 266:8002–8007.
- Smith, A., Morgan, W. T. (1979) Haem transport to the liver by haemopexin. *Biochem. J.* 182:47–54.
- Smith, C. A., Anderson, B. F., Baker, H. M., Baker, E. N. (1992) Metal substitution in transferrins – The crystal structure of human copper-lactoferrin at 2.1-Å resolution. *Biochemistry* 31:4527–4533.

- Smith, T. K., Gibson, C. L., Howlin, B. J., Pratt, J. M. (1991) Active transport of amino acids by g-glutamyl transpeptidase through Caco-2 cell monolayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178:1028-1035.
- Soda, R., Hardy, C. L., Kataoka, M., Tavassoli, M. (1989) Endothelial mediation is necessary for subsequent hepatocytes uptake of transferrin. *Am. J. Med. Sci.* 297:314-320.
- Solari, R., Morris, B., Morris, R. (1984) Kinetic studies on IgG transport by the jejunum of the neonatal rat. *Biol. Neonate* 46:163-170.
- Solotoff, S. P., Cantley, L. C. (1988) Mitogens and ion fluxes. *Annu. Rev. Physiol.* 50:207.
- Spik, G. (1988) Rôle de la lactotransferrine dans la nutrition martiale du nourrisson. *Cah. Nutr. Diét.* 23:121-125.
- Spik, G., Brunet, B., Mazurier-Dehaine, C., Fontaine, G., Montreuil, J. (1982a) Characterization and properties of human and bovine lactotransferrins extracted from the faeces of newborn infants. *Acta Paediatr. Scand.* 71:979-985.
- Spik, G., Chéron, A., Montreuil, J., Dolby, J. (1978) Bacteriostasis of a milk-sensitive strain of *Escherichia coli* by immunoglobulins and iron-binding proteins in association. *Immunology* 33:663-671.
- Spik, G., Coddeville, B., Montreuil, J. (1988) Comparative study of the primary structures of sero-, lacto-, and ovotransferrin glycans from different species. *Biochimie* 70:1459-1469.
- Spik, G., Legrand, D., Leveugle, B., Mazurier, J., Mikogami, T., Montreuil, J., Pierce, A., Rochard, E. (1993) Binding properties of different lactotransferrins to human lactotransferrin receptor. In "New Perspectives in Infant Nutrition: Symposium Antwerpen" edited by Sawatzki, G. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, in press.
- Spik, G., 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.* 160: 94-98.
- Spik, G., Montreuil, J. (1983) Rôle de la lactotransferrine dans les mécanismes moléculaires de la défense antibactérienne. *Bull. Europ. Physiopath. Resp.* 19:123-130.
- Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dorland, L., van Halbeek, H., Vliegthart, J. F. G. (1982b) Primary structure of the glycans from human lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* 121:413-419.
- Stephens, S., Dolby, J. B., Montreuil, J., Spik, G. (1980) Differences in inhibition of the growth of commensal and enteropathogenic strains of *Escherichia coli* by lactotransferrin and secretory immunoglobulin A isolated from human milk. *Immunology* 41:597-603.
- Stremmel, W. G., Lotz, G., Niederau, C., Strohmeyer, G. (1987) Iron uptake by rat duodenal microvillous membrane vesicles: evidence for a carrier mediated transport system. *Eur. J. Clin. Invest.* 17:136-145.
- Stuart, S. G., Simister, S. B., Clarkson, S. B., Kacinski, B. M., Shapiro, M., Mellman, I. (1989) Human IgG Fc receptor (hFcRII; CD32) exists as multiple isoforms in macrophages, lymphocytes and IgG-transporting placental epithelium. *EMBO J.* 8:3657-3666.

- Sun, I. L., Toole-Simms, W., Crane, F. L., Morr , D. J., L w, H., Chou, J. Y. (1988) Reduction of diferric transferrin by SV40 transformed pineal cells stimulates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity. *Biochim. Biophys. Acta* 938:17.
- Suzuki, T., Nonaka, N., Kiyosawa, I., Ogasa, K. (1977) Lactoferrin contents in bovine colostrum and milk. *J. Jpn Soc. Nutr. Food Sci.* 30:317-322.
- Suzuki, T., Nonaka, N., Kiyosawa, I., Ogasa, K. (1978) Peptic digestion of human and bovine lactoferrin. *J. Jpn Soc. Nutr. Food Sci.* 31:395-403.
- Suzuki, T., Yamauchi, K., Tomita, N., Kiyosawa, I., Okonogi, S. (1989) Properties of peptic-tryptic digestion products of human and bovine lactoferrins. *J. Jpn Soc. Nutr. Food Sci.* 42:13-19.
- Sørensen, M. S., Sørensen, P. L. (1939) The protein in whey. *Comptes rendus des travaux du laboratoire Carlsberg série chimique* 23:55-99.
- Takami, M., Mizumoto, K., Kasuya, I., Kino, K., Sussman, H. H., Tsunoo, H. (1986) Human placental ferritin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100:1667.
- Tedeshi, A., Tuccari, G., Magazzu, G., Arena, F., Ricciardi, R., Barriesi, G. (1987) Immunohistochemical localization of lactoferrin in duodenojejunal mucosa from celiac children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 6:328-334.
- Teichmann, T., Stremmel, W. G. (1990) Iron uptake by human upper small intestinal microvillous membrane vesicles. Indication for facilitated transport mechanism mediated by membrane iron-binding protein. *J. Clin. Invest.* 86:2145-2153.
- Testa, U., Louache, F., Titeux, M., Thomopoulos, P., Rochant, H. (1985) The iron-chelating agent picolinic acid enhances transferrin receptors expression in human erythroleukaemic cell lines. *Br. J. Haematol.* 60:491-502.
- Theil, E. C. (1987) Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants and microorganisms. *Annu. Rev. Biochem.* 56:289-315.
- Theil, E. C. (1990) Regulation of ferritin and transferrin receptor mRNAs. *J. Biol. Chem.* 265:4771-4774.
- Thelander, L. (1990) Ribonucleotide reductase. In "Iron Transport and Storage" edited by Ponka, P., Schulman, H. M., Woodworth, R. C. CRC Press, p. 193-216.
- Thorstensen, K. (1989) Hepatocytes and reticulocytes have different mechanisms of the uptake of iron from transferrin. *J. Biol. Chem.* 263:16837-16841.
- Thorstensen, K., Romslo, T. (1988) Uptake of iron from transferrin by isolated rat hepatocytes. A redox-mediated plasma membrane process? *J. Biol. Chem.* 263:8844-8850.
- Thorstensen, K., Romslo, T. (1990) The role of transferrin in the mechanism of cellular iron uptake. *Biochem. J.* 271:1-10.
- Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K. (1992) Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.* 74:4137-4142.
- Tomita, M., Takase, M., Wakabayashi, H., Bellamy, W. (1993) Identification of the structural domain responsible for the microbicidal properties of lactoferrin. In "Proceedings of the First International Symposium on Lactoferrin Structure and Function" (Honolulu, Hawaii, September 19-24, 1992), in press.

- Topham, R. W., Eads, C. E., Butler, B. F. (1992) Alterations in the mucosal processing of iron in response to very-short-term dietary iron depletion and repletion. *Biochem. J.* 284:877-884.
- Trowbridge, I. S. (1989) Immunoassay of serum transferrin receptors: Clinical implications. *J. Lab. Clin. Med.* 114:336-337.
- Tuil, D., Vaulont, S., Mariano, J. L., Munnich, A., Moguilewsky, M., Bouton, M. M., Brissot, P., Dreyfus, J. C., Kahn, A. (1985) Transient transcriptional inhibition of the transferrin gene by cyclic AMP. *FEBS Lett.* 189:310-314.
- Turkewitz, A. P., Schwartz, A. L., Harrison, S. C. (1988) A pH-dependent reversible conformational transition of the human transferrin receptor leads to self-association. *J. Biol. Chem.* 263:16309-16315.
- Underwood, E. J. (1977) In "Trace Elements in Human and Animal Nutrition, 4th edition" Academic Press
- van den Berghe, N., Vaandrager, A. B., Bot, A. G. M., Parker, P. J., de Jonge. (1992) Dual role for protein kinase Ca as a regulator of ion secretion in the HT29cl.19A human colonic cell line. *Biochem. J.* 285:673-679.
- van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegenhart, J. F. G., Spik, G., Cheron, A., Montreuil, J. (1981) Structure determination of two oligomannoside-type glycopeptides obtained from bovine lactotransferrin, by 500MHz <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 675:293-296.
- Van Snick, J. L., Masson, P. L. (1976) The binding of human lactoferrin to mouse peritoneal cells. *J. Exp. Med.* 144:1568-1580.
- Van Snick, J. L., Masson, P. L., Heremans, J. F. (1974) The involvement of lactoferrin in the hyposideremia of acute inflammation. *J. Exp. Med.* 140:1068-1084.
- Van Vugt, H., van Gool, J., Ladiges, N. C. J.J., Boers, W. (1975) Lactoferrin in rabbit bile: its relation to iron metabolism. *Q. J. Exp. Physiol.* 60:79-88.
- Vasile, E., Nistor, A., Simionescu, M. (1983) Visualization of the binding, endocytosis and transcytosis of low density lipoprotein in the arterial endothelium *in situ*. *J. Cell Biol.* 96:1677-1689.
- Wada, H. G., Hass, P. E., Sussman, H. H. (1979) Transferrin receptor in the human placental brush border membranes. *J. Biol. Chem.* 254:12629.
- Walden, W. E., Daniels-McQueen S., Brown, P. H., Patino, M. M., Gaffield, L., Bielser, D., Thach, R. E. (1988) Translational repression in eukaryotes: partial purification and characterization of a repressor of ferritin mRNA translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9503-9507.
- Walden, W. E., Patino, M. M., Gaffield L. (1989) Purification of a specific repressor of ferritin mRNA translation from rabbit liver. *J. Biol. Chem.* 264:13765-13769.
- Walden, W. E., Thach, R. E. (1986) Translational control of gene expression in a normal fibroblast. Characterization of a subclass of mRNAs with unusual kinetic properties. *Biochemistry* 25:2033-2041.
- Walters, G. O., Jacobs, A., Worwood, M., Trevett, D., Thomson, W. (1975) Iron absorption in normal subjects and patients with idiopathic haemochromatosis: relationship with serum concentration. *Gut* 16:188-192.

- Ward, J. H., Jordan, I., Kushner, J. P., Kaplan, J. (1984) Heme regulation of HeLa cell transferrin receptor number. *J. Biol. Chem.* 259:13235–13240.
- Ward, J. H., Kushner, J. P., Kaplan, J. (1982) Regulation of HeLa cell transferrin receptor. *J. Biol. Chem.* 257:10317–10323.
- Weinberg, E. D. (1974) Iron and susceptibilities to infectious disease. *Science* 184:952–956.
- Wice, B. M. L., Trugnan, G., Pinto, M., Rousset, M., Chevalier, G., Sussaulx, E., Lacroix, B., Zweibaum, A. (1985) The intracellular accumulation of UDP-N-acetylhexosamines is concomitant with the inability of human cancer colon cells to differentiate. *J. Biol. Chem.* 260:139–146.
- Worwood, M. (1986) Serum ferritin. *Clin. Sci.* 70:215.
- Young, S. P., Aisen, P. (1981) Transferrin receptors and the uptake and release of iron by isolated hepatocytes. *Hepatology* 1:114.
- Yu, Y., Radisky, E., Leibold, E. A. (1992) The iron-responsive element binding protein - Purification, cloning, and regulation in rat liver. *J. Biol. Chem.* 267:19005–19010.
- Zähringer, J., Baliga, B. S., Munro, H. N. (1976) Novel mechanism for translational control in regulation of ferritin synthesis by iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:857–861.
- Zheng, L., Andrews, P. C., Hermodson, M. A., Dixon, J. E., Zalkin, H. (1990) Cloning and structural characterization of porcine heart aconitase. *J. Biol. Chem.* 265:2814–2821.
- Zheng, L. M., Kennedy, M. C., Blondin, G. A., Beinert, H., Zalkin, H. (1992) Binding of cytosolic aconitase to the iron responsive element of porcine mitochondrial aconitase messenger RNA. *Arch. Biochem. Biophys.* 299:356–360.
- Zimecki, M., Mazurier, J., Machnicki, M., Wieczorek, Z., Montreuil, J., Spik, G. (1991) Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> murine thymocytes. *Immunol. Lett.* 30:119–124.
- Zweibaum, A., Hauri, H. P., Sterchi, E., Chentret, I., Haffen, K., Bamat, J., Sordat, B. (1984) Immunohistological evidence obtained with monoclonal antibodies of small intestinal brush-border hydrolases in human colon cancers and foetal colons. *Int. J. Cancer* 34:591–598.
- Zweibaum, A., Pinto, M., Chevalier, G., Dussaulx, E., Triadou, N., Lacroix, B., Haffen, K., Brun, J. L., Rousset, M. (1985) Enterocytic differentiation of subpopulation of the human colon tumor cell line HT29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. *J. Cell Physiol.* 122:21.



## *Table des Matières*

---

<b>SOMMAIRE</b>	2
<b>INTRODUCTION</b>	5
<b>GENERALITES</b>	10
<b>I. LES PROTEINES CONTENANT DU FER</b>	11
A. Les protéines fonctionnelles contenant du fer	11
A-1. Les protéines héminiques	13
A-2. Les protéines Fer-Soufre	13
A-3. Les protéines non héminiques et non Fer-Soufre	13
B. Les protéines de stockage du fer	14
B-1. La ferritine	14
B-2. L'hémosidérine	15
C. Les protéines de transport du fer	15
C-1. Les transferrines	15
a) La famille des transferrines	15
b) Propriétés de la sérotransferrine	16
c) Régulation de la biosynthèse de la sérotransferrine	16
C-2. La ferritine	17
C-3. L'hémopexine	18
D. La lactotransferrine	18
D-1. Localisation	18
a) Le lait	18
b) Autres sécrétions externes	20
<i>Les sécrétions gastrointestinales</i>	20
<i>Le mucus</i>	20
c) Les leucocytes neutrophiles polymorphonucléaires	21
d) Le sang	21
D-2. Propriétés de fixation du métal et structure de la lactotransferrine	21
a) Activité de fixation du métal	21
b) Structure primaire de la protéine	22
c) Les glycanes	22
<i>Sites de glycosylation</i>	23
<i>Structure des glycanes</i>	23
d) Structure cristallographique	23
<i>Structure bilobée</i>	23
<i>Site de fixation du fer</i>	25
<i>Autres observations</i>	25
D-3. Rôles de la lactotransferrine au niveau du tractus gastrointestinal	25
a) Résistance de la lactotransferrine aux dégradations protéolytiques	27
b) Rôles dans l'absorption intestinale du fer	27



c) Rôles dans la défense antibactérienne de la muqueuse	27
<i>Activité bactériostatique de la lactotransferrine</i>	
<i>par ferriprivation</i>	28
<i>Activités bactéricides de la lactotransferrine</i>	
<i>par déstabilisation de la paroi bactérienne</i>	28
<i>Effet synergique du lysozyme et des IgA sécrétoires</i>	29
d) Activité de stimulation de la croissance	29
D-4. Rôles de la lactotransferrine dans les mécanismes de	
défense immunitaire	30
a) Rôle de la lactotransferrine dans l'activité bactéricide	
des leucocytes polymorphonucléaires	30
<i>Activité bactéricide de la lactotransferrine libérée</i>	30
<i>Activité bactéricide de la lactotransferrine au niveau des</i>	
<i>phagolysosomes</i>	30
b) Rôle de la lactotransferrine dans l'hyposidérémie inflammatoire	31
c) Rôle de la lactotransferrine dans la régulation de la myélopoïèse	31
d) Rôle de la lactotransferrine dans l'inhibition de l'agrégation	
plaquettaire	32
e) Interactions de la lactotransferrine avec les lymphocytes	32
D-5. Relations structure–fonction de la lactotransferrine	32
a) Les domaines fixant le récepteur	32
b) Les domaines responsables des propriétés bactéricides et	
des propriétés d'inhibition de l'agrégation plaquettaire	33
<b>II. INCORPORATION DU FER PAR LES CELLULES ET HOMEOSTASE</b>	36
<b>A. Incorporation du fer à partir de la sérotransferrine</b>	36
A-1. Endocytose par le récepteur de la sérotransferrine	36
a) Internalisation du complexe ligand–récepteur	38
b) Effet de l'acidification de l'endosome	38
c) Libération du fer lié à la sérotransferrine	38
d) Devenir du fer libéré	39
e) Recyclage du complexe ligand–récepteur	39
A-2. Libération réductive du fer	39
a) Rôle dans l'incorporation du fer	39
b) Rôle dans la stimulation de la croissance cellulaire	41
A-3. Autres mécanismes	41
a) Endocytose non–spécifique	41
b) Endocytose par le récepteur d'asialoglycoprotéines	41
<b>B. Homéostasie cellulaire du fer</b>	42
B-1. Régulation de la biosynthèse du TfR et de la ferritine	42
a) Expression du TfR	42
<i>Expression de TfR dans les cellules prolifératives et non–</i>	
<i>prolifératives</i>	42
<i>Expression fer–dépendante</i>	43

b) Expression de la ferritine	43
B-2. Coordination de la biosynthèse des protéines intervenant dans le métabolisme du fer	45
a) Fixation fer-dépendante d'une protéine cytosolique sur les IRE	45
<i>Régulation traductionnelle de l'expression de ferritine</i>	45
<i>Régulation post-transcriptionnelle de l'expression du TfR</i>	47
<i>Régulation traductionnelle de l'expression de l'acide 5-aminolévulinique synthase</i>	47
b) La protéine fixant l'IRE ou IRE-BP	48
<i>Fonction de détection du taux de fer</i>	48
<i>Activité aconitase et mécanisme de détection du taux de fer</i>	48
B-3. Résumé de la régulation de l'homéostasie cellulaire	50
a) Homéostasie cellulaire du fer	50
b) Implication dans le métabolisme tissulaire du fer	53
III. ABSORPTION INTESTINALE DU FER	54
A. Morphologie de la muqueuse intestinale.	54
A-1. La muscularis mucosa	56
A-2. La lamina propria	56
A-3. L'épithélium	58
a) L'épithélium cryptique	58
b) Les villosités	58
c) Les entérocytes	58
d) Différenciation des cellules de l'épithélium intestinal	60
B. Absorption intestinale du fer – phase intraluminaire.	61
C. Phase d'incorporation du fer par la bordure en brosse des entérocytes.	62
C-1. Absorption du fer héminique	62
C-2. Absorption du fer inorganique	64
a) Implication de transporteurs spécifiques du fer inorganique	64
b) Etude des différents transporteurs de fer inorganique	64
<i>Glycoprotéine membranaire de la bordure en brosse fixant Fe<sup>2+</sup></i>	64
<i>Acide gras non estérifié</i>	64
<i>Glycoprotéine membranaire de la bordure en brosse fixant Fe<sup>2+</sup> et Fe<sup>3+</sup></i>	65
C-3. Rôle de la sérotransferrine dans l'absorption du fer luminal	65
a) Rôle présumé de la sérotransferrine dans l'absorption du fer	65
b) Résultats controversés	66
<i>Origine de la sérotransferrine localisée dans la lumière intestinale</i>	66
<i>Localisation du TfR dans les entérocytes</i>	66
<i>La sérotransferrine facilite-t-elle réellement l'absorption intestinale du fer?</i>	67
C-4. Rôle de la lactotransferrine dans l'absorption du fer luminal	67
a) Grande biodisponibilité du fer contenu dans le lait humain	67

b) Présence de lactotransferrine à la surface luminale des entérocytes	67
c) Présence de récepteurs de lactotransferrine sur les membranes de la bordure en brosse des entérocytes	68
<i>Affinité de la lactotransferrine pour son récepteur</i>	68
<i>Spécificité d'espèce de la fixation de la lactotransferrine</i>	70
<i>Implication des glycanes de la lactotransferrine sur la fixation à son récepteur</i>	70
d) Effets de la lactotransferrine sur l'absorption du fer	70
<i>Effet inhibiteur</i>	70
<i>Effet activateur</i>	71
D. Phase intracellulaire: passage du fer à travers les entérocytes	71
D-1. "pool" intracellulaire de fer	71
a) La sérotransferrine	72
b) La ferritine	72
c) Autres substances	72
E. Phase de transfert du fer des entérocytes vers le plasma	73
F. Régulation de l'absorption intestinale du fer	73
F-1. Facteurs humoraux	74
a) La ferritine sérique	74
b) Récepteur sérique de la sérotransferrine	74
c) La sérotransferrine	75
F-2. Rôle des entérocytes	75
a) L'hypothèse proposée: mise en condition des cellules cryptiques pour moduler la capacité d'absorption intestinale du fer	75
b) Modulation de la capacité d'absorption du fer des entérocytes	76
<i>Régulation fer-dépendante de l'absorption du fer</i>	76
<i>Implication de l'IRE-BP dans la régulation de l'absorption du fer</i>	77

## **TRAVAUX PERSONNELS** 79

<b>I. ETUDE DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LES CELLULES INTESTINALES EN CULTURE</b>	<b>80</b>
A. Introduction	80
A-1. Systèmes de culture de cellules épithéliales intestinales	80
a) Les cellules Caco-2	81
b) Les cellules T84	81
c) Les cellules HT29 cultivées dans du milieu sans glucose	82
d) Les clones et sous-clones isolés de la lignée cellulaire HT29	82
<i>HT29 clone 16E et 19A</i>	82
<i>HT29-D4 et HT29-D9</i>	83
<i>HT29-18-C<sub>1</sub> et HT29-18-N2</i>	83

A-2. Utilisation des cellules intestinales en culture pour étudier les rôles de la lactotransferrine humaine dans l'absorption intestinale du fer	83
a) La différenciation des cellules cryptiques au cours de leur migration vers l'extrémité de la villosité	84
b) Le transport transépithélial	84
c) Le récepteur de la lactotransferrine dans les lignées cellulaires en culture	84
d) Limitation de l'utilisation des cellules intestinales en culture comme modèle de l'épithélium intestinal	85
e) Conclusion	85
B. Matériel et méthodes	86
B-1. Culture cellulaire	86
a) Conditions générales	86
b) Les cellules Caco-2	86
c) Les cellules HT29 Glc- Ino+	86
d) Les cellules HT29 cl.19A	87
e) Les cellules HT29-18-C <sub>1</sub>	87
B-2. Protéines et marquage de protéines	87
a) La lactotransferrine	87
b) Radioiodination de la lactotransferrine	87
B-3. Fixation de la lactotransferrine	88
C. Résultats et discussion	89
C-1. Evolution de la fixation de la lactotransferrine en fonction de l'âge des cellules	89
C-2. Comparaison des modalités de la fixation de la lactotransferrine sur différentes lignées cellulaires différenciées	89
C-3. Spécificité de la fixation de la lactotransferrine sur les lignées cellulaires en culture	92
D. Conclusion	92
<b>II. ETUDE DU TRANSPORT TRANSEPIHELIAL DE LA LACTOTRANSFERRINE ET DE SON FER A TRAVERS LES MONOCOUCHEs CELLULAIRES DIFFERENCIÉES EN ENTEROCYTES</b>	<b>93</b>
A. Introduction	93
A-1. Destinée de la lactotransferrine fixée sur les membranes de bordure en brosse	93
A-2. La transcytose	94
a) La transcytose à travers les cellules de l'épithélium intestinal par l'intermédiaire de récepteur	95
Transcytose d'IgA dimérique par l'intermédiaire du récepteur d'immunoglobuline polymérique	95
La transcytose des IgG maternelles par l'intermédiaire du récepteur de Fc chez les Rats nouveau-nés	97
La transcytose de la cobalamine alimentaire par l'intermédiaire du récepteur spécifique du complexe cobalamine-facteur intrinsèque	97

b) Les transcytoses à travers les cellules de l'épithélium intestinal ne faisant pas intervenir de récepteur	98
A-3. Conclusion	100
B. Article soumis à publication dans <i>American Journal of Physiology</i>	101
B-1. Abstract	103
B-2. Introduction	104
B-3. Materials and methods	105
a) Materials	105
b) Cell culture	105
c) Human lactoferrin labeling	106
d) Human lactoferrin binding to the apical surface of HT29 cl.19A cells	107
e) Human lactoferrin transport studies in Ussing chambers	108
1. Measurement of electrical parameters in Ussing chambers	108
2. Studies of apical to basolateral transport of <sup>125</sup> I-labeled diferric human lactoferrin	108
3. Studies of apical to basolateral transport of diferric human lactoferrin, dual-labeled with <sup>125</sup> I and <sup>59</sup> Fe	109
4. Analysis by ELISA of intact human lactoferrin transcytosis.	109
5. Electrophoretic characterization of human lactoferrin after transcytosis.	110
f) Statistical analysis	111
B-4. Results	111
a) Human lactoferrin binding to apical surface of HT29 cl.19A cells	111
b) Human lactoferrin transport in Ussing chambers	114
1. Electrical parameters of HT29 cl.19A cell monolayers	114
2. Apical to basolateral transport of <sup>125</sup> I-labeled diferric human lactoferrin	114
3. Transepithelial iron transport studies using dual-labeled <sup>125</sup> I- <sup>59</sup> Fe-diferric human lactoferrin	118
4. Characterization of hLf after transcytosis	118
B-5. Discussion	121
C. Conclusion	126
<b>III. ETUDE DE L'EFFET DE LA CARENCE INTRACELLULAIRE EN FER SUR LE RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS UNE LIGNEE CELLULAIRE INTESTINALE</b>	128
A. Introduction	128
B. Article soumis à publication dans <i>Biochemical Journal</i>	129
B-1. Synopsis	131
B-2. Introduction	132
B-3. Materials and methods	133
a) Materials	133
b) Cell culture	134
c) Human lactoferrin labelling	134

d) Human lactoferrin binding to the apical surface of HT29-18-C <sub>1</sub> cells	135
e) Effect of picolinic acid on lactoferrin binding to HT29-18-C <sub>1</sub> cells	136
f) Measurements of intracellular iron contents of HT29-18-C <sub>1</sub> cells	137
g) Measurements of lactoferrin uptake into HT29-18-C <sub>1</sub> cells	137
B-3. Results	138
a) Binding of human lactoferrin to the apical surface of HT29-18-C <sub>1</sub> cells	138
b) Effect of picolinic acid on intracellular iron and binding of human lactoferrin to HT29-18-C <sub>1</sub> cells	140
c) Nature of increased binding of human lactoferrin to HT29-18-C <sub>1</sub> cells by picolinic acid treatment	143
d) Effect of picolinic acid on the uptake of lactoferrin	146
e) Effect of picolinic acid on uptake of lactoferrin-bound iron	148
B-4. Discussion	150
C. Conclusion	153
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	154
<b>REFERENCES</b>	159
<b>TABLE DES MATIERES</b>	184

