

50376
1994
209

Copy

50376
1994
209

THESE

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

par

Nathalie NILLESSE

LE RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

PREPARATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX ET POLYCLONAUX

**APPLICATIONS A LA CARACTERISATION ET AU DOSAGE ELISA
DU RECEPTEUR**

Soutenue le 24 Juin 1994 devant la commission d'examen :

Président	: André VERBERT	Professeur, USTL
Rapporteurs	: Janine DOLY Jacques CAEN	Directeur de recherche CNRS, Paris Professeur, Paris
Examineurs	: Baptiste FAUCHEUX Jean MONTREUIL Geneviève SPIK Annick PIERCE	Directeur de recherche Association Claude Bernard, Paris Professeur Emérite, USTL Professeur, USTL Chargé de recherche CNRS, USTL

Ce travail a été réalisé sous la direction du Docteur Annick Pierce et du Professeur Geneviève Spik dans le Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Unité mixte du CNRS n°111 : Relations Structure-Fonction des constituants membranaires; Directeur : Professeur André Verbert). Il a bénéficié d'une Allocation de Recherche du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

A ma mère,

A mes grands-parents,

A Alain,

Avec toute mon affection.

A Ludo,

Avec tout mon amour.

A Monsieur le Professeur André VERBERT

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

A Madame le Professeur Geneviève SPIK

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre équipe et de m'avoir fait découvrir les joies que procure la Recherche. J'ai toujours trouvé auprès de vous beaucoup de gentillesse, de disponibilité ainsi que de précieux conseils. Je vous en suis sincèrement reconnaissante.

A Madame le Docteur Janine DOLY

Vous avez suivi nos travaux avec beaucoup d'intérêt et de bienveillance en nous prodiguant de précieux conseils. Veuillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements et soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Jacques CAEN

Grand spécialiste dans le domaine des plaquettes et des mégacaryocytes, vous avez accepté de juger ce travail. Je tiens à vous en remercier.

A Monsieur le Docteur Baptiste FAUCHEUX

J'ai énormément apprécié vos conseils scientifiques, votre dynamisme ainsi que la chaleur de votre accueil lors de mes séjours à Paris. Votre venue en tant qu'examineur de cette thèse me fait extrêmement plaisir. Veuillez trouver ici l'expression de ma vive gratitude et de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur MONTREUIL

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

A Madame le Docteur Annick PIERCE

Au cours de la réalisation de cette thèse, tu m'as fait bénéficier de ton expérience scientifique et de tes précieux conseils. J'ai pu en plus, au cours de ces quatre années, apprécier ta gentillesse et ton énergie au travail. Sois assurée de ma sincère reconnaissance et de mon amitié.

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

- l'ensemble du personnel du CRTS de Lille, et plus particulièrement madame Royakers, pour les concentrés plaquettaires de 6 jours qu'ils m'ont généreusement et aimablement fournis et sans lesquels je n'aurais pu mener à bien mes manipulations

- les membres des laboratoires 103 et 210 et plus particulièrement Philippe, Mazu et Dominique pour leur sympathie et les encouragements qu'ils m'ont prodigués pendant ces quatre années

- Jean-Pierre Decottignies pour son assistance technique lors de la préparation du récepteur de la lactotransferrine

- Myriam Lecocq pour son aide technique en culture cellulaire

- Madame Celen qui assuré la reproduction de ce mémoire

- Christophe Mariller pour son aide précieuse lors de la réalisation des figures

- **Fabrice Allain pour ses précieux conseils lors de la réalisation du dosage ELISA**

- **Monique Benaïssa pour ses compétences techniques, ses qualités humaines et son délicieux thé à la menthe**

- **Bernadette Coddeville qui m'a formée à mon arrivée au Laboratoire et dont j'ai pu apprécier la gentillesse**

- **Tous mes amis qui m'ont toujours soutenue pendant ces années passées au Laboratoire : Papy, Elisabeth, Brigitte, Valérie, Isabelle, Agnès, Catherine, Anne-Marie ...**

LISTE DES ABREVIATIONS

ACIDES AMINES

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

MONOSACCHARIDES CITES

Fuc	: Fucose
Gal	: Galactose
GalNAc	: N-acétylgalactosamine
GlcNAc	: N-acétylglucosamine
Man	: Mannose
NeuAc	: Acide N-acétylneuraminique

ELEMENTS CITES

Al	: Aluminium
Co	: Cobalt
Cu	: Cuivre
Er	: Erbium
Eu	: Europium
Ga	: Gallium
Gd	: Gadolinium
I	: Iode
Mg	: Magnésium
Mn	: Manganese
Nd	: Neodymium
P	: Phosphore
Pr	: Praseodymium
Tb	: Terbium

Zn : Zinc

TRANSFERRINES

BLTF : Lactotransferrine bovine
HLTF : Lactotransferrine humaine
MLTF : Lactotransferrine murine
PLTF : Lactotransferrine porcine
XLTF : Lactotransferrine de xenope
HMTF : Mélanotransferrine
HSTF : Sérotransferrine equine
PSTF : Sérotransferrine porcine
RSTF : Sérotransferrine de lapin
STF : Sérotransferrine humaine

CYTOKINES, HORMONES ET FACTEURS DE CROISSANCE

EGF : Epidermal Growth Factor
FSH : Follicular Stimulating Hormone
G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor
IGF : Insulin-like Growth Factor
INF : Interferon
IL : Interleukin
PDGF : Platelet Derived Growth Factor
PF : Platelet Factor
TGF : Transforming Growth Factor
TNF : Tumor Necrosis Factor

DIVERS

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADP : Adénosine diphosphate
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate
BET : Bromure d'ethidium
BFU : Burst Forming Unit
CAT : Chloramphénicol Acetyl Transferase
CD : Cluster differentiation
CFU-MK : Colony Forming Unit-Megakaryocyte
Con A : Concanavaleine A
COUP : Chicken Ovalbumin Upstream Promoter
cpm : coup par minute
DEAE : Diéthylaminoéthyl
DEPC : Diéthylpyrocarbonate
DTT : Dithiothréitol
dXTP : 2'-désoxynucléoside-5'-triphosphate
EDTA : Ethylène diamine tétra-acétate de sodium
ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ERE : Estrogen Response Element
FITC : Fluorescein isothiocyanate
GP : Glycoprotein

Hyf	: 5-(((2-(carbohydrazino)methyl)thio)acetyl)amino-fluorescein
Ig	: Immunoglobuline
IPTG	: Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
IRE	: Iron Responsive Element
IRE-BP	: Iron Responsive Element-Binding Protein
Ka	: Constante d'affinité
kb	: Kilobase
Kd	: Constante de dissociation
kDa	: Kilodalton
LDL	: Low Density Lipoprotein
mERM	: module Estrogen Response Element
n	: nombre de sites par cellule
NADH	: Nicotinamide adénine dinucléotide hydrogène
PADGEM	: Platelet Activation Dependent Granule to External Membrane Protein
pb	: paire de bases
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PMA	: Phorbol 12-Myristate-13-Acetate
SAB	: Serum Albumine Bovine
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TM	: Température de demi-dissociation
TBP	: Transferrin Binding Protein
ULF	: Uterine Luminal Fluid
UV	: Ultra-Violet
X-Gal	: 5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactoside

Sommaire

SOMMAIRE

INTRODUCTION 1

GENERALITES

LES TRANSFERRINES

I - <u>UNE FAMILLE DE PROTEINES</u>	5
II - <u>LOCALISATION ET PRODUCTION</u>	
A- La sérotransferrine	6
B- La lactotransferrine	6
III - <u>STRUCTURE PRIMAIRE</u>	
A- La sérotransferrine	7
B- La lactotransferrine	8
IV - <u>ORGANISATION DE LA CHAINE POLYPEPTIDIQUE</u>	11
V - <u>LES SITES DE FIXATION DU FER</u>	11
VI - <u>LES GLYCANNES DES TRANSFERRINES</u>	
A- La sérotransferrine	16
B- La lactotransferrine	19
C- Conclusion	21
VII - <u>LES GENES DES TRANSFERRINES</u>	
A- La sérotransferrine	22
B- La lactotransferrine	23
VIII - <u>REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES DES TRANSFERRINES</u>	
A- La sérotransferrine	
1- Régulation au cours du développement	24
2- Spécificité tissulaire de l'expression du gène de la sérotransferrine	25

3- Modulation par le fer	26
4- Régulation par les hormones et les autres facteurs	
a- Dans le foie	27
b- Dans les cellules de Sertoli	28
c- Dans les astrocytes	29
B- La lactotransferrine	
1- Régulation au cours de la différenciation	29
2- Régulation par les hormones	31
IX - <u>PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES</u>	
A- La sérotransferrine	34
B- La lactotransferrine	35
X - <u>CONCLUSION</u>	36

LES RECEPTEURS DES TRANSFERRINES

- INTRODUCTION	37
-----------------------	----

- LE RECEPTEUR DE LA SEROTRANSFERRINE

I - <u>LE RECEPTEUR DES VERTEBRES</u>	
A- Localisation	
1- Les réticulocytes	38
2- Les hépatocytes	38
3- Les trophoblastes	39
4- Les lymphocytes	39
5- Les autres cellules	40
B- Structure du récepteur de la sérotransferrine	
1- La partie protéique	40
2- La partie glycanique	42
C- Interaction du récepteur avec son ligand : la sérotransferrine	45
D- Rôles du récepteur de la sérotransferrine	
1- Apport de fer aux cellules	46
a- Endocytose	48
b- Le système redox	51
2- Le récepteur de la sérotransferrine : une cible thérapeutique	53

3- Rôles divers	54
E- Le gène du récepteur de la sérotransferrine	
1- Organisation génomique	55
2- Régulation de l'expression du récepteur de la sérotransferrine	55
a- Le cycle cellulaire et l'état de différenciation	56
b- Le taux de fer intracellulaire	57
c- Les cytokines	61
d- Autres facteurs	61
F- Le récepteur soluble	62

II - LES RECEPTEURS BACTERIEN ET PARASITAIRE DE LA SEROTRANSFERRINE

A- Le récepteur bactérien	63
1- Haemophilus	64
2- Actinobacillus	64
3- Neisseria	65
4- Autres agents pathogènes	66
5- Conclusion	66
B- Le récepteur parasitaire	68

LE RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE

- LE RECEPTEUR DES VERTEBRES

I - LES RECEPTEURS LOCALISES SUR LES CELLULES DU FOIE

A- Introduction	69
B- Etudes préliminaires	69
C- Fixation et endocytose de la lactotransferrine par des hépatocytes de rat	70
D- Le récepteur remnant	71

II - LES RECEPTEURS ENTEROCYTAIRES

A- Caractérisation	72
B- Masse moléculaire et glycannes	73
C- Reconnaissance lactotransferrine-récepteur	
1- Affinité	73
2- Spécificité d'espèce	73

3- Existence d'un récepteur lectinique ?	75
D- Rôle du récepteur entérocytaire : apport de fer ?	75
E- Régulation de l'expression du récepteur entérocytaire de la lactotransferrine	76
III - <u>LES RECEPTEURS LOCALISES SUR LES NEUTROPHILES</u>	76
IV - <u>LES RECEPTEURS LOCALISES SUR LES MONOCYTES ET LES MACROPHAGES</u>	77
V - <u>LES RECEPTEURS DE MASSE MOLECULAIRE 105 kDa</u>	
A- Les lymphocytes et les thymocytes	
1- Le récepteur membranaire	81
2- Le récepteur soluble	85
B- Les cellules de la glande mammaire	
1- Caractérisation	85
2- Destinée de la lactotransferrine fixée sur les cellules T47D	87
C- Les plaquettes	
1- Caractérisation du récepteur de la lactotransferrine	87
2- Rôle dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire	88
- LES RECEPTEUR BACTERIEN ET PARASITAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE	
I - <u>LE RECEPTEUR BACTERIEN</u>	
A- Identification du récepteur bactérien	89
B- Rôle du récepteur bactérien dans les activités bactéricide et bactériostatique de la lactotransferrine	92
II - <u>LE RECEPTEUR PARASITAIRE</u>	94
- CONCLUSION	94

LES MEGACARYOCYTES ET LES PLAQUETTES COMME MODELES EXPERIMENTAUX

I- <u>LES MEGACARYOCYTES ET LES LIGNEES CELLULAIRES</u>	
<u>POSSEDANT LES MEMES MARQUEURS</u>	
A- Les mégacaryocytes	
1- Isolement et caractérisation	96
2- Les différents stades de maturation	97
3- Degré de ploïdie	97
4- Marqueurs de surface	97
B- Les lignées portant des marqueurs de surface mégacaryocytaire	100
II- <u>LES PLAQUETTES</u>	
A- Origine	102
B- Structure générale	103
C- Les réponses physiologiques	104
1- Le changement de forme	105
2- L'agrégation plaquettaire	105
3- La sécrétion plaquettaire	105
D- Les concentrés plaquettaires	106

TRAVAUX PERSONNELS

PREPARATION D'UN ANTICORPS MONOCLONAL DIRIGE CONTRE LE RECEPTEUR SOLUBLE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE ET MISE EN EVIDENCE DE SA SPECIFICITE

I- <u>INTRODUCTION</u>	107
II- <u>MODE OPERATOIRE</u>	
A- Préparation du récepteur soluble	
1- Concentration du milieu de culture	108
2- Chromatographie d'affinité sur colonne d'anticorps anti-lactotransferrine immobilisés	108
B- Production des anticorps monoclonaux	
1- Immunisation	108

2- Criblage des clones par la méthode ELISA	
a- Recherche des clones sécrétant des anticorps anti-SAB	110
b- Recherche des clones sécrétant des anticorps anti-LTF humaine	111
c- Recherche des clones sécrétant des anticorps dirigés contre une protéine de surface des cellules Jurkat	111
3- Recherche des clones sécrétant des anticorps anti-récepteur	112
4- Amplification d'un clone positif	112
C- Détermination des conditions d'utilisation de l'anticorps monoclonal 5B3G10	
1- Western blot	113
2- Cytofluorimétrie en flux	113

III- RESULTATS

A- Préparation du récepteur soluble en vue de l'immunisation d'une souris	
1- Identification du récepteur soluble de la lactotransferrine	114
2- Quantification du récepteur purifié	114
B- Production des anticorps monoclonaux	
1- Préparation des anticorps et sélection des clones produisant des anticorps uniquement dirigés contre une protéine de surface des cellules Jurkat	116
2- Recherche des clones sécrétant des anticorps anti-récepteur de la lactotransferrine humaine	116
3- Amplification du clone 5B3G10	118
C- Détermination des conditions d'utilisation de l'anticorps 5B3G10	
1- Western blot	118
2- Cytofluorimétrie en flux	120

IV- CONCLUSION 120

PURIFICATION DU RECEPTEUR MEMBRANAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

I- INTRODUCTION 124

II- MODE OPERATOIRE

A- Chromatographie de gel filtration 125

B- Chromatographie d'immuno-affinité

 1- Immobilisation des anticorps monoclonaux 5B3G10 sur du gel

Eurocell ONB-Carbonate A	
a- Principe	125
b- Protocole	125
2- Chromatographie d'affinité sur colonne de 5B3G10-Eurocell ONB-Carbonate A	126
III- <u>RESULTATS</u>	
A- Etapes chromatographiques	126
B- Analyse des protéines présentes dans les fractions obtenues avec les tampons D et E	128
C- Intérêt de cette technique de purification	130
IV- <u>CONCLUSION</u>	130

PREPARATION D'ANTICORPS POLYCLONAUX MONOSPECIFIQUES DIRIGES CONTRE LE RECEPTEUR MEMBRANAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

I- <u>INTRODUCTION</u>	132
II- <u>MODE OPERATOIRE</u>	
A- Préparation d'anticorps polyclonaux dirigés contre le récepteur de la lactotransferrine humaine après immunisation d'un lapin avec la protéine purifiée	
1- Préparation du récepteur	133
2- Immunisation du lapin	134
3- Obtention de la fraction Ig G renfermant les anticorps polyclonaux anti-récepteur	134
B- Test des anticorps polyclonaux anti-récepteur	
1- Cytofluorimétrie en flux	
a- Incubation des cellules avec l'anticorps anti-récepteur	135
b- Expériences de compétition	135
2- Western blot	136
III- <u>RESULTATS</u>	
A- Obtention d'anticorps polyclonaux anti-récepteur	136
B- Test des anticorps polyclonaux dirigés contre le récepteur	

de la lactotransferrine humaine	
1- Cytofluorimétrie en flux	
a- Etude de la fixation de l'anticorps polyclonal anti-récepteur à la surface de différentes cellules	137
b- Expériences de compétition	137
2- Western blot	140

IV- <u>CONCLUSION</u>	140
------------------------------	-----

DETECTION ET DOSAGE DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE A L'AIDE DES ANTICORPS POLYCLONAUX ANTI-RECEPTEUR SEULS OU EN COMBINAISON AVEC L'ANTICORPS MONOCLONAL 5B3G10

I- <u>INTRODUCTION</u>	143
-------------------------------	-----

II- MODE OPERATOIRE

A- Détection par immunocytochimie du récepteur de la lactotransferrine sur des coupes flottantes de cerveau humain	
1- Préparation de coupes flottantes	146
2- Immunocytochimie	
a- Fixation de l'anticorps	147
b- Révélation	147
B- Dosage du récepteur de la lactotransferrine humaine par la méthode ELISA	148

III- RESULTATS

A- Détection par immunocytochimie du récepteur de la lactotransferrine sur des coupes flottantes de cerveau	149
B- Dosage du récepteur de la lactotransferrine humaine par la méthode ELISA	
1- Choix de la technique	154
2- Dilutions optimales des anticorps dirigés contre le récepteur de la lactotransferrine humaine	154
3- Résultats	156

IV- <u>CONCLUSION</u>	158
------------------------------	-----

CARACTERISATION DU RECEPTEUR MEMBRANAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE A LA SURFACE DES MEGACARYOBLASTES ET DES MEGACARYOCYTES DE LA LIGNEE DAMI

I- <u>INTRODUCTION</u>	159
II- <u>MODE OPERATOIRE</u>	
A- Culture cellulaire	159
B- Caractérisation du récepteur	
1- Expériences de cytofluorimétrie en flux	160
2- Electrophorèse et immunorévélation	160
3- Détermination des paramètres de fixation de la lactotransferrine à la surface des cellules Dami	161
C- Détermination des paramètres de fixation de la lactotransferrine à la surface des plaquettes	162
D- Recherche du messager de la lactotransferrine humaine dans les cellules Dami	162
E- Etude par cytofluorimétrie en flux de la fixation d'un anticorps anti-GPIIb et d'un anticorps anti-GPIIb-IIIa à la surface des cellules Dami	163
F- Sélection de la population cellulaire des mégacaryoblastes Dami qui exprime le récepteur de la lactotransferrine humaine	163
III- <u>RESULTATS</u>	
A- Caractérisation du récepteur membranaire de la lactotransferrine sur les cellules Dami	
1- Analyse des cellules au cytofluorimètre	164
2- Etude de la fixation de la lactotransferrine et des anticorps monoclonal 5B3G10 et polyclonaux anti-récepteur membranaire à la surface des cellules Dami	166
3- Caractérisation du récepteur de la lactotransferrine par immunorévélation	169
4- Détermination des paramètres de fixation de la lactotransferrine à la surface des cellules Dami	172
B- Détermination des paramètres de fixation de la lactotransferrine à la surface des plaquettes	172
C- Recherche du messager de la lactotransferrine humaine dans	174

les cellules Dami	
D- Etude de la fixation d'un anticorps anti-GPIb et d'un anticorps anti-GPIIb-IIIa à la surface des cellules Dami	176
E- Sélection de la population cellulaire exprimant le récepteur de la lactotransferrine humaine	176
IV- <u>CONCLUSION</u>	183
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	188
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	194

APPENDICE TECHNIQUE

PARTIE I : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE

I - <u>PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE</u>	
A- Purification de la lactotransferrine	A1
B- Saturation en fer de la lactotransferrine	A1
C- Couplage de la fluorescéine sur les glycanes de la lactotransferrine	A1
II - <u>MATERIEL CELLULAIRE</u>	
A- Isolement des plaquettes	A2
B- Culture cellulaire	A3
C- Préparation d'un lysat cellulaire	A3
III - <u>TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES</u>	
A- Précipitation des fractions purifiées	A3
B- Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS	A4
C- Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose	A4
IV - <u>DETECTION DES PROTEINES APRES TRANSFERT SUR NITROCELLULOSE</u>	A4

V - CYTOFLUORIMETRIE EN FLUX

- A- Etude de la fixation des anticorps monoclonaux anti-récepteur 5B3G10 par cytofluorimétrie en flux A5
- B- Etude de la fixation de la lactotransferrine-HyF par cytofluorimétrie en flux (méthode directe) A5
- C- Etude de la fixation de la lactotransferrine par cytofluorimétrie en flux (méthode indirecte) A6
- D- Analyse des résultats A6

PARTIE II : BIOLOGIE MOLECULAIRE

I - COMPOSITION DES TAMPONS UTILISES B1

II - TECHNIQUES D'ISOLEMENT ET DE PURIFICATION DES ARN

- A- Préparation des ARN cellulaires totaux B1
- B- Purification des ARNm poly A⁺ B2

III- ELECTROPHORESE DE L'ARN EN GEL D'AGAROSE B2

IV- TRANSFERT DE L'ARN PAR CAPILLARITE (NORTHERN BLOT) B3

V- HYBRIDATION EN PRESENCE DE LA SONDÉ ADN_c DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

- 1- Marquage de la sonde B3
- 2- Hybridation et autoradiographie B4

Introduction

INTRODUCTION

La découverte, en 1960, de la lactotransferrine dans le lait de Femme (Montreuil et Mullet, 1960; Montreuil *et al.*, 1960) constitue le point de départ de nombreuses recherches effectuées, depuis de nombreuses années, au laboratoire au sein de l'équipe du professeur G. Spik. Ces recherches concernent plus particulièrement la détermination de la structure primaire de cette glycoprotéine et la mise en évidence de ses rôles biologiques, de même que l'étude des interactions de la lactotransferrine avec son récepteur.

Si à ce jour la structure de la lactotransferrine humaine est bien connue, à l'inverse ses fonctions biologiques restent encore très controversées. Afin de mieux les connaître, une étude des cellules cibles de la lactotransferrine a donc été entreprise.

La caractérisation de la lactotransferrine dans un premier temps, dans de nombreux liquides biologiques et à la surface des muqueuses et dans un second temps, dans les granules secondaires des leucocytes polynucléaires (Masson *et al.*, 1969) a dirigé plus précisément cette étude vers les entérocytes, les cellules de glande mammaire et les cellules sanguines. Ainsi, le récepteur de la lactotransferrine a pu être mis en évidence dans des biopsies intestinales humaines (Cox *et al.*, 1979), sur des entérocytes de lapin (Mazurier *et al.*, 1985) et de souris (Hu *et al.*, 1988 et 1990), à la surface des lymphocytes humains activés (Mazurier *et al.*, 1989), des plaquettes (Leveugle *et al.*, 1993) et des cellules de glande mammaire (Rochard *et al.*, 1992). De même, la fixation spécifique de la lactotransferrine a pu être observée à la surface des éosinophiles, des neutrophiles et des monocytes (Leveugle, 1992).

En dépit de sa caractérisation à la surface d'un nombre certain de cellules, le récepteur de la lactotransferrine n'est cependant pas aussi bien décrit que celui de la sérotransferrine. En effet, seule sa masse moléculaire a été déterminée et sa glycosylation

partiellement étudiée : il s'agit d'une glycoprotéine de masse moléculaire 105 kDa renfermant des glycanes de type N-acétyllactosaminique (Leveugle, 1992).

En fait, l'étude biochimique du récepteur de la lactotransferrine s'est très rapidement révélée difficile du fait d'une part, des faibles quantités de protéine obtenues après purification sur une colonne d'anticorps anti-lactotransferrine et d'autre part, de la présence de protéines contaminantes dans les fractions purifiées. Il semblait donc important de cloner le gène codant ce récepteur, ceci afin de déterminer sa séquence et d'étudier son expression. Ce travail et plus précisément les études préliminaires au clonage (préparation de sondes, choix de la cellule de départ) nous ont été confiées.

Ainsi, nous avons tout d'abord, en collaboration avec le docteur Collard (Centre d'Economie Rurale, Marloie), immunisé une souris avec une fraction de récepteur soluble de la lactotransferrine humaine puis, après avoir effectué des manipulations de " western blot " sur les différents surnageants de culture d'hybridomes, nous avons sélectionné le clone produisant un anticorps dirigé contre cette glycoprotéine. Cet anticorps monoclonal, une fois ses conditions expérimentales déterminées, nous a permis de mettre au point une technique de purification du récepteur membranaire de la lactotransferrine humaine. En effet, l'obtention de récepteur pur constituait le facteur limitant de nombreuses études le concernant, dont son clonage, puisque malheureusement le criblage d'une banque d'ADNc avec un anticorps monoclonal ne donne que très rarement des résultats intéressants. Nous devons par conséquent préparer de nouvelles sondes, ce travail nécessitant la purification préalable du récepteur. Notre choix s'est porté sur des anticorps polyclonaux qui devaient nous permettre, en plus de leur application première à savoir le criblage d'une banque d'ADNc, d'étudier plus précisément le récepteur de la lactotransferrine humaine.

Ainsi, l'utilisation de ces anticorps polyclonaux, seule ou combinée avec celle de l'anticorps monoclonal, a permis d'une part, de révéler l'existence de récepteurs spécifiques de la lactotransferrine sur les neurones qui dégénèrent lors du développement

de la maladie de Parkinson et d'autre part, de réaliser un dosage ELISA de ces récepteurs dans différents lysats cellulaires.

Les anticorps polyclonaux préparés et leur monospécificité établie, nous avons ensuite recherché le type cellulaire à utiliser pour la construction de la banque d'ADNc. Notre recherche s'est plus particulièrement dirigée vers une lignée cellulaire proche des plaquettes, cellules présentant des quantités importantes de récepteur mais ne renfermant malheureusement que très peu de matériel génétique. Notre intérêt s'est donc porté sur la lignée mégacaryoblastique Dami. La fixation des anticorps monoclonal et polyclonaux anti-récepteur à la surface de ces cellules a montré que seule une population particulière exprimait le récepteur de la lactotransferrine humaine. Cette population a pu être isolée, ce qui nous a permis de mieux comprendre le mécanisme de maturation de ces cellules, de même que le profil d'apparition du récepteur de la lactotransferrine et des glycoprotéines GP Ib et GP IIb-IIIa à la surface cellulaire.

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

COMMUNICATIONS

1- Nillesse N., Benaissa M., Spik G. et Pierce A.

Characterization of the membrane receptor of human lactoferrin on the megakaryocyte Dami cell line.

European Iron Club, Londres, 16-18 septembre 1993.

2- Nillesse N., Pierce A., Benaissa, M. et Spik G.

Caractérisation du récepteur membranaire de la lactotransferrine humaine sur la lignée mégacaryoblastique Dami.

Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Congrès d'automne, Villepinte, 7-9 décembre 1993.

3- Faucheux B.A., Nillesse N., Spik G., Leveugle B., Hauw J.J., Agid Y. et Hirsch, E.C. Lactotransferrin and lactotransferrin receptor immunohistochemistry in the mesencephalon of control subjects and patients with parkinsons' disease. Society for Neuroscience, 1994 Annual Meeting, November 13-18 1994.

PUBLICATIONS

1- Bi B. Y., Leveugle B. Liu J. L., Collard A., Coppe P., Roche A. C., Nillesse N., Capron M., Spik G. et Mazurier J. (1994) Immunocolocalization of the lactoferrin receptor on the human T lymphoblastic cell line Jurkat. Eur. J. Cell. Biol. (sous presse)

2- Nillesse N., Pierce A., Lecocq M., Benaissa, M. et Spik G. Expression of the lactotransferrin receptor during megakaryocyte maturation. Blood (soumis à publication)

Généralités

LES TRANSFERRINES

I- UNE FAMILLE DE PROTEINES

Les transferrines sont des glycoprotéines monomériques rencontrées à la fois chez les vertébrés et les invertébrés et qui ont pour propriété de fixer un ou deux ion(s) ferrique(s). Elles assurent ainsi, en partie, le transport de ce métal et permettent sa répartition entre les formes de stockage (ferritine et hémosidérine) et les formes actives (hémoglobine, cytochromes et enzymes métallo-dépendantes).

Les transferrines forment une famille naturelle de protéines présentes à différents stades de l'évolution. Les membres de cette famille sont les suivants :

- l'ovotransferrine (conalbumine) isolée du blanc d'oeuf en 1944 par Schade et Caroline
- la sérotransferrine (sidérophiline) isolée du plasma humain en 1946 par Schade et Caroline
- la lactotransferrine (lactoferrine) isolée du lait de Femme en 1960 par Montreuil et Mullet et Montreuil *et al.*
- la mélanotransferrine (p97, antigène associé à une tumeur) isolée à la surface de mélanomes humains par Brown *et al.* en 1980, 1982

Au cours des chapitres suivants, nous nous intéresserons plus particulièrement à deux de ces protéines, la sérotransferrine et la lactotransferrine, avec tout d'abord une description de leur localisation et de leur production.

II- LOCALISATION ET PRODUCTION

A- La sérotransferrine

La sérotransferrine, principalement localisée dans le plasma à partir duquel elle est aujourd'hui purifiée en une seule étape chromatographique (Rivat *et al.*, 1992), est également présente dans d'autres milieux biologiques tels que le sperme (Irisawa *et al.*, 1993), le lait, le liquide amniotique et le liquide cérébro-spinal.

Le foie est le site privilégié de la synthèse de la sérotransferrine (Aisen, 1964) bien que d'autres tissus expriment également le gène de cette protéine. Il s'agit des cellules de Sertoli qui produisent la sérotransferrine *in vivo* (Skinner et Griswold, 1980) mais également *in vitro* (Foucault *et al.*, 1992), des oligodendrocytes (Bloch *et al.*, 1985; Morris *et al.*, 1992b), des astrocytes (Connor *et al.*, 1990), des cellules du plexus choroïdien (Dickson *et al.*, 1985), du cerebellum (Aldred *et al.*, 1987), des lymphocytes (Soltys et Brody, 1970) et plus particulièrement des lymphocytes T4 (Lum *et al.*, 1986), des macrophages (Phillips et Thorbecke, 1966) et des fibroblastes (Stecher et Thorbecke, 1967). De même, la sérotransferrine est synthétisée par le placenta et l'estomac et est produite en faible quantité par le coeur et le rein (Levin *et al.*, 1984; Aldred *et al.*, 1987) et en grande quantité par la glande mammaire lactante (Morgan, 1968).

B- La lactotransferrine

Après sa découverte dans le lait de Femme (Montreuil *et al.*, 1960), la présence de lactotransferrine fut démontrée dans d'autres milieux de sécrétion, d'abord par Biserte *et al.* en 1963, dans les sécrétions bronchiques, résultat confirmé en 1965 par Masson *et al.* qui identifièrent cette protéine dans la salive, les larmes, le liquide synovial, le plasma séminal, la bile et en petite quantité dans le plasma sanguin. En 1987, Cohen *et al.* ont également montré la présence de lactotransferrine dans le fluide vaginal.

Outre sa localisation dans les milieux de sécrétion et les fluides biologiques, la lactotransferrine a également été décrite dans certaines cellules et tissus humains. Ainsi, Masson *et al.* (1969) et Baggiolini *et al.* (1970) ont découvert de la lactotransferrine dans les granules secondaires des leucocytes polynucléaires, la lactotransferrine leucocytaire étant synthétisée au cours de la granulopoïèse du stade promyélocytaire au stade métamyélocytaire (Rado *et al.*, 1984). Elle diffère de la lactotransferrine isolée du lait par sa faible saturation en fer (Masson, 1970; Van Snick *et al.*, 1974) et par la structure de ses glycanes (voir chapitre VI). De même, des études immunohistologiques réalisées par Mason et Taylor en 1978 ont révélé l'existence de lactotransferrine dans la glande mammaire lactante, le tractus gastrointestinal et les bronches. En 1970, La lactotransferrine a également été identifiée dans l'endomètre (Tourville *et al.*) et en 1991, Luqmani *et al.* ont montré son expression dans des tissus sains ou malins de l'estomac. Enfin, une étude de sa distribution a également été réalisée dans la prostate humaine normale ou présentant une inflammation et elle a été mise en évidence, en quantité supérieure à la normale, dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Kawamata *et al.*, 1993) ou de désordres neurodégénératifs (Leveugle *et al.*, 1994) .

III- STRUCTURE PRIMAIRE

A- La sérotransferrine

En 1983, Mc Gillivray *et al.* ont élucidé la séquence primaire de la chaîne peptidique de la sérotransferrine humaine. Celle-ci renferme 679 acides aminés et consiste en deux lobes (acides aminés 1 à 336 et 337 à 679) présentant 42% d'homologie.

Cette séquence primaire a été confirmée lors de l'isolement et la caractérisation, à partir d'une banque de foie humain, de l'ADNc de la sérotransferrine (Yang *et al.*, 1984; Uzan *et al.*, 1984). D'autres sérotransferrines ont également été clonées. Il s'agit de la

sérotransferrine du porc (Baldwin et Weinstock, 1988), du xénope (Moskaitis *et al.*, 1990), du ver du tabac *Manduca sexta* (Bartfeld et Law, 1990), du lapin (Banfield *et al.*, 1991) du cafard *Blaberus discoidalis* (Jamroz *et al.*, 1993) et du cheval (Carpenter et Broad, 1993). Une séquence partielle de la sérotransferrine bovine a également été décrite (Gilmont *et al.*, 1990).

Nous verrons dans un chapitre ultérieur l'organisation des gènes codant ces sérotransferrines.

B- La lactotransferrine

La séquence primaire de la chaîne polypeptidique de la lactotransferrine, isolée du lait de femme, a été réalisée au laboratoire en collaboration avec le groupe du professeur Jollès (Metz-Boutigue *et al.*, 1984). Cette séquence a révélé l'existence de deux lobes présentant 37% d'homologie.

Le clonage partiel (Rado *et al.*, 1987) puis total (Anderson *et al.*, 1989) du cDNA de la lactotransferrine leucocytaire est venu confirmé l'enchaînement en acides aminés déterminé par Metz-Boutigue *et al.* en 1984. Plus récemment, la lactotransferrine isolée de la glande mammaire a été clonée (Powell et Ogden, 1990; Rey *et al.*, 1990) : les auteurs ont montré que cette protéine est monocaténaire et renferme 692 acides aminés.

D'autres lactotransferrines isolées, pour la plupart, de la glande mammaire de divers animaux ont été séquencées. Il s'agit de la lactotransferrine de vache (Pierce *et al.*, 1991a; Mead et Tweedie, 1990; Goodman et Schanbacher, 1991), de souris (Pentecost et Teng, 1987; Shirsat *et al.*, 1992) et de truie (Lydon *et al.*, 1992; Alexander *et al.*, 1992).

L'étude comparative des séquences en acides aminés des lactotransferrines d'origine diverse (Figure 1 p. 9) d'une part, et de la lactotransferrine et de la sérotransferrine humaines (Figure 2 p. 10) d'autre part, met en évidence une identité structurale entre ces

HLTF: RRRRSVQWCAVSIQPEATKCFQWQRNMKXVR..G	HLTF: QNLRKSEEEVAAARRARVVWCAVGEQEELRKCQWQW
BLTF: APRKNVRRWCTISQPEWFKCRRWQWRMK..KLGA	BLTF: KNLRRETAEEVVKARYTRVVWCAVGPPEEQKCKCQWQW
MLTF: AKATTVRRWCAVSNSEEEKCLRWKNEMR..KVG G	MLTF: QNLRNKKQQQDVIASAKARVWCAVGPPEEKRXKCRQW
PLTF: APKKGVRRWCAVISTAEYSKCRQWQSKIR..R..T	PLTF: QGLRRETAEEVEARQAQVWCAVGPPEELRKCQWQW
HLTF: P P V S C I K R D S P I Q C I Q A I A E N R A D A V T L D G G F I	HLTF: S G L S E G S V T C S S A S T T E D C I A L V L K G E A D A M S L
BLTF: P S I T C V R R A F A L E C I R A I A E K K A D A V T L D G G M V	BLTF: S Q Q S C Q N V T C A T A S T T D D C I V L V L K G E A D A L M L
MLTF: P P L S C V K K S S T R Q C I Q A I V T N R A D A M T L D G G T M	MLTF: N R D S R G R V T C I S F P T T E D C I V A I N K G D A D A M S L
PLTF: N P I F C I R R A S P T D C I R A I A A K R A D A V T L D G G L V	PLTF: S S Q S S Q N L M C S L A S T T E D C I V Q V L K G E A D A M S L
HLTF: Y E A G I A P Y K L R P V A A E V Y G T E R Q P R T H Y Y A V A V	HLTF: D G G Y V Y T A C K C G L V P V L A E N Y K S Q S S P P D P N C
BLTF: Y E A G T D P Y K L R P V A A E I Y G T K E S P Q T H Y Y A V A V	BLTF: D G G Y I Y T A G K C G L V P V L A E N R K S S K Y S . S L D C
MLTF: F D A S K P P Y K L R P V A A E V Y G T K E Q P R T H Y Y A V A V	MLTF: D G G Y I Y T A G K C G L V P V L A E N Q K S S K S N . G L D C
PLTF: F E A . . G Q Y K L R P V A A E I Y G T E E N P Q T Y Y A V A V	PLTF: D G G F I Y T A G K C G L V P V L A E N Q K S R Q S S . S S D C
HLTF: V K K G G S F Q L N E L Q G L K S C H T G L R R T A G W H V P T G	HLTF: V D R P V E G Y L A V A V V R R S D T S E L T W N S V K G K S C R H
BLTF: V K K G S N F Q L N D L Q G R K S C H T G L G R S A G W I P M G	BLTF: V L R P T E G Y L A V A V V K R A N E C L T W N S S L R K K S C H
MLTF: V K N S S N F H L N Q L Q G L R S C H T G I G R S A G W K I P I G	MLTF: V N R P V E G Y L A V A V V R R E D A G F T W N S L R G K K S C H
PLTF: V K K G F N F Q L N Q L Q G R K S C H I C L G R S A G W N I P I G	PLTF: V H R P T Q G Y F A V A V V R K A N G G I T W N S V R G T R S C H
HLTF: T L R P F L N M T G P P E P I E A A V A R F F S A S C V P G A D K	HLTF: T A V D R T A G W N I P N G L L F V M Q T G S C R F D E Y F S Q S C
BLTF: I L R P Y L S M T E S L E P P P G A V A K F F S A S C V P C I D R	BLTF: T A V D R T A G W N I P N G L I V N Q T G S C A F D E F F S Q S C
MLTF: T L R P Y L N W N G P P A S L E E A V S K F F S K S C V P G A Q K	MLTF: T A V D R T A G W N I P N G L L A V N Q T R S C R F D E F F S Q S C
PLTF: L L R R F L D W A G P P E P L Q K A V A K F F S Q S C V P C A D G	PLTF: T A V D R T A G W N I P N G L L V N Q T G S C R F D E F F S Q S C
HLTF: G Q F P N L C R L C A G T G E N K C A F S S Q E P Y F S Y S G A F	HLTF: A P G S D P R S N L C A L C I G D E Q G E N K C V P N S M E R Y Y
BLTF: Q A Y P N L C Q L C K G E G E N Q C A C S S R E P Y F G Y S G A F	BLTF: A P G R D P K S R L C A L C A G D D Q G L D K C V P N S K E K Y Y
MLTF: O R F P N L C S S C A G T G A M K C A S S P E P Y S G Y A G A L	MLTF: A P G A D P K S N L C A L C I G D E K G E M K C A P N S K E R Y Q
PLTF: N A Y P N L C Q L C I G K G K D K C A C S S Q E P Y F G Y S G A F	PLTF: A P G S Q P G S N L C A L C V G N D Q G V D R C V P N S M E R Y Y
HLTF: K C L R D G A G D V A F I R E S T V F E D L S D E A E R D E Y E L	HLTF: G Y T G A F R C L A E N A G D V A F V K D V T V L Q M T D G N M N
BLTF: K C L Q D G A G D V A F V K E T T V F E N L P E K A D R D O Y E L	BLTF: G Y T G A F R C L A E D V G D D V A F V K N D T V W E N T N G E S T
MLTF: R C L R D N A G D V A F T R G S T V F E E L P N K A E R D O Y K L	MLTF: G Y T G A L R C L A E R A G N V A F L K D S T V L Q M T D G K N T
PLTF: N C L H K G I G D V A F V K E S T V F E N L P Q K A D R D K Y E L	PLTF: G Y T G A F R C L A E N A G D V A F V K D V T V L D N T R G Q N T
HLTF: L C P D N T R K P V D K F R D C H L A R V P S H A V V A R S V M G	HLTF: E A W A K D L K L A D F A L L C L D G K R K P V T E A R S C H L A
BLTF: L C L N M S R A P V D A F R E C H L A Q V P S H A V V A R S V D G	BLTF: A D W A K M L N R E D F E L L C L D G T R K P V T E A Q S C H L A
MLTF: L C P D N T W K P V T E Y R E C H L A Q V P S H A V V A R S S T N D	MLTF: E E W A R N L K L K D F E L L C L D D T R K P V T E A K N C H L A
PLTF: L C P D N T R K P V E A F R E C H L A R V P S H A V V A R S V M G	PLTF: Q E W A R E L R S D D F E L L C L N G T R K P V T E A Q N C H L A
HLTF: K E D A I W N L L R Q A Q E K F G K D K S P K F Q L F G S P S G Q	HLTF: N A P N H A V V S R S H D K V E R L K Q V L L H Q Q A K F G R N G S
BLTF: K E D L I W K L L S K A Q E K F G K N K S R S F Q L F G S P P G Q	BLTF: V A P N H A V V S R S D R A A H V K Q V L L H Q Q A L F G X N G K
MLTF: K E E A I W E L L R Q S Q E K F G K Q A S G F Q L F G S P S G Q	MLTF: I A P N H A V V S R T D K V E V L Q Q V L L D Q V Q F G R N G Q
PLTF: K E N S I W S L L Y Q S Q E K F G K S N P Q E F Q L F G S P G Q Q	PLTF: V A P S H A V V S R K E K A A Q V E Q N L L T E Q A Q F G R Y G K
HLTF: K D L L F K D S A I G F S R V P P R I D S G L Y L G S G Y F T A I	HLTF: C D P D K F C L F Q S E T K N L L F N D N T E C L A R L H G K T T
BLTF: R D L L F K D S A L G F L R I P S K V D S A L Y L A S R Y L T T L	BLTF: N C P D K F C L F K S E T K N L L F N D N T E C L A K L G G R P T T
MLTF: K D L L K K E S A I G F V R V P Q K V D V G L Y L T F S Y T T S I	MLTF: R C P G E F C L F Q S K T K N L L F N D N T E C L A K I P G K T T
PLTF: K D L L F R D A T I G F L K I P S K I D S K L Y L G L P Y L T A I	PLTF: D C P D K F C L F R S E T K N L L F N D N T E C L A Q L G K T T
HLTF: Y E K Y L G P Q Y V A G I T N L K K C S T S P L L E A C E F L R K	HLTF: Y E K Y L G P Q Y V A G I T N L K K C S T S P L L E A C E F L R K
BLTF: Y E Y L G T E Y V T A I A N L K K C S T S P L L E A C A F L T R	BLTF: Y E Y L G T E Y V T A I A N L K K C S T S P L L E A C A F L T R
MLTF: S E K Y L G K F V V I A T E R L K Q C S S S P L L E A C A F L T Q	MLTF: S E K Y L G K F V V I A T E R L K Q C S S S P L L E A C A F L T Q
PLTF: Y E K Y L G S E Y V T A I A T	PLTF: Y E K Y L G S E Y V T A I A T

Figure 1 : Comparaison des séquences primaires des chaînes peptidiques des lactotransferrines d'origine diverse (HLTF : lactotransferrine humaine, BLTF : lactotransferrine bovine, MLTF : lactotransferrine murine, PLTF: lactotransferrine porcine) (Pierce *et al.*, 1991a; Lydon *et al.*, 1992)

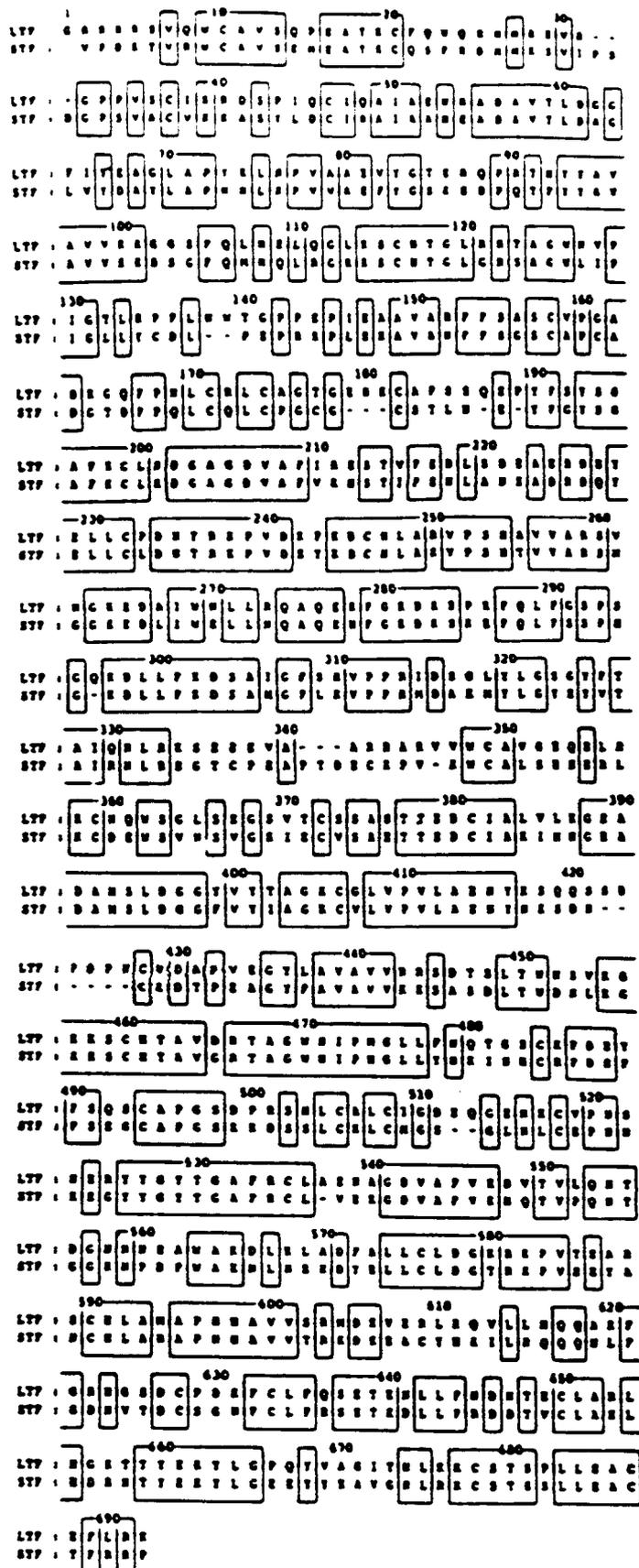


Figure 2 : Comparaison des séquences primaires des chaînes peptidiques de la lactotransferrine humaine (LTF) (Rey *et al.*, 1990) et de la sérotransferrine humaine (STF) (Mac Gillivray *et al.*, 1983)

protéines qui est respectivement de 60% (Pierce *et al.*, 1991a; Lydon *et al.*, 1992) et de 63-71% (Mazurier *et al.*, 1983; Metz-Boutigue *et al.*, 1984). Les valeurs exactes des pourcentages d'identité existant entre les transferrines d'origine diverse sont reportées dans le Tableau I p. 12.

L'organisation des gènes codant les différentes lactotransferrines sera abordée ultérieurement.

IV- ORGANISATION DE LA CHAÎNE POLYPEPTIDIQUE

La lactotransferrine et la sérotransferrine ont une masse moléculaire voisine de 80kDa. Ces deux transferrines possèdent une structure primaire très proche et leur organisation dans l'espace est similaire (Figure 3 p. 13). Ainsi, leur chaîne polypeptidique est formée de deux lobes (lobe N-terminal et lobe C-terminal) reliés par un petit peptide en hélice α (Legrand *et al.*, 1984; Bailey *et al.*, 1988; Anderson *et al.*, 1987 et 1989; Sarra *et al.*, 1990). Chaque lobe consiste en deux domaines (N1, N2 et C1, C2) présentant une crevasse interdomaine dans laquelle est localisée le site de fixation du fer.

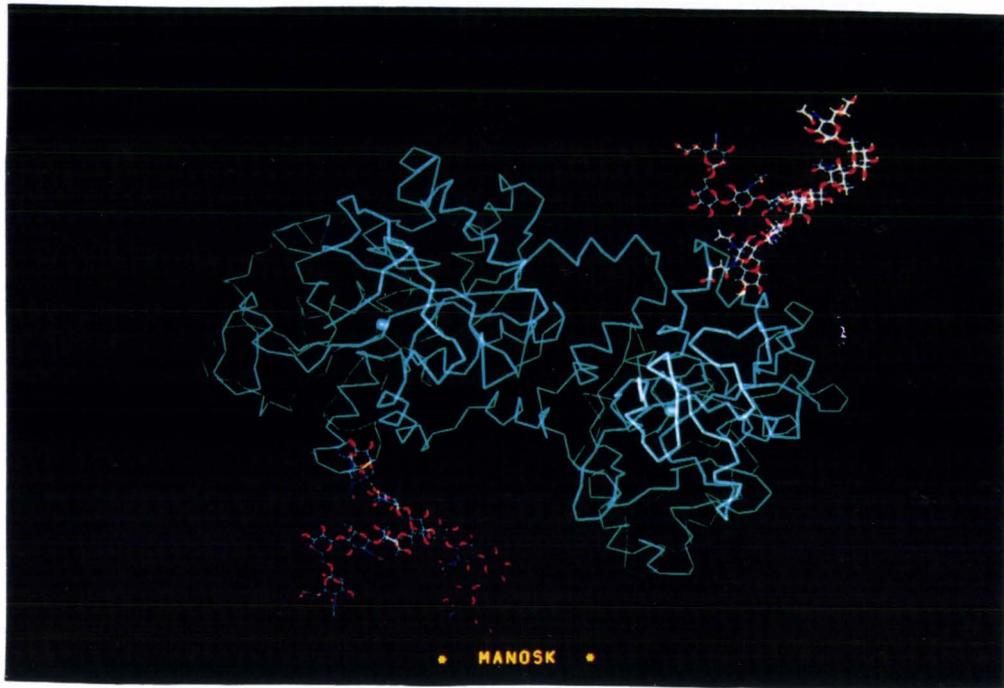
Ces deux transferrines ont récemment été étudiées par cristallisation et diffraction de rayons X afin de préciser les résultats obtenus précédemment lors d'études structurales, conformationnelles ou comparatives (Raman *et al.*, 1992; Bourne *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1992).

V- LES SITES DE FIXATION DU FER

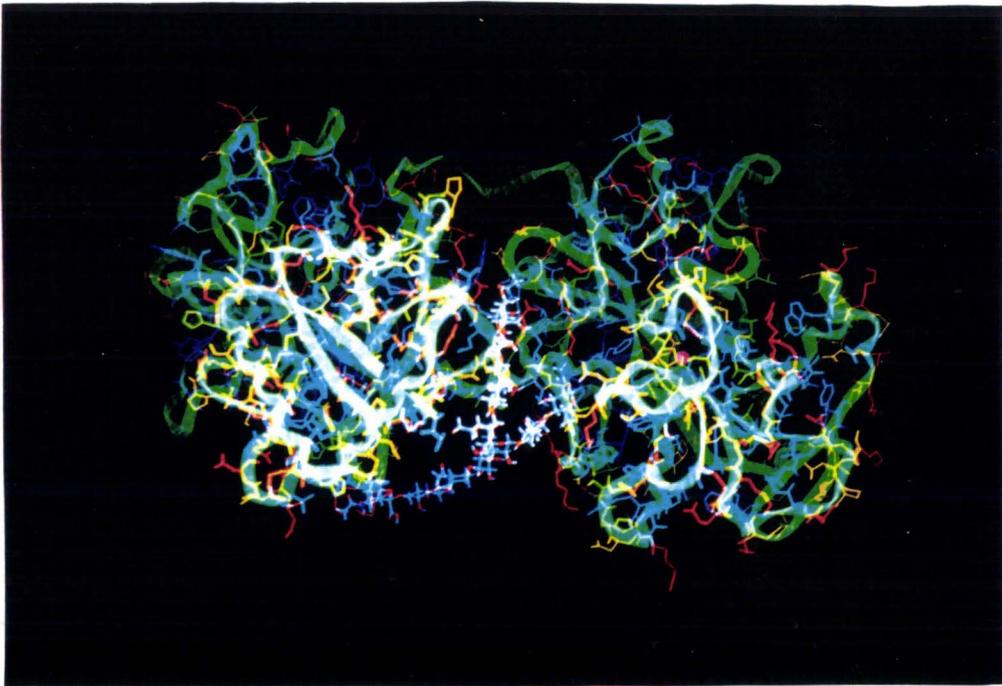
Les transferrines possèdent deux sites de fixation du fer. Cependant, la mélanotransferrine et la sérotransferrine de *Manduca sexta* n'ont qu'un seul de ces sites

Tableau I : Pourcentages d'identité existant entre les séquences primaires des chaînes peptidiques des différentes transferrines (HSTF : sérotransferrine équine , PSTF : sérotransferrine porcine , HSTF : sérotransferrine humaine, RSTF : sérotransferrine de lapin, HLTF : lactotransferrine humaine, MLTF : lactotransferrine murine, BLTF : lactotransferrine bovine, PLTF : lactotransferrine porcine, XLTF : lactotransferrine de xenope et HMTF : mélanotransferrine humaine) d'après Carpenter et Broad (1993)

	HSTF	PSTF	HSTF	RSTF	HLTF	MLTF	BLTF	PLTF	XLTF
PSTF	73,7								
HSTF	73,4	71,5							
RSTF	72,8	73,1	79,0						
HLTF	61,9	62,0	61,8	62,3					
MLTF	56,7	59,0	57,5	57,9	70,2				
BLTF	62,9	61,5	61,6	61,2	69,4	63,6			
PLTF	62,2	61,8	61,5	61,4	71,0	64,7	73,3		
XLTF	48,6	48,3	46,1	46,8	46,7	47,4	45,4	45,2	
HMTF	44,6	42,3	43,9	44,3	42,7	41,0	41,9	42,2	41,2



A



B

Figure 3 : Modélisations moléculaires de la lactotransferrine humaine (A) et de la sérotransferrine de lapin (B) réalisées d'après les données cristallographiques de Bailey *et al.* (1988) et d'Anderson *et al.* (1987, 1989).

fonctionnel : celui localisé dans le lobe N-terminal (Baker *et al.*, 1992; Baker et Lindley, 1992).

Au niveau de ces sites, le fer ferrique est directement coordonné à deux résidus de tyrosine, un résidu d'histidine et un résidu d'acide aspartique, et indirectement coordonné à un résidu d'arginine par l'intermédiaire d'un ion carbonate (Aisen et Listowsky, 1980; Anderson *et al.*, 1987 et 1989; Baker *et al.*, 1987; Legrand *et al.*, 1988).

Les résidus d'acides aminés impliqués dans la fixation du ligand sont identiques dans chacun des deux lobes :

- Asp 61, Tyr 93, Tyr 193, His 254 dans le lobe N-terminal
- Asp 396, Tyr 436, Tyr 509, His 578 dans le lobe C-terminal

(acides aminés de la lactotransferrine numérotés d'après Rey *et al.* (1990))

Des études de fixation du fer ou du gallium réalisées sur cinq mutants du domaine N-terminal de la sérotransferrine humaine, obtenus par mutagenèse dirigée, suggèrent que quelque soit l'ion métallique qui se fixe à la sérotransferrine, la fixation implique toujours deux résidus de tyrosine (Woodworth *et al.*, 1991). Il n'en est pas de même pour l'anion impliqué dans la fixation du fer. En effet, la lactotransferrine est capable de fixer un ion ferrique au niveau de son lobe C-terminal quand un ion oxalate remplace un ion carbonate (Shongwe *et al.*, 1992; Baker et Lindley, 1992). Comme le carbonate, l'oxalate se lie via un pont hydrogène à la chaîne latérale d'un résidu d'arginine, ce dernier étant proche d'un résidu de thréonine.

La fixation du fer sur les transferrines (sero, ovo et lacto) entraîne un changement dans la conformation de la protéine du à la fermeture du domaine, ce qui permettrait la reconnaissance de la transferrine par son récepteur (Grossman *et al.*, 1992 et 1993). Récemment, Lindley *et al.* (1993), travaillant sur un glycopeptide de 18 kDa issu du domaine N2 de l'ovotransferrine, ont précisé le mécanisme de prélèvement du fer par cette transferrine. Ainsi, lorsqu'un des lobes présente une configuration ouverte, un ion carbonate se fixe puis le fer ferrique vient se loger dans son site. Ces deux étapes sont

alors suivies de la fermeture du lobe dans laquelle le résidu d'acide aspartique joue un rôle clef en formant une liaison hydrogène interdomaine.

Les deux sites de fixation du fer des transferrines possèdent une forte affinité pour ce métal. Cependant sa libération est réalisée à un pH différent. Ainsi, le fer est libéré du site "acido-labile" (situé dans le lobe N-terminal) à pH 5,8 et du site "acido-stable" (situé dans le lobe C-terminal) à pH 4,8 dans le cas de la sérotransferrine (Princiotta et Zapolski, 1975) et à pH 4 dans le cas de la lactotransferrine (Mazurier et Spik, 1980). Cette différence de stabilité peut s'expliquer par la présence d'un plus grand nombre de ponts disulfure dans le lobe C-terminal d'où une structure plus compacte (Mazurier *et al.*, 1981; Baker *et al.*, 1987; Anderson *et al.*, 1989). De plus, le site de fixation situé dans le lobe C-terminal est moins accessible pour le fer (Anderson *et al.*, 1987; Norris *et al.*, 1989).

Les sites de fixation du fer sont identiques dans la sérotransferrine et la lactotransferrine, cependant cette dernière possède à pH 6,4 une affinité 260 fois supérieure pour le fer (Aisen et Liebman, 1971). De même, la lactotransferrine conserve bien son fer à pH acide (Montreuil *et al.*, 1960) alors que la sérotransferrine libère son fer à pH 5,5. En effet, il faut atteindre un pH voisin de 2,5 pour désaturer complètement la lactotransferrine humaine. Une étude récente a montré que la difficulté à désaturer la lactotransferrine est liée à la présence d'interactions stabilisantes entre les lobes N et C de cette protéine, ces interactions n'étant, semble-t-il, pas les mêmes dans la sérotransferrine (Day *et al.*, 1992).

Les différentes formes de transferrine (apo, mono et diférique) peuvent être séparées par chromatographie liquide haute performance (Makino et Kawanishi, 1991; Makino et Nishimura, 1992). De même, une isoélectrofocalisation réalisée à l'aide du Phastsystem (Pharmacia) permet de séparer les quatre formes de sérotransferrine : aposérotransferrine, sérotransferrine avec un fer ferrique dans le lobe C-terminal, sérotransferrine avec un fer ferrique dans le lobe N-terminal et sérotransferrine diférique (Van Eijk et Van Noort, 1992).

Les transferrines peuvent fixer d'autres ions que le fer ferrique : ainsi elles fixent Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{3+} , Ga^{3+} , Er^{3+} , Al^{3+} , Tb^{3+} , Eu^{3+} et Gd^{3+} à raison de deux ions par molécule de transferrine et Nd^{3+} et Pr^{3+} à raison d'un ion unique (Luk, 1971). Dans la lactotransferrine dicuprique récemment cristallisée (Smith *et al.*, 1992), un ion oxalate peut, comme dans la lactotransferrine diferrique, se substituer à un ion carbonate (Baker *et al.*, 1991). Cette substitution est réalisée grâce aux petits déplacements accomplis par les chaînes latérales des acides aminés présents dans le site de fixation.

VI- LES GLYCANNES DES TRANSFERRINES

Les études réalisées au laboratoire depuis une vingtaine d'années, ont permis notamment de préciser la structure des glycanes de la sérotransferrine et de la lactotransferrine humaines (Spik *et al.*, 1988).

A- La sérotransferrine

Elle possède deux glycanes de type N-acétyllactosaminique localisés dans le lobe C-terminal (Mazurier *et al.*, 1983b; Mc Gillivray *et al.*, 1983). Ces glycanes sont bi- (Spik *et al.*, 1975; Dorland *et al.*, 1977), tri- (Debruyne *et al.*, 1984; Spik *et al.*, 1985b) ou tétra-antennés (März *et al.*, 1982; Spik *et al.*, 1985a). Ils sont représentés dans la Figure 4 p. 17.

Trois variants glycaniques ont été isolés (Wong *et al.*, 1978; Debruyne *et al.*, 1984; Campion *et al.*, 1989) :

- le variant I renferme deux glycanes triantennés
- le variant II renferme un glycanne triantenné et un glycanne biantenné
- le variant III, majoritaire, renferme deux glycanes biantennés.

Ces variants possèdent 4, 5 ou 6 résidus d'acide sialique et peuvent être séparés par isoélectrofocalisation en gradient de pH (De Jong *et al.*, 1992).

Le taux de variant I et II augmente dans certains cas pathologiques comme les affections hépatiques (Debruyne *et al.*, 1984) et dans des conditions particulières comme la gestation (Léger *et al.*, 1989).

Récemment, des études ont été réalisées sur la fraction glycanique de la sérotransferrine sécrétée par des cellules d'hépatocarcinome humain (les cellules HepG2) et elles ont montré que :

- d'une part il existe une altération de la glycosylation de la sérotransferrine sécrétée par des cellules confluentes et subconfluentes, cette altération étant liée à une régulation de l'activité de la N-acétylglucosaminyltransférase V (Hahn et Goochee, 1992)

- et d'autre part, la répartition des glycovariants dépend des conditions de culture cellulaire (Jacquinot, 1992).

Les structures primaires des glycanes des sérotransferrines de cheval et de rat ont également été déterminées.

Concernant la sérotransferrine de cheval, trois variants ont été isolés: Tf2a, Tf4b et Tf5b (Coddeville *et al.*, 1989). Le premier variant ne contient qu'un seul glycanne alors que les deux autres renferment deux glycanes. Les deux glycanes du variant Tf5b sont, comme dans la sérotransferrine humaine, de type N-acétyllactosaminique bi-antennés et sialylés. Dans les deux autres variants, en plus de cette structure, deux isomères bi-antennés de type N-acétyllactosaminique ont été identifiés. Ils sont sialylés par un résidu d'acide N-acétyl neuraminique et un résidu d'acide N-acétyl 4-O-acétylneuraminique localisés sur les résidus de galactose en position 6 et 6'. De même, une structure bi-antennée de type N-acétyllactosaminique substituée par deux résidus d'acide N-acétyl 4-O-acétylneuraminique a été déterminée chez les variants Tf2a et Tf4b.

La sérotransferrine de rat possède également trois variants glycaniques renfermant toujours un noyau central trimannosyl-N-N'-diacétylchitobiose, substitué ou non par un résidu de fucose en α 1,6 sur le résidu de N-acétyl glucosamine du point d'attache, mais

présentant une affinité variable pour la concanavaline A (Con A) (Spik *et al.*, 1991). Ainsi, le variant r-Tf1 est non retenu sur la colonne de Con A-sépharose, le variant r-Tf2 est retardé et le variant r-Tf3 est retenu. r-Tf3 renferme un glycanne bi-antenné sialylé de type N-acétyllactosaminique. Dans les deux autres variants, l'antenne liée par le résidu de mannose en (α 1,3) a la séquence suivante : Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-3)[Neu5Ac(α 2-6)]GlcNAc(β 1-2)Man et l'antenne liée par le résidu de mannose en (α 1,6) de r-Tf2 présente l'enchaînement suivant : Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-2)Man. Récemment, Hu *et al.* (1992) ont montré que le foie de rat perfusé est capable de produire tous ces variants glycaniques.

Les résultats décrits ci-dessus indiquent que contrairement à la sérotransferrine humaine les sérotransferrines de cheval et de rat ne renferment pas de glycannes tri- ou tétra-antennés.

B- La lactotransferrine

La lactotransferrine isolée du lait de Femme présente deux glycannes localisés dans les domaines N2 et C2. Ces glycannes sont de type N-acétyllactosaminique (Figure 5 p. 20) mono ou disialylés et fucosylés (Spik *et al.*, 1982). Les résidus de fucose sont branchés en (α 1,6) sur la N-acétylglucosamine du point d'attache ou en (α 1,3) sur la N-acétylglucosamine 5' de l'antenne. Des structures polyfucosylées ont également été détectées en faible quantité (Matsumoto *et al.*, 1982). La lactotransferrine leucocytaire diffère de la précédente par l'absence totale de résidus de fucose (Derisbourg *et al.*, 1990).

La structure primaire des glycannes de la lactotransferrine bovine a également été déterminée (Spik *et al.*, 1985a; Coddeville *et al.*, 1992). Elle a révélé, comme pour les sérotransferrines et lactotransferrine précédentes, une certaine hétérogénéité puisque trois fractions sont obtenues après passage sur une colonne de Con A-Sépharose : fractions A (faiblement retenue), B (retenue) et C (fortement retenue). La fraction B

renferme une structure particulière avec la séquence Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2) branchée sur le résidu de mannose en (α 1,6) et la séquence GalNAc(β 1-4)GlcNAc(β 1-2) substituée ou non sur le résidu de N-acétyl galactosamine par un résidu d'acide N-acétyl neuraminique en (α 2,6) et branchée sur le résidu de mannose en (α 1,3). En outre, des glycanes de type oligomannosidiques ont été caractérisés (Van Halbeek *et al.*, 1981).

C- Conclusion

Une étude comparative de la structure primaire des glycanes des sérotransférines et lactotransférines conduit à la conclusion suivante: les glycanes des transférines sont spécifiques de chaque transferrine (séro ou lacto) et pour une transferrine donnée, il existe une spécificité d'espèce (Spik *et al.*, 1985a et 1988).

De même, les sérotransferrine et lactotransferrine humaines renferment deux glycanes de type N-acétyllactosaminique mais d'autres transférines, comme les sérotransférines de rat et de cheval, présentent des variants ne renfermant qu'un seul glycanne.

Enfin, la position ainsi que le nombre de sites possibles de N-glycosylation sont variables d'une transferrine à l'autre. Ainsi, la lactotransferrine humaine possède 4 sites potentiels de N-glycosylation (1 dans le lobe N-terminal et 3 dans le lobe C-terminal) mais seuls deux de ces sites sont glycosylés (1 dans chaque lobe). La sérotransferrine humaine, quant à elle, ne présente que deux sites de N-glycosylation (2 sites dans le lobe C-terminal) mais ils sont tous les deux glycosylés (Metz-Boutigue *et al.*, 1984). De même, la lactotransferrine de vache renferme 5 sites potentiels de N-glycosylation (Pierce *et al.*, 1991a) dont 4 sont glycosylés (1 dans le lobe N-terminal et 3 dans le lobe C-terminal) (Pierce *et al.*, 1991b). Enfin, les autres transférines, excepté celle de xénope, possèdent des sites potentiels de N-glycosylation dont le nombre ainsi que la position sont variables :

- lactotransferrine porcine (Alexander *et al.*, 1992) : 2 sites dans le lobe C-terminal

- lactotransferrine murine (Pentecost et Teng, 1987) : 2 sites dans le lobe N-terminal et 1 site dans le lobe C-terminal
- sérotransferrine de cheval (Carpenter et Broad, 1993) : 2 sites dans le lobe C-terminal

VII- LES GENES DES TRANSFERRINES

A- La sérotransferrine

Le gène codant la sérotransferrine comporte 17 exons séparés par 16 introns. Quatorze de ces exons constituent sept paires homologues codant les régions N- et C-terminales de la protéine. Le premier exon code le peptide signal nécessaire à la sécrétion de la sérotransferrine alors que les deux derniers codent une séquence trouvée uniquement dans le lobe C-terminal.

Les arrangements exon-intron sont homologues dans les deux parties de la molécule. Ceci permet d'affirmer que la sérotransferrine provient de la duplication d'un gène unique, cet évènement ayant eu lieu il y a environ 500 millions d'années (Park *et al.*, 1985; Bowman *et al.*, 1988), avant que les lignées de mammifères et d'oiseaux divergent (Baldwin, 1993).

Pendant l'évolution, il y a donc eu élongation du gène de la sérotransferrine par duplication intragénique mais aussi par augmentation de la taille des introns. En effet, les régions codantes des gènes de la sérotransferrine et de l'ovotransferrine ont une longueur de 2,3 kb mais le gène proprement dit de la sérotransferrine de mammifère fait 33,5 kb de long alors que celui de l'ovotransferrine ne mesure que 10,5 kb. Cette différence est due à une expansion significative des introns 2, 9, 13, 14 et 16 de la sérotransferrine de mammifère (Schaeffer *et al.*, 1985).

Le gène de la sérotransferrine humaine a été localisé, par hybridation *in situ*, sur le chromosome 3 aux loci q21-q25 (Yang *et al.*, 1984).

L'enhancer de ce gène a également été étudié (Boissier *et al.*, 1991). Il est situé 3,3 à

3,6 kb en amont du site d'initiation de la transcription et il est composé de deux domaines structuraux et fonctionnels distincts : le domaine A (nucléotide 1 à 86) et le domaine B (nucléotide 87 à 291).

B- La lactotransferrine

Le gène de la lactotransferrine humaine a été localisé sur le chromosome 3 aux loci q21-q23 (Teng *et al.*, 1987; Mc Combs *et al.*, 1988). Néanmoins sa structure n'est pas bien définie. En effet, seul le promoteur a été étudié dans les cellules HL60. Ces cellules n'expriment pas la lactotransferrine bien que la région 5' du gène (incluant le promoteur) soit normale. Il y a donc absence de transcription du gène codant la lactotransferrine humaine dans les cellules HL60 (Johnston *et al.*, 1992).

Le gène de la lactotransferrine de souris a, quant à lui, été bien caractérisé. Il est localisé sur le chromosome 9 (Teng *et al.*, 1987) et fait 30 kb de long. Il est présent à l'état d'un gène unique et est organisé en 17 exons, de taille comprise entre 48 et 190 pb, séparés par 16 introns mesurant de 0,2 à 4,3 kb.

L'analyse structurale de ce gène met en évidence un modèle de distribution exon-intron similaire à ceux trouvés dans la sérotransferrine humaine et l'ovotransferrine (Cunningham *et al.*, 1992).

La région 5' flanquante du gène de la lactotransferrine de souris a également été isolée. Elle renferme une séquence TATA, deux séquences CAAT, trois séquences GC, une région riche en AC ainsi qu'une séquence consensus répondant à une stimulation par les oestrogènes (Liu et Teng, 1991). Ce système de régulation de l'expression par les oestrogènes sera étudié dans le chapitre suivant.

VIII- REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES DES TRANSFERRINES

A- La sérotransferrine

Le gène de la sérotransferrine est soumis à plusieurs types de régulation. Ainsi, son expression est tissu-spécifique, contrôlée au cours du développement et régulée par le fer et par certaines hormones.

1- Régulation au cours du développement

En 1981, Dybkaer *et al.* ont montré que le taux de sérotransferrine plasmatique diminue avec l'âge chez les adultes en bonne santé. De même, la capacité totale à fixer le fer, qui reflète la concentration en sérotransferrine, diminue elle aussi significativement avec l'âge (Powell et Thomas, 1969).

Ces études ont conduit Markus (1989) à penser que la modification âge-dépendante de l'expression du gène de la sérotransferrine humaine et la diminution de la capacité de synthèse de cette protéine sont à la base d'une incapacité à produire suffisamment de sérotransferrine en cas de déficit en fer.

Afin d'étudier ce changement dans l'expression du gène de la sérotransferrine humaine, des souris transgéniques ont été utilisées. Ainsi, la région 5' régulatrice du gène de la sérotransferrine a été fusionnée avec le gène rapporteur bactérien codant la chloramphénicol acétyl-transférase et la fusion a été introduite dans le génôme de plusieurs souris. Le gène chimère est exprimé dans les mêmes tissus que la sérotransferrine de souris : dans le cerveau entre les jours 5 et 10 (après la naissance) et dans le foie entre les jours 10 et 20 (Lu *et al.*, 1992). Chez les souris transgéniques âgées, il y a diminution de 40% de l'expression dans le foie, du gène chimère, entre le dix-huitième et le vingt-sixième mois. Ce phénomène n'est pas observé pour la sérotransferrine endogène de souris dont le taux, au contraire, augmente

significativement au cours de la vieillesse (Adrian *et al.*, 1992) d'où une régulation au cours du développement différente pour les sérotransferrines humaine et murine.

2- Spécificité tissulaire de l'expression du gène de la sérotransferrine

La sérotransferrine humaine est synthétisée en quantité importante par le foie (Aisen, 1964) et en quantité moindre par le cerveau (Aldred *et al.*, 1987) et les testicules (Skinner et Griswold, 1980). La région 5' du gène de la sérotransferrine a donc été étudiée afin de déterminer quels éléments interviennent au niveau de la transcription dans cette régulation tissu-spécifique.

Ainsi, des expériences d'expression stable ou transitoire ont été réalisées dans les cellules HepG2 et Hep3B avec des mutants délétés dans la région 5' du gène de la sérotransferrine (Schaeffer *et al.*, 1989).

Quatre régions impliquées dans la régulation de la transcription ont été identifiées :

- Un promoteur tissu-spécifique localisé entre les nucléotides -125 à -45
- Une région promotrice distale (-620 à -125) qui régule l'activité du promoteur proximal
- Une région de régulation négative (nucléotide -1000 à -620) de la transcription à partir du promoteur
- Un enhancer localisé entre les nucléotides -3600 à -3300

De même, Adrian *et al.* (1990) ont montré que l'insertion d'un gène chimère (séquence -622 à -152 du gène de la sérotransferrine- gène cat) dans des souris permettent d'obtenir une expression mille fois plus importante du gène de la sérotransferrine dans le cerveau et dans le foie.

En 1988, Brunel *et al.* ont mis en évidence, sur le promoteur tissu-spécifique, deux sites de fixation pour des protéines. Ces deux sites nommés PRI (région proximale) et PRII sont respectivement localisés entre les nucléotides -76 à -52 et -102 à -83 (Figure 6

p. 32). Ils sont tous les deux nécessaires à l'obtention d'une expression spécifique dans le foie. Les facteurs qui interagissent avec ces deux sites sont respectivement :

- une protéine, nommée PYBP spécifique des séquences d'ADN simple-brin riches en bases pyrimidiques (Gil *et al.*, 1991) ou le facteur de transcription HNF4 (Petropoulos et Zakin, 1993)

- une protéine appartenant à la famille C/EBP des facteurs nucléaires (Cao *et al.*, 1991).

De même, Augé-Gouillou *et al.* (1993) ont montré que certains facteurs, interagissant avec l'enhancer et non le promoteur du gène de la sérotransferrine humaine, interviennent dans la régulation de l'expression de cette protéine dans le foie. Il en est ainsi pour le facteur de transcription HNF3 α qui se fixe au domaine A de l'enhancer du gène de la sérotransferrine. De même, la fixation de deux autres facteurs (EBP-40 et EBP-45), issus d'extraits nucléaires du foie, sur la séquence 5' TGTTTGCTTT 3' présente dans le domaine A permet la transcription *in vitro* du gène de la sérotransferrine, le domaine A étant nécessairement associé à une séquence TATA (Petropoulos *et al.*, 1991).

Dans les cellules de Sertoli, la fixation d'un facteur sur la séquence TATA située entre les nucléotides -34 et -18 est suffisante pour initier le niveau de base de la transcription du gène de la sérotransferrine. Une expression efficace est atteinte quand deux facteurs se fixent sur les sites situés entre -102 et -83 et entre -76 et -52 . L'addition d'un troisième élément adjacent diminue l'activité du promoteur, suggérant que la balance de trois facteurs se fixant sur les sites proximaux régule l'expression de la sérotransferrine dans les testicules (Guillou *et al.*, 1991).

3- Modulation par le fer

Chez le Poulet, un déficit en fer est à l'origine d'une augmentation de la transcription, dans le foie, du gène de la sérotransferrine (Mc Knight *et al.*, 1980). Ce phénomène est également décrit chez le Rat dans une moindre mesure par Idzerda *et al.* (1986) mais est

contesté par Tuil *et al.* (1985) pour qui l'expression dans le foie de la sérotransferrine de rat est constitutive.

La régulation par le fer du gène de la sérotransferrine humaine a été étudiée *in vivo* à l'aide de souris transgéniques (Adrian *et al.*, 1990). Ainsi, la région 5' (de taille variable) du gène de la sérotransferrine a été fusionnée avec le gène *cat* et introduite dans le génôme de plusieurs souris afin de mesurer l'activité CAT, régulée par la région 5' du gène de la sérotransferrine humaine. L'administration de fer à ces animaux entraîne une diminution de l'activité chloramphénicol acétyl-transférase chez les souris possédant la séquence comprise entre -0,622 et +0,046 kb ainsi qu'une chute du taux de la sérotransferrine plasmatique de souris. Il existe donc un système de régulation par le fer identique pour les sérotransferrines humaine et murine.

Récemment, Cox et Adrian (1993) ont précisé ce système de régulation. En effet, ces auteurs ont mis en évidence un complexe protéine-ARN de la sérotransferrine qui migre électrophorétiquement avec la même mobilité que le complexe IRE-BP (Iron Responsive Element-Binding Protein)-IRE de la ferritine et ils ont ainsi montré que la sérotransferrine, comme la ferritine, est régulée par le fer au cours de la traduction.

4- Régulation par les hormones et autres facteurs

a- Dans le foie

Dès 1980, Mc Knight *et al.* ont mis en évidence une augmentation de la transcription du gène de la sérotransferrine ainsi qu'une augmentation de la synthèse de cette protéine dans le foie de poulet lorsque ces animaux sont traités avec des hormones stéroïdiennes. Il est intéressant de noter que cette même régulation est obtenue avec des souris transgéniques chez lesquelles la sérotransferrine de poulet est exprimée (Hammer *et al.*, 1986).

A l'inverse, la sérotransferrine de rat ne semble pas sujette à une régulation par des stéroïdes (Tuil *et al.*, 1985). En effet, seul le glucagon et son second messenger, l'AMPc, ont un effet transitoire sur l'expression de cette sérotransferrine. Cependant, l'inhibition de la transcription observée est brève comparée à la demi-vie du mRNA de la sérotransferrine (Kahn *et al.*, 1987). Ce phénomène n'a donc semble-t-il pas un rôle physiologique significatif.

Plus récemment, la sérotransferrine humaine sécrétée par les cellules Hep3B a été étudiée (Hsu *et al.*, 1992). Celle-ci est régulée au niveau de la transcription par l'acide rétinoïque de manière dose dépendante. Ainsi, l'addition de 10 μ M d'acide rétinoïque dans le milieu de culture des cellules Hep3B pendant 48h conduit à une multiplication :

- par 8 de la synthèse de sérotransferrine
- par 10 du niveau d'ARNm stables de la sérotransferrine
- par 5 de la vitesse de transcription

Le cycloheximide et l'actinomycine D bloquent l'action de l'acide rétinoïque, suggérant que ce dernier régule indirectement l'expression du gène de la sérotransferrine dans les cellules de foie humain.

b- Dans les cellules de Sertoli

Le rétinol, l'insuline ainsi que l'hormone de stimulation du follicule (FSH) stimulent à la fois la synthèse de messagers et la sécrétion de sérotransferrine dans les cellules de Sertoli de rat (Skinner *et al.*, 1989). Un maximum de stimulation est atteint avec l'utilisation combinée de ces trois effecteurs et pour ces mêmes auteurs, la testostérone n'a semble-t-il aucun effet significatif. A l'inverse, Karzai et Wright (1992) ont montré qu'un mélange de FSH, rétinol et testostérone augmente de 30% la synthèse de sérotransferrine dans les cellules de Sertoli de rats matures et que cette stimulation est indépendante de l'effet de l'EGF et l'insuline. En dépit de ces résultats contradictoires, il est cependant possible de dire que la régulation de l'expression du gène de la

sérotransferrine dans les testicules de rat nécessite l'effet combiné de l'AMPc et d'autres signaux de transduction. En effet, l'action du FSH sur la fonction et la différenciation des cellules de sertoli est médiée par une augmentation de la quantité d'AMPc.

c- Dans les astrocytes

Dans les astrocytes de rat en culture, le taux d'ARNm de la sérotransferrine est diminué lors d'un traitement à l'hydrocortisone, suggérant que cette hormone est un régulateur physiologique *in vivo* (Espinosa de los monteros *et al.*, 1990).

Dans les cultures primaires de cellules épithéliales de plexus choroïdien de rat, des traitements avec des analogues de l'AMPc diminue la synthèse ainsi que la sécrétion de sérotransferrine dans le milieu. Au contraire, la sérotonine augmente cette synthèse et cette sécrétion ainsi que la production des messagers (Tsutsumi *et al.*, 1989).

Ces résultats suggèrent que la production et la sécrétion de la sérotransferrine dans le système nerveux central sont régulées par les hormones et les neurotransmetteurs.

B- La lactotransferrine

La moelle osseuse, la glande mammaire et l'utérus produisent la majeure partie de la lactotransferrine trouvée dans l'organisme. Néanmoins cette production est régulée différemment suivant l'organe impliqué. Ainsi, l'expression de la lactotransferrine dans les neutrophiles matures est réalisée au cours du processus de différenciation terminale alors que dans les glandes mammaires lactantes et les organes femelles de la reproduction, cette expression est sous le contrôle d'hormones.

1- Régulation au cours de la différenciation

Afin de déterminer à quel stade commence la synthèse de la lactotransferrine

leucocytaire, Rado *et al.* (1987) ont recherché la présence de messagers codant cette protéine dans les lignées leucémiques HL60 (promyélocyte) et PLB-985 (myéloblaste) et dans les cellules issues de prélèvements sanguins réalisés sur des patients atteints de leucémie touchant les différents stades de différenciation de la lignée granulocytaire. A cet effet, ces auteurs disposaient d'une sonde ADNc codant la lactotransferrine humaine. Les résultats de cette étude ont montré que les ARNm de la lactotransferrine ne sont détectables chez ces patients qu'au stade granulocyte. La lignée PLB-985 est cependant incapable de produire ces messagers dans les conditions qui lui permettent d'acquérir les caractères morphologiques des granulocytes. La différenciation en granulocytes de ces cellules est donc incomplète et la lactotransferrine jouerait un rôle dans le programme génétique conduisant à un granulocyte normal mature.

Le taux d'ARNm de la lactotransferrine humaine a également été mesuré chez des patients atteints d'une maladie congénitale rare : le déficit en granules spécifiques des neutrophiles (Lomax *et al.*, 1989). Ces personnes présentent un taux très faible de messagers de la lactotransferrine dans leur moelle osseuse alors que celui-ci est normal dans leur tissu lacrymal. Cette diminution suggère l'existence d'une anomalie survenant au cours de la transcription de l'ADN codant la lactotransferrine humaine.

Plus récemment enfin, la régulation du gène de la lactotransferrine a été étudiée sur la lignée murine 32D C13. Celle-ci, lorsqu'elle est exposée au G-CSF se différencie en granulocyte mature et présente une expression plus importante du gène de la lactotransferrine (Valtieri *et al.*, 1987). Friedman *et al.* (1991) ont montré que cette lignée lors de la différenciation myéloïde terminale présente une vitesse d'initiation de la transcription du gène de la lactotransferrine multipliée par 9. Cependant, il n'y a pas correspondance entre cette vitesse et la quantité de messagers qui s'accumulent. Il semble donc que l'accumulation des ARNm de la lactotransferrine est à la fois sous le contrôle de mécanismes transcriptionnel et post-transcriptionnel.

2- Régulation par les hormones

En 1986, Teng *et al.* ont purifié, à partir de cellules utérines de souris stimulées par des oestrogènes, une glycoprotéine de masse moléculaire voisine de 70kDa. Un an plus tard, ils ont montré que cette glycoprotéine était la lactotransferrine et qu'elle constituait la protéine majeure produite par des cellules utérines de souris soumises aux oestrogènes (Pentecost et Teng, 1987). En effet, la lactotransferrine est induite par ces hormones de manière dose et temps-dépendant dans l'utérus de souris immature (Teng *et al.*, 1989).

La caractérisation du promoteur du gène codant la lactotransferrine de souris (Liu et Teng, 1991) a mis en évidence la séquence consensus ERE (Figure 7 p. 32) de réponse aux oestrogènes (5' GGTCANNNTGACC 3'). Elle est localisée entre les nucléotides -341 et -329 et elle chevauche une séquence COUP ressemblant à un élément normalement situé en amont du promoteur du gène de l'ovalbumine de poulet (Liu et Teng, 1992), ce dernier étant, lui aussi, stimulé par les hormones stéroïdiennes (Gaub *et al.*, 1990).

L'élément COUP est localisé entre les nucléotides -349 et -337 en amont du promoteur du gène de la lactotransferrine de souris. L'élément COUP/ERE qui interagit soit avec le récepteur des oestrogènes, soit avec le facteur de transcription de l'ovalbumine de poulet a été appelé module de réponse aux oestrogènes du gène de la lactotransferrine de souris (mERM). Récemment, Liu *et al.* (1993) ont montré que le facteur de transcription du gène de l'ovalbumine de poulet réprime la réponse du module mERM à une stimulation par les oestrogènes. Le mécanisme moléculaire de cette répression est dû à la compétition entre le facteur de transcription et le récepteur des oestrogènes qui se fixent sur des sites de contact identiques dans la région de chevauchement du module mERM. Le facteur de transcription faisant lui-aussi parti de la super famille des récepteurs des hormones thyroïdiennes/stéroïdiennes, l'expression de la lactotransferrine de souris est donc modulée par deux membres de cette famille qui agissent de concert.

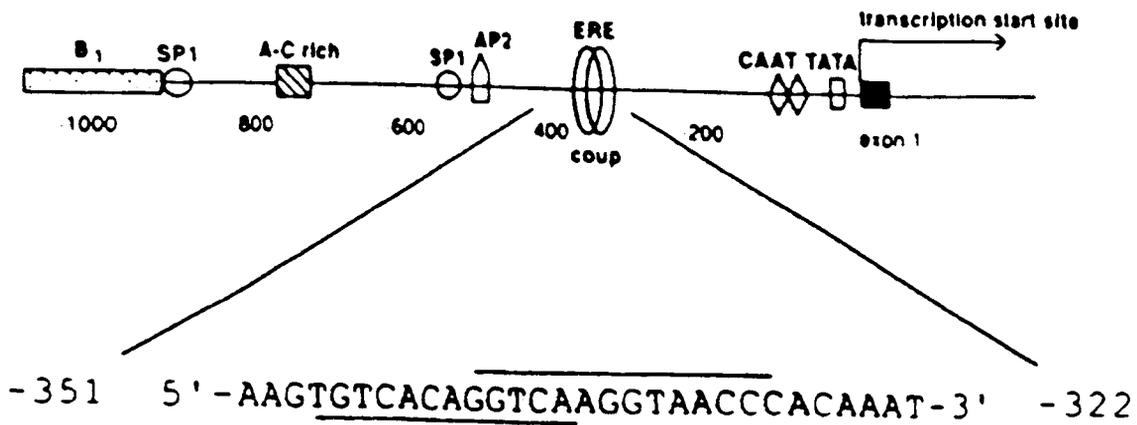


Figure 7 : Représentation schématique des éléments régulateurs putatifs de la région 5' flanquante du gène de la lactotransferrine de souris (Liu et Teng, 1992)

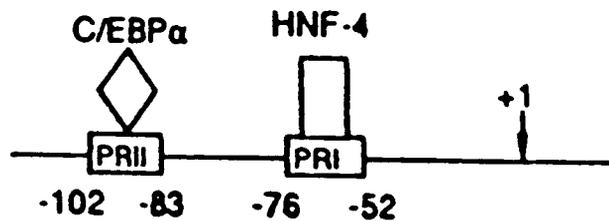


Figure 6 : Organisation du promoteur du gène de la sérotransferrine dans les hépatocytes (Brunel et al., 1988)

Le mécanisme de régulation par les oestrogènes du gène de la lactotransferrine humaine a également été étudié (Teng *et al.*, 1992) et une séquence imparfaite ERE a été mise en évidence. L'élément COUP/ERE agit toujours comme un enhancer en réponse à une stimulation par les oestrogènes mais il n'interagit pas avec le facteur de transcription de l'ovalbumine de poulet. Les mécanismes de régulation par les oestrogènes des gènes de la lactotransferrine humaine et murine sont donc différents.

Après de nombreuses études réalisées *in vitro*, l'expression de la lactotransferrine a été étudiée *in vivo* dans l'utérus de souris lors du cycle hormonal naturel (Walmer *et al.*, 1992; Newbold *et al.*, 1992). Au début du cycle, le taux de messagers de la lactotransferrine est faible, il y a très peu de protéines dans les cellules épithéliales utérines et pas du tout dans le fluide luminal utérin (ULF). Quand la quantité d'oestradiol est maximale, les taux de lactotransferrine et de messagers correspondant augmentent, jusqu'à atteindre un maximum, dans l'épithélium utérin et la lactotransferrine est détectable dans le fluide luminal utérin. Enfin, quand les taux d'oestradiol et de progestérone sont élevés, la quantité d'ARNm et de lactotransferrine diminue dans les cellules épithéliales et la protéine n'est plus détectable dans le fluide luminal utérin. Le taux ainsi que le niveau d'expression des messagers codant la lactotransferrine dans les cellules épithéliales de l'utérus de souris varient donc au cours du cycle hormonal. La combinaison de ces résultats avec le fait que la lactotransferrine est un constituant majoritaire du fluide luminal utérin de souris soumises aux oestrogènes, suggère que la lactotransferrine doit jouer un rôle important lors des processus de reproduction.

La présence du gène codant la lactotransferrine humaine a également été recherchée sur des tumeurs primaires invasives de cancer du sein (Campbell *et al.*, 1992). Ainsi, ces auteurs, disposant d'un ADNc codant la lactotransferrine issu d'une banque de cancer du sein, ont montré que 35 tumeurs du sein sur 39 expriment variablement la lactotransferrine et que cette expression est inversement proportionnelle à la présence du récepteur des oestrogènes.

IX- PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES

Les ADNc codant la sérotransferrine et la lactotransferrine humaines étant disponibles, plusieurs auteurs ont exprimés ces deux protéines dans les cellules BHK tout d'abord, puis dans les bactéries *Escherichia coli* ou les champignons *Aspergillus*.

A- La sérotransferrine

Le lobe N-terminal recombinant de la sérotransferrine a été produit dans les cellules BHK par Funk *et al.* (1990). Ces mêmes auteurs ayant échoué dans leurs essais d'expression dans *E. coli*, Hershberger *et al.* (1991) ont donc, les premiers, réussi ce type d'expression. La sérotransferrine recombinante a depuis été, de nouveau, produite dans *E. coli* par Ikeda *et al.* (1992) et Steinlein et Ikeda (1993) qui désiraient d'obtenir des cristaux de sérotransferrine de bonne qualité. En effet, la protéine produite par cette technique est génétiquement pure et non glycosylée, deux facteurs à l'origine de la bonne qualité des cristaux.

Plus récemment, Mason *et al.* (1993) ont exprimé la sérotransferrine humaine entière dans les cellules BHK à raison de 125 mg par litre de milieu de culture. La sérotransferrine recombinante produite présente les mêmes caractéristiques (immunoréactivité et capacités à fixer le fer et à se fixer à son récepteur cellulaire) que trois sérotransferrines disponibles dans le commerce. Cependant, elle possède un modèle de glycosylation extrêmement complexe puisque seize variants de sérotransferrine glycosylée sont mis en évidence par spectrométrie de masse électrospray. Ces mêmes auteurs ont également produit, après mutation des deux sites de N-glycosylation, de la sérotransferrine non glycosylée à raison de 25 mg par litre de milieu de culture. Celle-ci se présente sous une forme unique de masse moléculaire environ 75 kDa. Sa fixation sur les cellules HeLa, avec la même avidité que les sérotransferrines commerciales, indique

que les glycanes de la sérotransferrine n'interviennent pas dans l'interaction de cette dernière avec son récepteur.

B- La lactotransferrine

La lactotransferrine humaine a, elle aussi, été exprimée dans les cellules BHK et ceci à raison de 20 mg par litre de milieu de culture (Stowell *et al.*, 1991). La lactotransferrine recombinante obtenue a été étudiée par électrophorèse en gel de polyacrylamide, par séquençage partiel du lobe N-terminal et par déglycosylation avec la PNGase (Peptide-N^o-(acetyl- β -glucosaminyl)-asparagine amidase). Les résultats obtenus lors des deux premières études indiquent que la lactotransferrine recombinante est identique à la protéine native. Néanmoins, la résistance à l'action de la PNGase d'une petite fraction de lactotransferrine recombinante met en évidence une possible hétérogénéité de la fraction glycanique.

La lactotransferrine humaine a ensuite été exprimée dans les champignons *Aspergillus*. Ceux-ci, du fait de leur capacité à réaliser l'ensemble des modifications post-traductionnelles des protéines eucaryotes, produisent des protéines correctement glycosylées (Van Brunt, 1988). Ainsi, la lactotransferrine humaine a tout d'abord été produite dans *Aspergillus oryzae* (Ward *et al.*, 1992a) à raison de 25 mg par litre de milieu de culture puis dans *Aspergillus nidulans* (Ward *et al.*, 1992b) à raison de 5 mg par litre. Dans le dernier cas, seulement 30% de la lactotransferrine recombinante produite est sécrétée dans le milieu de culture. Dans les deux cas, la lactotransferrine humaine produite dans *Aspergillus* est indistinguishable de la lactotransferrine humaine native de par sa taille, son immunoréactivité et sa capacité à fixer le fer. De même, la protéine recombinante semble renfermer les mêmes glycanes liés N-glycosidiquement que la lactotransferrine native.

X- CONCLUSION

Les transferrines forment une famille de glycoprotéines dont les représentants majeurs sont la sérotransferrine et la lactotransferrine. La sérotransferrine est principalement localisée dans le plasma et la lactotransferrine, dans les fluides biologiques et les milieux de sécrétion. Ces deux protéines présentent une forte identité de séquence mais possèdent des glycanes et une affinité pour le fer différents. Enfin, les gènes des transferrines sont tous organisés en 17 exons mais semblent être régulés différemment.

LES RECEPTEURS DES TRANSFERRINES

INTRODUCTION

La sérotransferrine et la lactotransferrine transportent le fer dans l'organisme humain. Ainsi, la sérotransferrine achemine le fer vers les tissus utilisateurs tandis que la lactotransferrine intervient dans l'absorption intestinale du fer et les mécanismes de défense anti-infectieuse. Afin de remplir leurs rôles, ces deux protéines interagissent avec leurs cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

Le récepteur de la sérotransferrine a fait l'objet, jusqu'à ce jour, de nombreuses études (Newman *et al.*, 1982.; Goding, 1983; Trowbridge *et al.*, 1984; Testa, 1985; Huebers et Finch, 1987; Ward, 1987; de Jong, 1990; Neupert *et al.*, 1991; Trowbridge *et al.*, 1991; Testa *et al.*, 1993; Cook *et al.*, 1993) qui ont conduit à la connaissance de sa structure, de sa fonction ainsi que des mécanismes régulant son expression, l'obtention de ces résultats ayant fort probablement été facilitée par l'utilisation d'un procédé chimique hautement efficace d'isolement de ce récepteur (Huebers *et al.*, 1989).

A l'inverse, le récepteur de la lactotransferrine est beaucoup moins connu. En effet, seules quelques études de mise en évidence ont été réalisées et cela, pour la plupart, au laboratoire.

LE RECEPTEUR DE LA SEROTRANSFERRINE

I- LE RECEPTEUR DES VERTEBRES

A- Localisation

Le récepteur de la sérotransferrine est absent de la membrane plasmique de la plupart des cellules adultes au repos mais est présent sur les cellules embryonnaires, malignes, activées ou transformées. La présence de ce récepteur à la surface d'une cellule est liée au besoin en fer de cette cellule.

1- Les réticulocytes

Jandl *et al.* (1959) ont, les premiers, mis en évidence le récepteur de la sérotransferrine et cela à la surface des réticulocytes, cellules nécessitant du fer pour la synthèse de l'hémoglobine. Ce résultat a été confirmé par de nombreux auteurs et notamment par Cotner *et al.* (1989) qui ont identifié ce récepteur sur les précurseurs BFU (Burst forming Unit) des cellules érythroïdes.

Les réticulocytes perdent progressivement, de leur surface, le récepteur de la sérotransferrine lors de leur maturation en érythrocytes (Ecarot-Charier *et al.*, 1980; Pan *et al.*, 1983; Muta *et al.*, 1987; Chitambar *et al.*, 1991).

2- Les hépatocytes

Les hépatocytes stockent le fer sous forme de ferritine. Le métal est apporté par la sérotransferrine qui se fixe sur des récepteurs spécifiques localisés à la surface des hépatocytes (Gardiner et Morgan, 1974; Gröhlich *et al.*, 1979).

Bien que Soda et Tavassoli (1984) aient suggéré que le récepteur de la sérotransferrine n'était pas présent à la surface des hépatocytes mais était localisé sur la membrane des cellules endothéliales du foie, il a pu être caractérisé sur la lignée cellulaire humaine HepG2 d'un hépatocarcinome (Dautry-Varsat *et al.*, 1983). De même, utilisant cette même lignée, Neefjes *et al.* (1990) ont mis en évidence les interactions de la sérotransferrine et de son récepteur lors de leurs biosynthèses respectives, ces cellules étant capables de synthétiser les deux molécules.

3- Les trophoblastes

Les villosités du placenta humain sont recouvertes par des syncytiotrophoblastes qui sont en contact direct avec le sang maternel. En raison de leur localisation, ces cellules jouent un rôle crucial dans le transport des nutriments entre la mère et le fœtus et notamment dans le transport du fer.

La distribution du récepteur de la sérotransferrine dans le placenta humain est bien connue. En effet, ce dernier a été identifié à la surface de la zone d'échange mère-fœtus : sur les membranes apicales (Galbraith *et al.*, 1980; Loh *et al.*, 1980; Parmley *et al.*, 1985) et basales (Vanderpuye *et al.*, 1986) des syncytiotrophoblastes et sur les cytotrophoblastes proliférant (Bulmer *et al.*, 1988). De même des travaux récents (Kennedy *et al.*, 1992) ont permis de localiser le récepteur de la sérotransferrine dans le placenta lors de sa différenciation *in vitro*.

4- Les lymphocytes

Le récepteur de la sérotransferrine est exprimé sur les lymphocytes non stimulés du sang périphérique d'un nouveau né et de sa mère en quantité moindre (Komlos *et al.*, 1991). Cette expression diminue chez l'adulte mais peut néanmoins être induite par la phytohémagglutinine A dans le cas des lymphocytes T (Pelosi *et al.*, 1986;

Pattanapanyasat et Hoy, 1991) et par un anticorps anti-immunoglobuline dans le cas des lymphocytes B (Vora *et al.*, 1990).

5- Les autres cellules

Des récepteurs de la sérotransferrine ont également été mis en évidence :

- sur les cellules de l'épiderme du fœtus (Zambruno *et al.*, 1990) et de l'adulte (Soyer *et al.* 1987)

- sur les cellules trabéculaires (Tripathi *et al.*, 1992) et sur les cellules épithéliales de la cornée (Baudouin *et al.*, 1992)

- dans le cerveau (Mash *et al.*, 1990; Morris *et al.*, 1992a; Beard *et al.*, 1993)

- dans le tractus gastrointestinal (Banerjee *et al.*, 1986)

La caractérisation de ce récepteur sur les lignées cellulaires en culture sera détaillée dans un chapitre ultérieur.

B- Structure du récepteur de la sérotransferrine

1- La partie protéique

Le récepteur de la sérotransferrine (Figure 8 p. 41) est une glycoprotéine transmembranaire composée de deux sous-unités identiques (masse moléculaire d'une sous-unité : 90-95 kDa) reliées par deux ponts disulfures (Enns et Sussman, 1981; Schneider *et al.*, 1982). Il semble cependant que ces ponts disulfure intermoléculaires ne soient pas nécessaires à l'expression sous forme de dimère ainsi qu'à l'activité du récepteur (Alvarez *et al.*, 1989). De même, l'absence de la majeure partie du domaine extracellulaire du récepteur de la sérotransferrine ne semble pas affecter son renouvellement. Ainsi, la demi-vie du récepteur intact est de 19 h +/- 6 h alors que celle d'un fragment tryptique de 21 kDa comprenant les domaines cytoplasmique et

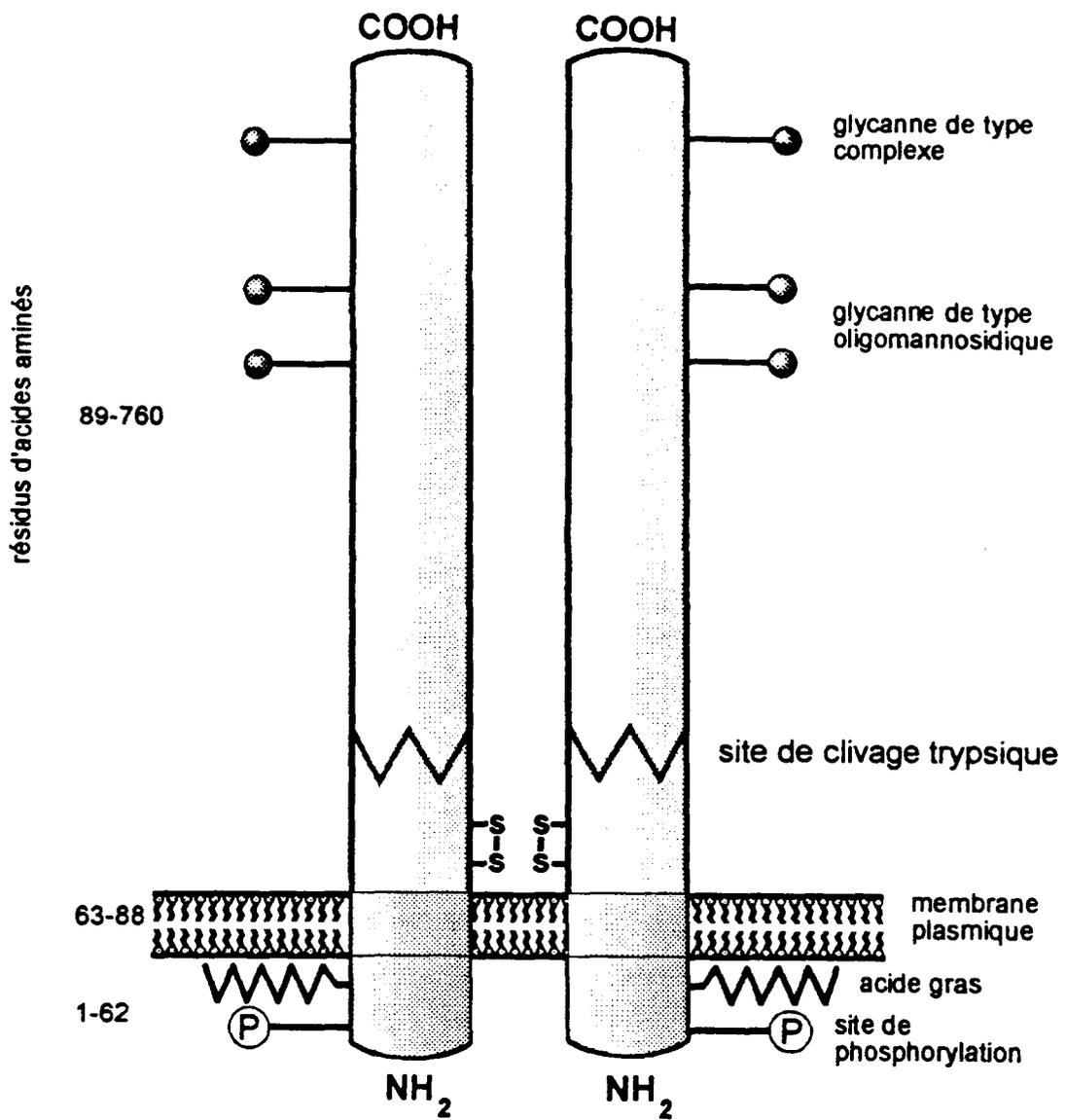


Figure 8 : Représentation schématique du récepteur de la sérotransferrine (Testa *et al.*, 1993)

transmembranaire ainsi qu'une petite partie du domaine externe est de 15 h +/- 4 h (Rutledge *et al.*, 1991).

L'utilisation d'endoglycosidases a montré que le récepteur est glycosylé (Schneider *et al.*, 1982). De même, il est phosphorylé et il est ancré dans la membrane par l'intermédiaire d'un acide palmitique (Omary et Trowbridge, 1981).

La séquence peptidique du récepteur de la sérotransferrine humaine, déduite de la séquence de l'ADNc (Schneider *et al.*, 1984; Mc Clelland *et al.*, 1984), a montré que chaque sous-unité renferme 760 résidus d'acides aminés ainsi répartis :

- 62 résidus, localisés dans le cytoplasme, constituant la partie N-terminale qui semble indispensable à l'internalisation du récepteur (Rothenberger *et al.*, 1987)
- 26 résidus formant la région hydrophobe transmembranaire
- 672 résidus dans le domaine extracellulaire qui comporte le site de fixation de la sérotransferrine.

La structure primaire d'autres récepteurs de la sérotransferrine a également été publiée après isolement et clonage des ADNcs. Il s'agit du récepteur de la sérotransferrine de souris (Stearne *et al.*, 1985), de rat (Roberts et Griswold, 1990) et de poulet (Gerhardt *et al.*, 1991). Ces récepteurs possèdent des séquences hautement conservées dans le domaine extracellulaire et les récepteurs des sérotransferrines de souris, rat et poulet présentent respectivement 77, 82 et 53% d'identité avec le récepteur de la sérotransferrine humaine. Néanmoins l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre divers épitopes du récepteur ont mis en évidence des différences immunologiques entre les différentes espèces animales et même entre différentes cellules au sein d'une même espèce (Bartek *et al.*, 1985; Panaccio *et al.*, 1987).

2- La partie glycanique

La détermination de la séquence primaire du récepteur de la sérotransferrine a mis en évidence trois sites potentiels de N-glycosylation localisés sur les résidus d'asparagine

251, 317 et 727 (Mc Clelland *et al.*, 1984; Schneider *et al.*, 1984). Les résultats obtenus lors de l'action d'endoglycosidases suggèrent que le récepteur est glycosylé et que les glycanes sont constitués d'un oligosaccharide de type complexe et deux oligosaccharides de type oligomannosidique.

La structure de ces oligosaccharides a été déterminée récemment (Orberger *et al.*, 1992) à partir du récepteur de la sérotransferrine humaine isolé du placenta et des cellules HepG2. Le récepteur isolé du placenta (Figure 9 p. 44) porte aussi bien des glycanes de type N-acétyllactosaminique di- et tri-antennés que des glycanes de type hybride. D'importantes différences sont cependant notées dans ce modèle de glycosylation selon que le placenta provienne d'un individu ou d'un autre. Le récepteur purifié à partir des cellules HepG2 contient majoritairement des glycanes de type oligomannosidique comportant de 6 à 9 résidus de mannose et des glycanes de type complexe tétrasialylés.

L'inhibition de cette N-glycosylation réalisée sur les cellules A431 bloque la translocation et interfère avec la formation de récepteurs actifs dimériques (Enns et Reckhow, 1988). A l'inverse, d'autres auteurs montrent que la tunicamycine (un inhibiteur de la N-glycosylation) additionnée au milieu de culture des cellules K562 et NS-1 n'empêche ni la formation du récepteur sous sa forme dimérique, ni son interaction avec la sérotransferrine, bien que celle-ci soit plus faible (Hunt *et al.*, 1989 a et b, Ralton *et al.*, 1989).

Des résultats récents cependant, obtenus par mutagenèse dirigée, montrent que le glycanne lié sur l'asparagine 727 du récepteur est indispensable à la reconnaissance de la sérotransferrine (Enns et Williams, 1991)

En 1988, Neeffes *et al.* ont mis en évidence la présence d'oligosaccharides liés O-glycosidiquement sur le récepteur de la sérotransferrine. En effet, ce dernier isolé des cellules K562 traitées par la déoxymannojirimycine, un autre inhibiteur de la N-glycosylation, reste sensible à l'action de la neuraminidase. Il a donc été suggéré que les résidus d'acide N-acétyl neuraminique étaient portés par des oligosaccharides liés

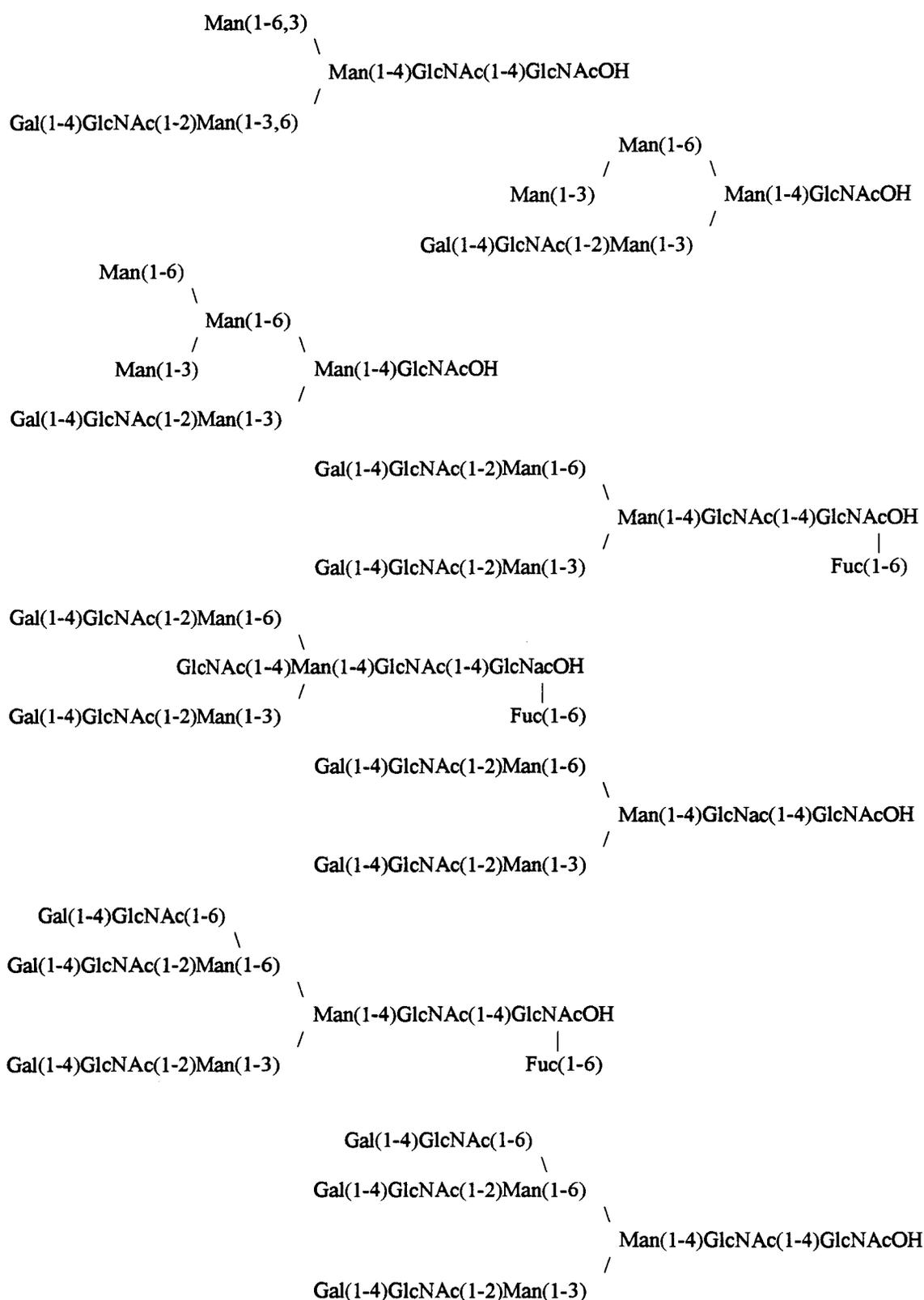


Figure 9 : Structure des glycanes du récepteur placentaire de la sérotransferrine (Orberger *et al.*, 1991)

O-glycosidiquement.

La structure de ces derniers a été réalisée en 1990 par Do *et al.* à partir des cellules K562. Ainsi, le récepteur de la sérotransferrine contient au moins un oligosaccharide lié O-glycosidiquement mono ou disialylé avec un noyau central Gal-GalNAc ou avec un seul monosaccharide, la N-acétylgalactosamine. Récemment, Hayes *et al.* (1992) ont caractérisé le site de O-glycosylation du récepteur de la sérotransferrine humaine : celui-ci est localisé sur le résidu de thréonine 104. De même, Do et Cummings ont mis en évidence la présence d'oligosaccharides liés O-glycosidiquement sur le récepteur de la sérotransferrine des cellules A431 et BeWo d'une part (Revue générale 1991) et des cellules de hamster, les cellules CHO d'autre part (1992).

C- Interaction du récepteur avec son ligand : la sérotransferrine

Un récepteur peut fixer deux molécules de sérotransferrine, soit une molécule par sous-unité (Schneider *et al.*, 1982).

Cette fixation est dépendante, à pH neutre, du taux de saturation en fer (Young *et al.*, 1984; Wado *et al.*, 1979). Les constantes de dissociation sont les suivantes :

- 1. 10^{-8} M pour la sérotransferrine diférrique
- 5. 10^{-8} M pour la sérotransferrine monoférrique, que le fer soit fixé sur le lobe N ou C-terminal (Huebers *et al.*, 1981)
- 2. 10^{-7} M pour l'aposérotransferrine

Cette différence est nettement plus importante dans le cas des cellules du placenta. En effet, l'aposérotransferrine a une affinité pour le récepteur placentaire 10 000 fois plus faible que la sérotransferrine diférrique (Tsunoo et Sussman 1983 a et b).

La fixation de la sérotransferrine sur son récepteur est également pH-dépendante. Ainsi, la sérotransferrine présente un maximum de fixation à pH compris entre 7 et 8 et l'aposérotransferrine à pH acide (Dautry-Varsat *et al.*, 1983; Klausner *et al.*, 1983). En effet, à pH acide, il y a augmentation de la libération du fer (Bali *et al.*, 1990).

Le nombre de récepteurs de la sérotransferrine est fonction du type cellulaire, de la croissance et du stade de différenciation. Il varie de $6 \cdot 10^4$ à $3,7 \cdot 10^5$ par cellule (Tableau II p. 47).

La fixation de la sérotransferrine sur son récepteur placentaire est partiellement inhibée, à des concentrations physiologiques, par deux protéines de la phase aigüe hépatique : l' α_1 -antitrypsine et l' α_2 -macroglobuline (Graziadei *et al.*, 1993). Ainsi, l'addition de 30 μ M d' α_1 -antitrypsine entraîne une modification de la constante de dissociation de 8,46 nM à 21,6 nM.

Comme nous l'avons vu précédemment, les glycanes du récepteur joueraient un rôle dans l'interaction sérotransferrine-récepteur, notamment le glycanne lié à l'asparagine 727 du récepteur (Enns et Williams, 1991).

A l'inverse, la déphosphorylation et l'acylation du récepteur n'ont aucun effet apparent sur l'interaction de la sérotransferrine avec son récepteur (Hunt *et al.*, 1989b; Jing et Trowbridge, 1990). Cependant, l'hyperphosphorylation du récepteur induite par les esters de phorbol entraîne une internalisation rapide du récepteur et affecte son expression (May et Tyler, 1987; Mc Graw *et al.*, 1988; Eicholtz *et al.*, 1992).

D- Rôles du récepteur de la sérotransferrine

1- Apport de fer aux cellules

Le fer est un nutriment essentiel à la croissance cellulaire et à la réplication (Aisen et Listowsky, 1980; Weinberg, 1984). Chez les mammifères, le fer est apporté aux cellules par un mécanisme impliquant la fixation de la sérotransferrine à son récepteur. Il apparaît que certaines cellules, telles les réticulocytes (Morgan, 1981) et les cellules d'hépatome de rat (Baker *et al.*, 1988) ont recours, pour subvenir à leur besoin en fer, au seul

Tableau II : Paramètres de fixation de la sérotransferrine sur différentes cellules

Cellules	Sites/cellule ($\times 10^3$)	Ka (M^{-1})	Références
Lymphoblastoïdes T	60	$1,0 \cdot 10^8$	Larrick et Cresswell, 1979b
Lymphoblastoïdes B	30	$1,0 \cdot 10^8$	Larrick et Cresswell, 1979b
K562	150	$5,3 \cdot 10^8$	Klausner <i>et al.</i> , 1983
Choriocarcinome	370	$4,2 \cdot 10^8$	Hamilton <i>et al.</i> , 1979
HeLa	278	$3,7 \cdot 10^7$	Ward <i>et al.</i> , 1982
HepG2	60	$1,4 \cdot 10^8$	Dautry-Varsat <i>et al.</i> , 1983
MCF7	210	$1,0 \cdot 10^8$	Vandewalle <i>et al.</i> , 1985

mécanisme d'endocytose de la sérotransferrine alors que les hépatocytes (Young et Aisen, 1981; Trinder *et al.*, 1986; Thorstensen, 1988; Thorstensen et Romslo; 1990) et les cellules de mélanomes (Richardson et Baker, 1990 et 1992) utilisent à la fois le mécanisme d'endocytose et un système redox.

Afin de déterminer quel mécanisme (dépendant ou non du récepteur de la sérotransferrine) joue un rôle prédominant dans l'apport de fer aux cellules, Sasaki *et al.* (1993) ont développé une technologie anti-sens. Celle-ci permet de supprimer sélectivement l'expression du gène du récepteur de la sérotransferrine humaine en transfectant des cellules avec un plasmide comportant, dans une orientation inverse, l'ADNc de ce récepteur. Il y a ainsi diminution de 50 % de l'expression de cette protéine d'une part et du prélèvement du fer lié à la sérotransferrine d'autre part. Cette diminution n'est pas liée à un abaissement du nombre de messagers codant le récepteur de la sérotransferrine mais à l'intervention de l'ARNm anti-sens au niveau de la traduction.

a- Endocytose

Le mécanisme d'endocytose médiée par le récepteur de la sérotransferrine a fait l'objet de nombreux travaux (Dautry-Varsat et Lodish, 1984; Crichton et Charlotheaux-Wauters, 1987; Morgan et Baker, 1988; Kühn *et al.*, 1990; Crichton et Ward, 1992). Ce mécanisme, décrit ci-dessous, est représenté Figure 10 p. 49.

A pH neutre, la sérotransferrine diférique se fixe avec une forte affinité sur son récepteur. Le complexe sérotransferrine-récepteur est alors endocyté dans un puit recouvert. La vésicule recouverte qui se forme ensuite ne contient, dans le cas du placenta, qu'un seul complexe ligand-récepteur (Turkewitz et Harrison, 1989). Celle-ci se transforme en endosome dans lequel, à pH acide, le fer est libéré de la sérotransferrine, cette libération étant facilitée par le récepteur lui-même (Bali *et al.*, 1990; Sipe et Murphy, 1991). Le fer est ensuite transporté jusque la ferritine cytoplasmique par un mécanisme inconnu. L'aposérotransferrine, quant à elle, reste fixée

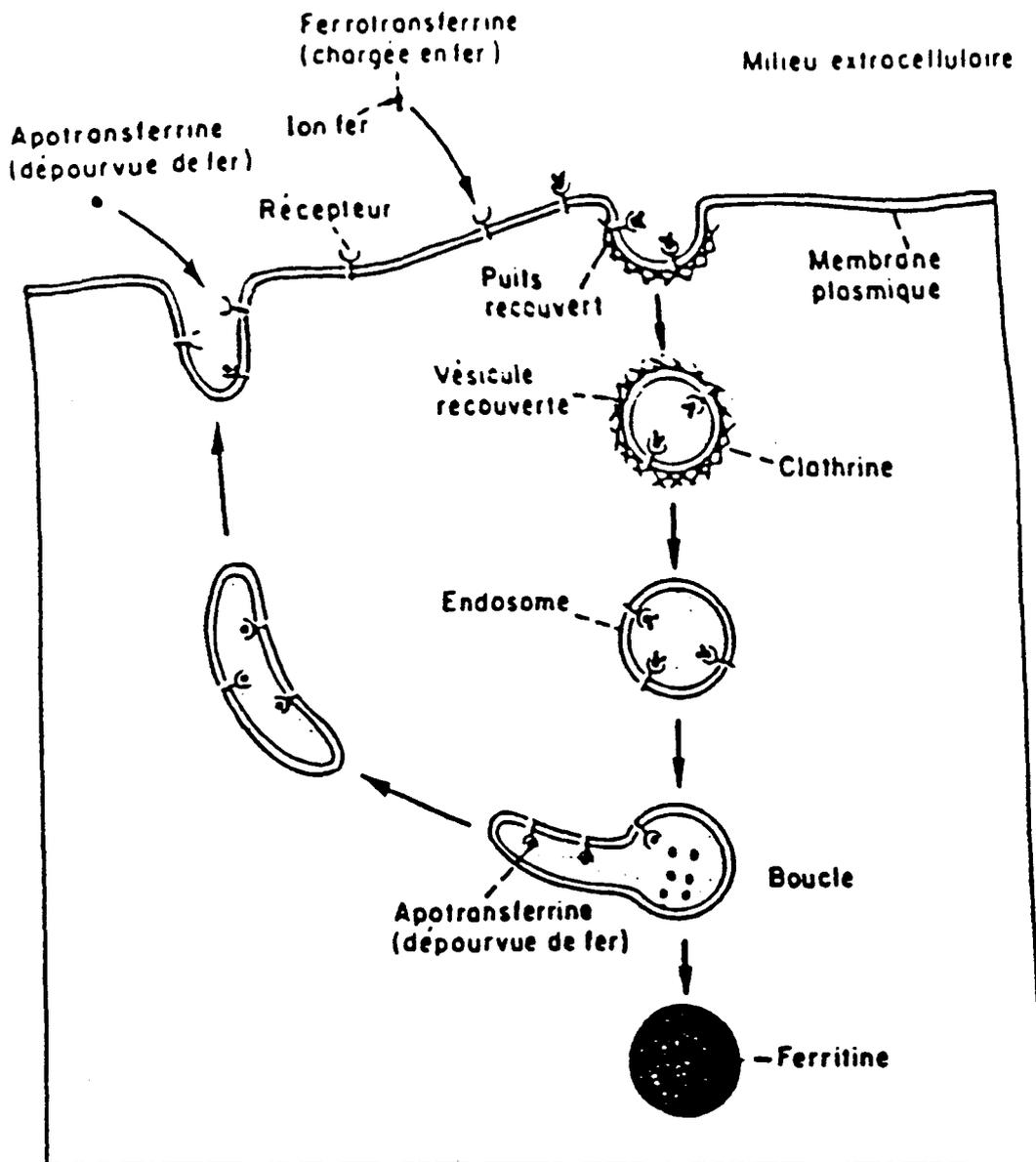


Figure 10 : Endocytose de la sérotransferrine et recyclage de son récepteur (Dautry-Varsat et Lodish, 1984)

sur son récepteur et le complexe est recyclé en surface. A pH extracellulaire, l'aposérotransferrine se libère alors de son récepteur, elle peut à nouveau fixer deux ions ferriques et une nouvelle endocytose peut avoir lieu. Ce cycle est très rapide : il ne dure que 15 à 20 minutes.

Récemment, Richardson et Baker (1992) ont élucidé une partie du mécanisme qui suit la libération du fer dans l'endosome. En effet, ils ont identifié, à basse température, dans les fibroblastes et les cellules de mélanomes et d'hépatomes, un pool de fer libre. Ceci suggère la présence d'une protéine ou d'un complexe protéique, température-dépendant, associé à la membrane de l'endosome et impliqué dans le déplacement du fer dans le cytoplasme, après sa libération par la sérotransferrine diferrique. De même, d'autres étapes ont été mises en évidence. Ainsi, Killisch *et al.* (1992) ont caractérisé les compartiments d'endocytose précoces et tardifs du cycle de la sérotransferrine et Hansen *et al.* (1992) ont montré que l'étape d'internalisation nécessite une concentration de 6 à 9 fois, du récepteur de la sérotransferrine, dans les puits recouverts par rapport à la surface cellulaire, cette concentration n'étant possible que quand la densité cellulaire est élevée .

En 1990, Jing *et al.* ont montré que la séquence comprise entre les acides aminés 19 et 28 du récepteur de la sérotransferrine permet d'obtenir une endocytose efficace de la sérotransferrine puis Collawn *et al.* ont identifié le térapeptide $^{20}\text{YXRF}^{23}$ comme étant la séquence nécessaire et suffisante à cette endocytose. Mc Graw *et al.* (1991) puis Girones *et al.* (1991) ont contesté ce fait. En effet, les premiers ont montré que le résidu de tyrosine en position 20 et le résidu de phénylalanine en position 23 sont nécessaires pour une internalisation efficace mais qu'un résidu de phénylalanine en position 13 doit également être présent puisque la substitution de cet acide aminé par un résidu d'alanine diminue approximativement de deux fois l'endocytose. Les seconds, quant à eux, ont conclu que d'autres acides aminés de la queue cytoplasmique du récepteur de la sérotransferrine sont nécessaires à l'endocytose. Ces signaux d'internalisation, enfin, sont semble-t'il, interchangeables. En effet, les signaux transplantés des récepteurs des LDL et du Man6P entraînent une rapide internalisation de la sérotransferrine (Collawn *et al.*,

1991; Trowbridge et Collawn, 1992). Récemment, Dargemont *et al.* (1993) ont également montré, sur les cellules MDCK, que le signal d'internalisation est distinct de la séquence qui conduit à la localisation quasi-exclusive du récepteur de la sérotransferrine sur la membrane basolatérale de ces cellules.

b- Le système redox

Dans ce modèle, la première étape est identique à celle du mécanisme d'endocytose. En effet, il y a encore fixation de la sérotransferrine sur son récepteur à la surface cellulaire. Puis l'action concertée de protons et d'agents réducteurs fournis par un système redox, voisin du récepteur de la sérotransferrine, entraîne la déstabilisation du fer lié à la sérotransferrine ainsi que sa réduction (Figure 11 p. 52). Le fer ferreux se fixe ensuite sur un transporteur membranaire spécifique, qui lui permet de traverser la membrane plasmique. Il se trouve alors dans le cytosol où il est prélevé par un chélateur qui le transporte jusque la ferritine (Thorstensen, 1988; Thorstensen et Romslo, 1988).

Le système redox n'est autre que la NADH oxydoréductase (Sün *et al.*, 1987 a et b; Thorstensen, 1988; Thorstensen et Romslo, 1990; Crane *et al.*, 1990). La réduction du fer s'accompagne de l'oxydation du NADH cytosolique et d'une libération, dans le milieu extérieur, de protons par l'intermédiaire de l'antiport Na^+/H^+ (Sün *et al.*, 1987b et 1988).

Le prélèvement du fer par les hépatocytes semble majoritairement avoir lieu par ce système. En effet, l'addition d'inhibiteurs de la NADH oxydoréductase inhibe le prélèvement du fer de la sérotransferrine (Thorstensen et Romslo, 1988). De plus, une faible concentration en oxygène qui stimule le prélèvement du fer par les hépatocytes augmente la concentration cellulaire en NADH et l'activité du système redox (Thorstensen et Romslo, 1988).

De Jong (1990) a fourni une autre explication à ce modèle. Pour cet auteur, une partie du fer ferreux libéré pourrait être réoxydé et être à nouveau capté par la sérotransferrine

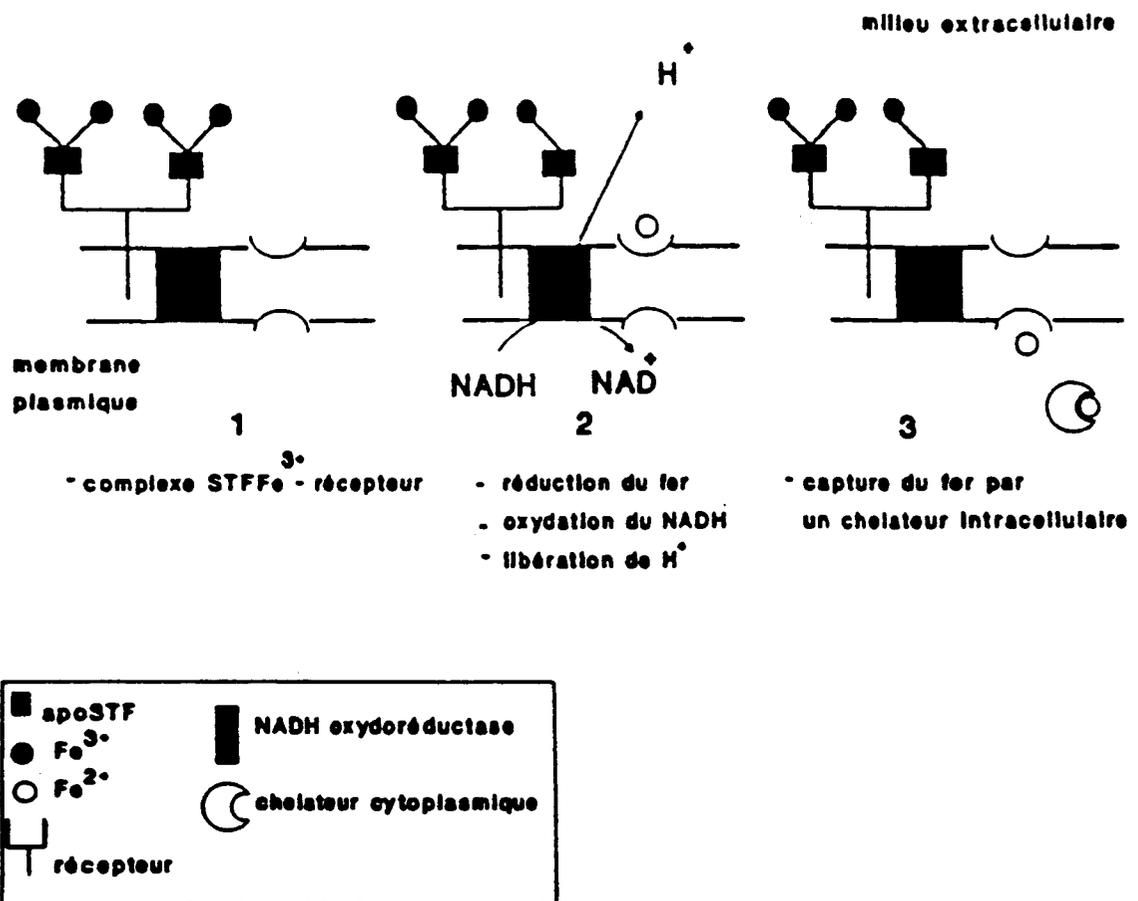


Figure 11 : Schéma de libération du fer de la sérotransferrine par un mécanisme d'oxydo-réduction et de sa capture par les cellules (Thorstensen, 1988; Thorstensen et Romslo, 1988)

circulante. Il y aurait ainsi régulation de la distribution du fer entre les molécules de sérotransferrine circulantes et par conséquent régulation de la prolifération cellulaire.

2- Le récepteur de la sérotransferrine : une cible thérapeutique

Les cellules cancéreuses présentent à leur surface davantage de récepteurs de la sérotransferrine que les cellules normales (Trowbridge, 1988; Neckers, 1991). Ce fait a amené de nombreux auteurs à suggérer que la sérotransferrine et son récepteur membranaire pourraient être utilisés pour inhiber la croissance des cellules cancéreuses (Revue générale Thorstensen et Romslo, 1993). Plusieurs stratégies ont ainsi été développées :

- utilisation d'anticorps anti-récepteur de la sérotransferrine qui bloquent la fonction normale du récepteur, privent les cellules de leur apport en fer et inhibent ainsi leur croissance (Trowbridge *et al.*, 1991). L'effet de ces anticorps peut être combiné avec l'action de chélateurs du fer (Kemp *et al.*, 1990).

- utilisation de conjugués de drogues et d'anticorps anti-récepteur de la sérotransferrine. Ceux-ci peuvent, par transcytose au niveau du récepteur de la sérotransferrine, traverser la barrière sang-cerveau. La drogue est alors libérée de l'anticorps par hydrolyse et elle peut exercer son action au niveau du système nerveux central (Pardridge, 1992).

- utilisation de conjugués de la sérotransferrine et de drogues, toxines ou antibiotiques comme la ricine A (Raso et Basala, 1984), la toxine diphtérique (O'Keefe et Draper, 1985), la néocarzinostatine (Kohgo *et al.*, 1990), l'adriamycine (Fritzer *et al.*, 1992) et la doxorubicine (Berczi *et al.*, 1993). Le mécanisme d'endocytose de la doxorubicine-sérotransferrine a été étudié plus particulièrement. Il met en évidence la fixation de cette molécule à la surface des cellules K562 avec une affinité diminuée de moitié par rapport à la sérotransferrine native. De même, l'endocytose est plus longue à se réaliser et le recyclage des complexes ligand-récepteur est de durée plus élevée.

- utilisation d'immunotoxines dirigées contre le récepteur de la sérotransferrine et inhibant la synthèse protéique, ce qui provoque la mort des cellules cancéreuses (Martell et al., 1993).

3- Rôles divers

La sérotransferrine est capable de fixer spécifiquement Al^{3+} avec une affinité voisine de celle du fer (Trapp, 1983; Martin *et al.*, 1987). Le récepteur de la sérotransferrine, localisé dans le cerveau, fixe alors son ligand et permet, dans des conditions physiologiques, l'accès de l'aluminium au système nerveux central. Selon Roskams et Connor (1990), ce système permettrait d'expliquer la présence, en quantité importante, de ce métal dans le cerveau de sujets atteints de la maladie d'Alzheimer. Un autre effet négatif de la sérotransferrine substituée par de l'aluminium a pu être observé. Ainsi, l'interaction de cette molécule avec des lymphocytes humains entraîne une dégradation de leur fonction qui pourrait contribuer à la diminution de la sensibilité immunitaire des patients atteints de troubles rénaux et placés sous hémodialyse (Mc Gregor *et al.*, 1991).

Le récepteur de la sérotransferrine peut aussi être utilisé comme agent de locomotion par les cellules d'une lignée lymphoïde B : la lignée JY (Bretscher, 1992). Les cellules JY s'attachent à des anticorps fixés sur les récepteurs de la sérotransferrine et migrent ainsi sur des distances considérables.

Un autre rôle du récepteur de la sérotransferrine a été appelé "transferrinfection". Il consiste à coupler de l'ADN à des complexes sérotransferrine-polycations et d'introduire les conjugués ainsi formés à l'intérieur de cellules non adhérentes par le mécanisme d'endocytose via le récepteur de la sérotransferrine (Wagner *et al.*, 1990). Deux "transferrinfections" d'érythroblastes de poulet ont ainsi été réalisées avec le gène reporter codant la luciférase couplée à la sérotransferrine-polylysine ou la sérotransferrine-protamine (Zenke *et al.*, 1990). L'efficacité du transfert est plus faible que lors d'une transfection selon la méthode au DEAE-Dextran qui nécessite des cellules

adhérentes mais elle peut néanmoins être améliorée si les cellules sont traitées avec de la chloroquine.

Enfin, le dosage du récepteur de la sérotransferrine peut être utilisé pour mettre en évidence une pathologie liée à un déficit en fer. En effet, le taux de récepteurs de la sérotransferrine est un bon index de l'anémie due à un déficit en fer alors que celui-ci n'est pas affecté lors d'une anémie due à une maladie chronique du foie (Ferguson *et al.*, 1992). De même, la mesure de la concentration en récepteur de la sérotransferrine lors d'une grossesse permet de mettre en évidence un déficit en fer puisque le taux de récepteurs est inchangé lors d'une grossesse normale (Carriaga *et al.*, 1991).

E- Le gène du récepteur de la sérotransferrine : organisation génomique et régulation de l'expression

1- Organisation

En 1984, Kühn *et al.* ont isolé du génôme humain les séquences qui codent le récepteur de la sérotransferrine. L'analyse de ces séquences combinées à celle d'un ADN complémentaire obtenu à partir de fibroblastes humains a permis à Mc Clelland *et al.* (1984) de décrire l'organisation du gène du récepteur de la sérotransferrine. Celui-ci contient au moins 19 exons distribués sur 31 kb et présente un cadre de lecture ouvert de 2280 bases. Ce gène, comme celui de la sérotransferrine, est localisé sur le chromosome 3 (Goodfellow *et al.*, 1982).

2- Régulation de l'expression du récepteur de la sérotransferrine

Elle est directement liée aux besoins en fer de la cellule. Les variations observées sont dues à une modification de la synthèse du récepteur ou à un changement dans la répartition du nombre de récepteurs entre la surface cellulaire et les vésicules

intracellulaires (Bomford et Munro, 1985) ou encore à une libération du récepteur dans le milieu extracellulaire. Elles sont observées au cours du cycle et de la différenciation cellulaire, lors du changement du taux intracellulaire en fer et après action de certaines substances comme le G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), l'INF γ (Interferon), les esters de phorbol, l'EGF (epidermal growth factor), l'insuline, l'IGF (insulin-like growth factor) et certaines protéases membranaires.

a- Le cycle cellulaire et l'état de différenciation

Les cellules au repos présentent à leur surface très peu de récepteurs de la sérotransferrine. Leur nombre augmente de façon importante lorsque les cellules se divisent et passent de la phase G₁ à la phase S (Larrick et Cresswell, 1979; Trowbridge et Omary, 1981, Teixeira et Kühn, 1991). Cette régulation du nombre de récepteurs de la sérotransferrine présents à la surface cellulaire implique des éléments localisés dans les 114 premières paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription. Cette région est reconnue spécifiquement par plusieurs facteurs agissant en trans et contient un élément composé d'une alternance de purines et de pyrimidines. *In vitro*, cet élément peut adopter une conformation superenroulée (Ouyang et Miskimins, 1992).

Concernant les lymphocytes, le récepteur de la sérotransferrine apparaît en abondance à leur surface après une stimulation par un mitogène, la phyohémagglutinine A (Larrick et Cresswell, 1979). Cette stimulation peut être divisée en deux étapes :

- Expression des récepteurs de l'IL₂ et libération d'IL₂ (Neckers et Cossman, 1983) conduisant à l'entrée en phase G₁ des lymphocytes (Bettens *et al.*, 1982)

- Induction du récepteur de la sérotransferrine et entrée des cellules en phase S

L'addition de sels de fer ou inversement de chélateurs du fer à ces lymphocytes activés entraîne une modification du taux de récepteurs de la sérotransferrine, indiquant que l'expression de ce récepteur, chez les lymphocytes activés, est modulée spécifiquement

dans un troisième temps par la concentration en fer cellulaire plutôt que par la vitesse de prolifération des cellules.

Le même phénomène est observé lors de l'activation des cellules de la rate par le 4 β -phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) : avant l'entrée en phase S, il y a apparition du récepteur de la sérotransferrine à la surface de ces cellules (Teixeira et Kühn, 1991). Cette apparition n'est pas liée à une augmentation sensible du nombre de messagers codant le récepteur mais à une activation du facteur se fixant sur ces messagers, ce qui augmente leur stabilité.

A l'inverse des lymphocytes et des cellules de la rate, les cellules érythroïdes voient leur nombre de récepteurs diminuer au cours de la différenciation. En effet, le récepteur de la sérotransferrine est très fortement exprimé dans les globules rouges immatures qui nécessitent des quantités de fer importantes pour la synthèse de l'hémoglobine. Puis le nombre de récepteurs diminue progressivement de la surface cellulaire jusqu'à disparaître complètement, les hématies en étant dépourvues (Kailis et Morgan, 1974). Récemment, Chan et Gerhardt (1992) ont montré que, chez les cellules érythroïdes en cours de différenciation, l'expression du gène du récepteur de la sérotransferrine est régulée significativement au niveau de la transcription.

b- Le taux de fer intracellulaire

Le fer est un élément essentiel jouant un rôle dans de nombreux processus biologiques tels que le transfert de l'oxygène et la synthèse de l'ADN. Le fer libre étant toxique pour les cellules, ces dernières régulent sa concentration en modulant son prélèvement via le récepteur de la sérotransferrine et son stockage dans la ferritine (revue générale Klausner *et al.*, 1993).

La synthèse de ferritine augmente avec le taux de fer intracellulaire et est contrôlée au niveau de la traduction. Ainsi quand la concentration en fer intracellulaire est élevée, les ARNm de la ferritine sont dirigés vers les polysomes où la traduction a lieu (Zahringer *et*

al., 1976; Aziz et Munro, 1986; Rogers et Munro, 1987) et quand la concentration est faible, ces ARNm sont retrouvés dans les particules ribonucléoprotéiques.

A l'inverse, la synthèse du récepteur de la sérotransferrine diminue quand le taux de fer augmente (Pellicini *et al.*, 1982; Ward *et al.*, 1982; Louache *et al.*, 1984; Mattia *et al.*, 1984; Bridges et Cudkowicz, 1984; Rao *et al.*, 1986; Bierings *et al.*, 1992) et elle est contrôlée au niveau de la stabilité des messagers. Ainsi, les cellules répondent à une augmentation de la concentration en fer en dégradant spécifiquement une partie des ARNm du récepteur de la sérotransferrine (Revue générale Leibold et Guo, 1992).

La régulation coordonnée du récepteur de la sérotransferrine et de la ferritine est réalisée grâce à des séquences localisées respectivement sur leurs messagers en 3' (Casey *et al.*, 1988; Mullner *et al.*, 1989; Koeller *et al.*, 1989) et 5' (Leibold et Munro, 1988; Rouault *et al.*, 1988) et sont nommées IRE (Iron Responsive Element). Les IRE-BPs (Iron-Responsive Element Binding Protein), protéines cytoplasmiques de masse moléculaire voisine de 90kDa, se fixent sur les IREs dans un processus médié par le fer (Revue générale Theil, 1993). L'intégrité de la séquence et de la conformation des IREs est indispensable à une bonne fixation des IRE-BPs (Casey *et al.*, 1989; Leibold *et al.*, 1990; Harrell *et al.*, 1991; Bettany *et al.*, 1992). En effet, les IREs présentent une structure particulière en épingle à cheveux et renferment une boucle de six nucléotides et une tige appariée possédant un résidu protubérant de cytosine localisé cinq nucléotides plus loin que la boucle (Aziz et Munro, 1987; Casey *et al.*, 1988). Deux IRE-BPs ont été clonées. Il s'agit de l'IRE-BP du foie d'homme (Rouault *et al.*, 1990) et de rat (Yu *et al.*, 1992). Les deux séquences nucléotidiques déterminées révèlent 92% d'identité entre elles et présentent environ 54% d'homologie et 34% d'identité avec les aconitases mitochondriales de porc et de levure (Rouault *et al.*, 1991), une aconitase étant un enzyme Fe/S présent dans le cycle de Krebs. La conservation du site actif de l'aconitase dans les IRE-BPS permet d'affirmer que ces protéines sont des aconitases (Kaptain *et al.*, 1991; Lauble *et al.*, 1992). De même, récemment l'aconitase cytosolique bovine a été

purifiée et l'analyse partielle de sa séquence indique que cette protéine est une IRE-BP (Kennedy *et al.*, 1992)

Pour expliquer l'activation des IRE-BPs par le fer, deux modèles ont été proposés (Figure 12 p. 60).

Le premier modèle explique l'activation des IRE-BPs par leur sensibilité au taux de fer intracellulaire (Rouault *et al.*, 1991; Haile *et al.*, 1992) et implique que ces protéines existent sous une forme [4Fe-4S] de faible affinité pour l'ARNm et une forme [3Fe-4S] de forte affinité. Ainsi, quand la concentration intracellulaire en fer est élevée, les IRE-BPs seraient converties en forme de faible affinité par addition d'un quatrième atome de fer, ce qui empêcherait la fixation sur l'ARNm en sequestrant une cystéine libre ou en stabilisant la structure de l'IRE-BP. Inversement, quand il y a peu de fer, les IRE-BPs seraient converties en formes de forte affinité et se fixeraient sur les IREs.

Le second modèle nécessite l'intervention d'une protéine putative qui transporterait le fer et serait sensible à sa concentration intracellulaire. Cette protéine faciliterait la conversion des IRE-BPs d'une forme de haute affinité à une forme de faible affinité, les IRE-BPs étant cependant toujours sous la forme [4Fe-4S]. Ainsi, la protéine capterait le fer ferrique libéré par le complexe transferrine-récepteur de la sérotransferrine puis interagirait avec les IRE-BPs, créant un couple redox. La forme oxydée des IRE-BPs serait seulement un état transitoire. Elle serait réduite par le glutathion en une forme de haute affinité pour les messagers. Ce modèle présente l'avantage d'expliquer l'activation *in vitro* des IRE-BPs par des agents réducteurs et leur inactivation par le fer (Hentze *et al.*, 1989).

Récemment Abe *et al.* (1992) ont montré que la régulation liée au fer de l'expression du récepteur de la sérotransferrine est différente pour les érythroblastes humains. En effet, dans des conditions de ferriprivation (en présence d'un chélateur du fer), il y a bien augmentation du nombre de récepteurs de la sérotransferrine à la surface des cellules mais lors d'un traitement de ces mêmes érythroblastes avec de l'hémine, il y a maintient

du nombre de récepteurs en surface bien que la vitesse de synthèse des messagers ainsi que leur taux diminuent. Ce phénomène explique le fait que *in vivo*, une quantité élevée de fer sérique n'a pas d'influence sur le nombre de récepteurs de la sérotransferrine présents en surface (Muta *et al.*, 1987). Il semble donc qu'il existe un mécanisme de régulation spécifique pour les cellules productrices d'hémoglobine et que ce mécanisme, en dépit d'un excès de fer, maintient constant le taux de récepteurs de la sérotransferrine à la surface de ces cellules.

c- Les cytokines

L'addition d'interferon γ à des monocytes humains (Byrd et Horwitz, 1991) ou à des cellules WISH (Bourgeade *et al.*, 1992) réduit l'expression du récepteur, l'interferon intervenant probablement après la transcription lors de la maturation des ARNm immatures du récepteur de la sérotransferrine. A l'inverse, le G-CSF amplifie l'expression du récepteur chez deux lignées leucémiques myéloïdes : NKM-1 et NOMO-1 (Morishita *et al.*, 1990). Cette augmentation est également mise en évidence pour les ARNm, suggérant un contrôle direct de leur taux de base par le G-CSF. De même, l'addition de TNF- α et d'IL₁ aux cellules MRC5 (fibroblastes humains) entraîne une augmentation, d'un facteur 3 à 4, du nombre de messagers codant le récepteur de la sérotransferrine, cette augmentation étant coordonnée avec une induction importante de l'expression de ce récepteur (Tsuji *et al.*, 1991).

d- Autres facteurs

L'insuline (Davis *et al.*, 1986; Tanner et Lienhard, 1987; Akin et Sonnenfeld, 1993), l'IGF, l'EGF (Davis *et al.*, 1987) ainsi que les esters de phorbol (Buys *et al.*, 1984; Alcantara *et al.*, 1991) sont à l'origine d'une redistribution des récepteurs de la sérotransferrine entre les pools externe et interne des cellules. Ainsi, l'addition d'esters de

phorbol entraîne une rapide internalisation du récepteur alors que l'incubation avec l'un ou l'autre des trois facteurs restants conduit à une augmentation du nombre de récepteurs à la surface des cellules, l'hyperacylation du récepteur étant semble-t-il à l'origine de ce maintien en surface (Alvarez *et al.*, 1990).

Les protéases membranaires, quant à elles, modifient le nombre de récepteurs à la surface des cellules HL60 en libérant ce dernier dans le milieu extracellulaire (Chitambar et Zivkovic, 1989), cette libération étant fonction de la densité des récepteurs en surface et du taux de fer intracellulaire (Chitambar et Zivkovic, 1990). Le récepteur libéré est appelé récepteur soluble.

F- Le récepteur soluble

Le récepteur de la sérotransferrine est présent dans le sérum humain sous une forme soluble (Kohgo *et al.*, 1986 et 1987; Flowers *et al.*, 1989) non dégradée (Huebers *et al.*, 1990) ou tronquée des domaines cytoplasmiques et transmembranaires (Shih *et al.*, 1990). Sa concentration varie et notamment augmente dans le cas de thalassémie et d'anémie associée à un déficit en fer (Skikne *et al.*, 1990; Revue générale Béguin, 1992).

En 1991, Johnstone *et al.* ont montré que, chez d'autres espèces (mouton, rat, poulet), le récepteur soluble est associé à une vésicule (exosome) et qu'il est entier. Plus récemment, le même groupe de chercheurs (Ahn et Johnstone, 1993) a précisé ce résultat en incubant *in vitro* des réticulocytes de mouton. Le récepteur soluble obtenu est majoritairement (75%) natif et associé à des exosomes mais une petite fraction (25%) est tronquée et possède une masse moléculaire de 80 kDa, ce dernier récepteur soluble provenant semble-t-il d'une coupure réalisée sur le récepteur associé à l'exosome.

Le récepteur soluble est également libéré dans le milieu de culture par les cellules HL60 (Chitambar et Zivkovic, 1989), K562 (Baynes *et al.*, 1990 et 1991) et les lymphocytes activés (Woith *et al.*, 1993). Ce récepteur est capable de fixer la sérotransferrine et possède, dans le cas des cellules HL60, une masse moléculaire de

158 kDa.

Récemment, une forme soluble particulière (acides aminés 121 à 760) du récepteur a été cristallisée et étudiée par diffraction de rayons X (Borhani et Harrison, 1991). Il s'agit d'un fragment trypsique du récepteur placentaire solubilisé par des détergents. Comme les précédents récepteurs solubles, il fixe la sérotransferrine.

Enfin, Shih *et al.* (1993) ont développé un dosage ELISA permettant de distinguer le récepteur soluble intact de sa forme tronquée, ces auteurs disposant d'anticorps dirigés contre le domaine extracellulaire du récepteur d'une part et contre le domaine intracellulaire d'autre part. Ils ont ainsi montré que dans le sérum humain moins de 1 % des récepteurs solubles de la sérotransferrine sont entiers.

II- LES RECEPTEURS BACTERIEN ET PARASITAIRE DE LA SEROTRANSFERRINE

A- Le récepteur bactérien

Le fer est un élément essentiel à la croissance des bactéries. Dans le sérum, le fer est majoritairement complexé à la sérotransferrine, ce qui amène les bactéries à l'acquérir à l'aide de quatre mécanismes différents (Griffiths, 1987) :

- clivage protéolytique de la sérotransferrine conduisant à un réarrangement de ses sites de fixation du fer
- sécrétion d'agents chélateurs de faible masse moléculaire qui sont capables de prélever le fer lié à la sérotransferrine et de l'apporter à la bactérie
- réduction du fer ferrique en fer ferreux et libération de ce dernier
- interaction directe entre la sérotransferrine et un récepteur bactérien de cette dernière

Ce dernier mécanisme sera le seul décrit dans ce chapitre (Revue générale Williams et Griffiths, 1992).

1- Haemophilus

Haemophilus influenzae est une bactérie trouvée dans l'appareil respiratoire des êtres humains (Turk, 1984). Sa capacité à fixer la sérotransferrine dépend de la concentration en fer dans le milieu. En effet, elle pousse dans un milieu pauvre en fer mais pas dans un milieu enrichi en ce dernier (Herrington et Sparling, 1985; Schryvers, 1988 et 1989; Morton et Williams, 1990). *H. influenzae* type b souche Eagan présente une spécificité d'espèce puisqu'elle ne fixe que les sérotransférines humaine et bovine (Morton et Williams, 1990). Schryvers (1989), Stevenson *et al.* (1992) et Holland *et al.* (1992) ont montré que le récepteur de la sérotransferrine des bactéries *H. influenzae* consiste en deux protéines régulées par le fer nommées TBP₁ et TBP₂ (Transferrin Binding Protein). TBP₁ possède une masse moléculaire de 100 kDa et semble fixer plus fortement la sérotransferrine. TBP₂ est plus hétérogène puisque sa masse moléculaire est comprise entre 70 et 90 kDa.

2- Actinobacillus

Gonzales *et al.* (1990) ont montré qu'*Actinobacillus pleuropneumoniae* sérotype 1, 2 et 7 fixent la sérotransferrine porcine par l'intermédiaire de deux protéines membranaires de masse moléculaire 105 et 56 kDa. Ricard *et al.* (1991) ont obtenu des résultats similaires en purifiant, à partir d'*A. pleuropneumoniae*, deux protéines fixant la sérotransferrine de masse moléculaire 99 et 64 kDa. La protéine avec la plus grande masse moléculaire fixe toujours plus fortement la sérotransferrine, mais la plus petite protéine d'*A. pleuropneumoniae* est cependant capable de fixer seule son ligand (Gerlach *et al.*, 1992 a et b).

3- *Neisseria*

Plusieurs protéines, susceptibles d'être le récepteur de la sérotransferrine, régulées par le fer et de masse moléculaire comprise entre 70 et 100 kDa ont été mises en évidence chez *Neisseria meningitidis* et *Neisseria gonorrhoeae* (Norqvist *et al.*, 1978; Mietzner *et al.*, 1984; West et Sparling, 1985). Ces derniers auteurs ont également détecté d'autres protéines additionnelles dont une protéine de 37 kDa qui est le constituant majoritaire de la membrane externe de *N. gonorrhoeae* dans un milieu pauvre en fer. Cette protéine, nommée fbp, a été clonée, son gène a fait l'objet d'une étude structurale (Berish *et al.*, 1990) et il a été exprimé dans *Escherichia coli* (Berish *et al.*, 1992).

Schryvers et Morris (1988) ont les premiers identifié le récepteur de la sérotransferrine de *N. meningitidis* comme étant une protéine de 71 kDa. Des études plus poussées ont montré que le récepteur, en fait, consistait en deux protéines de 98 et 68 kDa (Schryvers et Lee, 1989; Griffiths *et al.*, 1990), cette dernière étant distincte de la protéine de 70 kDa régulée par le fer. Ces deux protéines ont, comme pour *Haemophilus influenzae*, été nommées TBP₁ et TBP₂. TBP₂, dans de nombreux cas cliniques, possède plutôt une masse moléculaire comprise entre 78 et 85 kDa qu'une masse de 68 kDa. Cette protéine dont la séquence partielle a été déterminée grâce à une technique particulière de PCR (Wilton *et al.*, 1993), présente des caractéristiques particulières chez certaines souches de *N. meningitidis* mais pas chez d'autres souches qui ont permis à Rokbi *et al.* (1993) d'affirmer qu'il existe deux familles majeures de bactéries *N. meningitidis*. La séquence en acides aminés de TBP₁ a été également obtenue et cela par analyse chimique directe de la protéine purifiée (Griffiths *et al.*, 1992) et son expression a été réalisée dans *E. coli* (Palmer *et al.*, 1993). Les deux récepteurs ont été localisés, à l'aide d'un microscope électronique, à la surface des méningocoques (Ala'Aldeen *et al.*, 1993).

Récemment, Griffiths *et al.* (1993) ont préparé des anticorps polyclonaux contre les 20 premiers acides aminés des extrémités N-terminales des protéines TBP₁ et TBP₂ de *N.*

meningitidis et ils ont montré que ces anticorps reconnaissent également les protéines TBP₁ et TBP₂ de *N. Gonorrhoeae*.

Enfin, Padda et Schryvers (1990) ont montré que les glycanes de la sérotransferrine n'étaient pas nécessaires à la fixation de cette dernière sur les récepteurs bactériens de *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* et *H. influenzae* et plus récemment encore, Alcantara *et al.* (1993) ont, grâce à des expériences de compétition, déterminé lequel des deux lobes de la sérotransferrine est impliqué dans son interaction avec les récepteurs bactériens précédemment cités. Il s'agit du lobe C-terminal qui est capable de se fixer aux protéines TBP₁ et TBP₂.

4- Autres agents pathogènes

D'autres bactéries Gram négatives et même Gram positives fixent la sérotransferrine. Elles sont citées dans le Tableau III p. 67.

5- Conclusion

La sérotransferrine se fixe sur ses récepteurs bactériens mais n'est pas internalisée (Archibald et de Voe 1979 et 1980; Simonsen *et al.*, 1982; Mc Kenna *et al.*, 1988). Aucun mécanisme de libération du fer dans les bactéries à partir de la sérotransferrine n'a été décrit jusqu'à maintenant. De même, le mécanisme par lequel le fer contrôle l'expression des protéines bactériennes fixant la sérotransferrine n'est pas clair. La seule hypothèse émise est déduite d'un système mis en évidence chez *Escherichia coli* (Griffiths, 1991). Elle implique que les gènes des protéines transportant le fer dans les bactéries seraient arrangés en tandem : ainsi le gène *tbp1* serait en tandem avec le gène *fbp*.

Tableau III : Autres agents pathogènes fixant la sérotransferrine

Bactérie	Masse moléculaire des récepteurs de la sérotransferrine (kDa)	Références
<i>Bordetella pertussis</i>	27 et 32	Menzio <i>et al.</i> , 1991 Redhead <i>et al.</i> , 1991
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	27 et 32	Menzio <i>et al.</i> , 1991
<i>Haemophilus somnus</i>	73, 85 et 105	Ogunnariwo <i>et al.</i> , 1990
<i>Pasteurella haemolytica</i>	71, 77 et 100	Ogunnariwo et Schryvers, 1990
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	45	Modun et Williams, 1992
<i>Listeria monocytogenes</i>	126	Hartford <i>et al.</i> , 1993

ND : non déterminé

B- Le récepteur parasitaire

Le récepteur de la sérotransferrine a été identifié sur les parasites suivants :

- *Plasmodium falciparum* au stade trophozoïte (Rodriguez et Jungery, 1986; Haldar *et al.*, 1986)
- *Leishmania infantum* aux stades amastigote et promastigote (Voyiatzaki et Soteriadou, 1990)
- *Trypanosoma cruzi* au stade amastigote (Lima et Villata, 1990)
- *Trypanosoma brucei* (Webster et Crab, 1988)

Les récepteurs purifiés présentent, comme pour les bactéries, des masses moléculaires hétérogènes allant de 45 kDa pour le récepteur de *Trypanosoma brucei* à 93 ou 102 kDa pour le récepteur de *Plasmodium falciparum* et 200 kDa pour le récepteur de *Trypanosoma cruzi*. De même, ces parasites acquièrent le fer lié à la sérotransferrine selon deux mécanismes différents. Ainsi, la sérotransferrine est endocytée chez *T. cruzi* (Webster et Crab, 1988) alors que chez *P. falciparum*, il y a réduction du fer lié à la sérotransferrine (Fry, 1989).

Récemment, Schell *et al.* (1991) ont localisé le gène codant le récepteur de la sérotransferrine de *T. brucei*. Ils ont montré que ce dernier est sous le contrôle d'un promoteur régulant l'expression de plusieurs glycoprotéines variables de surface.

LE RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE

LE RECEPTEUR DES VERTEBRES

A ce jour, le récepteur de la lactotransferrine a été peu décrit par rapport au récepteur de la sérotransferrine. En effet, seules quelques études portant sur sa caractérisation ou l'observation de la fixation de la lactotransferrine à la surface de certaines cellules ont été publiées. Ces cellules sont les entérocytes ainsi que les cellules du foie, du sang et de la glande mammaire.

I- LES RECEPTEURS LOCALISES SUR LES CELLULES DU FOIE

A- Introduction

La lactotransferrine, libérée par les granules secondaires des leucocytes polymorphonucléaires, est retrouvée dans le sang où sa concentration reste néanmoins peu élevée (20 nM) car elle est rapidement prélevée par les cellules du foie (Bennett et Kokocinsky, 1979; Imber et Pizzo, 1983). Cette rapide clairance de la lactotransferrine est maintenant bien établie et elle constitue une fonction homéostasique hépatique significative. Cependant, le type cellulaire hépatique impliqué dans cette association avec la lactotransferrine n'est pas clairement établi.

B- Etudes préliminaires

Prieels *et al.* (1978) ont initialement proposé que le foie prélevait la lactotransferrine via le récepteur à fucose des cellules parenchymateuses. Cependant, plusieurs études

montrent que la reconnaissance par le foie de la lactotransferrine n'implique pas qu'elle soit glycosylée et plusieurs glycoconjugués portant des résidus de fucose, galactose, N-acétyl glucosamine ou mannose n'inhibent pas l'accumulation, dans le foie de souris, de la lactotransferrine humaine (Imber et Pizzo, 1983). De plus, la lactotransferrine leucocytaire n'est pas fucosylée (Derisbourg *et al.*, 1990) et Moguilevsky *et al.* (1984) ont montré que c'est la partie protéique et non la partie glycanique de la lactotransferrine qui détermine sa clairance hépatique.

Plusieurs auteurs (Courtoy *et al.*, 1984; Imber et Pizzo, 1983; Regoeczi *et al.*, 1985; Moguilevsky, 1987) ont mis en évidence l'accumulation de lactotransferrine dans les hépatocytes, les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales du foie mais le mécanisme par lequel le foie prélève cette glycoprotéine reste inconnu (endocytose ou pinocytose adsorptive).

Enfin, récemment Schmidt *et al.* (1994) ont proposé que les sites de fixation, situés sur les cellules endothéliales du poumon et non du foie, de protéines glycosylées renfermant des cetoses, sont formés de l'association non covalente de la lactotransferrine et d'une protéine ancrée dans la membrane de ces cellules endothéliales, cette protéine, nommée RAGE, appartenant à la superfamille des immunoglobulines.

C- Fixation et endocytose de la lactotransferrine par des hépatocytes de rat

Mc Abee et Esbensen (1991) ont précisé la nature du transport de la lactotransferrine dans le foie. En effet, travaillant sur des hépatocytes isolés de rat, ils ont montré que :

- les hépatocytes fixent la lactotransferrine bovine via deux populations de sites : sites de haute affinité calcium dépendant (K_d : 20 nM, 10^6 sites/cellule) et sites de faible affinité calcium indépendant (K_d : 700nM, 10^7 sites/cellule)

- la fixation est optimale de pH neutre à basique

- les hépatocytes fixent la lactotransferrine indépendamment de son degré de saturation en fer

- les hépatocytes internalisent la lactotransferrine via une endocytose dépendante de la clathrine.

D- Le récepteur remnant

Récemment, un autre site de reconnaissance de la lactotransferrine a été caractérisé sur les cellules parenchymateuses du foie (Ziere *et al.*, 1992).

En effet, Huettinger *et al.* (1988) puis Van Dijk *et al.* (1991) ont montré que la lactotransferrine bloque le prélèvement par le foie des lipoprotéines portant l'apolipoprotéine E (apo E), ce prélèvement hépatique étant normalement médié par un récepteur présent à la surface des cellules parenchymateuses et appelé récepteur remnant. Une comparaison de la séquence en acides aminés de la lactotransferrine et de l'apo E suggère que quatre résidus d'arginine présents dans l'extrémité N-terminale de la lactotransferrine (Metz-Boutigue *et al.*, 1984) seraient impliqués dans l'action compétitive de la lactotransferrine puisque cette séquence ressemble à une séquence riche en arginine trouvée dans l'apo E (Lee *et al.*, 1991).

Afin de déterminer si cette séquence est responsable de la clairance de la lactotransferrine par le foie, Ziere *et al.* (1992) ont injecté par voie intraveineuse à des rats de la lactotransferrine normale puis de la lactotransferrine modifiée au niveau de ses résidus d'arginine par le 1,2 cyclohexanedione. Ces auteurs ont tout d'abord montré que les cellules parenchymateuses contiennent 97% de la lactotransferrine normale injectée, que 40% de la lactotransferrine associée au foie est internalisée au bout de 10 min et que cela prend 180 mn pour internaliser 90% de la lactotransferrine. Un fractionnement subcellulaire indique que la protéine internalisée est transportée dans les lysosomes.

La fixation de la lactotransferrine sur les cellules parenchymateuses isolées est saturable et la constante de dissociation est de 10 μ M ($20 \cdot 10^6$ sites/cellule). La lactotransferrine modifiée par le 1,2 cyclohexanedione est incapable d'inhiber la fixation de la lactotransferrine normale aux cellules parenchymateuses, ce qui indique que les

résidus d'arginine de l'extrémité N-terminale de la lactotransferrine sont essentiels à une reconnaissance spécifique de la lactotransferrine par les cellules parenchymateuses. De plus, cette séquence riche en arginine est à la fois responsable de l'internalisation de la lactotransferrine et de l'inhibition du prélèvement hépatique des lipoprotéines portant l'apo E.

II- LES RECEPTEURS ENTEROCYTAIRES

A- Caractérisation

En 1978, Mason et Taylor ainsi que Isobe *et al.*, travaillant sur des biopsies de duodénum humain, ont décrit la présence de lactotransferrine à la surface des villosités et des cellules cryptiques des entérocytes, cette lactotransferrine provenant fort probablement de la bile (De Vet et Van Gool, 1974; Van Vugt *et al.*, 1975). En 1979, Cox *et al.* ont complété ces travaux en suggérant la présence d'un récepteur spécifique de la lactotransferrine à la surface de l'intestin humain. Puis, plusieurs récepteurs de la lactotransferrine ont été mis en évidence sur la membrane de la bordure en brosse des entérocytes de diverses espèces : le lapin (Mazurier *et al.*, 1985), la souris (Hu *et al.*, 1988 et 1990), le macaque rhésus (Davidson et Lönnerdal, 1988) et le fœtus humain (Kawakami et Lönnerdal, 1991). De même, la fixation spécifique de la lactotransferrine a pu être observée sur plusieurs lignées intestinales (Roiron-Lagroux *et al.*, 1989; Roiron-Lagroux et Figarella, 1990; Derisbourg, 1990). Enfin, les travaux de Mikogami (1993), sur des lignées cellulaires capables de se différencier en entérocytes, ont permis de préciser la nature de ce récepteur entérocytaire humain. En effet, ce dernier a montré que la fixation de la lactotransferrine sur son récepteur n'est pas liée à son degré de saturation en fer et que cette fixation est spécifique puisqu'elle ne résulte pas d'interactions électrostatiques ou lectiniques.

B- Masse moléculaire et glycannes

Seules, les masses moléculaires des récepteurs entérocytaires du lapin (Mazurier et al., 1985) et de la souris (Hu *et al.*, 1988 et 1990) ont été déterminées. Elles sont respectivement de 100 et 130 kDa.

La partie glycanique du récepteur entérocytaire, quant à elle, n'a fait l'objet que d'une seule étude structurale : selon Hu *et al.* (1990) le récepteur entérocytaire murin porterait 12 glycannes bi- ou tri-antennés de type N-acétyllactosaminique.

C- Reconnaissance lactotransferrine-récepteur

1- Affinité

Les constantes de dissociation déterminées par la technique de Scatchard (1949) sont inscrites dans le Tableau IV p. 74. Dans un système homologue, elles varient de $2,9 \cdot 10^{-7}$ M à $9 \cdot 10^{-6}$ M. L'affinité de la lactotransferrine diférique pour son récepteur est beaucoup plus faible que celle de la sérotransferrine pour son propre récepteur (10^{-9} à 10^{-8} M).

2- Spécificité d'espèce

Davidson et Lönnerdal (1988) ont proposé une spécificité d'espèce dans le cadre de la fixation de la lactotransferrine sur son récepteur entérocytaire. En effet, ces auteurs ont montré que les lactotransferrines isolées du lait de singe et de femme se fixent aux membranes de la bordure en brosse de l'intestin de singe mais pas la lactotransferrine bovine. De même, d'autres auteurs (Kawakami et Lönnerdal, 1991) ont mis en évidence, sur les récepteurs entérocytaires du fœtus humain, la fixation de la lactotransferrine humaine et mais pas celle de la lactotransferrine bovine.

Tableau IV : Paramètres de fixation de la lactotransferrine sur les entérocytes et les lignées entérocytaires

Type cellulaire	Kd (M)	Nombre de sites	Références
Entérocytes de lapin	$8,3 \cdot 10^{-7}$	$1,5 \cdot 10^{13} *$	Mazurier <i>et al.</i> , 1985
Entérocytes de souris	$2,9 \cdot 10^{-7}$	$5,3 \cdot 10^{14} *$	Hu <i>et al.</i> , 1988
Entérocytes de singe	$9,0 \cdot 10^{-6}$	$1,8 \cdot 10^{15} *$	Davidson et Lønnerdal, 1988
Entérocytes de foetus humain	$3,3 \cdot 10^{-6}$	$4,3 \cdot 10^{14} *$	Kawakami et Lønnerdal, 1991
HT29-D4	$4,1 \cdot 10^{-7}$	$4,1 \cdot 10^6 **$	Roiron-Lagrourx <i>et al.</i> , 1989
Caco-2	$1,7 \cdot 10^{-6}$	$2,4 \cdot 10^6 **$	Mikogami, 1993
HT29 Glc-Ino ⁺	$1,2 \cdot 10^{-6}$	$7,2 \cdot 10^6 **$	Mikogami, 1993
HT29 c19A	$1,4 \cdot 10^{-6}$	$2,4 \cdot 10^6 **$	Mikogami, 1993
HT29-18-C1	$1,0 \cdot 10^{-6}$	$3,0 \cdot 10^6 **$	Mikogami, 1993

* : nombre de sites de fixation par mg de protéines membranaires

** : nombre de sites de fixation par cellule

Cependant, Hu et al. (1988) viennent infirmer ces résultats en montrant que les lactotransferrines humaine, bovine et murine se fixent de façon similaire aux membranes de la bordure en brosse de l'intestin de souris.

3- Existence d'un récepteur lectinique ?

L'implication des glycanes de la lactotransferrine dans la fixation à son récepteur entérocytaire a fait l'objet de résultats contradictoires. Ainsi chez le Singe, les résidus de fucose de la partie glycanique de la lactotransferrine sont essentiels à la reconnaissance ligand-récepteur, suggérant l'existence d'un récepteur de type lectinique (Davidson et Lönnnerdal, 1988). Cependant, chez la Souris (Hu *et al.*, 1988) de même que chez l'Homme (Kawakami et Lönnnerdal), il semble que les glycanes de la lactotransferrine n'interviennent pas, la lactotransferrine humaine déglycosylée se fixant normalement à son récepteur entérocytaire.

D- Rôle du récepteur entérocytaire : apport de fer ?

Une étude réalisée *in vitro* sur le duodénum humain montre que la lactotransferrine peut délivrer son fer aux entérocytes (Cox *et al.*, 1979). De même, chez le Rat carencé en fer, l'administration de lactotransferrine saturée en fer augmente plus efficacement le taux de fer dans l'organisme que l'administration de sulfate de fer (Kawakami *et al.*, 1988). La lactotransferrine est donc, semble-t-il, capable de délivrer son fer aux entérocytes mais le chemin qu'elle emprunte (endocytose ou transcytose) pour libérer son fer est controversé.

En effet, Derisbourg (1990) montre que la lactotransferrine, après s'être fixée sur ses récepteurs au niveau de la bordure en brosse des cellules HT29 différenciées, pénètre dans la cellule par un mécanisme d'endocytose adsorptive. Elle est alors dégradée dans les lysosomes et les produits de dégradation sont retrouvés à l'extérieur.

Cependant, Roiron-Lagroux et Figarella (1990) n'observent aucune internalisation de la lactotransferrine sur le sous-clone HT29-D4, celle-ci restant fixée à la surface cellulaire.

Mikogami (1993), quant à lui, suggère que le transport trans-épithélial de la lactotransferrine à travers les monocouches des cellules HT29 clone 19A est de type transcellulaire et non paracellulaire. En effet, lors d'expériences réalisées avec la chambre d'Ussing, il montre que la lactotransferrine est transportée du côté apical vers le côté basolatéral via deux voies intracellulaires. La première voie majeure transporte 90% de la lactotransferrine et conduit à la libération du fer de la lactotransferrine, celui-ci étant retenu dans la cellule et les fragments de lactotransferrine dégradée transportés vers le compartiment basolatéral. La seconde voie mineure transporte les 10% restants et permet le passage dans le compartiment basolatéral de la lactotransferrine diférique intacte. Ces derniers résultats sont compatibles avec la présence de lactotransferrine maternelle dans le sang des nouveau-nés. De plus, il suggère que la lactotransferrine et son récepteur entérocytaire pourraient jouer un rôle mineur dans l'absorption du fer.

E- Régulation de l'expression du récepteur entérocytaire de la lactotransferrine

Mikogami (1993) a observé que l'addition d'un chélateur du fer aux cellules HT29-18-C1 entraîne une augmentation de deux fois du nombre de récepteurs de la lactotransferrine, cette augmentation produisant une plus grande incorporation du fer lié à la lactotransferrine. Ce résultat suggère que la biosynthèse du récepteur de la lactotransferrine dans les cellules de l'épithélium intestinal pourrait être régulée par le taux de fer intracellulaire.

III- LES RECEPTEURS LOCALISES SUR LES NEUTROPHILES

L'activation des leucocytes polymorphonucléaires entraîne une libération de la lactotransferrine produite au cours de leur maturation et contenue dans leurs granules

secondaires. Il est envisageable que cette lactotransferrine se fixe alors sur les cellules qui viennent de la libérer puisque plusieurs auteurs ont décrit la fixation spécifique de la lactotransferrine à la surface des neutrophiles.

Maneva *et al.* (1983) ont en effet démontré l'existence de deux sites de fixation pour la lactotransferrine à la surface de ces cellules :

- les premiers sites de haute affinité sont au nombre de $4 \cdot 10^4$ par cellule avec un Kd de $0,44 \cdot 10^{-9}$ M

- les seconds sites de faible affinité sont au nombre de $8 \cdot 10^4$ par cellule avec un Kd de $160 \cdot 10^{-9}$ M

Birgens *et al.* (1984), quant à eux, n'ont mis en évidence qu'un seul type de récepteur à la surface des leucocytes polymorphonucléaires. Celui-ci est présent à raison de $4,6 \cdot 10^6$ sites par cellule et possède une constante de dissociation de $200 \cdot 10^{-9}$ M.

Enfin, Leveugle (1992), grâce à la technique de cytofluorimétrie en flux, montre la présence de récepteurs de faible affinité à la surface des neutrophiles.

Bennett et Davis (1981) sont en opposition avec les trois auteurs précédents. Ils mesurent une fixation importante de la lactotransferrine à la surface des neutrophiles mais celle-ci serait non spécifique.

IV- LES RECEPTEURS LOCALISES SUR LES MONOCYTES ET LES MACROPHAGES

A ce jour, la fixation de la lactotransferrine à la surface des monocytes et des macrophages a fait l'objet de nombreuses études (Bennett et Davis, 1981; Birgens *et al.*, 1983 et 1984; Goavec *et al.*, 1985; Bartal *et al.*, 1987; Oria *et al.*, 1988; Birgens, 1991) qui n'ont cependant pas permis d'établir la nature précise de cette fixation, ni sa signification biologique. En effet, seuls Retegui *et al.* (1984) et Courtoy *et al.* (1984) ont suggéré que le système monocyte/macrophage était impliqué dans la clairance hépatique de la lactotransferrine.

Les travaux portant sur le métabolisme du fer, réalisés sur les macrophages péritonéaux de souris et les monocytes humains, ont montré que la lactotransferrine était capable de céder son fer à la ferritine intracellulaire (Van Snick *et al.*, 1977; Birgens *et al.*, 1988), ce qui supposait l'existence de récepteurs de la lactotransferrine à la surface de ces cellules. Steinman *et al.* (1982) ont confirmé cette hypothèse en révélant l'internalisation de la lactotransferrine par les monocytes humains. De même, le fractionnement subcellulaire réalisé par Birgens *et al.* (1988) a mis en évidence l'accumulation dans les monocytes humains de lactotransferrine, plus précisément dans la fraction lysosomale myéloperoxydase-positif. Enfin, Leveugle (1992), à l'aide de la technique de cytofluorimétrie en flux, met en évidence des récepteurs de faible affinité à la surface des monocytes humains.

Les paramètres de fixation déterminés par la technique de Scatchard (1949) sont représentés dans le tableau V p. 79. La constante de dissociation est très différente selon les expériences et varie de 4,5 à 3560 nM.

Le récepteur des monocytes et des macrophages n'a, à ce jour, pas encore été isolé et plusieurs auteurs, du fait des très faibles affinités mesurées, ont même mis en doute son existence.

En effet pour ces derniers, l'interaction de la lactotransferrine avec les monocytes et les macrophages :

- est réalisée par l'intermédiaire de la partie glycanique de la lactotransferrine d'où une fixation de type lectinique (Bennett et Davis, 1981; Goavec *et al.*, 1985; Leclercq, 1987; Britigan *et al.*, 1991)

- est inhibée quand les cellules sont au préalable traitées avec la désoxyribonucléase, ce qui suggère une interaction de la lactotransferrine avec l'ADN fixé à la surface des cellules (Bennett *et al.*, 1983)

- se fait par l'intermédiaire des lipopolysaccharides bactériens présents à la surface des macrophages (Miyazawa *et al.*, 1991)

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

Type cellulaire	Kd (x 10 ⁻⁷ M)	sites/cellule (x 10 ⁶)	Références
Macrophages alvéolaires humains	ND	2	Markowitz <i>et al.</i> , 1979
Macrophages péritonéaux murins	15	22	Van Snick et Masson, 1976
Macrophages péritonéaux murins	0,28	ND	Imber et Pizzo, 1983
Macrophages alvéolaires humains	17	54	Campbell, 1982
Macrophages alvéolaires humains	5	12	Goavec <i>et al.</i> , 1985
MDM(Monocytes et Macrophages humains)	35,6	34	Britigan <i>et al.</i> , 1991
Monocytes sanguins humains	18	33	Bennett et Davis, 1981
Monocytes sanguins humains	0.045	1,6	Birgens <i>et al.</i> , 1983
Monocytes sanguins humains	4,3	10	Moguilevsky <i>et al.</i> , 1985

ND : non déterminé

De même, Baynes *et al.* (1986), lors d'essais de purification du récepteur des monocytes par passage de membranes marquées à travers une colonne de Lactotransferrine-CNBr-Sepharose, ont montré une association entre le site de fixation de la lactotransferrine et le complexe Ia des antigènes de type cellulaire, ce qui est en accord avec les travaux de Broxmeyer (1979) qui montre *in vitro* que l'activité inhibitrice de la lactotransferrine sur la myélopoïèse est médiée par un effet de la lactotransferrine sur une sous-population de monocytes possédant l'antigène Ia.

Campbell (1982) et Moguevsky *et al.* (1984) ont également suggéré que le récepteur monocyttaire de la lactotransferrine était un récepteur à protéines cationiques puisque d'autres protéines basiques telles que l'élastase, la cathepsine G et le lysozyme dimérique inhibent la fixation de la lactotransferrine sur les monocytes. Cependant, les résultats de Birgens et Kristensen (1990) semblent indiquer que la propriété cationique n'est pas la seule qualité requise lors de la fixation sur le récepteur. En effet, ces auteurs ont montré que la lactotransferrine libérée de la surface des monocytes ne peut plus se fixer à nouveau sur ces mêmes cellules. En conclusion, Birgens (1991) affirme que la lactotransferrine se fixe sur les cellules du système monocyte/macrophage par l'intermédiaire d'un mécanisme de type récepteur. Dans des conditions normales, moins de 10% des récepteurs des monocytes sont occupés mais lors d'une inflammation, la libération en grande quantité de lactotransferrine dans le plasma entraîne une occupation des sites pouvant excéder 50%. Après la fixation et le prélèvement de la lactotransferrine par les monocytes, environ 50% de son fer serait transféré vers la ferritine cytosolique et la lactotransferrine libérée des neutrophiles serait alors impliquée dans la pathogénèse des "anomalies" de cinétique en fer observées lors d'une inflammation.

V - LES RECEPTEURS DE MASSE MOLECULAIRES 105 kDa

A- Les lymphocytes et les thymocytes

1- Le récepteur membranaire

La fixation de la lactotransferrine à la surface d'une population cellulaire enrichie en lymphocytes B humains a été observée pour la première fois par Bennett et Davis en 1981. Ce n'est qu'en 1990, que la présence de lactotransferrine à la surface des cellules B a été confirmée grâce à l'utilisation de la cytofluorimétrie en flux (Butler *et al.*, 1990). Ces auteurs travaillant sur plusieurs préparations lymphocytaires B issues de leucémies chroniques des lymphocytes B, montrent que l'expression de la lactotransferrine à la surface des lymphocytes B est fonction de l'état de maturation de la cellule. Sato *et al.* (1990) viennent compléter la précédente étude en montrant l'incorporation de lactotransferrine dans les lymphocytes B puis sa re-sécrétion graduelle dans le milieu extracellulaire. En dépit de ces résultats et de ceux de Birgens *et al.* (1984) qui décrivent la présence du récepteur lymphocytaire de la lactotransferrine à la surface des cellules B et T, aucune caractérisation de ce récepteur à la surface des lymphocytes B n'a à ce jour été réalisée.

La présence du récepteur de la lactotransferrine a également été décrite à la surface des cellules hématopoïétiques et plus particulièrement sur la lignée K562 par Yamada *et al.* (1987). Ces auteurs montrent que, contrairement au récepteur de la sérotransferrine, le récepteur de la lactotransferrine présent sur les cellules K562 n'est pas régulé par le taux de fer intracellulaire mais est fonction de la prolifération cellulaire. Garré *et al.* (1992), travaillant sur des lysats de cellules K562, ont obtenu, après électrotransfert et reconnaissance par la lactotransferrine marquée à l'iode ^{125}I , une bande présente à la masse moléculaire 120 kDa. Ces mêmes auteurs ont également montré que la lactotransferrine, après sa fixation en surface, est internalisée et est alors retrouvée, grâce

à sa propriété de fixer l'ADN, dans les extraits nucléaires.

Gnezditskaya *et al.* (1984) ont mis en évidence, sur une sous-population de lymphocytes du thymus, la présence de récepteurs de la lactotransferrine et ils ont montré que celle-ci dépendait de la concentration intracellulaire en AMPc. De même, ils ont, les premiers, décrit le rôle joué par la lactotransferrine à la surface des thymocytes humains : *in vitro*, elle induit une augmentation de l'expression des récepteurs à IgG ou à IgM (Gnezditskaya *et al.*, 1987). Zimecki *et al.* (1991), travaillant sur les thymocytes murins, ont démontré l'existence d'un second rôle pour la lactotransferrine. En effet, l'incubation pendant une nuit de thymocytes murins $CD_4^-CD_8^-$ avec de la lactotransferrine humaine permet à ces cellules d'acquérir l'antigène CD_4 caractéristique des cellules auxiliaires.

Les études les plus avancées concernent le récepteur de la lactotransferrine à la surface des cellules T. Elles ont été réalisées au laboratoire. Ainsi dès 1989, Mazurier *et al.* en stimulant les lymphocytes T humains à l'aide de la phytohémagglutinine A ont induit la biosynthèse du récepteur de la lactotransferrine absent des lymphocytes T quiescents. La fixation du ligand sur des membranes solubilisées de lymphocytes T montre que 60% des récepteurs sont intracellulaires. Le récepteur a été purifié par chromatographie d'affinité sur une colonne d'anticorps anti-lactotransferrine : il se présente sous la forme d'une bande unique correspondant à une protéine de masse moléculaire 105 kDa. Ce récepteur est glycosylé : il renferme des glycanes de type N-acétyllactosaminique liés au domaine extracellulaire (Leveugle, 1992).

La lactotransferrine interagit avec le récepteur lymphocytaire (Figure 13 p. 83) des cellules T par l'intermédiaire de son lobe N-terminal (Rochard *et al.*, 1989) et plus particulièrement par l'intermédiaire de deux boucles (résidus 28 à 34 et 38 à 45) localisées dans le domaine N1 (Legrand *et al.*, 1991 et 1992).

Les paramètres de fixation de la lactotransferrine sur les différents types lymphocytaires sont inscrits dans le Tableau VI p 84.

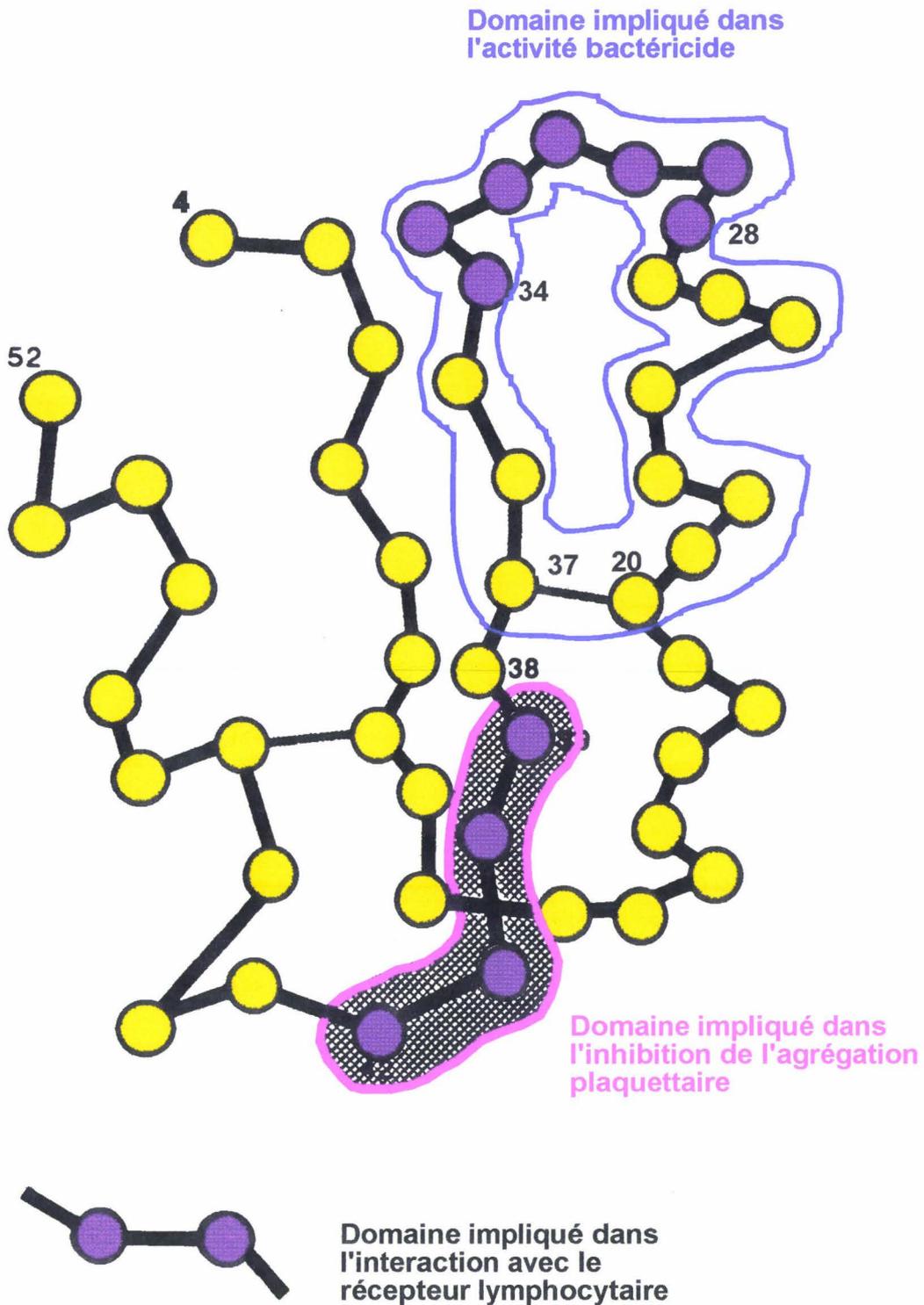


Figure 13 : Relations structure-fonctions de la lactotransferrine humaine. Localisation du site d'interaction avec le récepteur et les domaines impliqués dans l'activité bactéricide et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire.

Tableau VI : Paramètres de fixation de la lactotransferrine sur les lymphocytes

Type cellulaire	Kd ($\times 10^{-9}$)	sites/cellule ($\times 10^6$)	Référence
Lymphocytes B circulants humains	ND	26	Bennett et Davis, 1981
Lymphocytes circulants humains	43	1,9	Birgens <i>et al.</i> , 1984
Lymphoblastes et myéloblastes humains	20	10	Birgens <i>et al.</i> , 1984
Lymphocytes circulants humains activés	80	2	Mazurier <i>et al.</i> , 1989

ND : non déterminé

2- Le récepteur soluble

Leveugle (1992) a mis en évidence la présence de récepteurs solubles de la lactotransferrine dans le milieu de culture de lymphocytes humains activés. Celui-ci a été purifié comme précédemment c'est à dire par passage de milieu de culture filtré et concentré sur une colonne d'anticorps anti- lactotransferrine. Ce récepteur se présente sous la forme d'une protéine monocaténaire de masse moléculaire apparente 100 kDa, la différence de masse avec le récepteur membranaire correspondant au domaine intracytoplasmique perdu.

B- Les cellules de la glande mammaire

1- Caractérisation

Au laboratoire, Rochard (1992), lors de sa thèse de troisième cycle, a mis en évidence, à l'aide des techniques de cytofluorimétrie en flux et de Scatchard (1949), la présence de récepteurs de la lactotransferrine à la surface de tissu sain et de cellules cancéreuses et précancéreuses de glande mammaire.

Les paramètres de fixation obtenus sont décrits dans le Tableau VII p 86 (Rochard *et al.*, 1992; excepté les paramètres de T47D qui font l'objet d'un article en préparation). Ceux-ci, compte-tenu des tailles respectives des cellules, montrent que les lignées cancéreuses MCF-7, BT-20, VBH1, HH9 et T47D possèdent un récepteur de la lactotransferrine de caractéristiques identiques à celles du tissu sain (HBL100) et à celles des cellules précancéreuses de mastoses (NPM14T, NPM21T). Seule, la lignée MDAMB-231 présente une affinité six fois plus faible et un nombre de sites très élevé. Le récepteur de la lactotransferrine ne peut donc être considéré comme un marqueur de la progression tumorale puisque son expression n'est pas augmentée à la surface des

Tableau VII : Paramètres de fixation de la lactotransferrine sur les cellules de la glande mammaire

Cellules	Kd (nM)	sites/cellule (x 10 ⁶)
Cellules cancéreuses		
T47D	120	1,20
MCF7	190	1,18
HH9	340	1,21
BT20	160	1,18
VBH1	288	1,21
MDAMB-231	960	4,80
Cellules précancéreuses de mastose		
NPM14T	288	1,40
NPM21T	350	1,60
Tissu sain		
HBL100	216	1,40

lignées cancéreuses de la glande mammaire et n'est pas altérée par la transformation par l'oncogène hst d'une cellule normale (HBL100) en une cellule cancéreuse (HH9)

La masse moléculaire du récepteur présent à la surface des cellules T47D a été déterminée par immunoprécipitation avec un anticorps polyclonal anti-récepteur lymphocytaire de titre faible : elle est de 126 kDa (Rochard, 1992).

2- Destinée de la lactotransferrine fixée sur les cellules T47D

La lignée T47D, établie à partir d'une effusion pleurale de patiente atteinte du cancer du sein (Keydar *et al.*, 1979), a été plus particulièrement étudiée car elle possède les paramètres de fixation de la lactotransferrine les plus proches de ceux des lymphocytes activés.

Les expériences de cinétique à 37°C et de radiomarquage de la lactotransferrine à l'iode ^{125}I ou au fer ^{59}Fe (Rochard 1992) ont montré que la lactotransferrine ainsi que son fer n'était pas endocytée. Elle se fixe simplement sur son récepteur et son fer est alors libéré dans le milieu extérieur. Ces résultats indiquent que la lactotransferrine ne joue aucun rôle dans la nutrition martiale des cellules T47D mais suggèrent qu'elle peut intervenir dans les mécanismes d'oxydo-réduction membranaire. Les observations faites par Sün *et al.* (1991) lors de fixation de la lactotransferrine aux membranes plasmiques des cellules K562 et Hela semblent confirmer cette hypothèse.

C- Plaquettes

1- Caractérisation du récepteur de la lactotransferrine

L'utilisation de lactotransferrine marquée sur ses glycanes à la fluorescéine (Legrand *et al.*, 1991) a permis à Leveugle (1992) de mettre en évidence au laboratoire, par cytofluorimétrie en flux, une fixation spécifique de cette protéine à la surface des

plaquettes. Cette fixation, observée en présence de 10^{-7} M de lactotransferrine est caractéristique de la présence de récepteurs de haute affinité. Les récepteurs plaquettaires fixent la lactotransferrine quelque soit son degré de saturation en fer. De plus, la fixation de la lactotransferrine diférique est inhibée par l'apolactotransferrine et la lactotransferrine native. Ces résultats montrent que, contrairement à la sérotransferrine, le degré de saturation en fer de la lactotransferrine n'influence pas le mécanisme de reconnaissance de cette protéine par le récepteur plaquettaire.

Ce dernier a été purifié comme décrit précédemment (Mazurier *et al.*, 1989). Comme le récepteur lymphocytaire, il se présente sous la forme d'une chaîne polypeptidique unique de masse moléculaire 105 kDa. L'utilisation du kit de mise en évidence des glycanes (Boehringer Mannheim) a montré que le récepteur plaquettaire est glycosylé. De même, les diverses endoglycosidases et lectines utilisées ont révélé la nature de ces glycanes : le récepteur renferme deux ou trois glycanes liés N-glycosidiquement de type N-acétyllactosaminique.

2- Rôle dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire

Récemment, Mazoyer *et al.* (1990) ont montré que KRDS, un térapeptide localisé entre les acides aminés 39 et 42 du lobe N-terminal de la lactotransferrine humaine, inhibe la sécrétion de sérotonine et par la même, l'agrégation des plaquettes (Figure 13 p. 83).

Cette découverte a amené Leveugle *et al.* (1993) à étudier l'effet sur l'agrégation plaquettaire de la lactotransferrine, de son lobe N-terminal et d'un octodécapeptide composé des acides aminés 20 à 37 du lobe N-terminal. La lactotransferrine à une concentration inférieure à 5nM, soit une concentration compatible avec la quantité de lactotransferrine trouvée dans le plasma après la dégranulation des leucocytes, inhibe l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP. Le lobe N-terminal et l'octodécapeptide inhibent 50% de l'agrégation pour des concentrations respectives de 2 et 20 μ M. Ces

activités inhibitrices sont nettement supérieures à celle observée avec le tétrapeptide KRDS puisque 500 μ M de KRDS sont utilisés pour inhiber 50% de l'agrégation induite par l'ADP.

Enfin, l'activité inhibitrice de la lactotransferrine nécessite sa fixation sur son récepteur plaquettaire et non sur le récepteur de la glycoprotéine GPIIb-IIIa (Leveugle *et al.*, 1993).

LES RECEPTEURS BACTERIEN ET PARASITAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE

I- LE RECEPTEUR BACTERIEN

La lactotransferrine se fixe à de nombreuses bactéries pathogènes et permet, grâce à son apport en fer, la croissance de ces microorganismes (Mickelsen *et al.*, 1982; Brock *et al.*, 1983; Husson *et al.*, 1993). Néanmoins, l'interaction lactotransferrine-bactérie peut également, dans certains cas, induire l'action anti-microbienne de la lactotransferrine. De même, récemment, Soukka *et al.* (1993) ont montré que la lactotransferrine par un mécanisme encore inconnu, mais intégré dans l'activité antibactérienne de cette protéine, est capable d'agglutiner les bactéries *Streptococcus mutans* sérotype c.

A- Identification du récepteur bactérien

A ce jour, le récepteur de la lactotransferrine a été identifié sur toute une variété de bactéries :

- *Triponema pallidum* (Alderete *et al.*, 1988)
- *Haemophilus influenzae* (Schryvers, 1989)

- *Neisseria gonorrhoeae* et *meningitidis* (Schryvers et Lee, 1989)
- *Escherichia coli* (Naidu et al., 1991)
- *Prevotella intermedia* (Kalfas et al., 1991)
- *Bordetella pertussis* et *bronchiseptica* (Redhead et al., 1987; Menozzi et al., 1991)
- *Staphylococcus aureus* (Naidu et al., 1992)

Les paramètres de fixation ainsi que les masses moléculaires des récepteurs sont inscrits dans le tableau VIII p. 91. La masse moléculaire du récepteur bactérien de la lactotransferrine humaine est identique pour les espèces *Neisseria* et *Haemophilus* et est hétérogène pour toutes les autres bactéries, tout comme celle du récepteur de la sérotransferrine humaine.

La fixation de la lactotransferrine à la surface des bactéries a lieu à un pH différent selon les espèces : pH compris entre 4 et 9 pour *S. aureus* (Naidu et al., 1992) et pH compris entre 4 et 7,5 pour *E. coli* (Naidu et al., 1991).

Dans un milieu privé en fer, les bactéries *Neisseria* fixent la lactotransferrine et présentent une activité induite de leur récepteur (Blanton et al., 1990). Néanmoins, la capacité à fixer la lactotransferrine est différente (Mickelsen et al., 1982) pour les méningocoques (100%), les gonocoques (53%) et les commensales (24 à 100%) et la fixation ne dépend pas du degré de saturation en fer de la lactotransferrine (Schryvers et Morris, 1988). Il en est de même pour *E. coli* qui fixe de manière identique l'apolactotransferrine et la lactotransferrine saturée en fer (Naidu et al., 1991).

Récemment, Alcantara et al. (1992) ont mis en évidence le caractère non lectinique du récepteur bactérien de la lactotransferrine. En effet, la lactotransferrine humaine déglycosylée en partie ou totalement par la N-glycosidase F se fixe, comme la lactotransferrine native, sur les bactéries *N. gonorrhoeae* et *meningitidis* et *M. catarrhalis*. De même, Yu et Schryvers (1993) ont montré que plusieurs régions localisées dans les deux lobes de la lactotransferrine sont impliquées dans la fixation de cette protéine sur ses récepteurs bactériens, ce qui diffère de la sérotransferrine pour laquelle seul le lobe C-terminal intervient (Alcantara et al., 1993).

Tableau VIII : Paramètres de fixation de la lactotransferrine sur ses récepteurs bactériens et masse moléculaire de ces derniers

Bactérie	Kd (M)	Sites/cellule	Masse moléculaire (kDa)	Référence
<i>Treponema pallidum</i>	ND	ND	ND	Alderete <i>et al.</i> , 1988
<i>Haemophilus influenzae</i>	ND	ND	105 et 106	Schryvers, 1989
<i>Neisseria gonorrhoeae et meningitidis</i>	ND	ND	105	Schryvers et Lee, 1989
<i>Escherichia coli</i>	$1,4 \cdot 10^{-7}$	54 000	ND	Naidu <i>et al.</i> , 1991
<i>Prevotella intermedia</i>	$5,5 \cdot 10^{-7}$	45 000	ND	Kalfas <i>et al.</i> , 1991
<i>Bordetella pertussis et bronchiseptica</i>	ND	ND	27 et 32	Redhead <i>et al.</i> , 1987 Menozzi <i>et al.</i> , 1991
<i>Staphylococcus aureus</i>	$6,4 \cdot 10^{-8}$ $3,7 \cdot 10^{-9}$	5700	67 et 62	Naidu <i>et al.</i> , 1991

ND : non déterminé

D'autres bactéries fixent la lactotransferrine mais le mécanisme utilisé est semble-t-il non spécifique ou fait intervenir un sidérophore. Ainsi, les bactéries *Vibrio cholerae* fixent la lactotransferrine mais cette fixation est inhibée d'une part fortement par d'autres glycoprotéines fixant le fer comme la sérotransferrine et l'hémoglobine et d'autre part, dans une moindre mesure, par plusieurs monosaccharides (mannose, galactose, fucose et N-acétylgalactosamine) ou par certaines glycoprotéines telles que la fétuine et l'orosomucoïde (Ascencio *et al.*, 1992a).

De même, *Shigella flexneri* fixe la lactotransferrine humaine par l'intermédiaire de porines de masse moléculaire 39, 22 et 16 kDa (Tigyi *et al.*, 1992). *Aeromonas hydrophila* possède des protéines fixant la lactotransferrine de masse moléculaire 40 et 30 kDa quand une préparation chauffée à 100°C de l'enveloppe est utilisée et de masse moléculaire 60 kDa quand la préparation n'est pas portée à ébullition (Kishore *et al.*, 1991), cette fixation étant semble-t-il réalisée par l'intermédiaire de la partie glycanique de la lactotransferrine (Ascencio *et al.*, 1992b). Enfin, *Pseudomonas pseudomallei* utilise une malléobactine pour acquérir le fer de la lactotransferrine (Yang *et al.*, 1993).

B- Rôle du récepteur bactérien dans les activités bactéricide et bactériostatique de la lactotransferrine

La lactotransferrine en se fixant sur son récepteur bactérien peut développer une activité bactéricide (Arnold *et al.*, 1980; Dalamastri *et al.*, 1988). Il en est ainsi pour *Escherichia coli* K₁₂ dont la croissance est inhibée par la lactotransferrine qu'elle soit sous sa forme apo ou sous sa forme saturée en fer (Visca *et al.*, 1990). Cette inhibition est plus importante quand la lactotransferrine est associée à des immunoglobulines de classe G₁ ou A (Spik *et al.*, 1978; Stephens *et al.*, 1980; Rainard, 1986).

L'addition de lactotransferrine et de lysozyme est également bactéricide pour *V. cholerae*, *S. typhimurium* et *E. coli*. En effet, les bactéries *E. coli* exposées à la lactotransferrine et au lysozyme deviennent plus grandes et moins denses, suggérant une

destruction par choc osmotique (Ellison et Giehl, 1991). Récemment, l'utilisation de la microscopie électronique à transmission a permis à Yamauchi *et al.* (1993) de montrer l'effet produit par la lactotransferrine sur les bactéries Gram négatives dont *E. coli*. Ainsi, selon ces auteurs, le contact direct de la lactotransferrine avec ces microorganismes provoque des "boursouflures" sur les membranes externes et entraîne, d'une part, leur altération par la libération des lipopolysaccharides et d'autre part, l'entrée de certains antibiotiques et la destruction des bactéries (Ellison *et al.*, 1988; Nikaido, 1989).

En 1991, Gado *et al.* ont expliqué l'absence d'activité bactéricide de la lactotransferrine vis à vis de certaines souches mutées d'*E. coli*. Ainsi, ils ont mis en évidence une corrélation entre l'absence de fixation de la lactotransferrine sur certaines bactéries mutées *E. coli* et la sensibilité de ces dernières aux colicines, les colicines étant des bactériocines produites par certaines souches d'*E. coli*, différentes des premières, (Konisky, 1982) et étant capables de tuer *E. coli* en s'adsorbant à des récepteurs spécifiques présents sur leurs membranes externes (Kadner *et al.*, 1979; Konisky, 1982).

Les domaines bactéricides des lactotransferrines humaine et bovine ont été identifiés : ils sont localisés dans une boucle de 18 acides aminés formée par un pont disulfure entre les résidus de cystéine 20 et 37 pour la lactotransferrine humaine et 19 et 36 pour la lactotransferrine bovine (Bellamy *et al.*, 1992), les acides aminés 28 à 34 étant également impliqués dans l'interaction de la lactotransferrine humaine avec son récepteur lymphocytaire (Legrand *et al.*, 1992) (Figure 13 p. 83). De même, Bellamy *et al.* (1993) ont montré que l'addition de lactoferricine B (un peptide provenant du clivage enzymatique de la lactotransferrine bovine) à des bactéries *Candida albicans* entraîne leur mort due à la perte de leur capacité à former des colonies.

Notons également que la lactotransferrine possède, en plus de son activité bactéricide, une activité bactériostatique qu'elle exerce seule ou en combinaison avec d'autres protéines telles que le lysozyme et certains anticorps (Revue générale Spik et Montreuil, 1983; Sanchez *et al.*, 1992).

II- LE RECEPTEUR PARASITAIRE

Il n'a été mis en évidence qu'à la surface de deux parasites: *Trichomonas vaginalis* (Peterson et Alderete, 1984) et *Trypanosoma cruzi* (Lima et Kierszenbaum, 1985).

T. vaginalis possède une faible affinité pour la lactotransferrine humaine (Kd : 1 μ M; 90 000 sites par cellule). Cependant, une réponse à la fixation de cette protéine a pu être observée : il y a multiplication par 6 de l'activité pyruvate/ferrodoxine oxydo-réductase, enzyme intervenant dans le métabolisme énergétique de ce protozoaire. Deux protéines impliquées dans l'interaction avec la lactotransferrine ont été purifiées : elles possèdent une masse moléculaire de 178 et 75 kDa (Peterson et Alderete, 1984).

T. cruzi présente un récepteur particulier de la lactotransferrine. En effet, Lima et Kierszenbaum (1985) ont montré que la lactotransferrine se lie à la fois au récepteur monocyttaire et au récepteur parasitaire. Elle joue ainsi un rôle de "pontage" et facilite la phagocytose des trypanosomes par les monocytes.

CONCLUSION

Comme nous venons de le voir, le récepteur de la lactotransferrine n'est pas aussi bien décrit que celui de la sérotransferrine. Ils présentent néanmoins des points communs qui sont les suivants :

- leur caractérisation à la surface de lymphocytes T activés par la phytohémagglutinine A (Pelosi *et al.*, 1986; Mazurier *et al.*, 1989; Pattanapayasat et Hoy, 1991)
- l'apport de fer aux cellules (Morgan, 1981; Baker *et al.*, 1988; Cox *et al.*, 1979; Richardson et Baker, 1990)
- l'existence de récepteurs parasitaires et bactériens (Williams et Griffiths, 1992)

- la régulation de leur expression liée au taux de fer intracellulaire suggérée par Mikogami (1993) pour le récepteur de la lactotransferrine et parfaitement décrite par de nombreux auteurs pour le récepteur de la sérotransferrine.

La structure des glycanes du récepteur de la sérotransferrine est bien connue (Orberger *et al.*, 1992) alors que seuls Hu *et al.* (1990) et Leveugle (1992) ont montré que le récepteur de la lactotransferrine était glycosylé et renfermait des glycanes de type N-acétyllactosaminique.

Enfin, la séquence primaire du récepteur de la sérotransferrine a été déterminée, la localisation chromosomique du gène codant ce récepteur a été réalisée et la régulation de son expression a été étudiée. Concernant le récepteur de la lactotransferrine, aucune de ces études n'a été publiée. Une partie de ce travail nous a d'ailleurs été confiée puisque notre but était de cloner le récepteur de la lactotransferrine humaine ou tout du moins d'effectuer les nombreuses études préliminaires nécessaires à ce clonage, à savoir la préparation de sondes et le choix de la cellule de départ, ce travail nécessitant tout d'abord l'obtention en quantité suffisante de récepteur de la lactotransferrine et par conséquent la mise au point préalable d'une technique de purification de ce récepteur.

LES MEGACARYOCYTES ET LES PLAQUETTES COMME MODELES

EXPERIMENTAUX

La découverte du récepteur plaquettaire de la lactotransferrine (Leveugle *et al.*, 1993) nous a amené à étudier les cellules précurseurs des plaquettes, les mégacaryocytes et plus particulièrement la lignée mégacaryoblastique Dami.

L'utilisation des plaquettes et des cellules Dami lors de nos manipulations implique la connaissance de leurs caractéristiques biologiques, biochimiques et immunologiques. C'est pourquoi, nous allons les développer dans ce chapitre avec tout d'abord une description des mégacaryocytes présents dans la moelle osseuse.

I- LES MEGACARYOCYTES ET LES LIGNEES CELLULAIRES POSSEDANT LES MEMES MARQUEURS

A- Les mégacaryocytes

1- Isolement et caractérisation

Les mégacaryocytes représentent de 0,03 à 0,6 % des cellules nucléées de la moelle. Leur diamètre est habituellement de 33,8 ou 51,6 μm (Berkow *et al.*, 1984). Leur isolement, difficile à mettre en oeuvre du fait de leur faible représentativité, nécessite plusieurs centrifugations en gradient de densité suivies d'une élutriation (Berkow *et al.*, 1984) ou de deux sédimentations (Levine et Fedorko, 1978).

2- Les différents stades de maturation

Les mégacaryocytes ont pour origine des progéniteurs appelées CFU-MK (Colony Forming Unit-Megacaryocyte). Ces CFU-MK donnent ensuite naissance aux promégacaryoblastes encore nommés mégacaryocytes précoces. Ces précurseurs se transforment alors en mégacaryocytes qui présentent, quant à eux, quatre stades de maturation (Breton-Gorius et Vainchenker, 1986). Les caractéristiques morphologiques des promégacaryoblastes et des mégacaryocytes sont décrits dans le Tableau IX p 98.

3- Degré de ploïdie

Le passage du stade I au stade IV s'accompagne d'une augmentation de la taille et du degré de ploïdie de la cellule, les mégacaryocytes étant des cellules polyploïdes.

Ainsi au stade I, les cellules passent d'un degré de ploïdie 2N à un degré de ploïdie 4N ou 8N. Les cellules continuent alors de synthétiser de l'ADN mais elles sont incapables de se diviser. Les noyaux deviennent donc polyploïdes après une série d'endomitoses, certains mégacaryocytes du stade IV ayant un degré de ploïdie 64N (Williams et Levine, 1982; Breton-Gorius et Vainchenker, 1986).

4- Marqueurs de surface

Comme nous venons de le voir, il est possible, sur la base de critères morphologiques, de distinguer les promégacaryoblastes des mégacaryocytes. Une autre technique permet d'obtenir un résultat similaire : il s'agit de l'immunofluorescence qui révèle les différents marqueurs cellulaires .

Ainsi, la glycoprotéine GP Ib est, selon les auteurs, présente (Rabellino et al., 1981; Breton-Gorius et al., 1983) ou absente de la surface des promégacaryoblastes (Vinci et al., 1984).

Tableau IX : Aspects morphologiques des promégacaryoblastes et des mégacaryocytes

Stade	Type cellulaire	Caractéristiques
	Promégacaryoblaste ou Mégacaryocyte précoce	Diamètre : 10-15 μm Noyau rond non segmenté Petit nucléole Rapport nucléaire/cytoplasmique élevé Nombreux ribosomes
I	Mégacaryoblaste ou Mégacaryocyte immature	Diamètre supérieure à 14 μm Noyau lobé Cytoplasme basophile
II	Mégacaryocyte basophile ou Promégacaryocyte ou Mégacaryocyte immature	Noyau segmenté Basophilie intense Granules azurophiles autour du centrosome
III	Mégacaryocyte granulocytaire ou Mégacaryocyte ou Mégacaryocyte mature	Noyau multilobé Cytoplasme acidophile Nombreux granules azurophiles
IV	Mégacaryocyte produisant des plaquettes ou Mégacaryocyte mature	Groupes de 10-12 granules azurophiles

A l'inverse les glycoprotéines GP IIb et IIIa sont déjà mises en évidence chez les progéniteurs CFU-MK (Jenkins *et al.*, 1986). Ainsi, afin d'analyser les mécanismes qui régulent la différenciation des mégacaryocytes, le gène codant la glycoprotéine GP IIb, du fait de son expression à un stade précoce du développement, a été isolé et son promoteur a été caractérisé. Ce promoteur contient des éléments cis activateurs positifs et négatifs qui expliquent l'expression tissu spécifique du gène (Marguerie *et al.*, 1991).

Le facteur plaquettaire 4 ainsi que le récepteur Fc des immunoglobulines de classe G (Rabellino *et al.*, 1981) sont présents chez les promégacaryoblastes et les mégacaryocytes.

Il en est de même pour la peroxydase plaquettaire qui apparaît encore plus tôt que les glycoprotéines GP IIb et IIIa (Koike *et al.*, 1987).

Le récepteur de la sérotransferrine, quant à lui, est présent sur les promégacaryoblastes mais absent sur les mégacaryocytes, cette disparition étant fort probablement liée au processus de différenciation (Vinci *et al.*, 1984).

De même, l'antigène CD 34 est exprimé chez les progéniteurs des mégacaryocytes puis disparaît et cela seulement après l'apparition en surface de la glycoprotéine GP IIIa (Debili *et al.*, 1992).

Nous pouvons remarquer que de nombreux marqueurs plaquettares sont retrouvés chez les mégacaryocytes et même chez les promégacaryoblastes. Les plaquettes disposant d'un appareil de synthèse protéique vestige, la plupart des composés fonctionnels et structuraux de ces cellules dérivent donc des mégacaryocytes.

Nous expliquerons dans le chapitre II le processus qui permet le passage mégacaryocyte-plaquettes. Nous allons maintenant étudier les lignées cellulaires portant des marqueurs mégacaryocytaires.

B- Les lignées portant des marqueurs de surface mégacaryocytaires

Elles sont au nombre de six :

- HEL (Rimmer et Horton, 1984; Tabilio *et al.*, 1984)
- MEG-01 (Ogura *et al.*, 1985)
- K-562 (Lozzio *et al.*, 1981; Tabilio *et al.*, 1983; Tetteroo *et al.*, 1984)
- LAMA-84 (Seigneurin *et al.*, 1987)
- EST-IU (Sledge *et al.*, 1986)
- DAMI (Greenberg *et al.*, 1988).

Leur origine, les marqueurs mégacaryocytaires qu'elles portent ainsi que les caractères appartenant à d'autres types cellulaires que les mégacaryocytes mais qu'elles présentent néanmoins en surface sont décrits dans le Tableau X p. 101.

Les deux dernières lignées, du fait de l'absence à leur surface d'autres marqueurs que ceux portés par les mégacaryocytes ou les plaquettes, sont plus intéressantes. Cependant la lignée EST-IU n'a eu une viabilité en culture que de six mois. C'est pourquoi nous nous sommes intéressée à la lignée Dami.

Celle-ci renferme des cellules dont le diamètre varie de 12 à 120 μm et dont le degré de ploïdie est majoritairement 2N ou 4N. Son temps de doublement est compris entre 24 et 30 h et les cellules possèdent un stade de développement commun aux mégacaryoblastes et aux mégacaryocytes immatures. En effet, seule une petite proportion des cellules présente un degré de ploïdie élevé et la membrane de démarcation (qui est à l'origine de la libération des plaquettes) est absente de la lignée Dami (Greenberg *et al.*, 1988).

L'addition de PMA (Phorbol Myristate Acétate) à cette lignée induit l'endomitose qui génère des cellules avec un degré de ploïdie de 54N ou 64N. Cette endomitose est inhibée par l'addition de TGF β (Transforming Growth Factor β) (Greenberg *et al.*, 1990).

Tableau X : Lignées cellulaires humaines portant des caractères mégacaryocytaires

Lignée	Origine	GP IIb/IIIa	GPIb	Autres caractères
HEL	Maladie de Hodgkin dégénéralant en leucémie	+	+ mais sur peu de cellules et la MM(*) est inférieure	Erythrocyte Granulocyte Monocyte
MEG-01	Leucémie chronique	+	+	Lymphocyte B
K-562	Leucémie myéloïde chronique	+	-	Erythrocyte Granulocyte Monocyte
LAMA 84	Leucémie myéloïde chronique	+ sur seulement 50 % des cellules	-	Erythrocyte
EST-IU	Leucémie mégacaryocytaire	+	+	
DAMI	Leucémie mégacaryoblastique	+	+	

(*) Masse moléculaire

Monté *et al.* (1991) ont caractérisé à la surface de cette lignée le récepteur de l'interféron γ . Celui-ci possède une masse moléculaire de 90 kDa et est présent à raison de 11000 sites par cellule avec une constante de dissociation de $3 \cdot 10^{-10}$ M.

Enfin, Vittet *et al.* (1992) ont montré, grâce à l'étude de la libération de deux seconds messagers (calcium, AMPc), que les cellules Dami fixent l'adénosine diphosphate, la thrombine, l'épinéphrine et la prostaglandine E_1 .

II- LES PLAQUETTES

A- Origine

Les plaquettes sont les plus petits éléments figurés du sang. A ce jour, nous pouvons affirmer qu'ils sont issus de la fragmentation des mégacaryocytes. En effet, dès 1910 Wright avait émis une hypothèse concernant la naissance des plaquettes : celles-ci seraient formées à la suite de la fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes médullaires. Cette hypothèse n'a cependant été confirmée que beaucoup plus tard avec les travaux de Scurfield et Radley (1981) et Handagama *et al.* (1986).

L'étape initiale de la libération des plaquettes est la transformation dans la moelle des mégacaryocytes matures sphériques en des cellules de forme irrégulière et portant des protusions cytoplasmiques (Behnke et Pederson, 1974). Ces protusions appelées proplaquettes seraient ensuite libérées dans le sang pour fournir une cohorte de précurseurs plaquettaires (Handagama *et al.*, 1986).

Néanmoins, la perte dans la moelle d'un "pool" de plaquettes rapidement mobilisable a conduit Behnke et Pederson (1974) à émettre l'idée suivante : la moelle ne serait pas le seul site de production des plaquettes. Ceux-ci ont été rejoints dans leur hypothèse par plusieurs auteurs pour lesquels 7 % des plaquettes circulantes seraient produites au niveau du système vasculaire des poumons à partir de mégacaryocytes et de

proplaquettes qui auraient quitté la moelle (Kaufman *et al.*, 1965; Tavassoli et Aoki, 1981; Handagama *et al.*, 1987).

La libération des plaquettes semble régulée par plusieurs facteurs qui modulent les réactions cellulaires ayant lieu lors des différents stades de maturation des mégacaryocytes (Gewirtz et Hoffman, 1990). De même, il est évident que certains constituants plaquettaires, comme le facteur plaquettaire 4, sont impliqués dans la régulation négative de la mégacaryocytopoïèse, cette action inhibitrice s'exerçant principalement sur les précurseurs CFU-MK des cellules mégacaryocytaires (Han *et al.*, 1990 a et b; 1991). Notons que le facteur plaquettaire 4 inhibe également l'angiogenèse (Maione *et al.*, 1990) par un mécanisme semble-t-il identique à celui qu'il utilise pour affecter la mégacaryocytopoïèse. Ce résultat, combiné au fait que les mégacaryocytes et les cellules endothéliales possèdent des antigènes communs et présentent des similarités dans la régulation de leur croissance, a amené Han et Caen (1993) à se demander si les mégacaryocytes et les plaquettes ne seraient pas des cellules soeurs.

B- Structure générale

Les plaquettes sont dépourvues d'ADN puisque sans noyau mais elles contiennent quelques traces d'ARN.

Elles renferment un grand nombre de granules et d'organelles subcellulaires (mitochondries, peroxyosomes et particules de glycogène). Trois sortes de granules peuvent être observés :

- les granules denses contenant de l'ADP, de l'ATP, de la sérotonine, des catécholamines et des cations (Ca^{2+} , Mg^{2+})
- les granules α renfermant le fibrinogène plaquettaire, la β -thromboglobuline, la thrombospondine, le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) et le PF4 (Platelet Factor 4) qui neutralise l'héparine

- les lysosomes contenant des hydrolases acides et des cathepsines (voir Revue Générale de Blache, 1992).

De même, leur membrane externe renferme des glycoprotéines qui interviennent dans les interactions avec des protéines ou avec d'autres cellules. Ainsi, ces glycoprotéines servent de récepteurs pour de nombreuses molécules qui activent les plaquettes (Nurden et Caen, 1975; Shattil et Bennett, 1980; Hourani et Cusack, 1991).

Un des premiers récepteurs à avoir été identifié et aussi un des plus abondants est la glycoprotéine GPIIb-IIIa (Phillips *et al.*, 1988). Plusieurs mécanismes peuvent activer ce complexe : citons seulement l'hydrolyse des phosphoinositides membranaires dépendante de la protéine G (Shattil et Brass, 1987). Le complexe activé GPIIb-IIIa peut fixer quatre protéines différentes : le fibrinogène, la fibronectine, le facteur de Willebrand et la vitronectine (Phillips *et al.*, 1988).

Le système GP IIb-IIIa, bien qu'étant le récepteur le mieux caractérisé, n'est pas le seul présent à la surface des plaquettes activées. Ainsi, une protéine, appelée PADGEM (Platelet-Activation-Dependent Granule to External Membrane Protein) et détectée dans les granules α des plaquettes non stimulées (Berman *et al.*, 1986), apparaît sur la membrane externe de ces dernières après activation (Sims *et al.*, 1988). Le récepteur PADGEM interviendrait semble-t-il dans les interactions des plaquettes activées et des cellules endothéliales avec les monocytes et les neutrophiles (Larsen *et al.*, 1990).

C- Les réponses physiologiques

Plusieurs agonistes sont capables de stimuler les plaquettes. Il s'agit entre autres de l'ADP, de la sérotonine, du thromboxane et du PAF (Platelet Aggregating Factor). Tous ces agonistes sont supposés exercer leurs effets grâce à des interactions avec les récepteurs spécifiques localisés sur la membrane plasmique.

Les réponses des plaquettes consistent en une ou plusieurs des trois réactions décrites ci-dessous (voir Revue Générale Blache, 1992).

1- Le changement de forme

Au cours d'un changement de forme, la plaquette subit une restructuration avec la formation de pseudopodes. Cet évènement qui est associé à une complète réorganisation du cytosquelette de la plaquette représente la réponse plaquettaire la plus sensible aux faibles doses d'agonistes.

2- L'agrégation plaquettaire

Elle peut être facilement mesurée par la méthode spectrophotométrique de Born et Cross (1963) : quand un agoniste est ajouté dans la suspension plaquettaire sous agitation et thermostatée à 37 °C, l'agrégation des plaquettes se traduit par une augmentation de la transmission lumineuse.

Quand l'agrégation est le seul phénomène faisant suite à l'addition d'un agoniste à une suspension plaquettaire, il y a agrégation primaire. Le terme d'agrégation secondaire est, quant à lui, réservé à l'agrégation avec sécrétion du matériel contenu dans les granules denses.

3- La sécrétion plaquettaire

Elle est le reflet de la libération des différents granules plaquettaires par exocytose. Du fait de la grande variété des substances libérables, il existe plusieurs méthodes capables d'apprécier la sécrétion des granules plaquettaires. Citons seulement la mesure de la libération du PF4 (Platelet Factor 4) qui permet d'apprécier l'hyperréactivité plaquettaire *in vitro* et la mesure de la libération de sérotonine radiomarquée, préincorporée dans les plaquettes et sécrétée lors de la stimulation (Costa et Murphy, 1975).

D- Les concentrés plaquettaires

Les plaquettes que nous avons utilisées lors de nos manipulations proviennent de concentrés plaquettaires généreusement fournis par le CRTS de Lille. C'est pourquoi, nous allons développer dans ce chapitre quelques informations les concernant.

Les concentrés plaquettaires sont préparés selon la méthode de Pieterz *et al.* (1988) après conservation du sang une nuit à 20°C ou selon une technique impliquant plusieurs centrifugations successives. Les résultats obtenus montrent que la première technique permet d'obtenir des concentrés plaquettaires avec très peu de leucocytes contaminants (Booth *et al.*, 1992) et une activité coagulante plus que satisfaisante.

La structure ainsi que le métabolisme des plaquettes sont sujets à des variations entre le moment où le sang est prélevé et l'administration du concentré au patient (Seghatchian et Brozovic, 1992). Afin de lutter contre ces variations, Bertolini *et al.* (1992) ont développé une stratégie qui permet d'amener dans de bonnes conditions la période de stockage à 14 jours. En effet, ces auteurs, par l'addition de différents facteurs tels que les prostaglandines, la théophylline ainsi que certaines solutions exemptes de protéines plaquettaires, empêchent l'activation des plaquettes et inhibent l'action des facteurs de coagulation, des enzymes fibrinolytiques et des composants du complément.

En dépit de cette solution aux problèmes de stockage des concentrés plaquettaires, ceux-ci doivent néanmoins être testés d'un point de vue qualitatif et plusieurs types de test sont réalisés : la mesure du volume plaquettaire (Brozovic *et al.*, 1992), la numération des plaquettes ainsi que l'évaluation du bon "fonctionnement" de ces cellules.

Travaux Personnels

PREPARATION D'UN ANTICORPS MONOCLONAL DIRIGE CONTRE LE
RECEPTEUR SOLUBLE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE ET
MISE EN EVIDENCE DE SA SPECIFICITE

I- INTRODUCTION

Au laboratoire, le récepteur de la lactotransferrine humaine a été caractérisé sur plusieurs types cellulaires (lymphocytes activés, lignée lymphocytaire T Jurkat, plaquettes et cellules de la glande mammaire notamment) grâce à l'utilisation de la cytofluorimétrie en flux, après fixation à la surface des cellules de la lactotransferrine ou d'anticorps polyclonaux anti-récepteur lymphocytaire (Leveugle, 1992; Bi *et al.* (1994), Rochard, 1992; Leveugle *et al.* 1993; Rochard *et al.*, 1993). Néanmoins, l'emploi de ces anticorps de titre faible, lors d'immunorévélation réalisées après électrophorèse en gel de polyacrylamide de lysats cellulaires et électrotransfert, ne permet pas d'obtenir une bande unique de masse moléculaire 105 kDa, soit la masse moléculaire du récepteur.

De même, une chromatographie d'affinité réalisée sur une colonne d'anticorps anti-lactotransferrine humaine ne fournit, à partir d'un lysat cellulaire, qu'une fraction partiellement purifiée du récepteur de la lactotransferrine humaine (Mazurier *et al.*, 1989).

Au vu de ces résultats, il nous a donc semblé indispensable de disposer d'un anticorps anti-récepteur qui nous permettrait d'obtenir, par chromatographie d'immuno-affinité, une fraction ne renfermant que le récepteur de la lactotransferrine. Notre choix s'est porté sur un anticorps de type monoclonal. Celui-ci a été préparé par le docteur Collard au Centre d'Economie Rurale de Marloie (Belgique), à partir d'une fraction élue par du tampon PBS urée 6 M d'une colonne d'anticorps anti-lactotransferrine immobilisés et renfermant le récepteur soluble de la lactotransferrine issu des cellules Jurkat.

II- MODE OPERATOIRE

A- Préparation du récepteur soluble

1- Concentration du milieu de culture

Le milieu de culture provenant des cellules Jurkat est au fur et à mesure stocké à -20°C en présence de diisopropyl fluorophosphate (10 µg/ml). Vingt litres de milieu de culture sont ensuite décongelés, passés sur un filtre de 0,2 µm de porosité (Millipore) puis concentrés 20 fois sur un appareil d'ultrafiltration (Oméga) dont le point de coupure est de 30 kDa.

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

La purification est réalisée à 4°C en présence d'anti-protéases (Figure 14 p.109). 50 ml de milieu de culture concentré sont incubés, sous agitation rotative, en présence de 1 mg de lactotransferrine. Au bout d'une heure d'incubation, 15 ml d'anticorps anti-lactotransferrine couplés à de la Sepharose 4B sont ajoutés et le tout est placé sous agitation douce pendant une nuit à 4°C. Le gel est alors transvasé dans une colonne et lavé par 150 ml de PBS puis par 60 ml de PBS urée 2 M. Le récepteur est enfin élué par 23 ml de PBS urée 6 M puis dialysé contre du PBS. La fraction urée 6 M est soit directement congelée, soit précipitée à l'ATCA et analysée en gel de polyacrylamide.

B- Production des anticorps monoclonaux

1- Immunsation

Des souris Balb/c sont immunisées par voie intrapéritonéale avec chacune 30 µg de

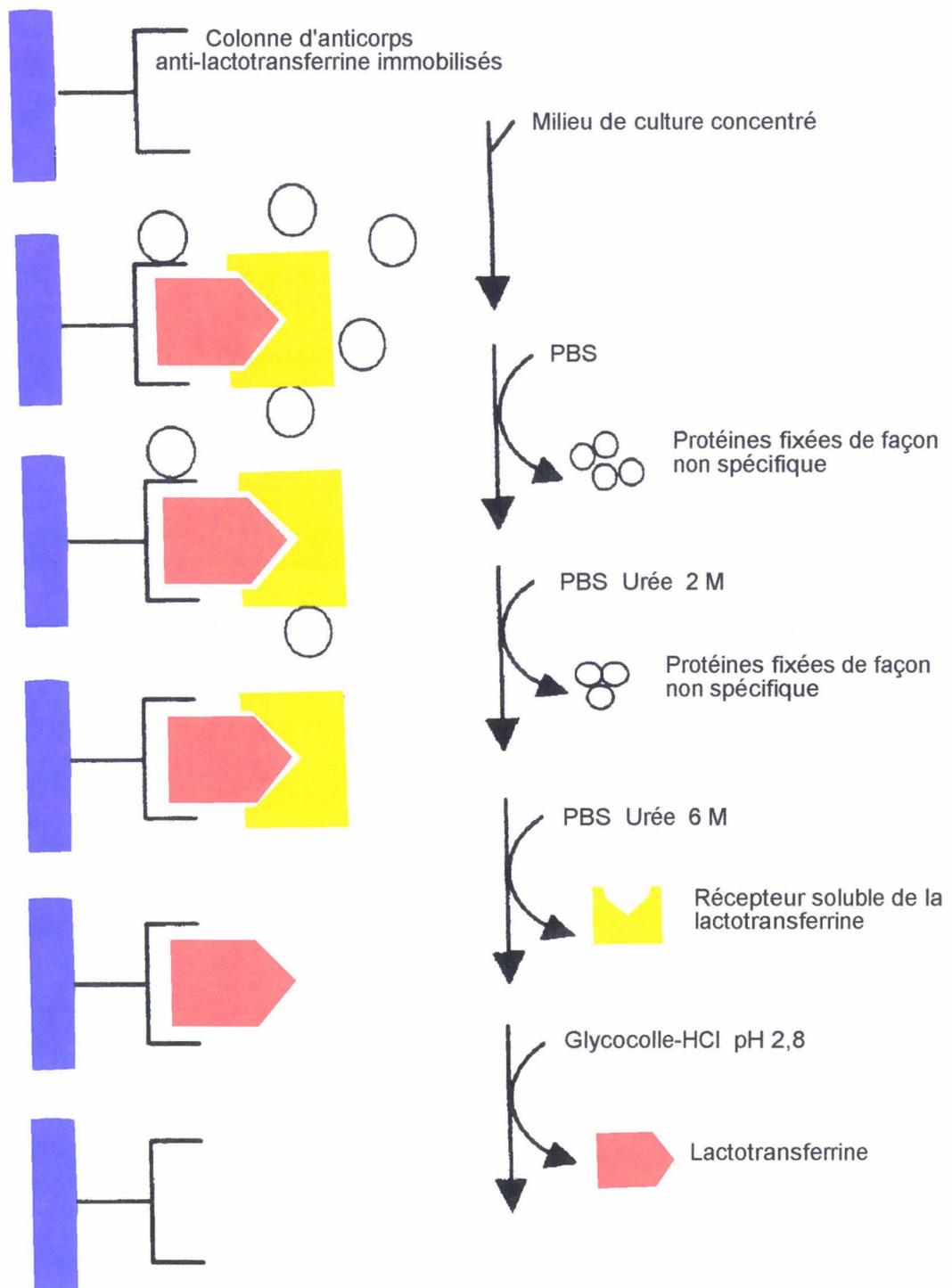


Figure 14 : Chromatographie d'affinité du récepteur soluble de la lactotransferrine sur une colonne d'anticorps anti-lactotransferrine immobilisés (Leveugle, 1992).

fraction partiellement purifiée de récepteur soluble anti-lactotransferrine de cellules Jurkat dilués dans 200 µl d'une solution de PBS/adjuvant complet de Freund (v/v). Cinq autres injections avec de l'adjuvant incomplet cette fois sont ensuite réalisées avec un intervalle de 3 semaines entre chaque injection. Quatre jours après la dernière injection réalisée sans adjuvant, la rate est prélevée puis fusionnée selon la méthode de Kohler et Milstein (1975). Les hybridomes obtenus sont clonés par la technique de dilution limite et l'isotype des anticorps sécrétés est déterminé par la technique ELISA faisant intervenir le coffret de détermination de l'isotype des anticorps monoclonaux de souris (Amersham).

2- Criblage des clones par la méthode ELISA

La sérum albumine bovine (SAB) et la lactotransferrine (LTF) ayant été identifiées dans la fraction de récepteur qui a été utilisée lors de l'immunisation, il s'avérait utile de cribler les clones afin de sélectionner ceux qui ne produisent pas d'anticorps dirigés contre ces deux protéines.

a- Recherche des clones sécrétant des anticorps anti-SAB

La mise en place de la méthode ELISA nécessite tout d'abord l'activation de la plaque de microtitration (Nunc maxisorb). Cette étape est réalisée par addition dans chaque puits de 100 µl d'une solution de PBS renfermant 1 µg/ml de SAB (Sigma) puis la plaque est stockée pendant une nuit à 4°C. 200 µl d'hydrolysate de caséine (Bio X 231) sont alors ajoutés dans chaque puits afin d'empêcher les fixations non spécifiques et la plaque est incubée pendant 30 min à température ambiante. Après 3 lavages en présence de PBS-Tween 20 0,1% (v/v), 100 µl de surnageant de culture des différents clones sont ajoutés et la plaque est incubée pendant 1 h toujours à température ambiante. Les anticorps

monoclonaux fixés sont, à ce stade, détectés grâce à l'addition, à raison de 100 µl/puit, d'anticorps anti- immunoglobulines de souris marqués à la peroxydase (Boehringer), suivie d'une révélation colorée en présence d'une solution d'acétate de sodium 1 M renfermant 0,03 % d'H₂O₂ (v/v) et 0,01% de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (v/v) (Sigma).

b- Recherche des clones sécrétant des anticorps anti-LTf humaine

Seuls les surnageants de culture des clones ne sécrétant pas d'anticorps anti-sérum albumine bovine sont testés. La méthode utilisée est identique à celle décrite ci-dessus si ce n'est la solution d'activation de la plaque qui diffère : il s'agit d'un tampon PBS renfermant 0,1 µg/ml de lactotransferrine humaine.

c- Recherche des clones sécrétant des anticorps dirigés contre une protéine de surface des cellules Jurkat

Les surnageants de culture testés sont ceux qui se sont révélés négatifs lors des deux précédents criblages. La méthode utilisée est toujours la technique ELISA. Elle fait intervenir les cellules Jurkat à partir desquelles le récepteur, utilisé lors de l'immunisation des souris, a été préparé.

La technologie est la suivante :

Les cellules Jurkat sont déposées dans les puits à fond rond d'une plaque de microtitration à raison de 10⁶ cellules par puits. La plaque est alors centrifugée à 1200 t/min pendant 15 min à 4°C (rotor Sorvall H2000). Les surnageants sont éliminés et les cellules sont resuspendues dans du PBS, NaN₃ 0,1% (200 µl par puit à 4°C), le rôle de NaN₃ étant de bloquer le métabolisme des cellules et d'éviter ainsi l'endocytose des immunoglobulines. La plaque est à nouveau centrifugée et lavée deux fois et les cellules sont resuspendues dans l'un ou l'autre des surnageants de culture des clones (180

µl de surnageant + 20 µl de PBS, NaN₃ 0,1% par puits). La plaque est alors incubée pendant une heure à 4°C puis les cellules sont centrifugées et lavées dans du PBS, NaN₃ comme décrit précédemment. Enfin, les cellules sont resuspendues dans une solution renfermant des anticorps anti-Ig G de souris marqués au FITC et incubées pendant une heure à 4°C. Après deux centrifugations et deux lavages, les cellules sont observées au microscope inversé à lampe UV.

3- Recherche des clones sécrétant des anticorps anti-récepteur

Les surnageants de culture testés ne contiennent pas d'une part, d'anticorps anti-SAB et d'autre part, d'anticorps anti-LTF.

Des expériences de "western blot" sont réalisées à partir d'un lysat plaquettaire préparé selon le protocole décrit dans l'appendice technique p. A3 . La technique de "western" blot, décrite p. A3 à A5, fait intervenir les surnageants de culture des clones en lieu et place du premier anticorps lors de la détection immunologique des protéines.

4- Amplification d'un clone positif

Le clone sélectionné est amplifié et injecté dans la cavité péritonéale d'une souris afin de produire des quantités importantes d'anticorps. Ces anticorps sont purifiés par chromatographie de gel filtration sur une colonne de Superdex 200 (Pharmacia).

C- Détermination des conditions d'utilisation de l'anticorps monoclonal 5B3G10 sélectionné

L'anticorps monoclonal 5B3G10 étant destiné à être utilisé, plus particulièrement, dans des expériences de cytofluorimétrie en flux et de "western blot", nous avons donc

cherché à optimiser les conditions d'utilisation de cet anticorps lors de la réalisation de ces deux techniques.

1- Western blot

Le protocole utilisé est décrit dans l'appendice technique p. A2 à A5.

Trois types de lysats cellulaires sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide : lysats de plaquettes ($1,5 \cdot 10^8$ cellules) et de cellules Jurkat (10^7 cellules) et T47D ($25 \cdot 10^6$ cellules). Le récepteur soluble de la lactotransferrine des cellules Jurkat ayant servi lors de l'immunisation des souris, il était important d'établir tout d'abord les conditions d'utilisation de l'anticorps monoclonal anti-récepteur avec ces cellules avant de passer aux autres types cellulaires sur lesquels le récepteur a également été décrit.

Le premier anticorps utilisé est l'anticorps monoclonal 5B3G10 à différentes dilutions et le second anticorps est un anticorps polyclonal anti-Ig M de souris (Sigma). Ce dernier est marqué à la peroxydase.

2- Cytofluorimétrie en flux

Les expériences de cytofluorimétrie en flux ont tout d'abord été réalisées sur les cellules Jurkat ($5 \cdot 10^5$ cellules/tube) puis sur les plaquettes ($5 \cdot 10^7$ cellules/tube).

Le protocole de visualisation par cytofluorimétrie de la fixation de l'anticorps monoclonal 5B3G10 à la surface de ces cellules est décrit dans l'appendice technique p. A5.

Afin d'analyser correctement les résultats obtenus lors de ces dernières manipulations, des expériences de fixation de lactotransferrine fluorescente suivies de détection au cytofluorimètre sont réalisées en parallèle. Leur protocole est également décrit dans l'annexe p. A5.

III- RESULTATS

A- Préparation du récepteur soluble en vue de l'immunisation de souris

La purification du récepteur soluble de la lactotransferrine est réalisée selon le protocole établi au laboratoire par B. Leveugle, c'est à dire par chromatographie d'affinité, sur colonne d'anticorps anti-lactotransferrine immobilisés, du complexe lactotransferrine-récepteur présent dans le milieu de culture concentré des cellules Jurkat.

1- Identification du récepteur soluble de la lactotransferrine

L'analyse en gel de polyacrylamide des protéines contenues dans la fraction urée 6 M a révélé la présence de trois protéines de masse moléculaire respective 100, 80 et 60 kDa.

Une immunorévélation effectuée en présence d'anticorps spécifiques a permis d'identifier les protéines de masse moléculaire 80 et 60 kDa comme étant la lactotransferrine humaine et la serum albumine bovine (Figure 15 p. 115, piste 2 et 3).

De même, l'utilisation de milieu de culture dans lequel se trouvait des cellules Jurkat marquées métaboliquement au ^{35}S a confirmé le fait que la protéine de 105 kDa, soit le récepteur de la lactotransferrine humaine, a bien une origine cellulaire (Figure 15 p. 115, piste 1).

2- Quantification du récepteur purifié

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

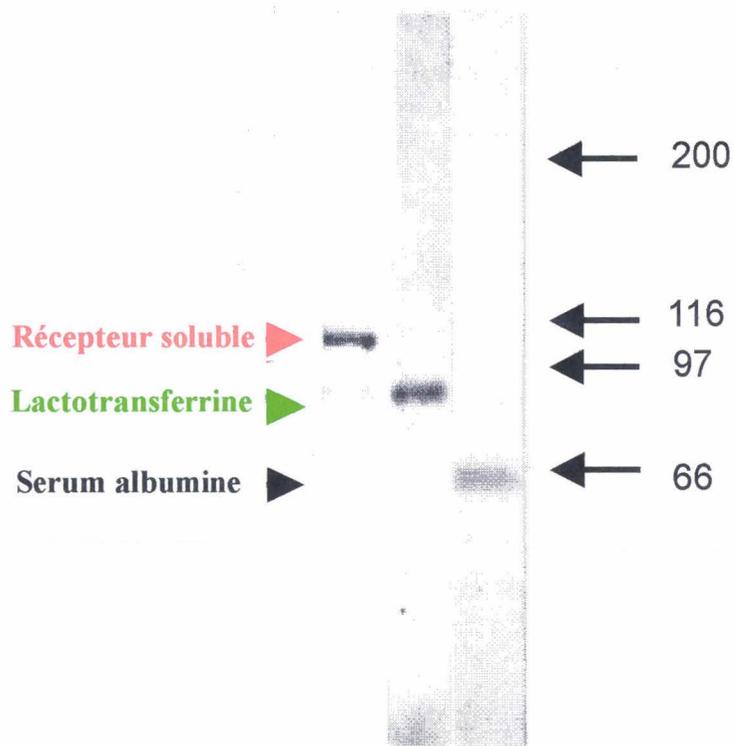


Figure 15 : Identification des protéines présentes dans la fraction éluée par le tampon PBS Urée 6 M de la colonne d'anticorps anti-lactotransferrine immobilisés.

- 1 : Autoradiographie des protéines présentes dans le milieu de culture des cellules Jurkat marqués au ^{35}S et chromatographiés sur la colonne d'affinité
- 2 : Immunorévélation réalisée en présence d'anticorps anti-lactotransferrine humaine
- 3: Immunorévélation réalisée en présence d'anticorps anti-sérum albumine bovine

B- Production des anticorps monoclonaux

1-Préparation des anticorps et sélection des clones produisant des anticorps uniquement dirigés contre une protéine de surface des cellules Jurkat

Le clonage des hybridomes obtenus par fusion des cellules spléniques et myéломateuses a donné naissance à 500 clones. Néanmoins, après criblage des surnageants de culture, seuls 12 clones ont été sélectionnés. Ceux-ci sécrètent des anticorps qui ne sont ni dirigés contre la sérum albumine bovine, ni dirigés contre la lactotransferrine humaine mais qui reconnaissent des protéines de surface des cellules Jurkat.

Les 12 clones ont été remis en culture mais seulement 10 clones ont pu être conservés.

Ce travail a été réalisé au Centre d'Economie Rurale de Marloie (Belgique) par le docteur Collard.

2- Recherche des clones sécrétant des anticorps anti-récepteur de la lactotransferrine humaine

La réactivité et la spécificité des anticorps sécrétés par les 10 clones positifs ont été analysées par des expériences de "western blot" réalisées sur des lysats plaquettaires.

Comme le montre la Figure 16 p. 117, seulement quatre clones sécrètent des anticorps dirigés contre des protéines présentes dans un lysat plaquettaire. Ces 4 anticorps sont nommés 1B11H6, 7H2H7, 8C10 et 5B3G10.

Les deux premiers anticorps sont dirigés contre les mêmes protéines dont les masses moléculaires respectives sont les suivantes : masse moléculaire supérieure à 200 kDa, masse moléculaire de 200 kDa et 133 kDa.

L'anticorps 8C10 est faiblement dirigé contre deux protéines dont l'une présente une masse moléculaire supérieure à 200 kDa et l'autre possède une masse moléculaire de

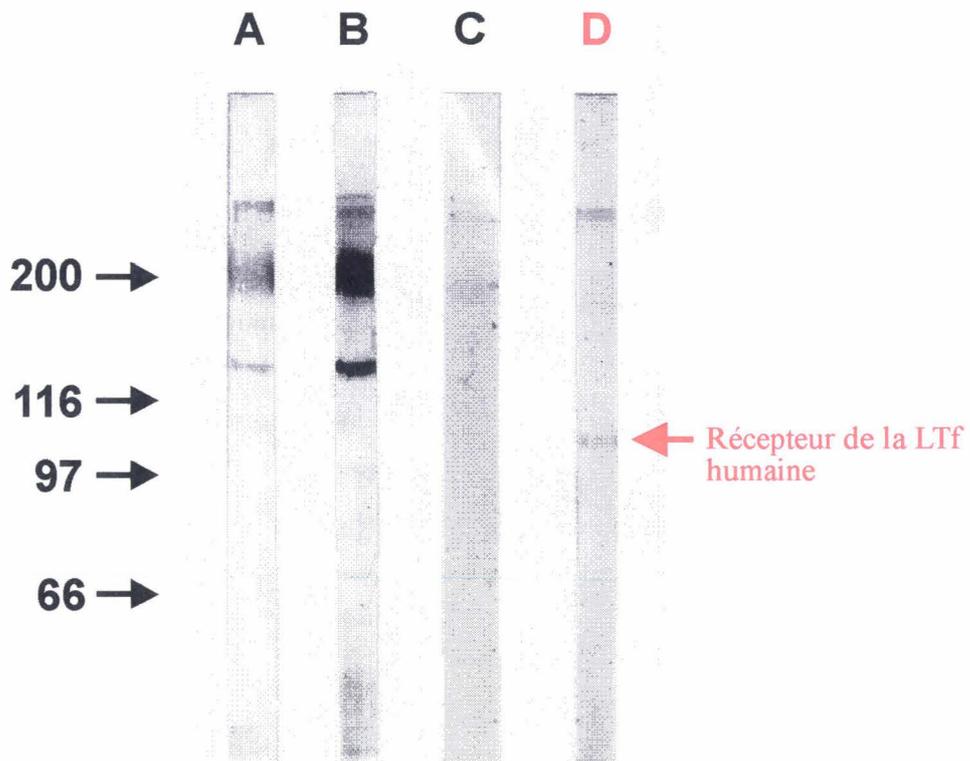


Figure 16 : Etude par "western blot", sur du lysat plaquettaire, de la spécificité des anticorps sécrétés par les clones positifs.

Immunorévélation par :

- A : les anticorps 1B11H6
- B : les anticorps 7H2H7
- C : les anticorps 8C10
- D : les anticorps 5B3G10

185 kDa.

L'anticorps 5B3G10, quant à lui, reconnaît une protéine de masse moléculaire supérieure à 200 kDa et une protéine de masse moléculaire 105 kDa, soit la masse moléculaire du récepteur de la lactotransferrine humaine.

Tous les surnageants de culture testés contiennent, semble-t-il, des anticorps dirigés contre une protéine de masse moléculaire supérieure à 200 kDa. En fait, il s'avère que cette protéine n'est pas reconnue spécifiquement par ces anticorps mais par le second anticorps utilisé lors de l'immunorévélation.

Au vu des résultats obtenus lors de ces manipulations, nous avons décidé de n'amplifier que le clone sécrétant les anticorps 5B3G10.

3- Amplification du clone 5B3G10

Le clone sécrétant les anticorps 5B3G10 a été amplifié comme décrit précédemment et l'isotype de ces anticorps a été déterminé. Il s'agit d'immunoglobulines M (isotype M₁K).

C- Détermination des conditions d'utilisation de l'anticorps monoclonal 5B3G10

Le récepteur de la lactotransferrine humaine ayant été mis en évidence à la surface des plaquettes, des cellules Jurkat (lignée lymphocytaire humaine T) et des cellules T47D (cellules cancéreuses de glande mammaire humaine), nous avons déterminé les conditions d'utilisation de l'anticorps monoclonal 5B3G10 qui permettent de visualiser ce récepteur lors des manipulations de "western blot" et de cytofluorimétrie en flux.

1- Western blot

L'électrophorèse en gel d'acrylamide (Figure 17 p. 119) des protéines présentes dans les

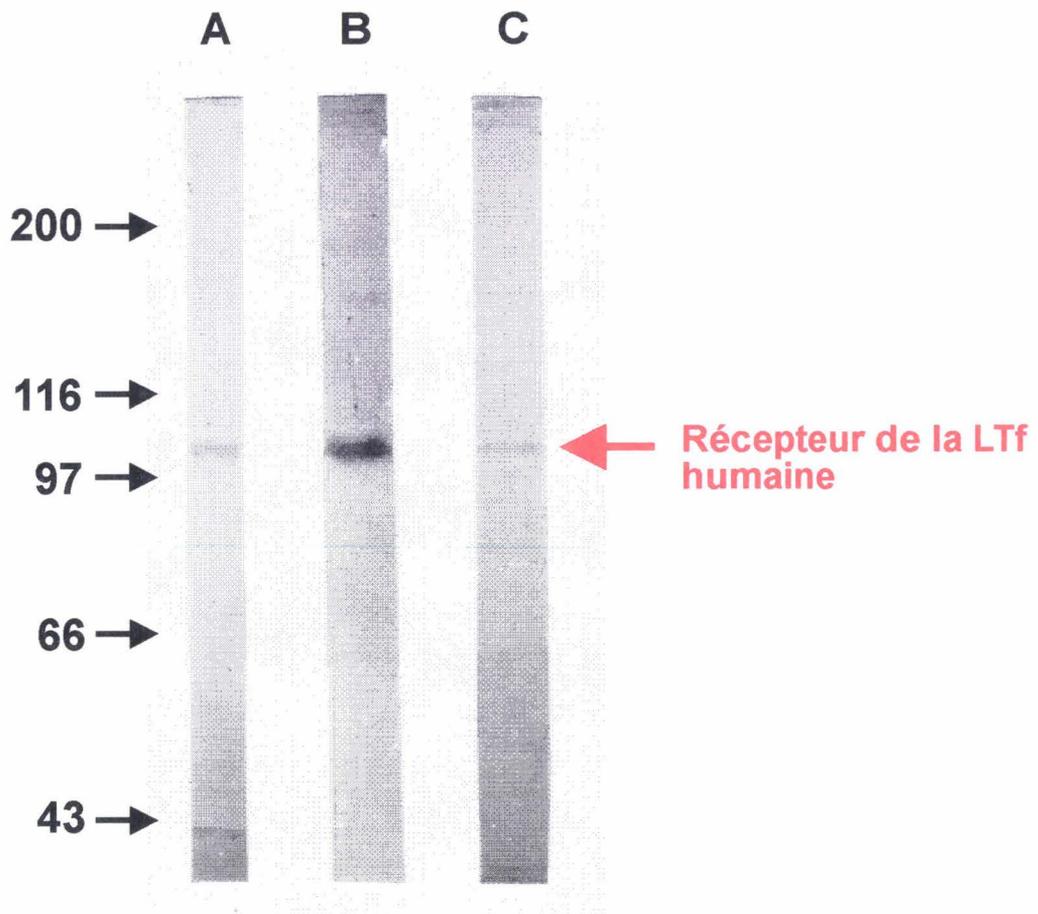


Figure 17 : Etude de la spécificité de l'anticorps monoclonal anti-récepteur 5B3G10 par des expériences de "western blot" sur :

- A : les protéines d'un lysat de cellules Jurkat
- B : les protéines d'un lysat de plaquettes
- C : les protéines d'un lysat de cellules T47D

différents lysats cellulaires a tout d'abord été réalisée dans des conditions non réductrices. Après électrotransfert, les protéines ont été révélées par l'anticorps monoclonal 5B3G10 dont les dilutions, établies après plusieurs manipulations, sont les suivantes : 1/5000^{ème} pour les cellules Jurkat et 1/2500^{ème} pour les deux autres types cellulaires.

Comme le montre la Figure 17, l'anticorps monoclonal 5B3G10 reconnaît le récepteur de la lactotransferrine humaine de masse moléculaire de 105 kDa qu'il soit présent sur les plaquettes, les cellules Jurkat ou T47D. De même, ce résultat montre que les protéines plaquettaires sont intactes dans des concentrés plaquettaires de 6 jours puisque le récepteur de la lactotransferrine présent dans les lysats préparés à partir de ces concentrés est reconnu par l'anticorps monoclonal 5B3G10.

Cette manipulation a également été réalisée dans des conditions réductrices. Les mêmes résultats ont été obtenus.

2- Cytofluorimétrie en flux

Cette étude montre que l'anticorps monoclonal, à la dilution 1/500^{ème}, se fixe spécifiquement à la surface des cellules Jurkat et des plaquettes (Figure 18 p. 121).

La fixation de lactotransferrine-HyF à la surface des deux types cellulaires précédents (Figure 19 p. 122), à raison de 20 µg par ml, nous permet de penser que la dilution utilisée pour l'anticorps 5B3G10 est bonne puisque les histogrammes de fluorescence présentent un aspect identique avec des espacements de pics similaires.

IV- CONCLUSION

Les manipulations réalisées dans ce chapitre nous ont tout d'abord permis de sélectionner, parmi 500 clones de départ, un clone qui sécrète des anticorps anti-récepteur de la lactotransferrine humaine.

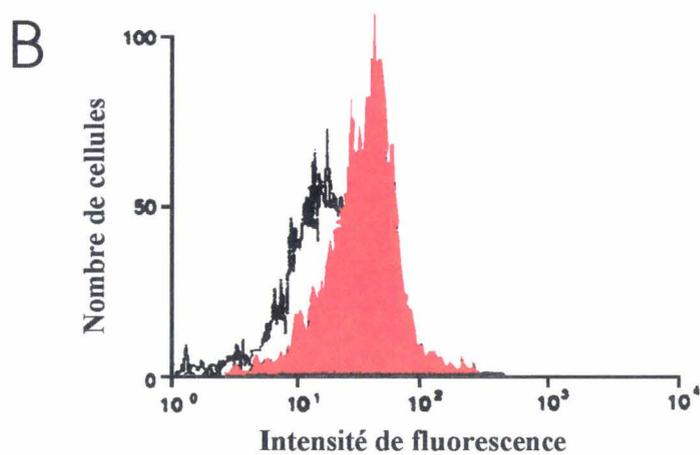
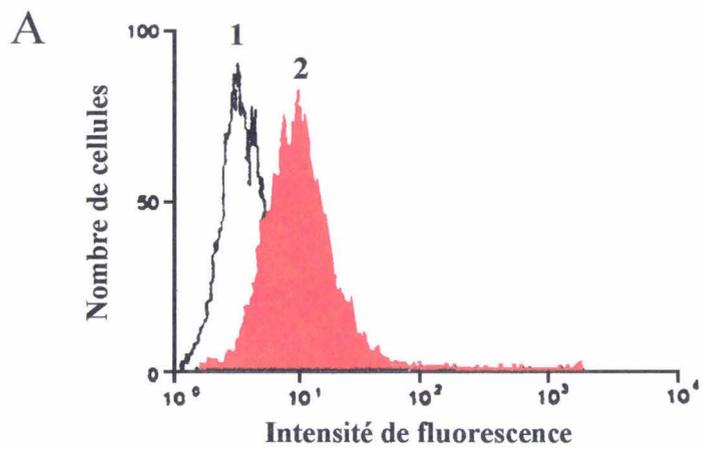


Figure 18 : Etude par cytofluorimétrie en flux de la fixation de l'anticorps anti-récepteur 5B3G10 sur les cellules Jurkat (A) et sur les plaquettes (B).

- 1 : Fixation non spécifique
- 2 : Fixation totale

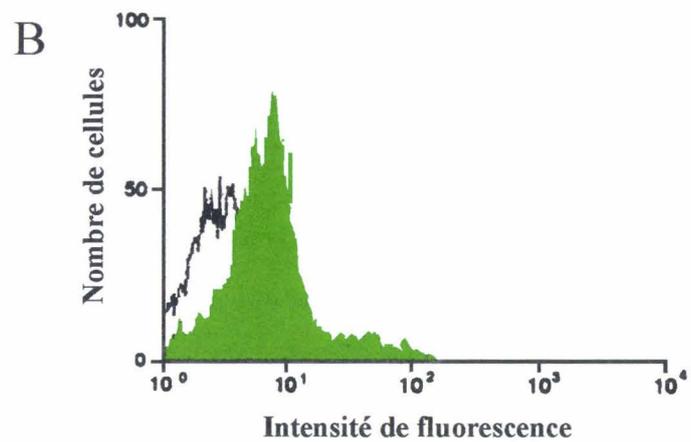
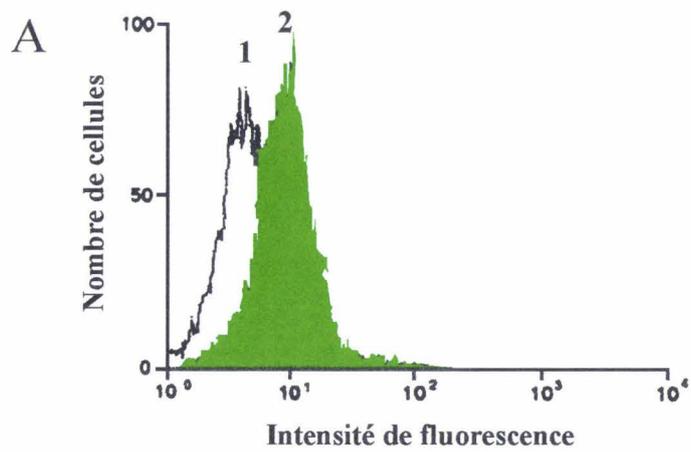


Figure 19 : Etude par cytofluorimétrie en flux de la fixation de la lactotransferrine sur les cellules Jurkat (A) et les plaquettes (B) par la

- 1 : Fixation non spécifique
- 2 : Fixation totale

L'utilisation de ces anticorps lors d'expériences de "western blot" et de cytofluorimétrie en flux, dans des conditions expérimentales mises au point par nos soins, a permis de confirmer les résultats obtenus précédemment par Rochard (1992), Leveugle *et al.* (1993) et par Bi *et al.* (1994), à savoir la présence d'un récepteur monomérique de masse moléculaire 105 kDa à la surface des cellules T47D, des plaquettes et des cellules Jurkat.

PURIFICATION DU RECEPTEUR MEMBRANAIRE DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

I- INTRODUCTION

La mise au point d'une technique efficace de purification du récepteur membranaire de la lactotransferrine s'est très rapidement révélée indispensable. En effet, l'obtention de récepteur pur en quantité suffisante était le facteur limitant de nombreuses manipulations. Ainsi, sans récepteur membranaire pur, il n'était pas possible d'étudier le mode d'ancrage de celui-ci dans la membrane, ni de déterminer la structure de ses glycanes. De même, la réalisation d'un dosage ELISA du récepteur membranaire de la lactotransferrine n'était pas envisageable tant que nous ne disposions pas de cette glycoprotéine pure puisqu'une gamme étalon ne pouvait alors être établie. Enfin, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, le désir de cloner le gène codant le récepteur de la lactotransferrine impliquait la préparation d'anticorps polyclonaux indispensables au criblage, d'où la nécessité d'obtenir du récepteur en quantité pur pour effectuer plusieurs immunisations chez le Lapin.

Concernant le type cellulaire à partir duquel le récepteur membranaire serait purifié, notre choix s'est porté sur les plaquettes puisque nous disposions régulièrement, grâce aux dons du Centre Régional de Transfusion Sanguine de Lille, de concentrés plaquettaires de 6 jours en quantité importante. Il nous restait alors à mettre au point la technique de purification du récepteur membranaire de la lactotransferrine humaine.

II- MODE OPERATOIRE

Une chromatographie de gel filtration est réalisée au préalable afin d'injecter majoritairement sur la colonne d'immuno-affinité des protéines de masse moléculaire supérieure à 60 kDa.

A- Chromatographie de gel filtration

15 ml de lysat plaquettaire (5 concentrés plaquettaires) sont chromatographiés, avec un débit de 20 ml/h, sur une colonne (1,3 x 160 cm ou 770 ml de gel) de Sephacryl 300 HR (Pharmacia LKB) équilibrée dans du PBS Triton X-100 0,1% (Boehringer).

B- Chromatographie d'immuno-affinité

L'immobilisation des anticorps monoclonaux 5B3G10 d'isotype Ig M sur de la Sepharose 4B (Pharmacia) activée au bromure de cyanogène ayant échoué, nous avons utilisé le gel Eurocell ONB-Carbonate A (Eurochrom).

1- Immobilisation des anticorps monoclonaux 5B3G10 sur du gel Eurocell ONB-Carbonate A

a- Principe

Le gel Eurocell ONB-Carbonate A (Eurochrom) est un support activé hydrophile préparé à partir de cellulose sphérique hautement poreuse. L'activation est réalisée par introduction d'un groupe ONB-Carbonate actif après réaction sur la cellulose du 5-norbornene-2,3-dicarboximido-carbonochloridate.

Ce gel permet l'immobilisation de ligands contenant des groupements NH ou SH libres.

b- Protocole

10 ml de support activé sont lavés, sur un verre fritté, avec trois volumes d'un mélange acétone/eau (1/1) puis avec au moins trois volumes d'eau, cette deuxième série de lavages étant effectuée sous vide. Le gel est ensuite repris par 15 ml de tampon de

couplage (NaHCO_3 0,1 M NaCl 0,2 M pH 8,1) et 34 mg d'Ig M 5B3G10, en solution dans ce même tampon, lui sont ajoutés. Après deux heures d'incubation à température ambiante sur un agitateur rotatif non magnétique, le tampon de couplage est éliminé puis, le gel est repris par 10 ml du tampon précédent renfermant de l'éthanolamine 1M et possédant un pH voisin de 7 cela, afin de bloquer les groupes actifs résiduels. Après une heure d'incubation dans les conditions citées précédemment, le tampon de blocage est éliminé et le gel est lavé avec un excès de tampon de couplage avant d'être équilibré dans du PBS Triton X-100 0,1 % (Boehringer) (volume final de gel : 10 ml).

2- Chromatographie d'affinité sur colonne de 5B3G10-Eurocell ONB-Carbonate A

La fraction, issue de la chromatographie de gel filtration et renfermant en quantité importante le récepteur de la lactotransferrine humaine, est injectée sur la colonne d'immuno-affinité. Le gel est ensuite lavé par 50 ml de PBS Triton X-100 0,1% puis par 40 ml de PBS NaCl 1 M Triton X-100 0,1% afin d'éliminer les adsorptions non spécifiques. Le récepteur est enfin élué par 36 ml de tampon Gly 0,1M pH 2,8 renfermant 0,1 % de Triton X-100. Après ajustement du pH à 6-7, cette dernière fraction est stockée à -20°C .

III- RESULTATS

A- Etapes chromatographiques

La chromatographie de gel filtration, réalisée sur une colonne de Sephacryl 300 HR et dont le profil d'éluion est représenté sur la Figure 20-1 p. 127, nous a permis d'injecter sur la colonne d'immuno-affinité une fraction dans laquelle le récepteur de la lactotransferrine humaine constitue une protéine majoritaire. De même, cette première

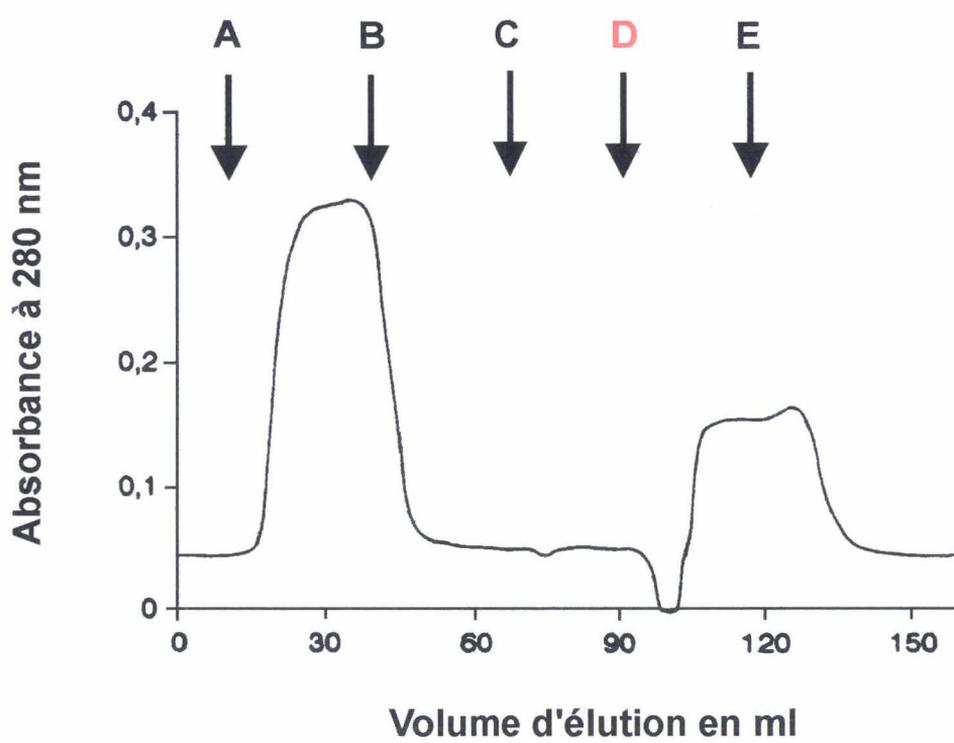
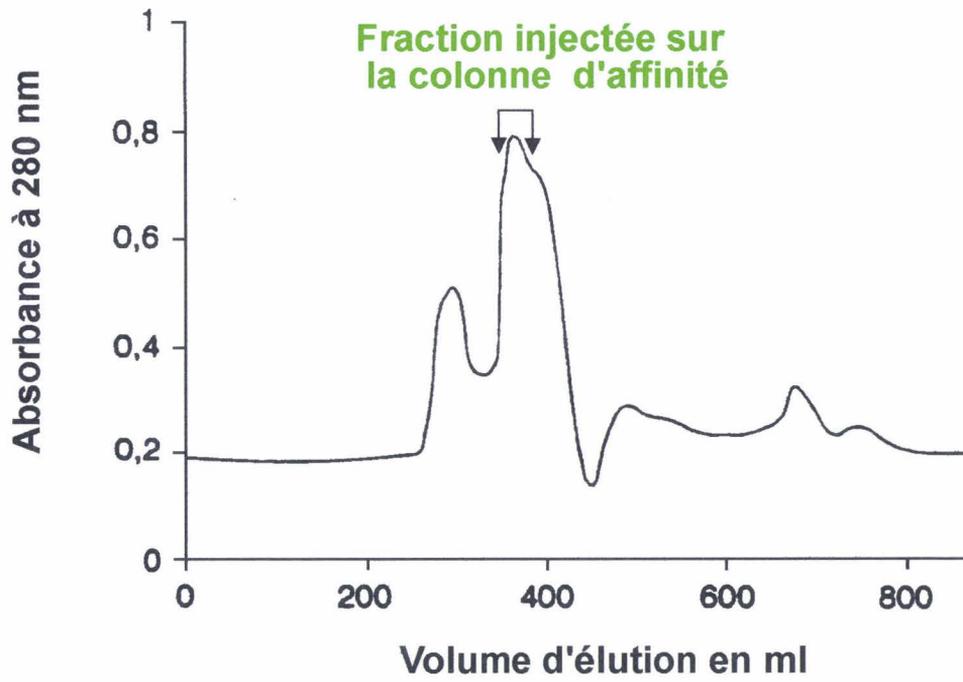


Figure 20 : Profils d'élution du récepteur membranaire de la lactotransferrine humaine des colonnes de Sephacryl 300 HR (1) et d'anticorps monoclonaux anti-récepteur (2).

étape chromatographique s'est avérée indispensable pour préserver la colonne d'anticorps anti-récepteur immobilisés en limitant, comme nous pouvons le voir sur la Figure 20-2 p. 127, les adsorptions non spécifiques.

Sur le profil d'élution de la colonne d'immuno-affinité, la fraction issue de la chromatographie de gel filtration est injectée en A, les protéines non retenues sont éluées par du PBS Triton X-100 0,1% (B), les protéines adsorbées de manière non spécifique sont éluées par du PBS Triton X-100 0,1% renfermant du NaCl 1M (C) et la fraction contenant le récepteur de la lactotransferrine humaine est éluee par le tampon Gly-HCl 0,1 M pH 2,8 (D). Finalement la colonne est rééquilibrée dans le tampon PBS Triton X-100 0,1% de départ (E).

B- Analyse des protéines présentes dans les fractions obtenues avec les tampons D et E

1/5^{ème} d'une part, d'une fraction éluee avec le tampon Gly (D) et d'autre part, d'une fraction obtenue avec le tampon PBS Triton X-100 0,1 % (E) sont concentrés par précipitation avec de l'acide trichloroacétique selon le protocole décrit dans l'appendice technique p. A3. Les protéines ainsi précipitées sont déposées sur un gel de polyacrylamide. Son profil est représenté sur la Figure 21 p. 129.

La piste 2 correspond à la fraction éluee avec le tampon Gly. Elle renferme deux protéines : une protéine de masse moléculaire 105 kDa, soit la masse moléculaire du récepteur de la lactotransferrine humaine et une protéine de masse moléculaire supérieure à 200 kDa. Cette dernière protéine est également présente dans la fraction obtenue lors de la rééquilibration de la colonne (piste 1). Il s'agit, comme nous l'avons montré par immunorévélation, d'immunoglobulines d'isotype M fort probablement dégradées, celles-ci étant libérées de la colonne d'immunoaffinité.

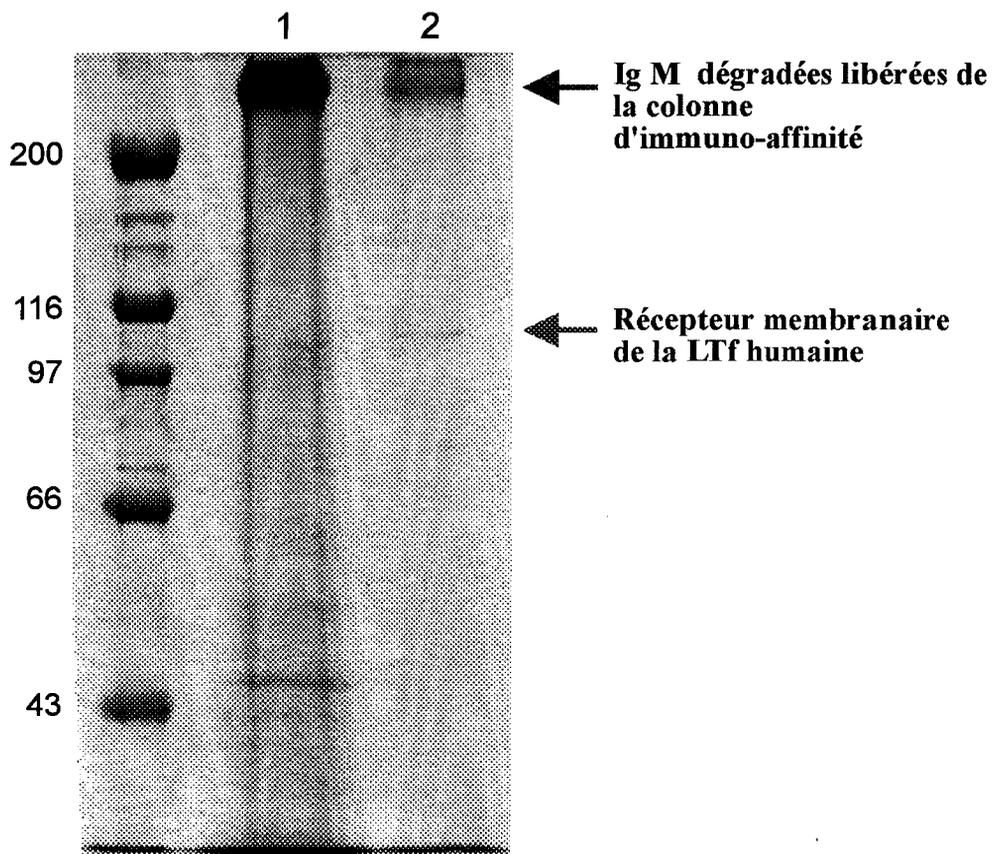


Figure 21 : Analyse en gel de polyacrylamide des fractions éluées de la colonne d'immuno-affinité avec les tampons E (PBS Triton X-100 0,1%, piste 1) et D (Gly 0,1 M pH 2,8 Triton X-100 0,1%, piste 2) lors de la préparation du récepteur membranaire de la lactotransferrine humaine.

C- Intérêt de cette technique de purification

Cette technique de purification nous a donc permis d'obtenir une fraction ne renfermant pratiquement que du récepteur membranaire de la lactotransferrine humaine, si ce n'est la présence d'Ig M libérées du gel. De plus, contrairement à la chromatographie réalisée sur la colonne d'anticorps anti-lactotransferrine immobilisés, l'élution du récepteur de cette colonne d'immuno-affinité ne nécessite pas l'emploi d'agents dénaturants tels que l'urée.

Le rendement final obtenu après les deux étapes chromatographiques (gel filtration et chromatographie d'immuno-affinité) est voisin de 14%, ce qui est un petit peu plus faible que celui obtenu lors de la réalisation d'une chromatographie unique sur la colonne d'anticorps anti-lactotransferrine immobilisés, soit environ 17 %. Cependant, l'absence quasi-totale d'adsorptions non spécifiques sur la colonne d'anticorps monoclonaux 5B3G10 immobilisés constitue un avantage non négligeable.

IV- CONCLUSION

Les manipulations réalisées dans ce chapitre nous ont amenée à utiliser un nouveau type de gel activé (Büttner *et al.*, 1989), cela afin de purifier le récepteur membranaire de la lactotransferrine humaine. En effet, le couplage des Ig M 5B3G10 sur de la Sepharose activée n'étant pas réalisable, nous avons dû chercher un autre type de support activé. Nous avons donc utilisé le gel Eurocell ONB-Carbonate A qui est constitué de billes de cellulose dérivées. Ce support permet le couplage rapide et efficace d'anticorps tout en conservant leur activité biologique d'où son utilisation lors de la réalisation de chromatographies d'immuno-affinité (Löster et Gottschall, 1991). Ainsi, dans notre cas nous avons obtenu une efficacité de couplage de l'ordre de 70 %.

La fraction glycolle élue de la colonne d'immuno-affinité renfermait comme nous l'avons vu, en plus du récepteur membranaire de la lactotransferrine, des Ig M dégradées,

libérées du gel. Il était donc nécessaire de séparer ces deux molécules avant d'entreprendre toute nouvelle étude du récepteur. Nous développerons dans le chapitre suivant la technique que nous avons employée pour mener à bien ce travail, cette technique ayant plus particulièrement été choisie car elle permet d'utiliser directement les protéines obtenues lors de la préparation d'anticorps.

PREPARATION D'ANTICORPS POLYCLONAUX MONOSPECIFIQUES
DIRIGES CONTRE LE RECEPTEUR MEMBRANAIRE DE LA
LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

I- INTRODUCTION

L'emploi d'un anticorps monoclonal lors du criblage d'une banque d'ADNc constitue une stratégie à haut risque. En effet, les protéines obtenues par expression sont des protéines de fusion qui ne possèdent pas toujours la même conformation que les protéines natives, d'où une absence possible de reconnaissance de la protéine de fusion par un anticorps monoclonal si celui-ci ne reconnaît qu'un épitope parfaitement conformé. De même, l'épitope reconnu par un anticorps monoclonal peut être absent de la protéine de fusion si la protéine native est très grande puisque, dans ce cas, l'ARNm ne pourra être entièrement transcrit par la transcriptase inverse.

L'analyse des problèmes soulevés ci-dessus nous a donc incitée à préparer de nouvelles sondes mieux adaptées au criblage d'une banque d'ADNc qu'un anticorps monoclonal bien qu'une telle expérience ait néanmoins été tentée avec l'anticorps 5B3G10. Notre choix s'est porté sur des anticorps polyclonaux, qui en plus de leur utilisation lors de criblages, nous permettaient d'envisager la réalisation d'un dosage ELISA du récepteur de la lactotransferrine humaine. Ceux-ci ont été préparés à partir du récepteur plaquettaire membranaire purifié dans un premier temps, par chromatographie d'affinité sur la colonne d'anticorps monoclonaux 5B3G10 immobilisés et dans un second temps, par élution d'une membrane d'immobilon.

II- MODE OPERATOIRE

A- Préparation d'anticorps polyclonaux dirigés contre le récepteur membranaire de la lactotransferrine humaine après immunisation d'un lapin avec la protéine purifiée

1- Préparation du récepteur

Dix fractions de récepteur membranaire plaquettaire, éluées par le tampon Gly de la colonne d'immuno-affinité, sont décongelées et concentrées, par centrifugation dans des centriprep-30 (Amicon), jusqu'à 500 µl.

Le protocole utilisé par la suite dans ce chapitre est celui décrit par Szewczyk et Summers (1992).

Ainsi, les protéines présentes dans les "fractions Gly" concentrées sont soumises à une électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide en présence de SDS avant d'être transférées pendant une nuit à 20 V sur une membrane d'immobilon (Millipore). Après coloration de la membrane pendant 5 mn avec du Rouge Ponceau S (Sigma) puis décoloration avec de l'eau distillée, la bande renfermant le récepteur de la lactotransferrine humaine est excisée à l'aide d'un scalpel et placée, par section de 1 cm², dans des tubes Eppendorf contenant 500 µl de tampon Tris-HCl 50 mM pH 9,5 SDS 2% Triton 1 %. Les tubes Eppendorf sont ensuite mis sur un agitateur vibrant pendant 10 min et le surnageant de chaque tube est prélevé après une brève centrifugation. Finalement, le récepteur de la lactotransferrine est précipité par addition, aux surnageants, de 4 volumes d'acétone froid et stockage une nuit à -20°C. Les culots de récepteur sont repris le lendemain, après centrifugation à 10 000 g pendant 15 min, par du tampon PBS de manière à obtenir un volume final d'environ 100 µl.

2- Immunsation du lapin

La technique d'immunsation est celle préconisée par Green et Manson (1992). Ainsi, trois injections sont réalisées en intramusculaire dans une patte postérieure à raison d'une tous les 15 jours. Le produit injecté renferme le produit d'élution de la membrane d'immobilon repris par 100 µl de PBS auxquels sont ajoutés d'une part, 400 µl d'eau physiologique (Meram) et d'autre part 500 µl d'adjuvant complet de Freund (Difco) pour la première injection et d'adjuvant incomplet (Difco) pour les injections suivantes. Le lapin est saigné une semaine après la troisième injection par incision de la veine marginale de l'oreille (25 ml de sang prélevé). Une quatrième injection est réalisée 10 jours après le prélèvement de sang et le lapin est à nouveau saigné une semaine plus tard (40 ml de sang prélevé).

3- Obtention de la fraction Ig G renfermant les anticorps polyclonaux anti-récepteur membranaire

Une fois le lapin saigné, le sang est stocké pendant une nuit à 4°C puis l'immunsérum est récupéré par centrifugation avant d'être dilué avec un volume égal (V) de PBS. Les immunoglobulines d'isotype G sont alors précipitées par addition, sous agitation magnétique lente dans la glace, d'un volume x ($x = 4/3 V$) de sulfate d'ammonium saturé. Après stockage pendant 10 min à 4 °C, le précipité est centrifugé pendant 20 min à 3000 t/mm (centrifugeuse Jouan GR 412) puis il est repris avec un volume (V) de sulfate d'ammonium à 40 % de saturation. Finalement, une seconde centrifugation est effectuée et le précipité est repris par le quart du volume initial de PBS avant d'être dialysé pendant une nuit contre ce même tampon. L'absorbance à 280 nm est mesurée le lendemain dans un spectrophotomètre Shimadzu MPS-2000. Les Ig G sont ensuite stockées à 4 °C en présence d'azide (0,2% final) ou à -20 °C en présence de glycérol (40 % final).

B- Test des anticorps polyclonaux anti-récepteur membranaire

Trois techniques ont été utilisées pour déterminer la spécificité des anticorps polyclonaux préparés. Il s'agit de la cytofluorimétrie en flux, du "western blot" et du dosage ELISA.

1- Cytofluorimétrie en flux

a- Incubation des cellules avec les anticorps polyclonaux anti-récepteur membranaire

Les expériences de cytofluorimétrie en flux ont été réalisées sur les plaquettes ($5 \cdot 10^7$ cellules/tube) et les cellules Jurkat ($5 \cdot 10^5$ cellules/tube). Les cellules en suspension dans 150 μ l de PBS sont incubées pendant 1 h en présence des anticorps polyclonaux anti-récepteur (à différentes dilutions) et d'azide (1/1000). Les cellules sont ensuite lavées et des anticorps anti-Ig G de lapin (Sigma) marqués au FITC (dilution 1/80) sont ajoutés. Après 30 min d'incubation, les cellules sont lavées deux fois puis analysées par cytofluorimétrie en flux. La fixation non spécifique est estimée en incubant les cellules dans les mêmes conditions mais en remplaçant les anticorps polyclonaux anti-récepteur par des immunoglobulines d'isotype G de lapin (dilution 1/1000).

b- Expériences de compétition

Les expériences de compétition sont réalisées en présence de lactotransferrine marquée à la fluorescéine. La technique directe de fixation de la lactotransferrine, dont le protocole est décrit p. A5, est donc utilisée et trois mesures de fluorescence sont effectuées.

La première mesure correspond à la fluorescence émise par les plaquettes incubées en présence de $2,5 \cdot 10^{-7}$ M de lactotransferrine fluorescente .

La deuxième mesure correspond à la fluorescence émise par les plaquettes incubées en présence de $2,5 \cdot 10^{-7}$ M de lactotransferrine fluorescente et de 100 excès molaire de lactotransferrine non fluorescente.

La troisième mesure correspond à la fluorescence émise par les cellules incubées en présence de $2,5 \cdot 10^{-7}$ M de lactotransferrine fluorescente et des anticorps polyclonaux anti-récepteur dilués au 1/1000^{ème}.

2- Western blot

Le protocole utilisé est décrit dans l'appendice technique p. A3 à A5.

Les expériences de "western blot" sont réalisées à partir de lysats de plaquettes ($1,5 \cdot 10^8$ cellules) et de cellules Jurkat (10^7 cellules).

La fraction Ig G renfermant les anticorps polyclonaux dirigés contre le récepteur de la lactotransferrine est utilisée en lieu et place du premier anticorps et cela, à différentes dilutions, la dilution adéquate ayant été plus particulièrement déterminée avec les plaquettes puisque les anticorps sont préparés par injection à un lapin du récepteur plaquettaire de la lactotransferrine.

Les anticorps secondaires sont des anticorps polyclonaux anti-Ig G de lapin marqués à la peroxydase (Diagnostic Pasteur). Leur dilution est 1/2500^{ème}.

III- RESULTATS

A- Obtention des anticorps polyclonaux anti-récepteur membranaire

Tous les 15 jours, environ 150 µg de récepteur de la lactotransferrine humaine ont été injectés au lapin. Ces 150 µg correspondent au produit d'élution de l'immobilon des 10

fractions Gly concentrées, le rendement de la technique d'élution étant d'environ 35 %. Lors de chaque saignée, 14 à 20 ml de serum ont été récupérés après centrifugation. La précipitation, en présence de sulfate d'ammonium, des Ig G présentes dans ces sera nous a permis d'obtenir 7 et 10 ml d'Ig G anti-récepteur de concentrations respectives 8,9 mg/ml et 8,4 mg/ml.

B- Test des anticorps polyclonaux dirigés contre le récepteur membranaire de la lactotransferrine humaine

1- Cytofluorimétrie en flux

a- Etude de la fixation des anticorps polyclonaux anti-récepteur à la surface de différentes cellules

Cette étude réalisée par cytofluorimétrie en flux montre que les anticorps polyclonaux préparés se fixent spécifiquement à la surface des plaquettes ainsi qu'à la surface des cellules Jurkat (Figure 22 p. 138). La dilution utilisée pour les anticorps est dans ce cas 1/1000^{ème}. Elle permet d'obtenir un profil de fixation comparable ou meilleur que celui obtenu avec la lactotransferrine fluorescente, pour chaque type cellulaire.

b- Expériences de compétition

Nous avons, par des expériences de compétition, essayé d'inhiber la fixation, à la surface des plaquettes, de la lactotransferrine fluorescente en incubant simultanément ces cellules avec la lactotransferrine-Hyf, à la concentration 20 µg/ml, et les anticorps polyclonaux anti-récepteur, à la dilution 1/1000^{ème}. Comme le montre la Figure 23 p. 139, cette incubation simultanée des plaquettes avec la lactotransferrine et les anticorps polyclonaux anti-récepteur entraîne l'inhibition quasi totale de la

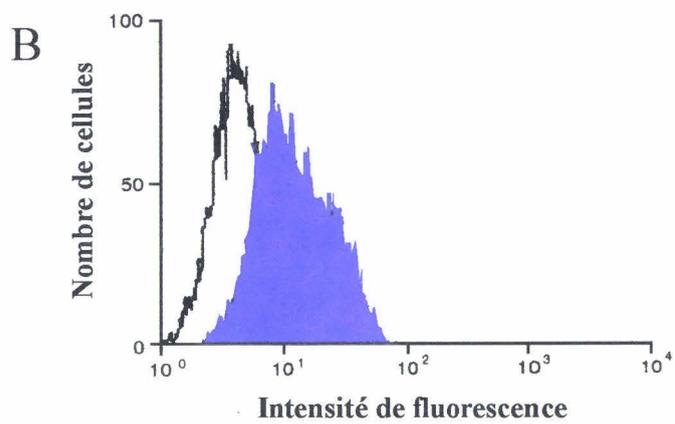
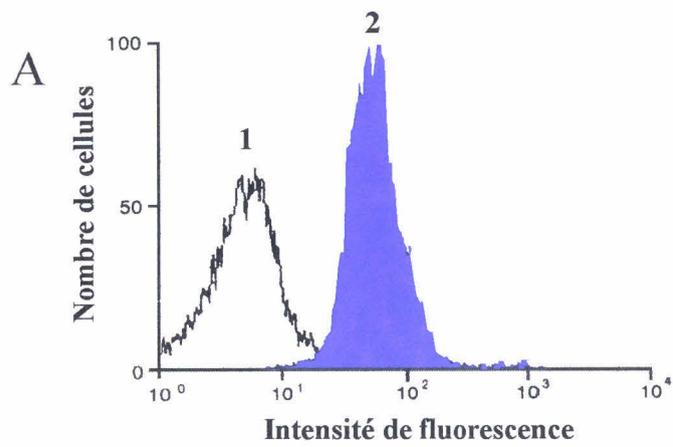


Figure 22 : Etude par cytofluorimétrie en flux de la fixation des anticorps polyclonaux anti-récepteur à la surface des plaquettes (A) et des cellules Jurkat (B).

- 1 : Fixation non spécifique
- 2 : Fixation totale

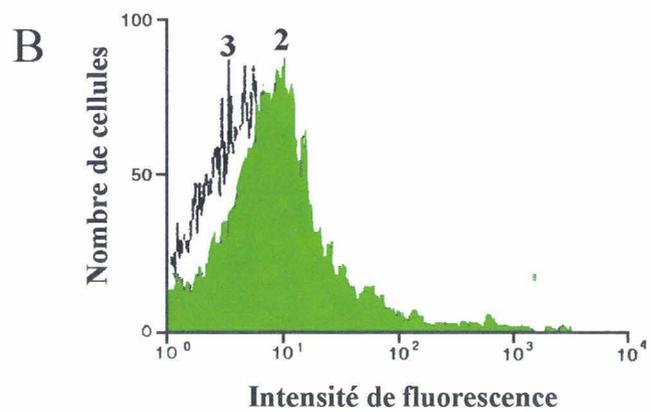
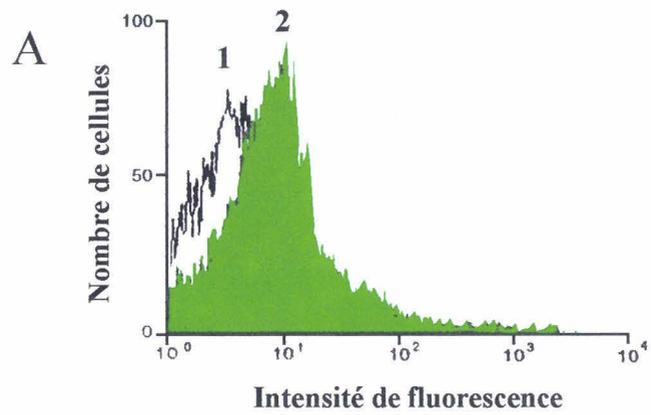


Figure 23 : Etude par des expériences de compétition de la spécificité des anticorps polyclonaux anti-récepteur.

- 1 : Fixation de la lactotransferrine-Hyf en présence de 100 excès molaire de lactotransferrine non fluorescente
- 2 : Fixation de la lactotransferrine-Hyf
- 3 : Fixation de la lactotransferrine-Hyf en présence des anticorps polyclonaux anti-récepteur

fixation de la lactotransferrine-Hyf à la surface de ces cellules. Ces résultats indiquent que les anticorps polyclonaux préparés se fixent bien sur les mêmes sites que la lactotransferrine à la surface des plaquettes.

2- Western blot

L'électrophorèse en gel d'acrylamide des protéines présentes dans les différents lysats cellulaires a tout d'abord été réalisée dans des conditions non réductrices. Après électrotransfert, les protéines ont été révélées par les anticorps polyclonaux anti-récepteur dont les dilutions, établies après plusieurs manipulations, sont les suivantes : 1/7500^{ème} pour les plaquettes et 1/2500^{ème} pour les cellules Jurkat.

Comme le montre la Figure 24 p. 141, les anticorps polyclonaux anti-récepteur reconnaissent le récepteur de la lactotransferrine humaine de masse moléculaire 105 kDa qu'il soit présent sur les plaquettes ou les cellules Jurkat.

Cette manipulation a également été réalisée dans des conditions réductrices. Les mêmes résultats ont été obtenus.

IV- CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons, grâce à l'utilisation d'une technique récente et originale, préparé des anticorps polyclonaux monospécifiques dirigés contre le récepteur membranaire de la lactotransferrine humaine.

Dans un premier temps, nous avons donc séparé le récepteur membranaire de la lactotransferrine des Ig M par une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS puis nous l'avons transféré sur une membrane de polyvinylène difluoride (immobilon) à partir de laquelle il a finalement été élué, cette technique permettant

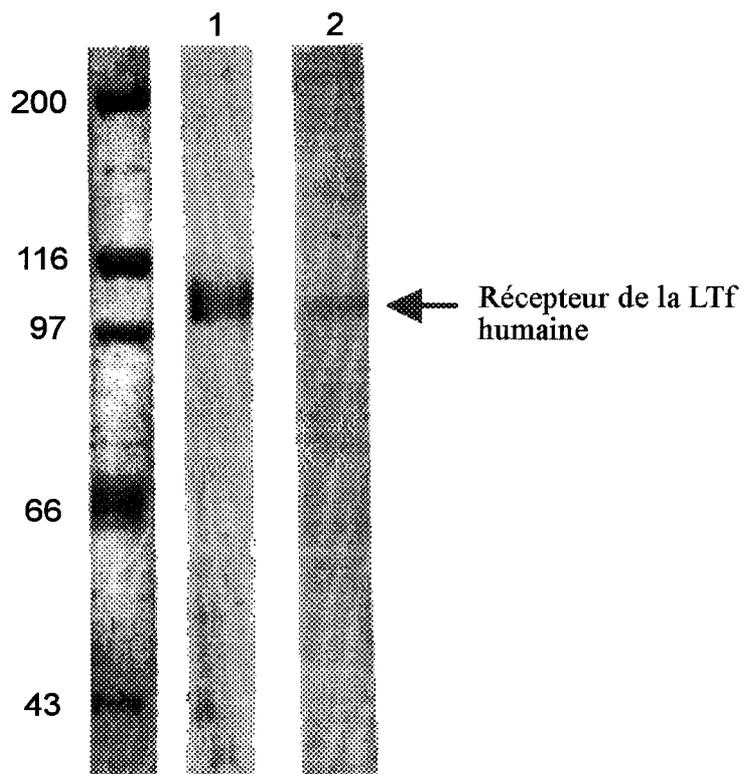


Figure 24 : Etude de la spécificité des anticorps polyclonaux anti-récepteur par des expériences de "western blot" réalisées sur :

- 1- les protéines d'un lysat de plaquettes
- 2- les protéines d'un lysat de cellules Jurkat

l'élution de protéines de masse moléculaire supérieure à 100 kDa tout en conservant leur activité (Szewczyk et Summers, 1988; Szewczyk *et al.*, 1988). De plus, elle présente l'avantage, contrairement à la technique d'élution de protéines à partir d'une membrane de nitrocellulose (Anderson, 1985; Parekh *et al.*, 1985), de ne pas nécessiter l'emploi d'agents dissociants (acétonitrile et pyridine).

Dans un second temps, la préparation de récepteur membranaire a été utilisée pour immuniser un lapin. Les anticorps polyclonaux préparés, nous avons alors mis en évidence leur caractère monospécifique. Nous disposions donc d'anticorps polyclonaux anti-récepteur que nous pouvions utiliser seuls ou en combinaison avec l'anticorps monoclonal 5B3G10 pour étudier plus précisément le récepteur de la lactotransferrine humaine.

**DETECTION ET DOSAGE DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE
HUMAINE A L'AIDE DES ANTICORPS POLYCLONAUX ANTI-RECEPTEUR
SEULS OU EN COMBINAISON AVEC L'ANTICORPS MONOCLONAL**

5B3G10

I- INTRODUCTION

Les anticorps polyclonaux préparés précédemment ont trouvé rapidement deux applications intéressantes consistant en la recherche de récepteurs de la lactotransferrine au niveau du cerveau humain et la mise au point d'un dosage ELISA.

Concernant la première application, à savoir la mise en évidence de récepteurs dans le cerveau de sujets sains tout d'abord puis par la suite, dans le cerveau de patients atteints de la maladie de Parkinson, elle fait l'objet d'une collaboration avec les docteurs Faucheux et Hirsch (Inserm U 289, Hôpital de la Salpêtrière, Paris) et elle est partie du constat suivant : les concentrations en fer total et en fer ferrique mais pas en fer ferreux sont augmentées dans la substance noire (Figure 25 p. 144) de patients atteints de la maladie de Parkinson (Jellinger *et al.*, 1992 et Riederer *et al.*, 1992). Cette augmentation non observée au niveau de la substance grise centrale suggérait que le fer pourrait être sélectivement toxique pour les neurones dopaminergiques vulnérables de la substance noire (Hirsch *et al.*, 1991). En effet, sur le plan biochimique, la maladie de Parkinson se caractérise principalement par une lésion sévère de la voie dopaminergique nigrostriatale. Néanmoins d'autres voies sont également touchées : il s'agit des voies monoaminergiques (noradrénaline, sérotonine), cholinergiques et peptidergiques (Agid, 1989). Les symptômes moteurs des patients atteints de cette maladie neurodégénérative n'apparaissent que lorsque la destruction de la voie dopaminergique nigrostriatale atteint un certain seuil de dénervation, de l'ordre de 70 % environ (Agid *et al.*, 1987).

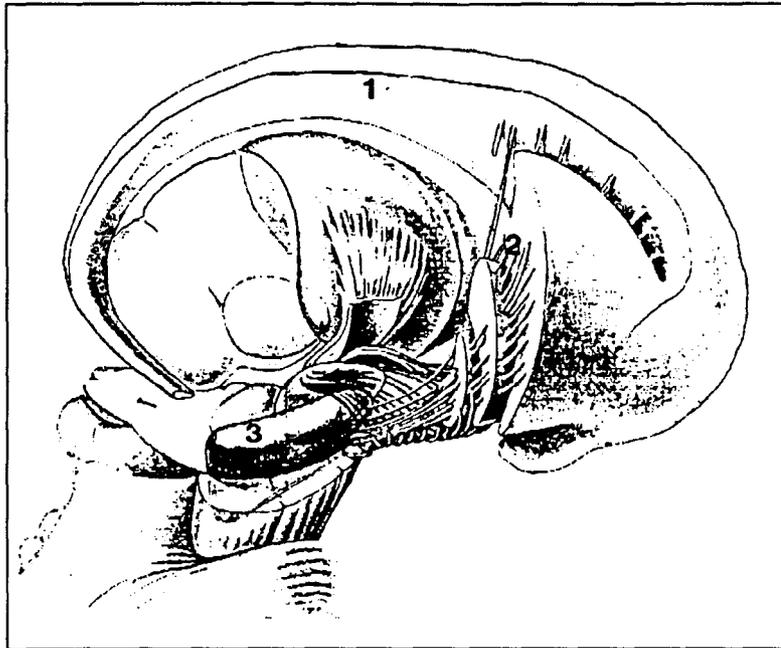


Figure 25 : Coupe du cerveau humain présentant l'organisation des ganglions de la base (1 : noyau caudé, 2 : putamen, 3 : substance noire).

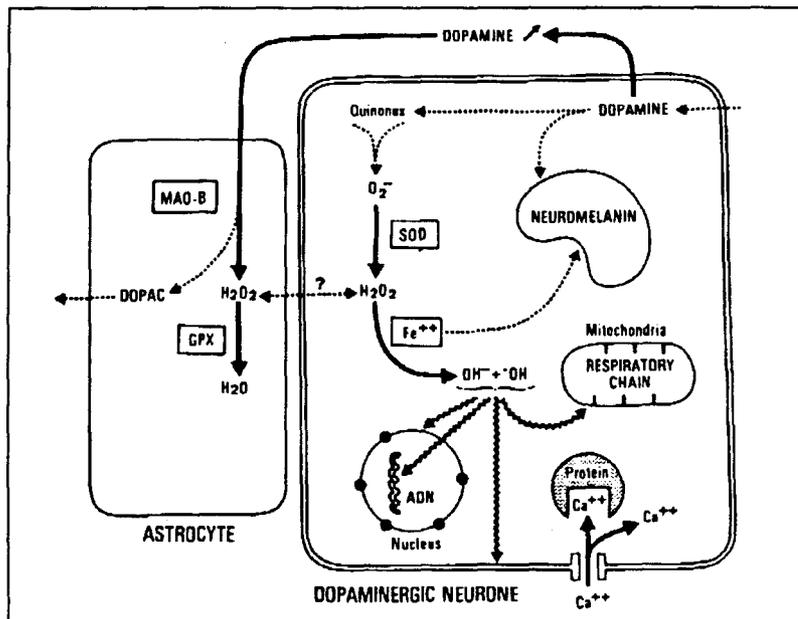


Figure 26 : Représentation schématique du rôle hypothétique des radicaux libres et du calcium dans la maladie de Parkinson (SOD : superoxyde dismutase, MAO : monoamine oxydase, GPX : glutathione peroxydase)

L'implication du fer dans la maladie de Parkinson semble donc aujourd'hui fort probable (Youdim *et al.*, 1989; Ben-Sachar *et al.*, 1992; Morris *et al.*, 1992c). En effet, en présence d'un excès de fer, le stress oxydatif (provoqué par une combinaison des radicaux libres et du fer, Figure 26 p. 144) pourrait contribuer à la destruction sélective des neurones dopaminergiques mélanisés de la substance noire des patients atteints de la maladie de Parkinson (Agid, 1991; Agid *et al.*, 1993. Faucheux et Nieoullon, 1993). Cependant, le mécanisme par lequel le fer est prélevé par les neurones dopaminergiques reste inconnu. Une voie d'accès possible serait celle impliquant un prélèvement de sérotransferrine selon un processus médié par son récepteur, ce dernier jouant alors un nouveau rôle en modulant la libération du fer de la sérotransferrine (Aisen, 1992). Partant de cette hypothèse, Faucheux *et al.* (1993) ont imaginé que l'accumulation du fer dans la substance noire était rendue possible par l'augmentation du nombre de récepteur de la sérotransferrine à la surface des neurones dopaminergiques des patients atteints de la maladie de Parkinson. Néanmoins, ces auteurs n'ont pu mettre en évidence une différence significative entre le nombre de sites de fixation mesuré sur le mésencéphale de patients atteints de cette maladie neurodégénérative et celui établi pour le mésencéphale de sujets témoins.

La deuxième application, quant à elle, rejoint la première puisqu'elle vise également à expliquer certains désordres pathologiques. En effet, nous avons vu précédemment, dans les généralités, qu'un déficit en fer lors d'une grossesse (Carriaga *et al.*, 1991) ou d'une anémie (Ferguson *et al.*, 1992) pouvait être mis en évidence lors d'un dosage ELISA du récepteur de la sérotransferrine humaine. Nous désirions donc réaliser un dosage du récepteur de la lactotransferrine humaine afin d'étudier l'expression de ce récepteur sur diverses cellules isolées ou en culture tout d'abord puis sur des cellules sanguines de patients présentant diverses pathologies. Pour ce faire, nous avons préféré utiliser, lors

de la réalisation des dosages ELISA, les deux types d'anticorps anti-récepteur dont nous disposions plutôt que la lactotransferrine humaine, en raison des problèmes occasionnés lors de l'utilisation de cette glycoprotéine et que nous développerons dans ce chapitre.

La détection de récepteurs spécifiques de la lactotransferrine au niveau du mésencéphale de sujets sains a, quant à elle, été effectuée à l'aide des anticorps polyclonaux anti-récepteur seuls.

II- MODE OPERATOIRE

A- Détection par immunocytochimie du récepteur de la lactotransferrine sur des coupes flottantes de cerveau humain

1- Préparation des coupes flottantes

Les coupes flottantes de cerveau ne sont en général constituées que d'un seul hémisphère, l'autre hémisphère étant utilisé pour des études pathologiques.

L'hémisphère disponible est donc disséqué, à l'aide d'un scalpel, le plus rapidement possible et le tissu est fixé sous agitation à 4°C pendant 72 h dans du tampon PBS renfermant 4 % de paraformaldéhyde et 15 % d'acide picrique. Les blocs fixés sont alors lavés pendant 12 à 24 h avec chacune des solutions suivantes : PBS, PBS + 5, 10, 15 ou 20 % de sucrose. Puis ils sont congelés dans de l'isopentane refroidi à -70 °C dans un bain d'acétone-glace carbonique pour les petits blocs (5 mm x 1 cm au maximum) ou dans de la carboglace pillée pour les blocs les plus gros. Des coupes de 40 µm peuvent ensuite être coupées au microtome à congélation et stockées à 4°C dans du tampon TBS renfermant 0,1 % d'azide.

2- Immunocytochimie

a- Fixation des anticorps

L'incubation des coupes flottantes en présence, à différentes dilutions, des anticorps polyclonaux anti-récepteur nécessite plusieurs manipulations préliminaires.

Ainsi, chaque coupe, après avoir été sélectionnée, est lavée deux fois, pendant 8 minutes à chaque fois, dans du tampon TBS 0,25 M pH 7,4. Puis la peroxydase endogène est inhibée en incubant pendant 5 minutes les coupes en présence de méthanol (20 % final) et d'eau oxygénée 30 % (3% de cette solution). Après deux nouveaux lavages, les coupes sont mises en présence, pendant cinq minutes, de tampon TBS 0,25 M pH 7,4 Triton X-100 (Merck) 0,2 %, cela afin de permettre la pénétration ultérieure des anticorps polyclonaux anti-récepteur. La coupe est encore lavée deux fois avant d'être incubée pendant 30 min dans du tampon TBS 0,25 M pH 7,4 renfermant du serum normal de chèvre (dilution 1/30^{ème}), cela afin d'inhiber les liaisons non spécifiques que les anticorps polyclonaux anti-récepteur pourraient établir. Finalement après deux nouveaux lavages, la coupe est incubée pendant 96 heures en présence des anticorps polyclonaux anti-récepteur. Cette incubation, contrairement aux précédentes réalisées à température ambiante, est effectuée à 4°C dans du tampon TBS 0,25 M pH 7,4 renfermant 1 % de serum normal d'homme et de chèvre et 0,02 % de thimerosal.

b- Révélation

Après 96 h d'incubation à 4°C, les coupes sont ramenées à température ambiante et lavées deux fois dans le tampon TBS. Une incubation en présence d'anticorps biotinylés (dilution 1/250^{ème}) dirigés contre les immunoglobulines de lapin (coffret Vectastain, Vector Laboratories) est alors réalisée pendant 30 min. Deux nouveaux lavages sont ensuite effectués et les coupes sont mises en présence pendant 1 h d'avidine marquée à la

peroxydase (coffret Vectastain, Vector Laboratories). Enfin, une révélation colorée est réalisée dans du tampon Tris 0,25 M pH 7,4 renfermant 0,05 % de diaminobenzidine (Sigma), 0,06 % d'H₂O₂ et 0,1 M d'imidazole. Après arrêt de la réaction en présence de Tris 0,25 M pH 7,4, les coupes sont montées, déshydratées et recouvertes d'une lamelle. Toutes les incubations décrites dans ce chapitre ainsi que le précédent sont effectuées sous agitation lente.

B- Dosage du récepteur de la lactotransferrine humaine par la méthode ELISA

La mise en place de la méthode ELISA nécessite tout d'abord l'activation de la plaque de microtitration (Nunc Maxisorb). Cette étape est réalisée par addition dans chaque puit de 200 µl d'une solution de PBS renfermant 10 µg/ml d'anticorps monoclonaux 5B3G10 puis la plaque est stockée pendant une nuit à 4°C. 200 µl de PBS renfermant 3 % de gélatine (Biorad) sont alors ajoutés dans chaque puit afin d'empêcher les fixations non spécifiques et la plaque est incubée pendant 1 h à 37 °C. Après deux lavages en présence de PBS Tween 20 (Merck) 0,05 % (v/v), 100 µl de lysats de plaquettes ou de cellules Jurkat ou de cellules Dami ou encore 100 µl de récepteur pur obtenu par élution de la membrane d'immobilon sont ajoutés et la plaque est incubée pendant deux heures à 37°C. Trois lavages en présence de PBS Tween 20 0,05 % sont alors effectués et 200 µl de la fraction Ig G renfermant les anticorps polyclonaux anti-récepteur sont ajoutés, dans chaque puit, à la dilution 1/300^{ème}. Après une incubation d'une heure à 37°C et une seconde série de lavages, les anticorps polyclonaux fixés sont, à ce stade, détectés par addition, à raison de 200 µl par puit, d'anticorps anti-immunoglobulines de lapin (Diagnostic Pasteur) marqués à la peroxydase (dilution 1/2500^{ème}) suivie d'une révélation colorée en présence d'une solution de PBS/acide citrique pH 5,5 renfermant 0,03 % d'H₂O₂ (v/v) et 40 % d'O-phenylène diamine (p/v) (Sigma).

III- RESULTATS

A- Détection par immunocytochimie du récepteur de la lactotransferrine sur des coupes flottantes de cerveau

Les expériences d'immunocytochimie réalisées indiquent que les anticorps polyclonaux dirigés contre le récepteur membranaire de la lactotransferrine humaine se fixent spécifiquement sur divers types de cellules et de tissus du cerveau, prélevé post-mortem, de sujets sains.

Le caractère spécifique de cette fixation est démontré grâce aux manipulations suivantes:

- La dilution progressive des anticorps polyclonaux anti-récepteur (1/100, 1/500, 1/1000, 1/5000, 1/10000 et 1/50000) entraîne une diminution correspondante de l'intensité du marquage, l'absence de marquage étant obtenue avec la dernière dilution.
- Les expériences réalisées en absence d'anticorps primaire constituent un excellent témoin négatif puisqu'aucun marquage n'est observé lors de leur réalisation.
- Les manipulations effectuées sur trois cerveaux différents, provenant de sujets sains âgés respectivement de 53, 83 et 92 ans lors de leur décès, fournissent les mêmes résultats. Pour plus de commodités, nous les appellerons cerveau 1, 2 et 3.

De même, le marquage intense de certains neurones particuliers et pas d'autres constitue une preuve supplémentaire du caractère spécifique de la fixation des anticorps polyclonaux anti-récepteur sur le cerveau humain.

Les divers types de cellules et de tissus reconnus par les anticorps polyclonaux préparés sont représentés sur la Figure 27 p. 150.

Ainsi, nous avons observé un marquage spécifique sur :

(A) : certains vaisseaux sanguins (têtes de flèche) et neurones (flèches) du noyau de la troisième paire de nerfs craniens (nerfs oculomoteurs) du mésencéphale.

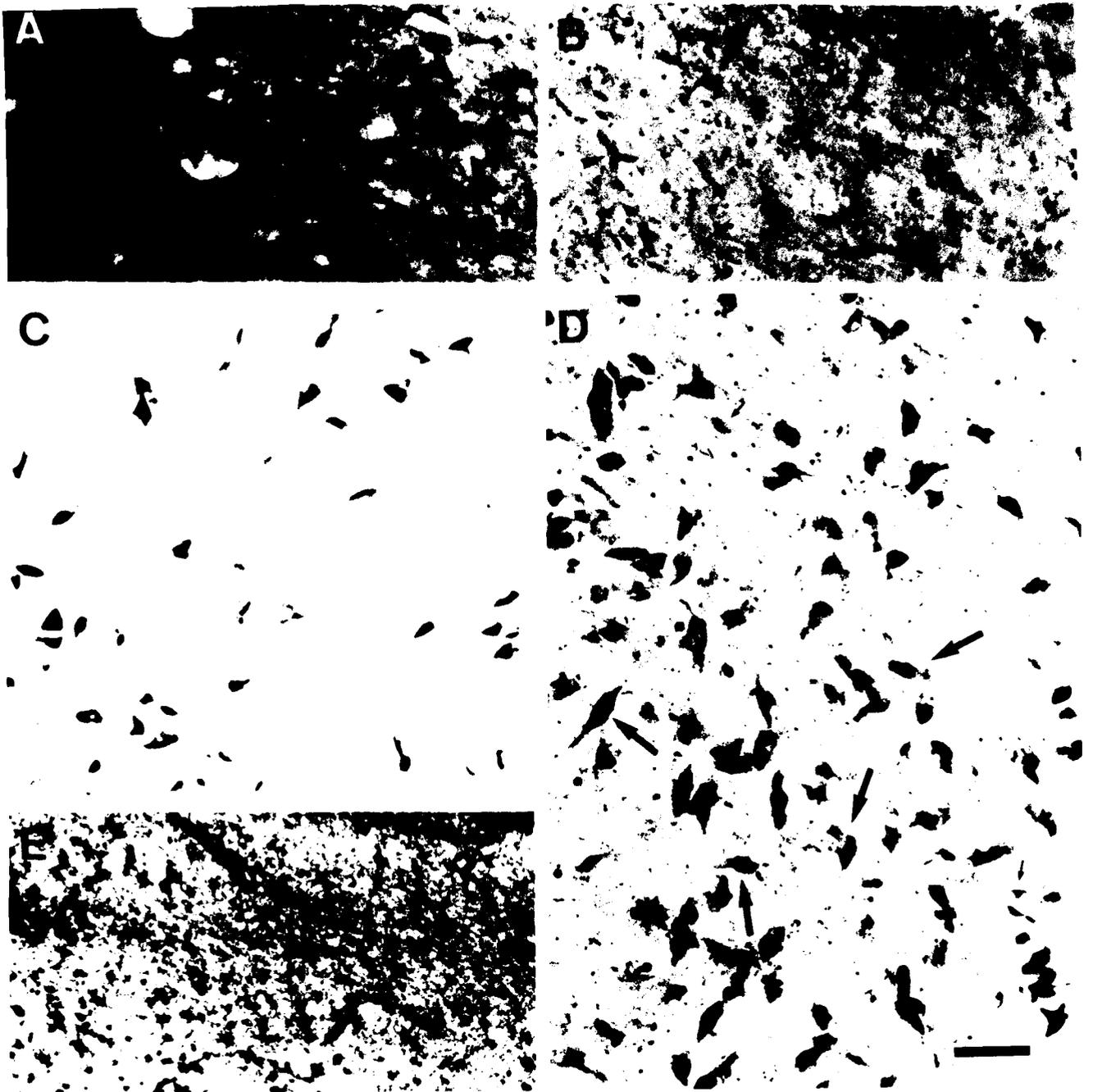


Figure 27 : Détection par immunocytochimie des récepteurs de la lactotransferrine dans le cerveau humain (barre d'échelle : 100 μ m).

(B) : les neurones probablement cholinergiques (flèches) et les vaisseaux (têtes de flèche) du noyau caudé. Nous avons également remarqué que les neurones GABAergiques, nombreux dans cette structure du striatum, ne sont pas marqués.

(D) : certains corps cellulaires de neurones de la substantia nigra pars compacta contenant (flèches) ou ne contenant pas (flèches fines) de neuromélanine.

De même, l'espace interneuronal (ou neuropile) qui contient des arborisations dendritiques et des fibres de passage est nettement marqué par rapport au témoin (C) obtenu lors d'une manipulation ne faisant pas intervenir d'anticorps primaires. Sur ce témoin, la neuromélanine contenue dans les corps cellulaires des neurones dopaminergiques de la substance noire est visible.

(E) : certaines cellules gliales (astrocytes) dans les corps calleux.

Les manipulations conduisant à ces résultats sont réalisées respectivement sur les cerveaux 1 (C et D), 2 (A) et 3 (B et E) avec les dilutions 1/100 (E), 1/500 (B) et 1/1000 (A, C et D) pour les anticorps polyclonaux anti-récepteur.

Les photographies prises à fort grossissement (Figure 28 p. 152 et 29 p. 153) confirment les résultats précédents, ce qui pose le problème de l'implication ou non du récepteur de la lactotransferrine dans le mécanisme d'accumulation du fer dans la substance noire des patients atteints de la maladie de Parkinson. En effet, nous avons mis en évidence une fixation importante des anticorps polyclonaux anti-récepteur sur les neurones du mésencéphale qui dégèrent lors du développement de cette maladie neurodégénérative.

Ainsi, nous avons observé (Figure 28 p. 152), lors de manipulations d'immunocytochimie réalisées sur le cerveau 2 avec les anticorps polyclonaux à la dilution 1/1000, un immunomarquage intense des neurones mélanisés (flèches) ou non (flèches fines), de leurs prolongements dendritiques ou axonaux et des vaisseaux (têtes de flèche) de la substantia nigra pars lateralis (A) ainsi que des neurones mélanisés (flèches) et des vaisseaux (têtes de flèche) de l'aire tegmento-ventrale (B). De même, nous avons visualisé un marquage conséquent (Figure 29 p. 153) des cellules gliales

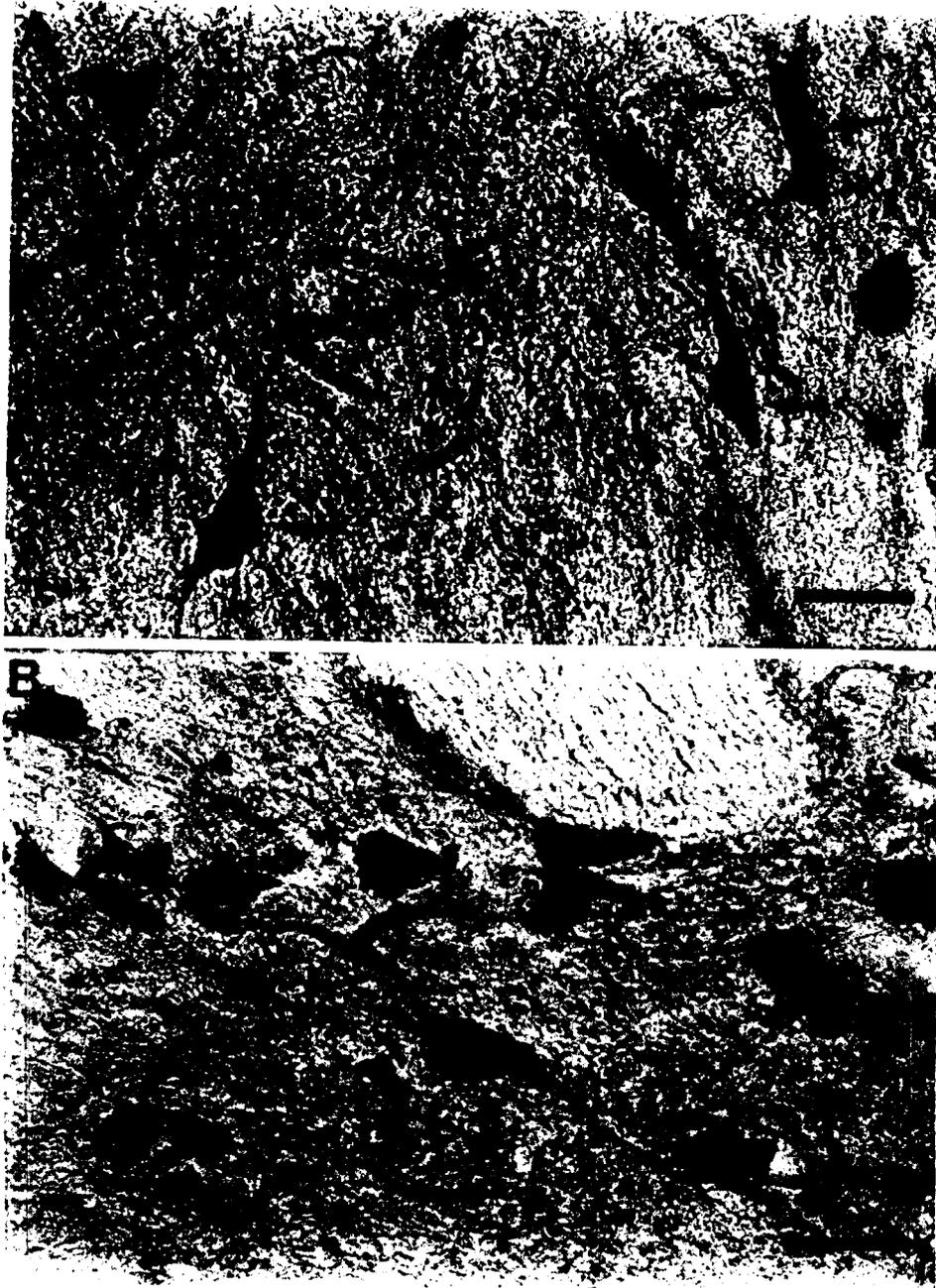


Figure 28 : Identification des neurones du mésencéphale présentant une immunoréactivité avec les anticorps dirigés contre le récepteur de la lactotransferrine humaine (barre d'échelle : 50 μ m).

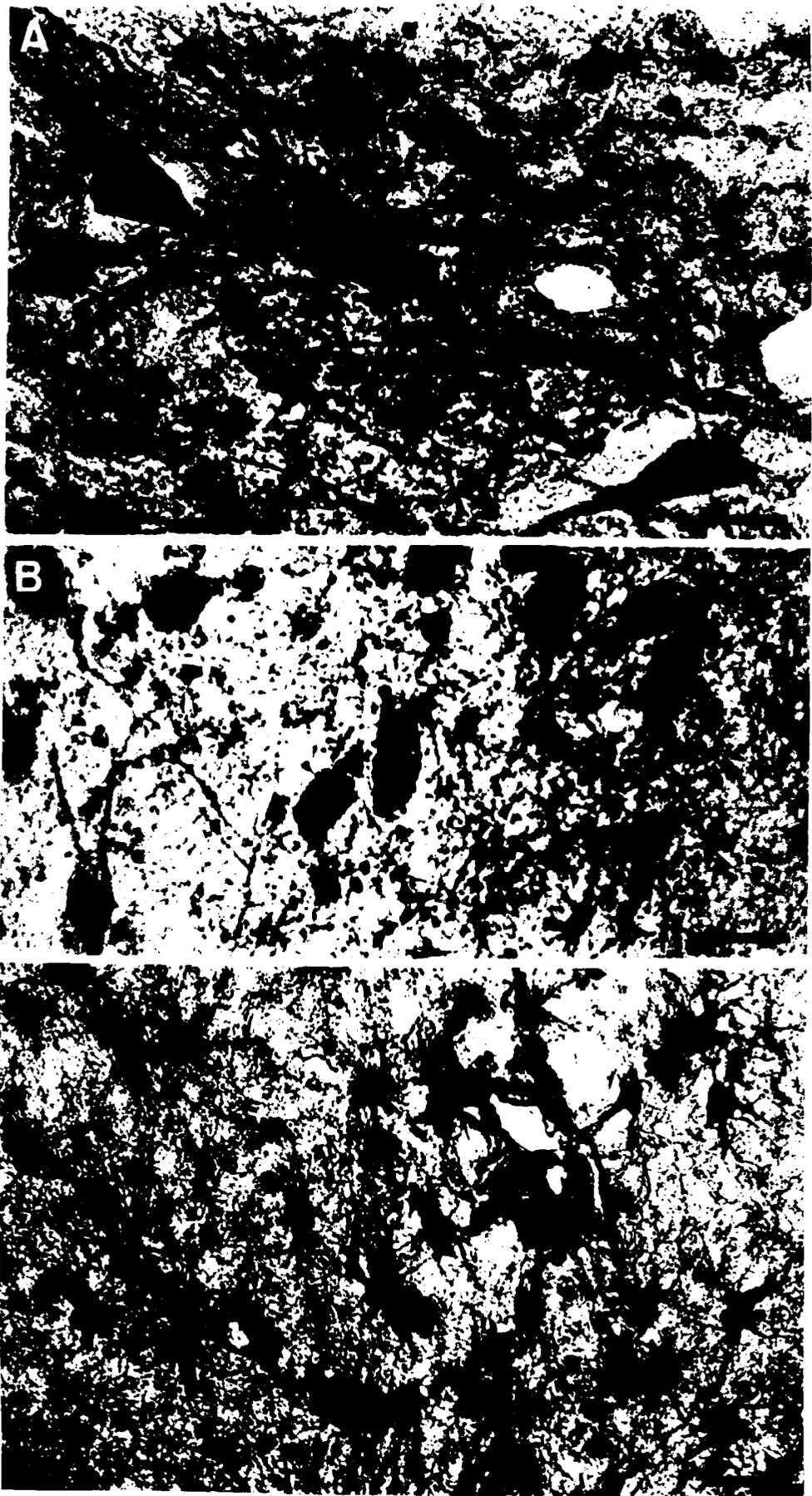


Figure 29 : Observation à fort grossissement de l'immunomarquage des neurones et des cellules gliales obtenu avec les anticorps polyclonaux anti-récepteur (A et C, barre d'échelle : 25 μm ; B, barre d'échelle : 50 μm).

du corps calleux (C) et des neurones situés dans le noyau de la troisième paire de nerfs crâniens (A). Enfin, nous avons également mis en évidence (B) la fixation des anticorps polyclonaux anti-récepteur sur les neurones situés dans le nucleus basalis de Meynert, qui constituent la population neuronale impliquée dans la maladie d'Alzheimer.

B- Dosage du récepteur de la lactotransferrine humaine par la méthode ELISA

1- Choix de la technique

Lors de la mise au point du dosage ELISA du récepteur de la lactotransferrine humaine, notre choix s'est porté très tôt sur la méthode sandwich, celle-ci faisant intervenir les deux types d'anticorps anti-récepteur dont nous disposions. En effet, l'utilisation de la lactotransferrine, lors d'un dosage dans lequel la plaque de microtitration est également activée par l'anticorps monoclonal anti-récepteur, s'est révélée très rapidement impossible pour les deux raisons suivantes. L'interaction de la lactotransferrine avec son récepteur n'est pas très forte lorsque ce dernier est présent dans un lysat cellulaire. Ainsi, les densités optiques obtenues lors d'un tel dosage sont très faibles (inférieures à 0,1). De même, la lactotransferrine adhère fortement au plastique de la plaque de microtitration quel que soit l'agent bloquant utilisé, les deux meilleurs étant, comme le révèle nos expérimentations, la gélatine et le sérum de veau foetal (Figure 30 p.155).

2- Dilutions optimales des anticorps dirigés contre le récepteur de la lactotransferrine humaine

La plaque de microtitration a été activée avec l'anticorps monoclonal anti-récepteur aux concentrations suivantes : 5, 10 et 20 µg/ml. La concentration intermédiaire s'est révélée être la meilleure car elle produit les densités optiques les plus élevées et les

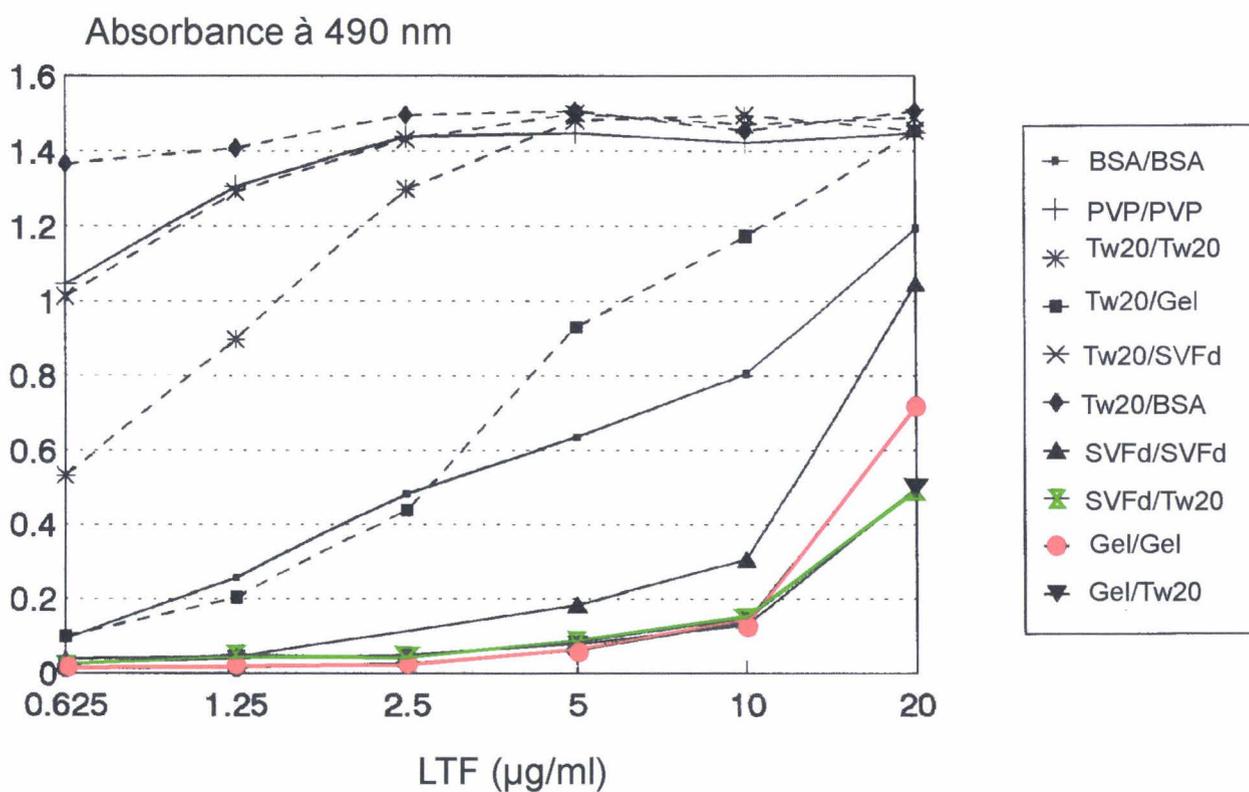


Figure 30 : Etude comparative de l'effet inhibiteur de différences agents bloquants sur l'adhérence de la lactotransferrine à la plaque de microtitration (BSA : Bovine Serum Albumine, PVP : PolyVinyl Pyrrolidone, Tw20 : Tween 20, Gel : Gélatine, SVFd : Sérum de Veau Foetal décomplémenté).

témoins négatifs les plus faibles, ces derniers étant obtenus en absence de récepteur de la lactotransferrine humaine.

La dilution adéquate des anticorps polyclonaux anti-récepteur a été déterminée par un dosage ELISA faisant intervenir du lysat plaquettaire à la concentration 300 µg/ml. La dilution 1/300^{ème} a été retenue car elle permet d'obtenir une densité optique peu élevée (inférieure à 0,1) pour le témoin négatif.

3- Résultats

Afin de vérifier que la protéine dosée était bien le récepteur de la lactotransferrine humaine, nous avons réalisé, en parallèle des dosages du récepteur présent dans les différents lysats cellulaires, des dosages du récepteur de la lactotransferrine pur, élué de la membrane d'immobilon selon la technique décrite précédemment.

Les différents lysats (plaquettes, cellules Dami et Jurkat) ont été utilisés aux concentrations suivantes : 3 et 1 mg/ml; 300, 100, 30, 10 et 3 µg/ml. De même, le récepteur élué possédait, quant à lui, les concentrations données ci-après : 30; 10; 3; 1; 0,3; 0,1 et 0,03 µg/ml.

Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 31 p. 157. Il s'agit d'une représentation logarithmique d'une moyenne obtenue à partir de cinq manipulations. A partir de ces données, nous avons déterminé la quantité de récepteur de la lactotransferrine présente dans 1 mg de protéines totales.

Ainsi, le lysat plaquettaire renferme 3,65 µg de récepteur par mg de protéines totales contre seulement 0,86 µg par mg de protéines totales pour le lysat de cellules Jurkat.

Afin de vérifier ces résultats, nous avons ensuite effectué plusieurs dosages ELISA en utilisant les lysats à deux concentrations (300 µg/ml et 1mg/ml), chaque concentration étant réalisée en triple exemplaire. Les résultats obtenus lors de trois dosages de ce type ont confirmé les précédents, à savoir que nous avons mis en évidence la présence de

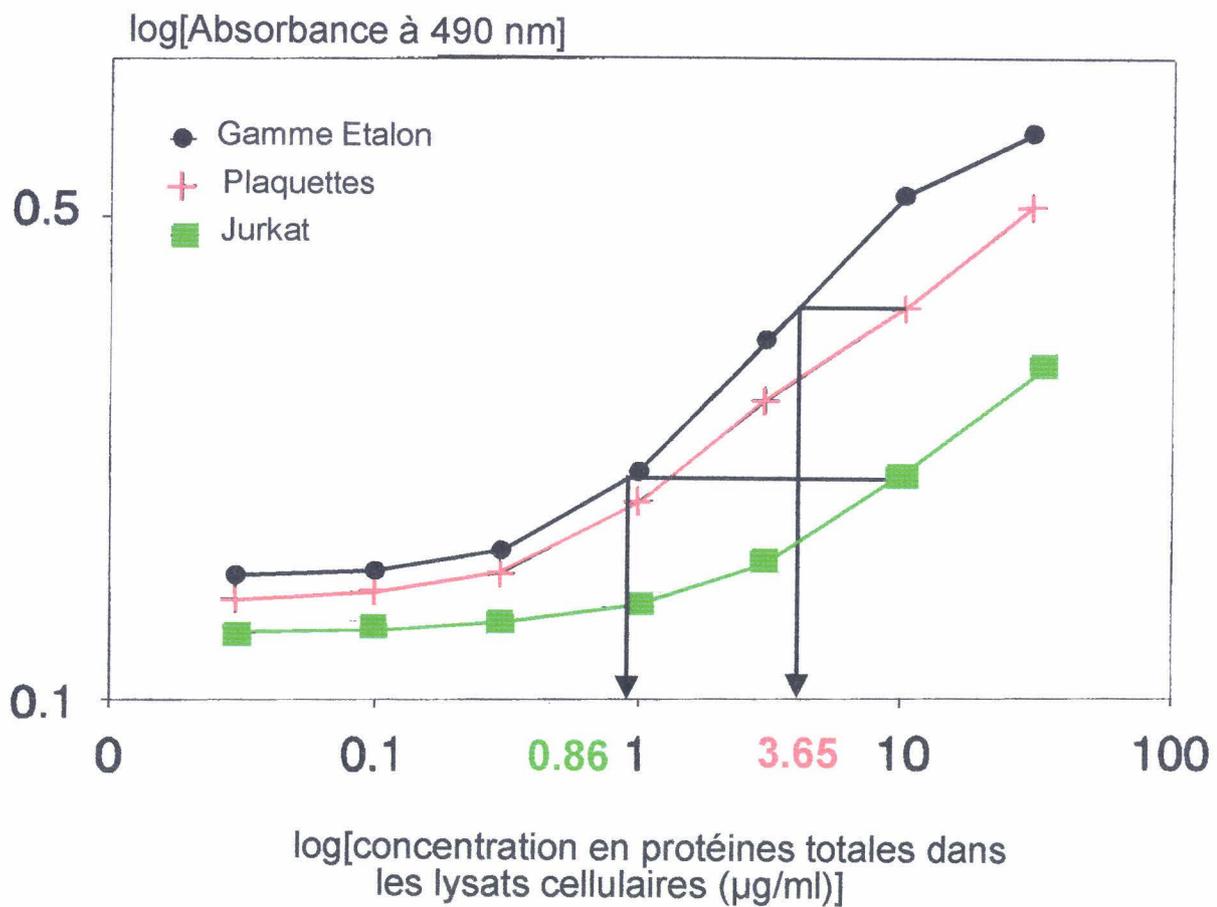


Figure 31 : Dosage du récepteur de la lactotransferrine humaine par la méthode sandwich dans les lysats de plaquettes et de cellules Jurkat.

3,66 µg de récepteur par mg de protéines totales dans les lysats plaquettaires contre 0,86 µg par mg de protéines totales dans les lysats de cellules Jurkat.

IV- CONCLUSION

L'utilisation des anticorps polyclonaux anti-récepteur lors de manipulations d'immunocytochimie réalisées sur le striatum et le mésencéphale de sujets sains a mis en évidence la présence de récepteurs spécifiques de la lactotransferrine sur certaines structures particulières du cerveau et notamment sur les neurones particulièrement touchés lors du développement de la maladie de Parkinson. Une perspective s'ouvre donc à nous dans l'étude de l'expression du récepteur de la lactotransferrine humaine au niveau du cerveau de patients atteints de cette maladie neurodégénérative, d'autant plus que Kawamata *et al.* (1993) et Leveugle *et al.* (1994) ont mis en évidence une augmentation de la concentration en lactotransferrine dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de désordres neurodégénératifs.

Le dosage ELISA du récepteur de la lactotransferrine a, quant à lui, d'une part, confirmé le fait que l'anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur soluble de la lactotransferrine et les anticorps polyclonaux dirigés contre le récepteur membranaire de la lactotransferrine reconnaissent bien la même protéine et d'autre part, révélé la présence, en quantité plus importante, de récepteur dans les lysats de plaquettes (3,65 µg/mg de protéines totales) que dans les lysats de cellules Jurkat (0,86 µg/mg de protéines totales).

Une fois ses deux applications réalisées, il nous restait à utiliser les anticorps polyclonaux préparés dans leur application première, à savoir le criblage d'une banque d'ADNc visant à cloner le récepteur de la lactotransferrine humaine. Cependant avant de cribler une banque, il est nécessaire de la construire et pour cela de sélectionner le type cellulaire à partir duquel l'ADNc sera préparé, les résultats obtenus lors des dosages ELISA nous incitant à nous intéresser plus particulièrement aux plaquettes.

CARACTERISATION DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE
HUMAINE A LA SURFACE DES MEGACARYOBLASTES DE LA LIGNEE
DAMI

I- INTRODUCTION

Le récepteur de la lactotransferrine humaine a été identifié au laboratoire par Leveugle *et al.* (1993) à la surface des plaquettes sanguines. De même, nous avons montré, lors d'un dosage ELISA, que ces cellules exprimaient de façon importante ce récepteur. Malheureusement, elles ne renferment que très peu de matériel biologique et elles nécessitent d'être isolées du sang ou de concentrés plaquettaires à chaque manipulation. C'est pourquoi il nous a semblé intéressant d'étudier l'expression du récepteur de la lactotransferrine à la surface d'une lignée cellulaire proche des plaquettes, en utilisant tout d'abord l'anticorps monoclonal 5B3G10 puis les anticorps polyclonaux dirigés contre le récepteur membranaire, ceci afin de sélectionner la lignée cellulaire à partir de laquelle nous isolerons l'ARNm en vue du clonage de ce récepteur.

Nous nous sommes donc intéressées à la lignée Dami, cette lignée présentant l'avantage de ne posséder que des marqueurs des mégacaryoblastes et des mégacaryocytes immatures (cellules précurseurs des plaquettes).

II- MODE OPERATOIRE

A- Culture cellulaire :

Les cellules Dami sont cultivées dans du milieu de Dulbecco modifié selon Iscove (Gibco-BRL) additionné de 10 % de sérum de cheval (Gibco-BRL).

Ces cellules nous ont été données par le docteur S. Greenberg (Brigham and Women's Hospital, Hematology Division, Boston, USA).

B- Caractérisation du récepteur

1- Expériences de cytofluorimétrie en flux

Elles sont réalisées les 1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} jours suivant le repiquage et font intervenir 10⁶ cellules par tube. Les trois techniques décrites dans l'appendice technique p. A5 et A6 sont développées ici : fixation directe et indirecte de la lactotransferrine et fixation de l'anticorps monoclonal anti-récepteur 5B3G10.

De même, la fixation des anticorps polyclonaux anti-récepteur membranaire a été effectuée à la surface des cellules Dami au 3ème jour de culture selon le protocole suivant. 10⁶ cellules en suspension dans 150 µl de PBS sont incubées pendant une heure en présence des anticorps polyclonaux anti-récepteur (dilution 1/1000) et d'azide (1/1000). Les cellules sont ensuite lavées et des anticorps anti-Ig G de lapin (Sigma) marqués au FITC (dilution 1/80) sont ajoutés. Après trente minutes d'incubation, les cellules sont lavées deux fois puis analysées par cytofluorimétrie en flux. La fixation non spécifique est estimée en incubant les cellules dans les mêmes conditions mais en remplaçant les anticorps polyclonaux anti-récepteur par des Ig G de lapin (dilution 1/1000).

2- Electrophorèse et immunorévélation

6 10⁶ cellules sont solubilisées en présence de Triton X-100 (Boehringer) et de diisopropyl fluorophosphate (Aldrich). Les protéines cellulaires ainsi préparées sont alors soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide, dans des conditions réductrices ou non, puis immunorévéllées.

Les protocoles de l'électrophorèse et de l'immunorévélation sont décrits dans l'appendice technique p. A3 à A5 . Le premier anticorps utilisé est l'anticorps monoclonal 5B3G10 (dilution 1/2500) et les anticorps secondaires sont des anticorps polyclonaux anti-Ig M de souris (Sigma). Ces derniers sont marqués à la peroxydase.

3- Détermination des paramètres de fixation de la lactotransferrine à la surface des cellules Dami

Ces expériences sont réalisées quand les cellules Dami ont trois jours de culture.

Les cellules Dami sont lavées et resuspendues, à raison de 10^6 cellules par tube, dans une solution de PBS renfermant 0,2 % de sérotransferrine humaine (Behring), la sérotransferrine permettant de limiter l'absorption de la lactotransferrine sur les parois du tube. Différentes concentrations de lactotransferrine marquée à l'iode ^{125}I (125 nM à 1,75 μM) sont alors ajoutées (trois tubes par concentration) et les cellules sont incubées pendant 45 min à 4°C. La fixation non spécifique de la lactotransferrine est évaluée en ajoutant 100 excès molaire de cette même protéine non marquée. Une fraction aliquote de 50 μl de solution radioactive est prélevée, après une centrifugation, dans un tube de chaque concentration et cela afin de déterminer la quantité de lactotransferrine radioactive libre. Les deux autres séries de cellules sont lavées trois fois par du PBS à 4°C et la radioactivité de chaque tube est mesurée au compteur gamma (LKB).

La différence entre la quantité totale de ligand fixé et la quantité de ligand fixé de manière non spécifique détermine la fixation spécifique de la lactotransferrine sur les cellules. La constante de dissociation (Kd) et le nombre de sites de fixation (n) sont calculés selon la méthode de Scatchard (1949).

C- Détermination des paramètres de fixation de la lactotransferrine à la surface des plaquettes

Le protocole utilisé est celui décrit par Kahn et Sinha (1990) et modifié par nos soins. Ainsi, un volume donné de concentré plaquettaire est chromatographié sur une colonne de Sépharose 4B (Pharmacia). Le nombre de plaquettes présentes dans un millilitre de concentré filtré est alors déterminé au cytofluorimètre (Becton Dickinson).

Puis différentes concentrations de lactotransferrine marquée à l'iode ^{125}I (25 nM à 1,125 μM) sont ajoutées à 10^8 plaquettes (trois tubes par concentration) en suspension dans une solution de PBS renfermant 0,2 % de sérotransferrine humaine (Behring).

La fixation non spécifique est évaluée comme décrit ci-dessus.

Après une heure d'incubation à 23 °C, une série de cellules est centrifugée et 50 μl de la solution radioactive est prélevée dans chaque tube afin de déterminer la quantité de lactotransferrine radioactive libre.

Les deux autres séries de suspension plaquettaire sont filtrées sous vide sur un filtre en fibre de verre (Whatman). Les filtres sont lavés deux fois avec 5 ml de PBS et leur radioactivité est mesurée comme précédemment.

Le nombre de sites de fixation de même que la constante de dissociation sont déterminées selon la méthode de Scatchard (1949).

D- Recherche du messager de la lactotransferrine humaine dans les cellules Dami

L'extraction de l'ARN total des cellules Dami est réalisée selon la technique au chlorure de césium et à l'isothiocyanate de guanidium (Sambroock *et al.*, 1989). L'ARNm est obtenu après chromatographie de l'ARN total sur une colonne d'oligo dT-cellulose (Stratagène) (Aviv et Leder, 1972).

Les expériences de "northern blot" sont réalisées selon la procédure décrite par Thomas (1980).

L'ARNm de glande sous-maxillaire bovine est utilisé comme contrôle positif (Pierce *et al.*, 1991a). L'ADNc partiel de la lactotransferrine humaine (Rado *et al.*, 1987) est marqué au ^{32}P à l'aide d'un coffret de marquage (oligolabelling) commercialisé par Pharmacia avant d'être hybridé avec l'ARNm transféré sur la membrane de nylon. Les techniques utilisées dans ce paragraphe sont davantage explicitées dans l'appendice technique partie II.

E- Etude par cytofluorimétrie en flux de la fixation d'un anticorps anti-GPIb et d'un anticorps anti-GPIIb-IIIa à la surface des cellules Dami

Le protocole utilisé est le même que celui décrit pour l'anticorps monoclonal 5B3G10 (appendice technique p. A5).

L'anticorps monoclonal anti-GPIb (clone AN51, Dako) est incubé à la dilution $1/50^{\text{ème}}$. Le deuxième anticorps est dirigé contre les immunoglobulines G de souris et est marqué au FITC (Sigma). Sa dilution est $1/100^{\text{ème}}$.

L'anticorps monoclonal anti-GPIIb-IIIa (clone Thr4/BC5, Serotec) est incubé à la dilution $1/2000^{\text{ème}}$. Le second anticorps est le même que celui décrit ci-dessus.

F- Sélection de la population cellulaire des mégacaryoblastes Dami qui exprime le récepteur de la lactotransferrine humaine

Elle se fait grâce à l'utilisation de flacons activés sur lesquels sont greffés les anticorps monoclonaux 5B3G10.

Le protocole est le suivant :

L'anticorps monoclonal 5B3G10 est dissous dans 5 ml de PBS à raison de 100 μg par ml. Cette solution est alors ajoutée à un flacon activé (AIS Microcollector, Techgen) et incubée pendant 4 heures à température ambiante. Le flacon est ensuite lavé trois fois et les sites libres sont bloqués par incubation pendant 30 min avec 5 ml d'une solution de

PBS renfermant 0,2 % de sérum albumine bovine (Sigma). Pendant cette période, 10^7 cellules Dami sont lavées et diluées dans 5ml de PBS. Quand le blocage des sites libres est terminé, le flacon est lavé et les cellules sont ajoutées. Après deux heures d'incubation à température ambiante, la suspension cellulaire non adhérente est prélevée avec une pipette stérile, lavée avec du PBS et resuspendue dans un premier temps, dans 15 ml de milieu de Dulbecco modifié selon Iscove (Gibco-BRL) et dans un deuxième temps, dans le même milieu mais conditionné, avant d'être mise en culture pendant trois jours. Le flacon contenant les cellules adhérentes est, quant à lui, lavé trois fois et les cellules sont mises en culture dans le milieu cité précédemment. Après 12 h de culture, les cellules fixées sur les anticorps commencent à se détacher.

Les deux populations sont analysées après trois jours de culture au cytofluorimètre selon deux des techniques décrites dans l'appendice technique p. A5 et A6 à savoir la visualisation de la fixation d'une part, de la lactotransferrine par la méthode indirecte et d'autre part, de l'anticorps monoclonal anti-récepteur 5B3G10.

III- RESULTATS

A- Caractérisation du récepteur membranaire de la lactotransferrine sur les cellules Dami

1- Analyse des cellules au cytofluorimètre

Greenberg *et al.* (1988) ayant montré que la lignée Dami renfermait des cellules de diamètre compris entre 12 et 120 μm , nous avons dans un premier temps analysé ces cellules au cytofluorimètre selon deux critères : leur taille et leur granulométrie (Figure 32 p. 165).

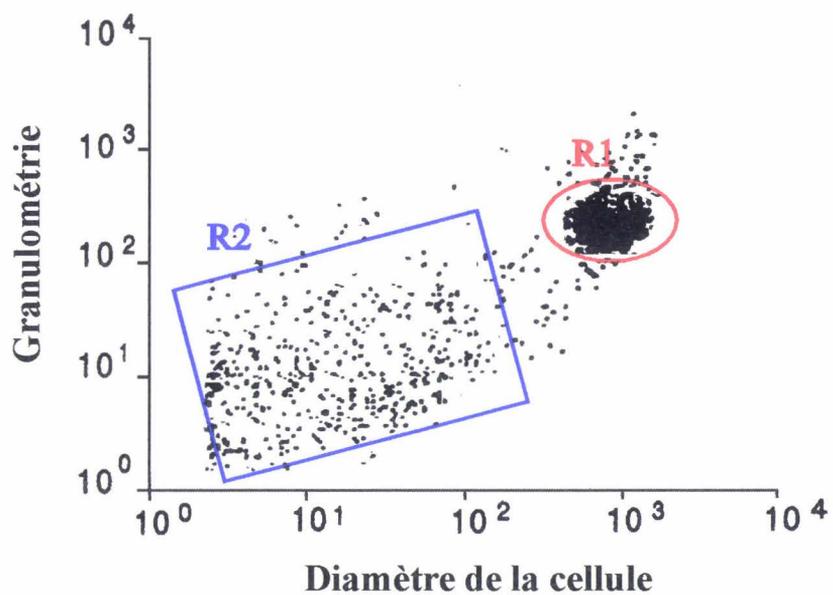


Figure 32 : Visualisation au cytofluorimètre des cellules Dam1 au troisième jour de culture. Les cellules sont séparées en deux sous-populations (R1 et R2) selon leur taille et leur granulométrie.

Pour nos études ultérieures, il nous a semblé judicieux de différencier les cellules Dami en deux sous-populations placées respectivement dans les fenêtres R1 et R2. Les cellules présentes dans la fenêtre R1 sont grosses, denses et polyploïdes et R2 renferme un faisceau de cellules moins différenciées et de diamètre variable et inférieur à celui des cellules en R1. Nous avons étudié la représentativité de ces deux sous-populations à différents jours de culture (Tableau XI p. 167). Les résultats obtenus ont montré que d'une part, les cellules en R1 qui sont peu nombreuses le premier jour de culture (12 % de la population totale) deviennent la sous-population majoritaire au quatrième jour (77 % de la population totale) et d'autre part, que les cellules en R2 subissent l'effet inverse : 88 % des cellules le premier jour de culture et 23 % le quatrième jour.

2- Etude de la fixation de la lactotransferrine et des anticorps monoclonal 5B3G10 et polyclonaux anti-récepteur membranaire à la surface des cellules Dami

Cette étude, réalisée tout d'abord au troisième jour de culture, a montré que seules les cellules présentes dans la fenêtre R1 et majoritaires à ce jour de culture fixent la lactotransferrine et l'anticorps monoclonal anti-récepteur.

La Figure 33 p. 168 présente les histogrammes de fluorescence correspondant à la fixation :

- de la lactotransferrine-HyF (A), cette fixation étant réversible puisque l'addition de 100 excès molaire de lactotransferrine non marquée (pic 1) inhibe la fixation de lactotransferrine-HyF

- de la lactotransferrine (B) par la méthode indirecte

- des anticorps monoclonal 5B3G10 (C) et polyclonaux anti-récepteur membranaire confirment les résultats obtenus lors des fixations de lactotransferrine par les méthodes directe et indirecte.

Tableau XI : Cinétique d'apparition du récepteur de la lactotransferrine à la surface des cellules Dami

Jour de culture	% de cellules en R1	% de cellules en R2	% de cellules exprimant le récepteur de la lactotransferrine
1	12	88	12,5
2	32	68	28,5
3	64	36	64
4	77	23	80

NB : Ces résultats constituent une moyenne de trois manipulations. Une différence de l'ordre de 3 à 5 % a été déterminée entre chaque résultat.

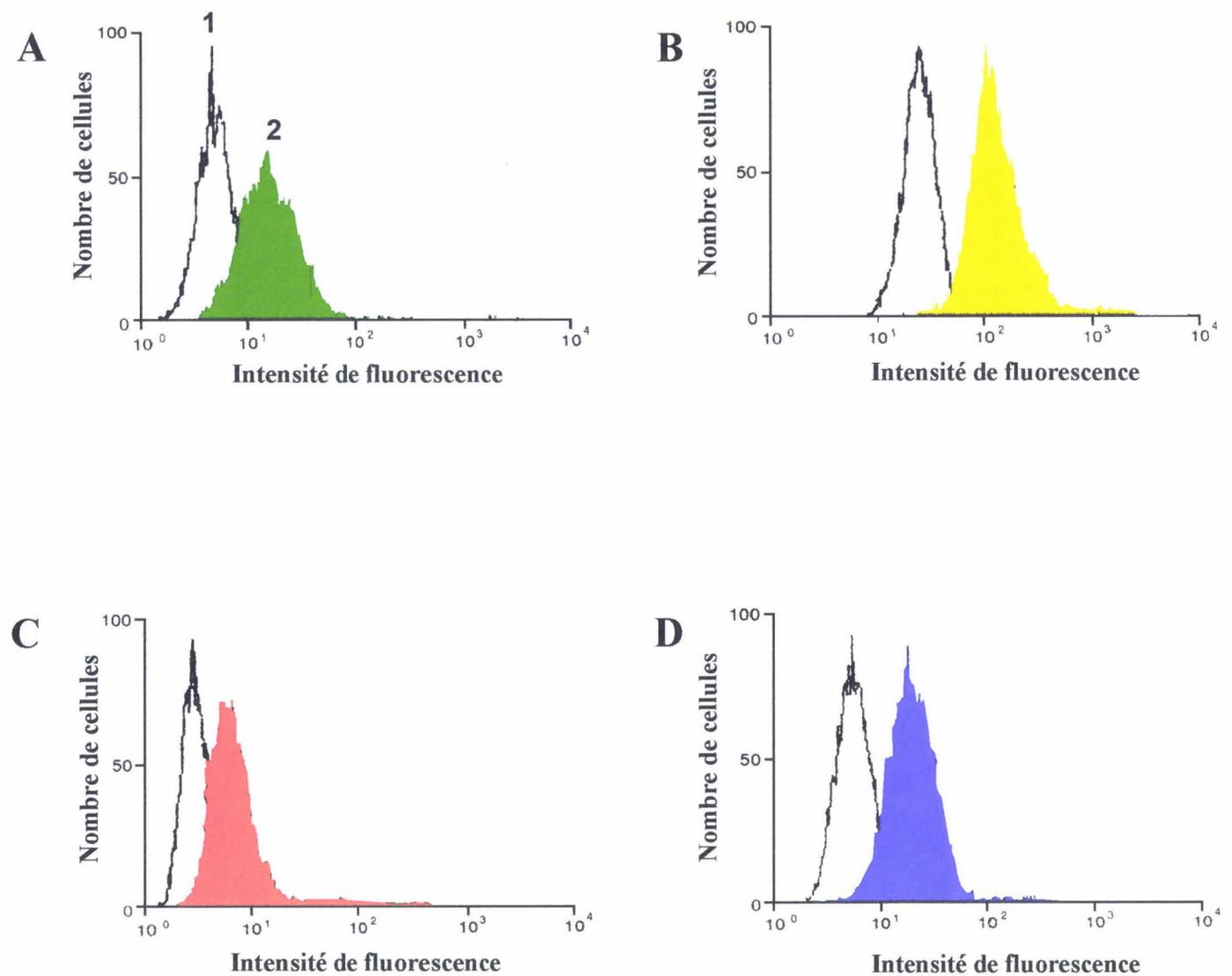


Figure 33 : Etude par cytofluorimétrie en flux de la fixation à la surface des cellules Dami (3ème jour de culture) de :

- A : la lactotransferrine-Hyf
- B : la lactotransferrine
- C : l'anticorps monoclonal 5B3G10
- D : les anticorps polyclonaux anti-récepteur

pic 1 : Fixation non spécifique
pic 2 : Fixation totale

Cette même étude a ensuite été réalisée à différents jours de culture afin d'étudier l'apparition du récepteur de la lactotransferrine humaine à la surface des cellules Dami. Les profils de fixation, du 1^{er} au 4^{ème} jour de culture, de l'anticorps monoclonal 5B3G10 sont représentés dans la Figure 34 p. 170. A partir de ces profils, nous avons pu estimer le pourcentage de cellules Dami exprimant le récepteur de la lactotransferrine humaine. Ces valeurs sont reportées dans le tableau XI p. 167. L'analyse de ce tableau met en évidence une augmentation concomitante, entre le 1er et le 4ème jour de culture, du pourcentage de cellules présentes dans la fenêtre R1 et du pourcentage de cellules exprimant le récepteur de la lactotransferrine humaine, ce qui confirme les résultats déjà obtenus, à savoir que parmi les cellules Dami, seule la population cellulaire présente dans la fenêtre R1 exprime le récepteur de la lactotransferrine humaine.

3- Caractérisation du récepteur de la lactotransferrine par immunorévélation

Les lysats de plaquettes et de cellules Dami ont été soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et dans des conditions non réductrices. Après électrotransfert, les protéines présentes dans les lysats ont été immunorévéllées par l'anticorps monoclonal 5B3G10 à la dilution 1/2500 ème (Figure 35 p. 171). Dans chaque lysat, une protéine de masse moléculaire 105 kDa est immunorévéllée, ce qui confirme la présence du récepteur de la lactotransferrine humaine sur les cellules Dami et met en évidence l'identité de masse moléculaire entre le récepteur des cellules Dami et le récepteur plaquettaire.

Une protéine de masse moléculaire 72 kDa est également révélée dans la piste du lysat de cellules Dami. Il s'agit certainement d'une protéine portant l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal 5B3G10. En effet, la présence d'antiprotéases, en quantité suffisante, nous permet d'affirmer que la protéine de masse moléculaire 72 kDa ne provient pas de la dégradation du récepteur de la lactotransferrine humaine. De plus, une

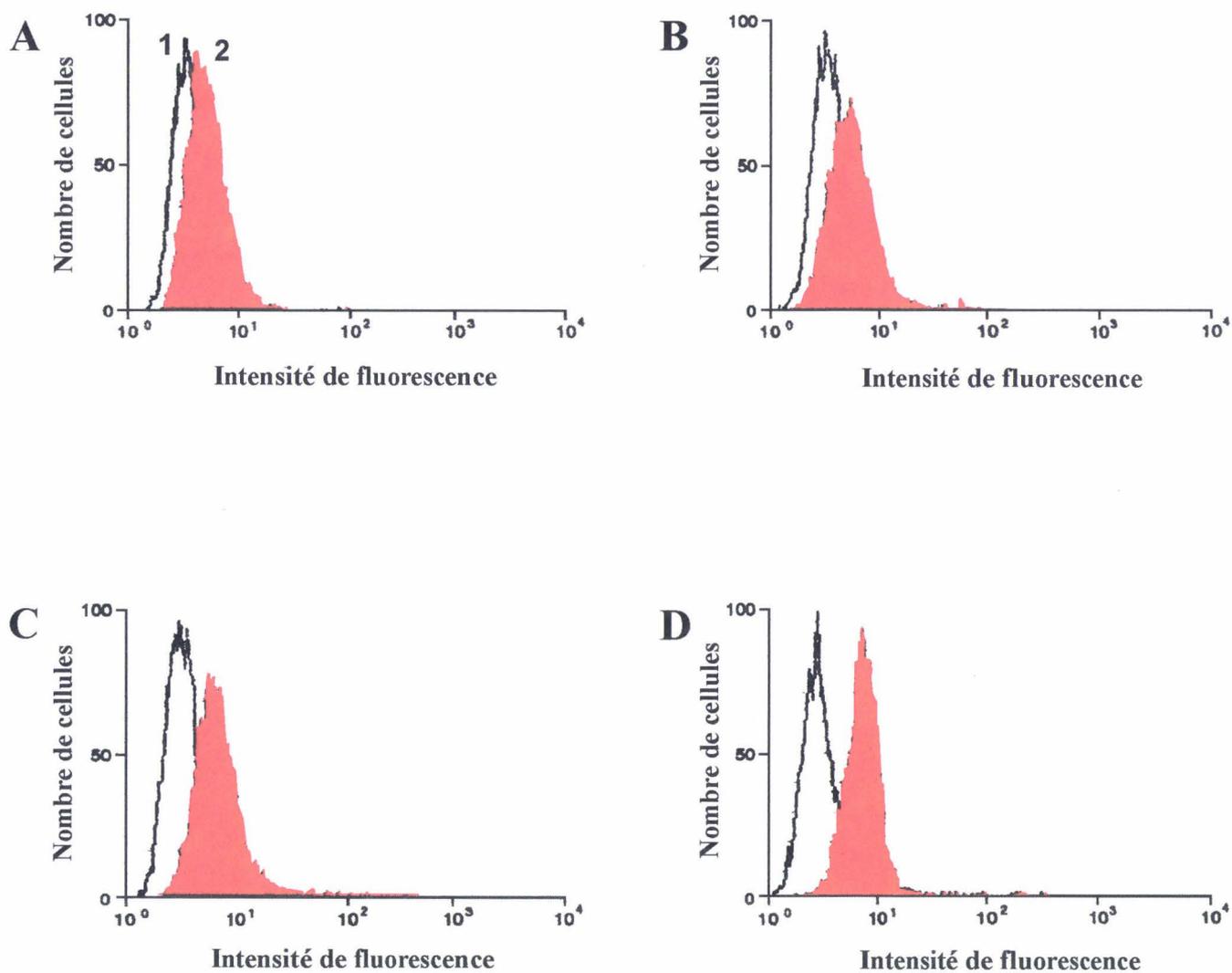


Figure 34 : Etude par cytofluorimétrie en flux de la fixation de l'anticorps monoclonal 5B3G10 sur les cellules Dami à différents jours de culture.

A : Premier jour de culture
 B : Deuxième jour de culture
 C : Troisième jour de culture
 D : Quatrième jour de culture

Pic 1 : Fixation non spécifique
 Pic 2 : Fixation totale

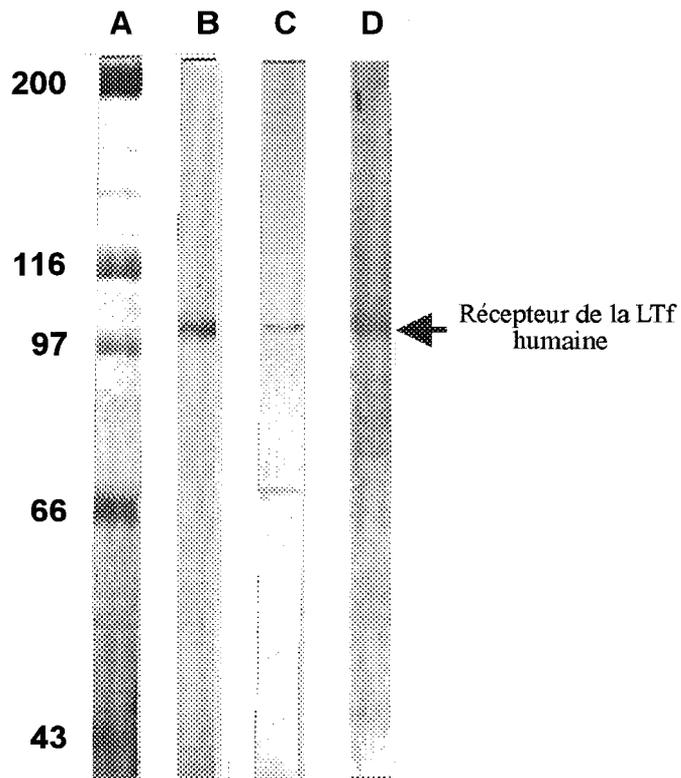


Figure 35 : Immunorévélation de protéines présentes dans les lysats de plaquettes et de cellules Dam1 par l'anticorps monoclonal 5B3G10 (B, C) et par les anticorps polyclonaux dirigés contre le récepteur membranaire de la lactotransferrine (D).

A : Témoin de masse moléculaire
 B : Lysat plaquettaire
 C et D : Lysat de cellules Dam1

immunorévélation réalisée avec l'anticorps polyclonal dirigé contre le récepteur membranaire, à la même dilution, n'a mis en évidence qu'une seule bande, soit celle présente à la masse moléculaire 105 kDa.

La même manipulation a été réalisée dans des conditions réductrices. Le même résultat a été obtenu, ce qui indique que le récepteur de la lactotransferrine des cellules Dami est, comme les récepteurs plaquettaire et lymphocytaire, une glycoprotéine monomérique.

4- Détermination des paramètres de fixation de la lactotransferrine à la surface des cellules Dami

La fixation de la lactotransferrine humaine saturée en fer et marquée à l'iode 125 I a été étudiée sur les cellules Dami au troisième jour de culture. La fixation non spécifique de la lactotransferrine est déterminée en présence de 100 excès molaire de lactotransferrine non marquée, puis soustraite de la quantité totale de ligand fixé. Elle représente 30 % de la radioactivité totale liée aux cellules. La Figure 36 A p. 173 montre la fixation spécifique de la lactotransferrine sur les cellules Dami. Elle augmente linéairement jusque 300 nM et devient saturable à partir de 700 nM.

La représentation de Scatchard (Figure 36 B p. 173) indique, dans la zone de concentration utilisée, la présence d'une seule classe de sites. La constante de dissociation est de l'ordre de 446 +/- 40 nM et le nombre de sites de fixation par cellule est d'environ $5,2 \pm 0,3 \cdot 10^6$ (ce calcul tient compte du nombre de cellules présentes dans la fenêtre R1 le jour de la manipulation).

B- Détermination des paramètres de fixation de la lactotransferrine à la surface des plaquettes

Quand nous avons fait nos manipulations sur les cellules Dami, les paramètres de fixation de la lactotransferrine à la surface des plaquettes n'avaient pas encore été établis.

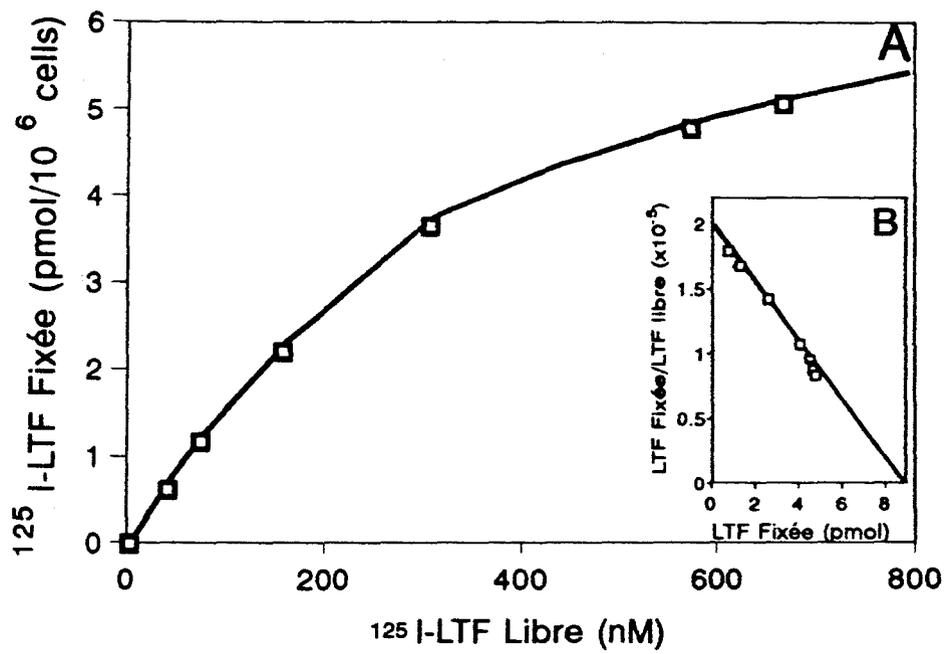


Figure 36 : Fixation de la lactotransferrine humaine diferrique sur les cellules Dami.

A : Courbe de saturation

B : Représentation de Scatchard

C'est pourquoi, nous avons décidé de les déterminer afin de pouvoir les comparer avec ceux des cellules Dami.

Ainsi, la fixation de la lactotransferrine humaine saturée en fer et marquée à l'iode ^{125}I a été étudiée sur les plaquettes issues de concentrés plaquettaires de 6 jours. La fixation non spécifique, déterminée en présence de 100 excès molaire de lactotransferrine non marquée, est d'environ 5 %. La fixation spécifique de la lactotransferrine sur les plaquettes (Figure 37 A p. 175) augmente linéairement jusque la concentration 200 nM et devient saturable à partir de 400 nM.

La représentation de Scatchard (Figure 37 B p. 175) indique la présence d'une seule classe de sites et fournit une constante de dissociation de 242 +/- 25 nM et un nombre de sites par cellule de 125 000 +/- 5000.

C- Recherche du messenger de la lactotransferrine humaine dans les cellules Dami

Le récepteur de la lactotransferrine étant présent à la surface des cellules Dami, il nous a semblé intéressant de déterminer si la lactotransferrine est exprimée dans ces cellules. A cet effet, nous avons recherché, parmi les messagers isolés des cellules Dami, celui codant la lactotransferrine humaine. Ainsi des expériences de "northern blot" ont été réalisées et elles se sont révélées négatives. En effet, aucun transcrite codant la lactotransferrine n'a été détecté.

Une manipulation identique à la précédente a également été réalisée sur l'ARN total isolé de plaquettes provenant de concentrés stockés seulement un jour. Le même résultat a été obtenu à savoir, qu'aucun ARN plaquettaire ne s'est hybridé avec la sonde ADNc de la lactotransferrine humaine.

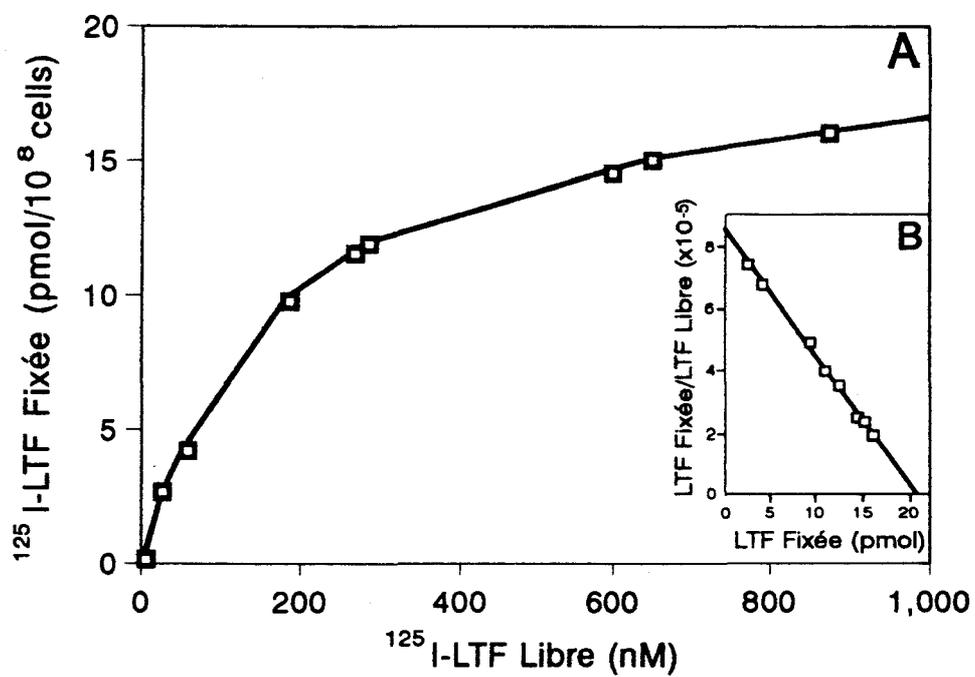


Figure 37 : Fixation de la lactotransferrine humaine diferrique sur les plaquettes.

A : Courbe de saturation

B : Représentation de Scatchard

D- Etude de la fixation d'un anticorps anti-GPIb et d'un anticorps anti-GPIIb-IIIa à la surface des cellules Dami

Greenberg *et al.* (1988) ayant décrit l'expression des glycoprotéines GPIb et GPIIb-IIIa à la surface des cellules Dami, nous avons étudié au cytofluorimètre la fixation d'un anticorps anti-GPIb et d'un anticorps anti-GPIIb-IIIa afin de déterminer si les deux populations présentes dans les fenêtres R1 et R2 expriment toutes les deux cette glycoprotéine.

Les profils de fluorescence obtenus au cytofluorimètre (Figure 38 p. 177) montrent que la glycoprotéine GPIb n'est exprimée qu'à la surface des cellules Dami présentes dans la fenêtre R1 alors que le complexe GPIIb-IIIa est exprimé à la surface des deux populations. Ce dernier résultat est donc différent de celui obtenu pour le récepteur de la lactotransferrine humaine qui, quant à lui, est uniquement présent sur les cellules de la fenêtre R1, ce qui nous permet d'affirmer d'une part, que le récepteur de la lactotransferrine est exprimé en surface des mégacaryoblastes Dami après le complexe GPIIb/IIIa et d'autre part que le récepteur de la lactotransferrine est un marqueur de la maturation des petites cellules Dami (fenêtre R2) en grosses cellules Dami plus denses (fenêtre R1).

E- Selection de la population cellulaire exprimant le récepteur de la lactotransferrine humaine

Nous avons précédemment montré que seules les cellules Dami présentes dans la fenêtre R1 expriment le récepteur de la lactotransferrine humaine. Nous avons donc décidé d'isoler cette population, de la remettre en culture trois jours, dans du milieu non conditionné, et d'étudier à nouveau, au cytofluorimètre, la fixation de la lactotransferrine et de l'anticorps monoclonal anti-récepteur.

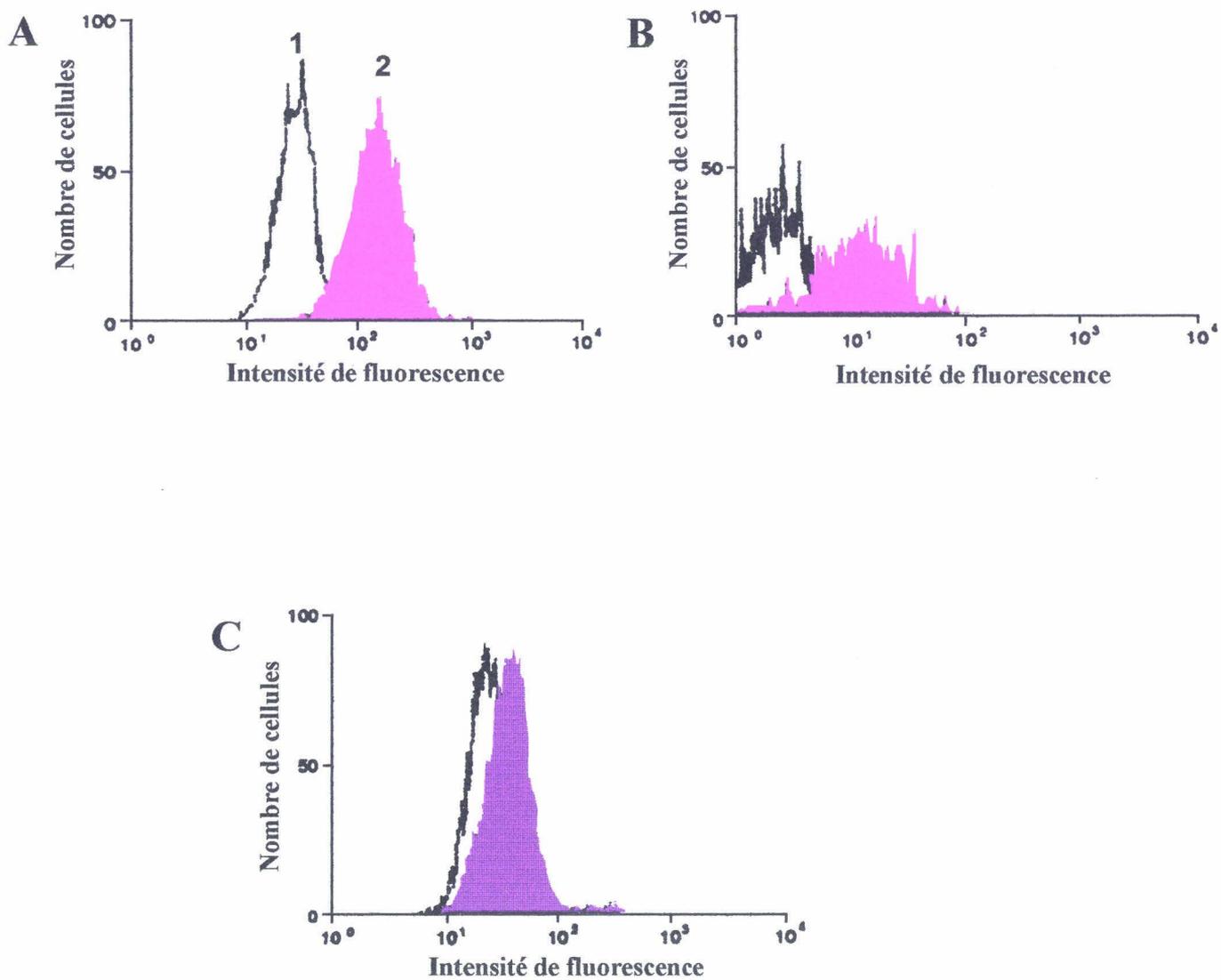


Figure 38 : Etude par cytofluorimétrie en flux de la fixation de l'anticorps anti-GPIIb-IIIa (A et B) et de l'anticorps GP Ib (C).

A : Cellules de la fenêtre R1
 B : Cellules de la fenêtre R2
 C : Cellules de la fenêtre R1

Pic 1 : Fixation non spécifique
 Pic 2 : Fixation totale

Pour ce faire, nous avons utilisé des flacons activés sur lesquels nous avons greffé les anticorps 5B3G10. Les cellules Dami présentant deux jours de culture sont ensuite incubées dans les flacons ainsi préparés. Sur la Figure 39 p. 179 nous avons :

- les cellules Dami à deux jours de culture (A)
- les cellules Dami qui ne se sont pas fixées aux anticorps monoclonaux anti-récepteur greffés (B)
- les cellules Dami, non fixées sur les anticorps monoclonaux anti-récepteur, après trois jours de culture (C)
- les cellules Dami, fixées sur les anticorps monoclonaux anti-récepteur, après trois jours de culture (D).

La Figure 39 B montre que les cellules qui ne se sont pas fixées sur les anticorps 5B3G10 sont, comme nous nous y attendions, les cellules de la fenêtre R2. Les cellules présentes dans la fenêtre R1 représentent moins de 1 % des cellules non fixées, ce qui indique que la technique de séparation des deux populations sur flacon activé est efficace. De même, l'analyse microscopique des cellules fixées sur le flacon activé a montré qu'il s'agissait de cellules grosses et denses (moins de 2 % de petites cellules).

Après trois jours de culture, les deux populations ont à nouveau été analysées au cytofluorimètre et nous avons été surprise de constater (Figure 39 D) la disparition dans le flacon activé des cellules de la fenêtre R1 et leur apparition dans la fenêtre R2. Nous avons alors recherché, par cytofluorimétrie en flux, la présence du récepteur de la lactotransferrine sur les deux populations. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau XII p. 180. Nous avons constaté après trois jours de culture, que parmi les cellules à l'origine fixées sur les anticorps monoclonaux anti-récepteur, seulement 18 % expriment encore le récepteur de la lactotransferrine. Il y a donc un changement radical dans la distribution cellulaire puisque les grosses cellules polyploïdes fixées sur les anticorps ont laissé la place à des cellules plus petites et n'exprimant que très peu le récepteur de la lactotransferrine humaine. Les cellules non fixées, quant à elles, gardent

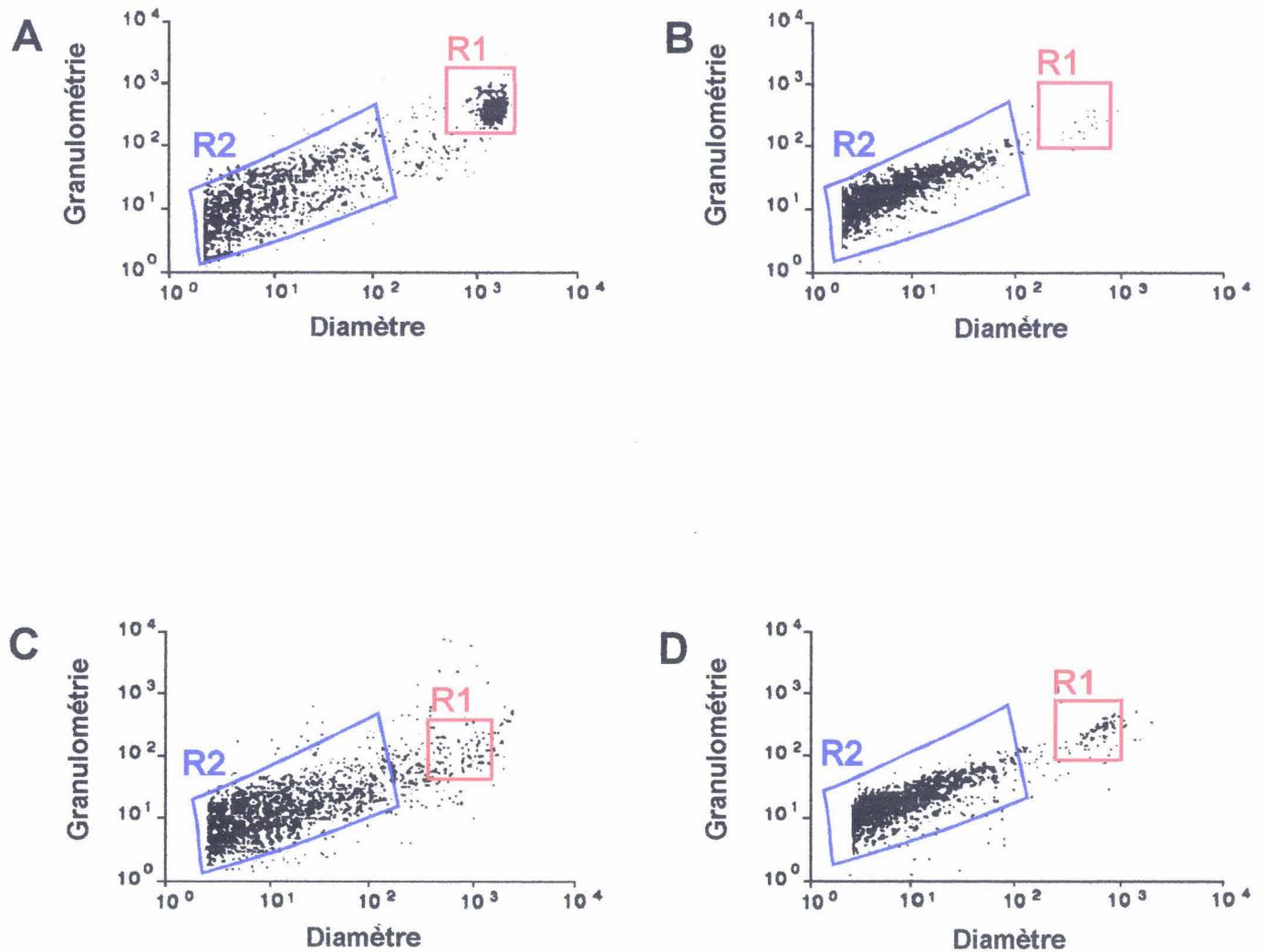


Figure 39 : Profils cytofluorimétriques des cellules Dam1 séparées sur flacon activé.

A : Cellules Dam1 avant la séparation

B : Cellules Dam1 non fixées aux anticorps anti-récepteur

C : Cellules Dam1, non fixées aux anticorps, après 3 jours de culture

D : Cellules Dam1, fixées aux anticorps, après trois jours de culture

Tableau XII : Expression du récepteur de la lactotransferrine à la surface des cellules Dami après séparation des populations cellulaires sur flacon activé

	R 1		R 2	
	% de cellules	% de cellules exprimant le récepteur de la LTF	% de cellules	% de cellules exprimant le récepteur de la LTF
cellules non fixées sur l'anticorps anti-récepteur J = 0	1	ND	97	0
cellules non fixées sur l'anticorps anti-récepteur J = 3	4	100	92	54
cellules fixées sur l'anticorps anti-récepteur J = 0	98	100	< 2	ND
cellules fixées sur l'anticorps anti-récepteur J = 3	7	100	82	18

ND : non déterminé

un profil identique au cytofluorimètre (Figure 39 B et 39 C) mais 54 % d'entre elles acquièrent le récepteur de la lactotransferrine.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé la même manipulation à un détail près : les deux populations séparées ont été remises en culture dans du milieu conditionné (milieu dans lequel se trouvaient les cellules avant leur séparation).

Nous avons constaté que, contrairement à la manipulation précédente, les cellules non fixées aux anticorps 5B3G10 au jour J_0 , sont majoritairement retrouvées, après trois jours de culture, dans la fenêtre R1 (74 % de la population totale). Ces cellules en R1 expriment le récepteur de la lactotransferrine humaine, tout comme les cellules en R2 d'ailleurs. Ce résultat a confirmé le fait que les petites cellules (R2), quand elles sont séparées des cellules en R1, peuvent, après trois jours de culture, exprimer le récepteur de la lactotransferrine humaine. De plus, cette dernière expérience a montré que les cellules non fixées aux anticorps anti-récepteur au jour J_0 peuvent, quand elles sont mises en culture trois jours dans du milieu conditionné, acquérir une certaine maturation puisque ces cellules sont majoritairement retrouvées dans la fenêtre R1.

Nous avons également étudié, après trois jours de culture, la fixation d'un anticorps anti-GPIb à la surface des cellules initialement non fixées aux anticorps 5B3G10. Nous avons constaté que seules les cellules de la fenêtre R1 expriment cette glycoprotéine. Ce dernier résultat nous a permis de situer l'apparition du récepteur de la lactotransferrine par rapport à l'apparition de la glycoprotéine GPIb. En effet, il semble que le récepteur de la lactotransferrine apparaît à la surface des cellules Dami avant la glycoprotéine GPIb.

L'ensemble des résultats obtenus après trois jours de culture dans du milieu conditionné est représenté dans la Figure 40 p. 182.

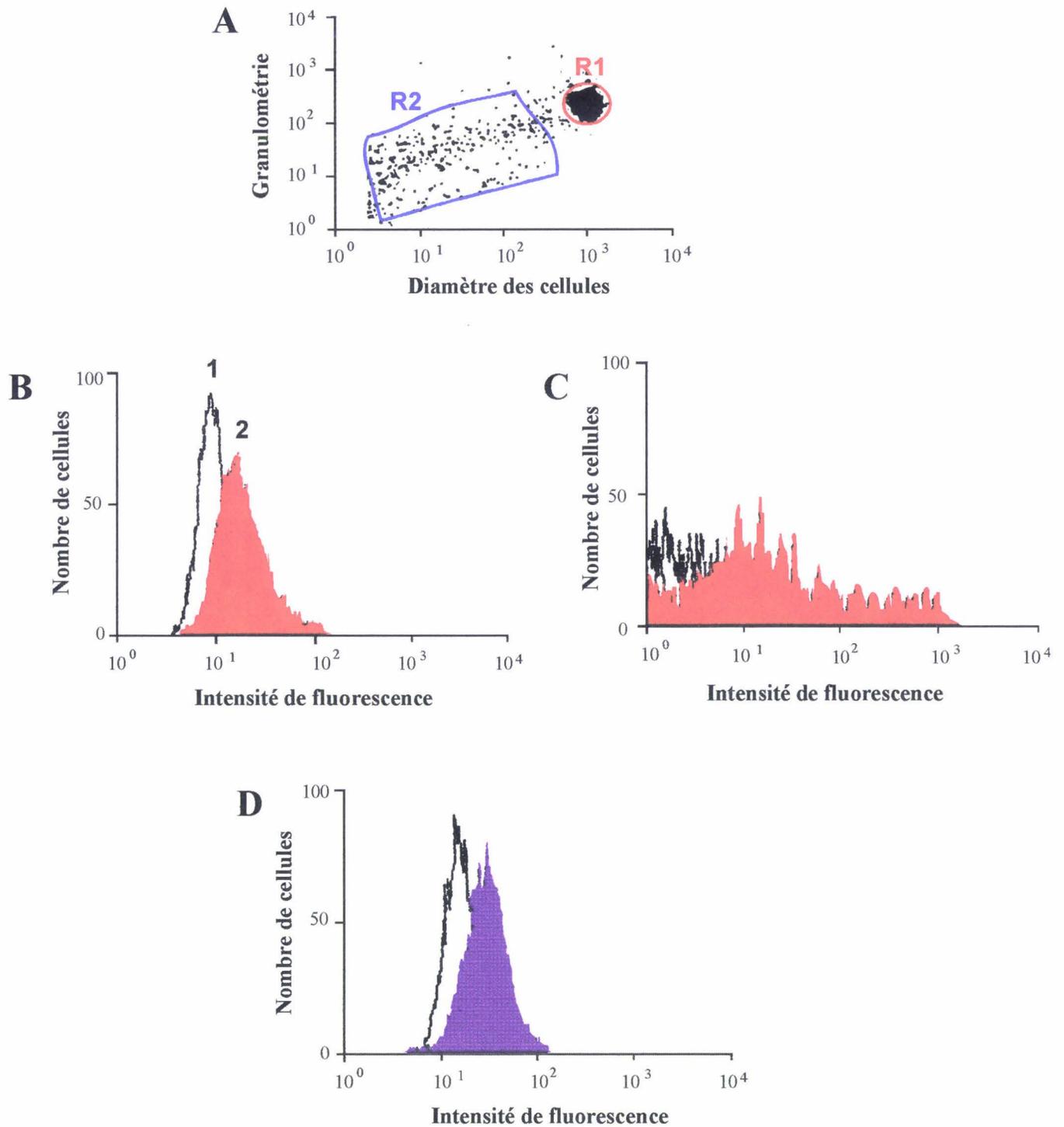


Figure 40 : Etude par cytofluorimétrie en flux, après trois jours de culture, de la fixation de l'anticorps monoclonal 5B3G10 (B et C) et de l'anticorps monoclonal anti- GPIb (D) à la surface des cellules Dam1 (A) non fixées aux antorps anti-récepteur au jour J0.

Pic 1 : Fixation non spécifique
 Pic 2 : Fixation totale

IV- CONCLUSION

L'ensemble des manipulations réalisées dans ce chapitre nous a permis de caractériser le récepteur de la lactotransferrine humaine à la surface des cellules Dami et plus particulièrement à la surface des cellules Dami les plus grosses et les plus denses (fenêtre R1).

Ainsi, nous avons tout d'abord mis en évidence une augmentation concomitante, entre le premier et le quatrième jour de culture, du pourcentage de cellules présentes dans la fenêtre R1 et du pourcentage de cellules exprimant le récepteur de la lactotransferrine humaine, ce qui a permis de confirmer le résultat suivant : parmi les cellules Dami, seule la population cellulaire présente dans la fenêtre R1 exprime le récepteur de la lactotransferrine humaine.

Nous avons ensuite déterminé la masse moléculaire de ce récepteur par "western blot" réalisée en présence de l'anticorps monoclonal anti-récepteur 5B3G10. La protéine immunorévélee possède une masse moléculaire de 105 kDa, ce qui a confirmé l'identité existant entre les récepteurs lymphocytaire et plaquettaire précédemment décrits (Mazurier *et al.*, 1989; Leveugle, 1992; Leveugle *et al.*, 1993) et le récepteur des cellules de la fenêtre R1 des mégacaryoblastes Dami.

Puis, la fixation de la lactotransferrine marquée à l'iode ^{125}I a été réalisée à la surface des cellules Dami. Elle a révélé l'existence d'une seule classe de sites et elle a permis de déterminer les paramètres suivants : une constante de dissociation (Kd) de 446 ± 40 nM et un nombre de sites par cellule (n) de $5,2 \pm 0,3 \cdot 10^6$. Ce dernier résultat est en accord avec les valeurs déterminées lors de dosages ELISA réalisés sur du lysat de cellules Dami, à savoir la présence de 1 μg de récepteur dans $2,0 \cdot 10^6$ cellules Dami.

Les paramètres de fixation de la lactotransferrine à la surface des plaquettes (cellules issues de la fragmentation des mégacaryocytes) ont également été mesurés. Ils sont respectivement de 242 ± 25 nM et $125 \pm 5 \cdot 10^3$ sites par cellule. Le récepteur plaquettaire possède donc une affinité plus forte pour la lactotransferrine que le

récepteur mégacaryoblastique. Néanmoins, cette différence d'affinité est peu significative. Les nombres de sites de fixation sont, quant à eux, comparables puisqu'une cellule Dami possède un diamètre 30 à 40 fois plus important qu'une plaquette.

Récemment, Maneva *et al.* (1993) ont publié d'autres paramètres de fixation de la lactotransferrine à la surface des plaquettes. Ceux-ci sont totalement différents des nôtres et font état de deux classes de sites :

- sites de forte affinité : $K_a = 13,6 \cdot 10^9$ l/mol et $n = 40$
- sites de faible affinité : $K_a = 1,23 \cdot 10^9$ l/mol et $n = 135$.

Ces paramètres ont été déterminés sur très peu de plaquettes ($5 \cdot 10^6$ cellules par tube contre 10^8 dans notre cas) préparées, à partir de sang humain, selon une technique faisant intervenir des centrifugations successives et non une chromatographie sur colonne de Sepharose 4B. De même, la fixation est réalisée en présence de lactotransferrine marquée au fer ^{59}Fe et non à l'iode ^{125}I . Enfin, les valeurs que nous avons obtenues lors de dosages ELISA du récepteur plaquettaire de la lactotransferrine indiquent la présence d'environ $3,65 \mu\text{g}$ de récepteur par mg de protéines totales ou pour $3,0 \cdot 10^8$ plaquettes ce qui correspond à 70 000 récepteurs par plaquettes, ce dernier résultat coïncidant davantage avec le nombre de sites par cellule que nous avons déterminé qu'avec celui établi par Maneva *et al.* (1993).

Le récepteur de la lactotransferrine étant, à ce stade, caractérisé sur les cellules Dami, nous avons recherché la présence, dans ces cellules, de messagers codant la lactotransferrine humaine. Cependant, les expériences de "northern blot" réalisées se sont révélées négatives. En effet, aucun transcrite codant cette protéine n'a été révélé par la sonde cDNA de la lactotransferrine humaine. Ce résultat combiné au fait que la lactotransferrine ne se trouve pas sous forme libre dans la moelle osseuse bien qu'elle soit présente dans les cellules myéloïdes précoces (promyélocytes et myélocytes) (Srivasta *et al.*, 1991) semble indiquer que le récepteur de la lactotransferrine humaine n'est présent sur les mégacaryoblastes que pour être transmis aux plaquettes qui possèdent un appareil de synthèse protéique vestige.

Dans la dernière partie de nos travaux, nous avons cherché à isoler les deux populations de cellules Dami et ceci afin d'étudier l'expression du récepteur de la lactotransferrine humaine. De même, nous avons essayé de préciser à quel moment ce récepteur apparaît c'est à dire avant, après ou en même temps que deux autres marqueurs déjà décrits à la surface des cellules Dami (Greenberg *et al.*, 1988) : la glycoprotéine GPIb et le complexe GPIIb-IIIa.

Nous avons donc séparé les cellules Dami en utilisant des flacons activés sur lesquels sont greffés les anticorps monoclonaux anti-récepteur 5B3G10. Cette technique s'est révélée efficace puisque d'une part, parmi les cellules non fixées nous n'avons mis en évidence que 1 % de grosses cellules (fenêtre R1) et d'autre part, parmi les cellules fixées, nous avons visualisé moins de 2 % de petites cellules (fenêtre R2). Les deux populations séparées ont été mises en culture trois jours et leur analyse au cytofluorimètre à la fin de cette période a mis en évidence, dans le flacon activé, la disparition des cellules de la fenêtre R1 et leur apparition dans la fenêtre R2 et, dans le flacon contenant les cellules non fixées, un maintien du profil cytofluorimétrique des cellules.

De même, l'étude, après trois jours de culture, de la fixation de l'anticorps monoclonal anti-récepteur et de la lactotransferrine humaine à la surface des populations séparées a montré que :

- dans le flacon activé, 18 % des cellules de la fenêtre R2 exprime le récepteur de la lactotransferrine

- dans le flacon contenant les cellules non fixées (cellule n'exprimant pas à l'origine le récepteur de la lactotransferrine), 54 % des cellules ont acquis ce récepteur.

Il semble donc, après trois jours de culture, que les petites cellules (non fixées sur les anticorps 5B3G10) sont capables d'acquérir le récepteur de la lactotransferrine. Cependant, en absence des grosses cellules polyploïdes, elles n'ont pu atteindre leur diamètre habituel puisque très peu de grosses cellules sont présentes. Les grosses cellules (fixées sur les anticorps 5B3G10), à l'inverse, ont vu leur diamètre diminuer par un

processus non défini mais différent du processus qui permet la fragmentation d'un mégacaryocyte mature en plaquettes puisque les cellules Dami n'atteignent jamais le stade mégacaryocyte mature. De même, parmi les cellules présentes dans le flacon activé, seulement 18 % expriment encore, après trois jours de culture, le récepteur de la lactotransferrine humaine.

Ces résultats semblent indiquer que le récepteur de la lactotransferrine humaine apparaît lors de l'étape de maturation qui permet le passage des petites cellules moins différenciées (fenêtre R2) en grosses cellules polyploïdes (fenêtre R1).

Une nouvelle manipulation, réalisée après trois jours de culture dans du milieu conditionné, a confirmé cette hypothèse. De même, elle a révélé l'existence d'un facteur soluble émis par les cellules de la fenêtre R1, ce facteur permettant aux cellules de la fenêtre R2 d'acquérir une certaine maturation qui les conduit dans la fenêtre R1 où elles deviennent polyploïdes. Plusieurs facteurs ont été décrits comme intervenant dans la régulation négative ou positive de l'endomitose qui permet aux cellules de devenir polyploïdes. Il s'agit du facteur plaquettaire 4 (Han *et al.*, 1990 a et b; 1991), du facteur de croissance transformant β (Greenberg *et al.*, 1990; Kuter *et al.*, 1992), de l'érythropoïétine (Revue générale Hoffman, 1989) et des interleukines 3 et 6 (Revue générale Hoffman, 1989; Ishibashi *et al.*, 1989; Williams *et al.*, 1990), ce dernier facteur retenant plus particulièrement notre attention. En effet, Navarro *et al.* (1991) ont montré que d'une part, les mégacaryocytes sécrètent l'interleukine 6 et que d'autre part, ils expriment son récepteur. De même, Ishibashi *et al.* (1989) et Williams *et al.* (1990) ont décrit l'augmentation de la taille et du degré de ploïdie des mégacaryocytes auxquels de l'interleukine 6 a été additionnée.

Afin d'étudier plus précisément le moment où le récepteur de la lactotransferrine est exprimé en surface des cellules Dami, nous avons visualisé au cytofluorimètre de flux la fixation, dans un premier temps, d'un anticorps anti-GPIIb-IIIa et dans un second temps, d'un anticorps anti-GPIb.

Les profils obtenus avec le premier anticorps ont montré que toutes les cellules Dami (fenêtres R1 et R2) expriment l'antigène GPIIb-IIIa, celui-ci apparaissant donc à la surface des cellules Dami avant le récepteur de la lactotransferrine humaine. A l'inverse, la glycoprotéine GPIb n'est exprimée qu'à la surface des cellules de la fenêtre R1, que la population cellulaire soit totale ou que les cellules soient séparées. Ce n'est pas le cas du récepteur de la lactotransferrine humaine qui est, quant à lui, présent sur les cellules des fenêtres R1 et R2 quand une séparation a été réalisée trois jours auparavant. Le récepteur de la lactotransferrine humaine apparaît donc, semble-t'il, à la surface des cellules Dami après l'antigène GPIIb-IIIa mais avant la glycoprotéine GPIb, cette dernière apparaissant plus tardivement à la surface des mégacaryoblastes (Vinci *et al.*, 1984), soit lors de l'endomitose. Ce dernier résultat nous amène donc à penser d'une part, que le récepteur de la lactotransferrine humaine pourrait être un marqueur de différenciation des mégacaryoblastes apparaissant avant l'endoréplication et d'autre part, que la lignée cellulaire Dami, de par l'expression du récepteur de la lactotransferrine et de la glycoprotéine GP IIb-IIIa à sa surface, pourrait être utilisée pour poursuivre les études réalisées par Raha *et al.* (1998) et concernant l'inhibition, par le térapeptide KRDS (séquence 39-42 de la lactotransferrine), de la fixation d'anticorps monoclonaux ~~GP~~ GPIIb-IIIa à la surface de mégacaryocytes stimulés par l'ADP.

Conclusion

CONCLUSION GENERALE

Les travaux antérieurs réalisés au laboratoire par J. Mazurier et par B. Leveugle ont d'une part, mis en évidence la présence de récepteurs spécifiques de la lactotransferrine à la surface des plaquettes, des lymphocytes humains circulants activés et des cellules de la lignée lymphocytaire T Jurkat et d'autre part, révélé l'existence de récepteurs solubles de la lactotransferrine dans le milieu de culture de lymphocytes sains ou établis en lignée. L'étude biochimique du récepteur membranaire a montré qu'il s'agissait d'une glycoprotéine monomérique de masse moléculaire 105 kDa renfermant des glycanes de type N-acétyllactosaminique. Néanmoins, la structure et le nombre de ses glycanes de même que la séquence primaire de sa chaîne polypeptidique n'ont pu être déterminés du fait de la difficulté à obtenir, par chromatographie sur une colonne d'anticorps anti-lactotransferrine immobilisés (Mazurier *et al.*, 1989), du récepteur parfaitement pur en quantité suffisante. De même, le clonage du récepteur de la lactotransferrine humaine n'était pas envisageable tant que nous ne disposions pas de sondes de type anticorps polyclonaux ou de type oligonucléotidique, la préparation de ces sondes nécessitant, comme pour les expérimentations précédentes, l'obtention préalable de cette glycoprotéine pure. Il nous a donc semblé indispensable de mettre au point une technique efficace de purification du récepteur de la lactotransferrine humaine. Nous avons procédé ainsi :

1- Nous avons préparé, selon le procédé préalablement décrit par Mazurier *et al.* (1989) et faisant intervenir 20 litres de milieu de culture filtré et concentré des cellules Jurkat, une fraction partiellement purifiée de récepteur soluble de la lactotransferrine. Cette fraction a permis l'immunisation de souris et l'obtention, après criblage des hybridomes contre les protéines contaminantes, d'un anticorps monoclonal (nommé 5B3G10) dirigé contre le récepteur de la lactotransferrine humaine, qu'il soit présent à la surface des

plaquettes, des cellules T47D ou des cellules Jurkat dont le milieu de culture a été utilisé lors de la préparation.

2- L'immobilisation des anticorps monoclonaux 5B3G10 (des Ig M) a été réalisée, avec une efficacité de couplage de l'ordre de 70 %, sur un nouveau type de support activé (Eurocell ONB-Carbonate A) constitué de billes de cellulose substituées. Les nombreuses chromatographies effectuées sur cette colonne avec du lysat plaquettaire (5 concentrés plaquettaires par chromatographie) nous ont permis d'isoler du récepteur pratiquement pur si ce n'est la présence d'Ig M dégradées, libérées de la colonne d'anticorps monoclonaux 5B3G10 immobilisés.

3- Afin de séparer le récepteur des Ig M libérées de la colonne d'immuno-affinité, nous avons utilisé une technique récente (Szewczyk *et al.*, 1992) qui permet l'éluion, à partir d'une membrane d'immobilon, de protéines de masse moléculaire supérieure à 100 kDa tout en conservant leur activité. Le récepteur membranaire de la lactotransferrine élué selon cette technique pouvait alors être utilisé pour préparer de nouvelles sondes mieux adaptées aux nombreuses expérimentations à réaliser, dont le clonage du gène codant le récepteur de la lactotransferrine humaine. En effet, l'anticorps monoclonal initialement préparé, à partir de récepteur soluble de la lactotransferrine, pour réaliser des manipulations de microscopie électronique et confocale ne peut être considéré comme une sonde fiable pour le criblage d'une banque d'ADNc.

Des anticorps polyclonaux ont donc été préparés selon la technique de Green et Manson (1992), à partir du récepteur membranaire pur élué de la membrane d'immobilon (100 à 150 µg de récepteur pur à chaque injection = 50 concentrés plaquettaires). La monospécificité de ces anticorps polyclonaux a été établie grâce à des manipulations de "western blot" et de cytofluorimétrie en flux effectuées sur les plaquettes, cellules utilisées lors de la préparation du récepteur, mais également sur les cellules de la lignée lymphocytaire T Jurkat. Les nombreuses manipulations ("western blot",

cytofluorimétrie en flux, immunocytochimie et dosages ELISA) effectuées avec ces anticorps seuls ou en combinaison avec l'anticorps monoclonal 5B3G10 nous ont permis de dégager les conclusions suivantes:

a- L'utilisation des anticorps polyclonaux dirigés contre le récepteur membranaire de la lactotransferrine humaine, lors de manipulations d'immunocytochimie, a révélé l'existence de récepteurs spécifiques de la lactotransferrine au niveau du mésencéphale et du striatum de sujets sains. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus d'une part, par Kawamata *et al.* (1993) qui mettent en évidence une augmentation de l'expression de la lactotransferrine dans les neurones de sujets âgés et plus encore de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et d'autre part, par Leveugle *et al.* (1994) qui révèlent une accumulation de lactotransferrine dans le cortex cérébral de patients atteints de désordres neurodégénératifs. De même, il est confirmé par des manipulations récentes, réalisées en collaboration avec les docteurs Faucheux et Hirsch, qui mettent en évidence la présence de lactotransferrine au niveau du mésencéphale de sujets sains. La combinaison de ces deux résultats ouvre donc une nouvelle voie dans la recherche visant à déterminer le chemin emprunté par le fer pour accéder à la substance noire, celle-ci présentant un taux plus élevé en fer chez les patients atteints de la maladie de Parkinson que chez les sujets témoins.

b- La mise au point d'une méthode de dosage ELISA du récepteur de la lactotransferrine faisant intervenir l'anticorps monoclonal anti-récepteur soluble et les anticorps polyclonaux anti-récepteur membranaire nous a permis de mettre en évidence l'existence de 4 fois plus de récepteur dans du lysat de plaquettes que dans du lysat de cellules Jurkat, soit 3,65 µg de récepteur dans 1 mg de protéines totales de plaquettes contre seulement 0,86 µg dans 1 mg de protéines totales de cellules Jurkat. Le résultat concernant les plaquettes peut également être traduit en nombre de sites par cellule soit 70 000. Ce chiffre est voisin de celui que nous avons obtenu par la technique de

Scatchard (environ 125 000) et est très différent de ceux établis par Maneva *et al.* (1993) à savoir 40 sites de forte affinité par cellule et 135 de faible affinité.

c- Les expériences de cytofluorimétrie en flux effectuées avec la lactotransferrine ou les anticorps monoclonal et polyclonaux préparés ont mis en évidence la présence d'un récepteur spécifique de la lactotransferrine humaine sur les cellules Dami, cellules présentant uniquement des marqueurs des mégacaryoblastes et des mégacaryocytes immatures. Ce récepteur de masse moléculaire 105 kDa, soit la masse moléculaire des récepteurs précédemment décrits, fixe la lactotransferrine avec une affinité plus faible (Kd : 446 nM contre 80 nM) et avec un nombre de sites plus élevés ($n : 5,2 \cdot 10^6$ /cellule contre $2 \cdot 10^6$ /cellule) que les lymphocytes activés. Néanmoins, ces paramètres sont peu différents de ceux que nous avons établis pour les plaquettes (Kd : 242 nM et $n : 1.25 \cdot 10^5$ /cellule). En effet, la différence d'affinité de l'ordre de 2 est peu significative et les nombres de sites de fixation sont comparables puisqu'une cellule Dami possède un diamètre 30 à 40 fois supérieur à celui d'une plaquette.

Le récepteur de la lactotransferrine n'étant pas présent sur toutes les cellules Dami mais uniquement sur les cellules les plus volumineuses et les plus denses, nous avons isolé cette population cellulaire, de même que celle n'exprimant pas le récepteur puis nous les avons remises en culture. Les résultats que nous avons obtenus sont en faveur de l'apparition du récepteur de la lactotransferrine lors de l'étape de maturation qui permet le passage des petites cellules moins différenciées en grosses cellules polyploïdes. De même, ils indiquent que ce passage n'est possible que lorsqu'un facteur soluble, émis au préalable par les cellules les plus volumineuses et les plus denses, est présent dans le milieu de culture.

Nous avons également étudié l'expression de deux autres marqueurs plaquettaire (GP Ib et GP IIb-IIIa) à la surface des cellules Dami et nous avons montré que le récepteur de la lactotransferrine apparaît après l'antigène GPIIb-IIIa mais avant la glycoprotéine GPIb.

Enfin, nous avons recherché la présence de messagers codant la lactotransferrine humaine dans les cellules Dami mais l'expérience de "northern blot" réalisée s'est révélée négative. Considérant que les mégacaryocytes sont principalement localisés dans la moelle osseuse dans laquelle la lactotransferrine ne se trouve pas sous forme libre, le récepteur de la lactotransferrine serait donc présent sur ces cellules pour être transmis aux plaquettes qui possèdent un appareil de synthèse protéique vestige. Néanmoins, des mégacaryocytes ont également été mis en évidence dans les poumons (Kaufman *et al.*, 1965; Trowbridge, 1990). Ces mégacaryocytes proviennent de la moelle osseuse qu'ils quittent en traversant la barrière moelle-sang avant de passer dans la circulation sanguine par l'intermédiaire des veines et de pénétrer dans les poumons (Woods *et al.*, 1992). Nous pouvons donc supposer qu'une interaction peut s'établir entre la lactotransferrine et son récepteur, localisé sur les mégacaryocytes, lors du passage dans la circulation sanguine, sous toute réserve que le récepteur soit également présent sur les mégacaryocytes isolés de la moelle et non en culture.

Les travaux réalisés sur les cellules Dami nous ont donc permis, tout en étudiant l'expression du récepteur de la lactotransferrine au cours de la maturation des mégacaryocytes, de sélectionner la lignée cellulaire à partir de laquelle l'ARN sera extrait pour construire une banque d'ADNc en vue du clonage du gène codant le récepteur de la lactotransferrine humaine.

d- Au laboratoire, le docteur A. Pierce a construit, dans le bactériophage λ UniZap II, deux banques d'ADNc : une à partir de l'ARN extrait des cellules Dami et une à partir de l'ARN extrait des cellules Jurkat, ces deux types cellulaires exprimant, au vu des résultats obtenus lors des dosages ELISA, des quantités similaires de récepteur de la lactotransferrine humaine.

Les anticorps polyclonaux préparés sont utilisés pour cribler ces deux banques de même que pour tester, par cytofluorimétrie en flux, les cellules COS transfectées avec le

vecteur pcDNA1 renfermant de l'ADNc de cellules Jurkat de taille supérieure ou égale à 2 kb.

Enfin, 100 µg de récepteur pur de la lactotransferrine préparés selon la technique décrite précédemment sont également actuellement séquencés par les docteurs Carles et Riva (Laboratoire de Chimie des Protéines, CEA, Saclay), en vue de la préparation de séquences oligonucléotidiques nous permettant ultérieurement de cribler une banque d'ADNc construite dans le bactériophage λgt10.

Bibliographie

- Abe, Y., Muta, K., Nishimura, J. et Nawata, H. (1992)** Regulation of transferrin receptors by iron in human erythroblasts. Am. J. Hematol., **40** : 270-275 59
- Adrian, G. S., Bowman, B. H., Herbert, D. C., Weaker, F. J., Adrian, E. K., Robinson, L. K., Walter, C. A., Eddy, C. A., Riehl, R., Pauerstein, C. J. et Yang, F. (1990)** Human transferrin. Expression and iron modulation of chimeric genes in transgenic mice. J. Biol. Chem., **265** : 13344-13350 25, 27
- Adrian, G. S., Herbert, D. C., Robinson, L.K., Walter, C. A., Buchanan, J. M., Adrian, E. K., Weaker, F. J., Eddy, C. A., Yang, F. et Bowman, B. H. (1992)** Expression of a human chimeric transferrin gene in senescent transgenic mice reflects the decrease of transferrin levels in aging humans. Biochim. Biophys. Acta, **1132** : 168-176 25
- Agid, Y., Javoy-Agid, F. et Ruberg, M. (1987)** Biochemistry of neurotransmitters in Parkinson's disease. in Movement disorders 2, Marsden, CD et Fahn, S. eds, London, Butterworth, 166-230 143
- Agid, Y. (1989)** Maladie de Parkinson : quelques aspects physiopathologiques et pratique clinique. Rev. Prat., **39** : 641-646 143
- Agid, Y. (1991)** Parkinson's disease. The Lancet, **337** : 1321-1324 145
- Agid, Y., Ruberg, M., Javoy-Agid, F., Hirsch, E., Raisman-Vozari, R., Vyas, S., Faucheux, B., Michel, P., Kastner, A., Blanchard, V., Damier, P., Villares, J. et Zhang, P. (1993)** Are dopaminergic neurons selectively vulnerable to Parkinson's disease ? in Advances in neurology, Narabayashi H., Nagatsu T., Yanagisawa N., Mizuno Y. eds, **22** :148-164 145
- Ahn, J. et Johnstone, R. M. (1993)** Origin of a soluble truncated transferrin receptor. Blood, **81** : 2442-2451 62
- Aisen, P. (1964)** Transferrin metabolism and the liver. Semin. Liver Dis., **4** : 192-206 6
- Aisen, P. et Liebman, A. (1971)** Lactoferrin and transferrin, a comparative study. Biochim.Biophys.Acta, **257** : 314-323 15
- Aisen, P. et Listowsky, I. (1980)** Iron transport and storage. Ann. Rev. Biochem., **49** : 357-393 14, 46
- Aisen, P. (1992)** Entry of iron into cells : a new role for the transferrin receptor in modulating iron release from transferrin. Ann. Neurol., **32** : S62-S68 145
- Akin, C. et Sonnenfeld, G. (1993)** Modulation of transferrin receptor expression by insulin and granulocyte-macrophage colony stimulating factor in AML-193 leukemic cells. Cancer Lett., **69** : 51-57 61

- Ala'Aldeen, D. A. A., Powell, N. B. L., Wall, R. A. et Borriello, S. P.** (1993) Localization of the meningococcal receptors for human transferrin. Infect. Immun., **61** : 751-759 65
- Alcantara, O., Javors, M. et Boldt, D. H.** (1991) Induction of proteine kinase C mRNA in cultured lymphoblastoid T cells by iron-transferrin but not by soluble-iron. Blood, **77** : 1290-1297 61
- Alcantara, J., Padda, J. S. et Schryvers, A. B.** (1992) The N-linked oligosaccharides of human lactoferrin are not required for binding to bacterial lactoferrin receptors. Can. J. Microbiol., **38** : 1202-1205 90
- Alcantara, J., Yu, R. H. et Schryvers, A. B.** (1993) The region of human transferrin involved in binding to bacterial receptors is localized in the C-lobe. Molec. Microbiol., **8** : 1135-1143 66, 90
- Alderete, J. F., Peterson, K. M. et Baseman J. B.** (1988) Affinities of *Treponema pallidum* for human lactoferrin and transferrin. Genitourin. Med., **61** : 359-363 89, 91
- Aldred, A. R., Dickson, P. W., Marley, P. D. et Schreiber, G.** (1987) Distribution of transferrin synthesis in brain and other tissues in the Rat. J. Biol. Chem., **262** : 5293-5297 6, 25
- Alexander, L. J., Levine, W. B., Teng, C. T. et Beattie, C. W.** (1992) Cloning and sequencing of the porcine lactoferrin cDNA. Anim. Genet., **23** : 251-256 8, 21
- Alvarez, E., Girones, N. et Davis, R. J.** (1989) Intermolecular disulfide bonds are not required for the expression of the dimeric state and fonctionnal activity of transferrin receptor. EMBO J., **8** : 2231-2240 40
- Alvarez, E., Girones, N. et Davis, R.** (1990) Inhibition of the receptor mediated endocytosis of diferric transferrin is associated with the covalent modification of the transferrin receptor with palmitic acid. J. Biol. Chem., **265** : 16644-16655 62
- Anderson, B. F., Baker, H. M., Dodson, E. J., Norris, G. E., Rumballe, S. V., Waters, J. M. et Baker, E. N.** (1987) Structure of human lactoferrin at 3.2 Å resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84** : 1-5 11, 13, 14, 15
- Anderson, B. F., Baker, H. M., Norris, G. E., Rice, D. W. et Baker, E. N.** (1989) Structure of human lactoferrin : crystallographic structure analysis and refinement at 2.8Å resolution. J. Mol. Biol., **209** : 711-734 11, 13, 14, 15
- Anderson, P. J.** (1985) The recovery of nitrocellulose-bound protein. Anal. Biochem., **148** : 87-92 142

- Archibald, F. S. et De Voe, L. W.** (1979) Removal of iron from human transferrin by *Neisseria meningitidis*. FEMS Microbiol. Lett., 6 : 159-162 66
- Archibald, F. S. et De Voe, L. W.** (1980) Iron acquisition by *Neisseria meningitidis* in vitro. Infect. Immun., 27 : 322-334 66
- Arnold, R. R., Brewer, M., Gauthier, J. J.** (1980) Bactericidal activity of human lactoferrin : sensitivity of a variety of microorganisms. Infect. Immun., 28 : 843-848 92
- Ascencio, F., Ljungh, A. et Wadstrom, T.** (1992a) Lactoferrin binding properties of *Vibrio cholerae*. Microbios, 70 : 103-117 92
- Ascencio, F., Ljungh, A. et Wadstrom, T.** (1992b) Characterization of lactoferrin binding by *Aeromonas hydrophila*. Appl. Environ. Microbiol., 58 : 42-47 92
- Augé-Gouillou, C., Petropoulos, I. et Zakin, M. M.** (1993) Liver-enriched HNF-3 α and ubiquitous factors interact with the human transferrin gene enhancer. FEBS Lett., 323 : 4-10 26
- Aviv, H. et Leder, P.** (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligo-thymidylic acid cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69 : 1408-1412 162
- Azari, P. et Baugh, R. F.** (1967) A simple and rapid procedure for preparation of a large quantity of pure ovotransferrin. Arch. Biochem. Biophys., 118 : 138-144 A1
- Aziz, N. et Munro, H. N.** (1986) Both subunits of rat liver are regulated at a translational level by iron induction. Nucleic Acids Res., 14 : 915-927 58
- Aziz, N. et 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 58
- Baggiolini, M., De Duve, C., Masson, P. L. et Heremans, J. F.** (1970) Association of lactoferrin with specific granules in rabbit neutrophile leukocytes. J. Exp. Med., 131 : 559-570 7
- Bailey, S., Evans, R. W., Garrat, R. C., Gorinsky, B., Hasnain, S., Horsburg, C., Jhoti, H., Lindley, P. F., Mydin, A., Sarra, R. et Watson, J. L.** (1988) Molecular structure of serum transferrin at 3.3A $^{\circ}$ resolution. Biochemistry, 27 : 5804-5812 11
- Baker, E. N., Rumball, S. V. et Anderson, B. F.** (1987) Transferrins : insights into structure and function from studies on lactoferrin. Trends Biochem.Sci., 12 : 350-353 14, 15

- Baker, E., Lloyd, D. A., Morgan, E. H. et Yeoh, G. C. (1988)** Iron metabolism and the effect of iron chelators in rat hepatoma cells. Birth Defects, 23 : 89-95 46, 94
- Baker, E. N., Anderson, B. F., Baker, H. M., Haridas, M., Jameson, G. B., Norris, G. E., Rumball, S. V. et Smith, C. A. (1991)** Structure, function and flexibility of human lactoferrin. Int. J. Biol. Macromol. Struct. Funct. Interactions, 13 : 122-130 16
- Baker, E. N., Baker, H. M., Smith, C. A., Stebbins, M. R., Kahn, M., Hellstrom, K. E. et Hellstrom, L. (1992)** Human melanotransferrin (p97) has only one functional iron-binding site. FEBS Lett., 298 : 215-218 14
- Baker, E. N. et Lindley, P. F. (1992)** New perspectives on the structure and function of transferrins. J. Inorg. Biochem., 47 : 147-160 14
- Baldwin, G. S. et Weinstock, J. (1988)** Nucleotide sequence of porcine liver transferrin. Nucleic Acids Res., 16 : 8720 8
- Baldwin, G. S. (1993)** Comparison of transferrin sequences from different species. Comp. Biochem. Biophys., 106B : 203-218 22
- Bali, P. K., Zak, O. et Aisen, P. (1990)** A new role for the transferrin receptor in the release of iron from transferrin. Biochemistry, 30 : 324-328 45, 48
- Banerjee, D., Flanagan, P. R., Cluett, J. et Valberg, L. S. (1986)** Transferrin receptors in the human gastrointestinal tract. Relationship to body iron stores. Gastroenterology, 91 : 861-869 40
- Banfield, D. K., Chow, B. K. C., Funk, W. D., Robertson, K. A., Umelas, T. M., Woodworth, R. C. et McGillivray, R. T. A. (1991)** The nucleotide sequence of rabbit liver transferrin cDNA. Biochim. Biophys. Acta, 1089 : 262-265 8
- Bartal, L., Padeh, S. et Passwell, J. H. (1987)** Lactoferrin inhibits prostaglandin E2 secretion by breast milk macrophages. Paediatr. Res., 21 : 54-57 77
- Bartek, J., Virlicky, V. et Stratim, A. (1985)** Phylogenetically more conservative epitopes among monoclonal antibody defined antigenic sites of human transferrin are involved in receptor binding. Brit. J. Haematol., 59 : 435-441 42
- Bartfeld, N. S. et Law, J. H. (1990)** Isolation and molecular cloning of transferrin from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J. Biol. Chem., 265 : 21684-21691 8

- Baudouin, C., Brignole, F., Fredj-Reygrobellet, D., Negre, F., Bayle, J. et Gastaud, P.** (1992) Transferrin receptor expression by retinal pigment epithelial cells in proliferative vitreoretinopathy. Invest. Ophthalmol. Visual Sci., **33** : 2822-2829 40
- Baynes, R. D., Bezwoda, W. R., Khan, Q. et Mansoo, N.** (1986) Characterisation of the lactoferrin receptor on human blood monocytes and its relationship to the Ia complex. XXI Congress of the International Society of Haematology Australia : 335-335 80
- Baynes, R. D., Shih, Y.J., Hudson, B. G. et Cook, J. D.** (1990) Characterization of transferrin receptor released by K562 erythroleukemic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **197** : 416-423 62
- Baynes, R. D., Shih, Y. J. et Cook, D.** (1991) Production of soluble transferrin receptor by K562 erythroleukemia cells. Br. J. Haematol., **78** : 450-455 62
- Beard, J. L., Connor, J. R. et Jones, B. C.** (1993) Iron in the brain. Nutrition Rev., **51** : 157-170 40
- Behnke, O. et Pedersen, N. T.** (1974) Ultrastructural aspects of megakaryocyte maturation and platelet release. In Platelet production function transfusion and storage. Baldinin, M. G. et Ebbe, S. eds, Grune et Stratton, NY, 21-31 102
- Beguin, Y.** (1992) The soluble transferrin receptor : biological aspects and clinical usefulness as quantitative measure of erythropoiesis. Haematologica, **77** : 1-10 62
- Bellamy, W., Takasque, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K. et Tomita, M.** (1992) Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. Biochim. Biophys. Acta, **1121** : 130-136 93
- Bellamy, W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S. et Tomita, M.** (1993) Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. Med. Microbiol. Immunol., **182** : 97-105 93
- Bennett, R. M. et Kokocinski, T.** (1979) Lactoferrin turnover in man. Clin. Sci., **57** : 453-460 69
- Bennett, R. M. et Davis, J.** (1981) Lactoferrin binding to human peripheral blood cells : an interaction with a B-enriched population of lymphocytes and a subpopulation of adherent mononuclear cells. J. Immunol., **127** : 1211-1216 77, 78, 79, 81, 84

- Bennett, R. M., Davis, J., Campbell, S. et Portnoff, S. (1983)** 78
Lactoferrin binds to cell membrane DNA : association of surface DNA with an enriched population of B cells and monocytes. J. Clin. Invest., 71 : 611-618
- Ben-Shachar, D., Eshel, G., Riederer, P. et Youdim, M. B. H. (1992)** 143
Role of iron and iron chelation in dopaminergic-induced neurodegeneration : implication for Parkinsons' disease. Ann. Neurol., 32 : S105-S110
- Berczi, A., Ruthner, M., Szuts, V., Fritzer, M., Schweinzer, E. et Goldenberg, H. (1993)** 53
Influence of conjugation of doxorubicin to transferrin on the iron uptake by K562 cells via receptor-mediated endocytosis. Eur. J. Biochem., 213 : 427-436
- Berish, S. A., Mietzner, T. A., Mayer, L. W., Genco, C. A., Holloway, B. P. et Morse, S. A. (1990)** 65
Molecular cloning and characterisation of the structural gene for the major iron-regulated protein expressed by *Neisseria gonorrhoeae*. J. Exp. Med., 171 : 1535-1546
- Berish, S. A., Chen, C. Y., Mietzner, T. A. et Morse, S. A. (1992)** 65
Expression of a functional neisserial fbp gene in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol., 6 : 2607-2615
- Berkow, R. G., Straneva, J. E., Bruno, E.D., Beyer, G. S., Burgess, J. S. et Hoffman, R. (1984)** 96, 97
Isolation of human megakaryocytes by density centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. J. Lab. Clin. Med., 103 : 811-818
- Berman, C. L., Yeo, E. L., Wencel-Drake, J. D., Furie, B. C., Ginsberg, M. H. et Furie, B. (1986)** 104
A platelet α -granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. J. Clin. Invest., 78 : 130-137
- Bertolini, F., Rebulli, P., Porretti, L., Murphy, S. (1992)** 106
Platelet quality after 15-day storage of platelet concentrates prepared from buffy coats and stored in a glucose-free crystalloid medium. Transfusion, 32 : 9-16
- Bettany, A. J. E., Eisenstein, R. S. et Munro, H. N. (1992)** 58
Mutagenesis of the iron-regulated element further defines a role for RNA secondary structure in the regulation of ferritin and transferrin receptor expression. J. Biol. Chem., 267 : 16531-16537
- Bettens, F., Kristensen, F., Walker, C. et De Week, A. L. (1982)** 56
Human lymphocyte proliferation. II Formation of activated (G1) cells. Eur. J. Immunol., 12 : 948-952

- Bi, B. Y., Leveugle, B., Liu, J. L., Collard, A., Coppe, P., Roche, A. C., Nillesse, N., Capron, M., Spik, G. et Mazurier, J. (1994)** Immunocolocalization of the lactoferrin receptor on the human T lymphoblastic cell line Jurkat. Eur. J. Cell. Biol. (accepté sous réserve de modifications) 107, 123
- Bierings, M. B., Van Eijk, H. G., Baert, M. R. M. et Van Dijk, H. P. (1992)** Regulation of transferrin receptor expression in term human cytotrophoblasts. Troph. Res., 6 : 237-248 58
- Birgens, H. S., Hansen, N. E., Karle, H. et Kristensen, L. O. (1983)** Receptor binding of lactoferrin by human monocytes. Br. J. Haematol., 54 : 383-391 77, 79
- Birgens, H. S., Karle, H., Hansen, N. E. et Kristensen, L. O. (1984)** Lactoferrin receptors in normal and leukaemic human blood cells. Scand. J. Haematol., 33 : 275-280 77, 81, 84
- Birgens, H. S., Kristensen, L. O., Borregaard, N., Karle, H. et Hansen, N. E. (1988)** Lactoferrin-mediated transfer of iron to intracellular ferritin in human monocytes. Eur. J. Haematol., 41 : 52-57 78
- Birgens, H. S. et Kristensen, L. O. (1990)** Impaired receptor-binding and a decrease in isoelectric point of lactoferrin after binding and uptake into human monocytes. Eur. J. Haematol., 45 : 31-35 80
- Birgens, H. S. (1991)** The interaction of lactoferrin with human monocytes. Dan. Med. Bull., 38 : 244-252 77, 80
- Biserte, G., Havez, R. et Cuvelier, R. (1963)** Glycoprotéines des sécrétions bronchiques. Exp. Ann. Biochem. Med., 25 : 85-120 6
- Blache, D. (1992)** Structure et fonctions des plaquettes sanguines. Arch. Intern. Phys. Bioch. Biophys. 100 : A17-A24 2104
- Blanton, K. J., Biswas, G. D., Tsai, J., Adams, J., Dyer, D. W., Davis, S. M., Koch, G. G., Sen, P. K. et Sparling, F. (1990)** Genetic evidence that *Neisseria gonorrhoeae* produces specific receptors for transferrin and lactoferrin. J. Bacteriol., 172 : 5225-5235 90
- Bloch, B., Popovici, T., Levin, M. J., Tuil, D. et Kahn, A. (1985)** Transferrin gene expression visualized in oligodendrocytes of the rat brain by using in situ hybridation and immunochemistry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 : 6706-6710 6
- Boissier, F., Auge-Gouillou, C., Schaeffer, E., et Zakin, M. M. (1991)** The enhancer of the human transferrin gene is organized in two structural and functional domains. J. Biol. Chem., 266 : 9822-9828 22

- Bomford, A. B. et Munro, H. N. (1985)** Transferrin and its receptor : their roles in cell function. Hepatology, 5 : 870-875 56
- Booth, T., Hayward, M. M., Brewer, M. D., Priday, C. et Trenchard, P. M. (1992)** Preparation of platelet concentrates after overnight hold at 20°C. Blood coagulation and fibrinolysis 3 : 621-624 106
- Borhani, D. W. et Harrison, S. C. (1991)** Crystallisation and X-ray diffraction studies of a soluble form of the human transferrin receptor. J. Mol. Biol., 218 : 685-689 63
- Born, G. V. R. et Cross, M. J. (1963)** The aggregation of blood platelets. J. Physiol., 168 : 178-195 105
- Bourgeade, M. F., Silbermann, F., Kuhn, L., Testa, U., Peschle, C., Memet, S., Thang, M. N. et Besancon, F. (1992)** Post-transcriptional regulation of transferrin receptor mRNA by IFN. Nucleic Acids Res., 20 : 2997-3003 61
- Bourne, Y., Nesa, M. P., Rouge, P., Mazurier, J., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J. et Cambiau, C. (1992)** Crystallization and preliminary X-Ray diffraction study of *Lathyrus ochrus* isolectin II complexed to the human lactotransferrin N2 fragment. J. Mol. Biol., 227 : 938-941 11
- Bowman, B. H., Yang, F. et Adrian, G. S. (1988)** Transferrin : evolution and genetic regulation of expression. Adv. Genet., 25 : 1-38 22
- Breton-Gorius, J., Vanhaeke, D., Tabilio, A., Vainchenker, W., Deschamps, J. F. et Xu, F. S. (1983)** Glycoprotein I identification during normal and pathological megakaryocytic maturation. Blood cells, 9 : 275-291 97
- Breton-Gorius, J. et Vainchenker, W. (1986)** Expression of platelet proteins during the *in vitro* and *in vivo* differentiation of megakaryocytes and morphological aspects of their maturation. Sem. Hemat., 23 : 43-67 97
- Bretscher, M. S. (1992)** Cells can use their transferrin receptors for locomotion. EMBO J., 11 : 383-389 54
- Bridges, K. R. et Cudkowicz, A. (1984)** Effect of iron chelators on the transferrin receptor in K562 cells. J. Biol. Chem., 259 : 12970-12977 58
- Britigan, B. E., Serody, J. S., Hayek, M. B., Charniga, L. M. et Cohen, M. S. (1991)** Uptake of lactoferrin by mononuclear phagocytes inhibits their ability to form hydroxyl radical and protects them from membrane autoperoxidation. J. Immunol., 147 : 4271-4277 78, 79

- Brock, J. H., Pickering, M. G., Mc Dowall, M. C. et Deacon, A. G.** 89
(1983) Role of antibody and enterobactin in controlling growth of *Escherichia coli* in human milk and acquisition of lactoferrin- and transferrin-bound iron by *Escherichia coli*. Infect. Immun., 40 : 453-459
- Brown, J. P., Wright, P. W., Hart, C. E., Woodbury, R. G., Hellstrom, K. E. et Hellstrom, I. J.** 5
(1980) Protein antigens of normal and malignant human cells identified by immuno-precipitation with monoclonal antibodies. J. Biol. Chem., 255 : 4980-4983
- Brown, J. P., Hewick, R. D., Hellstrom, I. J., Hellstrom, K. E., Doolittle, R. F. et Dreyer, W. J.** 5
(1982) Human melanoma-associated antigen P97 is structurally and functionally related to transferrin. Nature, 296 : 171-173
- Broxmeyer, H. E.** (1979) Lactoferrin acts on Ia-like antigen positive subpopulations of human monocytes to inhibit production of colony stimulatory activity in vitro. J. Clin. Invest., 64 : 1717-1720 80
- Brozovic, B., Seghatchian, M. J. et Mc Shine, R. L.** (1992) The use of mean platelet volume for evaluation of quality of platelet concentrates. Blood coagulation and fibrinolysis, 3 : 629-631 106
- Brunel, F., Ochoa, A., Schaeffer, E., Boissier, F., Guillou, Y., Cereghini, S., Cohen, G. N. et Zakin, M. M.** (1988) Interactions of DNA-binding proteins with the 5' region of the human transferrin gene. J. Biol. Chem., 263 : 10180-10185 25, 32
- Bulmer, J. N., Morrison, L. et Johnson, P. M.** (1988) Expression of the proliferation markers Ki67 and transferrin receptors by human trophoblast populations. J. Reprod. Immunol., 14 : 291-302 39
- Butler, T. W., Grossi, C. E., Canessa, A. et Pistola V. et Barton, J. C.** 81
(1990) Immunoreactive lactoferrin in resting activated and neoplastic lymphocytes. Leuk. Res., 14 : 441-447
- Büttner, W., Becker, M., Rupprich, C., Boeden, H. F., Henklein, P., Loth, F. et Dautzenberg, H.** (1989) A novel carbonchloridrate for the activation of supports containing hydroxyl groups. Biotechnol. Bioeng., 33 : 26-31 130
- Buys, S. S., Keogh, E. A. et Kaplan, J.** (1984) Fusion of intracellular membrane pools with cell surfaces of macrophages stimulated by phorbol esters and calcium ionophores. Cell, 38 : 569-576 61
- Byrd, T. F. et Horwitz, M. A.** (1991) Lactoferrin inhibits or promotes *Legionella pneumophila* intracellular multiplication in non activated and interferon gamma-activated human monocytes depending upon its degree of iron saturation. J. Clin. Invest., 88 : 1103-1112 61

- Campbell, E. J.** (1982) Human leukocyte elastase, cathepsin G and lactoferrin : family of neutrophil granule glycoproteins that bind to an alveolar macrophage receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79 : 6941-6945 79, 80
- Campbell, T., Skilton, R. A., Coombes, R. C., Shousha, S., Graham, M. D. et Luqmani, Y. A.** (1992) Isolation of a lactoferrin cDNA clone and its expression in human breast cancer. Br. J. Cancer, 65 : 19-26 33
- Campion, B., Leger, D., Wieruszkeski, J. M., Montreuil, J. et Spik, G.** (1989) Presence of fucosylated triantennary, tetraantennary and pentaantennary glycans in transferrin synthesized by human hepato carcinoma cell line HepG2. Eur. J. Biochem., 184 : 405-413 16
- Cao, Z., Urnek, R. et Mc Knight, S. L.** (1991) Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. Genest. Dev., 5 : 1538-1552 26
- Carpenter, M. A. et Broad, T. E.** (1993) The cDNA sequence of horse transferrin Biochim. Biophys. Acta, 1173 : 230-232 8, 22
- Carriaga, M. T., Skikne, B. S., Finley, B., Cutler, B. et Cook, J. D.** (1991) Serum transferrin receptor for the detection of iron deficiency in pregnancy. Am. J. Clin. Nutr., 54 : 1077-1081 55, 145
- Casey, J. L., Hentze, M. W., Koeller, D. M., Caughman, S. W., Rouault, T. A., Klausner, R. D. et Harford, J. B.** (1988) Iron response elements : regulatory RNA sequence that control mRNA levels and translation. Science, 240 : 924-927 58
- Casey, J. L., Koeller, D. M., Ramin, V. C., Klausner, R. D. et 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 58
- Chan, L. N. L. et Gerhardt, E. M.** (1992) Transferrin receptor gene is hyperexpressed and transcriptionally regulated in differentiated erythroid cells. J. Biol. Chem., 267 : 8524-8529 57
- Chéron, A., Mazurier, J. et Fournet, B.** (1977) Fractionnement chromatographique et études sur la microhétérogénéité de la lactotransferrine de vache préparée par un procédé original. C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. Ser. D., 284 : 585-588 A1
- Chitambar, C. R. et Zivkovic, Z.** (1989) Release of soluble transferrin receptor from the surface of human leukemic HL60 cells. Blood, 74 : 602-608 62

- Chitambar, C. R. et Zivkovic, Z. (1990)** Influence of cellular iron status on the release of soluble transferrin receptor from human promyelocytic leukemic HL60 cells. J. Lab. Clin. Med., **116** : 345-353 62
- Chitambar, C. R., Loebel, A. L. et Noble, N. A. (1991)** Shedding of transferrin receptor from rat reticulocytes during maturation in vitro : soluble transferrin receptor is derived from receptor shed in vesicles. Blood, **78** : 2444-2450 38
- Coddeville, B., Stratil, A., Wieruszeski, J. M., Srecker, G., Montreuil, J. et Spik, G. (1989)** Primary structure of horse serotransferrin glycans. Eur. J. Biochem., **186** : 583-590 18
- Coddeville, B., Strecker, G., Wieruszeski, J. M., Vliegenthart, J. F. G., Van Halbeek, H., Peter-Katalinić, J., Egge, H. et Spik, G. (1992)** Heterogeneity of bovine lactotransferrin glycans. Characterization of α -D-Galp(1→3)- β -D-Gal- and α -NeuAc-(2→6)- β -D-GalpNAc-(1→4)- β -D-GlcNAc-substituted N-linked glycans. Carbohydr. Res., **236** : 145-164 19
- Cohen, M. S., Britigan, B. E., French, M. et Bean, K. (1987)** Preliminary observations on lactoferrin secretion in human vaginal mucus : variation during the menstrual cycle, evidence of hormonal regulation, and implications for infection with *Neisseria gonorrhoeae*. Am. J. Obstet. Gynecol., **157** : 1122-1125 6
- Collawn, J. F., Stangel, M., Kühn, L. A., Esekoguw, V., Trowbridge, I. S. et Tainer, J. A. (1990)** Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn structural recognition motif for endocytosis. Cell, **63** : 1061-1072 50
- Collawn, J. F., Kühn, L. A., Sue Liu, L. F., Tainer, J. A. et Trowbridge, I. S. (1991)** Transplanted LDL and mannose-6-phosphate receptor internalization signals promote high-efficiency endocytosis of the transferrin receptor. EMBO J., **10** : 3247-3253 51
- Connor, J. R., Menzies, S. L., St Martin, S. M. et Mufson, E. J. (1990)** Cellular distribution of transferrin, ferritin and iron in normal and aged human brains. J. Neur. Res., **27** : 595-611 6
- Cook, J. D., Skikne, B. S. et Baynes, R. D. (1993)** Serum transferrin receptor. Ann. Rev. Med., **44** : 63-74 37
- Costa, J. L. et Murphy, D. L. (1975)** Platelet 5-HT uptake and release stopped rapidly by formaldehyde. Nature, **255** : 407-408 105
- Cotner, T., Das Gupta, A., Papayannopoulou, T. et Stramatoyannopoulos, G. (1989)** Characterization of a novel form of transferrin receptor preferentially expressed on normal erythroid progenitors and precursors. Blood, **73** : 214-221 38

- Courtoy, P. J., Moguilevsky, N., Retegui, L. A., Castracane, C. E. et Masson, P. L.** (1984) Uptake of lactoferrin by the liver. II Endocytosis by sinusoidal cells. Lab. Invest., **50** : 329-334 77
- Cox, T. M., Mazurier, J., Spik, G., Montreuil, J. et Peters, T. J** (1979) Iron binding proteins and influx of iron across the duodenal brush border. Evidence for specific lactotransferrin receptors in the human intestine. Biochim. Biophys. Acta, **588** : 120-128 1, 72, 75, 94
- Cox, L. A. et Adrian, G. W.** (1993) Posttranscriptional regulation of chimeric human transferrin genes by iron. Biochemistry, **32** : 4738-4745 27
- Crane, F. L., Löw, I. L., Morré, D. J. et Faulk, W. P.** (1990) Interaction between oxidoreductase transferrin receptor and channels in the plasma membrane. in "Growth Factors : from genes to clinical application", Vicki RS ed, Raven Press N. Y., 129-139 51
- Crichton, R. R. et Charlotheau-Wauters, M.** (1987) Iron transport and storage. Eur. J. Biochem., **164** : 485-506 48
- Crichton, R. R. et Ward, R. J.** (1992) Iron metabolism-New perspectives in view. Biochemistry, **31** : 11255-11264 48
- Cunningham, G. A., Headon, D. R. et Conneely, O. M.** (1992) Structural organization of the mouse lactoferrin gene. Biochem. Biophys. Res. Commun., **189** : 1725-1731 23
- Dalamastri, C., Valenti, P., Visca, P., Vittorioso, P. et Orsi, N.** (1988) Enhanced antimicrobial activity of lactoferrin by binding to the bacterial surface. Microbiologica, **11** : 225-230 92
- Dargemont, C., Le Bivic, A., Rothenberger, S., Iacopetta, B. et Kühn, L. C.** (1993) The internalization signal and the phosphorylation site of transferrin receptor are distinct from the main basolateral sorting information. EMBO J., **12** : 1713-1721 51
- Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A. et Lodish, H. F.** (1983) pH and recycling of transferrin during receptor mediated endocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80** : 2258-2262 39, 45, 47
- Dautry-Varsat, A. et Lodish, H.** (1984) Les recepteurs cellulaires et l'endocytose. Pour la Science, juillet : 78-85 48, 49
- Davidson, L. A. et Lönnerdal, B.** (1988) Specific binding of lactoferrin to brush-border membrane : ontogeny and effect of glycan chain. Amer. J. Physiol., **254** : G580-G585 72, 73, 74, 75

- Davis, R. J., Corvera, S. et Czeh, M. P.** (1986) Insulin stimulates cellular iron uptake and causes the redistribution of intracellular transferrin receptors to plasma membranes. J. Biol. Chem., 261 : 8708-8711 61
- Davis, R. J., Faucher, M., Racaniello, L. K., Carruthers, A. et Czeh, M. P.** (1987) Insulin-like growth factor I and epidermal growth factor regulate the expression of transferrin receptors at the cell surface by distinct mechanisms. J. Biol. Chem., 262 : 13126-13134 61
- Day, C. L., Stowell, K. M., Baker, E. N. et Tweedie, J. W.** (1992) Studies of the N-terminal half of human lactoferrin produced from the cloned cDNA demonstrate that interlobe interactions modulate iron release. J. Biol. Chem., 267 : 13857-13862 15
- Debili, N., Issaad, C., Massé, J. M., Guichard, J., Katz, A., Breton-Gorius, J. et Vainchenker, W.** (1992) Expression of CD34 and platelet glycoproteins during human megakaryocytic differentiation. Blood, 80 : 3022-3035 99
- Debruyne, V., Montreuil, J. et Spik, G.** (1984) Immunoaffinity electrophoresis of human transferrin in normal and cirrhotic sera. Prot. Biol. Fluids, 31 : 63-68 16, 18
- De Jong, G.** (1990) The biology of transferrin Clin. Chim. Acta, 190 : 1-46 37, 51
- De Jong, G., Van Noort, W. L. et Van Eijk, H. G.** (1992) Carbohydrate analysis of transferrin subfractions isolated by preparative isoelectric focusing in immobilized pH gradients. Electrophoresis, 13 : 225-228 18
- Derisbourg, P.** (1990) Etude des récepteurs entérocytaires de la lactotransferrine humaine : caractérisation des récepteurs sur les cellules humaines HT29. Etude du mécanisme d'endocytose de la lactotransferrine. Thèse d'Université, Lille I 72, 75
- Derisbourg, P., Wieruszkeski, J. M., Montreuil, J. et Spik, G.** (1990) Primary structure of glycans isolated from human leukocyte lactotransferrin. Absence of fucose residues questions the proposed mechanism of hyposideremia. Biochem. J., 269 : 821-825 19, 70
- De Vet, B. J. C. M. et Van Gool, J.** (1974) Lactoferrin and iron absorption in the small intestine. Acta Med. Scand., 196 : 393-402 72
- Dickson, P. L., Aldred, A. R., Marley, P. D., Guo-Pen, T., Howle, G. J. et Schreiber, G.** (1985) High prealbumin and transferrin mRNA levels in the choroid plexus of rat brain. Biochem. Biophys. Res. Commun., 127 : 890-896 6

- Do, S. I., Enns, C. et Cummings, R. D. (1990)** Human transferrin receptor contains O-linked oligosaccharides. J. Biol. Chem., **265** : 114-125 45
- Do, S. I. et Cummings, R. D. (1991)** O-glycosylation of the human transferrin receptor. T. I. G. G. **3** : 23-26 45
- Do, S. I. et Cummings, R. D. (1992)** The hamster transferrin receptor contains Ser/Thr-linked oligosaccharides : use of a lectin-resistant CHO cell line to identify glycoproteins containing these linkages. J. Biochem. Biophys. Meth., **24** : 153-165 45
- Dorland, L., Haverkamp, J., Schut, B. L., Vliegthart, J. F. G., Spik, G., Fournet, B. et Montreuil, J. (1977)** The structure of the asialocarbohydrate units of human serotransferrin as proven by 360MHz proton magnetic resonance spectroscopy FEBS Lett., **77** : 15-20 16, 17
- Dybkaer, R., Lauritzen, M. et Krakauer, R. (1981)** Relative reference values for clinical chemical and hematological quantities in "healthy" elderly people. Acta Med. Scand., **209** : 1-9 24
- Ecarot-Charrier, B., Grey, V. L., Wilczynska, A. et Schulman, H. M. (1980)** Reticulocytes membrane transferrin receptors. Can. J. Biochem., **58** : 418-426 38
- Eicholtz, T., Vosseveld, P., Van Overveld, M. et Ploegh, H. (1992)** Activation of protein kinase C accelerates internalization of transferrin receptor but not of major histocompatibility complex class I, independent of their phosphorylation status. J. Biol. Chem., **267** : 22490-22495 46
- Ellison, R. T., Giehl, T. J. et La Force, F. M. (1988)** Damage of the outer membrane of gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. Infect. Immun., **56** : 2774-2781 93
- Ellison, R. T. et Giehl, T. J. (1991)** Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. J. Clin. Invest., **88** : 1080-1091 93
- Enns, C. A. et Sussman, H. H. (1981)** Physical characterization of the transferrin receptor in human placentae. J. Biol. Chem., **256** : 9820-9823 40
- Enns, C. A. et Reckhow, C. L. (1988)** Characterization of the transferrin receptor in tunicamycin-treated A431 cells. J. Biol. Chem., **263** : 7297-7301 43
- Enns, C. A. et Williams, A. (1991)** Proper folding of the human transferrin receptor is correlated with the glycosylation of Asn 727. 10th International Conference on Iron and Iron-Proteins July 27th-31st:Oxford 43, 46

- Espinosa de los monteros, A., Kurnan, S., Scully, S., Cole, R. et De Vellis, J. (1990)** Transferrin gene expression and secretion by rat brain cells in vitro. J. Neur. Res., **25** : 576-580 29
- Faucheux, B. A., Hirsch, E. C., Villares, J., Selimi, F., Mouatt-Prigent, A., Javoy-Agid F., Hauw, J. J. et Agid, Y. (1993)** Distribution of ¹²⁵I-ferrotransferrin binding sites in the mesencephalon of control subjects and patients with Parkinson's disease. J. Neurochem., **60** : 2338-2341 145
- Faucheux, B. et Nieoullon, A. (1993)** Actualités sur les monoamines oxydases (MAO) et le stress oxydatif dans la maladie de Parkinson : vers la mise au point de nouveaux traitements à visée étiologique ? La lettre du pharmacologue, **7** : 4-11 145
- Ferguson, B. J., Skikne, B. S., Simpson, K. M., Baynes, R. D. et Cook, J. (1992)** Serum transferrin receptor distinguishes the anemia of chronic disease from iron deficiency anemia. J. Lab. Clin. Med., **119** : 385-390 55, 145
- Flowers, C. H., Skikne, B. S., Covell, A. M. et Cook, J. D. (1989)** The clinical measurement of serum transferrin receptor. J. Lab. Clin. Med., **114** : 368-377 62
- Foucault, P. P., Carreau, S., Kuczynski, W., Guillaumin, J. M., Bardos, P. et Drosdowski, M. A. (1992)** Human sertoli cells in vitro. Lactate, estradiol-17 and transferrin production. J. Androl., **13** : 361-367 6
- Friedman, A. D., Krieder, B. L., Venturelli, D. et Rouera, G. (1991)** Transcriptional regulation of two myeloid-specific genes, myeloperoxidase and lactoferrin, during differentiation of the murine cell line 32DC13. Blood, **78** : 2426-2432 30
- Fritzer, M., Barabas, K., Szüts, V., Berczi, A, Szekeres, T., Faulk, W. P. et Goldenberg, H. (1992)** Cytotoxicity of a transferrin-adriamycin conjugate to anthracycline-resistant cells. Int. J. Cancer, **52** : 619-623 53
- Fry, M. (1989)** Diferric transferrin reductase in *Plasmodium-falciparum*-infected erythrocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun., **58** : 469-473 68
- Funk, W. D., Mc Gillivray, R. T. A., Mason, A. B., Brown, S. A. et Woodworth, R. C. (1990)** Expression of the N-terminal half-molecule of human serum transferrin in cultured cells and characterization of the recombinant protein. Biochemistry, **29** : 1654-1660 34
- Gado, I., Erdei, J., Laszlo, V. G., Paszti, J., Czirok, E., Kontrohr, T., Toth, L, Forsgren, A. et Naidu, A. S. (1991)** Correlation between human lactoferrin binding and colicin susceptibility in *Escherichia*. Antimicrob. Agents Chemother., **35**: 2538-2543 93

- Galbraith, G. M. P., Galbraith, R. M. et Faulk, W. P. (1980)** 39
 Immunological studies of transferrin and transferrin receptors of human placental trophoblast. Placenta, 1 : 33-46
- Gardiner, M. E. et Morgan, E. H. (1974)** 38
 Transferrin and iron uptake by the liver in the rat. Aust. J. Biol. Med. Sci., 52 : 723-726
- Garré, C., Bianchi-Scarra, G., Siritto, M., Musso, M. et Ravazzalo, R. (1992)** 81
 Lactoferrin binding sites and nuclear localization in K562(S) cells. J. Cell. Physiol., 153 : 477-482
- Gaub, M. P., Bellard, M., Scheuer, I., Chambon, P. et Sassone-Corsi, P. (1990)** 31
 Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the Fos-Jun complex. Cell, 63 : 1267-1276
- Gerhardt, E. M., Chan, L. N. L., Jing, S., Qi, M. et Trowbridge, I. S. (1991)** 42
 The cDNA sequence and primary structure of the chicken transferrin receptor. Gene, 102 : 249-254
- Gerlach, G. F., Kashinsky, S., Anderson, C., Potter, A. A. et Willson, P. J. (1992a)** 64
 Characterization of two genes encoding transferrin-binding proteins in different *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. Infect. Immun., 60 : 3253-3261
- Gerlach, G. F., Anderson, C., Potter, A. A., Klashinsky, S. et Willson, P. J. (1992b)** 64
 Cloning and expression of a transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Infect. Immun., 60 : 892-898
- Gerwitz, A. M. et Hoffman, R. (1990)** 103
 Human megakaryocyte production : cell biology and clinical considerations. Hematol. Oncol. Clin. N. Amer., 4 : 43-64
- Gil, A., Sharp, P. A., Jamison, S. F. et Garcia-Blanco, M. A. (1991)** 26
 Characterization of cDNAs encoding the polypyrimidine tract-binding protein. Genes & Dev., 5 : 1224-1236
- Gilmont, R. R., Coulter, G. H., Sylvester, S. R. et Griswold, M. D. (1990)** 8
 Synthesis of transferrin and transferrin mRNA in bovine sertoli cells in culture and in vivo : sequence and partial cDNA clone for bovine transferrin. Biol. Reprod., 43 : 139-150
- Girones, N., Alvarez, E., Seth, A., Lin, I. M., Latour, D. A. et Davis, R. J. (1991)** 50
 Mutational analysis of the cytoplasmic tail of the human transferrin receptor. J. Biol. Chem., 266 : 19006-19012

- Gnezditskaya, C. V., Bukhova, V. P., Beletskaya, L. V., Zakharova, N. A. et Shakhanina, K. L. (1984)** Lactoferrin receptors on human thymic lymphocytes. Stimulation of expression by adenosine, theophylline and supernatant of thymic lymphocytes. Bull. Exp. Biol. Med., **98** : 1547-1550 82
- Gnezditskaya, E. V., Bukhova, V. P., Zakharova, N. A. et Malkina, L. A. (1987)** Lactoferrin induced stimulation of Fc γ and Fc μ receptor expression on the surface of human thymus lymphocytes in vitro. Bull. Exp. Biol. Med., **4** : 447-449 82
- Goavec, M., Mazurier, J., Montreuil, J. et Spik, G. (1985)** Rôle des glycanes dans la fixation de la sérotransferrine et de la lactotransferrine humaines sur les macrophages alvéolaires humains. C. R. Acad. Sc. Paris, **301** : 689-694 77, 78, 79, A6
- Goding, J. W. (1983)** Transferrin receptors on lymphocytes : structure, expression, evolution and function. Surv. Immunol. Res., **2** : 129-136 37
- Gonzales, G. C., Caamano, D. L. et Schryvers, A. B. (1990)** Identification and characterization of a porcine-specific transferrin receptor in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Mol. Microbiol., **4** : 1173-1179 64
- Goodfellow, P. N., Banting, G., Sutherland, D. R., Greaves, M., Solomon, E. et Povey, S. (1982)** Expression of human transferrin receptor is controlled by a gene on chromosome 3. Somatic Cell Genet., **8** : 197-206 55
- Goodman, R. E. et Schanbacher, F. L. (1991)** Bovine lactoferrin mRNA : sequence, analysis and expression in the mammary gland. Biochem. Biophys. Res. Commun., **180** : 75-84 8
- Graziadei, L., Kaserbacher, R., Braunsteiner, H. et Vogel, W. (1993)** The hepatic acute-phase proteins α 1-antitrypsin and α 2-macroglobulin inhibit binding of transferrin to its receptor. Biochem. J., **290** : 109-113 46
- Green, J. A. et Manson, M. M. (1992)** Production of polyclonal antisera in Methods in Molecular Biology : Immunochemical Protocols vol 10, Manson M. ed, The Humana Press Inc., Totowa, NJ 134, 189
- Greenberg, S. M., Rosenthal, D. S., Greeley, T. A., Tantravahi, R. et Handin, R. I. (1988)** Characterization of a new megakaryocytic cell line : the DAMI cell. Blood, **72** : 1968-1977 100,164, 176, 185
- Greenberg, S. M., Chandrasekhar, C., Gotan, D. E. et Handin, R. I. (1990)** Transforming growth factor β inhibits endomitosis in the DAMI human megakaryocytic cell line. Blood, **76** : 533-537 100, 186

- Griffiths, E. (1987)** The iron-uptake systems of pathogenic bacteria in Bullen JJ Griffiths E (eds) Iron and Infection : Molecular Physiological and Clinical Aspects John Wileys & sons, Chichester, 69-138 63
- Griffiths, E., Stevenson, P. et Ray, A. (1990)** Antigenic and molecular heterogeneity of the transferrin-binding protein of *Neisseria meningitidis*. FEMS Microbiol. Lett., 69 : 31-36 65
- Griffiths, E. (1991)** Iron and bacterial virulence- A brief overview. Biol. Metals, 4 : 7-13 66
- Griffiths, E., Stevenson, P., Byfield, P., Ala'Aldeen, D. A., Borriello, S. P., Holland, J., Parson, T. et Williams, P. (1992)** N-terminal amino acid sequences of meningococcal transferrin-binding proteins 1 and 2 : cross-reactivity of anti-peptide antibodies with transferrin-binding proteins of *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus* species. Neisseria Cuernava Mexico (oral communication) 65
- Griffiths, E., Stevenson, P., Byfield, P., Ala'Aldeen, D. A., Borriello, S. P., Holland, J., Parsons, T. et Williams, P. (1993)** Antigenic relationships of transferrin-binding proteins from *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae* : croos-reactivity of antibodies to NH2-terminal peptides. FEMS Microb. Lett., 109 : 85-92 65
- Gröhlich, D., Morley, C. G. D. et Bezkorovainy, A. (1979)** Some aspects of iron uptake by rat hepatocytes in suspension Int. J. Biochem. 10 : 792-802 38
- Grossman, J. G., Neu, M., Pantos, E., Schwab, F. J., Evans, R. W., Townes-Andrews, E., Lindley, P. F., Thies, H. A. W. G. et Hasnain, S. S. (1992)** X-ray solution scattering reveals conformational changes upon iron uptake in lactoferrin, serum and ovo-transferrins. J. Mol. Biol., 225 : 811-819 14
- Grossman, J. G., Neu, M., Evans, R. W., Lindley, P. F., Appel, H. et Hasnain, S. S. (1993)** Metal-induced conformational changes in transferrins. J. Mol. Biol., 229 : 585-590 14
- Guillou, F., Zakin, M. M., Part, D., Boissier, F. et Schaeffer, E. (1991)** Sertoli cell-specific expression of the human transferrin gene. J. Biol. Chem. 266 : 9876-9884 26
- Hahn, T. J. et Goochee, C. F. (1992)** Growth-associated glycosylation of transferrin secreted by Hep G2 cells. J. Biol. Chem., 267 : 23982-23987 18

- Haile, D. J., Rouault, T. A., Tang, C. K., Chin, J., Harford, J. B. et Klausner, R. D. (1992)** Reciprocal control of DNA-binding aconitase activity in the regulation of the iron-responsive element binding protein : role of the iron-sulfur cluster. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89** : 7534-7540 59
- Haldar, K., Henderson, C. L. et Cross, G. A. M. (1986)** Identification of the parasite transferrin receptor of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and its acylation via 1,2-diacyl-glycerol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83** : 8565-8569 68
- Hamilton, T. A., Wada, H. G. et Sussman, H. H. (1979)** Identification of the transferrin receptor distribution on the surface of human cultured cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76** : 6406-6410 47
- Hammer, R. E., Idzerda, R. L., Brinster, R. L. et Mc Knight, G. S. (1986)** Estrogen regulation of the avian transferrin gene in transgenic mice. Mol. Cell. Biol., **6** : 1010-1014 27
- Han, Z. C., Bellucci, S., Tenza, D. et Caen J. P. (1990a)** Negative regulation of human megakaryocytopoiesis by human platelet factor 4 and beta thromboglobulin : comparative analysis in bone marrow cultures from normal individuals and patients with essential thrombocythaemia and immune thrombocytopenic purpura. Br. J. Haematol., **74** : 395-401 103, 186
- Han, Z. C., Bellucci, S., Walz, A., Baggiolini, M. et Caen J.P. (1990b)** Negative regulation of human megakaryocytopoiesis by human platelet factor 4 (PF4) and connective tissue-activating peptide (CTAP-III). Int. J. Cell Cloning, **8** : 253-259 103, 186
- Han, Z. C., Bellucci, S., Bodevin, E., Wan, H. Y., Shen, Z. X. et Caen, J. P. (1991)** In vivo inhibition of megakaryocyte and platelet production by platelet factor 4 in mice. C. R. Acad. Sci. Paris, **313** : 553-558 103, 186
- Han, Z. C. et Caen, J. P. (1993)** Are megakaryocytes and endothelial cells sisters ? J. Lab. Clin. Med., **121** : 821-825 103
- Handagama, P., Jain, N. C., Kono, C. S. et Feldman, B. F. (1986)** Scanning electron microscopy studies of megakaryocytes and platelet formation in the dog and rat. Am. J. Vet. Res., **48** : 2454-2460 102
- Handagama, P. J., Feldman, B. F., Jain, N. C., Farver, T. B. et Kono, C. S. (1987)** Circulating proplatelets : isolation and quantification in healthy rats and in rats with induced acute blood loss. Am. J. Veterin. Res., **48** : 1142-1146. 103
- Hansen, S. H., Sandvig, K. et Van Deurs, B. (1992)** Internalization efficiency of the transferrin receptor. Exp. Cell Res., **199** : 19-28 50

- Harrell, C. M., Mc Kenzie, A. R., Patino, M. M., Walden, W. E. et Theil, E. C.** (1991) Ferritin mRNA : interactions of iron regulatory element with translational regulatory protein P-90 and the effect on base-paired flanking regions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88** : 4166-4170 58
- Hartford, T., O'Brien, S., Andrew, P. W., Jones, D. et Roberts, I. S.** (1993) Utilization of transferrin-bound iron by *Listeria monocytogenes*. FEMS Microb. Lett., **108** : 311-318 67
- Hayes, G. R., Enns, C. A. et Lucas, J. J.** (1992) Identification of the O-linked glycosylation site of the human transferrin receptor. Glycobiology, **2** : 355-359 45
- Hentze, M. W., Rouault, T. A., Harford, J. B. et Klausner, R. D.** (1989) Oxidation-reduction and the molecular mechanism of a regulatory RNA-protein interaction. Science, **244** : 357-359 59
- Herrington, D. A. et Sparling, F.** (1985) Haemophilus influenzae can use human transferrin as a sole source for required iron. Infect. Immun., **48** : 248-251 64
- Hershberger, C. L., Larson, J. L., Arnold, B., Rosteck, P. R., Williams, P., De Hoff, B., Dunn, P., O'Neal, K. L., Riemen, M. W., Tice, P. A., Crofts, R. et Ivancic, J.** (1991) A cloned gene for human transferrin. Ann. N. Y. Acad. Sci., **646** : 140-154 34
- Hirsch, E. C., Brandel, J. P., Galle, P. et Agid, Y.** (1991) Iron and aluminium increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease : an X-ray microanalysis. J. Neurochem., **56** : 446-451 143
- Hoffman, R.** (1985) Regulation of megakaryocytopoiesis. Blood, **74** : 1196-1212 186
- Holland, J., Langford, P. R., Towner, K. J. et Williams, P.** (1992) Evidence for in vivo expression of transferrin-binding proteins in *Haemophilus influenzae* type b. Infect. Immun., **60** : 2986-2991 64
- Hourani, S. M. O. et Cusack, N. J.** (1991) Pharmacological receptors on blood platelets. Pharmacol. Rev., **43** : 243-298 104
- Hsu, S. L., Lin, Y. F. et Chou, C. K.** (1992) Transcriptional regulation of transferrin and albumin genes by retinoic acid in human hepatoma cell line Hep3B. Biochem. J., **283** : 611-615 28
- Hu, W. L., Mazurier, J., Sawatzki, G., Montreuil, J. et Spik, G.** (1988) Lactotransferrin receptor of mouse small intestinal brush-border. Biochem. J., **249** : 435-441 72, 73, 74, 75

- Hu, W. L., Mazurier, J., Montreuil, J. et Spik, G. (1990)** Isolation and partial characterization of a lactotransferrin receptor from mouse intestinal brush border. Biochemistry, 29 : 535-541 1, 2, 72, 73, 95
- Hu, W. L., Chindemi, P. A. et Regoeczi, E. (1992)** The perfused liver is capable of producing all transferrin glycan variants found in the sera of intact rats. Hepatology, 16 : 1049-1054 19
- Huebers, H. A., Csiba, E., Josephson, B., Huebers, E. et Finch, C. A. (1981)** Interaction of diferric human transferrin with reticulocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 : 621-625 45
- Huebers, H. A. et Finch, C. A. (1987)** The physiology of transferrin and transferrin receptors. Physiological Rev., 2 : 520-582 37
- Huebers, H. A., Huebers, E., Josephson, B. et Csiba, E. (1989)** A highly efficient chemical isolation procedure for the rat placental transferrin receptor. Biochim. Biophys. Acta, 991 :30-35 37
- Huebers, H. A., Beguin, Y., Pootrakul, P., Einspahr, D. et Finch, C.A. (1990)** Intact transferrin receptors in human plasma and their relation to erythropoiesis. Blood, 75 : 102-107 62
- Huettinger, M., Retzek, H., Eder, M. et Goldenberg, H. (1988)** Characteristics of chylomicron remnant uptake into the rat liver. Clin. Biochem., 21 : 87-92 71
- Hunt, R. C., Riegler, R. et Davis, A. A. (1989a)** Changes in glycosylation alter affinity of the human transferrin receptor for its ligand. J. Biol. Chem., 264 : 9643-9648 43
- Hunt, R. C., Devey, A. et Davis, A. A. (1989b)** Transferrin receptors on the surfaces of retinal pigment epithelial cells are associated with the cytoskeleton. J. Cell. Sci., 92 : 655-666 43, 46
- Husson, M. O., Legrand, D., Spik, G. et Leclerc, H. (1993)** Iron acquisition by *Helicobacter pylori* : Importance of human lactoferrin. Infect. Immun., 61 : 2694-2697 89
- Idzerda, R. L., Huebers, A., Finch, C. A. et Mc Knight, G. S. (1986)** Rat transferrin gene expression tissue specificity and regulation by iron deficiency. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 : 2723-2727 26
- Ikeda, R. A., Bowman, B. H.; Yang, F. et Lokey, L. K. (1992)** Production of human serum transferrin in *Escherichia coli*. Gene, 117 : 265-269 34
- Imber, M. J. et Pizzo, S. V. (1983)** Clearance and binding of native and defucosylated lactoferrin. Biochem. J., 212 : 249-257 69, 70, 79

- Irisawa, C., Nakada, T., Kubota, Y., Sasagawa, I., Adachi, Y. et Yaguchi, H.** (1993) Transferrin concentration in seminal plasma with special reference to serum hormone levels in infertile men. Arch. Androl., **30** : 13-21 6
- Ishibashi, T., Kimura, H., Uchida, T., Kariyone, S., Friese, P. et Burstein, S. A.** (1989) Human IL-6 is a direct promoter maturation of megakaryocytes in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86** : 5953-5957 186
- Isobe, K., Sakurai, T. et Isobe, Y.** (1978) Studies on iron transport in human intestine by immunoperoxidase technique. I- the localization of ferritin, lactoferrin and transferrin in human duodenal mucosa. Acta Haematol., **41** : 294-299 72
- Jacquinet, P. M.** (1992) Etude de la modification de la glycosylation de la transferrine sécrétée dans le milieu de culture par les cellules d'hépatocarcinome humain et par les hépatocytes embryonnaires de poulet. Thèse d'Université, Lille I 18
- Jamroz, R. C., Gasdaska, J. R., Bradfield, J. Y. et Law, J. H.** (1993) Transferrin in a cockroach : molecular cloning, characterization and suppression by juvenile hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90** : 1320-1324 8
- Jandl, J. H., Inman, J. K., Simmonen, R. L. et Allen, D. W.** (1959) Transfer of iron from serum iron-binding protein to human reticulocytes. J. Clin. Invest., **38** : 161-185 38
- Jellinger, K., Kienzl, E., Rumpelmair, G., Riederer, P., Stachelberger, H., Ben-Sachar, D. et Youdim, M. B. H.** (1992) Iron-melanin complex in substantia nigra of parkinsonian brains : an X-ray microanalysis. J. Neurochem., **59** : 1168-1171 143
- Jenkins, R. B., Nichols, W. L., Mann, K. G. et Solberg, L.A.** (1986) CFU-M-derived human megakaryocytes synthesize glycoproteins IIb et IIIa. Blood, **67** : 682-688 99
- Jing, S. et Trowbridge, I. S.** (1990) Non acylated human transferrin receptors are rapidly internalized and mediate iron uptake. J. Biol. Chem., **265** : 11555-11559 46
- Jing, S., Spencer, T., Miller, K., Hopkins, C. et Trowbridge, I. S.** (1990) Role of the human transferrin receptor cytoplasmic domain in endocytosis : localization of a specific signal sequence for internalization. J. Cell Biol., **110** : 283-294 50
- Jobbagy, A. et Kiraly, K.** (1966) Chemical characterization of fluorescein isothiocyanate-protein conjugates. Biochim. Biophys. Acta, **124** : 166-175 A2

- Johnston, B. J., Rinkels, P., Chung, J., Sather, J., Benz, E. J. et Berliner, N.** (1992) Lactoferrin gene promoter : structural integrity and non expression in HL60 cells. Blood, 79 : 2998-3006 23
- Johnstone, R. M., Mathew, A., Mason, A. B. et Teng, K.** (1991) Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes : evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins. J. Cell Physiol, 147 : 27-36 62
- Kadner, R. J., Bassford, P. J. et Pugsley, A. P.** (1979) Colicin receptors and the mechanisms of colicin uptake. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Urogen. Reihe A, 244 : 90-104 93
- Kahn, A., Levin, M. J., Zakin, M. M. et Bloch, B.** (1987) The transferrin gene. in: Oncogenes, genes and growth factors, Guroff G, Ed., Wiley-Interscience, 277-309 28
- Kahn, N. N. et Sinha, K.** (1990) Stimulation of prostaglandin E1 binding to human blood platelet membrane by insulin and the activation of adenylate cyclase. J. Biol. Chem., 265 : 4976-4981 162
- Kailis, S. G. et Morgan, E. H.** (1974) Transferrin and iron uptake by rabbit bone marrow cells in vitro. Brit. J. Haem., 28 : 37-52 57
- Kalfas, S., Andersson, M., Edwardsson, S., Forsgren, A. et Naidu, A. S.** (1991) Human lactoferrin binding to *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella melaninogenica*. Oral. Microbiol. Immunol., 6 : 350-355 90, 91
- Kaptain, S., Downey, W. E., Tang, C. K., Philpott, C., Haile, D., Orloff, D. G., Harford, J. B., Rouault, T. A. et Klausner, R. D.** (1991) A regulated RNA binding protein also possesses aconitase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 : 10109-10113 58
- Karzai, A. W. et Wright, W. W.** (1992) Regulation of the synthesis and secretion of transferrin and cyclic protein-2/cathepsin L by mature rat sertoli cells in culture. Biology of reproduction, 47 : 823-831 28
- Kaufman, R. M., Airo, R., Pollack, S. et Crosby, W. H.** (1965) Circulating megakaryocytes and platelet release in the lung. Blood, 26 : 720-731 103, 192
- Kawakami, H., Hiratsuka, M. et Dosako, S.** (1988) Effects of iron-saturated lactoferrin on iron absorption. Agric. Biol. Chem., 52 : 903-908 75
- Kawakami, H. et Lönnnerdal, B.** (1991) Isolation and function of a receptor for human lactoferrin in human fetal intestinal brush-border membranes. Am. J. Physiol, 261 : 841-846 72, 73, 74, 75

- Kawamata, T., Tooyama, L., Yamada, T., Walker, D. G. et Mc Geer, P. L.** (1993) Lactotransferrin immunocytochemistry in Alzheimer and normal human brain. Am. J. Pathol., **142** : 1574-1585 7, 158, 190
- Kemp, J. D., Smith, K. M., Kanner, L. J., Gomez, F., Thorson, J. A. et Naumann, P. W.** (1990) Synergistic inhibition of lymphoid tumor growth in vitro by combined treatment with the iron chelator deferoxamine and an immunoglobulin G monoclonal antibody against the transferrin receptor. Blood, **76** : 991-995 53
- Kennedy, M. C., Mende-Mueller, L., Blondin, G. A. et Beinert, H.** (1992) Purification and characterization of cytosolic aconitase from beef liver and its relationship to the iron-responsive element binding protein (IRE-BP). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89** : 11730-11734 39
- Kennedy, M. L., Douglas, G. S. et King, B. F.** (1992) Expression of transferrin receptors during differentiation of human placental trophoblast cells in vitro. Placenta, **13** : 43-53 59
- Keydar, I., Chen, L., Karby, S., Weiss, F. R., Delarea, J., Radu, M., Chaitak, S. et Brenner, H. J.** (1979) Establishment and characterisation of a cell line of human breast carcinoma origin. Eur. J. Cancer, **15** : 659-670 87
- Killisch, I., Steinlein, P., Romisch, K., Hollinshead, R., Beug, H. et Griffiths, G.** (1992) Characterization of early and late endocytic compartments of the transferrin cycle. J. Cell Science, **103** : 211-232 50
- Kishore, A. R., Erdei, J., Naidu, S. S., Falsen, E., Forsgren, A. et Naidu, A. S.** (1991) Specific binding of lactoferrin to *Aeromonas hydrophila*. FEMS Microbiol. Lett., **83** : 115-120 92
- Klausner, R. D., Harford, J. B. et Van Renswoude, J.** (1983) Binding of apotransferrin to K562 : explanation of the transferrin cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80** : 2263-2266 45, 47
- Klausner, R. D., Rouault, T. A. et Harford, J. B.** (1993) Regulating the fate of mRNA : the control of cellular iron metabolism. Cell, **72** : 19-28 57
- Koeller, D. M., Casey, J. L., Hentze, M. W., Gerhardt, E. M., Chan, L., Klausner, R. D. et Harford, J. B.** (1989) A cytosolic protein binds to structural elements within the iron regulatory region of the transferrin receptor mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86** : 3574-3578 58
- Kohgo, Y., Nishisato, T., Kondo, H., Tsushima, N., Niitsu, Y. et Urushizaki, I.** (1986) Circulating transferrin receptor in human serum. Brit. J. Haematol., **64** : 277-281 62

- Kohgo, Y., Niitsu, Y., Kondo, H., Tsushima, N., Sasaki, K., Hirayama, M., Numata, T., Nishisato, T. et Urushizaki, I. (1987)** Serum transferrin receptor as a new index of erythropoiesis. Blood, 70 : 1955-1958 62
- Kohgo, Y., Kondo, H., Kato, J., Sasaki, K., Tsushima, N., Nishisato, T., Hirayama, M., Fujikawa, K., Shintani, M., Mogi, Y. et Niitsu, Y. (1990)** Kinetics of internalization and cytotoxicity of transferrin-neocarzinostatin conjugate in human leukemia cell line K562. Jpn. J. Cancer Res., 81 : 91-99 53
- Kohler, G. et Milstein, C. (1975)** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 256 : 495-497 110
- Koike, T., Aoki, S., Maruyama, S., Narita, M., Ishizuka, T., Imanaka, H., Adachi, T., Maeda, H. et Shibata, A. (1987)** Cell surface phenotyping of megakaryoblasts. Blood, 69 : 957-960 99
- Komlos, L., Landmann, J., Notmann, J., Dulitzky, F., Hart, J., Halbrecht, I. et Glibersson, A. (1991)** Expression of transferrin receptor on human maternal and neonatal peripheral blood lymphocytes. Am. J. Reprod. Immunol., 26 : 124-128 39
- Konisky, J. (1982)** Colicins and other bacteriocins with established modes of action. Ann. Rev. Microbiol., 36 : 125-144 93
- Kühn, L. C., Mc Clelland, A. et Ruddle, F. H. (1984)** Gene transfer, expression, and molecular cloning of the human transferrin receptor gene. Cell, 37 : 95-103 55
- Kühn, L. C., Schulman, H. M. et Ponka, P. (1990)** . in: Iron Transport and Storage, Ponka P, Schulman H M, Woodworth R C, Eds., , CRC Press, 149-193 48
- Kühn, L. C. (1991)** mRNA-protein interactions regulate critical pathways in cellular iron metabolism. Br. J. Haematol., 79 : 1-5 60
- Kuter, D. J., Gminski, D. M. et Rosenberg, R. D. (1992)** Transforming growth factor inhibits megakaryocyte growth and endomitosis. Blood, 79 : 619-626 186
- Laemmli, U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227 : 680-685 A4
- Larrick, J. W. et Cresswell, P. (1979a)** Modulation of cell surface iron transferrin receptors by cellular density and state of activation. J. Sup. Struct., 11 : 579-586 56

- Larrick, J. W. et Cresswell, P. (1979b)** Transferrin receptors on human B and T lymphoblastoid cell lines. Biochim. Biophys. Acta, **583** : 483-490 47, 56
- Larsen, E., Palabrica, T., Sajer, S., Gilbert, G. E., Wagner, D. D., Furie, B. C. et Furie, B. (1990)** PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage specific carbohydrate, LNF III (CD15). Cell, **63** : 467-474 104
- Lauble, H., Kennedy, M. C., Beinert, H. et Stout, C. D. (1992)** Crystal structures of aconitase with isocitrate and nitroisocitrate bound. Biochemistry, **31** : 2735-2748 58
- Leclercq, Y. (1987)** Interactions transferrines-macrophages : rôle des glycanes dans la reconnaissance par les récepteurs membranaires du macrophage péritonéal de souris. Thèse d'Université, Lille I 78
- Lee, B. R., Miller, J. M., Yang, C. Y., Ramdas, L., Yang, M., Morrisett, J. D. et Mims, M. P. (1991)** Amino acid sequence of rabbit apolipoprotein E. J. Lipid. Res., **32** : 165-171 71
- Léger, D., Champion, B., Decottignies, J. P., Montreuil, J. et Spik, G. (1989)** Physiological significance of the marked increased branching of the glycans of human serotransferrin during pregnancy. Biochem. J., **257** : 231-238 18
- Legrand, D., Mazurier, J., Metz-Boutigue, M. H., Jollès, J., Jollès, P., Montreuil, J. et Spik, G. (1984)** Characterization and localization of an iron binding 18kDa glycopeptide isolated from the N-terminal half of human lactotransferrin. Biochim. Biophys. Acta, **787** : 90-96 11
- Legrand, D., Mazurier, J., Montreuil, J. et Spik, G. (1988)** Structure and spatial conformation of the iron-binding sites of transferrins. Biochimie, **70** : 1185-1195 14
- Legrand, D., Mazurier, J., Maes, P., Rochard, E., Montreuil, J. et Spik, G. (1991)** Inhibition of the specific binding of human lactotransferrin to human peripheral blood PHA stimulated lymphocytes by fluorescein labelling and location of the binding site. Biochem. J., **276** : 733-738 82, 87
- Legrand, D., Mazurier, J., Ellass, A., Rochard, E., Vergoten, G., Maes, P., Montreuil, J. et Spik, G. (1992)** Molecular interactions between human lactotransferrin and the phytohemagglutinin-activated human lymphocyte lactotransferrin receptor lie in the two loop-containing regions of the N-terminal domain I of human lactotransferrin. Biochemistry, **31** : 9243-9251 82, 93

- Leibold, E. A. et Munro, H. N. (1988)** Cytoplasmic protein binds in vitro to a highly conserved sequence in the 5' untranslated region of ferritin heavy- and light-subunit mRNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85** : 2171-2175 58
- Leibold, E. A., Laudano, A. et Yu, Y. (1990)** Structural requirements of iron-responsive elements for binding of the protein involved in both transferrin receptor and ferritin mRNA post-transcriptional regulation. Nucleic Acids Res., **18** : 1819-1824 58
- Leibold, E. A. et Guo, B. (1992)** Iron-dependent regulation of ferritin and transferrin receptor expression by the iron-responsive element binding protein. Ann. Rev. Nutr., **12** : 345-368 58, 60
- Leveugle, B. (1992)** Interaction de la lactotransferrine avec les cellules du sang humain. Etude des récepteurs lymphocytaire et plaquettaire. Thèse d'Université, Lille I 1, 77, 78, 82, 85, 87, 95, 107, 109, 107, 183, 190
- Leveugle, B., Mazurier, J., Legrand, D., Mazurier, C., Montreuil, J. et Spik, G. (1993)** Lactotransferrin binding to its platelet receptors inhibits platelet aggregation. Eur. J. Biochem., **213** : 1205-1211 1, 2, 88, 89, 96, 107, 123, 159, 183
- Leveugle, B., Spik, G., Perl, D. P., Bouras, C., Fillit, H. M. et Hof, P. R. (1994)** The iron-binding protein lactotransferrin is present in pathologic lesions in a variety of neurodegenerative disorders : a comparative immunohistochemical analysis. J. Neurochem. 7, 158, 190
- Levin, M. J., Tuil, D., Uzan, G., Dreyfus, J. C. et Kahn, A. (1984)** Expression of the transferrin gene during development of iron hepatic tissues : high level of transferrin mRNA in fetal muscle and adult brain. Biochem. Biophys. Res. Commun., **122** : 212-217 6
- Levine, R. F. et Fedorko, M. E. (1978)** Isolation of intact megakaryocytes from guinea pig femoral marrow. J. Cell Biol., **69** : 159-172 97
- Lima, M. F. et Kierszenbaum, F. (1985)** Lactoferrin effects on phagocytic cell function. J. Immunol., **134** : 4176-4183 94
- Lima, M. F. et Villata, F. (1990)** Trypanosoma cruzi receptors for human transferrin and their role. Mol. Biochem. Parasitol. **38** : 245-252 68

- Lindley, P. F., Bajaj, M., Evans, R.W., Garratt, R. C., Hasnain, S. S., Jhoti, H., Kuser, P., Neu, M., Patel, K., Sarra, R., Strange R. et Walton, A.** (1993) The mechanism of iron uptake by transferrins : the structure of an 18 kDa NII-domain fragment from duck ovotransferrin at 2.3 Å resolution. *Acta Cryst.*, **D49** : 292-304 14
- Liu, Y. et Teng, C. T.** (1991) Characterization of estrogen-responsive mouse lactoferrin promoter. *J. Biol. Chem.*, **266** : 21880-21885 23, 31
- Liu, Y. et Teng, C.T.** (1992) Estrogen module of the mouse lactoferrin gene contains overlapping chicken ovalbumin up-stream promoter transcription factor and estrogen receptor-binding elements. *Mol. Endocr.*, **6** : 355-364 31, 32
- Liu, Y., Yang, N. et Teng, C. T.** (1993) COUP-TF acts as a competitive repressor for estrogen receptor mediated activation of the mouse lactoferrin gene. *Mol. Cell. Biol.*, **13** : 1836-1846 31
- Loh, T. T., Higuchi, D. A., Van Bockxmeer, F. M., Smith, C. H. et Brown, E. B.** (1980) Transferrin receptors on the human placental microvillus membrane. *J. Clin. Invest.*, **65** : 1182-1191 39
- Lomax, K. J., Gallin, J. I., Rotrosen, D., Raphael, G. D., Kaliner, M. A., Benz, E. J., Boxer, L. A. et Malech, H. L.** (1989) Selective defect in myeloid cell lactoferrin gene expression in neutrophil specific granule deficiency. *J. Clin. Invest.*, **83** : 514-519 30
- Löster, K. et Gottschall, K.** (1991) High-Performance-Affinity-Chromatography mit Con A-Perlcclulose. *BIOforum*, **11** : 442-443 130
- Louache, F., Testa, U., Pelicci, P., Thomopoulos, P., Titeux, M. et Rochant, H.** (1984) Regulation of transferrin receptors in human hematopoietic cell lines. *J. Biol. Chem.*, **259** : 11576-11582 58
- Lozzio, B. B., Lozzio, C. B., Bamberger, E. G. et Feliu, A. S.** (1981) A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin (41106). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **166** : 546-550 100
- Lu, Y., Cox, L. A., Herbert, D. C., Weaker, F. J., Walter, C. A. et Adrian, G. S.** (1992) Expression of chimeric human transferrin-chmoramphenicol acetyltransferase genes in liver and brain of transgenic mice during development. *Devel. Biol.*, **155** : 452-458 24
- Luk, C. K.** (1971) Study of the nature of metal binding sites and estimate of the distance between the metal binding sites in transferrin using trivalent lanthanide ions. *Biochemistry*, **10** : 2838-2843 16

- Lum, J. B., Infante, A. J., Makker, D. M., Yang, F. et Bowman, B. H.** (1986) Transferrin synthesis by inducer T lymphocytes. J. Clin. Invest., **77** : 841-849 6
- Luqmani, Y. A., Campbell, T. A., Bennett, C., Coombes, R. C. et Paterson, L. M.** (1991) Expression of lactoferrin in human stomach. Int. J. Cancer, **49** : 684-687 7
- Lydon, J. P., O'Malley, B. R., Saucedo, O., Lee, T., Headon, D. R. et Conneely, O. M.** (1992) Nucleotide and primary amino acid sequence of porcine lactoferrin. Biochim. Biophys. Acta, **1132** : 97-99 8, 9, 11
- Maione, T. E., Gray, G. S., Petro, J., Hunt, A. J., Donner, A. L., Bauer, S. I., Carson, H. F. et Sharpe, J.** (1990) Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. Science, **247** : 77-79 103
- Makino, Y. et Kawanishi, E.** (1991) High-performance liquid chromatography separation of human apotransferrin and monoferric and diferric transferrins. J. Chromat., **567** : 248-253 15
- Makino, Y. et Nishimura, S.** (1992) High-performance liquid chromatographic separation of human apolactoferrin and monoferric and diferric lactoferrins. J. Chromat., **579** : 346-349 15
- Maneva, A. I., Sirakov, L. M. et Manev, V. V.** (1983) Lactoferrin binding to neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. Int. J. Biochem., **15** : 981-984 77
- Maneva, A., Taleva, B., Manev, V. et Sirakov, L.** (1993) Lactoferrin binding to human platelets. Int. J. Biochem., **25** : 707-712 184,191
- Marguerie, G., Denarier, E., Prandini, M. H., Martin, F., Schweitzer, A., Thevenon, D., Roullot, V., Berthier, R. et Uzan, G.** (1991) Gene regulation in megakaryocyte. Nouv. Rev. Fr. Hematol., **33** : 517-520 99
- Markowetz, B., Van Snick, J. et Masson, P. L.** (1979) Binding and ingestion of human lactoferrin by mouse alveolar macrophages. Thorax, **34** : 209-212 79
- Markus, H. S.** (1989) Diagnostic investigations in the elderly : the clinical usefulness of serum iron and transferrin measurements in the diagnosis of iron deficiency anaemia. An audit. Br. J. Clin. Pract., **43** : 451-453 24
- Martell, L. A., Agrawal, A., Ross, D. A. et Muraszko, K. M.** (1993) Efficacy of transferrin receptor-targeted immunotoxins in brain tumor cell lines and pediatric brain tumors. Cancer Res., **53** : 1348-1353 54

- Martin, R. B., Savory, J., Brown, S., Bertholf, R. L., Wills, M. R.** (1987) Transferrin binding of Al³⁺ and Fe³⁺. Clin. Chem., **33** : 405-407 54
- März, L., Hatton, M. W. C., Berry, L. R. et Regoeczi, E.** (1982) The structural heterogeneity of the carbohydrate moiety of desialylated human transferrin. Can. J. Biochem., **60** : 624-630 16, 17
- Mash, D. C., Pablo, J., Flynn, D. D., Efange, S. M. N. et Weiner, W. J.** (1990) Characterization and distribution of transferrin receptors in the Rat brain. J. Neurochem., **55** : 1972-1979 40
- Mason, D. Y. et Taylor, C. R.** (1978) Distribution of transferrin, ferritin, and lactoferrin in human tissues. J. Clin. Pathol., **31** : 316-327 7, 72
- Mason, A. B., Miller, M. K., Funk, W. D., Banfield, D. K., Savage, K. J., Oliver, R. W. A., Green, B. N., Mc Gillivray R. T. A. et Woodworth, R. C.** (1993) Expression of glycosylated and non glycosylated human transferrin in mammalian cells. Characterization of the recombinant proteins with comparison to three available transferrins. Biochemistry, **32** : 5472-5479 34
- Masson, P. L., Heremans, J. F. et Prignot, J.** (1965) Immunohistochem. Localization of the Fe-binding protein lactoferrin in human bronchial glands. Experientia, **21** : 604-605 6
- Masson, P. L., Heremans, J. F. et Schonne, E.** (1969) Lactoferrin an iron binding protein in neutrophilic leukocytes. J. Exp. Med., **130** : 643-658 1, 7
- Masson, P. L.** (1970) La lactoferrine protéine des sécrétions externes et des leucocytes neutrophiles. in collection "Medico-Monographies d'agrégés" Arsacia Ed, 93-165 7
- Matsumoto, A., Yoshima, H., Takasaki, S. et Kobata, A.** (1982) Structural study of the sugar chains of human lactoferrin : finding of four novel complex type asparagine-linked sugar chains. Biochem.J., **91** : 143-155 19
- Mattia. E. K., Rao, K., Shapiro, H. H., Sussman, H. H. et Klausner, R. D.** (1984) Biosynthetic regulation of the human transferrin receptor by deferoxamine in K562 cells. J. Biol. Chem., **259** : 2689-2692 58
- May, W. S. et Tyler, G.** (1987) Phosphorylation of the surface transferrin receptor stimulates receptor internalization in HL60 leukemic cells. J. Biol. Chem., **262** : 16710-16718 46

- Mazoyer, E., Levy-Toledano, S., Rendu, F., Hermant, L., Lu, H., Fiat, A. M., Jollès, P. et Caen, J. (1990)** KRDS, a new peptide derived from human lactotransferrin, inhibits platelet aggregation and release reaction. Eur. J. Biochem., 194 : 43-49 88
- Mazurier, J. et Spik, G. (1980)** Comparative study of the iron-binding properties of human transferrins. Complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactotransferrin. Biochim. Biophys. Acta, 629 : 399-408 15, A1
- Mazurier, J., Leger, D., Tordera, V., Montreuil, J. et Spik, G. (1981)** Comparative studies of the iron binding properties of transferrins. Differences in the involvement of histidine residues as revealed by carbethoxylation. Eur. J. Biochem., 119 : 537-543 15
- Mazurier, J., Metz-Boutigue, M. H., Jollès, J., Spik, G., Montreuil, J. et Jolles, P. (1983)** Human lactotransferrin : molecular, functional and evolutionary comparisons with human serum transferrin and hen ovotransferrin. Experientia, 39 : 135-141 11
- Mazurier, J., Lhoste, J. M., Montreuil, J. et Spik, G. (1983b)** Comparative study of the iron binding properties of human transferrins. Biochim. Biophys. Acta, 745 : 44-49 16
- Mazurier, J., Montreuil, J. et Spik, G. (1985)** Visualization of lactotransferrin brush-border receptors by ligand-blotting. Biochim. Biophys. Acta, 821 : 453-460 1, 72, 73, 74
- Mazurier, J., Legrand, D., Hu, W. L., Montreuil, J. et Spik, G. (1989)** Expression of human lactotransferrin receptors in phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes. Isolation of the receptors by antiligand-affinity chromatography. Eur. J. Biochem., 179 : 481-487 1, 82, 84, 94, 107, 183, 188
- Mc Abee, D. D. et Esbensen, K. (1991)** Binding and endocytosis of apo- and holo-lactoferrin by isolated rat hepatocytes. J. Biol. Chem., 266 : 23624-23631 70
- Mc Clelland, A., Kühn, L. C. et Ruddle, F. H. (1984)** The human transferrin receptor gene : genomic organization, and the complete primary structure of the receptor deduced from a cDNA sequence. Cell, 39 : 267-274 42, 43, 55
- Mc Combs, J. L., Teng, C. T., Pentecost, B. T., Magnuson, V. L., Moore, C. M. et Mc Gill, J. R. (1988)** Chromosomal localization of human lactotransferrin gene (LTF) by in situ hybridization. Cytogenet. Cell. Genet., 47 : 16-17 23

- Mc Gillivray, R. T. A., Mendez, E., Shewale, J. G., Sinha, S. K., Lineback-Zins, J. et Brew, K. (1983)** The primary structure of human serum transferrin. The structures of seven cyanogen bromide fragments and the assembly of the complete structure. *J. Biol. Chem.*, **258** : 3543-3553 7, 10, 16
- Mc Graw, T. E., Dunn, K. W. et Maxfield, F. R. (1988)** Phorbol ester treatment increases the exocytic rate of the transferrin receptor recycling pathway independent of serine-24 phosphorylation. *J. Cell. Biol.*, **106** : 1061-1066 46
- Mc Graw, T. E., Pytowski, B., Arzt, J. et Ferrone, C. (1991)** Mutagenesis of the human transferrin receptor : two cytoplasmic phenylalanines are required for efficient internalization and a second-site mutation is capable of reverting an internalization-defective phenotype. *J. Cell. Biol.*, **112** : 853-861 50
- Mc Gregor, S. J., Naves, M. L., Birly, A. K., Russell, N. H., Halls, D., Junor, B. J. R. et Brock, J. H. (1991)** Interaction of aluminium and gallium with human lymphocytes : the role of transferrin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1095** : 196-200 54
- Mc Kenna, W. R., Mickelsen, P. A., Sparling, P. F. et Dyer, D. W. (1988)** Iron uptake from lactoferrin and transferrin by *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.*, **56** : 785-791 66
- Mc Knight, G. S., Lee, D. C. et Palmiter, R. D. (1980)** Transferrin gene expression. Regulation of mRNA transcription in chick liver by steroid hormones and iron deficiency. *J. Biol. Chem.*, **255** : 148-153 26, 27
- Mead, P. E. et Tweedy, J. W. (1990)** cDNA and protein sequence of bovine lactoferrin. *Nucleic Acids Res.*, **18** : 7167 8
- Menozzi, F. D., Gantiez, C. et Locht, C. (1991)** Identification and purification of transferrin- and lactoferrin-binding proteins of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.*, **59** : 3982-3988 67, 90, 91
- Metz-Boutigue, M. H., Jollès, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J. et Jollès, P. (1984)** Human lactotransferrin : amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur. J. Biochem.*, **145** : 659-676 8, 11, 21, 71
- Mickelsen, P. A., Blackman, E. et Sparling, P. F. (1982)** Ability of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, and commensal *neisseria* species to obtain iron from lactoferrin. *Infect. Immun.*, **35** : 915-920 89, 90
- Mietzner, T. A., Luginbuhl, G. H., Sandstrom, E. et Morse, S. A. (1984)** Identification of an iron-regulated 37000 dalton protein in the cell envelope of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.*, **45** : 410-416 65

- Mikogami, T.** (1993) Rôle de la lactotransferrine et de son récepteur dans l'absorption intestinale du fer. Thèse d'Université, Lille 72, 74, 76, 95
- Miyazawa, K., Mantel, C., Lu, L., Morrison, D. C. et Broxmeyer, H. E.** (1991) Lactoferrin-lipopolysaccharide interactions: effect on lactoferrin binding to monocyte/macrophage differentiated HL-60 cells. J. Immunol., 146 : 723-729 78
- Modun, B. et Williams, P.** (1992) Characterisation of Staphylococcal transferrin-binding proteins. Abstracts of the American Science and Microbiology. 92nd annual meeting of the American Society for Microbiology. New Orleans. May 1992. American society for microbiology. Washington, 43 67
- Moguilevsky, N., Retegui, L. A., Courtoy, P. J., Castracane, C. E. et Masson, P. L.** (1984) Uptake of lactoferrin by the liver. III- Critical role of the protein moiety . Lab. Invest., 50 : 335-340 70, 80
- Moguilevsky, N., Courtoy, P. J. et Masson, P. L.** (1985) Study of lactoferrin binding sites at the surface of blood monocytes. in "Proteins of Iron Storage and Transport", Spik G, Montreuil J, Crichton RR et Mazurier J eds, Elsevier Amsterdam, 199-202 79
- Moguilevsky, N.** (1987) La lactoferrine : interaction avec le système réticuloendothélial en relation avec le métabolisme du fer. Thèse de doctorat Biochimie, Lille 70
- Monté, D., Wietzerbin, J., Pancré, V., Merlin, G., Greenberg, S. M., Kusnierz, J. P., Capron, A. et Auriault, C.** (1991) Identification and characterization of a functional receptor for interferon- γ on a megakaryocytic cell line. Blood, 78 : 2062-2069 102
- Montreuil, J. et Mullet, S.** (1960) Isolement d'une lactosidérophiline du lait de Femme. C. R. Acad. Sci. Paris, 250 : 1736-1737 1, 5
- Montreuil, J., Tonnelat, J. et Mullet, S.** (1960) Préparation et propriétés de la lactosidérophiline (lactotransferrine) du lait de Femme. Biochim. Biophys. Acta, 45 : 413-421 1, 5, 6, 15
- Morgan, E. H.** (1968) Plasma protein turnover and transmission to the milk in the rat. Biochim. Biophys. Acta, 154 : 478-487 6
- Morgan, E. H.** (1981) Inhibition of reticulocyte iron uptake by NH_4Cl and CH_3N_2 . Biochim. Biophys. Acta, 642 : 119-134 46
- Morgan, E. H. et Baker, E.** (1988) Role of transferrin receptors and endocytosis in iron uptake by hepatic and erythroid cells. Ann. N. Y. Acad. Sci., 526 : 65-82 48

- Morishita, Y., Kataoka, T., Towatari, M., Ito, T., Inove, H., Ogura, M., Morishima, Y. et Saito, H. (1990)** Up-regulation of transferrin receptor gene expression by granulocyte colony-stimulating factor in human myeloid leukemia cells. Cancer Res., 50 : 7955-7961 61
- Morris, C. M., Candy, J. M., Bloxham, C. A. et Edwardson, J. A. (1992a)** Distribution of transferrin receptors in relation to cytochrome oxidase activity in the human spinal cord, lower brainstem and cerebellum. J. Neurol. Sci., 111 : 158-172 40
- Morris, C. M., Candy, J. M., Bloxham, C. A. et Edwardson, J. A. (1992b)** Immunocytochemical localisation of transferrin in the human brain. Acta Anatomica, 143 : 14-18 6
- Morris, C. M., Candy, J. M., Oakley, A. E., Bloxham, C. A. et Edwardson, J. A. (1992c)** Histochemical distribution of non-haem iron in th human brain. Acta Anatomica, 144 : 235-257 145
- Morton, D. J. et Williams, P. (1990)** Siderophore-independent acquisition of transferrin-bound iron by *Haemophilus influenzae* type b. J. Gen. Microbiol., 136 : 927-933 64
- Moskaitis, J. E., Pastori, R. L. et Schoenberg, O. R. (1990)** The nucleotide sequence of *Xenopus laevis* transferrin mRNA. Nucleic Acids Res., 18 : 6135 8
- Mullner, E. W., Neupert, B. et Kühn, L. C. (1989)** A specific mRNA binding factor regulates the iron-dependent stability of cytoplasmic transferrin receptor mRNA. Cell, 58 : 373-382 58
- Muta, K., Nishimura, J., Ideguchi, H., Unemura, T. et Ibayashi, H. (1987)** Erythroblast transferrin receptors and transferrin kinetics in iron deficiency and various anemias. Am. J. Hematol., 25 : 155-163 38, 61
- Naidu, A. S., Miedzobrodzki, J., Musser, J. M., Rosdahl, V. T., Hedström, S. A. et Forsgren, A. (1991)** Human lactoferrin binding in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol., 34 : 323-328 91
- Naidu, A. S., Andersson, M. et Forsgren, A. (1992)** Identification of a human lactoferrin-binding protein in *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol., 36 : 177-183 90
- Naidu, S. S., Erdei, J., Czirok, E., Kalfas, S., Gado, L., Thoren, A., Forsgren, A. et Naidu, A. S. (1991)** Specific binding of lactoferrin to *Escherichia coli* isolated from human intestinal infactions. APMIS, 99 : 1142-1150 90, 91

- Navarro, S., Devili, N., Le Cuedic, J. P., Klein, B., Breton-Gorius, J., Doly, J. et Vainchenker, W.** (1991) Interleukin-6 and its receptor are expressed by human megakaryocytes : in vitro effects on proliferation and endoreplication. Blood, **77** : 461-471 186
- Neckers, L. M. et Cossman, J.** (1983) Transferrin receptor induction in mitogen stimulated human T lymphocytes is required for DNA synthesis and cell division and is regulated by interleukin 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80** : 3494-3498 56
- Neckers, L. M.** (1991) Regulation of transferrin receptor expression and control of cell growth. Pathobiology, **59** : 11-18 53
- Neefjes, J. J., Verkerk, J. M. H., Broxterman, H. J. G., Van der Marel, G. A., Van Boom, J. H. et Ploegh, H. L.** (1988) Recycling glycoproteins do not return to the cis-Golgi. J. Cell. Biol., **107** : 79-87 43
- Neefjes, J. J., Hengeveld, T., Tol, O. et Ploegh, H. L.** (1990) Intracellular interactions of transferrin and its receptor during biosynthesis. J. Cell. Biol., **111** : 1383-1392 39
- Neupert, B., Müllner, E., Rothenberger, S., Seiser, C., Teixeira, S., Thompson, N. A., Emery-Goodman, A. et Kühn, L. C.** (1991) Expression of human transferrin receptor. Curr. Stud. Hematol. Blood Transf., **58** : 109-114 37
- Newbold, R. R., Teng, C. T., Beckman, W. C., Jefferson, W. N., Hanson, R. B., Miller, J. V. et Mc Lachlan, J. A.** (1992) Fluctuations of lactoferrin protein and messenger ribonucleic acid in the reproductive tract of the mouse during estrous cycle. Biology of reproduction, **47** : 903-915 33
- Newman, R., Schneider, C., Sutherland, R., Vodinelech, L. et Greaves, M.** (1982) The transferrin receptor. Trends Biochem. Sci., **7** : 397-400 37
- Nikaido, H.** (1989) Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. Antimicrob. Agents Chemother., **33** : 1831-1836 93
- Norqvist, A., Davies, J., Norlander, L. et Normansk, S.** (1978) The effect of iron starvation on the outer membrane protein composition of *Neisseria gonorrhoeae*. FEMS Microbiol. Lett., **4** : 71-75 65
- Norris, G. E., Baker, H. M. et Baker, E. N.** (1989) Preliminary crystallographic studies on human apolactoferrin in its native and defucosylated forms. J. Mol. Biol., **209** : 329-351 15
- Nurden, A. T. et Caen, J. P.** (1975) Specific roles for platelet surface glycoproteins in platelet function. Nature, **255** : 720-722 104

- Ogunnariwo, J. A. et Schryvers, A. B. (1990)** Iron-acquisition in *Pasteurella haemolytica* : expression and identification of a bovine-specific transferrin receptor. Infect. Immun., **58** : 2091-2097 67
- Ogunnariwo, J. A., Cheng, C., Ford, J. et Schryvers, A. B. (1990)** Response of *Haemophilus somnus* to iron limitation : expression and identification of a bovine-specific transferrin receptor. Microb. Pathog., **9** : 397-406 67
- Ogura, M., Morishima, Y., Ohno, R., Kato, Y., Hirabayashi, N., Nagura, H. et Saito, H. (1985)** Establishment of a novel human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01, with positive philadelphia chromosome. Blood, **66** : 1384-1392 100
- O'Keefe, D. O. et Draper, R. K. (1985)** Characterization of a transferrin-diphtheria toxin conjugate. J. Biol. Chem., **260** : 932-937 53
- Omary, M. B. et Trowbridge, I. S. (1981)** Covalent binding of fatty acid to the transferrin receptor in cultured cells. J. Biol. Chem., **256** : 4715-4718 42
- Orberger, G., Geyer, R., Stirm, S. et Tauber, R. (1992)** Structure of the N-linked oligosaccharides of the human transferrin receptor. Eur. J. Biochem., **205** : 257-267 43, 44, 95
- Oria, R., Alvarez-Hernandez, X., Liveaga, J. et Brock, J. H. (1988)** Uptake and handling of iron from transferrin, lactoferrin and immune complexes by a macrophage cell line. Biochem. J., **252** : 221-225 77
- Ouyang, Q. et Miskimins K. (1992)** A supercoil-dependent structural alteration within the regulatory region of the human transferrin receptor gene. Biochem. Biophys. Res. Comm., **183** : 62-69 56
- Padda, J. S. et Schryvers, A. B. (1990)** N-linked oligosaccharides of human transferrin are not required for binding to bacterial transferrin receptors. Infect. Immun., **58** : 2972-2976 66
- Palmer, H. M., Powell, N. B. L., Ala'Aldeen, D. A., Wilton, J. et Borriello, S. P. (1993)** *Neisseria meningitidis* transferrin-binding protein 1 expressed in *Escherichia coli* is surface exposed and binds human transferrin. FEMS Microbiol. Lett., **110** : 139-146 65
- Pan, B. T., Blostein, R. et Johnston, R. M. (1983)** Loss of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro. Biochem. J., **210** : 37-47 38
- Panaccio, M., Zalcherg, J. R., Thompson, C. H., Leyden, M. J. et McKenzie, P. (1987)** Heterogeneity of the human transferrin receptor and use of antitransferrin receptors antibodies to detect tumors in vivo. Immunol. Cell. Biol., **65** : 461-471 42

- Pardridge, W. M.** (1992) Recent developments in peptide drug delivery to the brain. Pharmacology & Toxicology, 71 : 3-10 53
- Parekh, B. S., Mehta, H. B., West, M. D. et Montelaro, R. C.** (1985) Preparative elution of proteins from nitrocellulose membranes after separation by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem., 148 : 87-92 142
- Park, I., Schaeffer, E., Sidoli, A., Baralle, F. E., Cohen, G. N. et Zakin, M. M.** (1985) Organization of the human transferrin gene : direct evidence that it originated by gene duplication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 : 3149-3153 22
- Parmley, R. T., Barton, J. C. et Conrad, M. E.** (1985) Ultrastructural localization of transferrin, transferrin receptor and iron-binding sites on human placental and duodenal microvilli. Br. J. Haematol., 60 : 81-89 39
- Pattanapanyasat, K. et Hoy, T. G.** (1991) Expression of cell surface transferrin receptor and intracellular ferritin after in vitro stimulation of peripheral blood T lymphocytes. Eur. J. Haematol., 47 : 140-145 40, 94
- Pellicini, P. G., Tabillio, P., Thomopoulos, M., Titieux, M., Vainchenker, W., Rochant, H. et Testa, U.** (1982) Hemin regulates the expression of the transferrin receptors in human hematopoietic cell lines. FEBS Lett., 145 : 350-354 58
- Pelosi, E., Testa, U., Louache, F., Thomopoulos, P., Salvo, G., Samoggia, P. et Peschle, C.** (1986) Expression of transferrin receptors in phytohemagglutinin-stimulated human T-lymphocytes. Evidence for a three-step model. J. Biol. Chem., 261 : 3036-3042 39, 94
- Pentecost, B. T. et Teng, C. T.** (1987) Lactotransferrin is the major estrogen inducible protein of mouse uterine secretions. J. Biol. Chem., 262 : 10134-10139 8, 22, 31
- Peterson, K. M. et Alderete, J. F.** (1984) Iron uptake and increased intracellular enzyme activity follow host lactoferrin binding by *Trichomonas vaginalis* receptors. J. Exp. Med., 160 : 398-410 94
- Petropoulos, I., Augé-Gouillou, C. et Zakin, M. M.** (1991) Characterization of the active part of the human transferrin gene enhancer and purification of two liver nuclear factors interacting with the TGTTTGC motif present in this region. J. Biol. Chem., 266 : 24220-24225 26
- Petropoulos I. et Zakin, M. M.** (1993) Transferrin gene as a model for liver-specific gene expression. Biol. Cell, 77 : 63-65 26

- Phillips, D. R., Charo, I. F., Parise, L. V. et Fitzgerald, L. A. (1988)** 104
The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. Blood, 71 : 831-843
- Phillips, J. L. et Thorbecke, G. J. (1966)** 6
Studies on the serum proteins of chimeras. I-identification and study of the site of origin of donor type serum proteins in Rat-into-Mouse chimeras. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 29 : 553-567
- Pierce, A., Colavizza, D., Benaissa, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J. et Spik, G. (1991a)** 8, 9, 11, 21, 163
Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactoferrin. Eur. J. Biochem., 196 : 177-184
- Pierce, A., Colavizza, D., Benaissa, M., Decottignies, J. P., Coddeville, B., Montreuil, J. et Spik, G. (1991b)** 21
Primary structure of bovine lactoferrin. Xth International Conference on Iron and Iron Proteins, Oxford, 27-31 Juillet
- Pietersz, R. N. I., Reesink, H. W., Huijgens, P. C. et Van Oers M. H. J. (1988)** 106
Preparation of leucocyte-poor platelet concentrates from buffy coats. IV- Clinical evaluation. Vox Sang, 55 : 129-132
- Powell, D. E. B. et Thomas, J. H. (1969)** 24
The iron binding capacity of serum in elderly hospital patients Geront. Clin., 11 : 36-47
- Powell, M. J. et Ogden, J. E. (1990)** 8
Nucleotide sequence of human lactoferrin cDNA. Nucleic Acids Res., 18 : 4013
- Prieels, J. P., Pizzo, S. V., Glasgow, L. R., Paulson, J. C. et Hill, R. L. (1978)** 69
Hepatic receptor that specifically binds oligosaccharides containing fucosyl N-acetylglucosamine linkages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 : 2215-2219
- Princiotta, J. V. et Zapolski, E. J. (1975)** 15
Difference between the two iron binding sites of transferrin. Nature, 255 : 87-88
- Rabellino, E. M., Levene, R. B., Leung, L. L. K. et Nachman, R. L. (1981)** 97, 99
Human megakaryocytes II. Expression of platelet proteins in early marrow megakaryocytes. J. Exp. Med., 154 : 88-100
- Rado, T. A., Bollekens, J., St Laurent, G., Parker, L. et Benz, E. J. (1984)** 7
Lactoferrin biosynthesis during granulocytogenesis. Blood, 64 : 1103-1109
- Rado, T. A., Wei, X. et Benz, E. J. (1987)** 8, 30, 163
Isolation of lactoferrin cDNA from a human myeloid library and expression of mRNA during normal and leukemic myelopoiesis. Blood, 70 : 989-993

- Raha, S., Dosquet, C., Abgrall, J. F., Jolles, P., Fait, A. M. et Caen, J.** (1988) KRDS- a terapeptide derived from lactotransferrin- inhibits binding of monoclonal antibody against glycoprotein IIb-IIIa on ADP-stimulated platelets and megakaryocytes. Blood, 72 : 172-178 187
- Rainard, P.** (1986) Bacteriostasis of *Escherichia coli* by bovine lactoferrin, transferrin and immunoglobulins (IgG1, IgG2, IgM) acting alone or in combinations. Vet. Microbiol., 11 : 103-105 92
- Ralton, J. E., Jackson, H. J., Zanoni, M. et Gleeson, P. A.** (1989) Effect of glycosylation inhibitors and function of the murine transferrin receptor. Eur. J. Biochem., 186 : 637-647 43
- Raman, A., Bhatia, K. L., Singh, T. P., Srinivasan, A., Betzel, C. et Malik, R. C.** (1992) Purification, crystallisation and X-ray diffraction studies of lactotransferrin from Buffalo colostrum. Arch. Biochem. Biophys., 294 : 319-321 11
- Rao, K., Harford, J. B., Rouault, T., Mc Clelland, A., Ruddle, F. K. et Klausner, R. D.** (1986) Transcriptional regulation by iron of the gene for the transferrin receptor. Mol. Cell. Biol., 6 : 236-240 58
- Raso, V. et Basala, M.** (1984) A highly cytotoxic human transferrin-ricin A chain conjugate used to select receptor modified cells. J. Biol. Chem., 259 : 1143-1149 53
- Redhead, K., Hill, T. et Chart, H.** (1987) Interaction of lactoferrin and transferrins with the outer membrane of *Bordetella pertussis* . J. Gen. Microb., 133 : 891-898 90, 91
- Redhead, K., Hill, T. et Chart, H.** (1991) Acquisition of iron from transferrin by *Bordetella pertussis*. FEMS Microbiol. Lett., 77 : 303-308 67
- Reese, J. H., Mc Neal, J. E., Goldenberg, S. L., Redwine, E. A. et Sellers, R. G.** (1992) Distribution of lactoferrin in the normal and inflamed human prostate : an immunohistochemical study. The Prostate, 20 : 73-85 7
- Regoeczi, E., Chondemi, P. A., Debanne, M. T. et Prieels, J. P.** (1985) Lactoferrin catabolism in the rat liver. Am. J. Physiol., 248 : G8-G14 70
- Retegui, L. A., Moguilevsky, N., Castracane, C. F. et Masson, P. L.** (1984) Uptake of lactoferrin by the liver. I- Role of the reticuloendothelial system as indicated by blockade experiments. Lab. Invest., 50 : 323-328 77
- Rey, M. W., Woloshuk, S. L., De Boer, H. A. et Pieper, F. R.** (1990) Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin. Nucleic Acids Res., 18 : 5288 8, 10, 14

- Ricard, M. A., Archibald, F. S. et Niven, D. F.** (1991) Isolation and identification of a putative porcine transferrin receptor from *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 1. J. Gen. Microbiol., **137** : 2733-2740 64
- Richardson, D. R. et Baker, E.** (1990) The uptake of iron and transferrin by the human malignant melanoma cell. Biochim. Biophys. Acta, **1053** : 1-12 48, 94
- Richardson, D. R. et Baker, E.** (1992) Intermediate steps in cellular iron uptake from transferrin. J. Biol. Chem., **267** : 21384-21389 48, 50
- Riederer, P., Dirr, A., Goetz, M., Sofic, E., Jellinger, K. et Youdim M. B. H.** (1992) Distribution of iron in different brain regions and subcellular compartments in Parkinson's disease. Ann. Neurol., **32** : S101-S104 143
- Rimmer, E. F. et Horton, M. A.** (1984) Expression of myeloid-specific antigens on two human erythroleukemia cell lines, HEL and K562. Leuk. Res., **8** : 207-211 100
- Rivat, C., Sertillanges, P., Patin, E. et Stoltz, J. F.** (1992) Single-step method for purification of human transferrin from a by-product of chromatographic fractionation of plasma. J. Chromat.-Biomed. Appl., **576** : 71-77 6
- Roberts, K. P. et Griswold, M. D.** (1990) Characterization of rat transferrin receptor cDNA : the regulation of transferrin receptor mRNA in testes and in sertoli cells in culture. Mol. Endo., **4** : 531-542 42
- Rochard, E., Legrand, D., Mazurier, J., Montreuil, J. et Spik, G.** (1989) The N-terminal domain of human lactotransferrin binds specifically to phytohemagglutinin-stimulated peripheral blood human lymphocyte receptors. FEBS Lett., **255** : 201-204 82
- Rochard, E.** (1992) Etude du mécanisme de l'interaction de la lactotransferrine avec son récepteur membranaire et de sa destinée intracellulaire dans les cellules cancéreuses de glande mammaire. Thèse d'Université, Lille I 85, 87, 107, 123
- Rochard, E., Legrand, D., Lecocq, M., Hamelin, R., Crepin, M., Montreuil, J. et Spik, G.** (1992) Characterization of lactotransferrin receptor in epithelial cell lines from non-malignant human breast, benign mastopathies and breast carcinomas. Anticancer Res., **12** : 2047-2052 1, 85, 107
- Rodriguez, M. H. et Jungery, M.** (1986) A protein on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes functions as a transferrin receptor. Nature, **388** : 391 68

- Rogers, J. et Munro, H. N.** (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 58
- Roiron-Lagroux, D., Amouric, M., Marvaldi, J. et Figarella, C.** (1989) Lactoferrin-binding sites at the surface of HT29-D4 cells . Eur. J. Biochem., 186 : 367-373 72, 74
- Roiron-Lagroux, D. et Figarella, C.** (1990) Evidence for a different mechanism of lactoferrin and transferrin translocation on HT29-D4 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 170 : 837-842 72, 76
- Rokbi, B., Mazarin, V., Maître-Wilmotte, G. et Quentin-Millet, M. J.** (1993) Identification of two major families of transferrin receptors among *Neisseria meningitidis* strains based on antigenic and genomic features. FEMS Microbiol. Lett., 110 : 51-58 65
- Roskams, A. J. et Connor, J. R.** (1990) Aluminium access to the brain : a role for transferrin and its receptor . Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 : 9024-9027 54
- Rothenberger, S., Iacopetta, J. et Khun, L. C.** (1987) Endocytosis of the transferrin receptor requires the cytoplasmic domain but not its phosphorylation site. Cell, 49 : 423-431 42
- Rouault, T. A., Henke, M. W., Caughman, S. W., Harford, J. B. et Klausner, R. D.** (1988) Binding of a cytosolic protein to the iron responsive element of human ferritin mRNA. Science, 241 : 1207-1210 58
- Rouault, T. A., Tang, C. K., Kaptain, S., Burgess, W. H. et Haile, D. J.** (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 58
- Rouault, T. A., Stout, C. D., Kaptain, S., Harford, J. B. et Klausner, R. D.** (1991) Structural relationship between an iron-regulated RNA-binding protein and aconitase : functional implications. Cell, 64 : 881-883 58, 59
- Rutledge, E. A., Mikoryak, C. A. et Draper, R. K.** (1991) Turnover of the transferrin receptor is not influenced by removing most of the extracellular domain. J. Biol. Chem., 266 : 21125-21130 42
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. et Maniatis, T.** (1989) in Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. 162
- Sanchez, L., Calvo, M. et Brock, J. H.** (1992) Biological role of lactoferrin. Archives of disease in childhood, 67 : 657-661 93

- Sarra, R., Garratt, R., Gorinsky, B., Jhoti, H. et Lindley, P. (1990)** 11
High resolution X-ray studies on rabbit serum transferrin : preliminary structure analysis of the N-terminal half-molecule at 2.3A° resolution. Acta Crystallogr.Sect.B, 46 : 763-771
- Sasaki, K., Zak, O. et Aisen, P. (1993)** 48
Antisense suppression of transferrin receptor gene expression in a human hepatoma cell (HuH-7) line. Am. J. Hematol., 42 : 74-80
- Sato, K., Shinmoto, H., Tanimoto, M., Dosko, S. et Nakajima, I. (1990)** 81
Uptake and re-secretion of human lactoferrin by B lymphocytes. Agric. Biol. Chem., 54 : 1275-1279
- Scatchard, G. (1949)** The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann. N. Y. Acad. Sci., 51:660-672 73, 78, 85, 161, 162
- Schade, A. L. et Caroline, L. (1944)** Raw hen egg white and the role of iron in growth inhibition of *Shigella dysenteria*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. Science, 100 : 14-15 5
- Schade, A. L. et Caroline, L. (1946)** An iron binding component of human blood plasma. Science, 104 : 340-341 5
- Schaeffer, E., Park, I., Cohen, G. N. et Zakin, M. M. (1985)** 22
Organization of the human serum transferrin gene. in: Proteins of Iron Storage and Transport, Spik G, Montreuil J, Crichton R, Mazurier J, Eds., , Elsevier amsterdam, 361-364
- Schaeffer, E., Boissier, F., Py, M. C., Cohen, G. N. et Zakin, M. M. (1989)** 25
Cell type-specific expression of the transferrin gene. Role of promoter, negative, and enhancer elements. J. Biol. Chem., 264 : 7153-7160
- Schell, D., Evers, R., Preis, D., Ziegelbauer, K., Kiefer, H., Lottspeich, F., Cornelissen, A. et Ovarath, P. (1991)** 68
A transferrin binding protein of *Trypanosoma brucei* is encoded by one of the genes in the variant surface glycoprotein gene expression site. EMBO J., 10 : 1061-1066
- Schmidt, A. M., Mora, R., Cao, R., Yan, S. D., Brett, J., Ramakrishnan, R., Tsang, T.C., Simionescu, M. et Stern, D. (1994)** 70
The endothelial cell binding site for advanced glycation end products consists of a complex : an integral membrane protein and a lactoferrin-like polypeptide. J. Biol. Chem., 269 : 9882-9888
- Schneider, C., Sutherland, R., Nexman, R. et Greaves, M. (1982)** 40, 42, 45
Structural features of the cell surface receptor for transferrin is recognised by the monoclonal antibody OKT9. J. Biol. Chem., 257 : 8516-8522

- Schneider, C., Owen, M. J., Banville, D. et Williams, J. G. (1984)** Primary structure of human transferrin receptor deduced from mRNA sequence. Nature, **311** : 675-678 42, 43
- Schryvers, A. B. (1988)** Characterisation of the human transferrin receptor and lactoferrin receptors in *Haemophilus influenzae*. Mol. Microbiol., **2** : 467-472 64
- Schryvers, A. B. et Morris, L. J. (1988)** Identification and characterization of the human lactoferrin-binding protein from *Neisseria meningitidis*. Infect. Immun., **56** : 1144-1149 65
- Schryvers, A. B. et Morris, L. J. (1988)** Identification and characterization of the transferrin-receptor from *Neisseria meningitidis*. Mol. Microbiol., **2** : 281-288 90
- Schryvers, A. B. (1989)** Identification of the transferrin and lactoferrin-binding proteins in *Haemophilus influenzae*. J. Med. Microbiol., **29** : 121-130 64, 89, 91
- Schryvers, A. B. et Lee, B. C. (1989)** Comparative analysis of the transferrin and lactoferrin binding proteins in the family *Neisseriaceae*. Can. J. Microbiol., **35** : 409-415 65, 90, 91
- Scurfield, G. et Radley, J. M. (1981)** Aspects of platelet formation and release. Am. J. Hematol., **10** : 285-296 102
- Seghatchian, M. J. et Brozovic, B. (1992)** An overview of current trends in platelet preparation, storage and transfusion. Blood coagulation and fibrinolysis, **3** : 617-620 106
- Seigneurin, D., Champelovier, P., Mouchiroud, G., Berthier, R., Leroux, D., Prenant, M., Mc Gregor, J., Starck, J., Morle, F., Micouin, C., Pietrantuono, A. et Kolodie, L. (1987)** Human chronic myeloid leukemic cell line with positive philadelphia chromosome exhibits megakaryocytic and erythroid characteristics. Exp. Hematol., **15** : 822-832 100
- Shattil, S. J. et Bennett, J. S. (1980)** Platelets and their membranes in haemostasis : physiology and pathophysiology. Ann. Int. Med., **94** : 108-118 104
- Shattil, S. J. et Brass, L. F. (1987)** Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediator. J. Biol. Chem., **262** : 992-1000 104
- Shih, Y. J., Baynes, R. D., Hudson, B. G., Flowers, C. H., Skikne, B. S. et Cook, J. D. (1990)** Serum transferrin is a truncated form of tissue receptor. J. Biol. Chem., **265** : 19077-19081 62

- 63
- Shih, Y. J., Baynes, R. D., Hudson, B. G., Flowers, C. H., Skikne, B. S. et Cook, J. D. (1993)** Characterization and quantitation of the circulating forms of serum transferrin receptor using domain-specific antibodies. Blood, **81** : 234-238
- Shirsat, N. V., Bittenbender, S., Kreider, B. L. et Rovera, G. (1992)** Structure of the murine lactotransferrin gene is similar to the structure of other transferrin-encoding genes and shares a putative regulatory region with the murine myeloperoxidase gene. Gene, **110** : 229-234
- 8
- Shongwe, M. S., Smith, C. A., Ainscough, E. W., Baker, H. M., Brodie, A. M. et Baker, E. N. (1992)** Anion binding by human lactoferrin : results from crystallographic and physicochemical studies. Biochemistry, **31** : 4451-4458
- 14
- Simonsen, C., Brener, D. et De Voe, I. W. (1982)** Expression of a high affinity mechanism for acquisition of transferrin iron by *Neisseria meningitidis*. Infect. Immun., **36** : 107-113
- 66
- Sims, P. J., Faioni, E. M., Wiedmer, T. et Shattil, S. J. (1988)** Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor V and expressed prothrombinase activity. J. Biol. Chem., **263** : 18205-18212
- 104
- Sipe, D. M. et 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
- 48
- Skikne, B. S., Flowers, C. H. et Cook, J. D. (1990)** Serum transferrin receptor : a quantitative measure of tissue iron deficiency. Blood, **75** : 1870-1876
- 62
- Skinner, M. K. et Griswold, M. D. (1980)** Sertoli cells synthesize and secrete a transferrin-like protein. J. Biol. Chem., **255** : 9523-9525
- 6, 25
- Skinner, M. K., Schiltz, S. M. et Tananis, A. C. (1989)** Regulation of sertoli cell differentiated function : testicular transferrin and androgen-binding protein expression . Endocrinology, **124** : 3015-3024
- 28
- Sledge, G. W., Glant, M., Jansen, J., Heerema, N. A., Roth, B. J., Goheen, M. et Hoffman, R. (1986)** Establishment in long term culture of megakaryocytic leukemia cells (EST-IU) from the marrow of a patient with leukemia and a mediastinal germ cell neoplasm. Cancer Res., **46** : 2155-2159
- 100

- Smith, C. A., Anderson, B. F., Baker, H. M. et Baker, E. N. (1992)** 16
Metal substitutions in transferrins : the crystal structure of human copper-lactoferrin at 2.1 Å resolution. Biochemistry, **31** : 4527-4533
- Soda, R. et Tavassoli, M. (1984)** Liver endothelium and not hepatocytes 39
or Kupffer cells have transferrin receptors. Blood, **63** : 270-276
- Soltys, H. D. et Brody, J. I. (1970)** Synthesis of transferrin by human 6
peripheral blood lymphocytes. J. Lab. Clin. Med., **75** : 250-257
- Soukka, T., Tenuovo, J. et Rundegren, J. (1993)** Agglutination of 89
Streptococcus mutans serotype c cells but inhibition of Porphyromonas gingivalis autoaggregation by human lactoferrin. Archs. Oral. Biol., **38** : 227-223
- Southern, E. M. (1975)** Detection of specific sequences among DNA 83
fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., **98** : 503-517
- Soyer, H. P., Smolle, J., Torne, R. et Kerl, H. (1987)** Transferrin 40
receptor expression in normal skin and in various cutaneous tumors. J. Cutan. Pathol., **14** : 1-5
- Spik, G., Bayard, B., Fournet, B., Strecker, G., Bouquelet, S. et 16, 17
Montreuil, J. (1975)** Studies on glycoconjugates. Complete structure of the two carbohydrate units of human transferrin. FEBS. Lett., **50** : 296-299
- Spik, G., Chéron, A., Montreuil, J. et Dolby, J. (1978)** Bacteriostasis 92
of a milk-sensitive strain of E. coli by immunoglobulins and iron binding proteins in association. Immunology, **33** : 663-671
- Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., 19, 20,
Dorland, L., Van Halbeek, H. et Vliegenthart, J. F. G. (1982)** Primary A1
structure of the glycans from human lactotransferrin. Eur. J. Biochem., **121** : 413-419
- Spik G. et Montreuil, J. (1983)** Rôle de la lactotransferrine dans les 93
mécanismes moléculaires de la défense anti-bactérienne. Bull. Europ. Physiopath. Resp., **19** : 123-130
- Spik, G., Coddeville, B., Legrand, D., Mazurier, J., Leger, M., 16, 19,
Goavec, M. et Montreuil, J. (1985a)** A comparative study of the 21
primary structure of glycans from varioussero-, lacto- and ovotransferrins. Role of human lactotransferrin glycans. in 'Proteins of Iron Storage and Transport, Spik G., Montreuil J., Crichton R. R. et Mazurier J. eds, 47-51

- Spik, G., Debruyne, V., Montreuil, J., Van Halbeek, H. et Vliegthart, J. F. G. (1985b)** Primary structure of two sialylated triantennary glycans from human serotransferrin. FEBS. Lett., **183** : 65-69 16
- Spik, G., Coddeville, B. et Montreuil, J. (1988)** Comparative study of the primary structures of sero-, lacto- and ovotransferrin glycans from different species. Biochimie, **70** : 1459-1469 16, 21
- Spik, G., Coddeville, B., Strecker, G., Montreuil, J., Regoeczi, E., Chindemi, P. A. et Rudolph, J. R. (1991)** Carbohydrate microheterogeneity of rat serotransferrin. Eur. J. Biochem., **195** : 397-405 19
- Srivasta, C. H., Rado, T. A., Bauerle, D. et Broxmeyer, H. E. (1991)** Regulation of human bone marrow lactoferrin and myeloperoxidase gene expression by tumor necrosis factor- α . J. Biol. Chem., **146** : 1014-1019 184
- Stearne, P. A., Pieterz, G. A. et Goding, J. W. (1985)** cDNA cloning of the murine transferrin receptor : sequence of trans-membrane and adjacent regions. J. Immunol., **134** : 3475-3479 42
- Stecher, V. J et Thorbecke, G. J (1967)** Site of synthesis of serum proteins. J. Immunol., **99** : 660-668 6
- Steinlein, L. M. et Ikeda, R. A. (1993)** Production of the N-terminal and C-terminal human serum transferrin in *Escherichia coli*. Enzyme Microb. Technol., **15** : 193-199 34
- Steinmann, G., Broxmeyer, H. E., De Harven, E. et Moore, M. A. S. (1982)** Immuno-electro microscopic tracing of lactoferrin, a regulator of myelopoiesis, into a subpopulation of human peripheral blood monocytes. Brit. J. Haematol., **50** : 75-84 78
- Stephens, S., Dolby, J. M., Montreuil, J. et 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 92
- Stevenson, P., Williams, P. et Griffiths, E. (1992)** Common antigenic domains in transferrin-binding protein 2 of *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae* type b. Infect. Immun., **60** : 2391-2396 64
- Stowell, K. M., Rado, T. A., Funk, W. D. et Tweedie, J. W. (1991)** Expression of cloned human lactoferrin in baby-hamster kidney cells. Biochem. J. **276** : 349-355 35

- Sün, I. L., Navas, P., Crane, F., Morré, J. et Löw, H. (1987a)** NADH diferric transferrin reductase in liver plasma membrane. J. Biol. Chem., **262** : 15915-15921 51
- Sün, I. L., Garcia-Canero, R. et Liu, W. (1987b)** Diferric transferrin reduction stimulates the Na⁺/H⁺ antiport HeLa. Biochem. Biophys. Res. Commun., **145** : 467-473 51
- Sün, I. L., Toole-Simms, W., Crane, F. L., Morré, D. J., Löw, H. et Chou, J. Y. (1988)** Reduction of diferric transferrin by SV40 transformed pineal cells stimulates Na⁺/H⁺ antiport activity. Biochim. Biophys. Acta, **938** : 17-23 51
- Sün, I. L., Crane, F. L., Morré, J., Löw, H. et Faulk, P. (1991)** Lactoferrin activates plasma membrane oxidase and Na⁺/H⁺ antiport activity. Biochem. Biophys. Res. Commun., **176** : 498-504 87
- Szewczyk, B. et Summers, D. F. (1988)** Preparative elution of proteins blotted to immobilon membranes. Anal. Biochem. **168** : 48-53 142
- Szewczyk, B., Laver, W. G. et Summers, D. F. (1988)** Purification, thioredoxin renaturation, and reconstituted activity of the three subunits of the influenza A virus RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85** : 7907-7911 142
- Szewczyk, B. et Summers, D. F. (1992)** Efficient elution of purified proteins from polyvinylidene difluoride membranes (immobilon) after transfer from SDS-PAGE and their use as immunogens in "Methods in Molecular Biology : Immunochemical Protocols" vol 10, Manson M. ed., The Humana Press Inc., Totowa, NJ 133,189
- Tabilio, A., Pellicci, P. G., Vinci, G., Mannoni, P., Civin, C. L., Vainchenker, W., Testa, U., Lipinski, M., Rochant, H. et Breton-Gorius, J. (1983)** Myeloid and megakaryocytic properties of K-562 cell lines. Cancer Res., **43** : 4569-4574 100
- Tabilio, A., Rosa, J. P., Testa, U., Kieffer, N., Nurden, A., T., Del Canizo, M. C., Breton-Gorius, J. et Vainchenker W. (1984)** Expression of platelet membrane glycoproteins and α -granule proteins by human erythroleukemia cell line (HEL). EMBO J., **3** : 453-459 100
- Tanner, L. I. et Lienhard, G. E. (1987)** Insulin elicits a redistribution of transferrin receptors in 3T3-L1 adipocytes through an increase in the rate constant for receptor externalization. J. Biol. Chem., **262** : 8975-8980 61
- Tavassoli, M. et Aoki, M. (1981)** Migration of entire megakaryocytes through the marrow-blood barrier. Br. J. Haematol., **48** : 25-29 103

- Teixeira, S. et Kühn, L. C. (1991)** Post-transcriptional regulation of the transferrin receptor and 4F2 antigen heavy chain mRNA during growth activation of spleen cells. Eur. J. Biochem., **202** : 819-826 56, 57
- Teng, C. T., Walker, M. P., Bhattacharyya, S. N., Klapper, D. G., Di-Augustine, R. P. et Mc Lachlan, J. A. (1986)** Purification and properties of an oestrogen-stimulated mouse uterine glycoprotein (approx 70kDa). Biochem. J., **240** : 413-420 31
- Teng, C. T., Pentecost, B. T., Marshall, A., Salomon, A., Bowman, B., Lalley, P. et Naylor, S. (1987)** Assignment of the lactotransferrin gene to human chromosome 3 and to mouse chromosome 9. Somat. Cell. Mol. Genet., **13** : 689-693 23
- Teng, C. T., Pentecost, P. T., Chen, Y. H., Newbold, R. R., Eddy, E. M. et Mc Lachlan, J. A. (1989)** Lactoferrin gene expression in the mouse uterus and mammary gland. Endocrinology, **124** : 992-999 31
- Teng, C. T., Liu, Y., Walmer, D. et Panella, T. (1992)** Differential molecular mechanism of the estrogen action that regulates lactoferrin gene in human and mouse. Mol. End., **6** : 1969-1981 33
- Testa, U. (1985)** Transferrin receptors : structure and function. in: Hematology, Piomelli S, Yachnin S, Eds., Vol 5, Alan R Liss inc, 127-161 37
- Testa, U., Pelosi, E. et Peschle, C. (1993)** The transferrin receptor. Crit. Rev. Oncogenesis, **4** : 241-276 37, 41
- Tetteroo, P. A. T., Massaro, F., Mulder, A., Schreuder-Van Gelder, R. et Von dem Borne, A. E. G. K. (1984)** Megakaryoblastic differentiation of proerythroblastic K-562 cell-line cells. Leukemia Research, **8** : 197-206 100
- Theil, E. C. (1993)** The IRE (iron regulatory element) family : structures which regulate mRNA translation or stability. BioFactors, **4** : 87-93 58
- Thomas, P. S. (1980)** Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77** : 5201-5205 162
- Thorstensen, K. (1988)** Hepatocytes and reticulocytes have different mechanisms for the uptake of iron from transferrin. J. Biol. Chem., **263** : 16837-16841 48, 51, 52
- Thorstensen, K. et Romslo, I. (1988)** Uptake of iron from transferrin by isolated rat hepatocytes. J. Biol. Chem., **263** : 8844-8850 51, 52
- Thorstensen, K. et Romslo, I. (1990)** The role of transferrin in the mechanism of cellular iron uptake. Biochem. J., **271** : 1-10 48, 51

- Thorstensen, K. et Romslo, I. (1993)** The transferrin receptor: its diagnostic value and its potential as therapeutic target. Scand. J. Clin. Invest., **53** : 113-120 53
- Tigyi, Z., Kishore, A. R., Maeland, J. A., Forsgren, A. et Naidu, S. (1992)** Lactoferrin-binding proteins in *Shigella flexneri*. Infect. Immun., **60** : 2619-2626 92
- Tourville, D. R., Ogra, S. S., Lippes, J. et Tomasi, T. B. (1970)** The human female reproductive tract : immunohistological localization of gamma A, gamma G, gamma M secretory "piece" and lactoferrin. Am. J. Obstet. Gynecol., **108** : 1102-1108 7
- Towbin, H., Staehelin, T. et Gordon, J. (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76** : 4350-4354 A4
- Trapp, G. A. (1983)** Plasma aluminium is bound to transferrin. Life Sci., **33** : 311-316 54
- Trinder, D., Morgan, E. et Baker, E. (1986)** The mechanism iron uptake by fetal rat hepatocytes in culture. Hepatology, **6** : 852-858 48
- Tripathi, R. C., Kolli, S. P., Borisuth, N. S. C. et Tripathi, B. J. (1992)** Identification and quantification of transferrin receptors on trabecular cells. Invest. Ophthalmol. Visual Sci., **33** : 3449-3454 40
- Trowbridge, E. A. (1990)** The circulating megakaryocyte, platelet volume heterogeneity and thrombopoiesis. in Platelet heterogeneity. Biology and Pathology, Martin J; et Trowbridge A; eds, 155-183 192
- Trowbridge, I. S. et Omary, M. B. (1981)** Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78** : 3039-3043 56
- Trowbridge, I. S., Newman, R. A., Domingo, D. L. et Sauvage, C. (1984)** Transferrin receptor : structure and function. J. Biol. Chem., **253** : 3771-3774 37
- Trowbridge, I. S. (1988)** Transferrin receptor as a potential therapeutic target. Monoclonal antibody therapy prog allergy, **45** : 121-146 53
- Trowbridge, I. S., Collawn, J., Jing, S., White, S., Esekogwu, V. et Stangel, M. (1991)** Structure-function analysis of the human transferrin receptor : effects of anti-receptor monoclonal antibodies on tumor growth. Curr. Stud. Hematol. Blood Transf., **58** : 139.147 37, 53

- Trowbridge, I. S. et Collawn, J. F. (1992)** Structural requirements for high efficiency endocytosis of the human transferrin receptor. J. Inorg. Biochem., **47** : 209-217 51
- Tsuji, Y., Miller, L. L., Miller, S. C., Torti, S. V. et Torti, F. M. (1991)** Tumor necrosis factor- α and interleukin 1- α regulate transferrin receptor in human diploid fibroblasts. J. Biol. Chem., **266** : 7257-7261 61
- Tsunoo, H. et Sussman, H. H. (1983a)** Characterization of transferrin binding and specificity of the placental transferrin receptor. Arch. Biochem. Biophys., **225** : 42-54 45
- Tsunoo, H. et Sussman, H. H. (1983b)** Placental transferrin receptor. J. Biol. Chem., **258** : 4118-4122 45
- Tsutsumi, M., Shimer, M. K. et Sanders-Bush, E. (1989)** Transferrin gene expression and synthesis by cultured choroid plexus epithelial cells. J. Biol. Chem., **264** : 9626-9631 29
- Tuil, D., Vaulont, S., Levin, M. J., Munnich, A., Moguilewsky, A., Bouton, M. M., Brissot, P., Dreyfus, J. C. et Kahn, A. (1985)** Transient transcriptional inhibition of the transferrin gene by cyclic AMP. FEBS Lett., **189** : 310-314 27, 28
- Turk, D. C. (1984)** The pathogenicity of *Haemophilus influenzae*. J. Med. Microbiol., **18** : 1-16 64
- Turkewitz, A. P. et Harrison, S. C. (1989)** Concentration of transferrin receptor in human placental coated vesicles. J. Cell. Biol., **108** : 2127-2135 48
- Uzan, G., Frain, M., Park, I., Besmond, C., Maessen, G., Sala Trepat, J. et Zakin, M. M. et Kahn, A. (1984)** Molecular cloning and sequence analysis of cDNA human transferrin. Biochem. Biophys. Res. Commun., **119** : 273-281 7
- Valtieri, M., Tweardy, D. J., Caracciolo, D., Johnson, K., Mavilio, F., Altmann, S., Snatoli, D. et Rovera, G. (1987)** Regulation of proliferative and differentiative responses in a murine progenitor cell line. J. Immunol., **138** : 3829-3835 30
- Van Brunt, J. (1988)** Fungi, the perfect hosts?. Biotechnology, **4** : 1057-1062 35
- Vanderpuye, O. A., Kelley, L. K. et Smith, C. H. (1986)** Transferrin receptors in the basal plasma membrane of the human placental syncytiotrophoblast. Placenta, **7** : 391-403 39

- Vandewalle, B., Granier, A. M., Peyrat, J. P., Bonneterre, J. et Lefebvre, J. (1985)** Transferrin receptors in cultured breast cancer cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **110** : 71-76 47
- Van Dijk, M. C. M., Ziere, G. J., Boers, W., Linthorst, C., Bijsterbosch, M. et Van Berkel, T. J. C. (1991)** Recognition of chylomicron remnants and migrating very-low-density lipoprotein, by the remnant receptor of parenchymal liver cells is distinct from the liver 2-macroglobulin-recognition site. *Biochem. J.*, **279** : 863-870 71
- Van Eijk, H. G. et Van Noort, W. L. (1992)** The analysis of human serum transferrins with the PhastSystem : quantitation of microheterogeneity. *Electrophoresis*, **13** : 354-358 15
- Van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegenthart, J. F. G., Spik, G., Cheron, A. et Montreuil, J. (1981)** Structure determination of two oligomannoside-type glycopeptides obtained from bovine lactotransferrin, by 500 Mhz ¹H-NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **675** : 293-296
- Van Snick, J. L., Masson, P. L. et Heremans, J. F. (1974)** The involvement of lactoferrin in the hyposideremia of acute inflammation. *J. Exp. Med.*, **140** : 1068-1084 7
- Van Snick, J. L. et Masson, P. L. (1976)** The binding of human lactoferrin to mouse peritoneal cells. *J. Exp. Med.*, **144** : 1568-1580 79
- Van Snick, J. L., Markowitz, B. et Masson, P. L. (1977)** The ingestion and digestion of human lactoferrin by mouse peritoneal macrophages and the transfer of its iron into ferritin. *J. Exp. Med.*, **146** : 817-827 78
- Van Vugt, H., Van Gool, J., Ladiges, N. C. J. J. et Boers, W. (1975)** Lactoferrin in rabbit bile : its relation to iron metabolism. *Q. J. Exp. Physiol.*, **60** : 79-88 72
- Vinci, G., Tabilio, A., Deschamps, J. F., Van Haecke, D., Henri, A., Guichard, J., Tetteroo, P., Lansdorp, P. M., Hercend, T., Vainchenker, W. et Breton-Gorius J. (1984)** Immunological study of in vitro maturation of human megakaryocytes. *Br. J. Haematol.*, **56** : 589-605 97, 187
- Visca, P., Dalmastri, C., Verzili, D., Antonini, G., Chiancone, E. et Valenti, P. (1990)** Interaction of lactoferrin with Escherichia coli cells and correlation with antibacterial activity. *Med. Microbiol. Immunol.*, **179** : 323-333 92
- Vittet, D., Matthieu, M. N., Launay, J. M. et Chevillard, C. (1992)** Platelet receptor expression on three human megakaryoblast-like cell lines. *Exp. Hematol.*, **20** : 1129-1134 102

- Vora, A., Stunz, L. L., Kemp, J. D. et Ashman, R. F. (1990)** Two mechanisms of transferrin receptor induction by anti-Ig in B cells. J. Immunol., **145** : 2099-2104 40
- Voyiatzaki, C. S. et Soteriadou, K. P. (1990)** Evidence of transferrin binding sites on the surface of *Leishmania promastigotes*. J. Biol. Chem., **265** : 22380-22385 68
- Wado, H. G., Hass, P. E. et Sussman, H. H. (1979)** Transferrin receptor in human placental brush border membranes. J. Biol. Chem., **254** : 12629-12635 45
- Wagner, E., Zenke, M., Cotten, M., Beug, H. et Birnstiel, M. L. (1990)** Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87** : 3410-3414 54
- Walmer, D. K., Wrona, M. A., Hughes, C. L. et Nelson, K. G. (1992)** Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle : correlation with circulating estradiol and progesterone. Endocrinology, **131** : 1458-1466 33
- Wang, Y., Chen, J., Luo, Y., Funk, W. D., Mason, A. B., Woodworth, R. C., Mc Gillivray, R. T. A. et Brayer, G. D. (1992)** Preliminary crystallographic analyses of the N-terminal lobe of recombinant human serum transferrin. J. Mol. Biol., **227** : 575-576 11
- Ward, J. H., Kushner, J. P. et Kaplan, J. (1982)** Regulation of HeLa cell transferrin receptors. J. Biol. Chem., **257** : 10317-10323 47, 58
- Ward, J. H. (1987)** The structure, function and regulation of transferrin receptors. Invest. Radiol., **22** : 74-83 37
- Ward, P. P., Lo, J. Y., Duke, M., May, G. S., Headon, D. R. et Conneely, O. M. (1992a)** Production of biologically active recombinant lactoferrin in *Aspergillus oryzae*. Biotechnology, **10** : 784-789 35
- Ward, P. P., May, G. S., Headon, D. R. et Conneely, O. M. (1992b)** An inducible expression system for the production of human lactoferrin in *Aspergillus nidulans*. Gene, **122** : 219-223 35
- Webster, P. et Crab, D. J. (1988)** Intracellular colocalization of variant surface glycoprotein and transferrin-gold in *Trypanosoma brucei*. J. Cell. Biol., **106** : 279-288 68
- Weinberg, E. D. (1984)** Iron withholding : a defense against infection and neoplasia. Physiol. Rev., **65** : 102 108 46

- West, S. E. H. et Sparling, P. F. (1985)** Response of *Neisseria gonorrhoeae* to iron limitation : alterations in expression of membrane proteins without apparent siderophore production. Infect. Immun., **47** : 388-394 65
- Williams, N. et Levine, R. F. (1982)** The origin, development and regulation of megakaryocytes. Br. J. Hematol., **52** : 173-180 97
- Williams, N., De Giorgio, T., Banu, N., Withy, R., Hirano, T. et Kishimoto, T. (1990)** Recombinant IL-6 stimulates immature murine megakaryocytes. Exp. Hematol., **18** : 69-72 186
- Williams, P. et Griffiths, E. (1992)** Bacterial transferrin receptors-structure, function and contribution to virulence. Med. Microbiol. Immunol., **181** : 301-322 64, 94
- Wilton, J., Ala'Aldeen, D., Palmer, H. M. et Borriello, S. P. (1993)** Cloning and partial sequence of transferrin-binding protein 2 of *Neisseria meningitidis* using a novel method : Twin N-terminal PCR. FEMS Microbiol. Lett., **107** : 59-66 65
- Woith, W., Nüsslein, L., Antoni, C., Dejica, D. I., Winkler, T. H., Herrmann, M., Pirner, K., Kalden, J. R. et Manger, B. (1993)** A soluble form of the human transferrin receptor is released by activated lymphocytes in vitro. Clin. Exp. Immunol., **92** : 537-542 62
- Wong, K. L., Debanne, M. T., Hatton, N. W. C. et Regoeczi, E. (1978)** Human transferrin, asialotransferrin and the intermediate forms. Int. J. Peptide Protein Res., **12** : 27-37 16
- Woods, M., J., Greaves, M. et Trowbridge, E. A. (1992)** The physiological significance of circulating megakaryocytes. Br. J. Haematol., **80** : 266-267 192
- Woodworth, R. C., Mason, A. B., Funk, W. D. et Mc Gillivray, R. T. A. (1991)** Expression and initial characterization of five site-directed mutants of the N-terminal half-molecule of human transferrin. Biochemistry, **30** : 10824-10829 14
- Wright, J. H. (1910)** The histogenesis of the blood platelets. J. Morphol., **21** : 263-270 102
- Yamada, Y., Amagasaki, T., Jacobsen, D. W. et Green, R. (1987)** Lactoferrin binding by leukemia cell lines. Blood, **70** : 264-270 81
- Yamauchi, K., Tomita, M., Giehl, T. et Ellison, R. T. (1993)** Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin fragment. Infect. Immun., **61** : 719-728 93

- Yang, F., Lum, J. B., Mc Gill, J. R., Moore, C. M., Naylor, S. L., Van Bragt, P. H., Baldwin, W. D. et Bowman, B. H. (1984)** Human transferrin : cDNA characterization and chromosomal localization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81** : 2752-2756 7, 22
- Yang, H., Kool, C. D. et Sokol, P. A. (1993)** Ability of *Pseudomonas pseudomallei* malleobactin to acquire transferrin-bound, lactoferrin-bound, and cell-derived iron. Infect. Immun., **61** : 656-662 92
- Youdim, M. B. H., Ben-Sachar, D. et Riederer P. (1989)** Is Parkinson's disease a progressive siderosis of substantia nigra resulting in iron and melanin induced neurodegeneration ? Acta Neurol. Scand., **126** : 47-54 143
- Young, S. P. et Aisen, P. (1981)** Transferrin receptors and the uptake and release of iron by isolated hepatocytes. Hepatology, **1** : 114-116 48
- Young, S. P., Bomford, A. et Williams, R. (1984)** The effect of iron saturation of transferrin on its binding and uptake by rabbit reticulocytes. Biochem. J., **219** : 505-510 45
- Yu, Y., Radisky, E. et Leibold, E. A. (1992)** The iron responsive element binding protein. Purification, cloning and regulation in Rat liver. J. Biol. Chem., **267** : 19005-19010 58
- Yu, R. H. et Schryvers, A. B. (1993)** Regions located in both N-lobe and C-lobe of human lactoferrin participate in the binding interaction with bacterial lactoferrin receptors. Microbial Pathogenesis, **14** : 343-353 90
- Zahringer, J., Baliga, B. S. et Munro, H. N. (1976)** Novel mechanism for translational control in regulation of ferritin synthesis by iron. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73** : 857-861 58
- Zambruno, G., Girolomoni, G., Manca, V., Segre, A. et Giannetti, A. (1990)** Epidermal growth factor and transferrin receptor expression in human embryonic and fetal epidermal cells. Arch. Dermatol. Res., **282** : 544-548 40
- Zenke, M., Steinlein, P., Wagner, E., Cotten, M., Beug, H., Birnstiel, M. L. (1990)** Receptor-mediated endocytosis of transferrin-polycation conjugates : an efficient way to introduce DNA into hematopoietic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87** : 3655-3659 54
- Ziere, G. J., Van Dijk, M. C. M., Bijsterbosch, M. K. et Van Berkel, T. J. C. (1992)** Lactoferrin uptake by the Rat liver. J. Biol. Chem., **267** : 11229-11235 71

Zimecki, M., Mazurier, J., Machnicki, M., Wieczorek, Z., Montreuil, J. et Spik, G. (1991) Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4-CD8- murine thymocytes. Immunol. Lett., 30 : 119-124

82

Appendice Technique

PARTIE I : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE

I- PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

A- Purification de la lactotransferrine

La lactotransferrine humaine est préparée selon le protocole mis au point au laboratoire par Chéron *et al.* (1975) et Spik *et al.* (1982).

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

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

B- Saturation en fer de la lactotransferrine

La saturation en fer de la lactotransferrine est réalisée selon la méthode décrite par Mazurier et Spik (1980), en utilisant le réactif préconisé par Azari et Baugh (1967). La protéine est dissoute dans un tampon acétate de sodium/bicarbonate de sodium 0,1 M pH 8,2. Le fer est ajouté sous forme de citrate ferrique (en dissolvant 260 mg de FeCl₃, 6 H₂O dans 10 ml de tampon citrate de sodium/bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 8,2). La quantité de citrate ferrique ajoutée pour saturer totalement la lactotransferrine est de 1,6 µg de fer par mg de protéine, ce qui représente environ 110 % de la quantité théorique. Après 3 h de repos, le fer libre est éliminé par dessalage sur une colonne de Séphadex G-25 équilibrée dans le tampon acétate.

C- Couplage de la fluorescéine sur les glycanes de la lactotransferrine

La méthode, mise au point au laboratoire par D. Legrand, nécessite dans un premier temps l'oxydation périodique des résidus d'acide sialique des glycanes de la lactotransferrine humaine et dans un second temps la réaction des fonctions aldéhydiques

formées avec le réactif HyF : (5-(((2-(carbohydrazino)méthyl)thio)acétyl)amino-fluorescéine).

330 µl de phosphate de sodium 0,1 M pH 5,6 contenant 5 mg de lactotransferrine saturée en fer, sont mélangés avec 100 µl de periodate de sodium 0,018 M et incubés pendant 10 min à 4°C. La réaction est arrêtée par addition de 10 µl d'éthylène glycol et la solution est dessalée sur une colonne de Séphadex G-25 équilibrée dans le tampon phosphate de sodium 0,1 M, NaCl 0,15 M pH 7,4. La lactotransferrine oxydée sur sa partie glycanique est ensuite incubée avec le réactif fluorescent (650 µg de HyF dans 10 µl de diméthylformamide) pendant 20 h à température ambiante. L'excès de réactif est ensuite éliminé par passage de la solution sur une colonne de Séphadex G-25 équilibrée dans le tampon phosphate pH 7,4 contenant 5 % (v/v) de butanol et par dialyse contre du PBS. Le nombre de molécules de HyF fixées par molécule de lactotransferrine humaine est estimé à 1,5 par mesure de l'absorbance à 280 et 495 nm selon la méthode de Jobbagy et Kiraly (1966).

II- MATERIEL CELLULAIRE

Les plaquettes, de même que les autres cellules (Jurkat, T47D) utilisées lors de nos expériences de "western blot" et de chromatographie d'affinité, sont lysées et conservées au maximum pendant deux mois à - 80 °C.

Néanmoins, les plaquettes ne constituant pas une lignée cellulaire établie en culture, celles-ci doivent être isolées avant d'être lysées.

A- Isolement des plaquettes

Les concentrés plaquettaires sont centrifugés à 120 g pendant 15 min à température ambiante. Les surnageants riches en plaquettes sont recueillis puis centrifugés à 2000 g pendant 15 min. Les culots plaquettaires sont alors remis en suspension dans un tampon physiologique composé d'acide citrique (36 mM), de glucose (5 mM), de calcium (2 mM), de magnésium (1 mM), de sérum albumine bovine (0,35 %) et d'apyrase (25 mg/ml). Trois lavages sont ensuite réalisés à 2000 g.

L'observation microscopique et cytofluorimétrique de la suspension plaquettaire montre que la contamination des plaquettes par les autres cellules du sang n'excède pas 0,1 %.

B- Culture cellulaire

Les cellules T47D sont cultivées dans un Milieu Essentiel Minimum (MEM) avec sels d'Earles (Gibco-BRL). Ce milieu est complété avec : 10 % de sérum de veau foetal, de la L-glutamine (3 g/l), de l'Hepes (4,7 g/l), du bicarbonate de sodium (2,2 g/l), de l'insuline (80 U/l) et des antibiotiques (amphotéricine B, gentamycine). Les cellules en culture forment, à confluence, un tapis cellulaire et sont maintenues en culture dans des boîtes de culture de 80 et 175 cm² (Nunc). A confluence, les cellules sont détachées par addition d'une solution de Versène (EDTA disodique 1,25 g/l, NaCl 8 g/l, Na₂HPO₄ 1,14 g/l, KH₂PO₄ 200 mg/l, KCl 200 mg/l pH 7,3). Les cellules sont ensuite diluées dans du milieu de culture contenant 10 % de sérum de veau foetal et remises en culture, d'une part, dans des boîtes de culture de 80 cm² pour leur entretien et d'autre part, en boîtes de culture de 24 ou de 6 puits (Costar et Limbro) pour les manipulations ultérieures. Dans toutes nos études expérimentales, les cellules sont utilisées au stade préconfluent.

Les cellules Jurkat sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Gibco-BRL) complété avec 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté. Ces cellules sont repiquées tous les deux ou trois jours et utilisées lors de nos manipulations au 3^{ème} jour de culture.

C- Préparation d'un lysat cellulaire

Les cellules sont lavées dans du PBS froid puis resuspendues dans un volume minimum de ce même tampon et placées dans la glace. Une solution de PBS, Triton X-100 2 % est additionnée à la suspension cellulaire de façon à obtenir une concentration finale de 1%. Un inhibiteur de protéases (Diisopropyl fluorophosphate, Sigma) est alors immédiatement ajouté à raison de 0,1 mM afin d'éviter la dégradation des protéines. Le tube est placé ensuite sous agitation rotative pendant une heure à 4°C. Le matériel cellulaire non solubilisé est éliminé par centrifugation (10 000 g, 15 min). Les lysats cellulaires obtenus sont conservés à - 80 °C.

III- TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES

A- Précipitation des fractions purifiées

Avant d'être analysées en gel de polyacrylamide, les fractions purifiées par chromatographie d'immuno-affinité sont concentrées par précipitation à l'acide trichloroacétique (ATCA). Ainsi, les protéines précipitées par 10 % d'ATCA sont

centrifugées pendant 15 min à 10000 g puis lavées deux fois par de l'éthanol distillé afin d'éliminer l'ATCA résiduel. Le culot est séché par évaporation de l'éthanol sous azote puis solubilisé dans le tampon échantillon d'électrophorèse (Tris-HCl 10 mM pH 8,8, SDS 10 %, Glycérol 10 %). Les échantillons sont centrifugés pendant 5 min à 10000g avant d'être analysés en gel de polyacrylamide.

B- Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

Les électrophorèses en gel de polyacrylamide sont réalisées dans un appareil vertical en plaques (1,5 x 140x 160 mm) de marque Hoeffler Scientific Instruments dans le système tampon préconisé par Laemmli (1970).

Le gel de séparation possède une réticulation de 7,5 % en acrylamide dans un tampon Tris/HCl pH 8,8. Le gel de concentration est à 5 % en acrylamide dans un tampon Tris/HCl pH 6,8. Le tampon de migration ainsi que les gels de concentration et de séparation renferment 0,1 % de SDS.

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

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

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

C- Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose

Après électrophorèse en gel de polyacrylamide, les protéines ayant migré selon leur masse moléculaire sont transférées électrophorétiquement (cellule de transfert Biorad) sur nitrocellulose 0,45 µm (Schleicher et Schull) selon la technique de Towbin *et al.* (1979). Le tampon utilisé est constitué de Tris 25 mM, glycofolle 200mM pH 8,4 et contient 20% de méthanol. L'électrotransfert est réalisé à 75 mA pendant une nuit à 4°C.

Les protéines fixées à la membrane de nitrocellulose sont ensuite immuno-révlées.

IV- DETECTION DES PROTEINES APRES TRANSFERT SUR NITROCELLULOSE

La membrane de nitrocellulose, sur laquelle sont immobilisées les protéines, est tout d'abord saturée de façon à bloquer tous les sites actifs restés libres et capables de réagir

avec des protéines. La saturation est réalisée en immergeant la feuille de nitrocellulose dans une solution de PBS, lait en poudre 5% (p/v), Tween 20 0,1% (p/v) (Sigma). Après une heure d'incubation sous agitation douce, la membrane de nitrocellulose est lavée avec une solution de PBS, Tween 20 0,05% puis placée pendant 3 h dans le surnageant de culture de l'un ou l'autre des clones ou dans le même tampon contenant l'anticorps monoclonal 5B3G10 à la dilution adéquate. La membrane de nitrocellulose est ensuite lavée trois fois pendant 10 min avec la solution de PBS, Tween 20 0,05%. Finalement la membrane de nitrocellulose est incubée en présence du deuxième anticorps spécifique du premier anticorps et marqué à la peroxydase. Après 2 lavages en présence de PBS, Tween 20 0,05%, Triton X-100 0,1% puis 3 lavages en présence de PBS, la membrane est révélée par addition d'un chromogène (diamino-benzidine) oxydable par H₂O₂ en présence de peroxydase. Ainsi, la réaction colorée est réalisée dans le tampon PBS, diamino-benzidine 0,04% (p:v) par addition de 1% d'eau oxygénée (v:v).

V- CYTOFLUORIMETRIE EN FLUX

Toutes les expériences de cytofluorimétrie en flux sont réalisées à 4°C à l'exception de celles effectuées sur les plaquettes (réalisées à 20°C afin d'éviter leur activation).

A- Etude de la fixation des anticorps monoclonaux anti-récepteur 5B3G10 par cytofluorimétrie en flux

Les cellules en suspension dans 150 µl de PBS sont incubées pendant une heure en présence de l'anticorps anti-récepteur 5B3G10 (dilution 1/500) et d'azide (0,1 %). Les cellules sont ensuite lavées et les anticorps anti-IgM de souris marqués au FITC (dilution 1/128) sont ajoutés. Après 30 min d'incubation, les cellules sont lavées deux fois puis analysées par cytofluorimétrie en flux. La fixation non spécifique est estimée en incubant les cellules dans les mêmes conditions mais en remplaçant l'anticorps anti-récepteur par du liquide d'ascite non purifié de souris.

B- Etude de la fixation de la lactotransferrine fluorescente par cytofluorimétrie en flux (méthode directe)

Les cellules sont incubées dans 150 µl de tampon PBS en présence de 1,25 10⁻⁷ M (Jurkat, plaquettes, T47D) ou de 5 10⁻⁷ M (Dami) de lactotransferrine-HyF saturée en fer et préparée selon le protocole décrit au chapitre I de l'appendice. De la sérotransferrine humaine (0,2 %), non reconnue par le récepteur de la lactotransferrine,

est ajoutée dans le milieu d'incubation afin de diminuer les phénomènes d'adsorption non spécifiques de la lactotransferrine (Goavec *et al.*, 1985). Les cellules sont incubées pendant 30 min puis lavées deux fois par du PBS et analysées au cytofluorimètre. La fixation non spécifique est estimée en incubant les cellules en présence d'un excès de lactotransferrine non marquée : 100 excès molaire.

C- Etude de la fixation de la lactotransferrine par cytofluorimétrie en flux (méthode indirecte)

Les cellules sont incubées dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment à la différence que la lactotransferrine utilisée est non fluorescente. Cette lactotransferrine est purifiée comme décrit précédemment (chapitre I de l'appendice) et possède un degré de saturation en fer de 30 %. Lorsque cette première incubation est terminée, les cellules sont lavées trois fois par du PBS. Les anticorps anti-lactotransferrine (dilution 1/40) sont alors ajoutés. Après 30 min d'incubation, les cellules sont lavées et additionnées de 150 µl d'anticorps anti-IgG de lapin marqués au FITC (dilution 1/80). La réaction se déroule pendant 30 min puis les cellules sont lavées, mises en suspension dans du PBS et analysées. La fixation non spécifique est estimée en incubant les cellules dans les mêmes conditions mais en absence de lactotransferrine.

D- Analyse des résultats

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

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

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

Sur un histogramme de fluorescence, la surface du pic de fluorescence est proportionnelle au pourcentage de cellules fluorescentes, alors que la position du pic sur

l'échelle de l'intensité de fluorescence est proportionnelle au nombre de molécules fluorescentes par cellule.

PARTIE II : BIOLOGIE MOLECULAIRE

I- COMPOSITION DES TAMPONS UTILISES

TBE

Tris-borate	0,089 M
Acide borique	0,089 M
pH	7,0

SSC 20x

NaCl	3 M
Citrate de sodium (Na) ₃	0,3 M
pH	7,0

Denhardt 50x

Ficoll	5 g
Polyvinylpyrrolidone	5 g
Sérum albumine bovine	5 g
H ₂ O qsp	500 ml

II- TECHNIQUES D'ISOLEMENT ET DE PURIFICATION DES ARN

A- Préparation des ARN cellulaire totaux

Tampon d'extraction

Isothiocyanate de guanidine	4 M
Citrate de sodium (pH 7,0)	0,005 M
β -mercaptoéthanol	0,1 M
Sarkosyl	0,5 M

Les cellules sont mises en suspension dans 5 volumes de tampon et homogénéisées au polytron dans un bécher sur de la glace (afin d'éviter l'échauffement). 1 g de chlorure de césium est ajouté pour 2,5 ml d'homogénat et mis sous agitation jusqu'à complète dissolution. L'ensemble est ensuite déposé, dans un tube Beckman pour rotor SW 50-1, sur un coussin de 1,2 ml de CsCl 5,7 M dans de l'EDTA 0,1 M (pH 7,5). Les tubes sont centrifugés pendant 12 h à 3500 t/min à 20°C. Dans ces conditions, l'ARN précipite et est retrouvé au fond du tube. Le surnageant est alors éliminé et l'ARN est lavé par une solution d'éthanol à 70 % puis séché à température ambiante.

L'ARN est ensuite repris par un tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), 5 mM EDTA, 1 % SDS et soumis à 5 extractions : 1 extraction par un volume de phénol saturé en Tris-HCl 10 mM pH 8; 2 extractions par un volume de mélange (v/v) de phénol/chloroforme et 2 extractions par de l'éther méthylique saturé en eau. La phase aqueuse est ajustée à 0,3 M en acétate de sodium par une addition d'acétate de sodium 3 M puis précipitée par 2,5 volumes d'éthanol absolu à -20°C. La précipitation des ARN est obtenue après 2 h à -80°C ou une nuit à -20°C.

L'ARN précipité est récupéré par une centrifugation en tube Corex à 15000 g, à 4°C pendant 20 min, puis séché sous vide. L'ARN est enfin repris par de l'eau. La quantité d'ARN obtenue est estimée par une mesure de l'absorbance à 260 nm. La qualité de la purification est déterminée par mesure du rapport des densités optiques à 260 nm et 280 nm.

B- Purification des ARNm poly A⁺

<u>Tampon de fixation</u>		<u>Tampon d'éluion</u>	
Tris-HCl (pH 8,0)	0,01 M	Tris-HCl (pH 8,0)	0,01 M
NaCl	0,5 M	SDS	0,05 %
SDS	0,5 %	EDTA	0,001 M
EDTA	0,001M		

500 mg d'oligo dT cellulose (Stratagène) mis à gonfler dans le tampon d'éluion permettent de préparer une colonne de 3 ml sur laquelle 10 mg d'ARN total pourront être purifiés.

L'ARN total repris dans l'eau est amené à une concentration de 2 mg/ml. Il est ensuite dénaturé pendant 5 min à 65°C puis rapidement mélangé à un volume égal de tampon de fixation deux fois concentré. L'ARN est alors déposé sur la colonne d'oligo dT équilibrée dans le tampon de fixation. La fixation sur la colonne s'effectue en deux étapes, le premier éluat étant recyclé. Après lavage de la colonne par 10 volumes de tampon de fixation, l'ARN est élué par 3 volumes de tampon d'éluion. L'éluat est ajusté à 0,5 M en NaCl et recyclé sur la colonne. La seconde chromatographie est menée comme la première. L'éluat final est amené à 0,3 M en acétate de sodium et précipité par 2,5 volumes d'éthanol.

III- ELECTROPHORESE DE L'ARN EN GEL D'AGAROSE

200 ml de gel d'agarose 1,5 % sont préparés par agitation, pendant 30 min à température ambiante et sous hotte, de la solution suivante : 3 g d'agarose, 124 ml d'eau et 124µl de DEPC. Après autoclavage pendant 20 min à 120°C et à 1 atm, lorsque le gel a refroidi jusqu'à une

température de 60°C, 40 ml de tampon 5x (MOPS 0,2 M pH 7,0, EDTA 5 mM, acétate de sodium 50 mM) et 50 ml de formaldéhyde à 37% sont ajoutés sous agitation lente.

10 µg d'ARNm sont déposés par puit. A cet effet, ils sont dilués comme suit :

-2,3 µl d'eau

-1 µl de tampon 5x

-1,7 µl de formaldéhyde (37 %)

-5 µl de formamide.

Le mélange est incubé pendant 15 min à 65°C puis refroidi dans la glace afin de déshydrider l'ARN.

Avant le dépôt sur gel, 2 µl de solution de dépôt (glycérol 50 %, EDTA 1 mM, Bleu de bromophénol 0,4 %, Xylène cyanol FF 0,4 %) sont ajoutés.

La migration est effectuée pendant 6 h à 6 h 30 min à 80-90V.

IV- TRANSFERT DE L'ARN PAR CAPILLARITE (NORTHERN BLOT)

Les ARN à analyser sont séparés en gel d'agarose puis transférés sur une membrane de nitrocellulose (BA85-0,45 µm, Schleicher et Schull) ou sur une membrane de nylon (Boehringer) selon le protocole suivant :

La membrane, préalablement trempée dans du SSC 20 fois concentré, est déposée sur le gel et l'ARN est transféré par capillarité pendant 16 h à température ambiante selon la technique de Southern (1975).

Lorsque la membrane utilisée est en nylon, l'ARN transféré est "cross-lié" par irradiation aux UV (254 nm) pendant 3 min à une distance de 15 cm de la membrane sèche.

Lorsque la membrane utilisée est en nitrocellulose, elle est tout d'abord séchée pendant 15 min à l'air libre puis cuite 2 h à 80°C.

V- HYBRIDATION EN PRESENCE DE LA SONDÉ ADNc DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

1- Marquage de la sonde

Le marquage de la sonde ADNc de la lactotransferrine humaine a été effectué selon le protocole conseillé par le coffret de marquage par "oligolabelling" de Pharmacia.

25 à 50 ng d'ADN sont dissous dans du tampon TE de façon à obtenir un volume final de 34 µl. Ils sont ensuite dénaturés pendant 2 min à 100°C puis placés dans la glace.

Après une brève centrifugation, sont ajoutés :

- 10 µl de mélange réactionnel
- 5 µl de [α - 32 P]dCTP à 3000 Ci/mmol
- 49 µl d'eau
- 1 µl de solution de fragment "Klenow".

Le mélange est alors incubé pendant 30 min à 37°C.

Le rendement de marquage de la sonde est déterminé par comptage en scintillation liquide après co-précipitation d'1 µl de la solution marquée avec 50 µl de sperme de saumon par 4 ml d'acide trichloroacétique à 10 % et filtration sur filtre en fibre de verre.

2- Hybridation et autoradiographie

Le "northern-blot" est préhybridé dans une boîte plastique hermétique pendant 2 h à 42 °C sous agitation dans le tampon suivant : SSC 5 x, Denhardt 5x, SDS 0,5 % et 200 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé. L'étape de préhybridation permet le blocage des sites de fixation non spécifiques.

L'hybridation est effectuée pendant une nuit à 42 °C sous agitation avec la sonde marquée au 32 P, préalablement dénaturée par chauffage pendant 2 min à 95 °C et incubée pendant 2 min dans la glace. 50 ml de tampon d'hybridation sont préparés par agitation sous hotte de 5 g de sulfate de dextran dans 25 ml de formamide. Après 3 h d'incubation, sont ajoutés 12,5 ml de SSC 20x et de l'eau pour atteindre un volume final de 50 ml.

Les lavages du "northern blot" sont ensuite réalisés comme suit :

- 2 fois pendant 10 min à température ambiante dans un tampon SSC 2x, SDS 0,1 %
- 1 fois pendant 15 min à température ambiante dans un tampon SSC 1x, SDS 0,1%
- 2 fois pendant 10 min à 65°C dans le tampon SSC 0,1x, SDS 0,1%.

Le "northern blot" est ensuite mis en autoradiographie à - 80°C.