

50376  
1995  
115

Jan 2010 4818

# 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

**Bao Yuan BI**



## **INTERACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE AVEC SON RECEPTEUR**

- I. LOCALISATION DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS LA LIGNEE CELLULAIRE LYMPHOCYTAIRE JURKAT PAR IMMUNOCYTOCHIMIE
- II. ETUDE DU MECANISME D'ENDOCYTOSE DE LA LACTOTRANSFERRINE
- III. ACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LA LIGNEE LYMPHOCYTAIRE T JURKAT

**Soutenue le 29 mai 1995 devant la Commission d'examen :**

- Président** : A. Verbert, Professeur, USTL
- Rapporteurs** : A. Dautry-Varsat, Directeur de Recherche au CNRS  
A-C. Roche, Directeur de Recherche à l'INSERM
- Examineurs** : G. Spik, Professeur, USTL  
J. Mazurier, Directeur de Recherche au CNRS  
J. Montreuil, Professeur Emérite, USTL

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur Joël Mazurier, Directeur de Recherche au CNRS, dans le Groupe Structure-Fonction des Transferrines et de leurs récepteurs (Responsable : Professeur Geneviève Spik) du Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Unité mixte du CNRS n° 111 : Relation Structure-Fonctions des Constituants Membranaires ; Directeur : Professeur André Verbert).

**à Jinli  
Yawei**

**à ma mère**

**à ma famille et mes amis**

A Monsieur le Professeur J. Montreuil : je trouve ici l'occasion de vous remercier pour la confiance que vous m'avez accordée en m'accueillant dans votre laboratoire. Vous m'avez permis de partager la vie du C9, de bénéficier de votre dynamisme et de votre haute compétence scientifique, soyez assuré de ma profonde gratitude et de mon respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur A. Verbert : vous m'avez permis de préparer mon Doctorat au sein de votre laboratoire. Je vous suis très reconnaissant de présider cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et soyez assuré de ma profonde gratitude.

A Madame le Professeur G. Spik : je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre équipe ; vous avez su, avec humour et sympathie, me suivre, m'encourager et m'apporter une aide scientifique très efficace tout au long de ce travail. J'ai toujours trouvé auprès de vous beaucoup de gentillesse, de disponibilité et de compréhension. Je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude.

A Madame le Docteur A-C. Roche, Directeur de Recherche à l'INSERM : j'ai énormément apprécié vos conseils scientifiques, votre dynamisme, ainsi que la chaleur de votre accueil lors de mes séjours à Orléans. Votre venue en tant que Rapporteur de cette thèse me fait extrêmement plaisir. Veuillez trouver ici l'expression de ma vive gratitude et de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Docteur A. Dautry-Varsat, Directeur de Recherche au CNRS : vous m'avez fait l'honneur d'être Rapporteur de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma vive gratitude et ma profonde reconnaissance pour l'intérêt que vous avez porté à cette thèse.

A Joël Mazurier : tu m'as encadré dans la préparation de cette thèse avec un grand dévouement. Tu m'as fait bénéficier de ton expérience scientifique. Tes conseils, ta constante sollicitude, ta patience et ta gentillesse m'ont accompagné au cours de ces quatre années. C'est avec une réelle admiration que je te remercie pour tout ce que tu m'as apporté.

Je tiens enfin à remercier ceux qui, par leur collaboration et leur amitié, m'ont aidé à réaliser ce travail : l'ensemble du personnel du laboratoire 103 et plus particulièrement Yolande, Dominique, Bernadette, Fabrice et Jean-Pierre pour leur sympathie et les encouragements qu'ils m'ont prodigués pendant ces quatre années, qu' ils trouvent ici l'expression de mon amitié.

-Madame Celen qui a assuré la production de ce mémoire dans de bonnes conditions.

-Christophe et Thierry pour leur aide précieuse pour les problèmes liés à l'informatique.

-Odette Labiau : j'ai eu un grand plaisir à travailler à vos côtés. Je vous en remercie.

-Maryse Masson, tu m'as beaucoup aidé pour la correction de cette thèse. Trouve ici l'expression de ma sympathie.

Par ailleurs, que ce mémoire soit pour moi l'occasion d'exprimer ma plus profonde reconnaissance à tous ceux qui par leur aide et leur gentillesse ont contribué à sa réalisation.

Une partie de ce travail a pu être réalisée grâce au Prix 1993 de l'Institut CANDIA qui nous a été octroyé, nous leur adressons nos vifs remerciements.

## TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION .....	5
GENERALITES .....	
I. LA LACTOTRANSFERRINE.....	10
A. Biosynthèse de la lactotransferrine.....	10
B. Structure de la lactotransferrine .....	17
C. Rôles de la lactotransferrine.....	32
II. LES RECEPTEURS DE LA LACTOTRANSFERRINE.....	51
A. Cellules et organismes fixant la lactotransferrine.....	51
B. Les récepteurs de la lactotransferrine .....	59
III. ENDOCYTOSE DE LA LACTOTRANSFERRINE.....	64
A. Introduction .....	64
B. Internalisation de la lactotransferrine.....	66
RESULTATS.....	68
I. LOCALISATION DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS LA LIGNEE CELLULAIRE LYMPHOCYTAIRE JURKAT PAR IMMUNOCYTOCHIMIE.....	69
A. Introduction .....	69
B. Article 1 .....	70
C. Conclusion.....	79
II. ETUDE DU MECANISME D'ENDOCYTOSE DE LA LACTOTRANSFERRINE.....	
A. Introduction .....	
B. Article 2 .....	
C. Conclusion.....	80
III. ACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LA LIGNEE LYMPHOCYTAIRE T JURKAT.....	112
A. Introduction .....	112
B. Article 3 .....	113
C. Conclusion.....	129
IV. CONCLUSION GENERALE.....	130
APPENDICE TECHNIQUE.....	133
I. PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE.....	134
A. Purification de la lactotransferrine.....	134

B. Saturation et désaturation en fer de la lactotransferrine .....	134
C. Couplage de la fluorescéine sur les glycanes de la lactotransferrine.....	135
D. Marquage de la lactotransferrine à l'iode <sup>125</sup> I.....	135
II. CULTURE CELLULAIRE.....	136
A. Culture cellulaire.....	136
B. Détection des mycoplasmes.....	136
C. Marquage de protéines membranaires à l'iode <sup>125</sup> I.....	137
D. Marquage métabolique à la <sup>35</sup> S-méthionine .....	137
E. Mesure de la synthèse d'ADN.....	137
F. Préparation d'un lysat cellulaire.....	137
G. Concentration du milieu de culture.....	138
III. TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES.....	138
A. Purification des immunoglobulines G anti-lactotransferrine.....	138
B. Purification du récepteur de la lactotransferrine.....	139
IV. TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES.....	139
A. Précipitation des fractions purifiées.....	139
B. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS.....	140
C. Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose.....	140
D. Détection des protéines après transfert sur la nitrocellulose.....	140
V. CYTOFLUORIMETRIE EN FLUX.....	141
A. Etude de la fixation de la lactotransferrine fluorescente par cytofluorimétrie en flux.....	141
B. Préparation de l'anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de la lactotransferrine .....	141
C. Etude de la fixation de l'anticorps monoclonal anti-récepteur 5B3G10 par cytofluorimétrie en flux.....	142
D. Etude de l'expression des antigènes de surface membranaire.....	142
E. Le cycle cellulaire.....	142
F. Analyse des résultats.....	143
VI. FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE.....	143
VII. ETUDE DE L'INTERNALISATION.....	143
A. Etude cinétique de l'internalisation.....	143
B. Etude de la dégradation de la lactotransferrine après internalisation.....	144

C. Effets des inhibiteurs sur l'internalisation et le devenir intercellulaire de la lactotransferrine .....	144
VIII. MICROSCOPIE CONFOCALE.....	145
IX. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.....	145
A. Localisation intracellulaire de la lactotransferrine endocytée.....	145
B. Localisation de surface du récepteur de la lactotransferrine.....	146
BIBLIOGRAPHIE.....	147



**Liste des Abréviations**

<b>COUP</b>	<b>:</b>	<b>Children Ovalbumin Upstream Promoter</b>
<b>DIFP</b>	<b>:</b>	<b>Diisopropyl fluorophosphate</b>
<b>EDTA</b>	<b>:</b>	<b>Ethylène Diamine Tétracétate de sodium</b>
<b>EGF</b>	<b>:</b>	<b>Epidermal Growth Factor</b>
<b>ELISA</b>	<b>:</b>	<b>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</b>
<b>ERE</b>	<b>:</b>	<b>Estrogen Response Element</b>
<b>FITC</b>	<b>:</b>	<b>Fluorescéine Isothiocyanate</b>
<b>G-CSF</b>	<b>:</b>	<b>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</b>
<b>Hyf</b>	<b>:</b>	<b>5-(((2-(Carbohydrazino)methyl)thio)acetyl)amino-fluorescein)</b>
<b>Ig</b>	<b>:</b>	<b>Immunoglobuline</b>
<b>IL</b>	<b>:</b>	<b>Interleukine</b>
<b>INF</b>	<b>:</b>	<b>Interfon</b>
<b>Kb</b>	<b>:</b>	<b>Kilobase</b>
<b>Kd</b>	<b>:</b>	<b>Constante de dissociation</b>
<b>kDa</b>	<b>:</b>	<b>Kilodalton</b>
<b>KGDS</b>	<b>:</b>	<b>Arg-Gly-Asp-Ser</b>
<b>KRDS</b>	<b>:</b>	<b>Lys-Arg-Asp-Ser</b>
<b>LDL</b>	<b>:</b>	<b>Low Density Lipoprotein</b>
<b>LRP</b>	<b>:</b>	<b>Lipoprotein Receptor Protein</b>
<b>LTF</b>	<b>:</b>	<b>Lactotransferrine</b>
<b>mERM</b>	<b>:</b>	<b>Module Estrogen Response Element</b>
<b>NADH</b>	<b>:</b>	<b>Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogène</b>
<b>NK</b>	<b>:</b>	<b>Natural Killer</b>
<b>PBS</b>	<b>:</b>	<b>Phosphate Buffer Saline</b>
<b>PHA</b>	<b>:</b>	<b>Phytohémagglutinine</b>
<b>PMA</b>	<b>:</b>	<b>Phorbol 12-Myristate- 13-Acetate</b>
<b>SDS</b>	<b>:</b>	<b>Sodium Dodecyl Sulfate</b>
<b>STF</b>	<b>:</b>	<b>Sérotransferrine</b>
<b>TBS</b>	<b>:</b>	<b>Tris Buffer Saline</b>
<b>TGF</b>	<b>:</b>	<b>Transforming Growth Factor</b>
<b>TNF</b>	<b>:</b>	<b>Tumour Necrosis Factor</b>

# **INTRODUCTION**

La découverte de la lactotransferrine par le Professeur J. Montreuil (1960) a ouvert la voie à de nombreux travaux au sein de l'équipe des transferrines de l'UMR n°111 du CNRS. Les travaux ont d'abord porté sur la détermination des structures protéique et glycanique de la lactotransferrine, puis sur l'étude du rôle de la lactotransferrine dans l'absorption intestinale du fer. Enfin, plus récemment, des récepteurs de la lactotransferrine ayant été décrits sur les cellules lymphocytaires (Mazurier *et al.*, 1989) et les plaquettes (Leveugle *et al.*, 1993) les travaux de l'équipe se sont orientés vers l'étude de récepteurs et de l'interaction de la lactotransferrine avec les cellules immunitaires ainsi que du rôle de la lactotransferrine dans la différenciation des lymphocytes.

La lactotransferrine est une glycoprotéine qui présente beaucoup d'homologie structurale avec la transferrine sérique. Elle est présente dans tous les milieux de sécrétion et elle est stockée dans les granules secondaires des leucocytes neutrophiles (Masson *et al.*, 1969). Dès que la lactotransferrine est excrétée dans le sang, le foie la capture immédiatement ce qui fait que la concentration sanguine de la lactotransferrine est maintenue à un taux très faible, quelques  $\mu\text{g/ml}$ , dans les conditions physiologiques. Cette concentration augmente dans des cas pathologiques : infections bactérienne et virale, cancer.

La fonction de la lactotransferrine du sang ou du lait n'est pas encore bien établie. La lactotransferrine peut être impliquée dans des mécanismes immunitaires comme la régulation de la synthèse du GM-CSF (Broxmeyer *et al.*, 1983, 1984), la synthèse des interleukines (IL-1, IL-6) (Zucali *et al.*, 1989 ; Hangoc *et al.*, 1991 ; Machnicki *et al.*, 1993) l'augmentation de l'activité cytotoxique des cellules NK (McCormick *et al.*, 1991a, b ; Nishiya & Horwitz, 1982 ; Horwitz *et al.*, 1984) et des monocytes (la lactotransferrine possède une puissante activité antitumorale et inhibe la migration des métastases. Bazault *et al.*, 1994), la maturation des lymphocytes T en lymphocytes auxiliaires. Les mécanismes par lesquels la lactotransferrine intervient ne sont pas connus mais il est possible que la lactotransferrine saturée en fer se fixe sur l'ADN via une séquence consensus et agit comme un facteur de transcription (He & Furmanski, 1995) ; quoiqu'il en soit ces fonctions impliquent que la lactotransferrine reconnaît les cellules lymphocytaires et que probablement elle soit endocytée et induise une réponse physiologique.

Les expériences réalisées par Mazurier *et al.* (1989), dans notre laboratoire, avaient démontré que les lymphocytes activés expriment un récepteur membranaire spécifique de la lactotransferrine. Ce récepteur lymphocytaire a été identifié puis purifié. Il s'agit d'une glycoprotéine de masse moléculaire 105 kDa composé d'une chaîne polypeptidique unique. Ce récepteur a été retrouvé sur les plaquettes non activées (Leveugle *et al.*, 1993).

Le travail qui nous a été confié a été d'étudier l'interaction de la lactotransferrine avec le récepteur lymphocytaire, l'internalisation de la lactotransferrine par les lymphocytes, et d'identifier le compartiment cellulaire vers lequel la lactotransferrine est endocytée. Pour cela, nous avons tout d'abord mis au point un système permettant d'étudier les rôles de la lactotransferrine sur le lymphocyte ainsi que les mécanismes d'interaction des lactotransferrines avec les cellules lymphocytaires en prenant comme modèle expérimental la lignée cellulaire lymphoblastique Jurkat. Pour entreprendre notre étude, nous avons préparé du récepteur soluble par la technique de chromatographie d'affinité mise au point précédemment dans notre laboratoire à partir de la lignée Jurkat. Nous avons, en collaboration avec les Docteurs Collard et Coppe (Centre d'Economie Rurale, Marloie, Belgique), immunisé une souris avec le récepteur soluble de la lactotransferrine et produit un anticorps dirigé contre cette glycoprotéine. Cet anticorps monoclonal nous a permis, tout d'abord, de localiser le récepteur à la surface et à l'intérieur des cellules, ensuite, de mettre en évidence le récepteur de la lactotransferrine sur différentes lignées lymphocytaires : lymphocytes T (Cem), lymphocytes B (Raji).

Dans un second temps, nous avons étudié l'endocytose de la lactotransferrine puis le devenir intracellulaire de la lactotransferrine endocytée par les cellules Jurkat. Finalement, nous avons étudié la réponse du lymphocyte à l'action de la lactotransferrine.

Dans ce mémoire nous faisons dans un premier temps le point sur nos connaissances actuelles concernant la biosynthèse, la structure et la fonction de la lactotransferrine, en outre, nous décrivons la nature des différents récepteurs de la lactotransferrine qui ont été identifiés jusqu'à présent ainsi que le trafic intracellulaire de la lactotransferrine.

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

### **Communications orales**

1. **Bi, B.Y.**, Roche, A.C., Spik, G. and Mazurier, J. Intracellular traffic of lactotransferrin in T-lymphocyte cell line. 2nd IUBMB Conference: Biochemistry of cell membranes, Bari (Italie), 29 septembre-3 octobre 1993
2. **Bi, B.Y.**, Roche, A.C., Legrand, D., Spik, G. and Mazurier, J. Internalisation de la lactotransferrine humaine dans les cellules lymphoblastiques T Jurkat. Premières Rencontres du GDR 1154, Transport du fer dans les systèmes biologiques. De la chimie de coordination à la biologie moléculaire et cellulaire, SEILLAC, 1-4 Février 1995
3. Pierce, A., Mazurier, J., Nillesse, N., **Bi, B. Y.**, Benaissa, M., Spik, G. Le récepteur

lymphocytaire de la lactotransferrine humaine est présent sur les mégacaryocytes et des plaquettes. Premières Rencontres du GDR 1154, Transport du fer dans les systèmes biologiques. De la chimie de coordination à la biologie moléculaire et cellulaire, SEILLAC, 1-4 Février 1995

4. Mazurier, J, **Bi, B. Y.**, Ellass, E., Legrand, D., and Spik, G. Differences in binding and fate of lactotransferrin in Jurkat human lymphocyte T-cell line and in T-47D human breast cancer cells. Second International Symposium on Lactoferrin Structure and Function, Honolulu, Hawaii (U.S.A.) 19-21 February, 1995

5. Spik, G., **Bi, B.Y.**, Legrand, D., Leveugle, B., Mazurier, J., Mikogami, T., and Pierce, A. Diversity of lactotransferrin receptors. Second International Symposium on Lactoferrin Structure and Function, Honolulu, Hawaii (U.S.A.) 19-21 February, 1995

### Communications par affiche

1. **Bi, B.Y.**, Roche, A.C., Spik, G. and Mazurier, J. Intracellular traffic of lactotransferrin in T-lymphocyte cell line. Congrès d'Automne de la SFBBM Parc International des Expositions, 7-9 Décembre, 1993

2. **Bi, B.Y.**, Roche, A.C., Legrand, D., Spik, G. and Mazurier, J. Intracellular traffic of lactotransferrin in T-lymphocyte cell line. European Iron Club, à Gargnano del Garda (Italie), 24-27 Septembre, 1994

### PUBLICATIONS

#### -Avec comité de lecture

1. **Bi, B. Y.**, Leveugle, B., Liu, J. L., Collard, A., Coppe, P., Roche, A.C. Nillesse, N., Capron, M., Spik, G. Mazurier, J. Immunolocalization of lactotransferrin receptor on the human lymphoblastic cell line Jurkat. Eur. J. Cell Biol. (1994) 65: 164-171.

2. **Bi, B. Y.** Liu, J. L., Legrand, D., Roche, A.C., Capron, M., Spik, G., Mazurier, J. Receptor-mediated endocytosis of lactotransferrin Jurkat cell. En révision pour publication dans Eur. J. Cell Biol.

3. **Bi, B. Y.**, Lefebvre, A.-M., Dus, D., Spik, G., Mazurier, J. Effect of lactotransferrin on proliferation and differentiation of the human lymphoblastic T cell Jurkat cell. Soumis à publication dans Immunology Letters.

**Une partie de notre travail, ne figurant pas dans ce mémoire, est en cours de rédaction.**

4. **Bi, B. Y., Liu, J. L., Spik, G. Mazurier, J.** Modulation of lactotransferrin receptor expression during HL-60 cell differentiation.

### **Revue générale**

1. Mazurier, J., **Bi, B. Y.**, Ellass, E., Legrand, D. and Spik, G. Differences in binding and fate of lactotransferrin in Jurkat human lymphocyte T-cell line and in T-47D human breast cancer cells. Proceedings of the Second International Symposium on Lactoferrin Structure and Function, Honolulu, Hawaii (*U.S.A.*) 19-21 February, 1995

2. Spik, G., **Bi, B. Y.**, Legrand, D., Leveugle, B., Mazurier, J., Mikogami, T., and Pierce, A. Diversity of lactotransferrin receptors. Proceedings of the Second International Symposium on Lactoferrin Structure and Function, Honolulu, Hawaii (*U.S.A.*) 19-21 February, 1995

# **GENERALITES**

## I. LA LACTOTRANSFERRINE

La lactotransferrine appartient à un groupe de transporteurs de ligand polyanionique, qui fixe le ligand à l'interface de deux domaines structuraux (Louie, 1993). Ces protéines regroupent plusieurs familles: les transferrines, les transporteurs de sulfate, de phosphate, de maltodextrines et la porphobilinogène désaminase. La famille des transferrines comprend la lactotransferrine (Montreuil & Mullet, 1960 ; Montreuil *et al.*, 1960), la transferrine sérique (Schade & Caroline, 1946), l'ovotransferrine (Schade & Caroline, 1944) et la mélanotransferrine (Brown *et al.*, 1980, 1982).

Le ligand polyanionique fixé par les transferrines est un ion carbonate associé à un ion métallique, généralement le  $Fe^{3+}$ . Ces glycoprotéines en complexant l'ion  $Fe^{3+}$  l'empêchent, dans les conditions physiologiques, de former des hydroxydes insolubles et le maintiennent disponible pour l'organisme.

Dans ce chapitre, nous étudierons la biosynthèse, la structure et les rôles biologiques de la lactotransferrine et du récepteur de la lactotransferrine, et rappellerons les connaissances actuelles sur l'internalisation de la lactotransferrine.

### A. *Biosynthèse de la lactotransferrine*

#### 1. Gène de la lactotransferrine

##### a) *Organisation du génome*

Le gène des lactotransferrines murine et bovine a été bien caractérisé. Le gène murin localisé sur le chromosome 9 (Teng *et al.*, 1987) est long de 30 kb, le gène bovin de 34 kb. Les gènes sont répartis en 17 exons, de taille comprise entre 48 et 190 bp, 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), bien que certains introns du gène bovin soient de taille très différente. 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 & Teng, 1991).

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), mais sa structure n'est pas bien définie. En effet, seul le promoteur a été étudié dans les cellules HL60 pour lesquelles le gène n'est pas



transcrit (Johnston *et al.*, 1992) bien que sa région 5' (incluant le promoteur) soit normale.

**b) Régulation de l'expression du gène de 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.

**α) Régulation au cours de la différenciation**

L'étude de cellules issues de prélèvements sanguins réalisés sur des patients atteints de leucémie touchant les différents stades de différenciation de la lignée granulocytaire a montré que les ARNm de la lactotransferrine ne sont détectables chez ces patients qu'au stade granulocyte (Rado *et al.*, 1984). Cependant, la lignée myéloblastique PLB-985 est 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 (Rado *et al.*, 1987).

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 de 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.

**β) Régulation par les hormones**

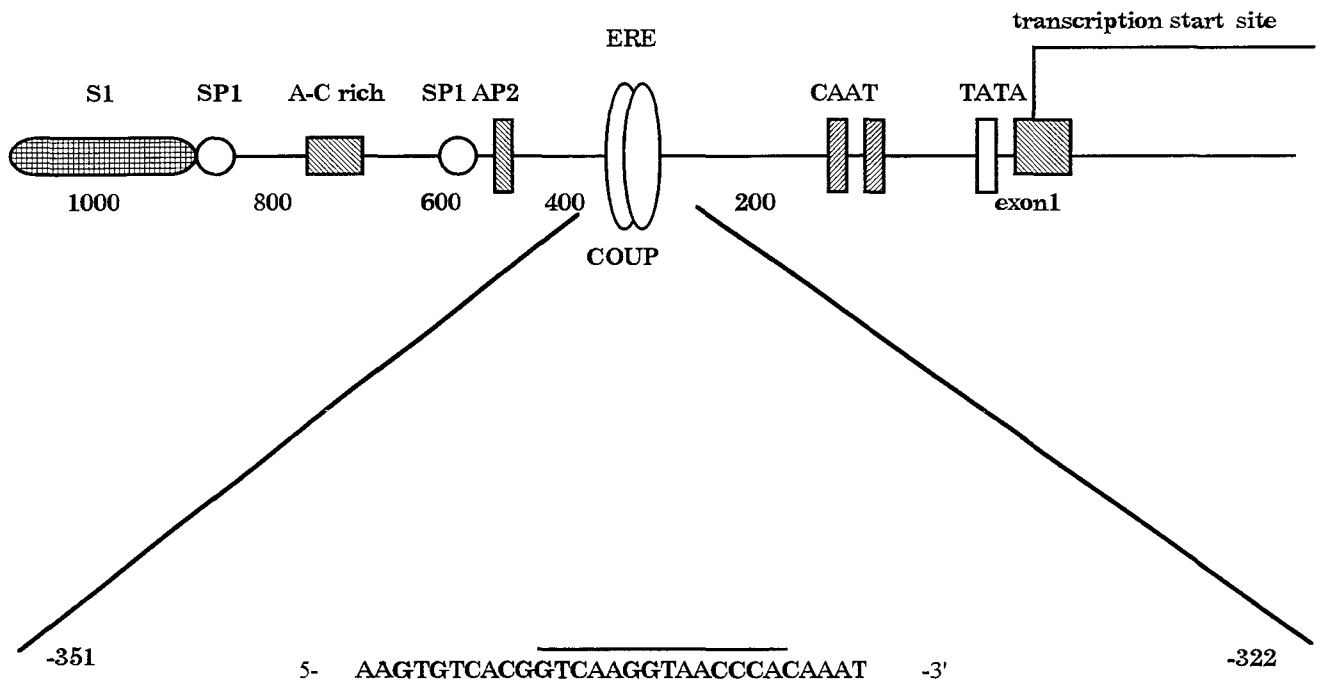
Après de nombreuses études réalisées *in vitro*, l'expression de la lactotransferrine a été étudiée *in vivo* dans l'utérus de souris lors du cycle hormonal naturel (Walmer *et al.*, 1992 ; Newbold *et al.*, 1992). Au début du cycle, le taux de messagers de la lactotransferrine est faible, il y a très peu de protéines dans les cellules épithéliales utérines et pas du tout dans le

fluide luminal utérin. 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 caractérisation du promoteur du gène codant la lactotransferrine de souris (Liu & Teng, 1991) a mis en évidence la séquence consensus ERE (Fig. 1) 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 & 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 partie 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.

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 stimulateur en réponse à l'action des 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.



**Figure 1** : Représentation schématique des éléments régulateurs putatifs de la région 5' flanquante du gène de la lactotransferrine de souris (Liu & Teng, 1992)

## 2. Distribution tissulaire et cellulaire

### a) *La lactotransferrine provenant de la cellule épithéliale*

#### α) La lactotransferrine du lait

Une protéine fixant du fer a été décrite dans le lait pour la première fois par Sørensen en 1939 et a été isolée du lait de femme (Montreuil & Mullet, 1960 ; Montreuil *et al.*, 1960 ; Jøhannson, 1960) et du lait de vache (Blanc & Isliker, 1961 ; Grove, 1960). Un bon nombre d'études ultérieures ont montré que la lactotransferrine et la sérotransferrine étaient toutes les deux présentes dans le lait, mais à des concentrations variant selon les espèces (Masson & Heremans, 1966 ; Nagasawa *et al.*, 1972 ; Underwood, 1977 ; Suzuki *et al.*, 1977 ; Lønnerdal & Forsum, 1985). La lactotransferrine a longtemps été considérée comme le principal transporteur de fer du lait. Mais, comme nous le décrivons dans les tableaux I et II, il existe une relation inverse, d'une part, entre la concentration du fer et la concentration en lactotransferrine et, d'autre part, entre la concentration en lactotransferrine et en transferrine sérique pour les différentes espèces étudiées. Ainsi, le lait de femme qui est riche en lactotransferrine est particulièrement pauvre en fer alors que le lait de lapin riche en fer et en sérotransferrine est pauvre en lactotransferrine. De fait, des études récentes ont permis d'établir que la lactotransferrine est présente dans le lait sous la forme apo, c'est-à-dire non saturée en fer (Lønnerdal & Forsum 1985).

**Tableau I.** Concentration en fer de la lactotransferrine chez différentes espèces animales (Fransson *et al.*, 1983)

Fer (µg/ml)	Espèces
0.3-0.6	Femme, vache, chèvre
1.4-2.4	Truie
2.0-4.0	Lapine
3.0-14	Rate, chienne

**Tableau II.** Concentrations en lactotransferrine et en sérotransferrine dans le lait de différentes espèces animales (Fransson *et al.*, 1983)

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Lactotransferrine	Sérotransferrine
<50	Rate, lapine, chienne	Femme, chienne
20-200	Vache, chèvre, truie	Truie, vache, chèvre, jument
200-2000	Cochon d'Inde, souris, jument	Cochon d'Inde, souris
>2000	Femme	Lapine, rate

$\beta$ ) La lactotransferrine dans les liquides biologiques

La lactotransferrine est présente dans la plupart des milieux d'excrétion et les sécrétions. La présence de lactotransferrine a été observée dans la salive, la bile, le suc pancréatique et les sécrétions de l'intestin grêle de nombreuses espèces incluant l'homme. La lactotransferrine se trouve aussi dans la plupart des mucus : les sécrétions bronchiques (Biserte *et al.*, 1963) et les sécrétions vaginales, nasales et intestinales (Masson, 1970) dans lesquelles elle est systématiquement associée à des IgA de sécrétion au lysozyme et à un facteur antitrypsique (pour revue générale, voir Montreuil *et al.*, 1985).

$\chi$ ) La lactotransferrine membranaire

Les produits de glycosylation non enzymatique des protéines (AGEs) qui sont très importants chez les sujets diabétiques se fixent sur les cellules endothéliales par l'intermédiaire de 2 protéines membranaires de 35 kDa et de 80 kDa de masse moléculaire. Cette dernière n'a pas formellement été identifiée, mais elle possède la masse moléculaire de la lactotransferrine, elle est révélée par les anticorps anti-lactotransferrine et sa séquence N-terminale de 20 acides aminés est identique à la lactotransferrine (Schmidt *et al.*, 1992).

**b) La lactotransferrine provenant des leucocytes**

$\alpha$ ) La lactotransferrine leucocytaire

La lactotransferrine est présente dans les leucocytes neutrophiles polymorphonucléaires (Masson *et al.*, 1969) où elle est localisée dans les granules secondaires des cellules ne possédant pas de myéloperoxydase.

$\beta$ ) La lactotransferrine sérique

La concentration plasmatique normale en lactotransferrine est très faible (0,4 à 2 $\mu\text{g/ml}$ )

comparativement à celle de la sérotransferrine (environ 2 à 3,5 mg/ml). Cette faible concentration est une conséquence de la courte durée de demi-vie de la lactotransferrine. Cette concentration peut considérablement augmenter dans certains cas pathologiques : elle atteint, par exemple, 12 à 22 µg/ml dans les cas de leucémie myéloïde chronique (Bennett & Mohia, 1976). Cette lactotransferrine plasmatique provient de la dégranulation des leucocytes polymorphonucléaires (Rado *et al.*, 1984).

### c) *La lactotransferrine utérine*

La lactotransferrine constitue la protéine majeure produite par les cellules utérines de souris soumises aux oestrogènes (Teng *et al.*, 1986 ; Pentecost & 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 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 joue un rôle important lors des processus de reproduction.

### 3. Les lactotransferrines recombinantes

Les ADNc codant la lactotransferrine humaine ont été exprimés dans les cellules BHK, dans des cellules végétales, les champignons *Aspergillus* et tout récemment par transgénèse chez la souris. La lactotransferrine humaine a été exprimée dans les cellules BHK 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'-(acetyl-β-glucosaminyl)-asparagine amidase). Les résultats obtenus lors des 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 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. Plus récemment, l'expression de la lactotransferrine humaine a été réalisée chez la souris transgénique. La lactotransferrine exprimée, à des taux de 15 mg/ml, est identique à celle du lait de femme (Platenburg *et al.*, 1994). Enfin, la lactotransferrine vient d'être exprimée dans des cellules du tabac (*Nicotiana tabacum*) où elle augmente la résistance vis à vis de bactéries pathogènes (Mitra & Zhang, 1994).

## **B. Structure de la lactotransferrine**

### **1. Séquence de la chaîne peptidique**

Les transferrines présentent un ensemble de caractères communs dont le principal est celui d'être des glycoprotéines monocaténares et bilobées, possédant une masse moléculaire voisine de 80000 daltons et de fixer réversiblement deux ions ferriques en prenant une coloration rose saumon ( $\epsilon_{465_{nm}} = 4500 \text{ mol}^{-1}/\text{l}^1/\text{cm}^{-1}$ ).

#### **a) Séquence de la chaîne peptidique**

##### **$\alpha$ ) Séquence primaire**

La séquence complète en acides aminés de la lactotransferrine humaine (Fig. 2) a révélé 59 % d'homologie interne, c'est-à-dire d'homologie entre les moitiés N-et C- terminales de la protéine (Metz-Boutigue *et al.*, 1984). Cette séquence a été revue et corrigée selon les observations cristallographiques (Anderson *et al.*, 1989) et récemment, trois séquences complètes de lactotransferrine ont été décrites par clonage de l'ADNc : celles de l'homme (Rey *et al.*, 1990 ; Powell & Ogden, 1990), de la souris (Pentecost & Teng, 1987 ; Shirsat *et al.*, 1992), de la vache (Mead & Tweedie, 1990 ; Goodman & Schanbacher, 1991), et du porc (Alexander *et al.* 1992), cette dernière ayant également été déterminée dans notre laboratoire (Pierce *et al.*, 1991). La lactotransferrine humaine est constituée de 692 résidus d'acides aminés et possède une masse moléculaire de 80,6 kDa (Rey *et al.*, 1990).

```

1      2      30
N-t  G R R R S V Q W C A V S N P E A T K C F Q W Q R N M R K V R G P
C-t  A R R A R V V W C A V G E Q E L R K C N Q W S G L S E - - - G
      341      370

N-t  P V S C L 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
C-t  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 D G G Y V

N-t  Y E A G L A P Y K I R P V A A E V Y G T E - - - - - R
C-t  Y T A G K C - - G I V P V L A E N Y K S Q Q S S D P D P N C V D

N-t  Q P R T H Y Y A V A V V K K G G - S F Q L N E L Q G L K S C H T
C-t  R P V E G Y L A V A V V R R S D T S L T W N S V K G K K S C H T

N-t  G L R R T A G W N V P I G T I R P F L N W T G P P E P I E A A V
C-t  A V D R T A G W N I P M G L I F N Q T G S C - - - - - K F

N-t  A R F F S A S C V P G A D K G Q F P N L C R L C A G T - - G E N
C-t  D E Y F S Q S C A P G S D P R - - S N L C A L C I G D E Q G E N

N-t  K C A F S S Q E P Y F S Y S G A F K C L K D G A G D V A F I R E
C-t  K C V P N S N E R Y Y G Y T G A F R C L A E N A G D V A F V K D

N-t  S T V F E D L S D E - - - - - A D R D Q Y E L L C P D N T
C-t  V T V L Q N T D G N N N E A W A K D L K L A D F A L L C L D G K

N-t  R K P V D K F K D C H L A R V P S H A V V A R S V N G K E D A I
C-t  R K P V T E A R S C H L A M A P N H A V V S R M - - D K V E R L

N-t  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 K
C-t  K Q V L L H Q Q A K F G R N G S D C P D K F C L F Q S E - - T K

N-t  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
C-t  N L L F N D N T E C L A R L H G K T T Y E K Y L G P Q Y V A G I

      330
N-t  Q N L R K S E E E V A
C-t  T N L K K C S T S P L L E A E P L R K
      670

```

Figure 2 : Alignement de la séquence peptidique de la lactotransferrine humaine (Metz-Boutigue *et al.*, 1984 ; Rey *et al.*, 1990)



## β) Homologies séquentielles

L'alignement de toutes les séquences de transferrine actuellement déterminées sur celle de la transferrine sérique (Baldwin, 1993) montre que 84 résidus sont conservés (homologie de 12%). Parmi ceux-ci, on trouve à côté des résidus de cystéine, les ligands Asp 63, Tyr 95 et 188 du site polyanionique, ceux impliqués dans la fixation du métal et l'Arg 124.

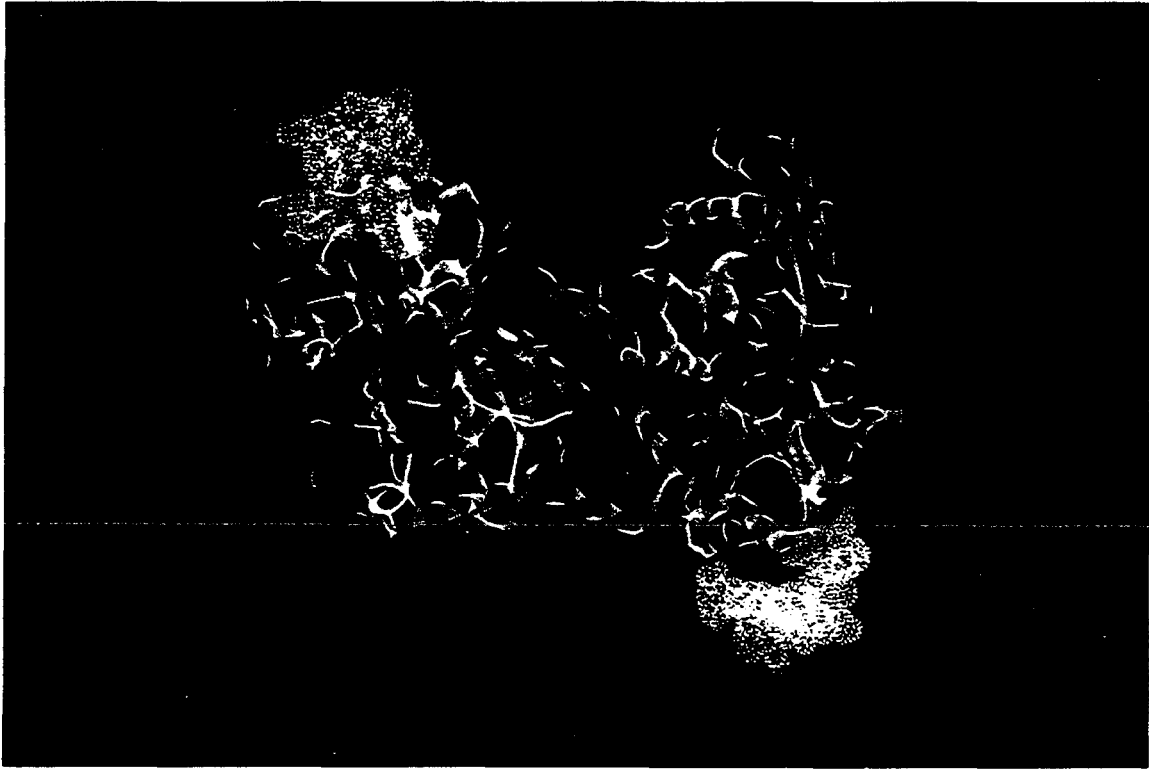
La lactotransferrine présente en outre des analogies séquentielles avec la 65 kDa "heat shock protein" mycobactérienne et les protéines du MHC de classe II (Aguas *et al.*, 1991 ; Esaguy *et al.*, 1991).

## b) *Structure tridimensionnelle de la lactotransferrine*

### α) Repliement de la chaîne polypeptidique

Parmi les lactotransferrines, seules les lactotransferrines humaine et bovine ont été cristallisées et analysées par diffraction des rayons X, dans le laboratoire de E.N. Baker (Nouvelle-Zélande). Comme le montre la figure 3, la lactotransferrine humaine possède une forme bilobée, le lobe N-terminal comprenant les résidus 1 à 332 et le lobe C-terminal comprenant les résidus 344 à 692. L'existence des deux lobes N- et C-terminaux qui constituent la lactotransferrine avait déjà été suspectée par l'observation des homologies de séquences internes de la molécule et par hydrolyse enzymatique ménagée de la protéine qui libère deux fragments de 30 et 50 kDa correspondant aux deux moitiés N- et C-terminales de la lactotransferrine (Mazurier *et al.*, 1980 ; Legrand *et al.*, 1984, 1986). Les deux lobes sont reliés par une hélice  $\alpha$  de trois tours de spire et chacun porte un site de fixation du fer (Fig.4).

La molécule possède un axe de symétrie par rapport auquel le lobe N-terminal subit une rotation de  $180^\circ$ , suivie par une translation de 25 Å. Une zone de contact existe entre les deux lobes. Cette zone de contact serait le siège des interactions inter-lobes qui ont été mises en évidence dans notre laboratoire (Legrand *et al.*, 1986). Chaque lobe de la lactotransferrine humaine est constitué de deux domaines d'environ 160 résidus d'acides aminés chacun, le site de fixation du fer étant situé à l'interface des deux domaines. Les deux domaines possèdent la même organisation structurale basée sur l'alternance de structures en feuillets plissés  $\beta$  et de structures en hélice  $\alpha$ . Le premier domaine (appelé N-I pour le lobe N-terminal et C-I pour le lobe C-terminal) est constitué des extrémités N- et C-terminales de chaque moitié de lactotransferrine, tandis que le second domaine (appelé N-II ou C-II) est constitué de



**Figure 3 :** Modélisation moléculaire de la lactotransferrine humaine réalisée d'après les données cristallographiques d' Anderson *et al.* (1987, 1989)

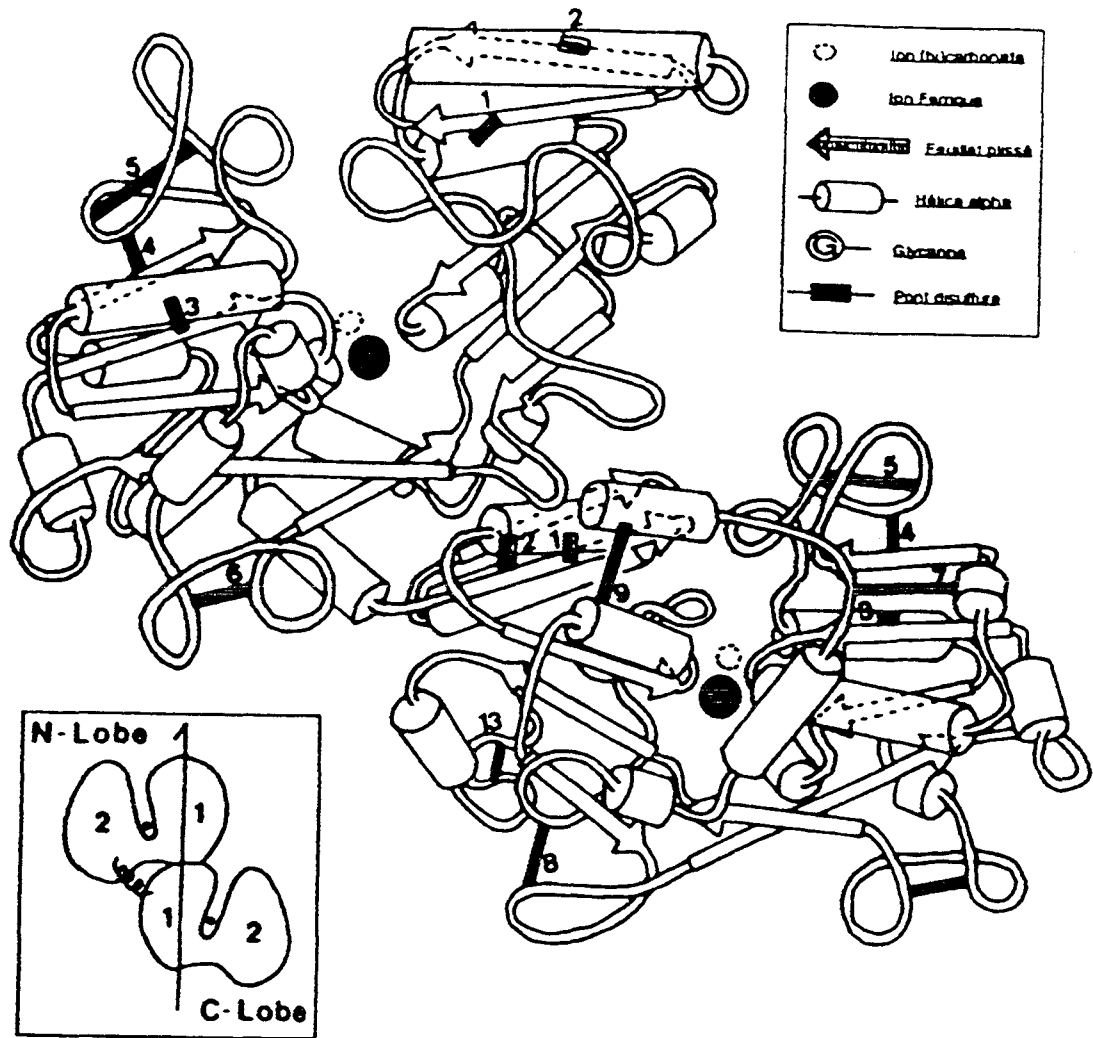


Figure 4 : Schéma de la structure 3 D de la lactotransferrine d'après la structure obtenue par diffraction des rayons X (résolution 2,5 Å)(Anderson *et al.*, 1987, 1989)

la partie médiane de la chaîne peptidique (Legrand *et al.*, 1986). Le domaine N-I de la lactotransferrine humaine est mobile, il peut pivoter de 30° par rapport au domaine N-II. Cette rotation s'effectue autour des résidus His 91 et Pro 251 localisés dans la région interdomaine entre 2 feuillets plissés  $\beta$  et 2 hélices  $\alpha$  (Anderson *et al.*, 1990), ce qui fait que la lactotransferrine peut adopter 2 conformations : une conformation ouverte préférentiellement rencontrée dans l'apo-protéine et une conformation fermée préférentiellement rencontrée avec la ferri-protéine.

## β) Homologie structurale de la lactotransferrine

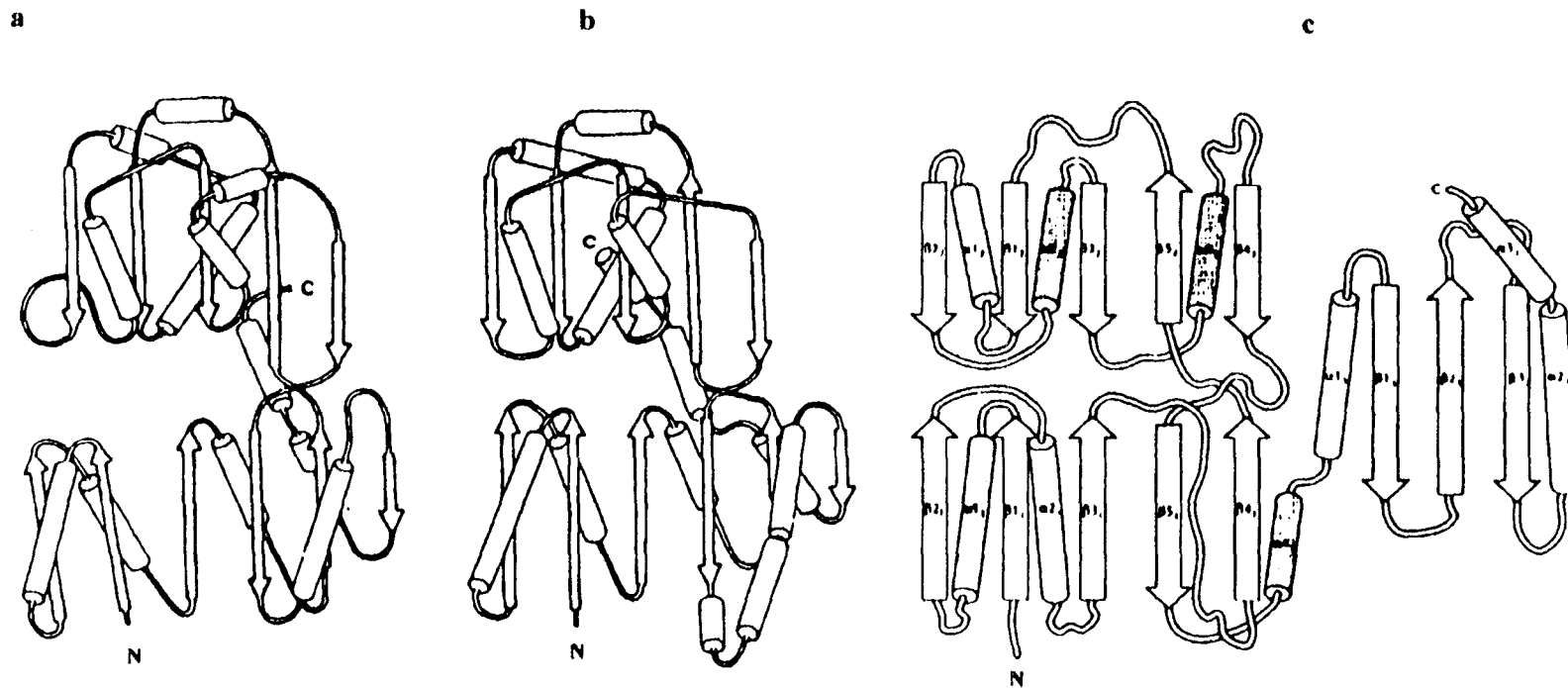
### i) Homologie avec la sérotransferrine

Toutes les structures de transferrine actuellement déterminées montrent que le repliement de la chaîne peptidique est identique (Baldwin, 1993). Les différences rencontrées dans les régions les plus conservées concernent les feuillets plissés  $\beta$  internes, les deux hélices 5 et 7 et la face interne de l'hélice 9. Par contre, l'homologie à la surface de la protéine est localisée à de petites zones, la boucle entre le feuillet plissé  $\beta$  et l'hélice 7 et celle entre les 2 feuillets plissés i et j (Fig. 4).

### ii) Homologie conformationnelle

Les protéines de transport des polyanions ont comme point commun de posséder une poche de fixation du ligand située à l'interface de 2 domaines structuraux. Jusqu'à présent elles regroupent les transferrines, les récepteurs périplasmiques de groupe II : les transporteurs de sulfate, phosphate, maltodextrine, lysine/arginine/ornithine ainsi que la porphobilinogène désaminase.

Ces protéines ne présentent pas d'homologies séquentielles mais possèdent la même structure tridimensionnelle (Fig. 5). Les deux domaines sont reliés par 2 segments inter-domaine de liaison. Chaque domaine est composé d'éléments de structure secondaire hélice  $\alpha$  et feuillet plissé  $\beta$  parallèles identiques. Les segments de structure organisée ont la même longueur, et la courbure ainsi que l'arrangement des feuillets plissés  $\beta$  sont identiques. De plus, l'un des éléments structuraux, le domaine  $\beta$ 41 présente toujours la même cassure. Quelques éléments comme les boucles connectant chaque segment structural, l'orientation des hélices  $\alpha$  par rapport à la surface des feuillets plissés  $\beta$  et l'orientation des domaines 1 et 2 l'un par rapport l'autre, différencient ces protéines. Un troisième domaine, qui suit la dernière hélice  $\alpha$



**Figure 5 :** Comparaison de la structure secondaire et du repliement du lobe Nt de la lactotransferrine (a), des transporteurs de sulfate (b) et du porphobilinogène (c) (Louie, 1993 ; Baker *et al.*, 1987)

( $\alpha$ 41) du domaine 2, est plus ou moins important et peut même être absent comme dans le cas des transporteurs de lysine/arginine/ornithine. Toutes ces protéines fixent un métal par l'intermédiaire d'un ion carbonate ou un ligand oxyaminé (Baldwin, 1993).

Bien qu'elles ne possèdent pas d'homologie séquentielle, elles ont toutes les mêmes résidus d'acides aminés essentiels à leur fonction de transporteur localisés en position homologue (tableau III). Il s'agit d'un résidu d'acide aspartique, d'un résidu d'histidine sur la boucle joignant le feuillet plissé  $\beta$  31 et l'hélice  $\alpha$  31, et d'un résidu sérine et d'arginine situés en début et en bout de l'hélice  $\alpha$  12. Cette homologie structurale entre ces protéines d'origine aussi diverse suggère qu'elles sont le résultat d'un processus d'évolution divergente. Elles ont pour origine un motif monomérique (Baker *et al.*, 1987 ; Baldwin, 1993).

### c) *Structure du site de reconnaissance des molécules et des récepteurs*

Les interactions entre la lactotransferrine et ses différentes cellules cibles s'effectue par l'intermédiaire de plusieurs récepteurs, décrits page 51, différemment exprimés suivant le type cellulaire.

#### $\alpha$ ) Zone d'interaction avec le récepteur lymphocytaire

La localisation du site d'interaction de la lactotransferrine humaine avec le récepteur de lymphocyte humain activé a été réalisée (Fig. 6). Dans un premier temps, l'étude de la fixation de différents fragments protéolytiques, obtenus par protéolyse ménagée de la lactotransferrine (parmi les fragments utilisés : lobe N-t, lobe C-t, fragment N-II et domaine 6 kDa du lobe N-t) a montré que seul le fragment N-terminal de la protéine était capable de se fixer sur le récepteur (Rochard *et al.*, 1989). L'hydrolyse ménagée du fragment N-terminal a conduit à l'obtention de nombreux peptides dont le 6 kDa a permis une inhibition significative de la fixation de la lactotransferrine sur son récepteur : le peptide 6 kDa est localisé entre les résidus 4 à 52 de la molécule. Ce site de fixation est constitué de 2 feuillets plissés  $\beta$ , 2 boucles (octodécapeptide et KRDS) accessibles aux structures reliées par 1 boucle  $\alpha$ . Ces résultats préliminaires sont confirmés par l'étude de l'interaction de la lactotransferrine modifiée et les cellules Jurkat. La fixation de FITC sur le résidu Lys-264 ou la fixation du SASD sur le résidu Lys-74 modifient les propriétés de fixation du ligand sur son récepteur en masquant la région 4-52 de la molécule. L'analyse par modélisation moléculaire de la zone 4-52 de la protéine suggère que deux zones (résidus 28-34 et 38-45) sont probablement impliquées dans le site d'interaction avec le récepteur lymphocytaire (Legrand *et al.*, 1991, 1992).

**Tableau III.** Eléments structuraux communs aux protéines bidomaines de fixation (Baldwin, 1993)

PROTEINES

	PBGD	LTF-N-t	LTF-C- t	Tf-N-t	MBP	SBP	PBP
Eléments de structure impliqués dans la fixation							
Ligand	Carboxylate	Carbonate (Fe <sup>3+</sup> )	Carbonate (Fe <sup>3+</sup> )	Carbonate (Fe <sup>3+</sup> )	Maltodextrine	Sulfate	Phosphate
hélices $\alpha$	$\alpha_1, \alpha_2, \alpha_2$	$\alpha_2$	$\alpha_2$	$\alpha_2$		$\alpha_1, \alpha_2, \alpha_2$	$\alpha_2, \alpha_2, \alpha_2$
sérine ( $\alpha_2$ )	Ser129	Thr117	Thr461	Thr 120		Ser130	Ser139
arginine ( $\alpha_2$ )	Arg131	Arg121	Arg465	Arg124		Arg134	Arg135
aspartate ( $\beta_3/\alpha_3$ )	Asp84	Asp60	Asp395	Asp63	Asp65	Asp68	Asp56
Rôle de l'aspartate	Catalyse	Coordination du métal	Coordination du métal	Coordination du métal	Pont hydrogène avec hydroxyles du sucre	Pont salin avec Arg134	Pont hydrogène avec le phosphate

PBGD : Porphobilinogène desaminase

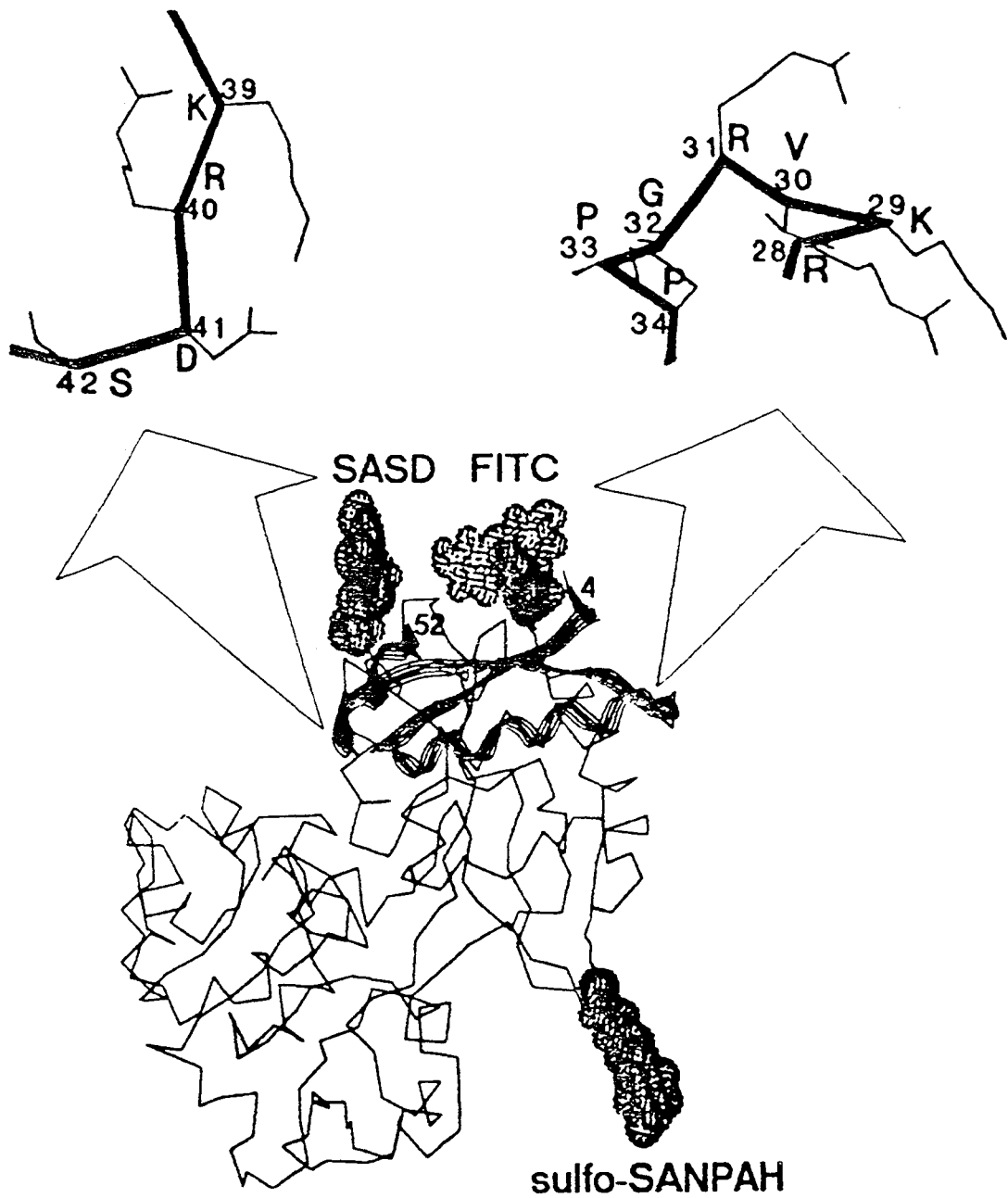
MBP : Transporteur de maltodextrine

SBP : Transporteur de sulfate

LTF-N-t/C-t : Lobe N- ou C-terminal de la lactotransferrine

PBP : Transporteur de phosphate

Tf-N-t : Lobe N-terminal de la transferrine sérique



**Figure 6** : Détail du site d'interaction de la lactotransferrine avec le récepteur lymphocytaire (Legrand *et al.*, 1991, 1992)



β) Zone d'interaction avec les protéoglycannes (GAGs)

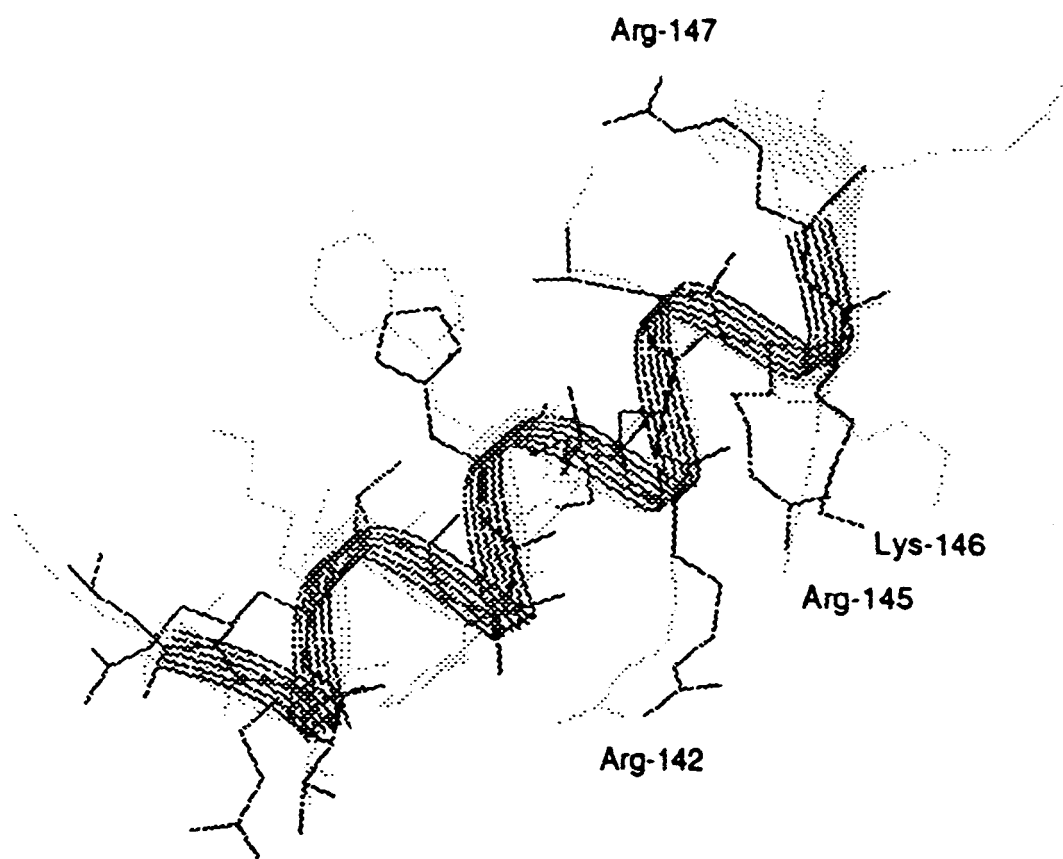
La lactotransferrine peut se fixer aux polysaccharides anioniques. Cette propriété a été utilisée pour purifier la lactotransferrine par chromatographie sur héparine-Sepharose et sur les GAGs sulfatés (glycosaminoglycannes) (Blackberg & Hernell, 1980). Plus récemment, la chromatographie d'affinité de la lactotransferrine sur GAGs a été réalisée (Zou *et al.*, 1992). Il a été établi que les GAGs se fixent sur une région de la lactotransferrine humaine qui a été localisée dans les 33 premiers résidus (GRRRRS séquence et RKVR séquence à la position 28-31) de cette protéine. Cette région contient deux clusters de résidus basiques qui constituent les sites putatifs de la liaison à l'héparine, sites que l'on retrouve sur d'autres protéines (Mann *et al.*, 1994).

χ) Zone d'interaction avec les récepteurs des apolipoprotéines de faible densité (LRP)

Une analyse de la séquence de l'apo E et de la lactotransferrine a permis à Huettinger *et al.* (1988, 1992) de montrer que le site de reconnaissance du récepteur de l'apo E: Arg-X-X-Arg-Lys-Arg (résidus 142-147) était en partie retrouvée dans la lactotransferrine: Arg-X-X-Arg-Lys-Val (résidus 25-30). Nous avons repris cette étude en comparant la structure 3D du site de reconnaissance du récepteur de l'apo E avec la structure 3D de la lactotransferrine. Comme le montre la figure 7, la région 16-32 de la lactotransferrine est très homologue dans sa conformation (hélice  $\alpha$ ) à la région 137-148 de l'apo E avec une superposition presque exacte des résidus Arg (142), Arg (145), Arg (147) du site actif. Cette homologie séquentielle et conformationnelle peut rendre compte de l'affinité de la lactotransferrine pour le récepteur LRP dans les cellules parenchymateuses isolées du foie de rat (Efremov, communication personnelle).

## 2. Site de fixation du métal

La lactotransferrine (Fig. 8), comme la sérotransferrine, est connue pour fixer avec une affinité de l'ordre de  $10^{32}$  deux ions ferriques par molécule, simultanément avec deux ions carbonates (Aisen & Listowsky, 1980). Le métal est fixé à l'interface des domaines N-I et N-II dans le lobe N-terminal et des domaines C-I et C-II dans le lobe C-terminal. Les ligands histidine, tyrosine et arginine, sont localisés sur les domaines N-II et C-II et le résidu d'acide aspartique est localisé sur les domaines N-I et C-I. Le fer réalise un pontage entre les 2 domaines et stabilise la molécule qui devient très résistante à la dénaturation et à la protéolyse



**Figure 7 :** Superposition de la chaîne peptidique principale et des chaînes latérales du site de reconnaissance du récepteur de l'apolipoprotéine E (⋯) avec le domaine N-terminal de la lactotransferrine (—) montrant leur homologie

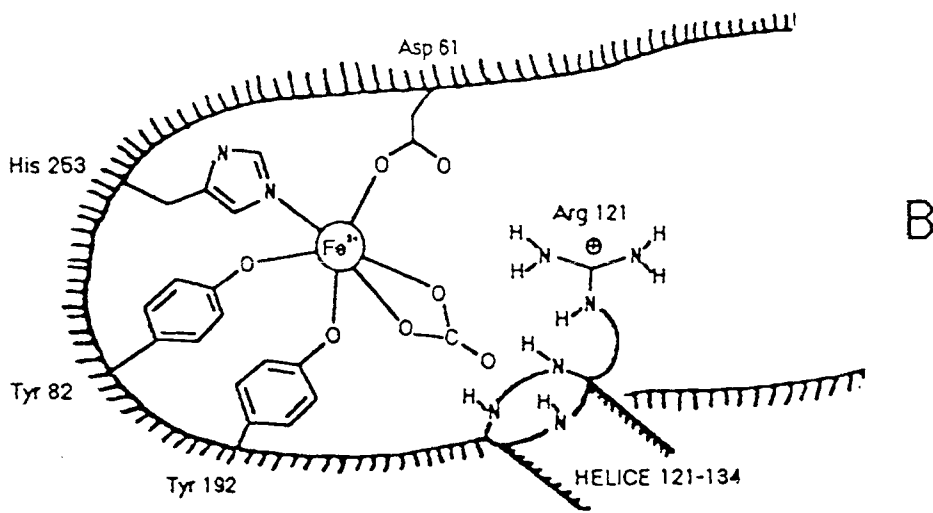


Figure 8 : Détail de la structure du site de fixation du métal des lactotransferrines (Baker *et al*, 1987)

(Spik & Montreuil, 1966 ; Montreuil, 1980 ; Mazurier *et al.*, 1983a ; Metz-Boutigue *et al.*, 1984 ; Anderson *et al.*, 1987, 1989 ; Baker *et al.*, 1987 ; Legrand *et al.*, 1988).

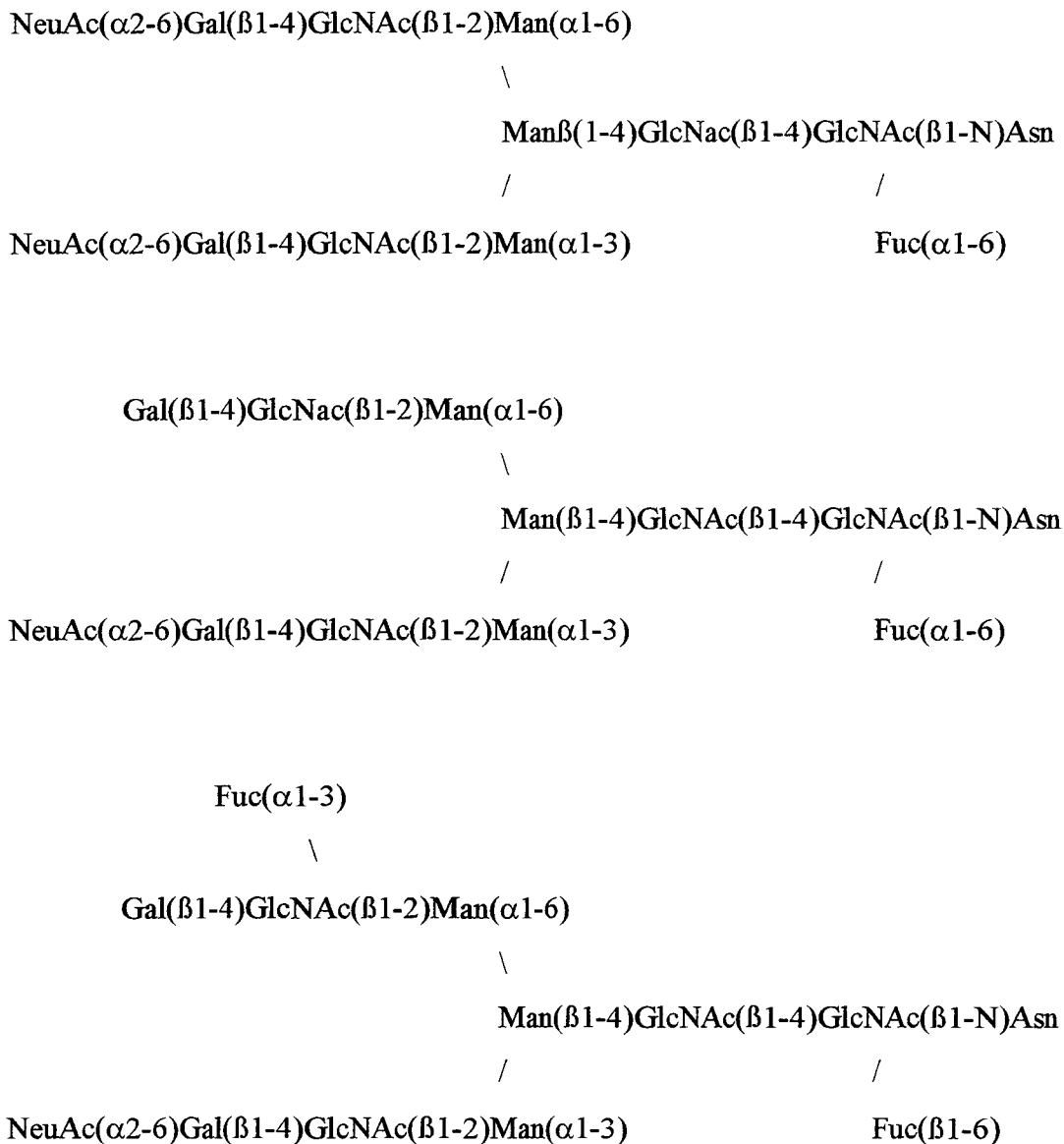
L'affinité de fixation du fer par la lactotransferrine est 260 fois plus forte que celle de la sérotransferrine (Aisen & Leibman, 1971 ; Aisen & Listowsky, 1980) ce qui suggère que la lactotransferrine fixe le fer préférentiellement à la sérotransferrine lorsque les deux protéines sont présentes (Aisen & Listowsky, 1980), mais l'apolactotransferrine ne déplace pas le fer de la sérotransferrine. La structure tridimensionnelle des sites de fixation du fer est identique pour la sérotransferrine et la lactotransferrine, la lactotransferrine conserve particulièrement bien son fer à pH acide (Montreuil *et al.*, 1960) il est nécessaire de descendre à pH voisin de 2,5 pour désaturer complètement la lactotransferrine humaine (Montreuil *et al.*, 1960 ; Princiotta & Zapolski, 1975 ; Lestas, 1976 ; Mazurier & Spik 1980).

### 3. Structure des glycannes

#### a) Structure primaire des glycannes

De nombreuses études sur la structure primaire des glycannes de transferrines ont été réalisées dans notre laboratoire. Une grande diversité a été mise en évidence, d'une part, au niveau du nombre et de la localisation des sites des glycosylations et, d'autre part, au niveau de la structure primaire des glycannes entre les différentes espèces (Spik *et al.*, 1982, 1988, 1993). La lactotransferrine humaine isolée du lait de femme possède deux glycannes de type N-acétyllactosaminique, sialylés et fucosylés en  $\alpha$ -1,6 sur la N-acétylglucosamine du point d'attache et parfois en  $\alpha$ -1,3 sur la N-acétylglucosamine de l'antenne liée en  $\alpha$ -1,6 (Fig. 9). Ils sont localisés dans les domaines N-II et C-II. Il existe une importante microhétérogénéité liée au nombre variable d'acide sialique, à la présence ou à l'absence de fucose et à la polyantennarisation (Spik *et al.*, 1982). Les glycannes de la lactotransferrine humaine isolée du leucocyte sont biantennés et dépourvus de résidus de fucose (Derisbourg *et al.*, 1990).

La structure primaire des glycannes de la lactotransferrine bovine a également été déterminée (Coddeville *et al.*, 1992). Elle a révélé une plus grande hétérogénéité par rapport aux lactotransferrines humaines avec la coexistence de structures oligomannosidiques et de structures N-acétyllactosaminiques. De plus, certaines structures N-acétyllactosaminiques possèdent des antennes particulières avec la séquence Gal ( $\alpha$ 1-3) Gal ( $\beta$ 1-4) GlcNAc ( $\beta$ 1-2) branchée sur le résidu de mannose ( $\alpha$ 1,6) ou la séquence GalNAc ( $\beta$ 1-4) GlcNAc ( $\beta$ 1-2) branchée sur le résidu de mannose ( $\alpha$ 1,3), ces séquences pouvant être substituées par un résidu d'acide N-acétyl neuraminique en ( $\alpha$ -2,6).



**Figure 9 :** Séquence des glycanes de la lactotransferrine humaine (Spik *et al.*, 1982)

### *b) Structure tri-dimensionnelle*

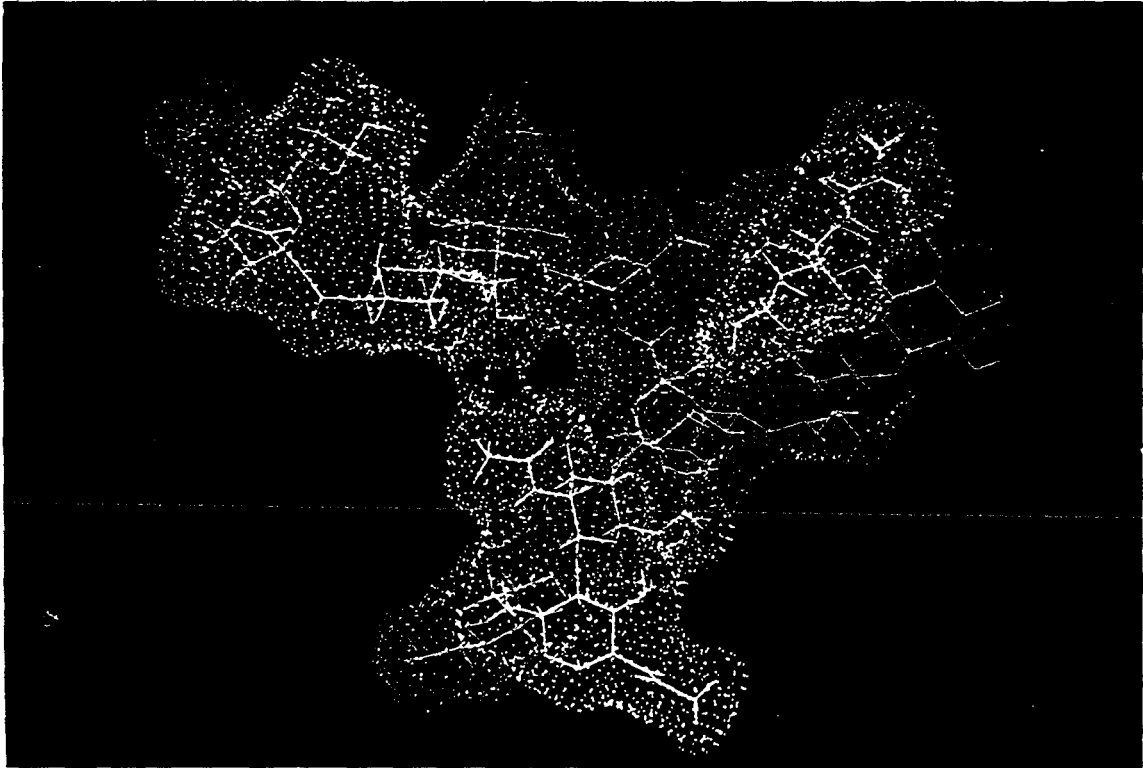
Concernant les deux glycanes de la lactotransferrine humaine, la diffraction des rayons X a permis de visualiser les 2 premiers résidus de N-acétyl glucosamine et le résidu de mannose (Baker, communication personnelle). Le reste de la molécule de glycanne, noyau trimannosidique et antennes, n'est pas visible. L'absence de diffraction de la fraction glycanne est due soit à la microhétérogénéité des séquences soit à la mobilité des glycanes. Les récents travaux réalisés en collaboration avec le laboratoire de C. Cambillau ont permis d'obtenir une diffraction des glycanes de la lactotransferrine (Fig. 10) lorsqu'ils sont immobilisés par la lectine *Lathyrus ochrus* (Bourne *et al.*, 1992, 1994). Ces résultats démontrent sans ambiguïté que les glycanes de la lactotransferrine ne possèdent pas, contrairement à la partie protéique, de structure organisée. Leur position sur la molécule (résidus 138 et 479) indique qu'ils se trouvent à l'opposé des canaux menant aux sites de fixation du fer.

### *c) Sites de glycosylation*

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

## *C. Rôles de la lactotransferrine*

Bien que la structure de la lactotransferrine soit très semblable à celle de la sérotransferrine, les fonctions de ces deux protéines sont profondément différentes (Iyer & Lönnnerdal, 1993 ; Sanchez *et al.*, 1992). La sérotransferrine est surtout synthétisée par l'hépatocyte et sécrétée dans le plasma, tandis que la lactotransferrine est élaborée par les cellules des épithéliums glandulaires et par les leucocytes neutrophiles polymorphonucléaires. La concentration et la demi-vie plasmatiques de ces deux protéines sont également très différentes. La concentration plasmatique de la sérotransferrine est d'environ 2,5 mg/ml pour une demi-vie de plusieurs jours. Le taux de la lactotransferrine ne dépasse jamais 1µg/ml et sa demi-vie est exceptionnellement brève (quelques minutes). De plus, la transferrine sérique dans



**Figure 10 :** Modélisation moléculaire de la structure d'un glycanne de la lactotransferrine humaine après son immobilisation par la lectine *Lathyrus ochrus* (d'après Bourne *et al.* 1992, 1994).

des conditions physiologiques normales possède un taux de saturation en fer de l'ordre de 30 % contrairement à la lactotransferrine qui est principalement présente sous la forme apo c'est-à-dire non saturée en fer. La distribution et la quantité de fer transportée par ces deux protéines sont donc très différentes. La sérotransferrine est incontestablement le principal transporteur du fer pour l'ensemble des cellules de l'organisme. Ce qui n'est pas le cas de la lactotransferrine, qui joue plutôt un rôle de chélateur. Ainsi, par ses propriétés de chélatrice du fer, la lactotransferrine, soit isolée, soit en association avec d'autres produits de sécrétion, par exemple, IgA et lysozyme, joue un rôle important dans la protection des muqueuses et des sécrétions contre l'infection. Bien qu'aucune preuve n'ait été apportée, de nombreux arguments expérimentaux suggèrent fortement que la lactotransferrine pourrait moduler l'absorption intestinale du fer. Cependant, la lactotransferrine joue, sans qu'intervienne sa capacité à fixer le fer, un rôle important dans la myélopoïèse et la production des interleukines.

## 1. Rôle physiologique

### a) *Rôle de la lactotransferrine dans la prolifération cellulaire*

Une activité facteur de croissance de la lactotransferrine humaine a été mise en évidence sur des lignées lymphocytaires humaines B et T (Hashizume *et al.*, 1983, 1987) et vis-à-vis d'une lignée murine macrophagique (P388DI) (Oria *et al.*, 1988). Cette activité a également été décrite pour d'autres lignées cellulaires telles que la lignée HT-29 d'adénocarcinome de colon humain (Amouric *et al.*, 1984), la lignée BALB/C 3T3 de fibroblastes embryonnaires de souris (Azuma *et al.*, 1989) et la lignée myéloblastique L6 pour la lactotransferrine bovine (Byatt *et al.*, 1990) ainsi que pour les cellules isolées de cryptes de l'intestin de rat (Nichols *et al.*, 1987, 1989). Enfin, très récemment une inhibition de la croissance de cellules de glande mammaire par la lactotransferrine de vache vient d'être décrite (Hurley *et al.*, 1994), cette inhibition de la croissance cellulaire n'est pas observée avec la lactotransferrine humaine.

Le mécanisme d'action de la lactotransferrine est très controversé. Selon certains auteurs, la lactotransferrine agirait en apportant le fer nécessaire à la prolifération cellulaire (Azuma *et al.*, 1989). Pour d'autres auteurs, l'activité facteur de croissance de la lactotransferrine ne serait pas liée à la présence de fer, c'est la protéine elle-même qui agirait en tant que signal de prolifération (Oria *et al.*, 1988 ; Byatt *et al.*, 1990 ; Nichols *et al.*, 1990 ; Bi *et al.*, 1994). La lactotransferrine pourrait agir en tant qu'agent oxydant à la surface cellulaire. Sun *et al.* (1991) montrent que la lactotransferrine, comme la sérotransferrine, stimule une activité NADH-oxydo-réductase à la surface cellulaire. Les réactions d'oxydo-réduction au



niveau de la membrane plasmique et l'alcanisation du cytoplasme résultant de ce phénomène pourraient être responsables de l'activité facteur de croissance de la lactotransferrine. Il est à remarquer que dans de nombreux cas l'activité facteur de croissance est observée à de fortes concentrations en lactotransferrine. Quand l'activité facteur de croissance est décrite à faible concentration en lactotransferrine il s'agit de culture de cellules réalisée dans des milieux démunis de tout facteur de croissance. Elle ne s'observe plus en présence de transferrine sérique.

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

**b) *Rôle de la lactotransferrine dans la réponse inflammatoire***

**α) Rôle de la lactotransferrine dans la migration des cellules immunocompétentes sur le lieu de l'inflammation**

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

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

Au cours de l'inflammation, la modification d'un grand nombre de paramètres régulant le métabolisme du fer conduit à une diminution de la concentration plasmatique en fer (tableau

IV). L'hyposidérémie inflammatoire ainsi établie va permettre, par ferriprivation, de limiter la croissance bactérienne. L'injection intraveineuse d'apo-lactotransferrine chez le rat ou la souris

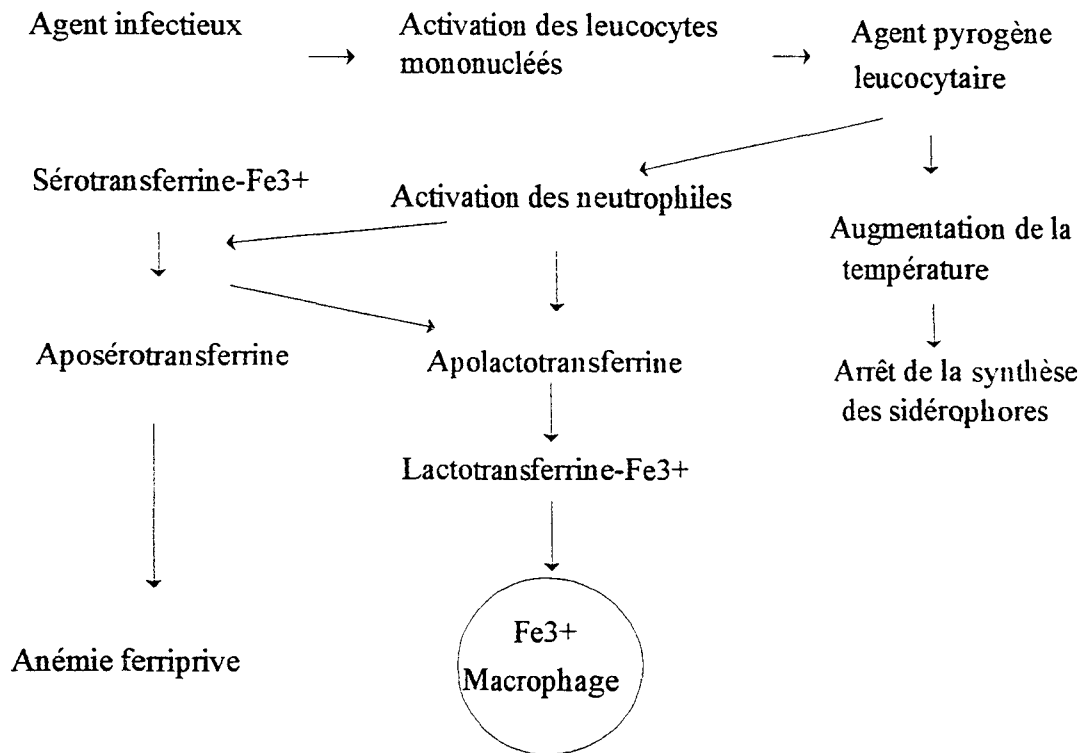
**Tableau IV.** Effet de l'inflammation sur le métabolisme du fer (De Sousa & Brock, 1989)

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

provoque une diminution de la concentration plasmatique en fer (Van Snick *et al.*, 1974 ; Sawatzki *et al.*, 1983), nous avons vu précédemment que l'apo-lactotransferrine contenue dans les granules secondaires des leucocytes polynucléaires était libérée dans le sang au moment d'une infection. L'apolactotransferrine, possédant à pH acide une capacité de fixation du fer très supérieure à celle de la transferrine sérique, pourrait capter le métal de celle-ci au niveau des sites inflammatoires (Van Snick *et al.*, 1974) (Fig. 11).

#### χ) Rôle de la lactotransferrine dans l'activité bactéricide des leucocytes

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



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

lactotransferrine est associée à des immunoglobulines de classe G1 ou A (Spik *et al.*, 1978 ; Stephens *et al.*, 1980).

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- 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).

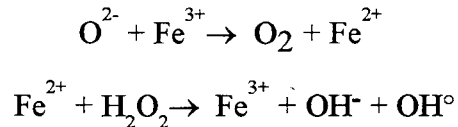
En 1991, Gado *et al.* ont expliqué l'absence d'activité bactéricide de la lactotransferrine vis à vis de certaines souches mutées d' *E.coli*. Ainsi, ils ont mis en évidence une corrélation entre l'absence de fixation de la lactotransferrine sur certaines bactéries mutées *E.coli* et la sensibilité de ces dernières aux colicines ; les colicines étant des bactériocines produites par certaines souches d' *E.coli*, différentes des premières (Konisky, 1982) capables de tuer *E. coli* en s'absorbant 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). De même, Bellamy *et al.* (1993) ont montré que l'addition 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 & Montreuil, 1983).

La lactotransferrine, par l'intermédiaire du fer qu'elle transporte, joue un rôle dans l'activité bactéricide des leucocytes polymorphonucléaires (Bullen & Armstrong, 1979). L'absence ou le faible taux de lactotransferrine intracellulaire, ainsi que la déficience en fer, provoque une diminution de cette activité bactéricide (Spitznagel *et al.*, 1972). Lors de la phagocytose d'une bactérie, la majeure partie de la lactotransferrine contenue dans les granules secondaires des leucocytes est libérée dans le milieu extérieur, le reste de la lactotransferrine des granules non dégradés est déversé dans les phagolysosomes (Leffel & Spitznagel, 1975). La majorité du fer libéré dans les phagolysosomes et dans le milieu de culture, après phagocytose d'*Escherichia coli* est retrouvée fixée à la lactotransferrine (Molloy & Winterbourn, 1990). Au cours de la phagocytose, les leucocytes polynucléaires consomment

une quantité accrue d'oxygène et le convertissent en anion superoxyde  $O^{2-}$  et en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ . L'association de ces deux composés conduit à la formation de radicaux libres qui induisent une peroxydation des lipides. L'ion ferrique intervient comme catalyseur de la réaction de Fenton en augmentant la vitesse de conversion de  $O_2$  en  $O^{2-}$  (Haber & Weiss, 1934).



Ambruso & Johnston (1981) ont montré que la lactotransferrine pouvait augmenter la production de radicaux libres par les neutrophiles humains grâce à l'apport du fer lié à la protéine et ainsi amplifier la réponse inflammatoire et la peroxydation des lipides. Mais ces résultats sont cependant très controversés. En effet, Gutteridge *et al.* (1981) ont observé que l'apo-lactotransferrine pouvait exercer un effet antagoniste en captant le fer et en évitant ainsi les dommages occasionnés aux leucocytes par ces radicaux. Cependant ils ont été confirmés par Bannister *et al.* en 1982 et par Klebanoff & Waltersdorff en 1990. La lactotransferrine pourrait piéger la membrane cellulaire des leucocytes et diriger les radicaux libres sur les membranes des bactéries à lyser (Ward *et al.*, 1983). Enfin, Winterbourn (1983) montre que la lactotransferrine saturée en fer n'augmente pas la production de radicaux libres. Seule l'addition d'agents complexant le fer, comme l'acide éthylène diamine tétraacétique, permettrait à la lactotransferrine d'être un catalyseur de la production de ces radicaux hydroxyles. Cependant Ismail & Brock (1993) viennent de démontrer que les cellules monocytaires de la lignée U937 fixent la lactotransferrine à la surface cellulaire et relâche le fer complexé dans le milieu extracellulaire.

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

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

Ce mécanisme est aujourd'hui abandonné en faveur d'un mécanisme d'action indirect de

la lactotransferrine (Fig 12). En effet, la lactotransferrine est sans effet lorsque les monocytes sont séparés des lymphocytes. La lactotransferrine agirait en inhibant la libération d'une monokine responsable, elle-même, de la libération de facteur GM-CSF par les lymphocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Bagby *et al.*, 1981, 1983a, b). Récemment, cette monokine a été identifiée à l'interleukine 1 (Bagby *et al.*, 1986 ; Zucali *et al.*, 1989).

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

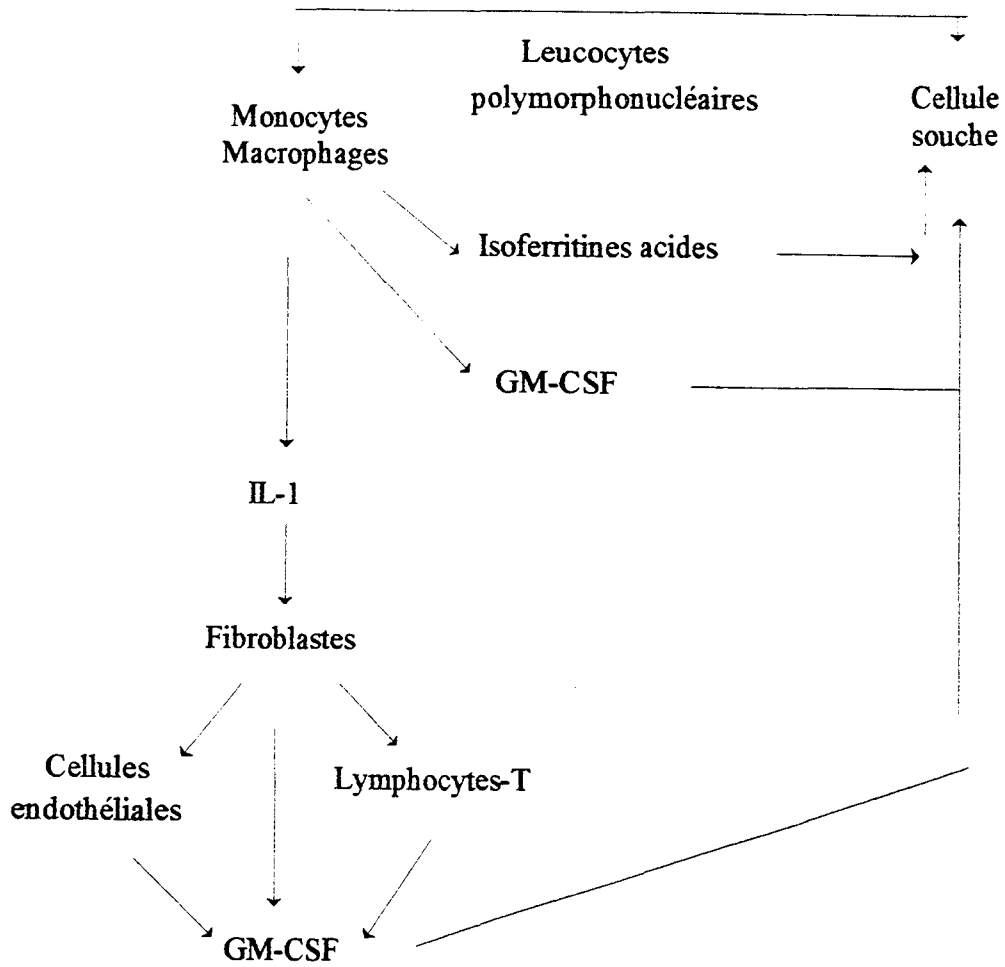
**d) Rôle de la lactotransferrine dans la réponse immunitaire**

**α) Rôle de la lactotransferrine dans la modulation de la synthèse d'anticorps**

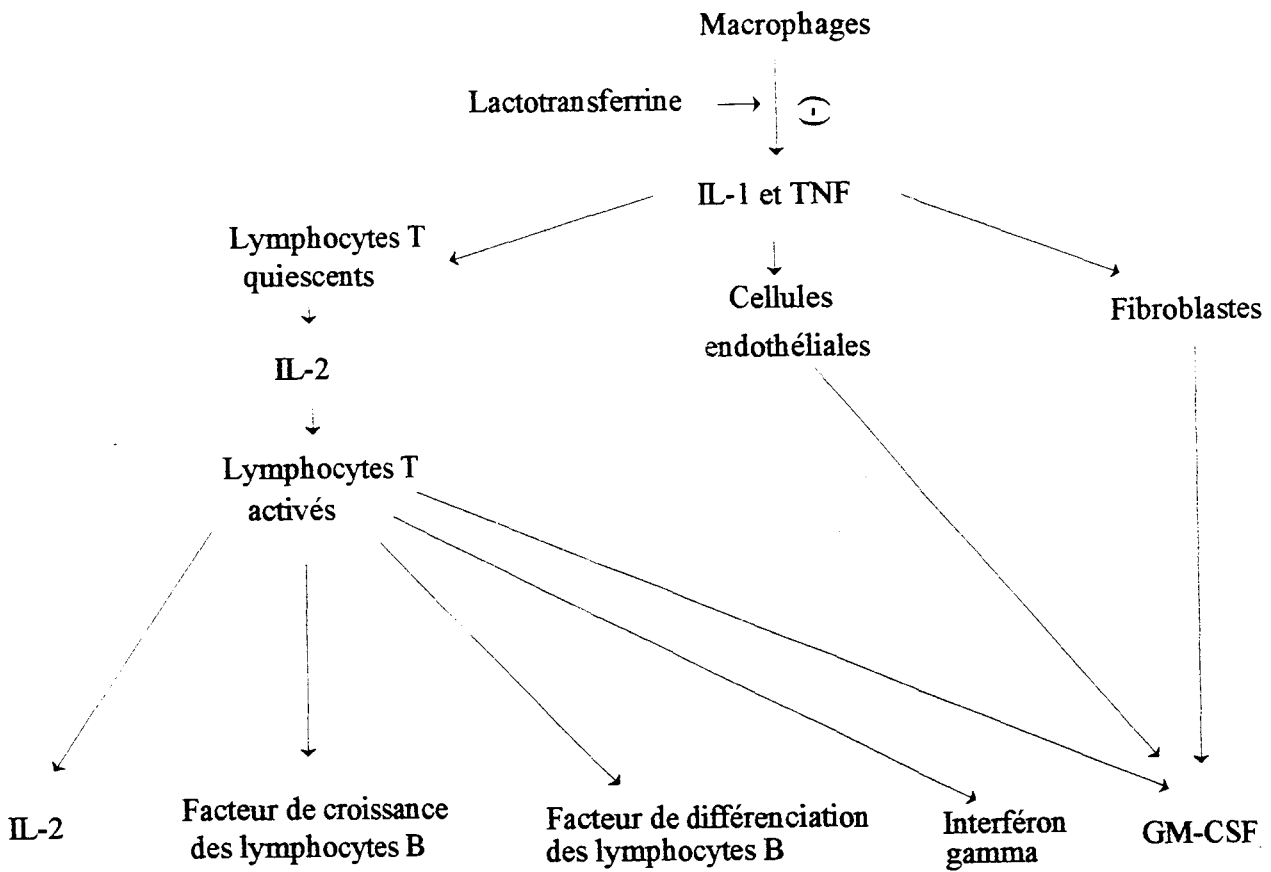
La réponse immunitaire des cellules isolées de la rate de souris peut être inhibée *in vitro* par la lactotransferrine. Lorsque les cellules sont incubées *in vitro* en présence de macrophages et de lactotransferrine, la synthèse d'IgM est proportionnelle à la concentration ( $10^{-10}$  à  $10^{-5}$ ) de la lactotransferrine (Duncan & McArthur, 1981). La lactotransferrine semble agir par l'intermédiaire des macrophages en inhibant la libération d'agents responsables de l'induction de la synthèse d'anticorps par les lymphocytes B (Duncan & McArthur, 1981). Le mode d'action indirect est identique à celui conduisant à l'inhibition de la libération du facteur GM-CSF (Fig. 13). Par contre, l'injection intramusculaire d'une dose unique de lactotransferrine préalablement à l'injection de l'antigène augmente considérablement la production d'anticorps dirigé contre celui-ci.

**β) Rôle de la lactotransferrine dans la maturation des lymphocytes**

Zimecki *et al.* (1991) montrent que la lactotransferrine induit chez les thymocytes CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>, isolés du thymus de souris, l'expression de l'antigène CD4 et, par conséquent, l'acquisition d'une activité de type auxiliaire. Le rôle de la lactotransferrine dans la maturation cellulaire vient d'être récemment démontré sur les cellules lymphocytaires B de la rate de souris (Zimecki, communication personnelle). Il a été démontré que la lactotransferrine participait à la différenciation et à la régulation du nombre de lymphocytes T $\mu$  et T (possédant à leur surface des récepteurs IgM et IgG) dans le thymus (Gnezditskaya *et al.*, 1987).



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



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



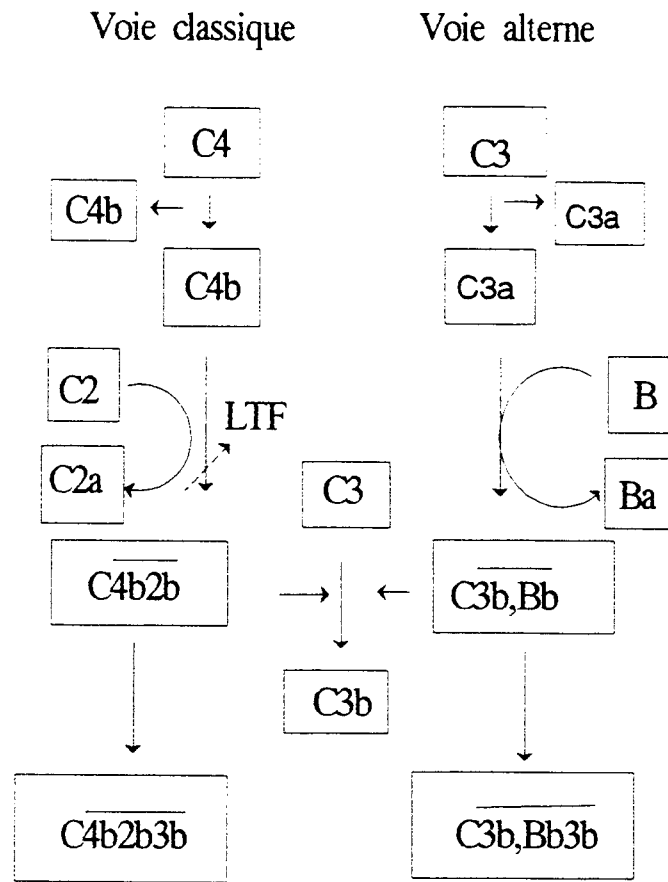
χ) Rôle de la lactotransferrine dans l'activation du complément

Le système du complément contient au moins 20 protéines interagissant dans un ordre de séquence donné, sous le contrôle de protéines de régulation. La lactotransferrine a récemment été ajoutée à la liste des protéines capables de réguler l'activation du complément. En effet, la lactotransferrine humaine isolée du lait (Morgan *et al.*, 1975) ou des larmes (Kijlstra & Jeurissen, 1981) inhibe l'activité hémolytique du complément.

Les protéines du complément forment deux cascades enzymatiques reliées entre elles, appelées voie classique et voie alterne (Fig. 14). Les deux voies classique et alterne du complément donnent naissance à la convertase C4b2b pour la voie classique et à la C3bBb pour la voie alterne. La lactotransferrine inhibe la formation de la convertase de la voie classique, elle n'a pas d'action sur la voie alterne. Cette action est rendue réversible par addition de fer ferrique dans le milieu de culture, ce qui semble indiquer que le rôle de la lactotransferrine dans l'activation du complément est lié à la présence de fer (Kijlstra & Jeurissen, 1981). Ces résultats sont confirmés par la démonstration d'une activité inhibitrice de la lactotransferrine dans la solubilisation par le complément de complexes immuns précipités. Cette action fait intervenir des composés dérivés du C3 (Kulics & Kijlstra, 1987).

δ) Rôle de la lactotransferrine dans l'activité cytotoxique des monocytes et des cellules NK

La lactotransferrine augmente l'activité des cellules NK (Nishiya & Horwitz, 1982 ; Horwitz *et al.*, 1984 ; McCormick *et al.*, 1991a, b), *in vitro* comme *in vivo* (Lu *et al.*, 1991; Bezault *et al.*, 1994). L'activité de régulation, par la lactotransferrine, de l'activité cytotoxique des cellules NK et des cellules LAK a été observée à des concentrations très faibles (0,75 µg/ml) sur la lignée cellulaire K562. La lactotransferrine est aussi active sur la cytotoxicité des monocytes (McCormick *et al.*, 1991b). Le mécanisme d'action de la lactotransferrine sur les cellules NK n'est pas encore élucidé mais semble agir *in vivo* sur les cellules infectées par un rétrovirus en synergie avec l'interféron (Lu *et al.*, 1991). Il est bien démontré que la lactotransferrine augmente de manière significative l'activité cytotoxique des cellules NK vis à vis des cellules tumorales (Nishiya & Horwitz, 1982 ; Bezault *et al.*, 1994) et des cellules infectées par les rétrovirus (Lu *et al.*, 1991). La cause de cette stimulation par la



**Figure 14 : Rôle de la lactotransferrine dans l'activation du complément ( Kijlstra & Jenrissen, 1982)**

lactotransferrine de l'activité cytotoxique des cellules NK, des lymphocytes, mais aussi des cellules adhérentes, peut être la conséquence, soit d'une activation des cellules tueuses à la suite de l'internalisation de la lactotransferrine, soit d'une différenciation des cellules cibles qui deviendraient alors plus sensibles à la lyse. Ces hypothèses demandent à être vérifiées. Plus récemment, il a été suggéré que la lactotransferrine est un facteur de transcription (Baeuerle, 1995). En effet, l'affinité de la lactotransferrine pour l'ADNc est connue depuis longtemps et a même servi à la purifier par chromatographie sur colonne d'ADN immobilisé. Il semble que cette interaction soit spécifique puisque He & Furmanski (1995) viennent de démontrer que la lactotransferrine ne reconnaît que 3 séquences consensus: GGC ACTTCG(A)C, TAGA(A/G)GATCAA, et ACTACAGTCTACA. Les cellules K562, transformées par un plasmide contenant de ces séquences consensus en amont du gène CAT (Chloramphénicol acétyltransférase) et de son promoteur, répondent à l'action de la lactotransferrine saturée en fer, démontrant ainsi que la lactotransferrine est un facteur de transcription.

#### e) *Rôle dans l'absorption intestinale du fer*

Il est bien établi que chez le nourrisson alimenté au lait maternel, l'incidence de la carence en fer est très faible (Saarien *et al.*, 1977). Cela pourrait être dû essentiellement à une haute bio-disponibilité du fer dans le lait de femme. Il est bien clair que la quantité de fer réellement absorbée est 2 à 3 fois supérieure chez les enfants nourris au sein par rapport aux nourrissons alimentés au lait de vache (Saarien *et al.*, 1977 ; Garry *et al.*, 1981).

Des auteurs ont attribué la bio-disponibilité du fer dans le lait de femme à des facteurs favorables à l'absorption du métal tels que la faible teneur en protéines, en calcium et en phosphate, la forte concentration en acide ascorbique et en lactose (Pirzio-Biroli *et al.*, 1958 ; Peter *et al.*, 1971 ; Amine & Hegstead, 1975). D'autres ont attribué à la lactotransferrine le rôle principal de transporteur de fer dans le lait de femme (Montreuil *et al.*, 1960 ; Montreuil, 1971 ; Spik, 1981). Cependant, plusieurs auteurs ont mis en doute ce concept en raison du fait que, d'une part, la lactotransferrine dans le lait n'est pas saturée en fer (Bullen *et al.*, 1972), une saturation maximale de 4% a été mesurée (Fransson & Lönnerdal, 1980 ; Lönnerdal & Forsum, 1985) et, d'autre part, il n'existe aucun lien entre le taux de fer et la concentration en lactotransferrine (Masson, 1970).

Tout récemment, pour étudier l'influence de la lactotransferrine sur l'absorption intestinale du fer chez le nourrisson, dans du lait humain, natif ou débarrassé à 97% de la lactotransferrine, la bio-disponibilité de l'isotope  $^{58}\text{Fe}$  a été mesurée chez des enfants âgés de 2 à 10 mois (Davidson *et al.*, 1987). Le  $^{58}\text{Fe}$  additionné se répartit indépendamment du type de

lait entre le lactosérum (80-89%), la caséine (4-5%) et la graisse (6-16%). Dans le lactosérum du lait appauvri en lactotransferrine, l'isotope métallique se retrouve à 50% complexé par le citrate alors que ce pourcentage n'est que de 36% pour le lait normal. L'absorption a été statistiquement plus faible dans les laits contenant de la lactotransferrine (11,8% compris entre 3,4 et 37,4%) que dans ceux n'en contenant pas (19,8% compris entre 8,4 et 72,8%). Cette expérimentation est la première réalisée *in vivo* qui démontre que la lactotransferrine n'est pas le facteur du lait humain qui facilite l'absorption intestinale du fer.

#### *f) Rôle dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire*

Récemment, Mazoyer *et al.* (1990) ont montré que la séquence KRDS, localisée entre les acides aminés 39 et 42 du lobe N-terminal de la lactotransferrine humaine, est un homologue structural et conformationnel de la séquence RGDS, et que le térapeptide synthétique correspondant à cette séquence inhibe l'agrégation plaquettaire. Cette découverte a amené Leveugle *et al.* (1993) à étudier l'effet de la lactotransferrine sur l'agrégation plaquettaire. La lactotransferrine à une concentration inférieure à 5 nM, c'est-à-dire 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. Cette activité inhibitrice a été retrouvée avec le lobe N-terminal (2 mM) et l'octodécapeptide (20 mM) dont la séquence correspond à celle de la région 20 à 37 de la lactotransferrine humaine. Ces activités inhibitrices sont nettement supérieures à celle observée avec le térapeptide KRDS puisque 500 mM de KRDS sont utilisés pour inhiber 50 % de l'agrégation induite par l'ADP (Fig. 15).

Ce résultat suggère que l'activité inhibitrice de la lactotransferrine nécessite sa fixation sur le récepteur plaquettaire ce qui corrobore les observations de Mazoyer *et al.* (1990) qui ont récemment démontré que l'activité inhibitrice du térapeptide KRDS sur l'agrégation plaquettaire ne transite pas par le complexe GPIIb-IIIa. Il est donc vraisemblable que le récepteur lymphocytaire de la lactotransferrine présent sur les plaquettes soit impliqué dans la 2<sup>ème</sup> voie de l'agrégation des plaquettes qui vient d'être découverte par l'équipe du Professeur Caen (Mazoyer *et al.*, 1990).

#### *g) Rôle dans la production des cytokines*

De nombreux rôles de la lactotransferrine impliquent des mécanismes qui sont régulés par des cytokines. Les études de Crouch *et al.* (1992) montrent que la lactotransferrine peut exercer un rétrocontrôle négatif sur certaines cytokines afin d'empêcher le recrutement et l'activation des leucocytes sur le lieu de l'inflammation. La lactotransferrine est capable

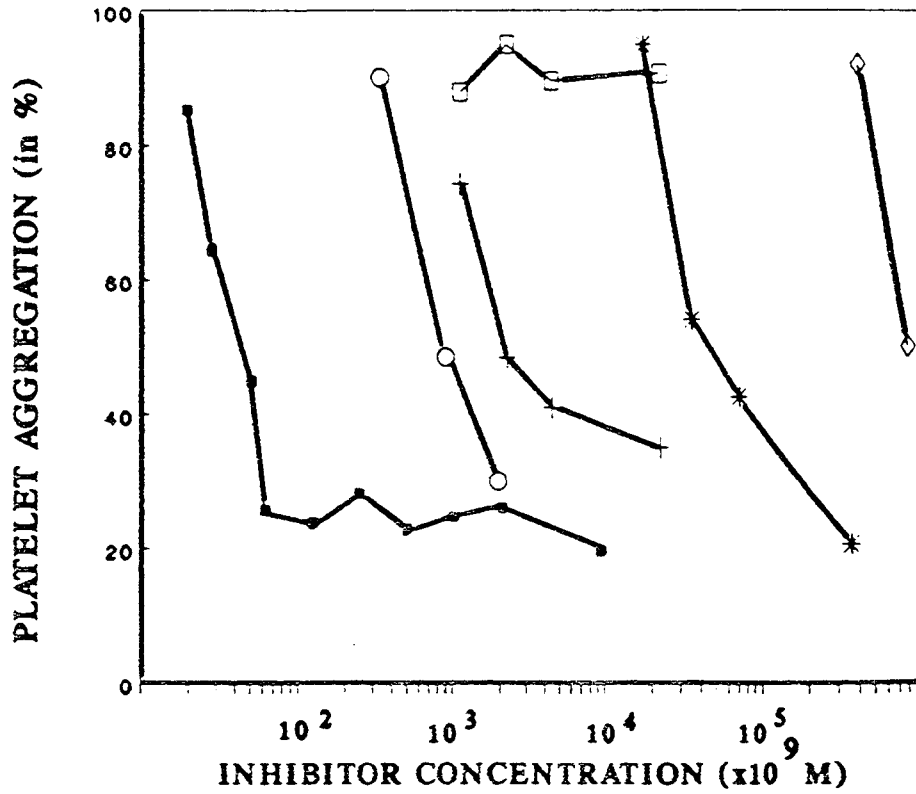


Figure 15 : Influence de la lactotransferrine sur l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP: lactotransferrine (■), lactotransferrine modifiée par le FITC (O), lobes N-(+) et C-terminaux (□) et les 2 peptides synthétiques KRDS (◇) et la boucle 20-37 de la lactotransferrine (\*) (Leveugle *et al.*, 1993).

d'inhiber la libération d'IL-1 et de TNF- $\alpha$  et indirectement celle d'IL-2. En effet, la production d'IL-2 par les lymphocytes T est dépendante de la sécrétion d'IL-1 par les monocytes (Durum *et al.*, 1984) et le TNF est partiellement responsable de cette production d'IL-1. Cette action de la lactotransferrine sur la production d'IL-1 et de TNF pourrait ainsi expliquer certains de ses rôles. La diminution de la production d'anticorps décrite par Duncan & McArthur (1981) proviendrait d'une réduction de l'activation des cellules B qui sont normalement stimulées soit directement par l'IL-1 soit indirectement par l'IL-2 provenant des cellules T activées. Ainsi, la réduction de l'activité cytotoxique des cellules NK par la lactotransferrine pourrait être due à une diminution de la production d'IL-2 (Nishiya & Horwitz, 1982). La lactotransferrine bovine injectée à des souris infectées par des lipopolysaccharides induit un taux élevé d'IL-6 qui va permettre d'inhiber la libération de TNF- $\alpha$  responsable des lésions tissulaires durant le choc septique (Machnichi *et al.*, 1993).

Par contre, l'injection de lactotransferrine bovine 24 heures avant l'injection de l'agent infectieux permet d'obtenir une désensibilisation sans passer par une augmentation du taux d'IL-6. Ceci implique probablement l'apparition de récepteurs solubles pour le TNF- $\alpha$  (Zagulski *et al.*, 1989). L'hématopoïèse est un processus de développement dynamique et complexe régulé par un grand nombre de cytokines capables de stimuler ou d'inhiber la croissance des cellules souches hématopoïétiques (Broxmeyer *et al.*, 1978). La lactotransferrine diminue la survie des cellules souches des granulocytes/macrophages et des érythrocytes en culture car elle inhibe la libération de l'IL-1 nécessaire à la libération de certains facteurs de stimulation des colonies (Hangoc *et al.*, 1991).

L'apo-lactotransferrine augmente la capacité des monocytes activés par l'interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) à inhiber la multiplication intracellulaire de *Legionella pneumophila* (Byrd & Horwitz, 1991). La lactotransferrine est également capable d'agir en synergie avec l'IFN- $\gamma$  pour diminuer l'infection et augmenter la durée de vie des cellules infectées par le FVC-P (un virus induisant une polycythémie). Ces résultats pourraient avoir un intérêt thérapeutique dans le traitement des leucémies et de certaines maladies induites par des rétrovirus (Lu *et al.*, 1991).

## 2. Rôle pathologique de la lactotransferrine

### a) *Lactotransferrine et cancer*

La lactotransferrine est associée à de nombreuses pathologies. Cette protéine fixant le fer a une grande affinité pour le  $^{67}\text{Ga}$  utilisé comme agent de diagnostic de tumeurs (Weiner *et al.*, 1981). La lactotransferrine joue un rôle important en tant que marqueur dans l'étude du

cancer. Une augmentation du taux de lactotransferrine sécrétée a été montrée dans les cancers gastro-intestinal, du poumon et du sein (Herzen, 1985 ; Sanchez *et al.*, 1992). Cependant, en ce qui concerne le cancer du sein, Rossiello *et al.* (1984) ont constaté qu'elle pouvait être utilisée comme marqueur de lésions bénignes. Pour les cancers de l'estomac, la détection immuno-histochimique de la lactotransferrine semble être en relation avec l'augmentation de la demande en fer des cellules néoplasiques (Tuccari *et al.*, 1989), mais ne serait pas associée aux lésions malignes (Luqmani *et al.*, 1992).

La lactotransferrine peut être utilisée pour un diagnostic des tumeurs malignes thyroïdiennes (Tuccari & Barresi, 1985) mais ne peut pas servir de marqueur de différenciation glandulaire dans l'étude des carcinomes cystiques adénoïdes salivaires (Hiroshi *et al.*, 1991).

### **b) Dégranulation des neutrophiles**

La lactotransferrine plasmatique provient de la dégranulation des neutrophiles activés lors de l'infection (Rado *et al.*, 1984), la lactotransferrine peut donc servir de marqueur de la réapparition des neutrophiles suite à une greffe de la moelle osseuse (Suzuki *et al.*, 1991), de la dégranulation des neutrophiles dans le plasma de patients atteints de septicémie (Hayakawa *et al.*, 1993) ou de pancréatite calcifiante chronique lorsqu'elle est hyper-sécrétée dans le suc gastrique (Hayakawa *et al.*, 1993). Elle serait un composant clé dans la réponse inflammatoire de la prostate (Reese *et al.*, 1992) chez des patients souffrant d'infections répétées. On a constaté une déficience en lactotransferrine qui serait la conséquence de l'absence de granules spécifiques des neutrophiles (Lomax *et al.*, 1989). Dans ce cas, le patient atteint d'un défaut de la coagulation sanguine souffre de continuelles infections bactériennes. Par ailleurs, on a montré que les tissus glandulaires produisaient et sécrétaient localement de la lactotransferrine par un processus qui diffère de la dégranulation des neutrophiles (Breton-Gorius *et al.*, 1980).

Parker *et al.* (1992) ont mis en évidence, chez des patients présentant une déficience en lactotransferrine, une tendance à saigner due à une absence des hauts polymères du facteur von Willebrand. Chez les patients souffrant de leucémie myéloïde chronique, on a montré que la lactotransferrine présente sous une forme inactive est incapable d'inhiber le CSF ("Colony Stimulating Factor"). La lactotransferrine pourrait servir dans ce cas d'adjuvant de la chimiothérapie (Esaguy *et al.*, 1993).

### **c) Lactotransferrine et maladies autoimmunes**

On a montré que la lactotransferrine et la protéine hsp65 d'origine mycobactérienne possédaient des déterminants antigéniques communs, suggérant que la lactotransferrine serait un facteur de stimulation accessoire de l'auto-réactivité des cellules T associée à l'arthrite auto-

immune induite par les mycobactéries (Aguas *et al.*, 1991 ; Esaguy *et al.*, 1991). D'autres études ont montré que l'apparition d'auto-anticorps anti-lactotransferrine chez des patients souffrant de colite ulcéreuse ou de la maladie de Crohn pouvait contrecarrer les propriétés anti-phylogistiques de la lactotransferrine à la surface des muqueuses (Peen *et al.*, 1993). De même l'arthrite rhumatoïde peut être exacerbée par l'ingestion de lait (riche en lactotransferrine) montrant l'implication d'auto-anticorps anti-lactotransferrine dans cette maladie (Coremans *et al.*, 1992). Par ailleurs, la présence d'anticorps anti-lactotransferrine peut être corrélée à l'activité du lupus érythémateux et leur taux à la surface des muqueuses peut être utilisé comme marqueur de l'évolution de la maladie (Peen *et al.*, 1993).

#### *d) Désordre neurodégénérateur et maladie d'Alzheimer*

Kawamata *et al.* (1993) 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, la détection immunochimique a montré une accumulation de lactotransferrine dans le cortex cérébral de patients atteints de désordres neurodégénérateurs (Leveugle *et al.*, 1994). De même, ce résultat est confirmé par des manipulations récentes, qui mettent en évidence la présence de lactotransferrine au niveau du mésencéphale de sujets sains (Leveugle *et al.*, 1994).

### **3. Conclusion**

Les transferrines regroupent une famille de glycoprotéines capables de fixer réversiblement deux ions ferriques dans l'organisme humain. La lactotransferrine est retrouvée à la surface des muqueuses et dans les liquides biologiques. Le gène de la lactotransferrine humaine a été localisé sur le chromosome 3 aux q-21--q-23, mais sa structure n'est pas bien définie.

Sur le plan structural, les lactotransferrines, en particulier la lactotransferrine humaine, ont fait l'objet de nombreuses études. La séquence peptidique, la structure secondaire, ainsi que la structure des glycanes qu'elles portent, sont bien connues. La structure peptidique des différentes lactotransferrines est proche tant du point de vue de la séquence que du point de vue conformationnel. Les LDL et la lactotransferrine présentent une forte identité de conformation.

Ainsi nous avons pu constater au cours de ce chapitre que les fonctions biologiques des lactotransferrines sont nombreuses, certaines d'entre elles font l'objet de controverses. Les principales fonctions de la lactotransferrine concernent la régulation de la myélopoïèse et les mécanismes de la défense antibactérienne.



## II. LES RECEPTEURS DE LA LACTOTRANSFERRINE

Les travaux portant sur les récepteurs de la lactotransferrine sont peu avancés et fortement contradictoires. Des interactions entre la lactotransferrine et un grand nombre de cellules ont été mises en évidence mais ces interactions ont des constantes d'affinité très variables et concernent un nombre important de cellules : les cellules du foie, les entérocytes, les cellules de glande mammaire et les cellules du système leucocytaire. Dans ce chapitre nous énumérerons tout d'abord les différentes cellules fixant la lactotransferrine, puis nous décrirons les molécules membranaires impliquées dans les interactions de la cellule avec la lactotransferrine.

### A. Cellules et organismes fixant la lactotransferrine

#### 1. Les cellules du foie

La lactotransferrine, provenant de la dégranulation des leucocytes polymorphonucléaires, est libérée dans le sang où sa concentration reste néanmoins peu élevée (20 nM). De même, 80-90% de la lactotransferrine marquée à  $^{125}\text{I}$ , injectée par voie intraveineuse à des souris ou à des lapins, est rapidement éliminée de la circulation et est retrouvée dans le foie (Prieels *et al.*, 1978 ; Bennett & Kokocinski, 1979). Par contre, le type de cellules responsables de la capture de cette protéine a fait l'objet de nombreuses controverses et n'a été établi que très récemment. Une accumulation de lactotransferrine a été décrite respectivement dans les hépatocytes, les macrophages et les cellules endothéliales (Prieels *et al.*, 1978 ; Imber & Pizzo, 1983 ; Courtoy *et al.*, 1984 ; Moguevsky, 1987). Plus récemment, Mc Abee & 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 la lactotransferrine bovine se fixe sur les hépatocytes et ceci via deux populations de sites : sites de haute affinité dépendant du calcium ( $K_d$  : 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 et les hépatocytes fixent la lactotransferrine indépendamment de son degré de saturation en fer. Cette localisation sur les cellules parenchymateuses a été récemment confirmée (Ziere *et al.*, 1992).

#### 2. Les entérocytes

La présence d'un récepteur entérocytaire spécifique de la lactotransferrine a tout d'abord

été suggérée par Montreuil pour expliquer l'absorption intestinale du fer transporté par la lactotransferrine. Cox *et al.* (1979) ont démontré *in vitro* que la lactotransferrine était capable de céder son fer à des biopsies intestinales humaines. Par la suite, les interactions de la lactotransferrine ont été étudiées avec des vésicules membranaires de la bordure en brosse de l'intestin de lapin (Mazurier *et al.*, 1985), de souris (Hu *et al.*, 1988, 1990), de singe (Davidson & Lönnnerdal, 1988) et d'homme (Kawakami & Lönnnerdal, 1991). La fixation de la lactotransferrine a également été démontrée sur une lignée entérocytaire (HT-29, HT29-D4) dérivée d'un adénocarcinome humain colique (Roiron-Lagroux *et al.*, 1989 ; Derisbourg, 1990 ; Mikogami, 1993). La lactotransferrine se fixe spécifiquement sur les cellules HT-29 différenciées en entérocytes. Les constantes de fixation de la lactotransferrine sur ces différentes cellules sont récapitulées dans le tableau V.

**Tableau V.** Caractérisation du récepteur de la lactotransferrine sur les entérocytes

Type cellulaire	Ligand	Kd ( $10^{-9}$ M)	Nombre de sites	Masse moléculaire du récepteur (kDa)
Entérocytes de lapin (1)	LTF humaine	830	$0,15 \times 10^{14}$	100
Entérocytes de souris (2, 3)	LTF murine	280	$5,3 \times 10^{14}$	130
	LTF humaine	380	$5,3 \times 10^{14}$	
	LTF bovine	380	$5,3 \times 10^{14}$	
Entérocytes de singe (4)	LTF simienne	9000	ND	ND
	LTF humaine	9000	ND	ND
Entérocytes humains (5)	LTF humaine	300	$4,3 \times 10^{14}$	100
Lignées cellulaires				
HT29(6)	LTF humaine	40	$0,29 \times 10^5$	ND
HT29D4 (7)	LTF humaine	400	$40 \times 10^5$	
Caco-2 (8)	LTF humaine	1600	$2,44 \times 10^6$	ND
HT29 Cl.19A (9)	LTF humaine	1400	$2,41 \times 10^6$	ND
HT29-18-C1 (10)	LTF humaine	1030	$3,04 \times 10^6$	ND

ND: non déterminé

Références : (1) Mazurier *et al.*, 1985 ; (2, 3) Hu *et al.*, 1988, 1990 ; (4) Davidson & Lönnnerdal, 1988 ; (5) Kawakami & Lönnnerdal, 1991 ; (6) Derisbourg, 1990 ; (7) Roiron-Lagroux *et al.*, 1989 ; (8, 9, 10) Mikogami, 1993.

Les récepteurs entérocytaires de souris et de singe reconnaissent les lactotransferrines isolées du lait de différents espèces (Hu *et al.*, 1988 ; Davidson & Lönnerdal, 1989). La fixation de la lactotransferrine sur son récepteur ne dépend pas de son degré de saturation en fer (Hu *et al.*, 1988 ; Davidson & Lönnerdal, 1989). Elle est dépendante du pH, le pH optimum étant de 5,5 pour le récepteur entérocytaire de souris (Hu *et al.*, 1988). 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.

### 3. Les monocytes et les macrophages

La capacité de fixation de la lactotransferrine sur les macrophages et les monocytes a été décrite par de nombreux auteurs (Bennett & Davis, 1981 ; Birgens *et al.*, 1983, 1984 ; Oria *et al.*, 1988 ; Goavec *et al.*, 1985 ; Bartal *et al.*, 1987) et est maintenant bien établie. Des études réalisées sur des macrophages péritonéaux de souris (Van Snick *et al.*, 1977) ou sur des monocytes humains (Birgens *et al.*, 1988) ont démontré que la lactotransferrine est capable de céder son fer à la ferritine intracellulaire, suggérant que la lactotransferrine est impliquée dans la séquestration du fer lors de l'hyposidérémie inflammatoire. D'autre part, cette interaction de la lactotransferrine avec les macrophages peut expliquer l'inhibition de la production d'IL-1 par le macrophage traité en présence de la lactotransferrine. L'analyse de la fixation de la lactotransferrine sur les monocytes et sur les macrophages selon la méthode de Scatchard (1949) par différents auteurs montre des constantes de fixation très variables (tableau VI). A ce jour, le récepteur de la lactotransferrine n'a pas encore été isolé et plusieurs auteurs ont même mis en doute son existence (Bennett *et al.*, 1983 ; Moguilevsky *et al.*, 1985a ; Goavec *et al.*, 1985 ; Moguilevsky, 1987 ; Leclercq, 1987). En outre, la nature de cette interaction et sa signification biologique sont beaucoup moins claires, bien qu'elles puissent être liées à la propriété de la lactotransferrine à inhiber la production d'IL-1.

### 4. Les leucocytes neutrophiles

Les leucocytes polymorphonucléaires synthétisent la lactotransferrine à un stade primaire de leur maturation (Baggiolini *et al.*, 1979 ; Rado *et al.*, 1984). L'activation des leucocytes provoque la libération dans le milieu extracellulaire de la lactotransferrine contenue

**Tableau VI.** Paramètres de fixation de la lactotransferrine sur les macrophages/ monocytes

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

ND: non déterminé

dans les granules secondaires. La lactotransferrine ainsi libérée se fixe à la surface des leucocytes humains (tableau VII) ce qui suggère que les leucocytes possèderaient également un récepteur pour la lactotransferrine (Maneva *et al.*, 1983 ; Birgens *et al.*, 1984). Cependant, Bennett & Davis (1981) décrivent une fixation importante de la lactotransferrine à la surface mais la qualifient de non spécifique. Enfin, Leveugle (1992), par la technique de cytofluorimétrie en flux, ne met en évidence que la fixation de très faible affinité à la surface des leucocytes humains.

**Tableau VII.** Paramètres de fixation de la lactotransferrine sur les neutrophiles

Références	Kd ( $10^{-9}$ M)	Sites/cellules ( $\times 10^6$ )
Maneva <i>et al.</i> , 1983	0,44	0,04
Birgens <i>et al.</i> , 1984	160	0,08
	200	4,60

## 5. Les lymphocytes

La présence de récepteurs spécifiques de la lactotransferrine a été suggérée pour la première fois à la surface des lymphocytes péritonéaux de souris par Van Snick & Masson en 1976 et à la surface des lymphocytes humains en 1981 par Bennett & Davis. Ces auteurs précisent la localisation du récepteur sur des lymphocytes B dans un système hétérologue.

Buttler *et al.* (1990), à l'aide de lactotransferrine marquée au FITC sur sa partie protéique, mettent en évidence la présence de la lactotransferrine à la surface des lymphocytes B isolés de l'amygdale ou du sang de sujets sains, et sur des lymphocytes B issus de différents types de leucémie, chacune étant représentative d'un stade de maturation cellulaire différent. Les résultats obtenus suggèrent que la quantité de lactotransferrine fixée augmente à certains stades de maturation cellulaire. Les cellules pré-B, représentatives d'un stade précoce de différenciation, n'expriment pas de lactotransferrine à leur surface. Les lymphocytes B immatures, représentatifs d'un stade plus tardif, possèdent un taux élevé de lactotransferrine à leur surface, ce taux diminue lors de la maturation de ces cellules en plasmocytes.

Les travaux de Gnezditskaya *et al.* (1984) montrent que le thymus humain possède une sous-population de lymphocytes capables de fixer la lactotransferrine grâce à la présence de récepteurs spécifiques. L'expression de ces récepteurs dépend de la concentration intracellulaire en AMP cyclique. L'utilisation d'agents mitogènes, comme la phytohéماغglutinine ou l'anticorps anti-CD3, permet de mimer l'activation des lymphocytes lors d'une infection et de transformer ainsi les lymphocytes quiescents en lymphocytes. Les travaux entrepris dans notre laboratoire ont conduit à l'observation selon laquelle les lymphocytes quiescents ne possèdent pas de récepteurs pour la lactotransferrine et la PHA induisait l'apparition de récepteurs à haute affinité de la lactotransferrine à la surface des lymphocytes circulants humains, qui sont synthétisés au cours des deux premiers jours d'activation (Mazurier *et al.*, 1989). Les constantes de dissociation et les nombres de sites de fixation sont 80 nM et 200000 pour les lymphocytes activés par PHA. La fixation est saturable et réversible (tableau VIII).

## 6. Les plaquettes et les mégakaryocytes

L'utilisation d'une nouvelle sonde fluorescente (lactotransferrine marquée à la fluorescéine sur la partie glycanique) a permis à Leveugle (1992) de mettre en évidence dans notre 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

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

Références	Type cellulaire	Kd ( $10^{-6}$ M)	Sites/cellule ( $\times 10^6$ )
Van Snick <i>et al.</i> , 1977	Lymphocytes péritonéaux de souris	1100	6,7
Bennett & Davis, 1981	Lymphocytes B circulants humains	ND	26
Birgens <i>et al.</i> , 1984	Lymphocytes circulants humains	43	1,9
	Lymphoblastes et myéloblastes humains	20	10
Mazurier <i>et al.</i> , 1989	Lymphocytes circulants humains activés	80	0,2
Bi <i>et al.</i> , 1994	Lignée lymphocytaire-T	40	0,3

ND: non déterminé

caractéristique de la présence de récepteurs de haute affinité (Maneva *et al.*, 1993). Les récepteurs plaquettaires fixent la lactotransferrine saturée en fer. De plus, la fixation de la lactotransferrine diférique est inhibée par l'apo-lactotransferrine et la lactotransferrine native.

Ces résultats montrent que, contrairement à la sérotransferrine, et comme dans le cas des lymphocytes activés, le degré de saturation en fer de la lactotransferrine n'influence pas le mécanisme de reconnaissance de cette protéine par le récepteur plaquettaire. La fixation a été retrouvée sur la lignée mégakaryocytaire Dami (Nillesse, 1994).

## 7. Les cellules épithéliales de la glande mammaire

Dans notre laboratoire, Rochard (1992) s'est intéressée à l'interaction entre la lactotransferrine humaine et les différentes lignées cellulaires humaines de glande mammaire. Cette étude réalisée par cytofluorimétrie en flux met en évidence une fixation de la lactotransferrine sur des cellules cancéreuses, de mastoses et de tissus sains cellulaires issus de glande mammaire humaine. Les paramètres de fixation obtenus selon la technique de Scatchard (1949) sont décrits dans le tableau IX. Chacune de ces lignées fixe la lactotransferrine mais avec des affinités faibles et très variables allant de 120 à 960 nM. Ces résultats sont à rapprocher de

ceux obtenus avec le facteur de croissance (FGF) pour lequel l'importance du compartiment de faible affinité est proportionnelle à la teneur en protéoglycane de la cellule et est maximale pour la lignée MDAMB-231 (Peyrat *et al.*, 1991).

**Tableau IX.** Paramètres de fixation de la lactotransferrine sur différentes lignées cellulaires humaines de glande mammaire (Rochard *et al.*, 1992).

Cellules	Kd ( $10^{-9}$ M)	Sites/cellule ( $\times 10^6$ )
Cellules cancéreuses		
T47D	120	1,20
MCF7	190	1,18
HH9	340	1,21
BT20	160	1,18
VHB1	288	1,21
MDAMB-231	960	4,80
Cellules de mastose		
NPM14T	288	1,40
NPM21T	350	1,60
Cellules de tissus sains		
HBL100	216	1,40

## 8. Les bactéries

Une fixation de la lactotransferrine a été mise en évidence sur des bactéries Gram(-) telles que *Bordetella pertussis* (Redhead *et al.*, 1987, 1991), *Neisseria* (McKenna *et al.*, 1988 ; Schryvers & Morris, 1988 ; Tsai *et al.*, 1988), *Haemophilus* (Schryvers & Morris, 1988, Schryvers *et al.*, 1989), *Trepanoma pallidum* (Alderete *et al.*, 1988), sur les Staphylocoques (Naidu *et al.*, 1990, 1992), *Escherichia coli* (Naidu *et al.*, 1991), *Bordetella pertussis* et *Bronchiseptia* (Redhead *et al.*, 1987 ; Menozzi *et al.*, 1991), *Prevotella intermedia* (Kalfas *et al.*, 1991) (tableau X). Plus récemment, nous avons démontré dans notre laboratoire que la croissance de *Helicobacter pylori* était dépendante de la présence de la lactotransferrine humaine (Husson *et al.*, 1993). La capacité de fixer la lactotransferrine par les bactéries n'est observée que lorsque celles-ci sont cultivées dans un milieu dépourvu de fer (Schryvers *et al.*,

1989). Elle peut être induite par addition d'un chélateur de fer et inversée par un excès de FeCl<sub>3</sub>, ce qui suggère que l'expression du récepteur de la lactotransferrine à la surface des bactéries est régulée par la quantité de fer disponible dans le milieu. La capacité des bactéries pathogènes à utiliser le fer de la sérotransferrine ou de la lactotransferrine humaine joue probablement un rôle important dans la prolifération bactérienne au moment d'une infection. Néanmoins, elle ne peut être considérée comme un critère chez des souches commensales *Neisseria fluvescens* (Schryvers *et al.*, 1989).

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

Références	Bactéries	Sites/cellule	Caractérisation du récepteur de la LTF
Redhead <i>et al.</i> , 1987	<i>Bordetella pertussis</i>		ND
Alderete <i>et al.</i> , 1988	<i>Treponema pallidum</i>		ND
Naidu <i>et al.</i> , 1990	Staphylocoques		ND
McKenna <i>et al.</i> , 1988	<i>Neisseria</i>		ND
Lee & Schryvers, 1988	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		ND
Schryvers <i>et al.</i> , 1988	<i>Neisseria meningitidis</i>		105 kDa
Schryvers <i>et al.</i> , 1989	<i>Neisseria</i>		105 kDa
Schryvers <i>et al.</i> , 1988	<i>Haemophilus</i>		ND
Schryvers <i>et al.</i> , 1989	Influenzae		105 et 106 kDa
Menozi <i>et al.</i> , 1991	<i>Bronchiseptia</i>		27 et 32 kDa
Naidu <i>et al.</i> , 1991	<i>Staphylococcus</i>	5700	62 et 67 kDa
Kalfas <i>et al.</i> , 1991	<i>Prevotella intermedia</i>	45000	ND

ND : non déterminé

## 9. Les parasites

Le récepteur de la lactotransferrine a été mis en évidence à la surface de *Trichomonas vaginalis* (Kennet & Alderete, 1984) et de *Trypanosoma cruzi* (Lima & Kierszenbaum, 1985) (tableau XI). Les monocytes possédant également un récepteur spécifique lactotransferrine,



Lima & Kierszenbaum (1985) ont étudié l'influence de cette protéine dans l'interaction monocytes-*Trypanosoma cruzi*. La lactotransferrine, en se liant au récepteur monocyttaire et au récepteur parasitaire, jouerait un rôle de "pontage" et faciliterait ainsi l'interaction et la phagocytose de *Trypanosoma* par les monocytes. La purification du récepteur de la lactotransferrine chez *Trichomonas vaginalis* a permis d'isoler deux protéines de 178 et 75 kDa (Kenneth & Alderete, 1984).

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

Références	Parasites	Caractérisation du récepteur de la lactotransferrine
Lima & Kierszenbaum, 1985	<i>Trypanoma brucei</i>	ND
Kenneth & Alderete, 1984	<i>Trichomonas vaginalis</i>	178 et 75 kDa

ND : non déterminé

### **B. Les récepteurs de la lactotransferrine**

De nombreuses équipes ont entrepris la purification des protéines membranaires fixatrices de lactotransferrine par chromatographie d'affinité. Les résultats obtenus jusqu'à présent ont conduit à la purification de plusieurs protéines dont la séquence peptidique n'a pas pu être définitivement établie.

#### **1. Caractérisation du récepteur de la lactotransferrine entérocytaire**

Le récepteur entérocytaire a été caractérisé comme étant une protéine dont la masse moléculaire apparente varie entre 100 et 130 kDa chez l'homme et chez la souris (Hu *et al.*, 1990 ; Kawakami & Lönnerdal, 1991). Hu *et al.* (1990) ont mis au point un protocole de purification du récepteur de lactotransferrine par chromatographie d'affinité sur la colonne de lactotransferrine immobilisée. Le récepteur est composé d'une chaîne polypeptidique monocaténaire. Le pHi du récepteur a été mesuré à 5,8 par l'iso-électrofocalisation. La fixation de lectines sur le récepteur entérocytaire après électrotransfert a révélé sa nature glycoprotéinique. La déglycosylation par des endoglycosidases, en abaissant la masse moléculaire de 20 à 25 kDa, conduit à la conclusion que le récepteur entérocytaire murin

renferme de 20 à 25 glycannes de type de N-acétyllactosaminique (Hu *et al.*, 1990).

L'implication des glycannes 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 glycanne de la lactotransferrine sont essentiels à la reconnaissance ligand-récepteur, suggérant l'existence d'un récepteur de type lectique (Davidson & Lönnerdal, 1988). Cependant, chez la souris (Hu *et al.*, 1990) et chez l'homme (Kawakami & Lönnerdal, 1991), il semble que les glycannes de la lactotransferrine n'interviennent pas, la lactotransferrine humaine déglycosylée se fixant normalement à son récepteur entérocytaire.

## 2. Le récepteur lymphocytaire

### a) *Le récepteur membranaire*

Le récepteur lymphocytaire de la lactotransferrine a été visualisé après électrotransfert du lysat lymphocytaire par la fixation de la lactotransferrine marquée à l'iode  $^{125}\text{I}$ . Il se présente sous la forme de deux bandes protéiques de masse moléculaire voisine de 100 et 110 kDa. Le récepteur a été purifié sous la forme du complexe lactotransferrine-récepteur par chromatographie d'affinité sur anticorps anti-lactotransferrine (Mazurier *et al.*, 1989). Des résultats identiques ont été obtenus à partir de plaquettes non activées ce qui démontre que les récepteurs lymphocytaires et plaquettaires ont la même structure. Le récepteur lymphocytaire ainsi purifié se présente sous la forme d'une chaîne polypeptidique monocaténaire de masse moléculaire voisine de 105 kDa. Ces résultats sont confirmés sur "Western blot" par les anticorps polyclonaux contre le récepteur lymphocytaire de lactotransferrine par Leveugle *et al.* (1993).

L'utilisation de techniques spécifiques de mise en évidence des glycannes a montré que les récepteurs lymphocytaire et plaquettaire sont glycosylés. De même, les diverses endoglycosidases et lectines utilisées ont révélé la nature de ces glycannes : le récepteur renferme deux ou trois glycannes liés N-glycosidiquement de type N-acétyllactosaminique (Leveugle, 1992).

### b) *Le récepteur soluble*

La présence de récepteurs solubles de la lactotransferrine dans le milieu de culture de lymphocytes humains activés a été mise en évidence par Leveugle (1992). Celui-ci a été purifié comme précédemment, c'est-à-dire par chromatographie d'affinité du milieu de culture, filtré et concentré sur une colonne d'anticorps anti-lactotransferrine. Ce récepteur se présente sous la forme d'une glycoprotéine monocaténaire de masse moléculaire apparente de 95 kDa, la

différence de masse avec le récepteur membranaire correspondant au domaine intramembranaire (Bi *et al.*, 1994). Le domaine extracellulaire est reconnu par les anticorps polyclonaux préparés à partir du récepteur membranaire (Leveugle, 1992).

### 3. Le récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDL)

L'interaction entre la lactotransferrine et l'hépatocyte met en jeu 2 compartiments : l'un de faible affinité,  $\text{Ca}^{2+}$  indépendant et l'autre de forte affinité  $\text{Ca}^{2+}$  dépendant. Les travaux récents de Ziery *et al.*, (1992) montrent que le compartiment de haute affinité  $\text{Ca}^{2+}$  dépendant implique la région de la lactotransferrine homologue au site d'interaction des apo-lipoprotéines avec le récepteur de l'apo E. Ces résultats confirment ceux de Willnow *et al.* (1992) qui montrent que la lactotransferrine marquée à  $^{125}\text{I}$  se fixe spécifiquement sur le LRP ("LDL receptor related protein"). La fixation a lieu, comme le montrent les expérimentations de "Western blot", sur la sous-unité 515 kDa du LRP et est calcium dépendante. Cette fixation est compétitive avec les LDL puisque l'incubation des hépatocytes par un excès de lactotransferrine inhibe de manière significative la clairance des LDL.

Le LRP est synthétisé sous la forme d'un précurseur transmembranaire de 4525 acides aminés qui subit une maturation dans le Golgi. Cette maturation consiste en un clivage en 2 sous-unités de 515 et 85 kDa environ. La plus grosse sous-unité contient le domaine de fixation (Herz *et al.*, 1990). Lors de la purification du LRP, une petite protéine de 39 kDa (RAP : "Receptor Associated Protein") est copurifiée. La molécule RAP inhibe *in vitro* la fixation des apo E/ $\beta$ VLDL (Herz *et al.*, 1991).

En plus du LRP, la lactotransferrine se fixe aussi spécifiquement sur la glycoprotéine membranaire gp 330. Cette glycoprotéine dont la masse moléculaire varie entre 330 et 600 kDa est exprimée sur de nombreux types de cellules épithéliales en brosse mais surtout sur la cellule rénale. Elle présente de nombreuses homologies séquentielles avec les récepteurs LDL et LRP (Willnow *et al.*, 1992).

### 4. Les lectines cellulaires

L'implication de la structure de la lactotransferrine dans l'interaction avec la cellule a été étudiée en 1978 par Prieels *et al.*, ils ont attribué à un récepteur lectinique, spécifique du fucose, la fixation de la lactotransferrine par l'hépatocyte. Ces résultats ont été repris et sont bien démontrés. La présence de résidus de fucose dans les chaînes glycaniques est essentielle à la fixation de la lactotransferrine sur le récepteur entérocytaire de singe et sur le récepteur macrophage (Goavec *et al.*, 1985 ; Davidson & Lönnerdal, 1988).

La présence de résidu galactose terminal au niveau de la structure glucidique de la

lactotransferrine a conduit certains auteurs à suggérer que la clairance de cette protéine s'effectuait par l'intermédiaire du récepteur des asialoglycoprotéines (Pricer *et al.*, 1971). Cependant, Imber & Pizzo (1983) écartent cette hypothèse, l'asialo-orosomucoïde spécifique de ce récepteur n'inhibant pas la clairance de cette protéine.

Les travaux de Debanne *et al.* (1985) mettent en évidence une fixation spécifique de la lactotransferrine sur les membranes d'hépatocytes de rat, mais ces auteurs démontrent que cette fixation est de type électrostatique et ne fait pas intervenir de récepteurs spécifiques. De plus, la fixation de la lactotransferrine humaine sur le macrophage alvéolaire humain est inhibée par des néoglycoprotéines à mannose et à fucose, suggérant ainsi l'existence du récepteur de type lectinique capable de reconnaître des glycanes renfermant des résidus du fucose ou de mannose en position externe (Goavec *et al.*, 1985). Le récepteur lectinique pourrait être impliqué dans la reconnaissance de la lactotransferrine par le macrophage lors d'une inflammation.

## 5. Les protéoglycannes

Il est bien établi que la lactotransferrine peut se fixer aux polysaccharides anioniques. Ainsi la chromatographie sur héparine immobilisée a été utilisée pour purifier cette protéine (Blackberg & Hernell, 1980). Plus récemment, Zou *et al.* (1992) et Mann *et al.* (1994) ont montré que la lactotransferrine interagissait avec les glycosaminoglycannes via le domaine N-I et plus particulièrement les séquences GRRRRS (résidus 1-6) et RKVR (résidus 28-31) de la lactotransferrine. Bien qu'aucune expérimentation n'ait directement démontré la participation des protéoglycannes dans la fixation de la lactotransferrine sur les cellules, de nombreux arguments sont en faveur de cette hypothèse. Ainsi les polysaccharides et les dextrans sulfatés sont des inhibiteurs compétitifs de la fixation de la lactotransferrine sur les hépatocytes (McAbee & Esbensen, 1991) et sur les macrophages (Imber & Pizzo, 1983 ; Moguevsky, 1987). De plus, l'élimination sélective des 6 premiers résidus de la chaîne peptidique (séquence GRRRRS) se traduit par une diminution de 80% de la fixation de la lactotransferrine par les hépatocytes sans modifier l'amplitude de l'endocytose de la protéine. Cette hypothèse vient récemment d'être confirmée dans notre laboratoire. En effet, le traitement des cellules MCF7 par les chondroïtines sulfatases entraîne une diminution (80%) de la fixation de la lactotransferrine. Tous ces résultats suggèrent que les protéoglycannes sont directement responsables de la fixation de faible affinité de la lactotransferrine sur les cellules.

## 6. Les composés acides

La lactotransferrine est une glycoprotéine possédant un pHi très basique et pourrait de ce fait interagir avec des groupements anioniques présents à la surface membranaire tels que les acides sialiques des glycoprotéines intégrées dans la membrane, les phospholipides ou encore les acides nucléiques attachés ou associés aux membranes (Moyer, 1979).

Les études réalisées par Bennett *et al.* (1983) et par Moguilevsky (1987) ont montré que des constituants anioniques seul l'ADN membranaire était capable de fixer la lactotransferrine de façon non spécifique. Après le traitement des monocytes par des endonucléases, la fixation de la lactotransferrine à la surface de la cellule est réduite de plus de 50 %. La fixation non spécifique de la lactotransferrine sur les monocytes semble très importante.

## 7. Conclusion

De cette étude, il apparaît que de nombreuses cellules fixent la lactotransferrine. Deux types de récepteur peuvent être mis en évidence suivant leur affinité pour la lactotransferrine : cellules à faible affinité qui possèdent un grand nombre de sites et sont riches en protéoglycannes (hépatocytes et les cellules de glande mammaire), cellules de forte affinité renfermant un faible nombre de sites, vraisemblablement pauvres en protéoglycannes et possédant un récepteur à forte affinité pour les LDL et le récepteur lymphocytaire. Les interactions entre la lactotransferrine et les récepteurs sont localisées dans le domaine N-I de la lactotransferrine et rendent bien compte de la structure du lobe N-I de la lactotransferrine.

### III. ENDOCYTOSE DE LA LACTOTRANSFERRINE

#### A. Introduction

Grâce à des récepteurs de la membrane plasmique, les cellules sont capables d'internaliser sélectivement des macromolécules du milieu extracellulaire et ce phénomène est appelé endocytose. Depuis les premiers travaux de Roth & Porter en 1964, les mécanismes de l'endocytose n'ont cessé d'être étudiés (revues : Rodman *et al.*, 1990 ; Smythe & Warren, 1991 ; Rothman, 1994)). Nous rappellerons brièvement les principales étapes de l'endocytose. Il existe une diversité quant au devenir des ligands et des récepteurs. Quatre cas peuvent se présenter.

#### 1. Recyclage du récepteur et dégradation du ligand

Dans ce cas, le ligand, par exemple les LDL, se lie à son récepteur situé à la surface de la cellule. Après rassemblement des complexes ainsi formés, une invagination de la membrane plasmique se produit tandis qu'un assemblage de protéines (clathrine) constitue une enveloppe de cette vésicule en formation. La vésicule formée contenant le complexe récepteur/ligand est alors transportée dans la cellule, son manteau de clathrine se dissocie et permet à la vésicule de fusionner avec un endosome pour former un endosome précoce. Cette formation s'accompagne d'une acidification due à une pompe à proton ATP-dépendant qui concentre les ions  $H^+$  à l'intérieur des vésicules. La diminution du pH provoque la dissociation du complexe récepteur/ligand à l'intérieur de l'endosome précoce, également appelé CURL ("compartment of uncoupling receptor ligand"). Récepteurs et ligands sont alors dirigés vers leurs destinations. Les récepteurs sont recyclés à la surface cellulaire et les ligands sont transférés dans les prélysosomes (ou endosomes tardifs) puis dans les lysosomes où il seront dégradés.

#### 2. Recyclage du récepteur et du ligand

A pH physiologique dans le fluide extracellulaire, la transferrine monoferrrique se fixe avec une forte affinité sur son récepteur. Le complexe transferrine sérique-récepteur est endocyté via les puits recouverts ("coated pits") (membranes tapissées de clathrine). Ces puits se détachent de la surface de la cellule pour former des vésicules recouvertes ("coated vesicle") ; celles-ci perdent leur revêtement de clathrine et fusionnent avec des structures vésiculaires plus grandes appelées endosomes primaires ("early endosome") ou CURL ("compartment of uncoupling receptor and ligand") (Geuze *et al.*, 1983 ; Dautry-Varsat *et al.*, 1983, Dautry-Varsat & Lodish, 1984, Dautry-Varsat, 1986), le lumen de la vésicule est rapidement acidifié

(pH 6,0-6,2) par l'action d'une pompe à proton ATPasique (Mellman *et al.*, 1986), ensuite, le fer est libéré de la transferrine sérique, cette libération étant facilitée par le récepteur lui-même (Bali *et al.*, 1991 ; Sipe & Murphy, 1991). L'apotransferrine sérique, quant à elle, reste fixée sur son récepteur et le complexe est recyclé en surface. A pH acide, une transition conformationnelle du récepteur de la transferrine a été démontrée qui conduit à son agrégation (Turkewitz & Harrison, 1989). A pH neutre, l'apotransferrine sérique se libère alors de son récepteur, elle peut à nouveau fixer deux ions ferriques et une nouvelle endocytose peut avoir lieu.

### 3. Dégradation du récepteur et du ligand

En raison de son importance, l'EGF ("Epithermal Growth Factor") a fait l'objet d'un grand nombre d'études ; parmi elles, beaucoup ont porté sur son interaction avec des cellules humaines en culture ("fibroblasts") et sur son internalisation et son devenir intracellulaire (Haigler *et al.*, 1979). Le cas de l'EGF est très différent de celui de la transferrine sérique et de la lipoprotéine. En effet, après fixation de l'EGF sur ses récepteurs, lesquels sont disposés de façon homogène à la surface des cellules et non regroupés dans des puits recouverts, les complexes récepteur-EGF finissent par être concentrés au niveau des puits recouverts et sont internalisés pour finalement aboutir dans un endosome, ce dernier va migrer le long des microtubules vers la zone périnucléaire et fusionner avec un lysosome 5 à 10 minutes après l'endosome, l'EGF et son récepteur seront détruits par les enzymes lysosomaux.

### 4. Cas de la transcytose

La transcytose (ou transcytose vectorielle) est le nom donné au transport d'un pôle à l'autre de la cellule de nombreux ligands. Le ligand est relargué intact de l'autre côté de la membrane tandis que le récepteur est dégradé ou bien recyclé. Ce phénomène est très courant dans les cellules épithéliales et concernent, par exemple, le transport de l'insuline, l'albumine, la thyroglobuline. L'insuline, après avoir fixée sur son récepteur de l'adipocyte, est dégradée dans les lysosomes, néanmoins une quantité non négligeable de l'insuline fixée est libérée à l'autre pôle de la cellule (Marshall, 1985). Dans les cas de l'EGF et de son récepteur sur des cellules MDKC ("Madin-Darby Kidney Cell"), il a été constaté que la protéine internalisée pouvait être transportée d'un pôle à l'autre de la cellule, ou être dégradée ou encore être recyclée, c'est-à-dire exocytée du côté où elle avait été internalisée (Maratos-Flier *et al.*, 1987). Dans le cas de l'entérocyte, un transport transépithélial de certaines protéines a été démontré, notamment pour la HRP ("Horse-radish peroxidase") dont la transcytose a été mise en évidence chez différentes espèces de mammifères, dont l'homme et chez un modèle de cellules intestinales humaines en

culture : les cellules Caco-2 (Heyman *et al.*, 1982, 1986, 1988, 1990) et pour les protéines du lait (Marcon-Genty *et al.*, 1989). Il a été montré que 90% des protéines sont dégradés par voie lysosomale et 10% sont transportés sous une forme intacte et antigéniquement active à l'autre pôle de la cellule.

## **B. Internalisation de la lactotransferrine**

L'étude de l'endocytose de la lactotransferrine a été entreprise par de nombreux groupes (Sato *et al.*, 1990 ; Roiron-Lagroux & Figarella, 1990 ; Mc Abee & Esbensen 1991 ; Rochard, 1992 ; Garré *et al.*, 1992 ; Ziere *et al.*, 1992 ; Ismail & Brock, 1993 ; Mikogami *et al.*, 1994) et les résultats obtenus sont très contradictoires et dépendent du système cellulaire utilisé.

### **1. Endocytose de la lactotransferrine**

Garré *et al.* (1992) ont montré que la lactotransferrine, après sa fixation en surface, est internalisée par les cellules de la lignée K562. En effet, après fractionnement cellulaire, les auteurs retrouvent la lactotransferrine localisée dans le noyau. Cette observation suggère l'existence sur la lactotransferrine d'une séquence signal qui oriente le trafic intracellulaire de la lactotransferrine vers le noyau. Cette séquence signal n'a pas été trouvée dans la séquence peptidique. D'autre part, on peut imaginer que la lactotransferrine se fixe non spécifiquement sur les éléments très acides du noyau. Mc Abee & Esbensen (1991) ont précisé la nature du transport de la lactotransferrine médié par les sites calcium dépendant dans le foie. Les hépatocytes internalisent la lactotransferrine via une endocytose dépendante de la clathrine. La lactotransferrine et la lactotransferrine modifiée au niveau de ses résidus d'arginine par 1,2 cyclohexanedione sont injectées par voie intraveineuse à des rats. 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 min pour internaliser 90 % de la lactotransferrine. Un fractionnement subcellulaire indique que la protéine internalisée est transportée dans les lysosomes. De plus, la 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 (Ziere *et al.*, 1992).

Dans notre laboratoire, 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. Sato *et al.* (1990) observent, par microscopie électronique, que la lactotransferrine est internalisée par les



lymphocytes B puis excrétée dans le milieu extracellulaire.

## 2. Transcytose de la lactotransferrine

Mikogami *et al.* (1994) suggèrent 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, ils montrent 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 diferrique 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.

## 3. Fixation de la lactotransferrine sans endocytose

La fixation de la lactotransferrine sans endocytose a été d'abord démontrée sur les cellules HT-29 puisqu'aucune internalisation de la lactotransferrine n'a été observée sur le sous-clone HT29-D4, celle-ci restant fixée à la surface cellulaire (Roiron-Lagrour & Figarella, 1990). Dans notre laboratoire, Rochard a montré que la lactotransferrine ainsi que son fer ne sont pas endocytés par la cellule de glande de mammaire (T47D). 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 (Rochard, 1992). Ismail & Brock (1993) viennent de démontrer que les cellules monocytaires de la lignée U937 fixent la lactotransferrine à la surface cellulaire et relâchent le fer qu'elle complexait dans le milieu extracellulaire, mais qu'il n'y a pas d'endocytose de la lactotransferrine.

# RESULTATS

# I. LOCALISATION DU RECEPTEUR DE LA LACTOTRANSFERRINE DANS LA LIGNEE CELLULAIRE LYMPHOCYTAIRE JURKAT PAR IMMUNOCYTOCHIMIE

## A. Introduction

A l'époque où nous avons entrepris ce travail, le récepteur lymphocytaire de la lactotransferrine humaine avait été mis en évidence sur les lymphocytes humains activés (Mazurier *et al.*, 1989), les plaquettes (Leveugle *et al.*, 1993) et les mégacaryocytes (Nillesse, 1994). Des fixations de lactotransferrine avaient aussi été observées sur les cellules de la glande mammaire humaine (Rochard *et al.*, 1992).

Le récepteur avait été purifié sous la forme d'un complexe lactotransferrine/récepteur par chromatographie d'affinité sur une colonne d'anticorps anti-lactotransferrine à partir d'un lysat de lymphocytes activés par la PHA ou à partir de plaquettes non activées. Deux formes de récepteur avaient été mises en évidence : une forme membranaire de 105 kDa et une forme soluble de 95 kDa (Mazurier *et al.*, 1989 ; Leveugle *et al.*, 1993). La forme soluble du récepteur avait été purifiée et avait permis la préparation d'un anticorps polyclonal. L'utilisation de cet anticorps avait confirmé l'identité structurale et immunologique des récepteurs lymphocytaire et plaquettaire, mais cet anticorps polyclonal n'était pas monospécifique puisqu'il révélait la lactotransferrine et d'autres protéines du cytosquelette comme l'actine. Il s'est avéré très rapidement qu'il nous fallait préparer un anticorps monoclonal contre le récepteur de la lactotransferrine. Cet outil était indispensable pour entreprendre l'étude fonctionnelle *in vitro* et *in vivo* du rôle de la lactotransferrine.

Les lymphocytes activés et les plaquettes ne produisent que de faibles quantités de récepteur. Il nous a donc semblé intéressant de rechercher une autre source de récepteur et pour cela nous avons étudié l'expression du récepteur de la lactotransferrine à la surface de lignées lymphocytaires. Nous avons, dans un premier temps, mis en évidence par cytofluorimétrie en flux, la présence du récepteur de la lactotransferrine à la surface de différentes cellules et notre choix s'est porté sur la lignée Jurkat. Dans un second temps, le récepteur a été préparé en grande quantité à partir du milieu de culture de Jurkat pour la production de l'anticorps monoclonal. Cet anticorps nous a permis de mettre en évidence par

(Cem) et des lymphocytes B (Raji). Finalement, nous avons entrepris l'étude de la localisation du récepteur de la lactotransferrine par immunocytochimie.

L'article présenté ci-après est paru dans la revue : "Eur. J. Cell Biol. (1994) 65 : 164-171". Il résume les résultats que nous avons obtenus concernant l'isolement du récepteur soluble pour la lactotransferrine, la production des anticorps monoclonaux des récepteurs pour la lactotransferrine et la localisation de ces récepteurs sur la cellule Jurkat.

*B. Article 1*

**Immunolocalization of the lactotransferrin receptor on the human T lymphoblastic cell line Jurkat**

## Immunolocalization of the lactotransferrin receptor on the human T lymphoblastic cell line Jurkat

Bao Yuan Bi<sup>a</sup>, Béatrice Leveugle<sup>a</sup>, Jin Li Liu<sup>b</sup>, Arthur Collard<sup>c</sup>, Philippe Coppe<sup>c</sup>, Annie-Claude Roche<sup>d</sup>, Nathalie Nillesse<sup>a</sup>, Monique Capron<sup>b</sup>, Geneviève Spik<sup>a</sup>, Joël Mazurier<sup>1)a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Chimie Biologique, UMR no. 111 du CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq/France

<sup>b</sup> Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte CNRS/INSERM, Institut Pasteur, Lille/France

<sup>c</sup> Centre d'Economie Rurale, Marloie/Belgique

<sup>d</sup> Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire des Glycoconjugés, CBM, CNRS, Orléans/France

Received January 18, 1994

Accepted June 10, 1994

### *Lactoferrin – lymphocyte – monoclonal antibodies – soluble receptor*

Monoclonal antibodies have been raised against the soluble lactotransferrin binding protein purified from the cell culture supernatant of Jurkat cell line, a human T-lymphoblastic cell. All monoclonal antibodies were able to specifically bind to the membrane of Jurkat cells. One of the monoclonal antibodies, DP5B3G10, recognized both the soluble lactotransferrin-binding protein and the membrane lymphocyte lactotransferrin receptor after SDS-PAGE in presence of 2-mercaptoethanol and electrotransfer on nitrocellulose. The monoclonal antibody DP5B3G10 inhibited the binding of lactotransferrin to Jurkat cells and human peripheral activated lymphocytes. In addition, lactotransferrin inhibited the binding of the monoclonal antibody to the cell surface. These results suggest that the 95 kDa lactotransferrin-binding protein isolated from the cell culture medium corresponds to the soluble form of the 105 kDa lymphocyte lactotransferrin receptor. Corresponding proteins of 105 kDa molecular mass were identified in Jurkat and CEM T-cells and Raji B-cells. Finally, the monoclonal antibody DP5B3G10 was used to immunolocalize the lactotransferrin receptor on the Jurkat cells. Using fluorescence and electron microscopy, the receptor was localized both inside and at the cell surface. The cell membrane receptor was associated into clusters. After permeabilization of the plasma membrane, the staining was positive in the peri-membrane area. The region near the nucleus was devoid of receptor.

### Introduction

Human lactotransferrin [23, 24], an iron binding glycoprotein also called lactoferrin, displays considerable structural and biochemical homologies with human serum transfer-

rin. However, lactotransferrin is not specifically bound by the well described receptor which internalizes iron-saturated serum transferrin. Moreover, lactotransferrin does not act as an iron donor for dividing cells [12, 25]. The binding of human lactotransferrin to a great variety of cells has been reported. These include macrophages/monocytes [6, 10], hepatocytes [21, 26], enterocytes [11, 13, 19] from different species, human peripheral activated lymphocytes [20] and more recently, human mammary epithelial cell lines [30], human non-activated platelets [17] and U937, a monocytic cell line [12]. The binding of lactotransferrin can probably be mediated by different types of molecules, and the relationships between the lactotransferrin receptors found on these different cells are not yet known. The cell surface molecule responsible for lactotransferrin binding has only been successfully identified in two cases. For liver and kidney cells, the 600 kDa membrane high density lipoprotein receptor-related protein and the gp330 both display a high affinity for lactotransferrin [34] and are probably responsible for the endocytosis of lactotransferrin [21]. For human activated lymphocytes [20] and human non-activated platelets [17], the lactotransferrin receptor has been partially purified. In that case, the receptor consists of a single transmembrane polypeptide chain of 105 kDa molecular mass [20] which binds lactotransferrin with a binding affinity constant of  $K_a = 10^{+8}$  M. It interacts with lactotransferrin through two accessible loops [15, 16] or an  $\alpha\beta\alpha$  superstructure (residues 4–52) located in the N1 domain of human lactotransferrin [1, 22]. Up to now, internalization of lactotransferrin has only been clearly demonstrated for hepatocytes [21]. However, binding of lactotransferrin to either HT 29-D4 adenocarcinoma cells [29] or U 937 promocytic cells [12] is not followed by endocytosis, suggesting that the high volume binding of lactotransferrin to cells involves a relatively non-specific mechanism, probably due to surface ionic interactions with acidic structural membrane proteins.

<sup>1)</sup> Dr. Joël Mazurier, Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du Centre National de la Recherche Scientifique no. 111, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex/France.

In view of the doubts raised about the function of lymphocyte lactotransferrin-binding protein, we have investigated the presence of intracellular receptor and its release to the medium as a soluble full-length or truncated form. The human lymphoblastic cell line Jurkat was used as a model. First, we demonstrated that Jurkat cells expressed at the cell surface the same lactotransferrin receptor that we previously described on human peripheral activated lymphocytes [20]. We showed that the lactotransferrin membrane receptor is released as a soluble truncated receptor in the culture medium. Then, we prepared a panel of monoclonal antibodies against the soluble lactotransferrin receptor. Finally, using immunofluorescence and electron microscopy, we observed the membrane localization of lactotransferrin receptor and demonstrated the presence of intracellular receptor.

## Materials and methods

### Materials

Bovine serum albumin, phenylmethylsulfonyl fluoride, diisopropyl fluorophosphate, saponin, paraformaldehyde, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane, goat anti-mouse IgM ( $\mu$ -chain specific peroxidase,  $\mu$ -chain specific gold and  $\mu$ -chain specific fluorescein-conjugated) immunoglobulins were purchased from Sigma (St. Louis, MO/USA). Human serum transferrin and blood were a generous gift from the Centre Régional de Transfusion Sanguine (Lille/France). Human anti-CD3 antibody was from Diagast (Lille/France). Human anti-actin and anti-myosin immunoglobulins were from Interchim (Montluçon/France). Iodo-Beads, Iodogen and Triton X-100 were from Pierce (Rockford, IL/USA). Carrier-free  $\text{Na}^{125}\text{I}$ , [ $^{35}\text{S}$ ]methionine, hyperfilm-MP and mouse monoclonal antibody isotyping kit were from Amersham International (Amersham, Buckinghamshire/UK) and 5-([2-(carbohydrazino) methyl]-thio)acetyl) aminofluorescein was from Molecular Probes (Eugene, OR/USA). Sephadex G-25 PD-10 columns were purchased from Pharmacia (Uppsala/Sweden). Nitrocellulose membrane was from Schleicher and Schuell (Dassel/Germany). Molecular mass markers were from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA/USA). Ultrafiltration unit was from Filtron (Coignières/France) and 0.2  $\mu\text{m}$  filter from Millipore (Bedford, MA/USA). RPMI 1640 medium and fetal calf serum were from Eurobio (Les Ulis/France) and D. Dutscher (Brumath/France), respectively. Gentamycin was from Gibco (Eragny/France). Polyethylene glycol 4000 and HAT were purchased from Boehringer (Mannheim/Germany).

### Cell culture

Lymphocytes were obtained from anti-coagulated human blood of healthy volunteers. Blood was layered onto lymphoprep for gradient separation of mononuclear leukocytes as previously described [20]. The monocytes/macrophages were depleted by adhesion for 2 h on Nunc culture plates under a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. The non-adherent cells ( $1.6 \times 10^6/\text{ml}$ ) were stimulated for 72 h with the anti-CD3 antibody (50 ng/ml) for 72 h in RPMI 1640 containing 1 mM L-glutamine, 25 mM Hepes, 300 mg/l pyruvate, 50 mg/l gentamycin and 10% of heat-inactivated fetal calf serum. Jurkat, CEM lymphoblastic T-cell lines, the Raji lymphoblastic B-cell line and the HL-60 monocytic cell line were routinely grown under similar conditions.

### Radiolabeling

The metabolic  $^{35}\text{S}$ -labeling was carried out on  $5 \times 10^6/\text{ml}$  cells in a methionine-free RPMI 1640 medium. Then, [ $^{35}\text{S}$ ]methionine (10 mCi/ $10^6$  cells) was added, and cells were incubated for 8 h.  $^{125}\text{I}$  surface cell labeling was performed on cells resuspended at a cell density of  $50 \times 10^6$  in Tris buffered saline, containing 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 1 mM KI. One Iodo-Bead and 0.3 mCi of  $^{125}\text{I}$  solution were added and the mixture was gently shaken every 5 min for 30 min. Finally, the radiolabeled cells were extensively washed and solubilized in Tris buffered saline containing 1% Triton X-100 and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride.

### Fluorescein labeling

Fluorescein labeling of lactotransferrin was carried out by coupling a 5-([2-(carbohydrazino)methyl]-thio)acetyl) aminofluorescein probe on aldehyde groups of lactotransferrin glycans resulting from the mild periodate oxidation of N-acetylneuraminic acid residues as previously described [17].

### Immobilization of proteins

Human lactotransferrin, purified according to Spik et al. [32], bovine serum albumin and anti-human lactotransferrin immunoglobulins were immobilized on Sepharose 4-B [18]. The binding capacity of 1 ml of Sepharose beads was about 0.8 to 1.5 mg of protein.

### Purification of the soluble lactotransferrin receptor

After removal of Jurkat cells or activated lymphocytes by centrifugation, the cell-free medium, to which the protease-inhibitor diisopropyl fluorophosphate was added to a final concentration of 10  $\mu\text{g/l}$ , was filtered through a 0.2  $\mu\text{m}$  filter and 20-fold concentrated at 4°C. Soluble receptor was purified by anti-ligand affinity chromatography as described previously [20] with the following modifications: lactotransferrin/lactotransferrin receptor complexes were bound to anti-lactotransferrin immunoglobulins by incubating overnight 50 ml of concentrated culture medium with 1 mg of lactotransferrin and 10 ml of anti-lactotransferrin immunoglobulins immobilized on Sepharose 4B. All the chromatography procedures were carried out at 4°C in the presence of 0.1 mM diisopropyl fluorophosphate. The lactotransferrin-binding proteins were eluted with 10 mM Tris-HCl, 6 M urea buffer, pH 8 and precipitated by 10% trichloroacetic acid, washed with distilled ethanol and lyophilized.

### Electrophoresis and electroblotting

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed on a 1.5 mm thick slab gel according to the method of Laemmli [14]. Electroblotting of membrane proteins to nitrocellulose was performed overnight at 4°C according to Towbin et al. [33] in a 20 mM Tris, 150 mM glycine, 20% methanol buffer at 0.3 A. Nitrocellulose paper was soaked for 2 h with 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, pH 7.4 containing 0.5% ovalbumin. Then, monoclonal anti-lactotransferrin immunoglobulins were added at a concentration of 10  $\mu\text{g/ml}$ . After 2 h incubation, the nitrocellulose sheets were washed 3 times 10 min with a solution of 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, pH 7.4 and then incubated for 2 h in the same buffer with peroxidase-labeled anti-mouse IgM immunoglobulins. Proteins were stained using Coomassie Blue or detected by staining with diaminobenzidine and hydrogen peroxide.

#### *Production of monoclonal anti-soluble lactotransferrin receptor immunoglobulins*

BALB/c mice were immunized intraperitoneally, each with 30 µg of lactotransferrin/soluble lactotransferrin receptor complex containing traces of bovine serum albumin in 200 µl of phosphate-buffered saline (PBS) mixed with complete Freund's adjuvant for the first injection. Five other injections were performed at three-week intervals using incomplete Freund's adjuvant. Four days after the last injection which was performed without adjuvant, the spleen was aseptically removed. The splenocytes were mixed with mouse myeloma cells SP2/0-Ag 14 at a ratio of 1:1, and the fusion was induced with polyethylene glycol 4000. The cells were then seeded into 96-well tissue culture plates at a density of  $6 \times 10^4$  cells per well in 150 µl of selective medium containing HAT. The positive hybridomas were further screened. The selected clones were amplified and injected into the peritoneal cavity of mice for high scale production of antibodies. The latter were purified by gel filtration chromatography on Superdex 200 column for IgM subclass and on protein G-Sepharose for other subclasses of mouse immunoglobulins. Isotypes were determined by enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibody isotyping kit.

#### *Screening procedures*

Microtiter plates were coated with PBS containing either 1 µg/ml of bovine serum albumin or 0.1 µg/ml human lactotransferrin. The amount of coated proteins was 100 ng per well. Plates were covered and left overnight at 4°C. In order to block the non-specific binding sites, 200 µl of casein hydrolysate were added to each well, and plates were incubated for 30 min at room temperature. After three washes with PBS containing 0.1% Tween 20, 100 µl of culture supernatants were added, and the plates were incubated for 1 h at room temperature. Binding of monoclonal antibodies was detected with peroxidase-labeled conjugate using 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0.01% 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine in 1 M sodium acetate buffer as substrate. Finally, Jurkat cells were layered at a density of  $1 \times 10^6$  cells/well on Microtiter plates with round bottom, and then centrifuged at 1200 rpm for 15 min at 4°C. The supernatant was discarded and the cells resuspended in 200 µl of PBS containing 0.1% of NaN<sub>3</sub> at 4°C. The centrifugation and washing steps were repeated twice, then the cells were resuspended in 180 µl of hybridoma supernatants and 20 µl of phosphate-buffered saline containing 0.1% of NaN<sub>3</sub> and incubated 1 h at 4°C. Cells were washed as previously described, resuspended in a solution of fluorescein-conjugated goat anti-mouse IgG or IgM and incubated for 1 h at 4°C. Cells were analyzed using an inverted UV light microscope.

#### *Binding of monoclonal anti-soluble lactotransferrin receptor immunoglobulins to lymphocyte cells*

Cells were rinsed with PBS three times and washed with PBS containing 0.5% ovalbumin in order to reduce non-specific background staining. Then, cells were incubated with anti-lactotransferrin receptor monoclonal immunoglobulins DP5B3G10 at a concentration of 10 µg/ml for 2 h at room temperature and washed three times in PBS. When necessary, cells were fixed in 2% paraformaldehyde and permeabilized in 0.05% saponin for 1 h before incubation with anti-lactotransferrin receptor monoclonal immunoglobulins. Finally, cells were incubated for 1 h with either fluorescein-conjugated or gold-labeled goat anti-mouse IgM immunoglobulins at a dilution of 1:20.

#### *Competition experiments*

Fixed cells were treated with either 100 µg per ml of unlabeled lactotransferrin, or 100 µg serum transferrin or 100 to 200 µg per ml of anti-lactotransferrin receptor monoclonal immunoglobulin

DP5B3G10 for 30 min before addition of 5 µg of fluorescein-carbohydrate-labeled lactotransferrin. After 1 h incubation, cells were washed twice before analysis. In a second set of experiments, cells were preincubated with unlabeled lactotransferrin at a concentration of 4 mg per ml or non-related mouse IgM immunoglobulins, for 30 min at room temperature. Then, after washing, cells were incubated for 1 h with the anti-lactotransferrin receptor monoclonal immunoglobulins DP5B3G10 at a concentration of 10 µg per ml. Staining was performed using fluorescein-conjugated goat anti-mouse IgM immunoglobulins.

#### *Flow-cytometry analysis*

Data were collected on a Becton Dickinson FACScan cytofluorimeter. The light-scatter channels were set on linear gains and the fluorescence channels on a logarithmic scale. Cells were gated for forward and side-angle scatters and 5000 fluorescent particles of each gated population were analyzed.

#### *Fluorescence microscopy*

Cytospin preparations were obtained by cytocentrifugation and mounted in PBS/glycerol containing 50 mg/ml of 1,4-diazabicyclo [2.2.2]octane. Cells were viewed using a confocal microscope Nikon.

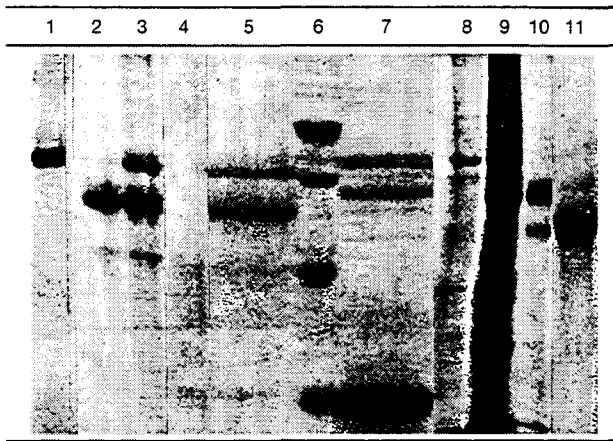
#### *Immunoelectron microscopy*

Cells were washed with 0.1 M cacodylate buffer and postfixed for 2 h in 1% osmium tetroxide in water. The contrast was enhanced by the incubation of the specimens with 2% uranyl acetate in 0.5% sucrose solution at 4°C overnight. Specimens were then dehydrated in acetone and embedded in Lowicryl K4M according to instructions of the manufacturer. Ultrathin sections of 100 nm were cut on a Reichert ultracut E Ultramicrotome with Diatome diamond knife and were examined with a Philips EM420 electron microscope.

## **Results**

#### *Isolation of the soluble lactotransferrin receptor*

The concentrated culture medium of <sup>35</sup>S-labeled cells, to which human lactotransferrin has been added, was chromatographed on immobilized anti-human lactotransferrin immunoglobulins as previously described [20]. The SDS-PAGE given in Figure 1 shows, for example, in the case of peripheral activated lymphocytes, that the proteins eluted with 10 mM Tris-HCl, 6 M urea, pH 8 contained one radio-labeled lactotransferrin binding protein of molecular mass close to 95 kDa (Fig. 1, lane 1). The analysis of the Coomassie Blue staining of the SDS-PAGE indicates that the 95 kDa lactotransferrin-binding protein was purified from both activated lymphocytes (Fig. 1, lanes 3, 5) and Jurkat cells (Fig. 1, lane 10) together with 80 and 66 kDa molecular mass proteins. The 95 kDa lactotransferrin-binding protein was not detected by Coomassie Blue staining when purification procedures were carried out without addition of lactotransferrin (Fig. 1, lane 4). Furthermore, the 95 kDa protein was not present in the culture medium of HL-60 (Fig. 1, lane 11), a promyelocytic cell line which does not express detectable amounts of lactotransferrin receptor. The 80 kDa protein was mainly eluted from the immobilized anti-lactotransferrin immunoglobulins column with



**Fig. 1.** Purification of the membrane and of the soluble human lactotransferrin receptor from peripheral activated lymphocytes and Jurkat cells. Cell-free medium of activated lymphocytes (lanes 1–5), Jurkat cells (lane 10) and HL-60 cells (lane 11) and 1% Triton X-100 membrane of activated lymphocytes (lane 7) and Jurkat cell (lane 8) extracts were chromatographed on immobilized anti-lactotransferrin immunoglobulins. Proteins eluted with 10 mM Tris-HCl, 6 M urea, pH 8 (lanes 1, 3–5, 7, 8, 10, 11) and with 0.1 M Gly-HCl, pH 2.8 (lane 2) were submitted to SDS-PAGE under reducing conditions. Lactotransferrin was omitted from the chromatography mixture during the purification procedure of lactotransferrin receptor in lane 4. The protein content of the 1% Triton X-100 membrane of Jurkat cell extracts is shown in lane 9. Activated lymphocytes were [<sup>35</sup>S]methionine-labeled in lanes 1 to 3 and detection of [<sup>35</sup>S]methionine-labeled proteins (lane 1) was performed by autoradiography. Staining of proteins was performed using Coomassie Blue (lanes 2–11). Molecular mass markers (lane 6):  $\beta$ -galactosidase (116.3 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (42.7 kDa).

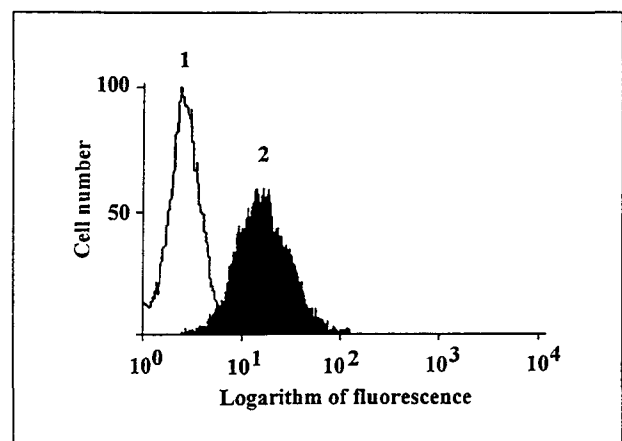
0.1 M Gly-HCl, pH 2.8 (Fig. 1, lane 2), and has been identified, using monospecific immunoglobulins, as human lactotransferrin (data not shown). Using monospecific immunoglobulins, the 66 kDa protein has been identified as bovine serum albumin.

Proteins purified by the same method from the cell-free culture medium and from the 1% Triton X-100 membrane extract were quite different. First, the 95 kDa soluble lactotransferrin-binding protein purified from the cell culture medium was not present in the protein fraction purified from the Triton X-100 extract of both Jurkat cells (Fig. 1, lane 8) and activated lymphocytes (Fig. 1, lane 7). In fact, the lactotransferrin receptor isolated under these experimental conditions from cell membranes, the protein content of which is given in lane 9 in the case of Jurkat cells, was migrating, as previously described [20], as a 105 kDa molecular mass protein. The membrane lactotransferrin receptor purified fraction contained in addition to lactotransferrin, a 42 kDa protein which has been identified (not shown), using specific immunoglobulins, as actin. In the case of activated lymphocytes, an additional protein of 90 kDa (Fig. 1, lane 7), was sometimes revealed. The 110 kDa protein we have previously described [17] was not observed under these experimental conditions.

#### *Production and screening of monoclonal immunoglobulins to soluble human lactotransferrin receptor from lymphocytes*

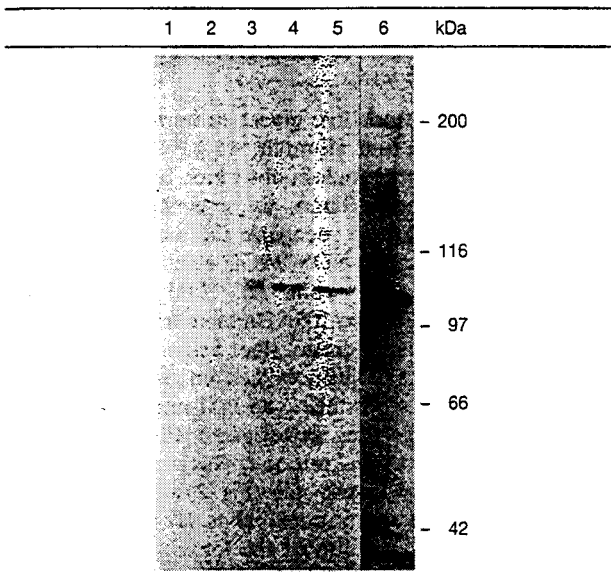
After elimination of positive clones to human lactotransferrin and bovine serum albumin, we have first selected clones producing immunoglobulins which bind to the cell surface of Jurkat cells. Then, we screened 10 selected clones for their ability to recognize the membrane lactotransferrin receptor after SDS-PAGE electrophoresis and electrotransfer on nitrocellulose. Only the clone DP5B3G10 recognized the 105 kDa membrane lactotransferrin receptor prepared from either activated lymphocytes or Jurkat cells and immobilized on a nitrocellulose sheet. The clone was producing an IgM-immunoglobulin, the specificity of which was investigated. First, using flow cytometry, the monoclonal antibody was demonstrated to bind to the surface of Jurkat cells (Fig. 2) when compared to non-specific mouse immunoglobulins. By measuring the variation of the mean value of the logarithm of fluorescence, the percentage of positive cells has been estimated to 90% of the total Jurkat cell population. Similar results have been obtained with activated lymphocytes, T-lymphoblastic cell line such as CEM and the B-lymphoblastic Raji cell line. We do not observe specific binding to HL-60 cells (data not shown).

Finally, the anti-lactotransferrin receptor monoclonal immunoglobulin DP3B5G10 was shown to recognize on a Western blot of a purified fraction of membrane lactotransferrin receptor (Fig. 3, lane 6) or a 1% Triton X-100 membrane extract, only one protein of 105 kDa molecular mass for each of the analyzed cells (Fig. 3): Jurkat (lane 3) and CEM T-lymphoblastic cells (lane 4) and Raji B-lymphoblastic cells (lane 5). In contrast, and as expected, the antibody did not stain a 1% Triton X-100 membrane extract of HL-60 cells (Fig. 3, lane 1). Addition of purified soluble lactotransferrin receptor fraction highly decreased



**Fig. 2.** Binding of the monoclonal anti-lactotransferrin immunoglobulin DP5B3G10 to Jurkat cells. Cells were incubated with monoclonal anti-lactotransferrin receptor immunoglobulin and the binding was monitored by flow cytometry after staining with fluorescent anti-mouse IgM immunoglobulins (2). Control (1) was performed using non-specific mouse IgM immunoglobulins.



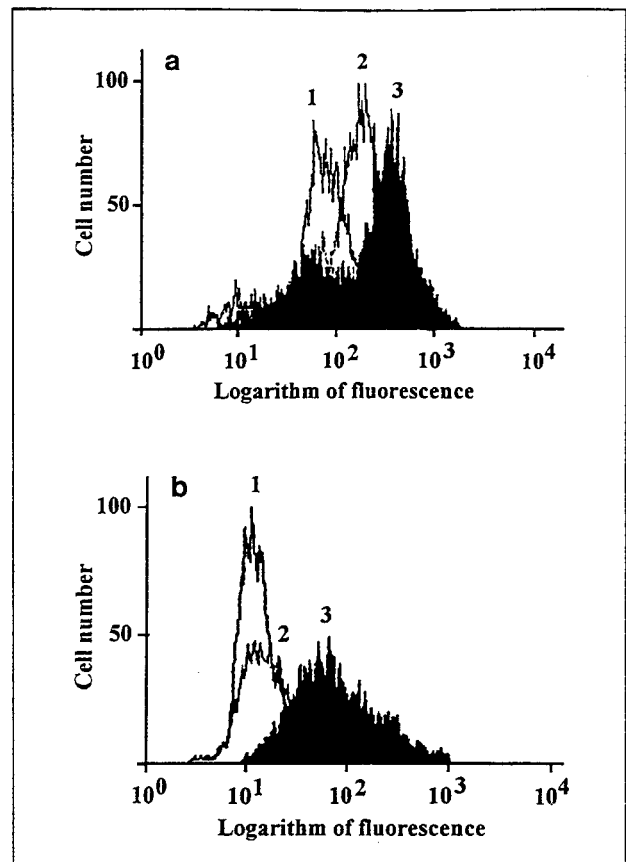


**Fig. 3.** Specificity of the anti-lactotransferrin receptor immunoglobulin. 1% Triton X-100 membrane extract of HL-60 (lane 1), Jurkat (lanes 2, 3), CEM (lane 4), and Raji (lane 5) cells were submitted to SDS-PAGE under reducing conditions and electrotransferred on nitrocellulose. After incubation with the monoclonal immunoglobulin DP5B3G10, the lactotransferrin receptor was detected using peroxidase-labeled anti-mouse IgM immunoglobulins. Control was performed by incubating 1% Triton X-100 membrane extract of Jurkat cells with the monoclonal immunoglobulin DP5B3G10 in presence of soluble lactotransferrin receptor enriched fraction (lane 2).

the reactivity of the antibody to membrane lactotransferrin receptor in the Western blot of Jurkat cells (Fig. 3, lane 2) thus suggesting that the soluble receptor has blocked the antibody.

#### Competition experiments

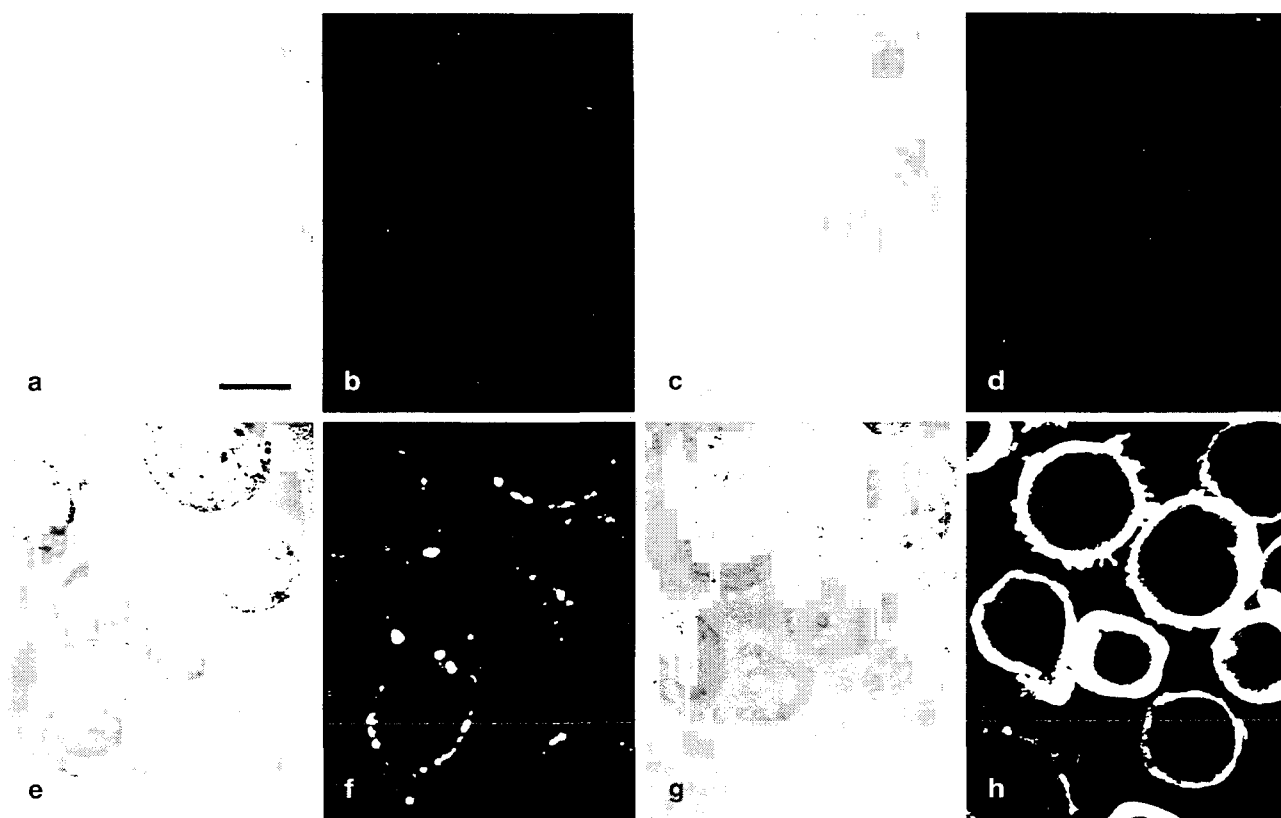
To determine whether the monoclonal anti-lactotransferrin receptor immunoglobulin DP5B3G10 was able to affect the binding of lactotransferrin, competition experiments were performed. Jurkat cells were incubated at least 30 min with either serum transferrin, lactotransferrin or monoclonal immunoglobulin DP5B3G10 before addition of fluorescein-carbohydrate-labeled lactotransferrin. Under these experimental conditions, as it is shown in Figure 4a, the binding activity of fluorescein-carbohydrate-labeled lactotransferrin was inhibited by both unlabeled lactotransferrin and anti-lactotransferrin receptor monoclonal immunoglobulins DP5B3G10. Similarly, the inhibition of the binding of anti-lactotransferrin receptor immunoglobulins to lymphocytes after saturation of membrane receptor with lactotransferrin has been analyzed. The incubation of cells with lactotransferrin fully inhibited binding of the monoclonal anti-lactotransferrin receptor (Fig. 4b).



**Fig. 4.** Competitive inhibition assays between lactotransferrin and monoclonal anti-lactotransferrin receptor. – a. Jurkat cells were treated with either unlabeled lactotransferrin (1), monoclonal anti-lactotransferrin receptor immunoglobulin (2) or serum transferrin (3) and then incubated with fluorescein-carbohydrate-labeled lactotransferrin. – b. Cells were preincubated with unlabeled lactotransferrin (1) or non-specific mouse IgM immunoglobulins (3) and then incubated successively with monoclonal immunoglobulin DP5B3G10 and fluorescent anti-mouse IgM immunoglobulins. Control was performed in absence of monoclonal immunoglobulin DP5B3G10 (2).

#### Immunolocalization of the lactotransferrin receptor

In the first set of experiments, the monoclonal antibody DP5B3G10 has been used to localize the lactotransferrin receptor on Jurkat cells using immunofluorescence techniques. The cell surface staining was analyzed using a confocal microscope. As shown in Figure 5, almost all the examined cell populations (Fig. 5e) were positive (Fig. 5f) and the staining of the control cells was negative (Figs. 5a, b). Staining was localized on the cell membrane, in a form of bright patches of fluorescence (Fig. 5f). The staining observed after fixation and permeabilization of cells was quite different as shown in Figures 5c, d and g, h. Intense lactotransferrin receptor immunoreactivity was apparent inside the cell (Fig. 5h) contrarily to cells stained with non-related IgM immunoglobulins (Fig. 5d). The strong staining of Figure 5h can be accounted for by the properties of



**Fig. 5.** Immunolocalization of the lactotransferrin receptor on Jurkat cells. The receptor was localized by confocal immunofluorescence microscopy using the monoclonal immunoglobulin DP3B5G10. Intact cells (a, b, e, f), permeabilized cells (c, d, g, h).

cell control (a, c, e, g), in which the monoclonal DP3B5G10 immunoglobulin has been replaced by non-specific mouse IgM immunoglobulins (b, d). – Bar 10  $\mu$ m.

saponin which will extract phospholipids from the cell plasma membrane during permeabilization and damage of the cell. Fluorescence staining was uniform and abundant in the region proximal to the plasma membrane. In all cells, the cytoplasm located near the nucleus and the nucleus itself were not stained.

To further identify localization of the lactotransferrin receptor at the cell surface, immunoelectron microscope studies were performed. Gold particles were observed only in association with the plasma membrane of Jurkat cells and as shown in Figure 6, particles were found arranged in clusters. Some particles were localized in coated pit-like domains surrounded by non-coated membrane domains.

## Discussion

Numerous biological responses have been assigned to lactotransferrin after binding to cells. The hepatic lactotransferrin receptor is probably responsible for the rapid clearance of lactotransferrin from the serum [3, 28] while the intestinal receptor could be involved in the mechanism of iron absorption [4, 7, 11, 19, 24]. In addition, lactotransferrin has been suspected to act in a variety of immunological

processes [5, 36] and in the inhibition of ADP-induced platelet aggregation [17, 27]. In fact, the mechanism by which lactotransferrin acts on cells is still controversial. Studies showed that lactotransferrin can be internalized [9, 21] and follows a pathway leading to the nucleus [9]. In contrast, some studies demonstrated binding of lactotransferrin without internalization [12, 29]. This study has attempted to provide evidence that the 105 kDa lactotransferrin receptor we have characterized on peripheral activated lymphocytes is a specific element which can be localized intracellularly and released into the medium.

The lactotransferrin-binding protein has been purified from the cell culture medium of both Jurkat cells or activated lymphocytes by anti-ligand affinity chromatography. Traditional affinity chromatography on immobilized ligand failed to purify both soluble and membrane lactotransferrin-binding molecules. In fact, we have demonstrated that lactotransferrin interacts with the lymphocyte receptor through a highly accessible domain, whose amino acid side chains are very reactive [16]. Covalent binding of various reagents leads to the inactivation of the binding activity of lactotransferrin. Therefore, it can be assumed that the immobilization of lactotransferrin results in the destruction of the binding activity of human lactotransferrin.



**Fig. 6.** Electron microscopy immunolocalization of the lactotransferrin receptor on Jurkat cells. The receptor was localized using the monoclonal immunoglobulin DP3B5G10 on intact cells. – Bar 0.2  $\mu\text{m}$ .

Several monoclonal antibodies have been raised against both the soluble lactotransferrin-binding protein and the Jurkat membrane proteins. Among them only DP5B3G10 recognized on Western blot and after denaturation the 105 kDa membrane receptor we have purified from peripheral activated lymphocytes [20], platelets [17] and Jurkat cells. Incubation of Jurkat cells with this monoclonal antibody fully inhibited the binding of lactotransferrin, suggesting that the antibody recognized an epitope which lies very near to, or in the regions which are involved in the binding of the lactotransferrin molecule. The possibility of cross-reaction between anti-lactotransferrin receptor with a shared epitope on another protein must be considered. One line of evidence argues against this hypothesis. The anti-lactotransferrin receptor monoclonal immunoglobulin DP5B3G10 recognized only a single band of a molecular mass corresponding to that lactotransferrin receptor on immunoblots of whole cell plasma membrane of T- and B-myeloid cell lines for which the presence of lactotransferrin receptor has been described [35]. It is unlikely that the immunoglobulins cross-reacted with a protein in the native state and did not recognize the same protein after SDS denaturation. Although we do not have any information on their amino acid sequence, it could be assumed that the lactotransferrin binding proteins correspond to the soluble lactotransferrin receptor released from the cell membrane of activated lymphocytes and Jurkat cells.

The purification of actin together with the membrane lactotransferrin receptor suggests that the membrane receptor interacts with the cytoskeleton as is the case, for example, for epidermal growth factor [8]. This hypothesis is strengthened by the observation that the soluble lactotransferrin receptor was never copurified with cytoskeleton proteins.

The production of shed receptors may be a feature common to several receptor-ligand systems and has been well documented [2]. It is now established that soluble receptors correspond to the extracellular ligand binding domains of the respective cell-associated receptors [31]. The molecular mass of the lactotransferrin soluble receptor is about 95 kDa while that of the membrane receptor has been estimated to 105 kDa. The truncated receptor is lacking 80 to 100 amino acid residues which could correspond to the cytoplasmic and transmembrane domains.

Lactotransferrin receptor appears to be localized both inside the cell and at the cell surface. It was not possible to identify by fluorescence microscopy the nature of the intracellular substructures containing lactotransferrin receptor. These results highly suggest that Jurkat cells, and probably lymphocytes, can bind and internalize lactotransferrin to cell compartments which are yet to be described. However, the absence of lactotransferrin receptor near the nucleus does not support the recent finding of Garré et al. [9] who suggest that lactotransferrin can be internalized by the cell and enter the nucleus.

*Acknowledgements.* This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche no. 111, Director: Prof. A. Verbert), the Université des Sciences et Technologies de Lille and by Grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer and the Institut National de la Recherche Scientifique et Médicale (Contract no. 930507). We are grateful to Prof. J. Montreuil for his personal interest in this work and to Dr. J. P. Perraudin for helpful discussion. We are indebted to Dr. D. Brévière from the Centre Régional de Transfusion Sanguine (Director: Dr. J. J. Huart, Lille/France) who provided us with blood fractions and to Mrs. O. Labiau for her technical assistance.

## References

- [1] Anderson, B. F., H. M. Baker, G. E. Norris, D. W. Rice, E. N. Baker: Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **209**, 711–734 (1989).
- [2] Beaudoin, A. R., G. Grondin: Shedding of vesicular material from the cell surface of eukariotic cells: different cellular phenomena. *Biochim. Biophys. Acta* **1071**, 203–213 (1991).
- [3] Bennett, R. M., T. Kokocinski: Lactoferrin turnover in man. *Clin. Sci.* **57**, 453–460 (1979).
- [4] Britton, J. R., O. Koldovsky: Luminal digestion of lactoferrin in suckling and weaning rats. *Am. J. Physiol.* **253**, G397–G403 (1987).
- [5] Brock, J.: Iron binding proteins and immunity. In: M. de Sousa, J. Brock (eds.): *Iron in Immunity, Cancer and Inflammation*. pp. 81–108. John Wiley and Sons, Chichester 1986.
- [6] Birgens, H. S., N. E. Hansen, H. Karle, L. O. Kristensen: Receptor binding of lactoferrin by human monocytes. *Br. J. Haematol.* **54**, 383–391 (1983).

- [7] Cox, T., J. Mazurier, J. Montreuil, G. Spik, T. J. Peters: 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 (1979).
- [8] Den Hartigh, J. C., P. M. P. van Bergen en Henegouwen, A. J. Verkleij, J. Boonstra: The EGF receptor is an actin-binding protein. *J. Cell Biol.* **119**, 349–355 (1992).
- [9] Garré, C., G. Bianchi-Scarra, M. Sirito, M. Musso, R. Ravazzolo: Lactoferrin binding sites and nuclear localization in K562(S) cells. *J. Cell. Physiol.* **153**, 477–482 (1992).
- [10] Goavec, M., J. Mazurier, J. Montreuil, G. Spik: Rôle des glycanes dans la fixation de la sérotransferrine et de la lactotransferrine humaines sur les macrophages alvéolaires humains. *C. R. Acad. Sci. Paris* **301**, 689–693 (1985).
- [11] Hu, W. L., J. Mazurier, J. Montreuil, G. Spik: Isolation and partial characterization of a lactotransferrin receptor from mouse intestinal brush border. *Biochemistry* **29**, 535–541 (1990).
- [12] Ismail, M., J. H. Brock: Binding of lactoferrin and transferrin to human promonocytic cell line U937. *J. Biol. Chem.* **268**, 21618–21625 (1993).
- [13] Kawakami, H., B. Lönnerdal: Isolation and function of a receptor for human lactoferrin in human fetal intestinal brush-border membranes. *Am. J. Physiol.* **261**, 841–846 (1991).
- [14] Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
- [15] Legrand, D., J. Mazurier, P. Maes, E. Rochard, J. Montreuil, G. Spik: Inhibition of the specific binding of human lactotransferrin to human peripheral blood phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes by fluorescein labeling and location of the binding site. *Biochem. J.* **276**, 733–738 (1991).
- [16] Legrand, D., J. Mazurier, A. Ellass, E. Rochard, G. Vergoten, P. Maes, J. Montreuil, G. Spik: Molecular interactions between human lactotransferrin and the phytohemagglutinin-activated human lymphocyte lactotransferrin receptor lie in two loop-containing regions of the N-terminal domain I of human lactotransferrin. *Biochemistry* **31**, 9243–9251 (1992).
- [17] Leveugle, B., J. Mazurier, D. Legrand, C. Mazurier, J. Montreuil, G. Spik: Lactotransferrin binding to its platelet receptor inhibits platelet aggregation. *Eur. J. Biochem.* **213**, 1205–1211 (1993).
- [18] March, S. C., I. Parikh, P. Cuatrecasas: A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Anal. Biochem.* **60**, 149–152 (1974).
- [19] Mazurier, J., J. Montreuil, G. Spik: Visualization of lactotransferrin brush-border receptors by ligand-blotting. *Biochim. Biophys. Acta* **821**, 453–460 (1985).
- [20] Mazurier, J., D. Legrand, W. L. Hu, J. Montreuil, G. Spik: Expression of human lactotransferrin receptors in phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Eur. J. Biochem.* **179**, 481–487 (1989).
- [21] McAbee, D. D., K. Esbensen: Binding and endocytosis of apo- and holo-lactoferrin by isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **266**, 23624–23631 (1991).
- [22] Metz-Boutigue, M. H., J. Jollès, J. Mazurier, F. Schöentgen, D. Legrand, G. Spik, J. Montreuil, P. Jollès: Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur. J. Biochem.* **145**, 659–676 (1984).
- [23] Montreuil, J., S. Mullet: Isolement d'une lactosidérophiline du lait de Femme. *C. R. Acad. Sci. Paris* **250D**, 1736–1737 (1960).
- [24] Montreuil, J., J. Tonnelat, S. Mullet: Préparation et propriétés de la lactosidérophiline (lactotransferrine) du lait de Femme. *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 413–421 (1960).
- [25] Nichols, B. L., K. S. McKee, H. A. Huebers: Iron is not required in the lactoferrin stimulation of thymidine incorporation into DNA of rat crypt enterocytes. *Pediatric Res.* **27**, 525–528 (1990).
- [26] Prieels, J. P., S. V. Pizzo, L. R. Glasgow, J. C. Paulson, R. L. Hill: Hepatic receptor that specifically binds oligosaccharides containing fucosyl N-acetylglucosamine linkages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 2215–2219 (1978).
- [27] Raha, S., C. Dosquet, J. F. Abgrall, P. Jollès, A. M. Fiat, J. Caen: A tetrapeptide derived from lactotransferrin inhibits binding of monoclonal antibody against glycoprotein gp IIb-IIIa on ADP-stimulated platelets and megakaryocytes. *Blood* **72**, 172–178 (1988).
- [28] Retegui, L. A., N. Moguilevski, C. F. Castragne, P. L. Mason: Uptake of lactoferrin by the liver. I. Role of the reticuloendothelial system as indicated by blockade experiments. *Lab. Invest.* **50**, 323–328 (1984).
- [29] Roiron-Lagroux, D., C. Figarella: Evidence for a different mechanism of lactoferrin and transferrin translocation on HT29-D4 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**, 837–842 (1990).
- [30] Rochard, E., D. Legrand, M. Lecocq, R. Hamelin, M. Crépin, J. Montreuil, G. Spik: Characterization of lactotransferrin receptor in epithelial cell lines from non-malignant human breast, benign mastopathies and breast carcinomas. *Anticancer Res.* **12**, 2047–2052 (1992).
- [31] Shih, Y. J., R. D. Baynes, B. G. Hudson, C. H. Flowers, B. S. Shikne, J. D. Cook: Serum transferrin receptor is a truncated form of tissue receptor. *J. Biol. Chem.* **265**, 19077–19081 (1990).
- [32] Spik, G., G. Strecker, B. Fournet, S. Bouquelet, J. Montreuil, L. Dorland, H. van Halbeek, J. F. G. Vliegthart: Primary structure of the glycans isolated from human lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* **121**, 413–419 (1982).
- [33] Towbin, H., T. Staehelin, J. Gordon: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350–4354 (1979).
- [34] Willnow, T. E., J. L. Goldstein, K. Orth, M. S. Brown, J. Herz: Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen activator inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance. *J. Biol. Chem.* **267**, 26172–26180 (1992).
- [35] Yamada, Y., T. Amagasaki, D. Jacobsen, R. Green: Lactoferrin binding by leukemia cell lines. *Blood* **70**, 264–270 (1987).
- [36] Zimecki, M., J. Mazurier, M. Machnicki, Z. Wiczorek, J. Montreuil, G. Spik: Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4-CD8-murine thymocytes. *Immunol. Lett.* **30**, 119–124 (1991).

### C. Conclusion

Nous avons retrouvé les résultats préalablement acquis sur les lymphocytes activés et les plaquettes. Le récepteur a été purifié par chromatographie d'affinité sur colonne d'anticorps anti-lactotransferrine immobilisés à partir de la cellule Jurkat. L'étude biochimique du récepteur membranaire a montré qu'il s'agissait d'une glycoprotéine monocaténaire de masse moléculaire de 105 kDa, identique à celle des récepteurs isolés des lymphocytes activés ou des plaquettes non activées.

La présence du récepteur soluble de la lactotransferrine a été démontrée dans le milieu de culture de la lignée Jurkat. Le récepteur soluble a été purifié et possède une masse moléculaire de 95 kDa. La reconnaissance de cette protéine soluble par la lactotransferrine marquée à  $^{125}\text{I}$  a été démontrée. La différence de 10 kDa entre la forme soluble et la forme membranaire devrait correspondre à la région d'ancrage dans la membrane plasmique et à la région cytoplasmique du récepteur. Cette fraction a permis l'immunisation de souris et la production d'hybridomes. Parmi les hybridomes produisant des anticorps contre les protéines solubles nous avons sélectionné l'hybridome DP5B3G10 qui reconnaissait une protéine de masse moléculaire de 105 kDa de la membrane plasmique de la cellule Jurkat, soit la masse moléculaire du récepteur de la lactotransferrine humaine.

Nous avons montré que l'anticorps monoclonal bloque la fixation de la lactotransferrine sur les cellules Jurkat, et réversiblement que la lactotransferrine inhibe la reconnaissance du récepteur par l'anticorps monoclonal. Finalement, l'étude immunocytochimique a montré que le récepteur de la lactotransferrine est localisé sur la membrane cytoplasmique et dans le cytoplasme. A la surface de la cellule, les molécules de récepteur sont concentrées dans de petits "clusters" et sont souvent associées à des puits recouverts. Dans le cytoplasme le récepteur est trouvé à proximité de la membrane et est absent de la région périnucléaire.

Cette localisation suggère que la lactotransferrine est internalisée par cette cellule et que plusieurs mécanismes de transduction pourraient médier l'action biologique de la lactotransferrine. Afin de mieux comprendre les mécanismes de l'interaction du récepteur avec le ligand, nous avons entrepris l'étude de l'internalisation de la lactotransferrine. C'est pourquoi nous avons repris les expériences d'endocytose qui n'avaient jusqu'à présent donné aucun résultat positif.

## II. ETUDE DU MECANISME D'ENDOCYTOSE DE LA LACTOTRANSFERRINE

### A. Introduction

Jusqu' à présent, les résultats obtenus concernant l'endocytose de la lactotransferrine sont très contradictoires. Sato *et al.* (1990) observent par microscopie électronique que la lactotransferrine est internalisée par les lymphocytes B puis excrétée dans le milieu extracellulaire. Garré *et al.* (1992) montrent que la lactotransferrine, après fixation à la surface de la cellule K562, est internalisée. Après fractionnement cellulaire, les auteurs retrouvent la lactotransferrine localisée dans le noyau. Ziere *et al.* (1992) ont montré que 97% de la lactotransferrine injectée par voie intraveineuse à des rats se retrouvaient fixés aux cellules parenchymateuses, que 10% de la lactotransferrine fixés au foie sont internalisés au bout de 180 min. Mc Abee & Esbensen (1991) ont précisé la nature du transport de la lactotransferrine dans le foie. Les hépatocytes internalisent la lactotransferrine via une endocytose dépendante de la clathrine. Un fractionnement subcellulaire indique que la protéine internalisée est transportée dans les lysosomes. De plus, l'internalisation de la lactotransferrine par les cellules de rat fait vraisemblablement intervenir le récepteur des LDL dans le cas de l'hépatocyte (Ziere *et al.*, 1992).

Mikogami *et al.* (1994) ont montré, lors d'expériences réalisées avec la chambre d'Ussing, que la lactotransferrine est transportée du côté apical vers le côté baso-latéral via deux voies intracellulaires dans les cellules HT-29 (clone 19A). 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 baso-latéral. La seconde voie mineure transporte les 10% restants et permet le passage dans le compartiment basolatéral de la lactotransferrine diferrique intacte. Ils suggèrent que la lactotransferrine et son récepteur pourraient dans ce modèle jouer un rôle mineur dans l'absorption du fer. Par contre, Roiron-Lagroux & Figarella (1990) n'observent aucune internalisation de la lactotransferrine fixée par les cellules HT29-D4, celle-ci restant fixée à la surface cellulaire.

Finalement, les expériences de cinétique à 37°C et de radiomarquage de la lactotransferrine à l'iode  $^{125}\text{I}$  et au fer  $^{59}\text{Fe}$  sur la cellule de la glande de mammaire (T47D) ont

résultats ont été retrouvés par Ismail & Brock, (1993) qui viennent de démontrer que les cellules monocytaires de la lignée U937 fixent la lactotransferrine à la surface cellulaire et relâchent le fer qu'elle complexait dans le milieu extracellulaire.

Afin de mieux comprendre le rôle de la lactotransferrine dans le fonctionnement du système immunitaire, il était indispensable d'étudier le mécanisme d'interaction entre la glycoprotéine et son récepteur. Pour cela, nous avons pris comme modèle les cellules Jurkat (lymphoblastes T). Ces cellules constituent le modèle d'étude idéal d'une éventuelle endocytose de la lactotransferrine puisque la fixation non spécifique de la lactotransferrine y est très faible contrairement aux cellules de la glande mammaire, aux hépatocytes ou aux macrophages. Nous avons étudié le devenir de la lactotransferrine après fixation à la surface cellulaire en utilisant une lactotransferrine marquée à  $^{125}\text{I}$  et à la fluorescéine sur sa partie glycanique. Nous avons utilisé les techniques de microscopie confocale et de microscopie électronique pour localiser le compartiment où la lactotransferrine est dirigée. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de chaque étape du parcours intracellulaire des ligands, ainsi que des études ultrastructurales, nous ont permis de mettre en évidence le devenir intracellulaire de la lactotransferrine. Les résultats que nous avons obtenus sont résumés dans le manuscrit qui est actuellement en révision pour publication dans Eur. J. Cell. Biol.

## *B. Article 2*

### **Internalization of human lactotransferrin by the Jurkat human lymphoblastic T-cell line**

**Internalization of human lactotransferrin by the Jurkat human lymphoblastic T-cell line**

Bao Yuan Bi<sup>a</sup>, Jin Li Liu<sup>b</sup>, Dominique Legrand<sup>a</sup>, Annie-Claude Roche<sup>c</sup>, Monique Capron<sup>b</sup>, Geneviève Spik<sup>a</sup>, Joël Mazurier<sup>1)a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Chimie Biologique, UMR n°111 du CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq/France

<sup>b</sup> Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité INSERM U147, Institut Pasteur, Lille/France

<sup>c</sup> Laboratoire des Glycoconjugués et Lectines Endogènes, CBM, CNRS, Orléans/France

Telephone number : (33)20337239  
Fax number : (33)20436555  
E-mail : Mazurier@pop.univ-lille1.fr

<sup>1)</sup>Dr. Joël Mazurier, Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du Centre National de la Recherche Scientifique n°111, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France



*Abstract**Lactotransferrin-lymphocytes-endocytosis-lysosome*

Binding of either iron-saturated or iron-free lactotransferrin to the Jurkat human lymphoblastic T-cell line was saturable with a dissociation constant  $K_d$  of 40 nM. The total number of binding sites was estimated to be  $\sim 300,000$ . Non-specific binding did not exceed 30% of the total binding. Removal of the 4 clustered arginine residues of lactotransferrin at position 2-5 did not modify the binding parameters. Therefore, the high number of low affinity binding sites previously described as responsible for the interaction between lactotransferrin and either hepatocytes or enterocytes or the U937 monocytic cell line, is not involved in the binding of lactotransferrin to Jurkat cells. After binding at 4°C, a shift to 37°C causes cells to internalize lactotransferrin, with the maximum intracellular concentration found at 3-8 and 5-15 min for iron-saturated and iron-free forms, respectively. Addition of colchicine had no effect on binding or internalization. These results suggest that endocytosis of lactotransferrin by Jurkat cells occurs through a receptor-mediated process. Jurkat cells internalize lactotransferrin monophasically with a first-order endocytic constant  $k_{in}$  of 0.060  $\text{min}^{-1}$  at 37°C. Confocal microscopic analysis, using fluorescein-carbohydrate labeled lactotransferrin showed that lactotransferrin was mainly localized in intracellular vesicles. Following uptake, the endocytic path utilized by fluorescein-carbohydrate labeled lactotransferrin was shown to diverge from that of rhodamine labeled serum transferrin; after internalization, lactotransferrin and serum transferrin did not fully colocalize. Intracellular lactotransferrin was found in endosomal vesicles as assessed by electron microscopy. Raising the pH in endosomes using chloroquine led to the accumulation of lactotransferrin into endosomes (acidic compartment). After internalization, Jurkat cells released both degraded and intact lactotransferrin into the culture medium, suggesting the existence of two endocytic pathways.

## Introduction

Lactotransferrin (27, 28), also called lactoferrin is a strongly cationic iron-binding glycoprotein structurally closely related to the serum iron glycoprotein, transferrin. However, it does not, as it is the case for serum transferrin, bring to cells the iron necessary for division (13). It is widely distributed and is found in secretions and in the secondary granules of neutrophils (21). The liver regulates the steady state level of lactotransferrin by rapidly clearing it from the blood stream (29). Therefore unlike serum transferrin, the concentration of lactotransferrin in plasma is normally very low (2), although concentrations can increase in plasma upon bacterial infection (18) and in some tumors (32). The function of lactotransferrin has not been definitively established. Its ability to bind iron under conditions in which serum transferrin loses it, suggests that it might act in physiological conditions as a specialised iron scavenger glycoprotein rather than an iron donor (13). Lactotransferrin has been shown to be involved in numerous inflammatory and immune response functions such as regulation of granulocyte monocyte colony stimulatory factor synthesis (7, 33), regulation of interleukin synthesis (20, 43), activation of NK cell activity (4, 34), maturation of T-cells (42) and protection against sepsis (40). Several functions appear to be regulatory in nature and imply an ability to specifically interact with DNA. In fact, it is well known that lactotransferrin has a high affinity for acidic compounds such as nucleic acids (3). Recently it has been shown that binding of lactotransferrin to DNA occurs under stringent conditions with distinct sequence specificity and that interaction between lactotransferrin and these sequences leads to transcriptional activation (9). Lactotransferrin has been immunocytochemically demonstrated in the nuclei of human granulocytes (6) and found in isolated nuclei of K562 cells (11) suggesting that it is internalized by the cell and enters the nucleus. Lactotransferrin also binds to numerous cells, the predominant interaction involves a low affinity binding (13, 19, 30, 41) but specific high affinity components which have only been described for hepatocytes (19, 41), activated-lymphocytes (25) and platelets (17) are also detected. The low affinity component allows only the binding and not the internalization of both iron free and iron saturated forms of lactotransferrin by HT29-D4 cells (30) or U937 cells (13). In hepatocytes, the low affinity component can be inhibited either by removal, using aminopeptidase, of the basic cluster of arginine residues located at the N-terminal extremity of lactotransferrin (41) or by using competitive inhibitors (19) which reveal the high affinity component. The high affinity receptor of hepatocytes has not been identified but it may be related to the low density lipoprotein receptor-related protein (39) and to the apo E receptor (41). The high affinity receptor of

hepatocytes allows internalization probably to the lysosomal compartment where lactotransferrin is degraded (19). The lactotransferrin-receptor of human activated-lymphocytes (25) and human non-activated platelets (17), has been partially purified. It has been shown to be a membrane-bound monomer glycoprotein of about 105 kDa molecular mass (5, 17, 25) that binds lactotransferrin with a binding affinity constant of  $K_a=10^{+8}$  M. The receptor is released into the culture medium as a soluble receptor of 95 kDa which is still able to bind lactotransferrin (5). It interacts with two accessible loops (15, 16) of an abab super structure [residues 4-52] located in the N1 domain of the N-terminal lobe of human lactotransferrin (1, 25). The receptor has been localized in Jurkat cells, both at the cell surface in coated-pit like domains, associated into clusters, and in different subsets of intracellular vesicles (5). The region near the nucleus and the nucleus were devoid of receptor. The internalization of lactotransferrin and subsequent effect on activated-lymphocytes and lymphocytic cell lines and have not yet been studied. However, the presence of the intracellular receptor (5) suggests that lactotransferrin is internalized to compartments which will be described in this study. We have determined the binding constant parameters of lactotransferrin to Jurkat cells and we have examined endocytosis of lactotransferrin in Jurkat cells. Then, we have investigated the intracellular processing of lactotransferrin and compared it to that of serum transferrin. We have demonstrated that 60-70% of the lactotransferrin is recycled and that remaining fraction (40-30%) of the lactotransferrin is brought to the lysosome at each round of endocytosis.

## **Materials and methods**

### *Chemicals*

Bovine serum albumin, ovalbumin, phenylmethylsulfonyl fluoride and gold immunoglobulins were purchased from Sigma (St. Louis, MO/USA). Human serum transferrin was a generous gift from the Centre Régional de Transfusion Sanguine (Lille/France). Iodo-Beads, Iodo-Gen, Triton X-100, sulfosuccinimidyl 6-((4'-azido-2'-nitro-phenyl)amino) hexanoate (sulfo-SANPAH) and sulfosuccinimidyl 2(*p*-azidosalicylamido)ethyl-1,3'-dithiopropionate (SASD) were from Pierce (Rockford, IL/USA). Carrier-free  $\text{Na}^{125}\text{I}$  and hyperfilm-MP were from Amersham International (Amersham, Buckinghamshire/UK) and fluorescein isothiocyanate and 5-({[2-(carbohydrazino)-methyl]-thio} acetyl) amino-fluorescein were from Molecular Probes (Eugene, OR/USA). Sephadex G-25 PD-10 columns were

purchased from Pharmacia (Uppsala/Sweden), nitrocellulose membrane from Schleicher and Schuell (Dassel/Germany). Molecular mass markers were from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA/USA). RPMI 1640 medium and fetal calf serum were from Eurobio (Les Ulis/France) and D. Dutscher (Brumath/France), respectively. Gentamycin was from Gibco (Eragny, France). Lactotransferrin was prepared from pooled human milk and purified as described by Spik et al. (35). Lactotransferrin was iron-saturated or desaturated according to Mazurier and Spik (23). Derivatization of lactotransferrin using SASD, sulfo SANPAH and FITC was performed as described elsewhere (16). Amino-peptidase treated lactotransferrin (residues 8-694 and 12-694) was prepared as described by Ziere et al. (41) and N-terminal amino acid sequence was determined by Pr A. Tartar (Institut Pasteur, Lille/France). Apo E enriched low density lipoprotein was a generous gift from Dr V. Clavez (Pasteur Institute, Lille/France).

#### *Cell Culture and Maintenance*

Jurkat cells were routinely grown at 37°C in a humidified atmosphere under 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 medium pH 7.4, containing 5 µg/ml gentamycin, 2 mM L-glutamine and 20 mM HEPES and supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum. Cells were kept in the logarithmic growth phase and diluted to a cell density of 4X10<sup>5</sup>/ml the day before the experiment. Density of cells was determined by using a cell counter. Cell viability was checked before the experiments by using the trypan blue method. Cells were washed twice in ice-cold PBS and harvested by centrifugation at 4°C for 10 min.

#### *Fluorescein Labeling and <sup>125</sup>I-Radiolabeling*

Fluorescent labeling of lactotransferrin on the glycan moiety was carried out by coupling 5-((2-carbohydrazino)methyl)-thio}acetyl) amino-fluorescein on aldehyde groups resulting from the mild periodate oxidation of N-acetylneuraminic acid residues as previously described (16). <sup>125</sup>I-labeling of lactotransferrin and amino-peptidase treated lactotransferrin (100-500 µg) was carried out with 0.3 mCi of <sup>125</sup>I in the presence of one Iodo-Bead according to the manufacturer instructions. After 15 min incubation, free iodine was removed by gel filtration on a Sephadex G-25 PD-10 column. The iodinated protein was used within 1 week in order to avoid radiation damage.

### *Preparation of Polyclonal Antibodies*

Anti-lactotransferrin immunoglobulins were raised in rabbit (37), by intradermal injections of iron-saturated lactotransferrin. Immunoglobulins were then purified by immuno-affinity chromatography on lactotransferrin-immobilized Sepharose 4-B columns. Affinity-purified IgG was dialysed against PBS, diluted with glycerol (40%, v/v), and stored at -20°C until use.

### *Binding of Lactotransferrin*

Equilibrium binding was measured in RPMI medium, containing 0.2% human serum transferrin, and 20 mM Hepes, pH 7.3 on ice, using  $2 \times 10^6$  cells as previously described (25). Experiments (n=5) were performed in duplicate samples. Non-specific binding was measured in the presence of a 50 fold molar excess of unlabeled-lactotransferrin.

### *Kinetics of Lactotransferrin Endocytosis*

Uptake (n=2) of lactotransferrin was determined as follows: cells ( $1 \times 10^7$  per tube) were washed twice with PBS containing 0.2% serum transferrin, 5 ml of RPMI 1640 medium was added to each tube and then cells were exposed to 100  $\mu\text{g}$  of  $^{125}\text{I}$ -labeled lactotransferrin for various time periods at 37°C. At the end of the incubation period, 1 ml of suspension was removed and cells were harvested and treated with ice-cold 50 mM-glycine, 100 mM NaCl buffer pH 2.5 in order to remove cell surface bound lactotransferrin. The remaining intracellular  $^{125}\text{I}$ -lactotransferrin was determined. Effect of the concentration of outside ligand was analyzed after 30 min of internalization at concentrations ranging from 20 to 200  $\mu\text{g}$  of lactotransferrin per ml. The results have been expressed as the number of intracellular lactotransferrin molecules internalized per cell (pmoles).

### *Expression of results*

Scatchard plot and kinetics analysis were performed using enzfitter software (Sigma, MI, USA)

### *Endocytosis of Lactotransferrin Prebound to Cell*

Cells were incubated on ice and at a cell density of  $4 \times 10^6$ /ml, with 200  $\mu$ g of  $^{125}$ I-labeled lactotransferrin in 5 ml of RPMI 1640 culture medium containing 0.2% human serum transferrin. After 60 min incubation, cells were centrifuged at 1000 rpm and washed twice with 30 ml of ice-cold PBS in order to remove unbound lactotransferrin. The washed cell pellet was resuspended in 10 ml of the above incubation medium and placed in a shaking water bath at 37°C. Samples of 1 ml were removed at different time periods of incubation and diluted with 2 ml of ice-cold PBS, then cells were centrifuged at 4°C for 10 min. Supernatants were decanted, the amount of radioactivity determined and the cell pellet was resuspended with 4 ml of ice-cold 50 mM-glycine, 100 mM NaCl buffer, pH 2.5 for 15 min at 4°C. After centrifugation, supernatants were collected and another 1 ml of cold acid buffer was used to wash the tube. The two solutions were combined and the amount of acid-sensitive radioactivity was determined. Finally, cells were dissolved in 1 M NaOH which allows one to determine the amount of acid-resistant radioactivity. Summation of acid-sensitive and acid-resistant radioactivity was considered to be the total radioactivity. The radioactivity of the cells was measured using a 1282 Compugamma LKB-Wallac Counter (Turku, Finland).

#### *Degradation of Internalized $^{125}$ I-Labeled Lactotransferrin*

After internalization of lactotransferrin by Jurkat cells, membrane-bound lactotransferrin was removed by acid-wash as described above and washed cells were solubilized and analyzed by SDS-PAGE as previously described (24, 25). The amounts of degraded and undegraded material in medium were determined by precipitation of undegraded material with 10% TCA (10).

#### *Electrophoresis*

SDS/PAGE analysis was performed under reducing conditions on 7.5% slab gels (1.5 mm) according to the method of Laemmli (14).

#### *Fluorescence Microscopy*

Jurkat cells were incubated for different times at 37°C or 60 min at 4°C with fluorescein carbohydrate-labeled lactotransferrin at a concentration of 40  $\mu$ g/ml in RPMI 1640 containing

0.2% serum transferrin. Cells were washed, treated for 60 min at 4°C with 2% paraformaldehyde in PBS and washed two more times. For double labeling experiments, cells were incubated for 30 min with fluorescein-labeled lactotransferrin, the 15 last min in presence of rhodamine-labeled transferrin (40 µg/ml). Cytospin preparations were obtained by cytocentrifugation and mounted in phosphate-buffered saline/glycerol containing 50 mg/ml of 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octane. Cells were examined using a Nikon associated with a scanning confocal imaging system (MRC 600 system) from Bio-R supplied with a krypton/argon laser and equipped with an excitation filter set (488, 568 and 647 nm). The oil-objective magnification was 60-fold with a 1.4 numerical aperture. A series of optical sections at 0.9 µm interval were recorded through individual cells. Photographs were taken using Kodak TMAX-100.2 film. Control experiments were carried out on acid-treated cells to remove membrane bound lactotransferrine.

### *Immunoelectron Microscopy*

After incubation with lactotransferrin, Jurkat cells were fixed with 1% glutaraldehyde in 0.15 M cacodylate buffer at 4°C overnight. Fixation was followed by treatment with 0.1 M lysine for 4-6 h at 4°C prior to embedding in Lowicryl K 4 M according to instructions of the manufacturer. Ultrathin sections, collected on nickel grids, were incubated for 10 min on a drop of 20 mM Tris, 0.5 M NaCl buffer pH 7.4 containing 0.5% ovalbumin and 5% heat inactivated goat serum. Sections were incubated at 4°C overnight with purified anti-human lactotransferrin immunoglobulins at a concentration of 10 µg/ml. Cells were rinsed and incubated on a drop of 1nm gold-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:50) in a 20 mM Tris/HCl, 0.5 M NaCl buffer pH 7.4 containing 0.5% ovalbumin. After 1 h incubation, cells were washed, post-fixed for 10 min in the same buffer containing 1% glutaraldehyde and washed with distilled water. Finally, sections were submitted to silver enhancement according to a modification of Dansschers' silver lactate hydroquinone physical developer. The specificity of the immunostaining was tested by omitting the primary antibody and incubation of cells without lactotransferrin was used as a negative control. Labeled sections were stained with uranyl acetate and lead citrate before examination with a Philips EM420 electron-microscope.

## **Results**

### *Binding of Lactotransferrin*

Binding of  $^{125}\text{I}$ -labeled lactotransferrin to the Jurkat human lymphoblastic T-cell line was both concentration dependent and saturable at concentrations ranging from 0.1 to 60 nM (Fig. 1). The binding was performed in the presence of serum transferrin to saturate the serum transferrin receptor and to decrease non specific interactions. The binding of lactotransferrin was inhibited 70 to 80% in the presence of a 50 fold molar excess of unlabeled lactotransferrin, suggesting that the binding is specific and reversible. Scatchard analysis revealed that the apparent equilibrium constant  $K_d$  of the specific element was equal to 40nM and the number of binding sites was estimated to be  $\sim 300,000$ . Varying the iron saturation from 0 to 100% had no effect either on the binding constant or the number of binding sites.

Previous experiments (16) have shown that FITC and SASD derivatization of lactotransferrin results in masking the 105 kDa receptor binding site of lactotransferrin and greatly decreases the binding of lactotransferrin to activated-lymphocytes. In contrast, binding was not affected if lactotransferrin was derivatized with sulfo-SANPAH (16). In order to verify that the lactotransferrin binding sites to Jurkat cells are similar to that we have previously described on platelets and activated-lymphocytes, we have performed in the present study competition experiments. It was found that total binding was not modified in the presence of a 100 fold molar excess of fluorescein isothiocyanate-lactotransferrin or SASD derivatized-lactotransferrin (data not shown). In contrast, the binding of lactotransferrin was inhibited 70% by sulfo SANPAH-modified lactotransferrin demonstrating that lactotransferrin probably interacts with Jurkat cells through the same baba super structure we have described for activated-lymphocytes (16) and platelets (17).

The binding of aminopeptidase treated lactotransferrin in which the basic cluster of arginine residues (residues 2-5) have been removed, was not significantly different from that of untreated lactotransferrin (Fig. 1). Furthermore, the binding of lactotransferrin was inhibited 70% upon addition of a 100 fold molar excess of aminopeptidase treated lactotransferrin (data not shown).

Finally, recent studies have suggested that lactotransferrin can bind cells via the low density lipoprotein receptor-related protein (41) or the remnant receptor (39). We have therefore performed competition experiments between lactotransferrin and apo E enriched lipoproteins. It was found that the binding of lactotransferrin to Jurkat cells was partially inhibited in the presence of apo E enriched lipoproteins. In fact, the percent of inhibition was 50% no matter what molar excess of apo E enriched lipoproteins was used and therefore inhibition not dependent on the concentration of apo E (data not shown).



### *Kinetics of Lactotransferrin Endocytosis*

In order to determine whether bound lactotransferrin was internalized, the cells were incubated with  $^{125}\text{I}$ -labeled lactotransferrin at either  $4^\circ\text{C}$  or  $37^\circ\text{C}$  and the cell surface bound protein was removed by acid washing. After a 30 min incubation, about 95% and 50% of bound  $^{125}\text{I}$ -labeled lactotransferrin was acid-sensitive at  $4^\circ$  and  $37^\circ\text{C}$ , respectively. These results demonstrated that at  $37^\circ\text{C}$ , half of the lactotransferrin had been internalized. We also examined the kinetics of lactotransferrin accumulation at  $37^\circ\text{C}$  in Jurkat cells (Fig. 2). In the continuous presence of  $^{125}\text{I}$ -labeled lactotransferrin ( $0.25\ \mu\text{M}$ ), cells accumulated lactotransferrin monophasically with a first-order constant  $k_{\text{in}}$  of  $0.060\ \text{min}^{-1}$ . We calculated that under these experimental conditions about 240 molecules of lactotransferrin were internalized per second at the beginning of the process. The uptake of lactotransferrin was not dependant on the outside lactotransferrin ligand on the concentration range of  $0.12$  to  $0.5\ \mu\text{M}$  and was abolished in presence of an excess of cold lactotransferrin.

### *Endocytosis of Lactotransferrin Prebound to Cell*

Lactotransferrin binding sites were saturated with  $^{125}\text{I}$ -labeled lactotransferrin at  $4^\circ\text{C}$ . After removal of excess unbound ligand, cells were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for various time and the radioactivity present on the cell surface, in the medium, and inside the cell was determined. As is shown in Fig. 3, the lactotransferrin initially bound to the cell surface was rapidly internalized with the maximum amount of intracellular iron-saturated lactotransferrin found 3 to 8 min later. By ten min, about 60% of the lactotransferrin had disappeared from the cell surface and radioactivity was found in the culture medium. Similar results were obtained using iron-free lactotransferrin; the maximum intracellular concentration was found at 5-15 min after the internalization processes (Fig.4).

The addition of colchicine, which is known to inhibit endocytosis clathrin-independent and to not modify the binding of ligand, did not significantly change the kinetics of internalization of lactotransferrin at  $37^\circ\text{C}$  and at concentrations up to  $15\ \text{mM}$ . Furthermore, when Jurkat cells were first incubated at  $4^\circ\text{C}$  with  $^{125}\text{I}$ -labeled lactotransferrin in the presence of  $15\ \text{mM}$  colchicine, the maximum uptake of lactotransferrin (Fig. 5) at  $37^\circ\text{C}$  was not modified.

### *Degradation of Internalized Lactotransferrin*

After internalization, lactotransferrin is released into the medium in the form of intact protein which was precipitated by TCA 10% and small peptides. The kinetics of release show that after 90 min incubation, about 30-40% of the internalized  $^{125}\text{I}$ -labeled lactotransferrin was found in the medium in a degraded form (Fig. 6). The proteolysis of lactotransferrin was not altered when experiments were performed in the presence of protease inhibitors, demonstrating that membrane proteases are not involved in degradation. About 5-10% of lactotransferrin was found undegraded in the culture medium at the beginning of the internalization process and probably represents lactotransferrin dissociated from the cell surface after initial binding.

We have tested whether increasing of the pH of intracellular acidic compartments, using either chloroquine or ammonium chloride can alter the processing of lactotransferrin. Addition of chloroquine up to a concentration of 0.2 mM had no effect on  $^{125}\text{I}$ -labeled lactotransferrin binding at 4°C (data not shown). However, the amount of intracellular  $^{125}\text{I}$ -labeled lactotransferrin increased continuously during internalization process at 37°C (Fig. 7A), suggesting that the lactotransferrin accumulates. Similar results were found with ammonium chloride (data not shown). To investigate intracellular degradation of lactotransferrin in Jurkat cells, we also analysed internalized  $^{125}\text{I}$ -labeled lactotransferrin, following a temperature shift from 4°C to 37°C, by SDS-PAGE (Fig. 7B). At 2 min, small amounts of internalized  $^{125}\text{I}$ -lactotransferrin were observed in both control and chloroquine-treated cells. These levels were most likely due to the 5-10% of cell surface-bound lactotransferrin which was not removed by acidic treatment. In the presence of chloroquine, the  $^{125}\text{I}$ -labeled lactotransferrin migrated as a single polypeptide chain of 80 kDa molecular mass equivalent to the native glycoprotein and its intracellular concentration increased during the internalization process from 2 to 60 min. In contrast, in the absence of chloroquine, the maximum intracellular concentration of undegraded lactotransferrin was found 5 min after incubation at 37°C. However, 60 min after internalization the level was essentially zero. Lysomotropic reagents significantly reduced the basal degradation of lactotransferrin, indicating that the lysosome is one of the organelles in which some of the normal degradation of lactotransferrin takes place.

### *Intracellular Pathway of Internalized Lactotransferrin*

When monitored using fluorescence microscopy, the binding of fluorescein carbohydrate-labeled lactotransferrin at 4°C (Fig. 8a) was visualized as discrete clusters on the surface of the cell, associated with the plasma membrane. Warming the cells to 37°C caused a redistribution (Fig. 8b) of the fluorescein-carbohydrate labeled lactotransferrin into an intense abundant intracellular fluorescent punctuate pattern found randomly throughout the cell. Treatment of cells with 0.2 mM chloroquine, which inhibited lactotransferrin degradation, induced an increase in the intensity of the vesicular fluorescence (Fig. 8c). To visualize the organization of the endocytic pathways in Jurkat cells, fluorescein-carbohydrate labeled lactotransferrin was continuously internalized from cell surface at 37°C. The spatial distribution of the marker was analyzed by confocal beam scanning laser microscopy. Fig. 8d shows a pair of cells where a series of 8 horizontal planes, taken every 0.9 µm between two cell poles, displays the complete cellular redistribution of the lactotransferrin compartment 30 min after internalization. In each plane, the lactotransferrin fluorescence was bright. The discrete clusters (shown as arrows 1 or 2) are representative of sub-cellular compartments of small and different size. The cluster indicated by arrow n°2 is found in only 1 plane and can be identified as a single vesicle of less than 0.9 µm of diameter. On the contrary, the compartment indicated by the arrow n°1 was fluorescent through 3 successive planes and is therefore at least 2-3 µm large.

This distribution was further studied by double immunofluorescence microscopy using rhodamine-labeled transferrin, which is known to be mainly confined in the early endosome. A comparison of the immunofluorescent patterns obtained with fluorescein-carbohydrate labeled lactotransferrin and rhodamine-labeled transferrin in Jurkat cells showed that the staining of both glycoproteins overlapped in a region close to the cell membrane (Fig. 8e). Some green fluorescence (fluorescein-carbohydrate labeled lactotransferrin), that did not overlap with red fluorescence (rhodamine-labeled transferrin) was observed.

#### *Immunoelectron Microscopic Identification of the Compartment in which Internalized Lactotransferrin is Found*

In order to extend the immunofluorescent microscopic localization of lactotransferrin, we carried out immunoelectron microscopy detection of internalized lactotransferrin on ultrathin section of Jurkat cells using monospecific anti-lactotransferrin immunoglobulins. Intracellular lactotransferrin was localized in endosomal vesicles in the perinuclear region (Fig. 9a). Lactotransferrin was never observed to be associated with the nucleus or associated

structures. Treatment of cells with chloroquine caused accumulation of lactotransferrin into endosome structures (Fig. 9b).

## Discussion

The N-terminal moiety of human lactotransferrin presents several sequence and structural clusters which could explain the large volume of binding of lactotransferrin to cells. First, the basic region [tetrapeptide RRRR; residues 2-5] has been shown to be involved in the large volume and low affinity binding to hepatocytes and probably other cells possibly through a proteoglycan component (41). The consensus KRDS sequence [residues 40-43], homologous to the RGD sequence (22) could be implicated in interaction with integrins. The QRNMRK sequence (residues 25-30) possesses structural homology with the LDL-receptor binding site of apo E lipoprotein (41) and could explain the high affinity of lactotransferrin for the LRP-receptor (39).

On the other hand, we have described specific interactions which occur between two loops [residues 28-34 and 39-42] of an  $\beta\alpha\beta$  domain of lactotransferrin and a 105 kDa membrane receptor present on both activated-lymphocytes (25) and platelets (17). The presence of the 105 kDa receptor has been demonstrated both at the surface and inside Jurkat cells (5) but the functionality of the receptor has not yet been investigated. The binding affinity has been measured to  $K_d=40\text{nM}$  which is in the range of the binding affinity recently measured for the U937 monocytic cell line (13) and for the binding of bovine lactotransferrin to isolated rat hepatocytes (19). However, the total number of binding sites involved in the binding of lactotransferrin to Jurkat cells is considerably lower ( $n \approx 300,000$ ) than in the case of U937 cells (13) and hepatocytes (19, 41). Competition experiments performed in the presence of apo E enriched lipoproteins failed to fully inhibit the binding of lactotransferrin to Jurkat cells. The partial inhibition we have observed was not concentration dependent, suggesting it is due to a charge effect. The fact that the binding of aminopeptidase treated lactotransferrin did not differ from the binding of unmodified lactotransferrin demonstrates that the electrostatic binding which can occur between lactotransferrin and cells is not detectable on Jurkat cells. Moreover, the lactotransferrin binding to Jurkat cells was not modified during competition experiment with SASD- and FITC-modified lactotransferrin and was fully inhibited in the presence of SANPAH-modified lactotransferrin. Altogether, these results demonstrate that lactotransferrin binds Jurkat cells in the same way as platelets and activated-lymphocytes.

We have shown using both a biochemical approach and confocal and electron microscopy that after binding to the cell surface, lactotransferrin enters T-cells. Under the experimental conditions used and in the continued presence of lactotransferrin, up to 50% of the protein was internalized in 30 min. The first-order endocytic rate constant ( $0.060 \text{ min}^{-1}$  at  $37^\circ\text{C}$ ) was not dependant on the outside lactotransferrin concentration and addition of colchicin did not modified the kinetics of internalization at  $37^\circ\text{C}$ . In other words, the uptake of lactotransferrin is receptor mediated and not fluid phase dependant (38). This high efficiency of endocytosis was not observed with U937 monocytic cells (13) and rat hepatocytes endocytosed only a minor fraction of bound bovine lactotransferrin (19). The demonstration that lactotransferrin was readily internalized by a human lymphoblastic cell line favors the existence of 2 binding components : a specific one which could involve the 105 kDa molecular mass membrane glycoprotein we have purified (25) and be the lipoprotein receptor-related protein and one less specific component involving mainly ionic interactions between basic residues of lactotransferrin and the extracellular matrix. The volume of the low affinity component depends on the cell studied: small in the case of lymphocytes and high in the case of hepatocytes, monocytes and maybe epithelial tumor cells (31).

Both iron-free and iron-saturated lactotransferrins were internalized at different rates. However, their endocytic pathway is identical. The internalization of both forms of lactotransferrin was followed by an accumulation of degraded lactotransferrin into cells and into the culture medium. Moreover, the addition of chloroquine which prevents transfer of endocytosed ligands to lysosomes results in the accumulation of intracellular lactotransferrin and inhibits its proteolysis. The presence of vesicular intact lactotransferrin and of persistent level of 60-70% of undegraded lactotransferrin in the the culture medium as well as the presence of both lactotransferrin and serum transferrin in the same vesicles suggests that the pathways might be common between the two ligands up to the early endosomal compartments. In fact, confocal and electron microscopy have shown a complex pattern of localisation for the lactotransferrin molecule. Fluorescein carbohydrate lactotransferrin accumulated in vesicles and electron microscopy showed the presence of lactotransferrin in endosome compartments.

The endocytic pathway utilized by lactotransferrin could diverge from that of iron-saturated serum transferrin as a fraction (40-30%) of the ligand is degraded at each round of endocytosis. Finally, lymphocytes internalize lactotransferrin via a receptor-mediated process. Experiments are actually under investigation to determine how lactotransferrin, an

extracellular transcription factor (9) reach the DNA in the cell nucleus or deliver the signal from the membrane receptor to the DNA bound transcriptional activator.

**Acknowledgements.** This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche n°111, Director: Professor A. Verbert), the Université des Sciences et Technologies de Lille and by Grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer and the Institut National de la Santé et de la Recherche (Contract n°930507). B.Y. Bi was a recipient of a grant from Candia Institute. We are grateful to Professor J. Montreuil for helpful advice in this work. We are very indebted to Mrs O. Labiau for her technical assistance.

- [1] Anderson, B. F., H. M. Baker, G.E. Norris, D. W. Rice, E. N. Baker: Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8Å resolution. *J. Mol. Biol.* **209**, 711-734 (1989).
- [2] Bennett, R. M., T. Kokocinski: Lactoferrin turnover in man. *Clin. Sci.* **57**, 453-460 (1979).
- [3] Bennett, R. M., J. Davis: Lactoferrin interacts with deoxyribonucleic acid: a preferential reactivity with double-stranded DNA and dissociation of DNA-anti-DNA complexes. *J. Clin. Lab.* **99**, 127-138 (1982).
- [4] Bezault, J., R. Bhimani, J. Wiprovnick, P. Furmanski: Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Cancer Res.* **54**, 2310-2312 (1994).
- [5] Bi, B.Y., B. Leveugle, J. L. Liu, A. Collard, P. Coppe, A. C. Roche, N. Nillesse, M. Capron, G. Spik, J. Mazurier: Immunolocalization of the lactotransferrin receptor on the human T lymphoblastic cell line Jurkat. *Eur. J. Cell Biol.* **65**, in the press (1994).
- [6] Briggs, R., W. Glass II, M. Montiel, L. Hnilica: Lactoferrin: nuclear localization in the human neutrophilic granulocyte. *J. Histochem. Cytochem.* **29**, 1128-1137 (1981).
- [7] Broxmeyer, H. E., A. Smithyman, R. R. Eger, P. A. Meyers, M. de Sousa: Identification of lactoferrin as the granulocyte derived inhibitor of colony stimulating activity (CSA-production). *J. Exp. Med.* **148**, 1052-1067 (1978).
- [8] Davidson, L., P. Kastenmayer, M. Yuen, B. Lönnerdal, R. Hurrell: Influence of lactotransferrin on iron absorption from human milk in infants. *Pediatric Res.* **15**, 117-123 (1994).
- [9] He, J., P. Furmanski: Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature* **373**, 721-724 (1995).
- [10] Hémar, A., Subtil, A., Lieb, M., Morelon, E., Hellio, R. & Darutry-Varsat, A. Endocytosis of interleukin 2 receptors in human T lymphocytes: Distinct intracellular localization and fate of the receptor  $\alpha, \beta, \gamma$  chains. *J. Cell Biol.* **129**, 55-64 (1995).
- [11] Garré, C., G. Bianchi-Scarra, M. Siroto, M. Musso, R. Ravazzolo: Lactoferrin binding sites and nuclear localization in K562(S) cells. *J. Cell. Physiol.*, **153**, 477-482 (1992).
- [12] Hu, W. L., J. Mazurier, J. Montreuil, G. Spik: Isolation and partial characterization of a lactotransferrin receptor from mouse intestinal brush border. *Biochemistry* **29**, 535-541 (1990).
- [13] Ismail, M., J. H. Brock: Binding of lactoferrin and transferrin to the human promonocytic cell line U937. *J. Biol. Chem.* **268**, 21618-21625 (1993).

[14] Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).

[15] Legrand, D., J. Mazurier, P. Maes, E. Rochard, J. Montreuil, G. Spik: Inhibition of the specific binding of human lactotransferrin to human peripheral blood phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes by fluorescein labelling and location of the binding site. *Biochem. J.* **276**, 733-738 (1991).

[16] Legrand, D., J. Mazurier, A. Ellass, E. Rochard, G. Vergoten, P. Maes, J. Montreuil, G. Spik: Molecular interactions between human lactotransferrin and the phytohemagglutinin-activated human lymphocyte lactotransferrin receptor lie in two loop-containing regions of the N-terminal domain I of human lactotransferrin. *Biochemistry* **31**, 9243-9251 (1992).

[17] Leveugle, B., J. Mazurier, D. Legrand, C. Mazurier, J. Montreuil, J., G. Spik: Lactotransferrin binding to its platelet receptor inhibits platelet aggregation. *Eur. J. Biochem.* **213**, 1205-1211 (1993).

[18] Maacks, S., H. Z. Yuan, W.G. Wood: Development and evaluation of luminescence based sandwich assay for plasma lactoferrin as a marker for septic and bacterial infections in pediatric medicine. *J. Biolumin. Chemilumin.* **3**, 221-226 (1989).

[19] McAbee, D. D., K. Esbensen: Binding and endocytosis of apo- and holo-lactoferrin by isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **266**, 23624-23631 (1991).

[20] Machnicki, M., M. Zimecki, T. Zagulski: Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 *in vivo*. *Int. J. Exp. Path.* **74**, 433-439 (1993).

[21] Masson, P. L., J. F. Heremans, E. Schöner: Lactoferrin an iron binding protein in neutrophilic leukocytes. *J. Exp. Med.* **130**, 643-658 (1969).

[22] Mazoyer, E., S. Lévy-Toledano, F. Rendu, L. Hermant, H. Lu, A.M. Fiat, P. Jollès, J. Caen: KRDS, a new peptide derived from human lactotransferrin inhibits platelet aggregation and release reaction. *Eur. J. Biochem.* **194**, 43-49 (1990).

[23] Mazurier, J., G. Spik: Comparative study of the iron-binding properties of human transferrins. *Biochim. Biophys. Acta* **629**, 399-408 (1980).

[24] Mazurier, J., J. Montreuil, G. Spik: Visualization of lactotransferrin brush-border receptors by ligand-blotting. *Biochim. Biophys. Acta* **821**, 453-460 (1985).

[25] Mazurier, J., D. Legrand, W. L. Hu, J. Montreuil, G. Spik: Expression of human lactotransferrin receptors in phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Eur. J. Biochem.* **179**, 481-487 (1989).



[26] Metz-Boutigue, M. H., J. Jollès, J. Mazurier, F. Schoentgen, D. Legrand, G. Spik, J. Montreuil, P. Jollès. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur. J. Biochem.* **145**, 659-676 (1984).

[27] Montreuil, J., S. Mullet: Isolement d'une lactosidérophiline du lait de Femme. *C. R. Acad. Sci. Paris* **250D**, 1736-1737 (1960).

[28] Montreuil, J., J. Tonnelat, S. Mullet: Préparation et propriétés de la lactosidérophiline (lactotransferrine) du lait de Femme. *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 413-421 (1960).

[29] Retegui, L. A., N. Moguilevsky, C. F. Castracane, P.L. Masson: Uptake of lactoferrin by the liver. *Lab. Invest.* **50**, 323-328 (1984).

[30] Roiron-Lagrour, D., C. Figarella: Evidence for a different mechanism of lactoferrin and transferrin translocation on HT29-D4 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**, 837-842 (1990).

[31] Rochard, E., D. Legrand, M. Lecocq, R. Hamelin, M. Crépin, J. Montreuil, G. Spik: Characterization of lactotransferrin receptor in epithelial cell lines from non-malignant human breast, benign mastopathies and breast carcinomas. *Anticancer Res.* **12**, 2047-2052 (1992).

[32] Rosenmund, A., J. Friedli, H. Bebie, P. Werner: Plasma lactoferrin and plasma lactoferrin/neutrophil ratio. *Acta Haematol.* **80**, 40-48 (1988).

[33] Sawatzki, G., I. N. Rich: Lactoferrin stimulates colony stimulating factor production *in vitro* and *in vivo*. *Blood Cells* **15**, 371-385 (1989).

[34] Shau, H., A. Kim, H. Golub: Modulation of natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity by lactoferrin. *J. Leuk. Biol.* **51**, 343-349 (1992).

[35] Spik, G., G. Strecker, B. Fournet, S. Bouquelet, J. Montreuil, L. Dorland, H. van Halbeek, J. F. G. Vliegthart: Primary structure of glycans from human lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* **121**, 413-419 (1982).

[36] Mikogami, T., M. Heyman, G. Spik, J. F. Desjeux: Apical-to-basolateral transepithelial transport of human lactoferrin in the intestinal cell line HT29 cl. 19A. *J. Amer. Physiol.* **267**, G308-G315 (1994).

[37] Vaitukaitis, J., J. B. Robbins, E. Nieschlag, G. T. Ross: A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **33**, 988-991 (1971).

[38] Watts, C. and Marsh, M.: Endocytosis: what goes in and how? *J. Cell Science* **103**, 1-8 (1992).

[39] Willnow, T. E., J. L. Goldstein, K. Orth, M. S. Brown, J. Herz: Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance. *J. Biol. Chem.* **267**, 26172-26180 (1992).

[40] Zagulski, T., P. Lipinski, A. Zagulska, S. Bronieck, Z. Jarbazeck: Lactoferrin can protect mice against a lethal dose of *E. coli* in experimental infection *in vivo*. *Br. J. Exp. Pathol.* **70**, 697-704 (1989).

[41] Ziere, G. J., M. K. Bijsterbosch, J. C. van Berkel: Lactoferrin uptake by the rat liver. *J. Biol. Chem.* **25**, 27069-27075 (1993).

[42] Zimecki, M., J. Mazurier, M. Machnicki, Z. Wieczorek, J. Montreuil, G. Spik: Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4- CD8- murine thymocytes. *Immunol. Lett.* **30**, 119-124 (1991).

[43] Zucali, J. R., H. E. Broxmeyer, D. Levy, C. Morse: Lactoferrin decreases monocyte induced fibroblast production of myeloid colony stimulating-activity by suppressing monocyte release of interleukin 1. *Blood* **74**, 1531-1536 (1989).

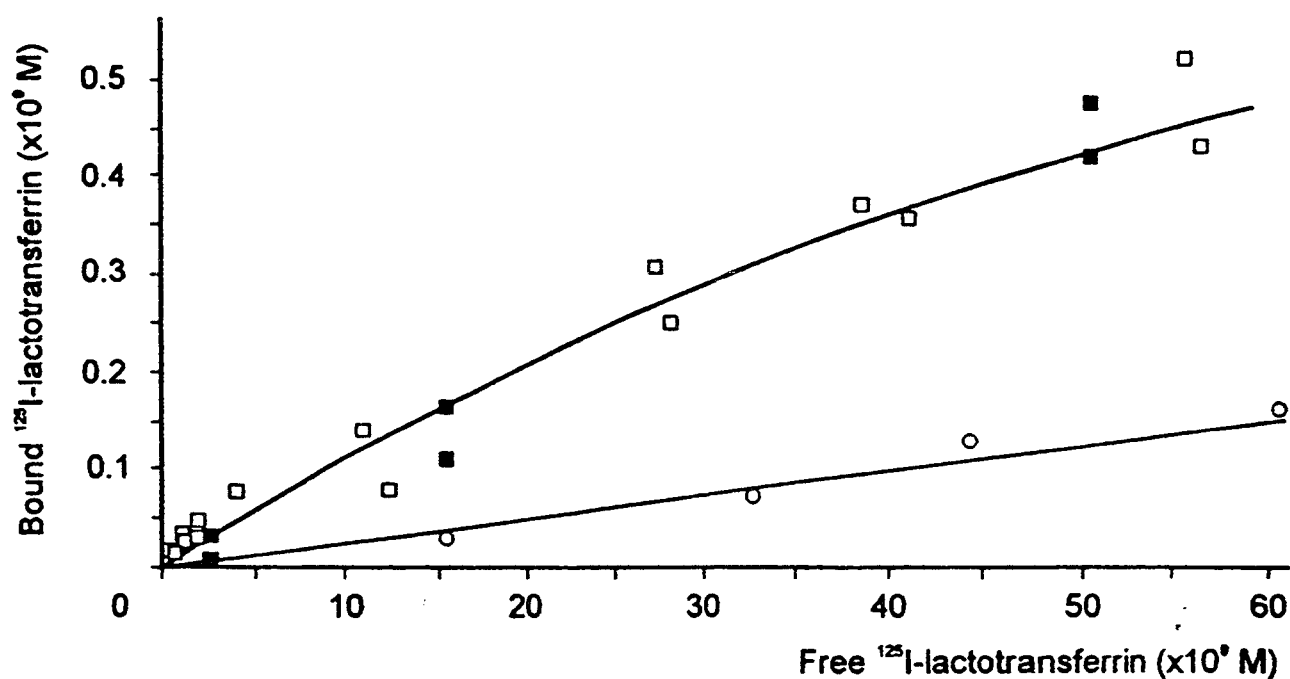
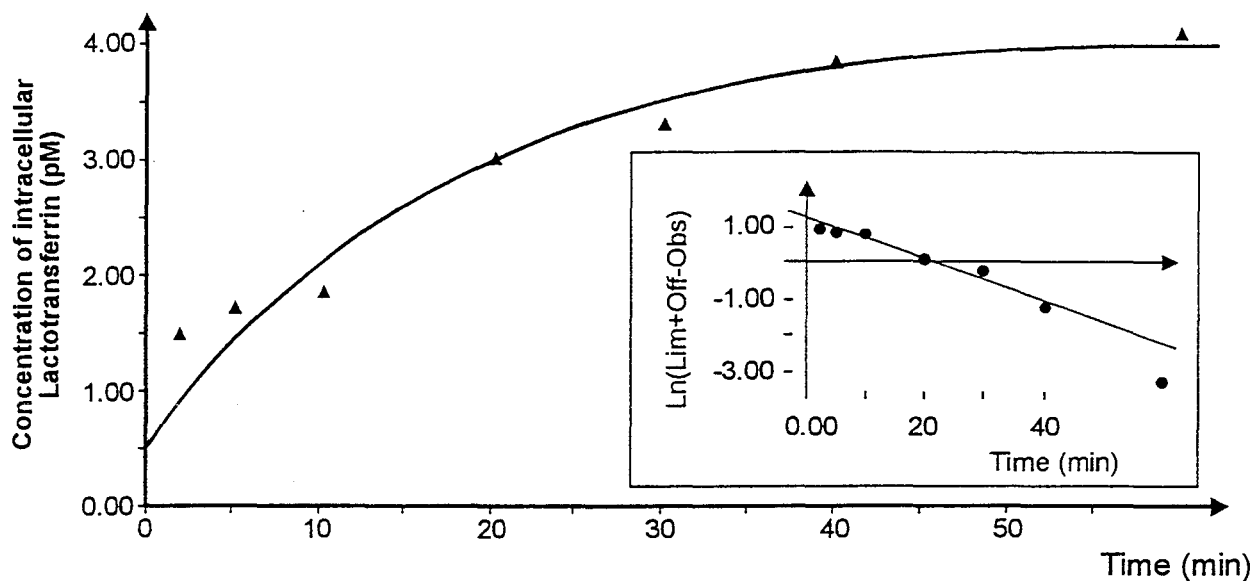
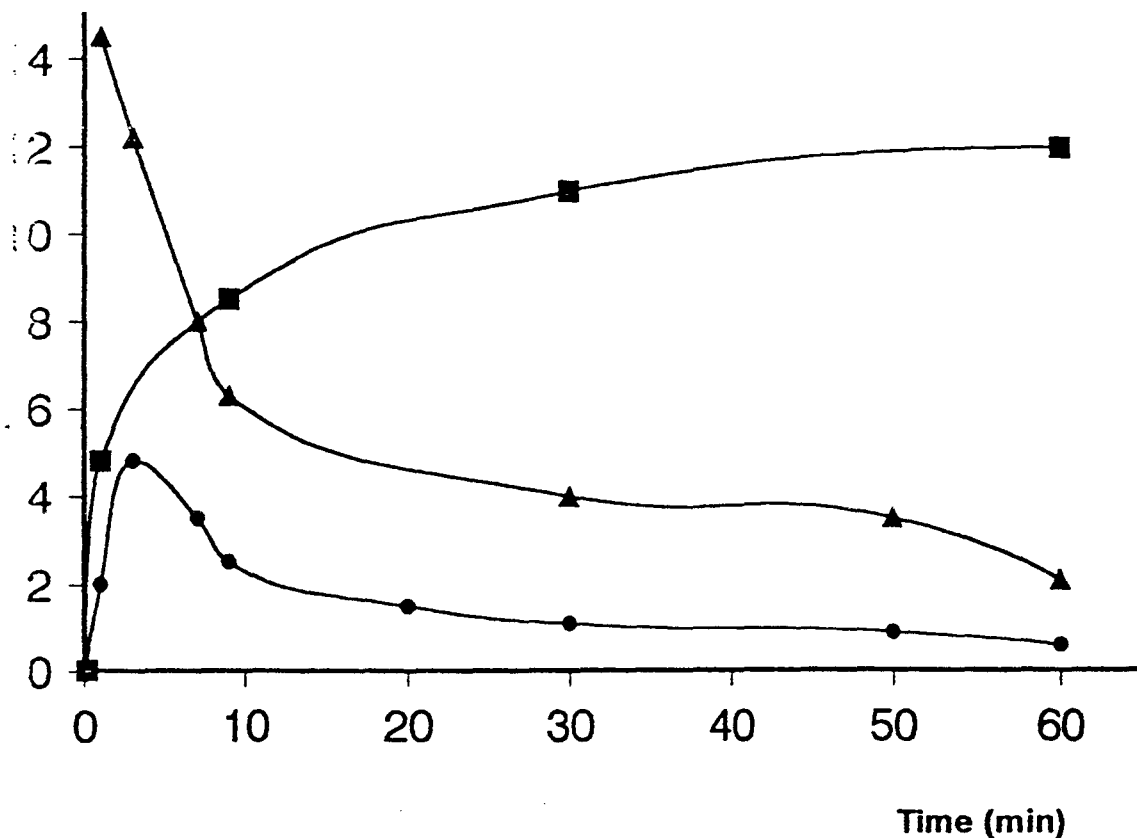


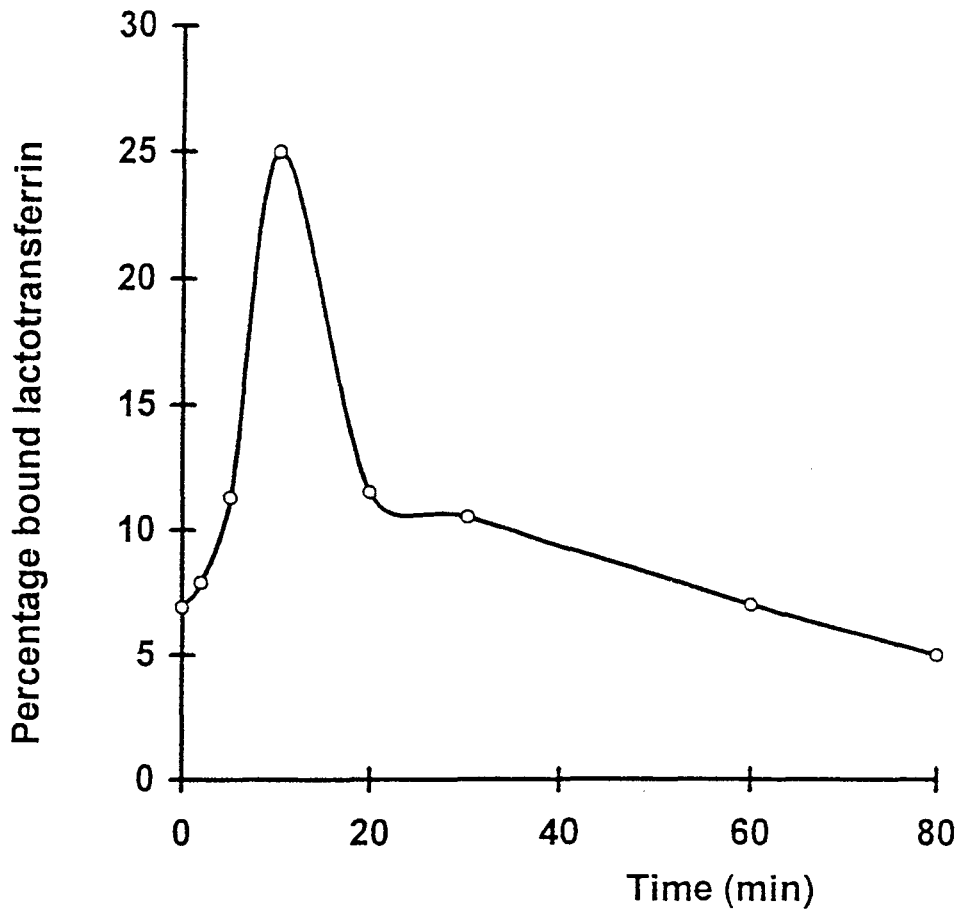
Figure 1. Representative experiment showing the binding of lactotransferrin to Jurkat cells at 4°C. Cells were incubated at 4°C for 1h with increasing concentrations of  $^{125}\text{I}$ -labeled lactotransferrin (□) or  $^{125}\text{I}$ -labeled aminopeptidase treated lactotransferrin (■). Non specific binding (○) was measured in the presence of a 50 fold molar excess of unlabeled lactotransferrin. Experiments (n=5) were performed in duplicates.



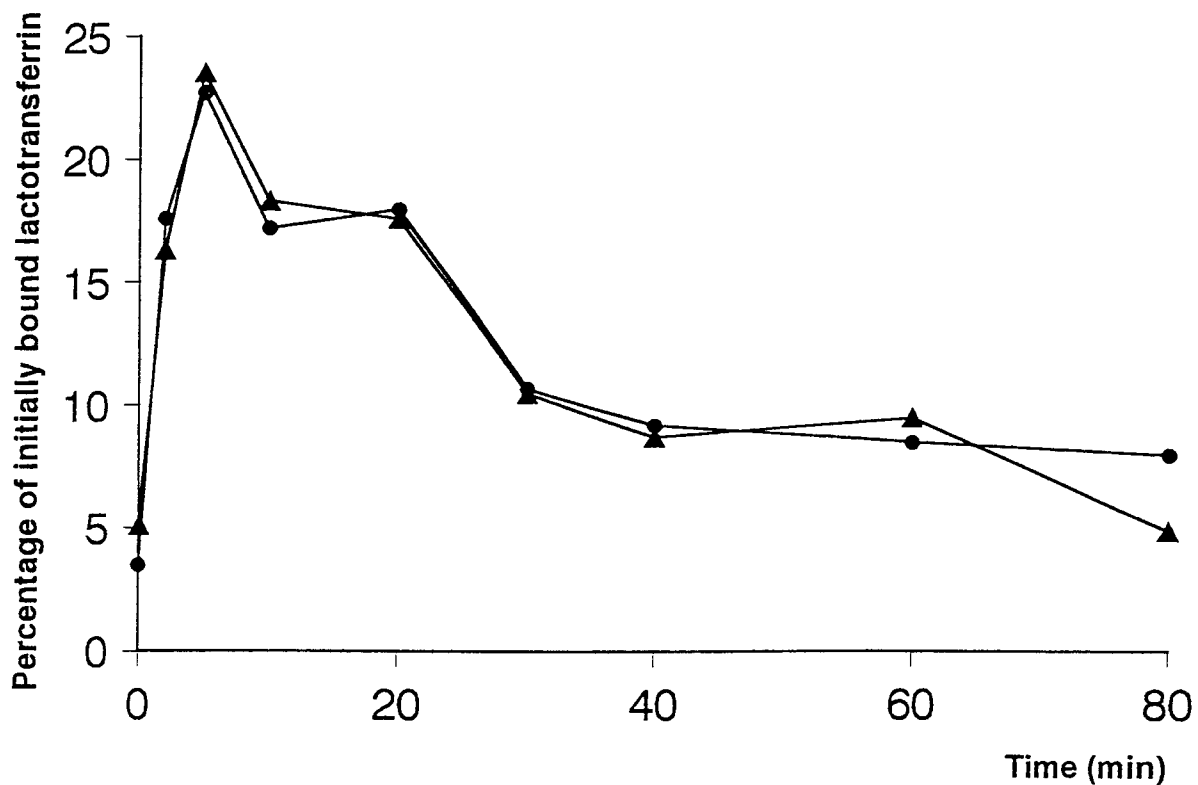
**Figure 2.** Kinetics of lactotransferrin uptake in Jurkat cells. Cells were incubated at 37°C in the continuous presence of an excess of  $^{125}\text{I}$ -labeled lactotransferrin. At the designated time, aliquots of the suspension were removed and the amount of intracellular lactotransferrin was determined. Inset: Linearization of the curve for calculation of the first order rate constant. Symbols represent means of duplicate samples.



**Figure 3.** Internalization kinetics of lactotransferrin in Jurkat cells. The cells were incubated for 1h at 4°C in the presence of  $^{125}\text{I}$ -labeled lactotransferrin, washed and at time zero prewarmed medium containing unlabeled lactotransferrin was added. Aliquots were removed at various times and were treated as described under "Experimental Procedures". The amount of radioactivity present in the medium ( ■ ), on the cell surface ( ▲ ), and inside the cells ( ● ) is shown. Symbols represent mean of duplicate samples.



**Figure 4.** Internalization of apo-lactotransferrin. The cells were treated as previously described. The amount of radioactivity present inside the cells is shown. Symbols represent mean of duplicate samples.



**Figure 5.** Effect of colchicine on the internalization of lactotransferrin in Jurkat cells. Figure shows the amounts of radioactivity present inside the cells when  $^{125}\text{I}$ -labeled lactotransferrin prebound at  $4^{\circ}\text{C}$  is internalized at  $37^{\circ}\text{C}$  in absence (■) or in presence of 15 mM colchicine (▲). Symbols represent mean of duplicate samples.

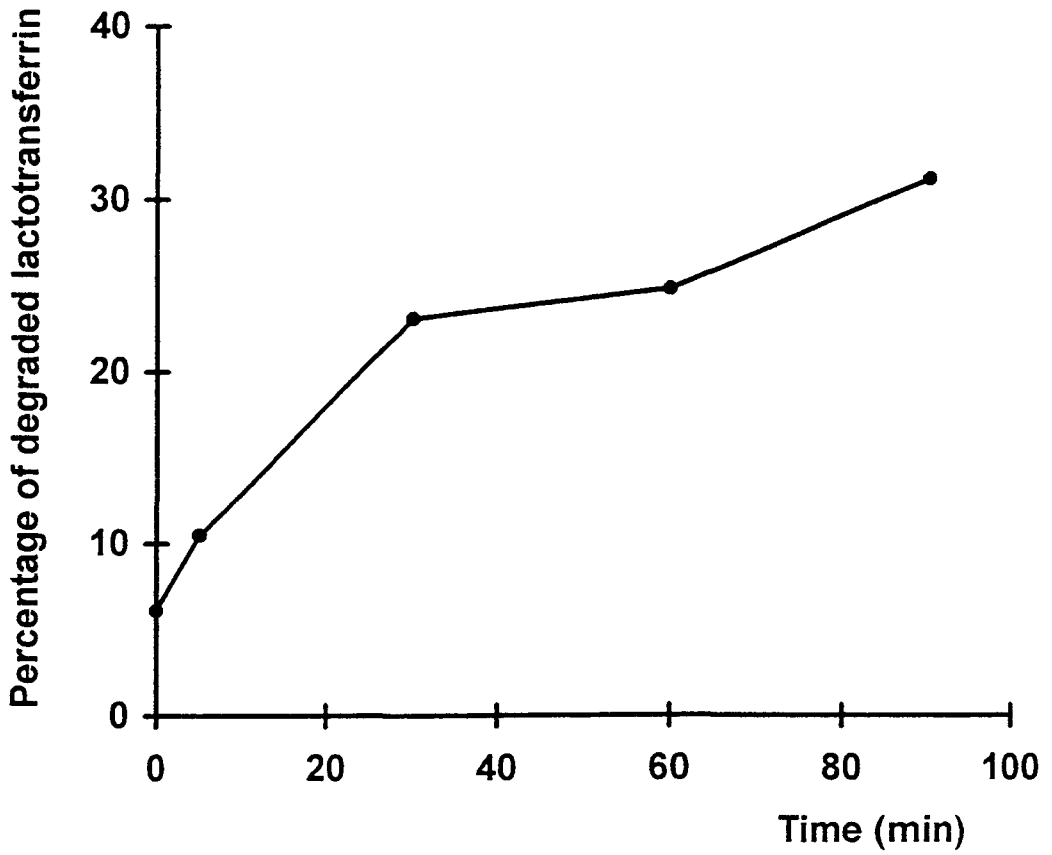


Figure 6. Degradation kinetics of lactotransferrin in Jurkat cells. Cells were treated as for endocytosis of prebound lactotransferrin and the amount of degraded  $^{125}\text{I}$ -labeled lactotransferrin (●) in the medium was determined as described in "Experimental Procedures".



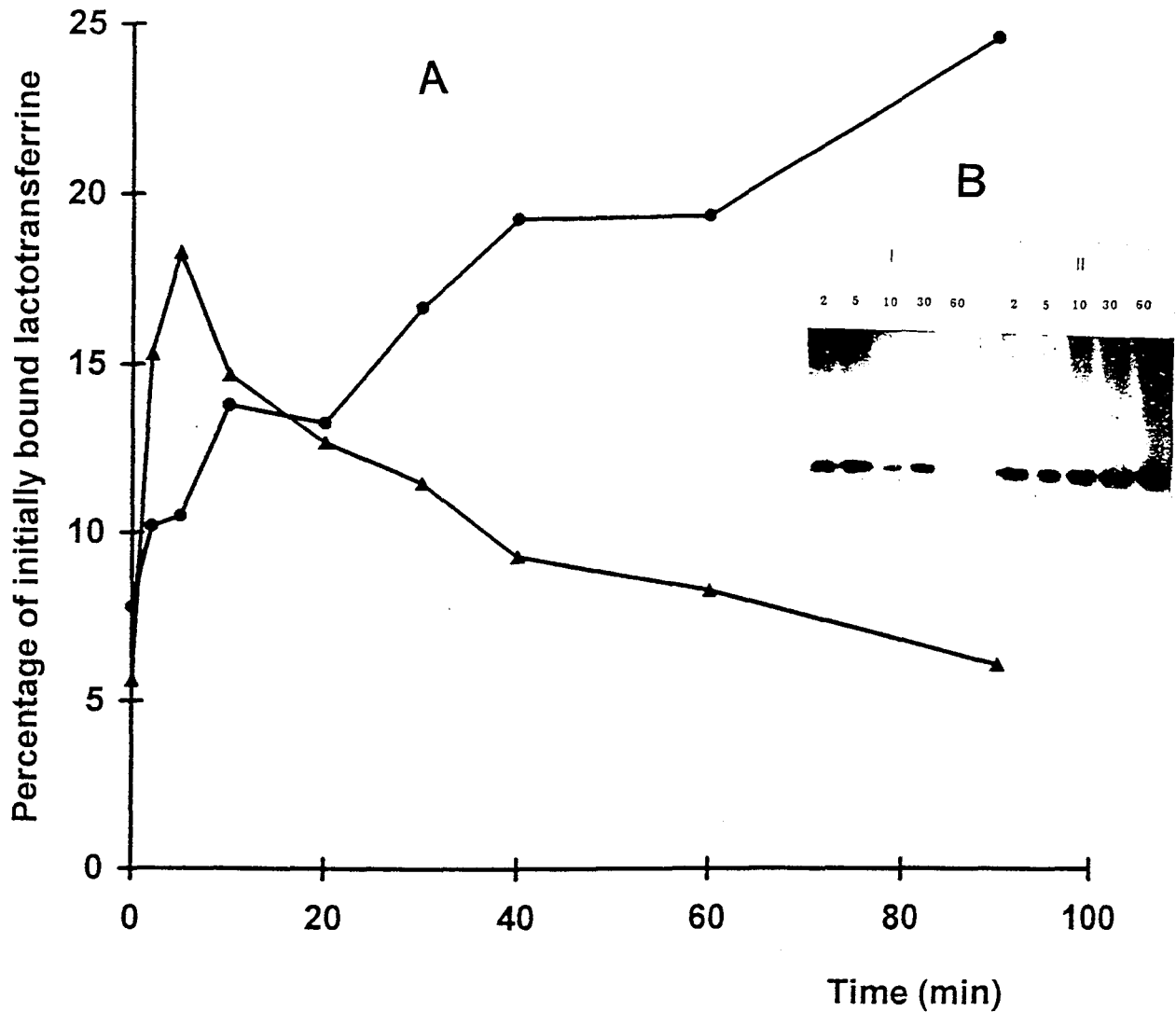
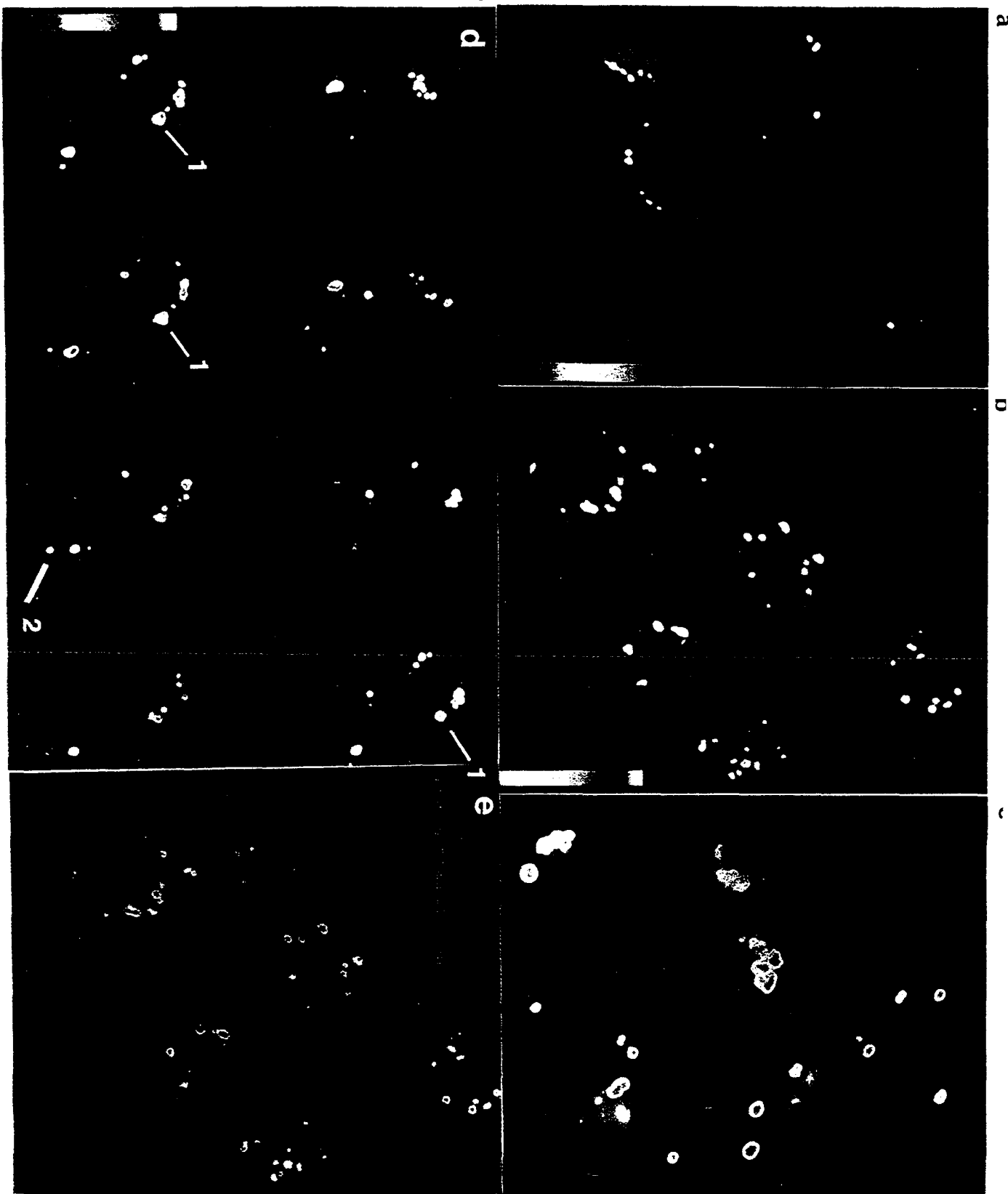
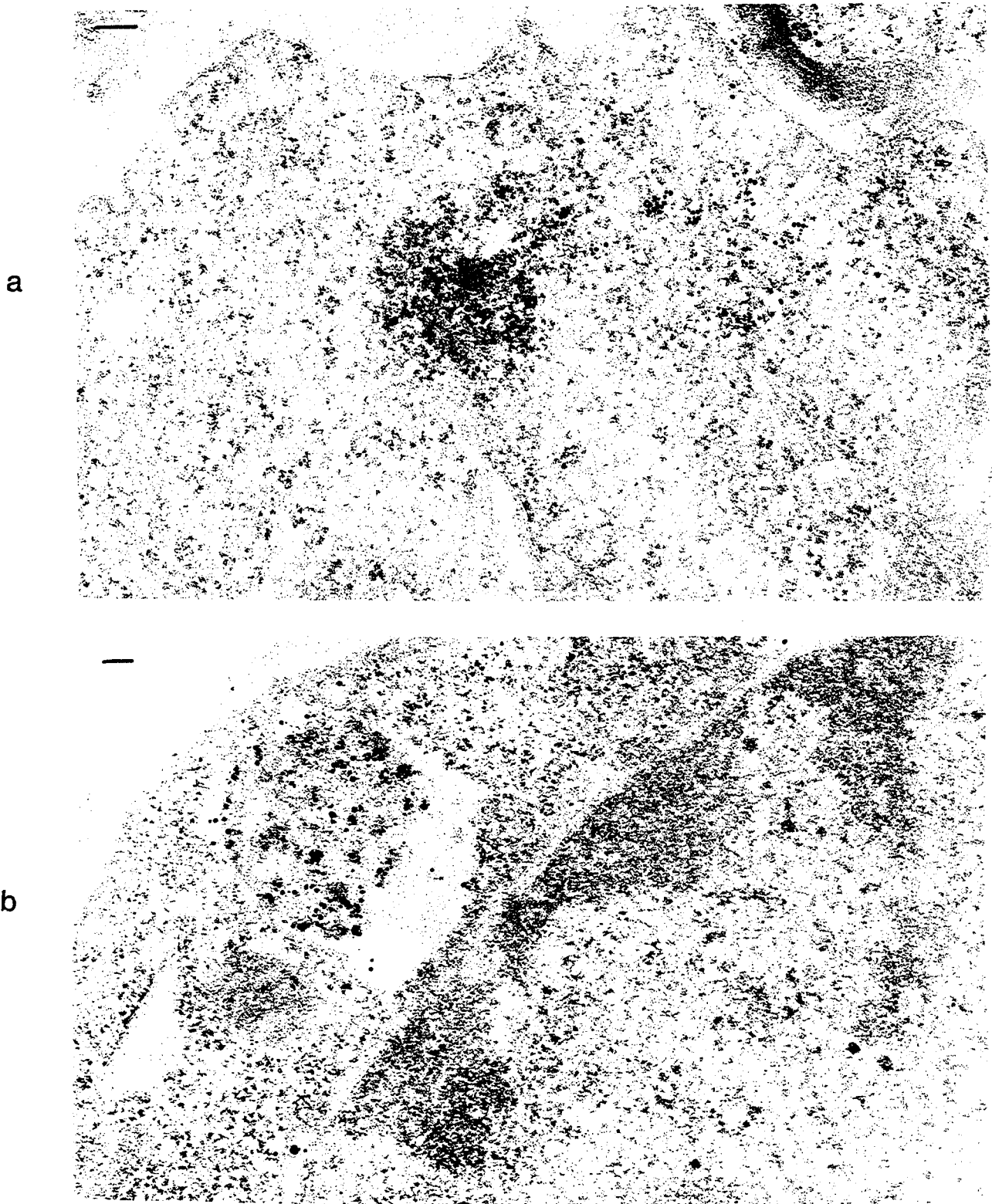


Figure 7. Effect of chloroquine on the internalization of lactotransferrin (A) and on the degradation kinetics of internalized lactotransferrin (B). In A, figure shows the amounts of radioactivity present inside the cells when  $^{125}\text{I}$ -labeled lactotransferrin prebound at  $4^\circ\text{C}$  is internalized at  $37^\circ\text{C}$  in absence (●) or in presence of  $200\ \mu\text{M}$  chloroquine (▲). Symbols represent the mean of duplicate symbols. In B, SDS-PAGE under reducing conditions was performed on 1% Triton X-100 extract of cells after internalization of  $^{125}\text{I}$ -labeled lactotransferrin in absence (I) and in presence of  $200\ \mu\text{M}$  chloroquine (II).



**Figure 8.** Intracellular localization of internalized lactotransferrin in Jurkat cells as seen by fluorescence microscopy. The cells were incubated for 1h at 4°C in the presence of fluorescein-carbohydrate labeled lactotransferrin (a), washed and incubated at 37°C for 30 min in the absence (b) or in the presence of chloroquine (c). In (d), cells were incubated at 37°C for 30 min in the continuous presence of fluorescein-carbohydrate labeled lactotransferrin and confocal microscopic analysis was performed on fixed cells and a series of 8 optical transverse sections at 0.9  $\mu\text{m}$  through the whole cell were examined. In (e), cells were incubated at 37°C for 30 min with fluorescein-carbohydrate labeled lactotransferrin, the last 15 min in the presence of rhodamine labeled serum transferrin.



**Figure 9.** Intracellular localization of lactotransferrin in Jurkat cells as seen by electron-microscopy. The cells were incubated at 37°C for 60 min with lactotransferrin in the absence (a) or in the presence (b) of 200  $\mu\text{M}$  chloroquine. (bar: 0.2  $\mu\text{m}$ )

### C. Conclusion

Nous avons mis en évidence l'internalisation de la lactotransferrine dans les cellules lymphoblastiques Jurkat. L'entrée de la lactotransferrine dans la cellule se produit très rapidement. Après l'étape de saturation des sites membranaires par la lactotransferrine radioiodée, l'incubation du système à 37°C induit une endocytose par laquelle la concentration intracellulaire en lactotransferrine est observée après 3-8 min pour la lactotransferrine saturée en fer et 5-15 min pour l'apo-lactotransferrine. L'endocytose ne dépend pas du taux de saturation en fer, contrairement à la transferrine sérique où la forme apo n'est pas reconnue par le récepteur.

Une partie de la lactotransferrine internalisée par les cellules Jurkat est dégradée. L'étude cinétique de la dégradation a montré que 30-40% de la <sup>125</sup>I-lactotransferrine se retrouvaient dans le milieu extérieur sous la forme de petits peptides, après 90 min d'incubation avec les cellules à 37°C. L'étude de l'influence des inhibiteurs a permis de confirmer ces résultats, la colchicine qui est un inhibiteur de la contraction de la tubuline et des microfibrilles du fuseau n'empêche pas l'internalisation de la lactotransferrine. La chloroquine et le NH<sub>4</sub>Cl n'empêchent pas l'internalisation de la lactotransferrine, mais empêchent le recyclage de la protéine. Les expériences d'immunolocalisation ont montré que cette inhibition était due à l'accumulation de la lactotransferrine dans les endosomes.

La microscopie confocale permet d'observer la distribution spatiale d'un ligand fluorescent à l'intérieur d'une cellule. La lactotransferrine internalisée apparaît concentrée dans des vésicules de tailles variables, surtout en présence de chloroquine dans le milieu. L'étude de la co-localisation de la lactotransferrine marquée à la fluorescéine avec la sérotransferrine marquée à la rhodamine nous a montré que la localisation de deux protéines fluorescentes n'est pas absolument identique. La microscopie électronique nous a montré que la lactotransferrine internalisée est localisée dans différents compartiments intracellulaires après 30 min d'incubation à 37°C. La lactotransferrine internalisée à 37°C en présence de chloroquine a été concentrée dans des vésicules de tailles variables, comme le montre l'observation des cellules par microscopie confocale et électronique .

Les résultats que nous avons obtenus jusqu'à présent montrent que la lactotransferrine après avoir été internalisée emprunte la voie de recyclage, puisque une grande partie de la lactotransferrine et de la sérotransferrine sont en effet colocalisées dans les mêmes compartiments. Cependant une partie de la lactotransferrine à chaque cycle d'endocytose semble être dirigée vers le lysosome où elle est dégradée avant d'être rejetée dans le milieu extérieur sous la forme de petits peptides.

### III. ACTION DE LA LACTOTRANSFERRINE SUR LA LIGNEE LYMPHOCYTAIRE T JURKAT

#### A. Introduction

Le rôle de la lactotransferrine sur la prolifération cellulaire est très controversé et semble en contradiction avec l'activité de différenciation qui vient d'être décrite (Zimecki *et al.*, 1991). Dans notre laboratoire, des études préliminaires ont montré que la lactotransferrine pouvait apporter aux lymphocytes activés, maintenus en culture dans un milieu de sevrage, le fer indispensable à leur croissance (Mazurier *et al.*, 1989). Par contre, les groupes de Brock (Ismail & Brock, 1993) et de Fletcher (Slater et Fletcher, 1987a,b) ont montré que les lymphocytes utilisent pour leur croissance le seul fer apporté par la transferrine sérique. Par ailleurs, l'activité facteur de croissance observée pour les cellules en culture par la majorité des expérimentateurs a été obtenue à des concentrations en lactotransferrine très importantes ce qui laisse supposer qu'elle pourrait être due à l'apport d'un contaminant. Plus récemment, une activité cytotoxique de la lactotransferrine vient même d'être décrite pour les cellules de la glande mammaire (Hurley *et al.*, 1994).

Le rôle biologique de la lactotransferrine a surtout été attribué à sa capacité à fixer le fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) et par analogie avec son homologue sérique à sa possibilité à céder le métal à un récepteur cellulaire. Cependant, les expérimentations récentes laissent supposer que la lactotransferrine est plus une protéine qui immobilise le fer pour détoxifier l'organisme et qu'elle agit sur la prolifération cellulaire par l'intermédiaire de la stimulation d'une activité NADH réductase (Sün *et al.*, 1991). En outre la lactotransferrine peut transmettre un signal biologique par elle-même puisqu'il vient d'être récemment démontré qu'elle est un facteur d'activation de la transcription (Baeuerle, 1995 ; He & Furmanski, 1995).

Le modèle cellulaire Jurkat, pour lequel nous avons mis en évidence une fixation spécifique de la lactotransferrine et une endocytose de celle-ci, constitue un modèle expérimental de choix pour étudier le rôle de la lactotransferrine aussi bien dans la prolifération que dans la différenciation cellulaire. Nous avons donc repris les expérimentations en étudiant l'expression des antigènes marqueurs de la prolifération et de la différenciation à la surface des cellules lymphoblastiques Jurkat traitées par la lactotransferrine saturée ou non en fer.

*B. Article 3*

**Effect of lactotransferrin on proliferation and differentiation of the Jurkat human lymphoblastic T-cell line**

**Effect of lactotransferrin on proliferation and differentiation of the Jurkat human lymphoblastic T-cell line**

B. Y. Bi<sup>1</sup>, A.-M. Lefebvre<sup>1</sup>, D. Dus<sup>2</sup>, G. Spik<sup>1</sup> and J. Mazurier<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Laboratoire de Chimie Biologique et Unité Mixte de Recherche du Centre National de la Recherche Scientifique n°111, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France; <sup>2</sup>Laboratory of Tumor Immunology, Institute of Immunology and Experimental Therapy Polish Academy of Sciences, Czerska st. 12, 59114 Wrocław, Poland*

*Key words:* lactoferrin, Jurkat, differentiation, CD4 antigen

Telephone number : (33)20337239

Fax number : (33)20436555

E-mail : Mazurier@pop.univ.lille.fr

Correspondence to J. Mazurier, *Laboratoire de Chimie Biologique et Unité Mixte de Recherche du Centre National de la Recherche Scientifique n°111, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France*



## 1. Abstract

The effect of human lactotransferrin on the human lymphoblastic T cell line Jurkat was tested on both proliferation and differentiation. Lactotransferrin enhanced cell proliferation in a serum (1% fetal calf serum) deprived culture. The proliferative effect was dependent on the degree of iron saturation and the amplitude of the effect was small and similar to that obtained in presence of serum transferrin. The proliferative effect of lactotransferrin was not observed in presence of fetal calf serum at a concentration of 10% in the culture medium. These results suggest that Fe-lactotransferrin can substitute Fe-transferrin during the prolonged serum starvation of cells. Lactotransferrin was also shown to promote T-cell differentiation. Jurkat cells treated in the presence of both iron-saturated lactotransferrin and fetal calf serum, at a concentration of 10%, slowly undergo a decrease of the cell volume, a decrease in cell surface density of CD71, a decrease of the incorporation of [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine and an increase of the percentage of cell population in the G1 phase of the cell cycle. These modifications were observed together with the appearance of CD4 antigen at cell surface. Therefore, growing cells slowly enter into quiescence in the continuous presence of lactotransferrin and undergo cell differentiation.

## 2. Introduction

Lactotransferrin [1, 2] belongs to the transferrin family, however unlike serum transferrin, it appears to be, in normal physiological conditions, involved in immunological processes rather than in the cellular uptake of iron [3]. In fact, the biological activity of human lactotransferrin is poorly understood and remains highly controversial. For example, it has been reported that lactotransferrin either promotes the proliferation of different cell lines [4-10], activated lymphocytes [11], has no effect on the lymphocyte proliferation [12] or inhibits lymphocytes [13] and mammary cell growth [14]. It has also been demonstrated that lactotransferrin inhibits *in vitro* the immune response [15] by inhibiting the release of IL1 by macrophages [16] or increases *in vivo* the immune response [17] through a mechanism which involved the maturation of double negative CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> thymic lymphocytes. In fact, it has also been recently demonstrated that lactotransferrin activates a nuclear reporter gene harbouring the specific DNA sequence lactotransferrin recognized (18,19). Lactotransferrin must therefore be considered as a transcriptional factor. Lactotransferrin binds to activated lymphocytes [11], non-activated platelets [20] and lymphoblastic cell lines through the 105 kDa lactotransferrin-receptor [21]. It is a membrane bound receptor [11, 22, 23] that interacts with lactotransferrin with a binding affinity constant of about  $K_d=10^{-8}$ M. Using the lymphoblastic T-cell line Jurkat as a cellular model, the receptor has been localized both at the cell surface in coated-pit like domains, associated into clusters, and in different subsets of intracellular vesicles [21]. We have shown using both a biochemical approach and confocal and electron microscopy that after binding to the cell surface, lactotransferrin enters T-cells via receptor mediated endocytosis [personal communication, B. Y. Bi, J. L. Liu, D. Legrand, A.-C. Roche, M. Capron, G. Spik and J. Mazurier]. Both iron-free and iron-saturated lactotransferrins were internalized at different rates. However, their endocytic pathway is identical.

Modulation of surface lactotransferrin receptor expression could be associated with leukemia cell differentiation and proliferation endocytosis. To examine the mechanism involved in regulation of this events we have undertaken the study of the influence of lactotransferrin presence on the proliferation and maturation status of T-lymphocytes. To do this, we have used as a model, the Jurkat human lymphoblastic T cell line [21]. In this report, we have investigated whether the time course of the lactotransferrin presence has some

influence on the cell phenotype of the Jurkat cell line. We have analysed the kinetics of several cell surface markers expression by dual parameter flow cytometry. Our data demonstrated, that lactotransferrin should be considered as a molecule that is involved in a rescue pathway of lymphocyte proliferation and a molecule that is involved in lymphocyte triggering of differentiation.

### **3. Materials and Methods**

#### *3.1. Reagents*

Mouse monoclonal anti-CD3, -CD4, -CD8, -CD25 and -CD71 immunoglobulins were purchased from Immunotech (Marseille, France). Fluorescein-isothiocyanate-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, U.S.A.). [Methyl-<sup>3</sup>H]thymidine was from Amersham (Amersham, United Kingdom). Lactotransferrin was prepared as previously described [24] and iron desaturation and iron saturation were performed according to Mazurier *et al.* (11, 25)

#### *3.2. Cells*

The human Jurkat lymphoblastic T-cell line was grown under standard conditions in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 0.005% gentamicin and 2.5 mM L-glutamine. The cell density was maintained at 0.2-0.5 x 10<sup>6</sup> cells per ml. Flow cytometric analysis of these cells showed that they were all homogeneously labeled with anti-CD3 immunoglobulins but were negative with anti-CD4, anti-CD8 and anti-CD25 immunoglobulins.

#### *3.3. Flow cytometry analysis*

Cells at a density of 0.25-1 x 10<sup>6</sup> per ml were incubated with monoclonal immunoglobulins against CD3, CD4, CD8, CD71 and CD25 (control negative) antigens, diluted 1:50 and, subsequently, with a secondary antibody of rabbit anti-mouse immunoglobulins fluorescein conjugated. Cells were incubated in phosphate buffered saline on ice with the test antibody for 1 h, twice washed and incubated 30 min with the secondary antibody. Negative control cells were incubated with the control mouse immunoglobulin of the

same Ig isotype and with the second antibody. The fluorescence intensity was measured using a FACScan flow cytometer (Becton and Dickinson, Sunnyvale, CA). Cells were gated for forward and side-angle scatters and 5000 single cell fluorescence events of the gated population were recorded. Results were expressed as a number of equivalent-fluorescein particles per cell calculated from the mean fluorescence intensity, as compared with calibrated fluorescent beads. Dead cells were excluded after propidium iodide (10 µg per ml) staining, on the basis of red fluorescence emission.

### *3.4. Cell proliferation*

To measure proliferation, cells were incubated for 72 h at a cell density of  $0.5 \times 10^6$  per ml in medium supplemented with either 1% or 10% fetal calf serum. Four hours before the end of the incubation, 37 kBq of [methyl- $^3\text{H}$ ]thymidine was added. The cells were lysed with 10% trichloroacetic acid and the insoluble material was filtered on a Multimash 2000 (Dynatec, France), washed and analyzed by liquid scintillation spectrometry on an Beckman (Gagny, France) apparatus. The results were expressed as the percentage of the incorporation obtained in the presence of 10% fetal calf serum. Cells were also counted. Two cell counts in each of two replicate bottles per time point were made every 24 h for up to 5 days, with an electronic particle Coulter counter (Coulter Electronic, Inc., Hialcon, Florida).

### *3.5. Evaluation of cell differentiation*

Cells were maintained in culture, during 3 weeks, at a density of  $1 \times 10^6$  per ml in absence and in presence of iron-saturated or iron free-lactotransferrin at concentrations of 50 to 500 µg per ml. The degree of differentiation was evaluated using flow cytometry, according to the following four parameters: cell size, expression of CD4, CD8 and CD71 antigens and cell cycle analysis. Cell staining with propidium iodide was carried out on cells fixed with cold ( $-30^\circ\text{C}$ ) ethanol 70% in water for 3 h on ice. Then fixed cells were thawed and stained at  $37^\circ\text{C}$  with propidium iodide (100 µg/ml) in presence of RNase (10 µg/ml) for 1 h. After 2 washing in PBS, cells were analysed on FACS using the Cell Fit software (Becton and Dickinson).

## **4. Results**

### *4.1 The effect of lactotransferrin on Jurkat proliferation in a serum deprived culture*

Cells were cultured in the presence of increasing amounts of either 30% iron-saturated lactotransferrin or 30% iron-saturated serum transferrin in RPMI medium supplemented with 1% of fetal calf serum and growth stimulating activity was evaluated by the  $^3\text{H}$ -thymidine uptake level. Although there was variation, the same pattern of proliferation was seen for both transferrins (Fig. 1A). As the transferrin concentrations increased there was first an increase in proliferation which reached for lactotransferrin a plateau between 20 and 100  $\mu\text{g}$  per ml. Then, there was a significant decrease in the proliferation effect. However, the proliferation effect obtained with lactotransferrin was always lower than that observed with serum transferrin. Even under optimal concentration, the growth rate was never more than 50% of the growth measured in medium containing 10% fetal calf serum.

To distinguish between a direct effect of lactotransferrin on proliferation and the effect of iron brought by an iron binding protein, the effect of iron saturation of lactotransferrin was also determined. Cells were cultured after addition of either iron-free, 30% iron-saturated or 100% iron-saturated lactotransferrin at concentrations ranging from 0 to 200  $\mu\text{g}$  per ml (Fig. 1B). Even if iron-free and 30% iron saturated lactotransferrin is susceptible to bind trace amounts of non-transferrin iron present in the medium, the results do show that the proliferation effect is dependent on the total iron content: it is maximum for 30% iron-saturated lactotransferrin at concentrations ranging from 10 to 100  $\mu\text{g}$  per ml. At higher iron concentrations : 100 to 200  $\mu\text{g}$  per ml of 100% iron-saturated lactotransferrin or 200  $\mu\text{g}$  per ml of 30% iron-saturated lactotransferrin there was a noticeable decline in proliferation. The effect observed with iron-free lactotransferrin is probably due to the free iron already present in the culture medium and complexed by lactotransferrin.

#### *4.2. The effect of lactotransferrin on Jurkat proliferation in the presence of fetal calf serum*

The low growth stimulating activity of lactotransferrin described in a serum deprived culture was not observed for the cells cultured in a medium supplemented with 10% fetal calf serum (Fig. 2). In contrast, at lactotransferrin concentrations higher than 200  $\mu\text{g}$  per ml, a progressive decrease of the incorporation of [Methyl- $^3\text{H}$ ]thymidine was observed and the lethal effect reached up to 50% for cells cultured in presence of 10% fetal calf serum and of 500  $\mu\text{g}$  per ml of lactotransferrin (data not shown).

We have also analyzed the incorporation of [Methyl-<sup>3</sup>H]thymidine in Jurkat cells in presence of iron-free or iron-saturated lactotransferrin at concentrations ranging from 50 to 200 µg per ml and we have compared it to the growth of cells in medium supplemented with 10% of fetal calf serum only, over a long time culture period. As expected, the proliferation effects were statistically not divergent during the first week of culture. On the second week, a progressive lowering of [Methyl-<sup>3</sup>H]thymidine uptake was observed for cells cultured in presence of iron-saturated lactotransferrin (data not shown), without affecting the cell viability. After 3 weeks of culture the cell growth decreased, reaching about 50% of the control value. These results were not observed with iron-free lactotransferrin.

#### *4.3. The effect of lactotransferrin on Jurkat differentiation*

We have studied the modulation of CD4 antigen expression in parallel with the expression of serum transferrin receptor (CD71) over a period of 3 weeks culture in presence of 10% fetal calf serum and in the continuous presence of iron-saturated lactotransferrin (100 µg/ml). In these conditions, Jurkat cells after one week of treatment showed (Fig.3) an upregulation of CD4 antigen. The cell surface density of the CD4 antigen reached a plateau after 2 weeks of treatment. Simultaneously, a progressive downregulation of CD71 with accompanying reduction of cell volume were observed. Expression of CD8 antigen was negative. These modifications in the expression of CD4 and CD71 antigens were not observed on cells growing in absence of lactotransferrin. Calculation of the cell cycle distribution (Fig.4) indicates that in the absence of lactotransferrin after one week of culture, 32.5% and 66% of cells are in G1 and S phases, respectively. Addition of lactotransferrin induces an increase of the number of cells in G1 up to 45% and a decrease of cells in S phase down to 56%. At the same time, a decrease of the cell volume was also observed. These effects were dependent on both lactotransferrin concentration and presence of iron. In fact, lactotransferrin was effective in the concentration range from 50 to 200 µg per ml and only in the iron-saturated form.

### **5. Discussion**

While significant progress has been made in our understanding of the molecular and functional aspects of lactotransferrin, there are a number of unresolved issues. Lactotransferrin is capable of mediating multiple ligand interactions. However, it remains unclear how lactotransferrin participates in cell growth and differentiation.

Whether lactotransferrin acts as an iron donor in an analogous way to serum transferrin remains unclear. Ismail and Brock [26] speculated that the uptake of iron by cells in culture when incubated in the presence of lactotransferrin was probably the result of transfer of Fe from lactotransferrin to unlabeled serum transferrin. Lactotransferrin may stimulate cell proliferation through activation of the NADH-oxydo-reductase activity at the cell surface [27].

We have demonstrated that lactotransferrin can promote Jurkat cell proliferation. This stimulation effect is only observed, with either iron-free or iron-saturated lactotransferrin when the cells are incubated in medium containing small amounts of fetal calf serum. Such a stimulatory effect disappeared as the percentage/amount of fetal calf serum reached 10%. In fact, the stimulatory effect of lactotransferrin was only observed in experimental conditions when the proliferation of cells is low due to the lack of serum growth factors. Furthermore, the proliferation of cells in presence of lactotransferrin is no more than 50% of the proliferation obtained under normal culture conditions, ie in the presence of fetal calf serum at a concentration of 10%. The results reported here can explain the contradictory results previously reported [11,14]. It cannot be excluded, that, in some conditions, lactotransferrin may be internalized and serve as an iron donor/source for starving cells kept in the absence of serum.

Furthermore, we demonstrate that lactotransferrin can also promote T-cell differentiation, under experimental culture conditions, while growing cells enter into quiescence. The upregulation of CD4 was observed together with a down regulation of CD71, an increase of the percentage of cells in G1 phase and a decrease of the cell volume. Upregulation of lactotransferrin binding capacity and lactotransferrin uptake by Jurkat cells with accompanying downregulation of transferrin receptor may be independent of cell growth inhibition and, instead, may be involved in the signalling of the maturation process. The phenomenon of differentiation is probably due to a transcriptional regulation effect. The regulation of transcription can occur either via a transmembrane signalling pathway involving a succession of protein kinases or via, as suggested recently [18, 19] by entry of lactotransferrin into cell and binding to a specific DNA sequence leading to gene activation. Changes in lactotransferrin binding capacity seems to correlate closely with the acquisition of the mature phenotype (CD4 expression) rather than with the cessation of proliferation of Jurkat cells.

Although the proliferation rate may be considered as an indicator of differentiation, or growth initiation, for a variety of cell types, it seems that in the presence of lactotransferrin, entry into quiescence of previously proliferating cells could be accompanied by cell differentiation. Lactotransferrin expression at exponential phase growth and at plateau phase

growth of human T-cell leukemia Jurkat cells, its activation and CD4 upregulation remain to be elucidated.

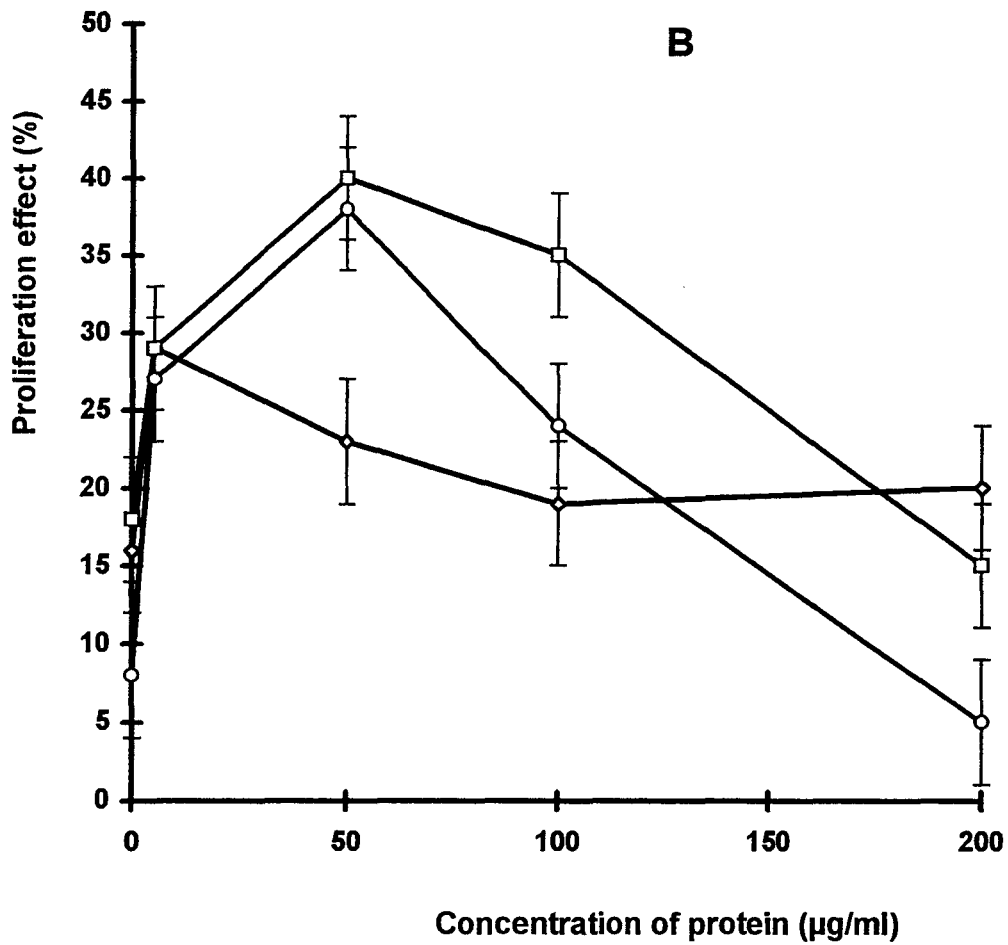
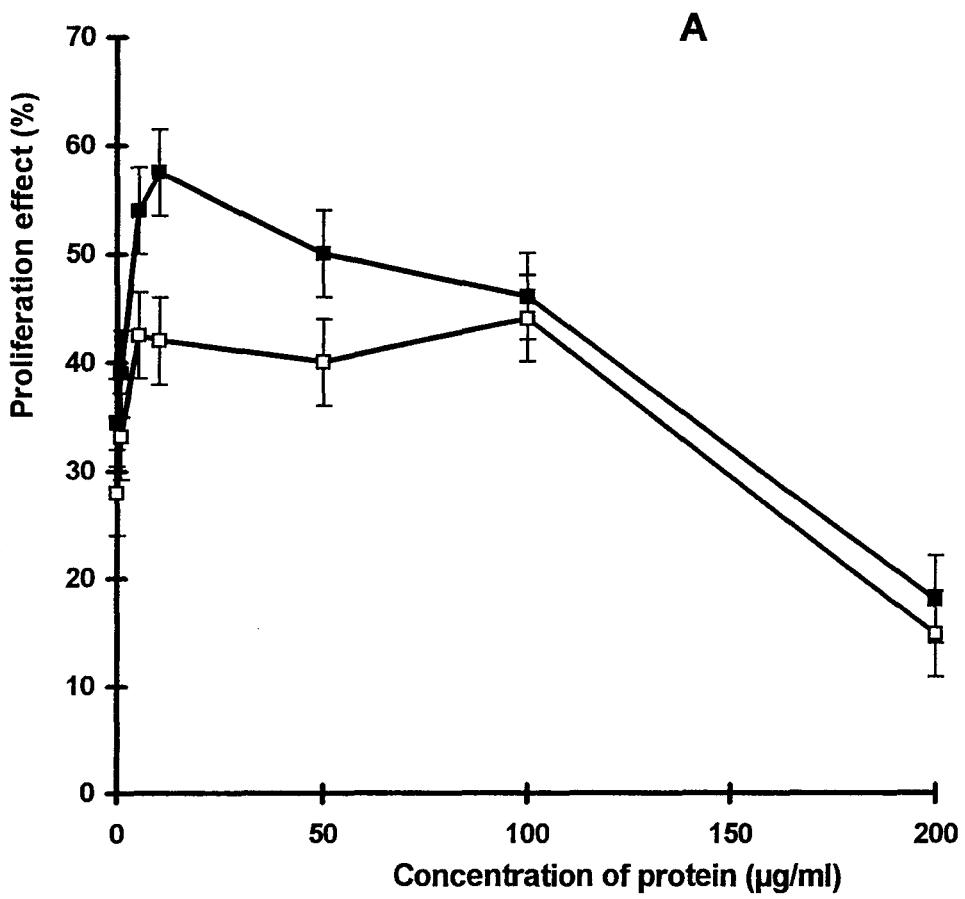
**Acknowledgements.** This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche n°111, Director: Professor A. Verbert), the Université des Sciences et Technologies de Lille and by Grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer and the Institut National de la Santé et de Recherche (Contract n°930507). We are grateful to Professor J. Montreuil for his constant interest in this work. We are indebted to Mrs O. Labiau for her technical assistance.



## References

- [1] Montreuil, J. and Mullet, S. (1960) *C. R. Acad. Sci. Paris* 250D, 1736.
- [2] Montreuil, J., Tonnelat, J. and Mullet, S. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 45, 413.
- [3] Brock, J. (1986) in: *Iron in immunity, cancer and inflammation* (M. de Sousa and J. Brock, Eds.), pp.81-108, John Wiley and Sons, Chichester.
- [4] Hashizume, S., Kuroda, K. and Murakami, M. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 763, 377.
- [5] Esaguy, N., Freire, O., Van Embden, J. D. A. and Aguasa, P. (1993) *Scand. J. Immunol.* 38, 147.
- [6] Oria, R., Alvarez-Hernandez, X., Liceaga, J. and Brock, J.H. (1988) *Biochem. J.* 252, 221.
- [7] Amouric, M., Marvaldi, Pichon, J., Bellot, F. and Figarella, C. (1984) *In Vitro* 20, 543.
- [8] Azuma, N., Kaminogawa, S. and Yamauchi, K. (1989) *Agric. Biol. Chem.* 3, 149.
- [9] Byatt, J.C., Grossi, C., Canessa, A., Pistola, V. and Barton, J. C. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 173, 548.
- [10] Nichols, B.L., Mac Kee, K.S., Henry, J.F. and Putnam, M. (1987) *Pediatr. Res.* 21,563.
- [11] Mazurier, J., Legrand, D., Hu, W.L., Montreuil, J. and Spik, G. (1989) *Eur. J. Biochem.* 179, 481
- [12] Djeha, A. and Brock, J. H. (1992) *British J. Haematol.* 80, 235.
- [13] Slater, K. and Fletcher, J. (1987) *Blood* 69, 1328.
- [14] Hurley, W. L., Hegarty, H. M. and Metzler J. T. (1994) *Life Sciences*, 55, 1955.
- [15] Duncan, R. L. and McArthur (1981) *Cellular Immunol.* 63, 308.
- [16] Zucali, J.R., Broxmeyer, H.E., Levy, C. and Morse, C. (1989) *Blood* 74, 1531.
- [17] Zimecki, M., Mazurier, J., Machnicki, M., Wiczorek, Z., Montreuil, J. and Spik, G. (1991) *Immunol. Lett.* 30, 119.
- [18] Baeuerle (1995) *Nature*, 373 : 661-662.
- [19] He, J. L. & Furmanski, P. (1995) *Nature*, 373 : 721-724.
- [20] Leveugle, B., Mazurier, J., Legrand, D., Mazurier, C., Montreuil, J. and Spik, G. (1993) *Eur. J. Biochem.* 213, 1205.
- [21] Bi, B.Y., Leveugle, B., Liu J. L., Collard, A., Coppe, P., Roche, A-C., Nillesse, N., Capron, M., Spik, G. and Mazurier, J. (1994) *Eur. J. Cell Biol.* 65, 164.
- [22] Legrand, D., Mazurier, J., Maes, P., Rochard, E. , Montreuil, J. and Spik, G. (1991) *Biochem. J.* 276, 733.
- [23] Legrand, D., Mazurier, J., Rochard, E., Ellass, A., Vergoten, G., Maes, P. and Spik, G. (1992) *Biochemistry* 31, 9243.

- [24] Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J. Dorland, L., van Halbeek, H. and Vliegthart, J. F.G. (1982) *Eur. J. Biochem.* 121, 413.
- [25] Mazurier, J., Lhoste, J.M., Montreuil, J. and Spik, G. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 745, 44.
- [26] Ismail, M., J. H. Brock (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 21618.
- [27] Sün, I. L., Crane, F. L., Morré, J., Löw, H. and Faulk, P. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 176, 498.



**Fig. 1.** Effect of lactotransferrin on the incorporation of [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine in Jurkat cells grown in a medium supplemented with 1% fetal calf serum. (A) Proliferation in the presence of increasing concentrations of 30% iron-saturated human lactotransferrin or 30% iron-saturated serum transferrin. (B) Proliferation in the presence of human lactotransferrin of varying iron saturation. Incorporation of [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine was measured after 3 days incubation with varying concentrations of human lactotransferrin. Iron-saturated lactotransferrin (○), 30% iron-saturated lactotransferrin (□), iron-free lactotransferrin (◇), 30% iron-saturated serum transferrin (■). Experiments (n=3) were performed in triplicate samples. The results were expressed as the percentage of the incorporation of [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine obtained in the presence of 10% fetal calf serum.

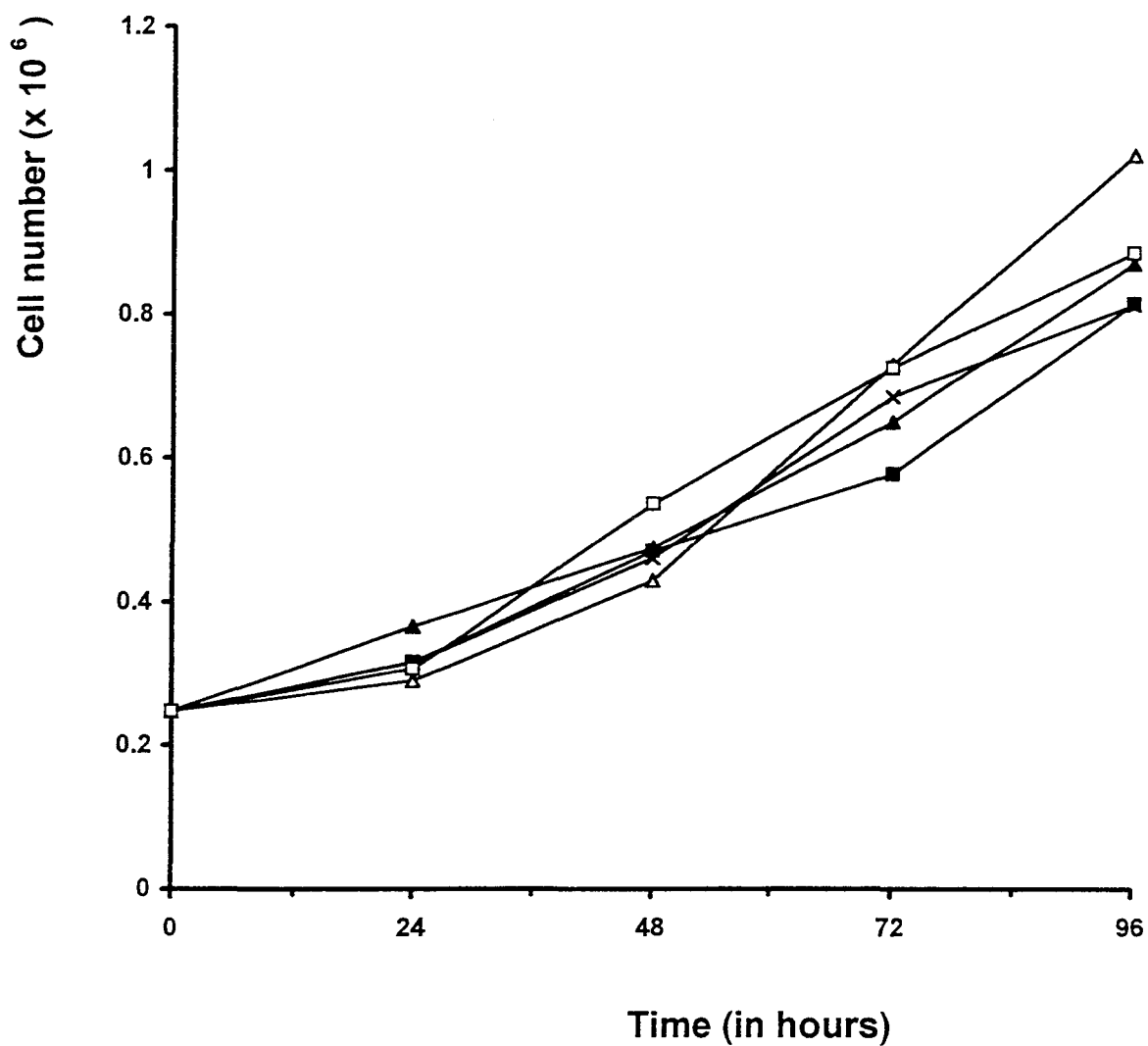


Fig. 2. Kinetic of proliferation of Jurkat cells in the presence of human lactotransferrin in a medium supplemented with 10% fetal calf serum. Cells were incubated with iron-free lactotransferrin at concentration of 50 µg/ml (■) and 100 µg/ml (▲), iron-saturated lactotransferrin of at concentration of 50 µg/ml (□) and 100 µg/ml (△). Control cells (×) grown in absence of lactotransferrin.

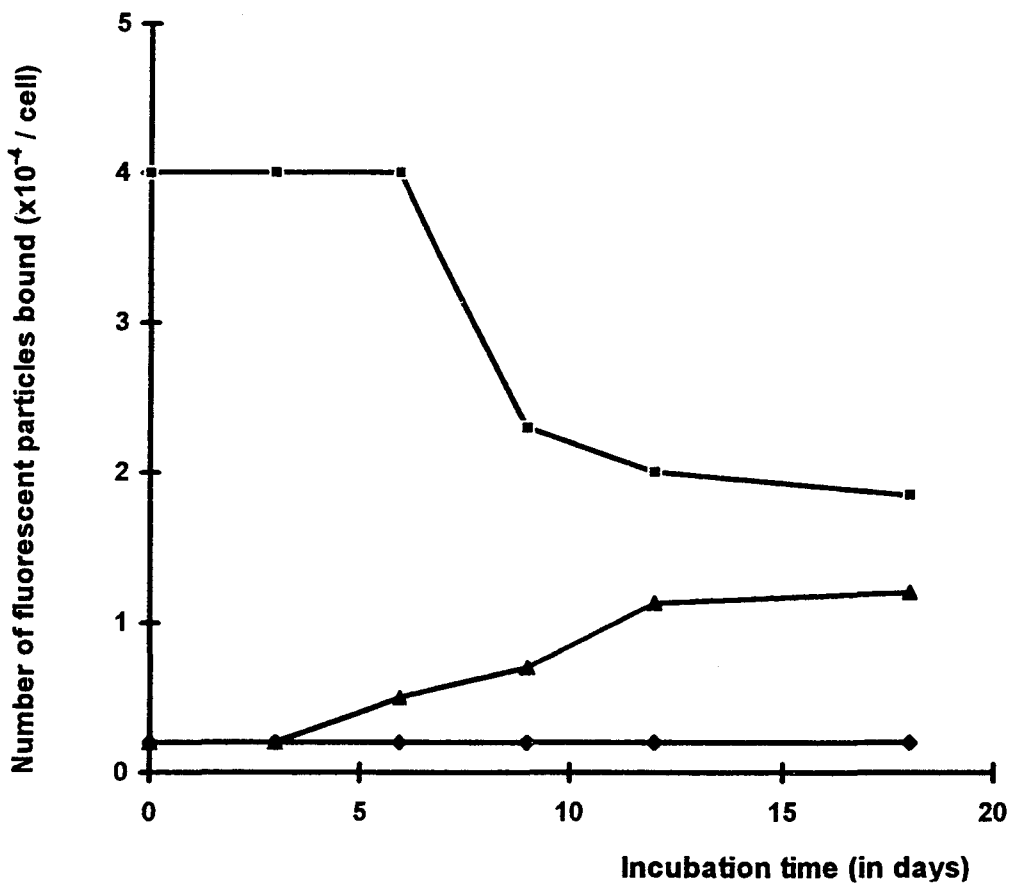


Fig. 3. Expression of cell surface antigens in Jurkat cells upon stimulation with human lactotransferrin (100 $\mu$ g/ml) in a medium supplemented with 10% fetal calf serum. The number of fluorescent particles per cell were calculated, as described in Material and Methods from logarithm of fluorescence intensity. CD4 (▲), CD8 (◆), CD71 (■).

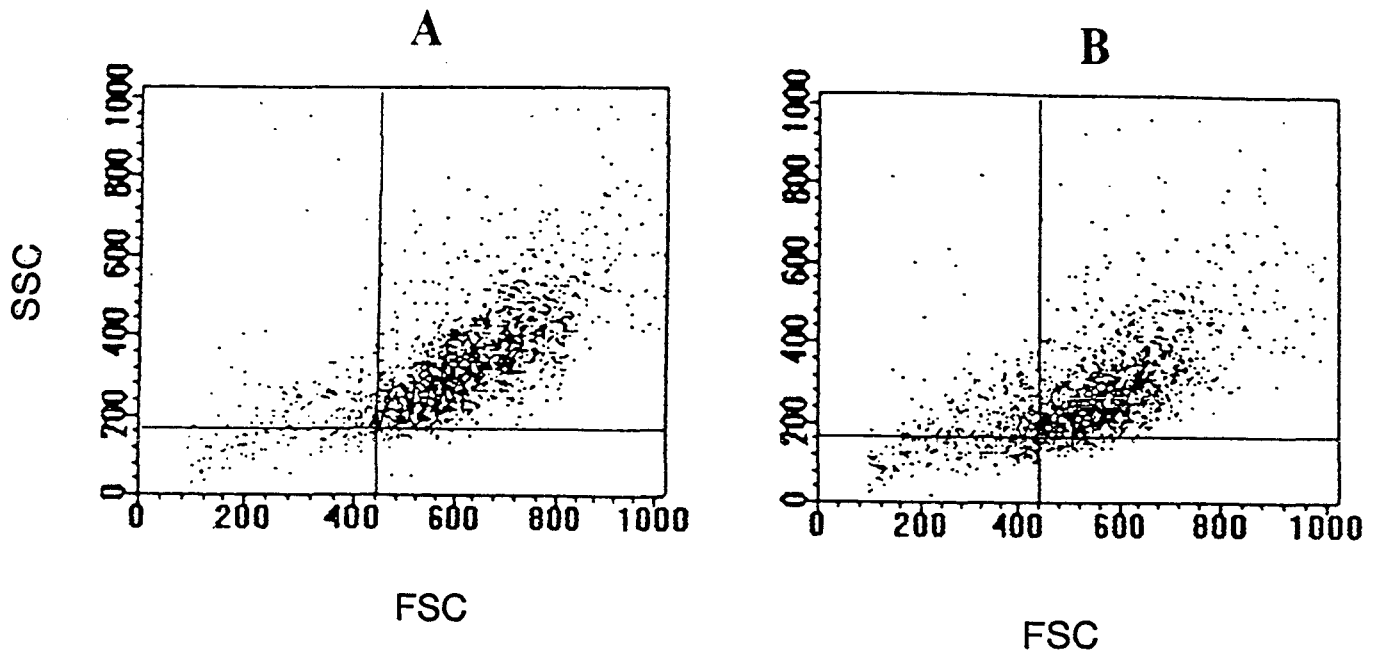


Fig. 4. Representative experiment, showing a variation of Jurkat cells image after incubation in the presence of iron-saturated lactotransferrin. Cell size was determined, using flow cytometer, after 18 days of incubation in medium supplemented with 10% fetal calf serum. (A): control without lactotransferrin; (B): in presence of lactotransferrin at a concentration of 50  $\mu\text{g}$  per ml. FSC: forward scatter, SSC: side scatter.

### C. Conclusion

L'activité facteur de croissance de la lactotransferrine n'est observée que lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu de sevrage. Elle est de la même amplitude que celle de la transferrine sérique et est due à l'apport de l'ion  $Fe^{3+}$ . Par contre, l'activité n'est pas retrouvée sur les cellules en culture dans un milieu supplémenté avec 10% de serum de veau foetal. Il semble donc, que dans des conditions de sevrage, le fer apporté par la lactotransferrine endocytée soit utilisable par la cellule bien que le compartiment dans lequel la lactotransferrine le relâche soit différent de celui dans lequel la sérotransferrine le libère. Le fer libéré dans le lysosome après la dégradation de la lactotransferrine endocytée ne serait utilisé par la cellule que pour survivre.

A forte concentration, la lactotransferrine par l'excès de métal qu'elle apporte devient toxique pour la cellule, qu'elle soit cultivée normalement ou dans un milieu de sevrage. Il n'est cependant pas exclu qu'elle ne soit elle-même cytotoxique.

Finalement, nous avons retrouvé sur les cellules Jurkat l'effet de différenciation qui avait été mis en évidence sur les thymocytes immatures CD4-, CD8- de la souris (Zimecki *et al.*, 1991). Cet effet s'accompagne d'une baisse de l'expression du récepteur de la transferrine sérique et est donc observé alors que la cellule entre en quiescence. Cet effet ne semble pas être la conséquence d'un arrêt de la prolifération des cellules Jurkat mais bien le résultat de l'acquisition d'un phénotype de maturation. Si cette hypothèse est vérifiée, l'apparition du récepteur de la lactotransferrine constituerait un des signaux de la différenciation et devrait précéder l'acquisition du phénotype CD4. Le phénomène de différenciation observé est le résultat d'une régulation au niveau transcriptionnel. Cette régulation peut se faire de 2 façons : soit à travers un système sophistiqué impliquant les voies de transduction et les protéines kinases ou soit comme l'a suggéré Baeuerle (1995) par la pénétration de la lactotransferrine dans le noyau, et l'activation d'un gène après fixation de la lactotransferrine sur une séquence spécifique d'ADN (He & Furmanski, 1995).



## IV. CONCLUSION GENERALE

Dans le but d'élargir nos connaissances sur le rôle de la lactotransferrine et de son récepteur dans la défense immunitaire et pour étudier *in vitro* les interactions entre la lactotransferrine et les cellules lymphocytaires, nous avons développé un modèle d'étude à partir de la lignée lymphoblastique Jurkat.

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

1. Au cours de la première période de nos recherches, nous avons mis en évidence le récepteur lymphocytaire de la lactotransferrine dans les cellules Jurkat. Nous avons vérifié que la lactotransferrine se fixe de manière réversible sur les cellules Jurkat avec une constante de dissociation de l'ordre de  $K_d = 40 \text{ nM}$  pour un nombre de sites de fixation estimé à  $\sim 300000$  par cellule. Ces paramètres sont très voisins de ceux qui ont été précédemment mesurés dans notre laboratoire pour les lymphocytes activés et les plaquettes. Ils s'éloignent considérablement des paramètres de fixation mesurés pour les cellules épithéliales comme les entérocytes et les cellules de la glande mammaire et les hépatocytes ( $K_d$  de l'ordre du  $\mu\text{M}$ , nombre de site égal à plusieurs  $1 \times 10^6$  sites/cellule). Ces différences observées avec les cellules épithéliales sont vraisemblablement la conséquence de la grande quantité de fixation non spécifique.

2. Tout comme les lymphocytes activés et les plaquettes, les cellules Jurkat libèrent dans les milieux de culture une forme tronquée et soluble du récepteur. Il s'agit d'une glycoprotéine monocaténaire d'une masse moléculaire de 95 kDa qui conserve la propriété de fixer la lactotransferrine puisqu'elle est purifiée sous la forme d'un complexe lactotransferrine/récepteur.

3. La purification d'une centaine de  $\mu\text{g}$  du complexe lactotransferrine/récepteur nous a permis d'immuniser des souris et de préparer des anticorps monoclonaux anti-récepteur. Le clonage des hybridomes obtenus par la fusion des cellules spléniques et myéломateuses a donné naissance à environ 500 clones. Parmi ceux-ci un anticorps monoclonal est dirigé à la fois contre le récepteur soluble et le récepteur membranaire.

4. L'anticorps monoclonal se fixe sur la membrane des cellules Jurkat et inhibe la fixation de la lactotransferrine. Il nous a permis de mettre en évidence la présence du récepteur dans les lignées lymphocytaires T (Molt, CEM) et B (Raji). Par contre, le récepteur n'est pas exprimé dans les cellules monocytaires HL-60 non différenciées.

5. L'étude immunocytochimique réalisée à l'aide de l'anticorps monoclonal a montré que le récepteur était présent à la surface de la cellule, localement concentré et souvent associé à des puits recouverts. Le récepteur intracellulaire est présent à la périphérie de la membrane cytoplasmique et est complètement absent de la région périnucléaire.

6. La lactotransferrine se fixe sur de nombreuses cellules mais seuls l'hépatocyte et les lymphocytes l'internalisent. L'endocytose de la lactotransferrine par le lymphocyte est très rapide ( $K_{in} = 0.060 \text{ min}^{-1}$ ) et celle-ci intéresse 80% de la protéine fixée, les deux formes apo- et saturée en fer sont endocytées avec de légères différences dans la cinétique, l'apolactotransferrine étant internalisée moins rapidement.

7. La lactotransferrine endocytée est concentrée dans des structures vésiculaires et dans des structures plus organisées que nous n'avons pas identifiées. Les expériences de co-localisation de la lactotransferrine et de la sérotransferrine marquées respectivement à la fluorescéine et à la rhodamine montrent que le trafic intracellulaire des 2 protéines est différent.

8. Après son endocytose, une partie de la lactotransferrine est dégradée à chaque cycle d'endocytose, les produits de dégradation de la lactotransferrine que nous avons identifiés sont ensuite relâchés dans le milieu extérieur. Cette hydrolyse de la lactotransferrine est inhibée par la chloroquine et  $\text{NH}_4\text{Cl}$  qui, en bloquant la baisse du pH intraendosomal, empêche le fonctionnement des hydrolases acides des lysosomes.

9. L'activité facteur de croissance de la lactotransferrine n'est observée que lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu de sevrage. Elle est de la même amplitude que celle de la transferrine sérique et est due à l'apport de l'ion  $\text{Fe}^{3+}$ . Par contre, l'activité n'est pas retrouvée sur les cellules en culture dans un milieu supplémenté en serum de veau foetal. Il semble donc, que dans des conditions de sevrage, le fer libéré dans le lysosome après la dégradation de la lactotransferrine endocytée ne soit utilisé par la cellule que pour survivre.

10. Finalement, nous avons retrouvé sur les cellules Jurkat l'effet de différenciation qui avait été mis en évidence sur les thymocytes immatures CD4-, CD8- de la souris (Zimecki *et al.*, 1991). Cet effet s'accompagne d'une baisse de l'expression du récepteur de la transferrine sérique CD71 et est donc observé alors que la cellule entre en quiescence. Cet effet ne semble pas être la conséquence d'un arrêt de la prolifération des cellules Jurkat mais bien le résultat de l'acquisition d'un phénotype de maturation.

Nos travaux ont contribué à mettre au point un modèle expérimental pour étudier le mécanisme d'action de la lactotransferrine sur les cellules lymphocytaires. Ils permettront dans un proche avenir d'étudier les voies de transduction activées par la fixation de la lactotransferrine sur son récepteur et d'étudier le trafic intracellulaire de celui-ci.

# **APPENDICE TECHNIQUE**

## I. PREPARATION DE LA LACTOTRANSFERRINE HUMAINE

### A. Purification de la lactotransferrine

La lactotransferrine humaine a été préparée selon le protocole mis au point dans notre laboratoire par Chéron *et al.* (1977) et modifié par Spik *et al.* (1982).

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

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

Finalement, la lactotransferrine est chromatographiée sur une colonne de Detoxigel (1,5 × 5cm, Pierce) équilibrée par une solution bicarbonate d'ammonium. Après dialyse contre l'eau distillée, la lyophilisation est faite.

### B. Saturation et désaturation en fer de la lactotransferrine

#### 1. La préparation de la lactotransferrine saturée en fer

La préparation de la lactotransferrine saturée en fer est réalisée selon la méthode décrite par Mazurier & Spik (1980), en utilisant le réactif préconisé par Azari & Baugh (1967). La protéine est dissoute dans un tampon acétate de sodium/bicarbonate de sodium 0,1 M de pH 8,2. Le fer est ajouté sous la forme de citrate ferrique (en dissolvant 260 mg de FeCl<sub>3</sub>(6 H<sub>2</sub>O) dans 10 ml de tampon citrate de sodium/bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 8,2). La quantité de citrate ferrique ajoutée pour saturer totalement la lactotransferrine est de 1,6 µg de fer par mg de protéine, ce qui représente environ 110% de la quantité théorique. Après 3 h de repos, le fer libre est éliminé par chromatographie sur une colonne de Dowex (2 × 8, 200 meshes) équilibrée dans le tampon d'utilisation.

## 2. La préparation d'apolactotransferrine

L'apolactotransferrine est préparée selon la méthode mise au point et décrite par Mazurier et Spik (1980). La lactotransferrine native est dissoute dans un tampon formiate de sodium 0,2 M, phosphate de sodium 0,2 M, EDTA 40mM de pH 4 pour obtenir une concentration maximale de 0,5%. Après un repos de 24 h, la solution est dialysée 3 jours contre de l'eau distillée, puis repurifiée par chromatographie sur SP-Séphadex C-50.

### C. Couplage de la fluorescéine sur les glycanes de la lactotransferrine

La méthode, mise au point dans notre laboratoire par D. Legrand et décrite par Leveugle *et al.* (1993), nécessite dans un premier temps l'oxydation périodique des résidus NeuAc des glycanes de la lactotransferrine humaine et dans un second temps la réaction des fonctions aldéhydiques formées avec {5-[[((2-(carbohydrazino)méthyl)thio)acétyl]amino-fluorescéine} (HyF).

230 µl de phosphate de sodium 0,1 M, pH 5,6 contenant 5 mg de lactotransferrine, sont mélangés avec 100 µl de périodate 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 un tampon phosphate de sodium 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,4. La lactotransferrine oxydée est 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 PBS pH 7,4 contenant 5 % (v/v) de butanol et par dialyse contre du PBS pH 7,4. Le nombre de molécules de HyF fixées par molécule de lactotransferrine humaine est estimé à 1,5 par mesure de l'absorbance à 280 nm et à 495 nm selon la méthode de Jobbagy & Kirly (1966).

### D. Marquage de la lactotransferrine à l'iode <sup>125</sup>I

L'iodogen (1, 3, 4, 6-tétrachloro-3a, 6a-diphényl glucoril, Pierce) est dissous dans du chloroforme à raison de 1 mg/ml. Des fractions de 100 µg sont ensuite réparties dans des tubes en verre et le chloroforme est éliminé par évaporation sous azote. La protéine à marquer (100 à 500 µg dans 500 µl de PBS) est placée dans le tube contenant l'iodogen et 200 µCi d'iode radioactif sont additionnées (Na <sup>125</sup>I, IMS 30, 3,7 x 10<sup>9</sup> Bq/ml, Amersham). La réaction est

effectuée à 4°C sous agitation. Au bout de 15-20 min, l'iode libre est éliminé par passage de la solution sur une colonne de Séphadex G-25 (2 x 15 cm) équilibrée dans le tampon de réaction. Des fractions de 0,5 ml sont recueillies et leur radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur gamma (LKB). La concentration en protéine est déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm.

## II. CULTURE CELLULAIRE

### A. Culture cellulaire

Les cellules Jurkat sont cultivées dans un milieu RPMI 1640, complété avec du serum de veau foetal décomplémenté (10% SVF), de la L-glutamine (292mg/l), de l'Hépès (4,7g/l), du bicarbonate de sodium (2,2 g/l), des antibiotiques (gentamycine) à 37°C dans une atmosphère humide composée de 95% d'air et 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont repiquées tous les deux ou trois jours etensemencées à 2-3 x 10<sup>5</sup> dans des flacons 250 cm<sup>2</sup>. Pour les études de fixation et internalisation, les cellules sont utilisées lors de nos manipulations au 2ème jour de culture. Les lignées Cem et Raji sont cultivées dans les mêmes conditions.

### B. Détection des mycoplasmes

La détection est réalisée par des cellules Véro (la lignée fibroblastique) mises en culture en présence du surnageant de culture des cellules à analyser. Les cellules Véro sont mises en culture sur des lamelles stériles à raison de 10<sup>5</sup> cellules par chambre. Après 3 jours, 100 µl du milieu de cellule de chaque lignée à tester sont ajoutés. Un témoin négatif est fait avec les cellules Véro, qui sont déposées dans le milieu DMEM sans antibiotique additionné de 10 % SVF et laissées en culture dans l'incubateur à 37°C et sous 5% de CO<sub>2</sub>. Au troisième jour, les cellules sont fixées avec le réactif de Carnoy (MeOH/acide acétique, 3/1). Après lavage, les cellules sont traitées avec la solution de Hoechst 33258 (0,05 µg/ml). Finalement, les cellules sont observées au microscope à fluorescence (Chen, 1977). Les cellules infectées montrent que les fluorescences sont localisées à la surface de la cellule pour les contaminations faibles. Dans les contaminations importantes la fluorescence devient intracellulaire.

### C. *Marquage de protéines membranaires à l'iode <sup>125</sup>I*

Le marquage des protéines de la surface cellulaire est réalisée sur les trois iodo-billes, dérivés de N-chloro-benzensulfonamide (iodo-beads, Pierce). Il est préalablement placé dans 500 µl de PBS, ajouté à 500 µl de PBS contenant  $3 \times 10^8$  cellules. Le tube est placé dans la glace puis 15 µl d'iode radioactif (IMS, 30) sont additionnés. Le tube, toujours placé à 4°C, est agité avec précaution toutes les 5 min. Au bout de 30 min les cellules sont lavées 3 fois par 50 ml de PBS froid.

### D. *Marquage métabolique à la <sup>35</sup>S-méthionine*

Les cellules sont lavées trois fois puis incubées dans le milieu de culture RPMI dépourvu de méthionine. Après 2 h d'incubation les lymphocytes sont lavés puis incubés 6 h en présence de 1 mCi de <sup>35</sup>S-méthionine (1000 Ci/mmmole, Amersham). Les cellules sont enfin lavées trois fois dans du PBS.

### E. *Mesure de la synthèse d'ADN*

Les cellules Jurkatensemencées dans des plaques de 24 puits (Nunc) à raison de  $3 \times 10^4$  cellules sont mises en culture dans 0,5 ml de RPMI 1640, supplémenté avec du serum de veau foetal (SVF) à la concentration de 1%. Après 48-72h d'incubation avec différentes concentrations en lactotransferrine saturée en fer et non saturée en fer, 1µCi de méthyl-[<sup>3</sup>H]-thymidine (Amersham) est ajoutée.

Après 6 h d'incubation, l'incorporation de méthyl-[<sup>3</sup>H]-thymidine est stoppée par lavage des cellules par du PBS. Les cellules sont ensuite fixées par l'acide trichloroacétique à 30 % pendant 30 min, lavées à l'eau courante et lysées par la soude 0,1 N (0,5 ml/puits) pendant 2 h à 37°C.

Le contenu de chaque puits est alors transféré dans une fiole à scintillation dans laquelle sont ajoutés 3 ml de liquide scintillant (Aqualite, Baker). La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur bêta (Beckman).

### F. *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 ) est alors immédiatement ajouté à raison de 0,1 nM afin d'éviter la dégradation des protéines. Le tube est placé ensuite sous agitation rotative pendant 1 h à 4°C. Le matériel cellulaire non solubilisé est éliminé par centrifugation (10000 g, 15 min). Les lysats cellulaires obtenus sont conservés à -80°C.

### **G. Concentration du milieu de culture**

Le milieu de culture provenant des cellules Jurkat est stocké à -20°C en présence de diisopropyl fluorophosphate (10 µg/ml). Puis 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.

## **III. TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES**

Les immobilisations de protéine (lactotransferrine et IgG contre la lactotransferrine) sur Sepharose-4B (Pharmacia) activée au bromure de cyanogène sont réalisées selon la technique décrite par March. Dix ml de support activé sont lavés, sur un verre fritté, avec au moins trois volumes d'eau permutée. Le gel ensuite repris par 15 ml tampon couplage (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, NaCl 0,2 M, pH 8,1) et 50 mg d'IgG, en solution dans ce même tampon, lui sont ajoutés. Après deux heures d'incubation à température ambiante sur agitation, le tampon de couplage est éliminé puis le gel est repris par 10 ml du tampon précédent renfermant de l'éthanolamine 1 M et possédant un pH voisin de 7. 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). Toutes les chromatographies sont réalisées à 4°C.

### **A. Purification des immunoglobulines G anti-lactotransferrine**

Le serum de lapin d'anti-lactotransferrine est déposé sur la colonne de la lactotransferrine immobilisée (1,3 x 7,5 cm de gel) équilibrée dans le PBS. La colonne est ensuite lavée par 50 ml de tampon d'équilibration puis par une solution de glycol, HCl 0,1 M, pH 2,8 pour décrocher la lactotransferrine. La lactotransferrine éluée est mélangée avec la solution de Tris-HCl, pH 9,6. Cette fraction est dialysée contre du PBS, diluée par du glycérol (30%), puis conservée à -20°C.

### **B. Purification du récepteur de la lactotransferrine**

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

Le lysat cellulaire et le milieu concentré sont incubés pendant une nuit à 4°C en présence de lactotransferrine en concentration finale de  $10^{-6}$  M, les protéines sont ensuite précipitées par 40% de sulfate d'ammonium. Le précipité est repris dans un volume minimum de PBS, Triton X-100 0,1% et dialysé contre ce même tampon avant d'être déposé sur la colonne d'anticorps anti-lactotransferrine immobilisés (10 ml). La colonne est d'abord rincée par 50 ml de PBS, Triton X-100 0,1%, puis par 25 ml de PBS, Triton X-100 0,1%, urée 2 M afin d'éliminer les constituants fixés de façon non spécifique. Le récepteur de la lactotransferrine est élué par 15 ml de PBS, Triton X-100 0,1%, urée 6M. L'affinité anticorps-antigène est supérieure à l'affinité ligand-récepteur et après passage de la solution d'urée 6 M, la lactotransferrine est toujours liée à son anticorps.

## **IV. TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES**

### **A. Précipitation des fractions purifiées**

Avant d'être analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, les fractions purifiées obtenues par chromatographie d'affinité sur les différents types de colonne sont concentrées par précipitation à l'ATCA. Les protéines, précipitées par 10% d'ATCA, sont centrifugées 15 min à 10000 g puis lavées 2 fois par de l'éthanol distillé afin d'éliminer l'ATCA. Le culot est séché par évaporation de l'éthanol sous azote puis solubilisé dans le tampon échantillon d'électrophorèse (Tris-HCl 10 mM, 10% SDS, 10% glycérol, pH 8,9). Les échantillons sont centrifugés 5 min à 10000 g 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 sur plaques (1,5 × 140 × 180mm ou 6 × 140 × 180mm) dans un appareil vertical de marque Bio-Rad. La migration est réalisée dans le système tampon préconisé par Laemmli (1970).

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

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

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

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

### **C. *Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose***

Après électrophorèse en gel de polyacrylamide, les protéines ayant migré selon leur masse moléculaire sont transférées électrophorétiquement sur la nitrocellulose (Schleicher & Schüll) selon la technique de Towbin *et al.* (1979). Le tampon utilisé est constitué de 25 mM Tris, 200 mM glycolle, pH 8,4 et contient 20% de méthanol. L'électrotransfert est réalisé à 200 mA, à 4°C pendant 3 h ou à 75 mA pendant 16 h.

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

### **D. *Détection des protéines après transfert sur la nitrocellulose***

La membrane de nitrocellulose, sur laquelle sont immobilisées les protéines, est tout d'abord saturée de façon à bloquer tous les sites actifs restés libres et capables de réagir avec des protéines. La saturation est réalisée en plongeant la feuille de nitrocellulose dans une solution de PBS, contenant de l'ovalbumine à la concentration de 1 %. Au bout de 1 h d'incubation sous agitation douce, la membrane de nitrocellulose est lavée dans une solution de PBS, polyvinyl pyrrolidone (PVP) 2% puis placée dans le même tampon contenant un

récepteur de la lactotransferrine (1:500). L'incubation dure 1 h à température ambiante sous agitation douce puis la membrane de nitrocellulose est lavée 3 fois 10 min par la solution de PBS, PVP 2%. Finalement, la nitrocellulose est incubée en présence du deuxième anticorps spécifique du premier anticorps et marqué soit à l'iode  $^{125}\text{I}$  soit couplé à la peroxydase. Lorsque l'anticorps est marqué à l'iode  $^{125}\text{I}$ , la révélation se fait par autoradiographie, lorsque l'anticorps est couplé à la peroxydase on utilise un chromogène (diamino-benzidine) oxydable par l'eau oxygénée en présence de peroxydase : la réaction colorée est réalisée dans le tampon PBS, 0,04% (p/v) diamino-benzidine par addition de 1 % (v/v) d'eau oxygénée.

## V. CYTOFLUORIMETRIE EN FLUX

Toutes les expériences de cytofluorimétrie en flux sont réalisées à 4°C à l'exception de celles effectuées sur le cycle cellulaire.

### A. *Etude de la fixation de la lactotransferrine fluorescente par cytofluorimétrie en flux*

Les cellules ( $5 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$ ) sont incubées dans 150  $\mu\text{l}$  de tampon PBS en présence de  $1,25 \times 10^{-7}$  M 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. Les cellules sont incubées pendant 45-60 min puis lavées deux fois par du PBS en présence d'un excès de lactotransferrine non marquée (100 excès molaire).

### B. *Préparation de l'anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de la lactotransferrine*

Le clonage des hybridomes obtenus par fusion des cellules spléniques et myélomateuses a donné naissance à 500 clones. Après élimination des anticorps dirigés contre la lactotransferrine humaine et contre la sérum albumine bovine et sélection des clones reconnaissant la protéine de surface des cellules Jurkat, il n'est resté que 10 clones.

La réactivité et la spécificité des anticorps sécrétés par les 10 clones positifs ont été analysées par expériences de " Western blot" réalisées sur des lysats Jurkat. Nous avons montré que seulement un clone sécrétant des anticorps dirigés contre le récepteur soluble reconnaît une protéine de masse moléculaire de 105 kDa, soit la masse moléculaire du récepteur de la lactotransferrine humaine. Il est nommé 5B3G10. L'isotype de cet anticorps a été déterminé. Il s'agit d'immunoglobulines M (Isotype M.K).

**C. *Etude de la fixation de l'anticorps monoclonal anti-récepteur 5B3G10 par cytofluorimétrie en flux***

Les cellules en suspension ( $5 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$ ) dans 150  $\mu$ l de PBS contenant du BSA et de l'azide (0,1%) sont incubées pendant une heure en présence de l'anticorps anti-récepteur 5B3G10 (dilution 1/500). Les cellules sont ensuite lavées et les anticorps anti-IgM de souris marqués au FITC (dilution 1/20-50) 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.

**D. *Etude de l'expression des antigènes de surface membranaire***

Les cellules en suspension ( $5 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$ ) dans 150  $\mu$ l de PBS contenant du BSA et de l'azide (0,1%) sont incubées pendant une heure en présence de l'anticorps (CD14, CD4, CD8 et CD71 ; dilution 1/100). Les cellules sont ensuite lavées et les anticorps anti-IgG de souris 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 l'anticorps par du liquide d'ascite non purifié de souris.

**E. *Le cycle cellulaire***

Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS, puis remises en suspension dans 100  $\mu$ l du PBS, les cellules sont refroidies sur de la glace fondante. On ajoute 2 ml d'éthanol à 70% froid en agitant vigoureusement, puis les cellules sont incubées 60 min à 4°C.

Après deux lavages dans du PBS, les cellules sont remises en suspension dans le même tampon contenant 20 µg/ml d'iodure de propidium en présence de ARNase (20 µg/ml). Après 1 h d'incubation à 37°C, les cellules sont analysées par cytométrie en flux avec le logiciel de Cellfit de Becton-Dickinson.

#### ***F. 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 et rouge. Le flux cellulaire est fixé à environ 300 cellules par seconde et 5000 cellules sont analysées pour chaque échantillon. Les données sont collectées avec le logiciel FAScan. Enfin les résultats sont analysés avec le logiciel PC-lysis.

### **VI. FIXATION DE LA LACTOTRANSFERRINE**

Les cellules, mises en culture selon les conditions précédemment décrites, sont lavées par du milieu de culture et mises à incuber avec des concentrations croissantes en lactotransferrine radio-iodée pendant une heure à 4°C dans du milieu de culture sans serum de veau foetal (SVF) en présence de transferrine sérique (0,4%). Afin d'estimer la fixation non spécifique, certaines incubations sont réalisées en présence de lactotransferrine non marquée 100 fois en excès molaire. A la fin d'incubation, les cellules sont sédimentées par centrifugation. Une aliquote du surnageant est prélevée afin de déterminer la quantité de lactotransferrine libre. Puis les cellules sont lavées trois fois par du PBS. Les cellules sont récupérées, la radioactivité attachée aux cellules est ensuite comptée.

### **VII. ETUDE DE L'INTERNALISATION**

#### ***A. Etude cinétique de l'internalisation***

Les cellules sont incubées pendant 1 h à 4°C avec du milieu de culture sans sérum de veau foetal contenant de la lactotransferrine humaine radio-iodée à une concentration saturante

(20  $\mu\text{g}/10^6$ ). Pendant cette première étape, la lactotransferrine se fixe sur ses récepteurs membranaires à une température qui inhibe tout mouvement ou métabolisme membranaire. Après une heure le milieu est aspiré et les cellules sont lavées trois fois par du PBS à 4°C.

Les cellules sont ensuite mises à incuber à 37°C dans du milieu de culture (sans serum de veau foetal). Cette seconde incubation, qui permet au métabolisme cellulaire, et membranaire en particulier, de s'exprimer, durera des temps variant selon les expériences de 1 à 90 min. Au temps d'arrêt de la réaction, les cellules sont placées dans la glace, le milieu est enlevé et conservé pour analyse et les cellules sont lavées trois fois par du PBS à 4°C.

Les cellules sont ensuite traitées pendant 15 min par du tampon pH 2,5 (NaCl 150 nM et glycocole 0,01 nM). Ce tampon acide a pour effet de détruire toute interaction entre la lactotransferrine et ses récepteurs membranaires. Recueilli par aspiration, ce milieu est ensuite analysé et rendra compte de la radioactivité membranaire en fin d'incubation à 37 °C. Les cellules sont ensuite lavées trois fois par du PBS à 4°C. La radioactivité encore liée aux cellules après traitement par l'acide sera mesurée et rendra compte de la radioactivité intracellulaire.

#### ***A. Etude de la dégradation de la lactotransferrine après internalisation***

Les cellules sont incubées successivement à 4°C puis à 37°C avec de la lactotransferrine marquée. Deux fractions sont recueillies. La fraction extracellulaire (le milieu d'incubation à 37°C correspondant aux différents temps d'incubation) est ensuite déposée sur la colonne de Séphadex G-25 ; 25 fractions de 1,5 ml sont recueillies et la radioactivité est mesurée. La fraction intracellulaire est séparée par l'électrophorèse SDS-PAGE et analysée par autoradiographie.

#### ***B. Effets des inhibiteurs sur l'internalisation et le devenir intercellulaire de la lactotransferrine***

Deux inhibiteurs différents ont été testés pour leur effet sur l'internalisation de la lactotransferrine par les cellules Jurkat.

-La colchicine, qui est un inhibiteur des microtubules et empêche les mouvements d'endocytose (phagocytose).

-La chloroquine et  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , qui sont connues pour inhiber l'acidification des vésicules acides.

Les cellules sont préalablement incubées à 4°C en présence et en absence de l'inhibiteur chloroquine (150 µM) et NH<sub>4</sub>Cl (15 mM). Après 1 h d'incubation à 4°C, les cellules sont remises à 37°C toujours en présence de l'inhibiteur. L'étude cinétique de l'internalisation de la lactotransferrine est réalisée.

## VIII. MICROSCOPIE CONFOCALE

Après incubation avec le ligand fluorescent, les cellules sont lavées avec du PBS et fixées à 4°C pendant 60 min dans du PBS contenant du 2% paraformaldéhyde (PAF). Après lavage avec du PBS, les cellules sont déposées sur une lame de microscope par cyto centrifugation. Avant de recouvrir les cellules d'une lamelle, une goutte de 1,4 diazabicyclo-[2-2-2]octane (DABCO) (Sigma) (50mg/ml PBS : glycérol 1 : 1) est ajoutée pour éviter le photoblanchiment. Les lames sont observées au microscope Nikon (OPTIPHOT) et l'image est traitée avec le système d'analyse d'images Bio-Rad MRC-600 (Richmond, USA) équipé d'un laser krypton/argon possédant trois longueurs d'onde de forte puissance à 488, 568 et 647 nm. Cet ensemble à excitation sélective est un outil de choix pour étudier deux fluorochromes en même temps (double marquage). Nous avons fait des coupes sériées (1 µm) de l'échantillon par déplacement de la lumière incidente du dessus vers le dessous de la cellule avec ce microscope.

## IX. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

### A. *Localisation intracellulaire de la lactotransferrine endocytée*

Elle a été réalisée sur les cellules Jurkat après endocytose de la lactotransferrine dans les conditions décrites précédemment. Après l'internalisation les cellules sont fixées avec une solution de PAF à 1% dans du tampon cacodylate et incluses dans de Lowicryl K4M. Des coupes ultrafines sont déposées sur des grilles de nickel, puis sont incubées pendant 10 min dans le tampon Tris/HCl (Tris 20 mM/HCl pH 7,4), NaCl 0,5 M contenant 5% d'ovalbumine et 1% de serum de chèvre décomplémenté. Finalement, les coupes sont incubées, pendant 2 h à 20°C, avec des immunoglobulines IgG de lapin anti-lactotransferrine à la concentration de 10 mg/ml. Elles sont rincées par le tampon Tris/HCl contenant de ovalbumine (0,5%) puis incubées avec un serum de chèvre anti-immunoglobulines de lapin conjugué à l'or (1 et 10 nm).



incubées avec un serum de chèvre anti-immunoglobulines de lapin conjugué à l'or (1 et 10 nm). Après 1 h d'incubation à température ambiante, les sections ultrafines sont lavées par du tampon Tris/HCl salin et rincées à l'eau distillée.

***B. Localisation de surface du récepteur de la lactotransferrine***

Elle a été réalisée en utilisant l'anticorps monoclonal DP5B3G10 sur des cellules Jurkat. Les cellules sont incubées avec l'anticorps monoclonal anti-récepteur de la lactotransferrine. Elles sont ensuite rincées par le tampon Tris/HCl contenant de l'ovalbumine (0,5%), incubées avec un serum de chèvre anti-immunoglobulines M de souris conjugué à l'or (1 et 10 nm), puis lavées avec du tampon carbonate 0,1 M, fixées pendant 2 h dans du tétraxide d'osmium (1%). Les cellules sont déshydratées dans l'acétone et incluses dans l'araldite. Les coupes ultrafines de 100 nm sont réalisées sur l'ultramicrotome Reichert ultra-cut E avec un couteau de diamant Diatome et placées sur des grilles en nickel. Elles sont alors colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb avant d'être examinées au microscope électronique Philips EM 420.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Aguas, A. P., Esaguy, N., Sunkel, C. E. & Silva, M. T.** (1991) Cross-reacting and sequence homology between the 65 kilodalton mycobacterial heat shock protein and human lactoferrin, transferrin and DR $\beta$  subsets of major histocompatibility complex class II molecules. *Infection and Immunity*, **50** : 1461-1470
- Aisen, P. & Liebman, A.** (1971) Lactoferrin and transferrin, a comparative study. *Biochim. Biophys. Acta*, **257** : 314-323
- Aisen, P. & Listowsky, I.** (1980) Iron transport and storage protein. *Ann. Res. Biochem.*, 357-393
- Alcantara, J., Padda, J. S. & 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
- Alderete, J. F., Peterson, K. M. & Baseman, J. B.** (1988) Affinities of *Trepanoma pallidum* for human lactoferrin and transferrin. *Genitourin. Med.*, **61** : 358-363
- Alexander, L. J., Levine, W. B., Teng, C. T. & Beattie, C. W.** (1992) Cloning and sequencing of the porcine lactoferrin cDNA. *Anim. Genet.*, **23** : 251-256
- Ambruso, D. R. & Johnston, R. B.** (1981) Lactoferrin enhances hydroxyl radical production by human neutrophils, neutrophil particulate fraction and an enzymatic generating system. *J. Clin. Invest.*, **67** : 352-360
- Amine, E. K. & Hegstead, D. M.** (1975) Effect of dietary carbohydrates and fats on inorganic iron absorption. *J. Agric. Food Chem.*, **23** : 204
- Amouric, M., Marvaldi, J., Pichon, J., Bellot, F. & Figarella, C.** (1984) Effect of lactoferrin on the growth of a human colon adenocarcinoma cell line : Comparison with transferrin. *In Vitro*, **20** : 543-548
- Anderson, B. F., Baker, H. M., Dodson, E. J., Norris, G. E., Rumball, S. V., Waters, J. M. & Baker, E. N.** (1987) Structure of human lactoferrin at 3.2 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84** : 1-5
- Anderson, B. F., Baker, H. M., Norris, G. E., Rice, D. M. & Baker, E. N.** (1989) Structure of human lactoferrin : crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **209** : 711-734
- Anderson, B. F., Baker, H. M., Norris, G. E., Rumball, S. V. & Baker, E. N.** (1990) Apotransferrin structure demonstrates ligand-induced conformational changes in transferrins. *Nature*, **334** : 784-787
- 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
- Ascencio, F., Ljungh, A. & Wastrom, T.** (1992a) Lactoferrin binding properties of *Vibrio cholerae*. *Microbios.*, **70** : 103-117
- Ascencio, F., Ljungh, A. & Wastrom, T.** (1992b) Characterization of lactoferrin binding by *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58** : 42-47
- Ashorn, R. G., Eskola, J., Tuohimaa, P. J. & Krohn, K. J.** (1986) Effect of the progesterone-inducible proteins human lactoferrin and chicken avidin on lymphocyte proliferation. *Hum. Reprod.*, **3** : 149-152
- Azari, P. & Baugh, R. F.** (1967) A simple and rapid procedure for preparation of a large quantity of pure ovotransferrin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **118** : 138-144
- Azuma, N., Nori, H., Kaminogawa, S. & Yamauchi, K.** (1989) Stimulatory effect of human lactoferrin on DNA synthesis in BALB/c 3T3 cells. *Agric. Biol. Chem.*, **53** : 31-35
- Baeuerle, P. A.** (1995) Enter a polypeptide messenger. *Nature*, **373** : 661-662
- Bagby, G. C., Rigas, V. D., Bennett, R. M., Vandenbark, A. A. & Garewal, H. S.** (1981) Interaction of lactoferrin, monocytes and lymphocytes-T subsets in the regulation of steady-state granulopoiesis *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, **68** : 56-65

- Bagby, G. C., McCall, E., Bergstrom, K. A. & Burger, D.** (1983a) A monokine regulates colony-stimulation activity production by vascular endothelial cells. *Blood*, **62** : 662-668
- Bagby, G. C., McCall, E. & Layman, D. L.** (1983b) Regulation of colony stimulating activity production. Interactions of fibroblasts, mononuclear phagocytes and lactoferrin. *J. Clin. Invest.*, **71**: 340-344
- Bagby, G. C., Dinarello, C. A., Wallace, P., Wagner, C., Hefeneider, S. & McCall, E.** (1986) Interleukin-1 stimulates granulocyte macrophage colony-stimulating activity release by vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, **78** : 1316-1323
- Baggiolini, M., De Duve, C., Masson, P. L. & Heremans, J. F.** (1970) Association of lactoferrin with specific granules in rabbit neutrophil leukocytes. *J. Exp. Med.*, **131** : 559-570
- Baker, E. N. & Lindley, P. F.** (1992) New perspectives on the structure and function of transferrins. *J. Inorg. Biochem.*, **47** : 147
- Baker, E. N., Rumball, S. V. & Anderson, B. F.** (1987) Transferrins : insights into structure and function from studies on lactoferrin. *Trends Biochem. Sci.*, **2** : 350-353
- Baker, E. N., Anderson, B. F., Baker, H. M., Haridas, M., Jameison, G. B., Norris, G. E., Rumball, S. V. & Smith, C. A.** (1991) Structure, function and flexibility of human lactoferrin. *Int. J. Biol. Macromol. Struct. Funct. Interactions.*, **13** : 122-130
- Baldwin, G. S.** (1993) Comparison of transferrin sequences from different species. *Comp. Biochem. Physiol.*, **106B** : 203-218
- Bali, P. K., Zak, O. & Aisen, P.** (1991) A new role for the transferrin receptor in the release of iron from transferrin. *Biochemistry*, **30** : 324-328
- Bannister, J. V., Bannister, W. H., Hill, H. A. O. & Thornalley, P. J.** (1982) Enhanced production of hydroxyl radicals by the xanthine-xanthine oxidase reaction in the presence of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta*, **715** : 116-121
- Bartal, L., Padeh, S. & Passwell, J. H.** (1987) Lactoferrin inhibits prostaglandin E2 secretion by breast milk macrophages. *Paediatr. Res.*, **21** : 54-57
- Baynes, R. D., Shih, Y. J., Hudson, B. G. & Finch, C. A.** (1988) Transferrin receptor in rat plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85** : 637-640
- Bellamy, W., Takasque, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K. & Tomita, M.** (1992) Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1121** : 130-136
- Bellamy, W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S. & Tomita, M.** (1993) Killing of *Candida albicans* by lactoferrin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Med. Microbiol. Immunol.*, **182** : 97-105
- Bennett, R. M. & Davis, J.** (1981) Lactoferrin binding to human peripheral blood cells : an interaction with a B-enriched population of lymphocytes and a subpopulation of adherent mononuclear cells. *J. Immunol.*, **127** : 1211-1216
- Bennett, R. M. & Kokocinski, T.** (1979) Lactoferrin turnover in man. *Clinical Science*, **57** : 456-460
- Bennett, R. M. & Mohia, C.** (1976) A solid phase radioimmunoassay for the measurement of lactoferrin in human plasma : variations with age, sex, and disease. *J. Lab. Clin. Med.*, **88** : 156-165
- Bennett, R. M., Quartey, A. C. & Holt, P. J. L.** (1973) Lactoferrin, an iron binding protein in synovial fluid. *Arthritis Rheum.*, **16** : 186-190
- Bennett, R. M., Davis, J., Cambell, S. & Portnoff, S.** (1983) Lactoferrin binds to cell membrane DNA. *J. Clin. Invest.*, **71** : 611-618

- Bezault, J. A., Bhimani, R., Wiprovnick, J. & Furmanski, P.** (1994) Human lactoferrin inhibits growth of solid tumor and development of experimental metastases in mice. *Cancer Res.*, **54** : 2310-2312
- Bi, B. Y., Leveugle, B., Liu, J. L., Collard, A., Coppe, P., Roche, A.-C., Nillesse, N., Spik, G. & Mazurier, J.** (1994) Immunolocalization of lactotransferrin receptor on human T lymphoblastic cell line Jurkat. *Eur. J. Cell Biol.*, **65** : 164-171
- Bi, B. Y., Spik, G. & Mazurier, J.** (1995) Effect of lactotransferrin on proliferation and differentiation of Jurkat cell. Soumis à publication dans *Immunology Lett.*
- Birgens, H. S.** (1985) Lactoferrin in plasma measured by an ELISA technique / evidence that plasma lactoferrin is an indicator of neutrophil turnover and bone marrow activity in acute leukemia. *Scand. J. Haematol.*, **34** : 326-331
- Birgens, H. S.** (1991) The interaction of lactoferrin with human monocytes. *Dam. Med. Bull.*, **38** : 244-252
- Birgens, H. S., & 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
- Birgens, H. S., Hansen, N. E., Karie, H., Ostergard, M. & Kristensen, L.** (1983) Receptor binding of lactoferrin by human monocytes. *Brit. J. Haematol.*, **54** : 383-391
- Birgens, H. S., Karle, H., Hansen, N. E. & Kristensen, L.** (1984) Lactoferrin receptors in normal and leukaemic human blood cells. *Scand. J. Haematol.*, **33** : 275-280
- Birgens, H. S., Kristensen, L. O., Borregard, N., Karle, H. & Hansen, H. E.** (1988) Lactoferrin mediated transfer of iron to intracellular ferritine in human monocytes. *Eur. J. Haematol.*, **41** : 52-57
- Biserte, G., Havez, R. & Cuvelier, R.** (1963) Les glycoprotéides des sécrétions bronchiques. *Exposés Annuels de Biochimie Médicale*, **24** : 85-120
- Blackberg, L. & Hernell, O.** (1980) Isolation of lactoferrin from human whey by a single chromatographic step. *FEBS Lett.*, **109** : 180-184
- Blanc, B. & Isliker, H.** (1961) Isolement et caractérisation de la protéine rouge sidérophile de lait maternel : la lactoferrine. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, **119** : C13-C14
- Blanton, K. J., Biswas, G. D., Tsai, J., Adams, J., Dyer, D. W., Davis, S. M., Koch, G. G., Sen, P. P. K. & Sparling, F.** (1990) Genetic evidence that *Neisseria gonorrhoeae* produces specific receptors for transferrin and lactoferrin. *J. Bacteriol.*, **172** : 5225-5235
- Bourdon, M. A. & Ruoslahti, M. A.** (1989) Tenascin mediates cell attachment through an RED-dependent receptor. *J. Cell. Biol.*, **108** : 1149-1155
- Bourne, Y., Nesa, M. P., Rougé, P., Mazurier, J., Legrand, D., Montreuil, J., Spik, G. & Cambillau, C.** (1992) Structure of a legume lectin complexed with the human lactotransferrin N2 fragment and with an isolated biantennary glycopeptide : role of the fucose moiety. *Structure*, **2** : 209-219
- Bourne, Y., Mazurier, J., Legrand, D., Rougé, P., Spik, G., Montreuil, J. & Cambillau, C.** (1994) 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
- Boxer, L. A., Haak, R. A., Yang, H. H., Wolach, J. B., Whitcomb, J. A., Butterick, C. J. & Baehner, R. I.** (1982) Membrane bound lactoferrin alters the surface of polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.*, **70** : 1049-1057
- Breton-Gorius, J. D., Mason, Y., Buriot, D., Vilde, J. L. & Giriscelli, C.** (1980) Lactoferrin deficiency as a consequence of a lack of specific granules in neutrophils from a patient with recurrent infections. *Ann. J. Pathol.*, **99** : 413-428

- Britigan, B. E., Serody, J. S., Hayek, M. B., Charniga, L. M. & 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
- Brock, J. H., Pickering, M. G., Mc Dowall, M. C. & Deacon, A. G.** (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
- Broekhuysse, R. N.** (1974). Tear lactoferrin : a bacteriostatic and complexing protein. *Invest. Ophthalm.*, **13** : 550-554
- Brown, J. P., Wright, P. W., Hart, C. E., Woodburg, R. G., Hellstrom, K. E. & Hellstrom, I. J.** (1980) Protein antigens of normal and malignant human cells identified by immuno-precipitation with monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.*, **255** : 4980-4983
- Brown, J. P., Hewick, R. D., Hellstrom, I. J., Hellstrom, K. E., Doolittle, R. F. & Dreyer, W. J.** (1982) Human melanoma-associated antigen 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
- Broxmeyer, H. E., Smithyman, A., Eger, R. R., Meyers & de Sousa, M.** (1978) Identification of lactoferrin as the granulocyte-derived inhibitor of colon-stimulating activity production. *J. Exp. Med.*, **148** : 1052-1067
- Broxmeyer, H. E., Gentile, P., Bognacki, J. & Ralph, P.** (1983) Lactoferrin, transferrin and acidic isoferritin / regulatory molecules with potential therapeutic value in leukemia. *Blood Cell*, **9** : 83-105
- Broxmeyer, H. E., Gentile, P., Cooper, S., Lu, L., Juliano, L., Piacibello, W., Meyers, P. A. & Cavanna, F.** (1984) Functional activities of isoferritins and lactoferrin *in vitro* and *in vivo*. *Blood Cell*, **10** : 397-426
- Bullen, J. J. & Armstrong, J. A.** (1979) The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leucocytes. *Immunology*, **36** : 781-791
- Bullen, J. J., Rogers, H. J. & Leigh, L.** (1972) Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants. *Br. Med. J.*, **1** : 69-75
- Buttler, T. W., Grossi, C., Canessa, A., Pistola, V. & Barton, J. C.** (1990) Immunoreactive lactoferrin in resting activated and neoplastic lymphocytes. *Leuk. Res.*, **14** : 441-447
- Byatt, J. C., Schmuke, J. J., Comens, P. G. Johnson, D. A. & Collier, R. J.** (1990) The effect of bovine lactoferrin on muscle growth *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173** : 548-553
- Byrd, T. F. & 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
- 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
- Campbell, T., Skilton, R. A., Coombes, R. C., Shousha, S., Graham, M. D. & Luqmani, Y. A.** (1992) Isolation of a lactoferrin cDNA clone and its expression in human breast cancer. *Br. J. Cancer*, **65** : 19-26
- Carpenter, G. & Cohen, S.** (1979) Epidermal growth factor. *Annu. Rev. Biochem.*, **48** : 193-216
- Charpin, C., Lachard, C., Pourrean-Schneider, N., Jacquemier, J., Lavant, M. N., Andonian, C., Martin, P.-M. & Toga, M.** (1984) Localisation of lactoferrin and nonspecific cross-reacting antigen in human breast carcinomas. *Cancer*, **55** : 2612-2617
- Chen, T. R.** (1977) *In situ* detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 strain. *Exp. Cell Res.* **104** : 255-262

- Chéron, A., Mazurier, J. & Fournet, B.** (1977) Fractionnement chromatographique et études sur la microhétérogénéité de la lactotransferrine de vache préparée par un procédé original. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **284** : 585-588
- Clechanover, A., Schwartz, A. L. & Dautry-Varsat, A.** (1983) Kinetics of internalisation and recycling of transferrin and the transferrin receptor in a human hepatoma cell line. *J. Biol. Chem.*, **258** : 9681-9689
- Coddeville, B., Strecker, G., Wieruszkeski, J. M., Wiegenthart, J. F. G., Van Halbeck, H., Peterkatalinic, J., Egge, H. & Spik, G.** (1992) Heterogeneity of bovine lactotransferrin glycans, characterization of  $\alpha$ -D-Galp(1 $\leftarrow$ 3)- $\beta$ -D-Gal- and  $\alpha$ -NeuAc(2 $\leftarrow$ 6)- $\beta$ -D-GalpNAc-(1 $\leftarrow$ 4)- $\beta$ -D-GAc-substituted N-linked glycans. *Carbohydr. Res.*, **236** : 145-164
- Cohen, M. S., Britigan, B. E., French, M. & Bean, K.** (1987) Preliminary observations on lactoferrin secretion in human vaginal mucus : variation during the menstrual cycle, evidence of hormonal regulation, and implication for infection with *Neisseria gonorrhoeae*. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **157** : 1122-1125
- Collawn, J. F., Stangel, M., Kühn, L. A., Esekoguw, V., Trowbridge, I. S. & Tainer, J. A.** (1990) Transferrin receptor interaction sequence YXRF implicates a tight turn structural recognition motif for endocytosis. *Cell*, **63** : 106-1072
- Collawn, J. F., Kühn, L. A., Sue Liu, L. F., Tainer, J. A. & 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
- Coremans, I. E. M., Hagen, E. C., Daha, M. R., van der Woude, F. J., van der Voort, E. A. M., van der Keur, C. K. & Breedveld, F. C.** (1992) Antilactoferrin antibodies in patients with rheumatoid arthritis are associated with vasculitis. **35** : 1466-1475
- Corman, R. M. & Poretz, R. D.** (1987) Resolution of multiple endosomal compartments associated with the internalization of epidermal growth factor and transferrin. *J. Cell. Physiol.*, **131** : 158
- Courtoy, P. J., Moguevsky, N., Retegui, L. A., Castracane, C. E. & Masson, P. L.** (1984a) Uptake of lactoferrin by the liver. II. Endocytosis by sinusoidal cells. *Lab. Invest.*, **50** : 329-334
- Courtoy, P. J., Quintart, J. & Limet, J. N.** (1984b) Endocytosis. Eds. Pastan, I. & Willingham, M. Plenum press. NewYork. pp 163-188
- Cox, T. M., Mazurier, J., Spik, G., Montreuil, J. & Peters, T. J.** (1979) Iron binding proteins and influx of iron across the duodenal brush border - Evidence for specific lactotransferrin receptors in the human intestine. *Biochem. Biophys. Acta*, **588** : 120-128
- Crouch, S. P. M., Slater, K. J. & Fletcher, J.** (1992) Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the Iron-binding protein lactoferrin. *Blood*, **80** : 235-240
- Cunningham, G. A., Headon, D. R. & Conneely, O. M.** (1992) Structure organization of the mouse lactoferrin gene. *Biophys. Res. Commun.*, **189** : 1725-1731
- Dalamastri, C., Valenti, P., Visca, P., Vittorioso, P. & Orsi, N.** (1988) Enhanced antimicrobial activity of lactoferrin by binding to the bacterial surface. *Microbiologica*, **11** : 225-230
- Dautry-Varsat, A.** (1986) Receptor mediated endocytosis : the intercellular journey of transferrin and its receptor. *Biochimie.*, **62** : 375-381
- Dautry-Varsat, A. & Lodish, H. F.** (1984) Les récepteurs cellulaires et l'endocytose. *Pour la Science*, **81** : 78-85
- Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A. & Lodish, H. F.** (1983) pH and recycling of transferrin during receptor mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80** : 2258-2262

- Davidson, L. A. & Lönnnerdal, B.** (1987) Persistence of human milk proteins in the breast fed infant. *Acta Paediatr. Scand.* **76** : 733-740
- Davidson, L. A. & Lönnnerdal, B.** (1988) Specific binding of lactoferrin to brush-border membrane : ontogeny and effect of glycan chain. *Amer. J. Physiol.*, **254** : G580-G585
- Davidson, L. A. & Lönnnerdal, B.** (1989) Fe-saturation and proteolysis of human lactoferrin : effect on brush-border receptor mediated uptake of Fe and Mn. *Amer. Physiol. Soc.*, **257** : G930-G934
- Day, C. L., Stowell, K. M., Baker, E. N. & 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
- De Sousa, M. & Brock, J. H.** (1989) Iron. In *Immunity Cancer and Inflammation*. Eds De Sousa, & M., Brock, J. H. Wiley J. & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore
- De Vet, B. J. C. M. & Ten Hoopen, C. H.** (1978) Lactoferrin in human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in relation to iron metabolism. *Acta Med. Scand.*, **203** : 197-203
- De Vet, B. J. C. M. & Van Gool, J.** (1974) Lactoferrin and iron absorption in the small intestine. *Acta Med. Scand.*, **196** : 393-402
- Debanne, M. T., Regoezi, E., Sweeney, G. D. & Krestynski, F.** (1985) Interaction of human lactoferrin with the Rat liver. *Am. J. Physiol.*, **248** : 463-469
- Derisbourg, P.** (1990) Etude des récepteurs entérocytaires de la lactotransferrine humaine : caractérisation des récepteurs sur les cellules entérocytaires humaines HT29 : étude du mécanisme d'endocytose de la lactotransferrine. Thèse d'Université, Lille I
- Derisbourg, P., Wieruszkeski, J. M., Montreuil, J. & Spik, G.** (1990) Primary structure of glycan isolated from human leucocyte lactotransferrin. Absence of fucose residues question the proposed mechanism of hyposideraemia. *Biochem. J.*, **269** : 821-825
- Drouet, L., Sollier, C., Cisse, M., Pignaud, G., Mazoyer, E., Fiat, A. M., Jollès, P. & Caen, J. P.** (1990) The antithrombotic effect of KRDS, a lactotransferrin peptide, compared with RGDS. *Nouv. Rev. Fr. Haematol.*, **32** : 59-62
- Duncan, R. L. & McArthur W. P.** (1981) Lactoferrin-mediated modulation mononuclear cell activities. *Cell Immunol.*, **63** : 308-320
- Durum, S. K., Higushi, C. & Ron, Y.** (1984) Accessory cells and T cell activation: the relationship between two components of macrophage accessory cell function. *Immunology*, **168** : 217-219
- Ellison, R. T. & Giehl, T. J.** (1991) Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin. Invest.*, **88** : 1080-1091
- Ellison, R. T., Giehl, T. J. & La Force, F. M.** (1988) Damage of the outer membrane of gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect. Immunology.*, **56** : 2774-2781
- Esaguy, N., Aguas, A. P., van Emden, J. D. A. & Silva M. T.** (1991) Mycobacteria and human autoimmune disease : direct evidence of cross-reactivity between human lactoferrin and the 65-kilodalton protein of tubercle and leprosy bacilli. *Infect. Immun.* **59** : 1117-1125
- Esaguy, N., Freire, O. J., van Emden, J. D. A. & Aguas, A. P.** (1993) Lactoferrin triggers *in vitro* proliferation of T cells of lewis rats submitted to mycobacteria-induced Adjuvant Arthritis. *Scand. J. Immunol.*, **38** : 147-152
- Estevenon, J. P. & Figarella, C.** (1983) A non competitive enzyme immunoassay of human lactoferrin in biological fluids. *Clin. Chim. Acta*, **129** : 311-318



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

**Fransson, G. B. & Lönnerdal, B.** (1980) Iron in human milk. *J. Pediatr.*, **96** : 380-384

**Fransson, G.-B., Thorén-Tolling, K. B., Hambræus, L. & Lönnerdal, B.** (1983) Absorption of lactoferrin-iron in sucking pigs. *Nutr. Res.*, **3** : 373-384

**Friedman, A. D., Krieder, B. L., Vantureui, D. & 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

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

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

**Gado, I., Erdei, J., Laszlo, V. G. J., Czirik, E., Kontrohr, T., Toth, I., Forsgren, A. & Naidu, A. S.** (1991) Correlation between human lactoferrin binding and colicin susceptibility in *Escherichia*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35** : 2538-2543

**Garré, C., Bianchi-Scarra, G., Sirito, Musso, M. & Ravazzalo, R.** (1992) Lactoferrin binding sites and nuclear localization in K562 cells. *J. Cell. Physiol.*, **153** : 477-482

**Garry, P. J., Owen, G. M., Hooper, E. M. & Gilbert, B. A.** (1981) Iron absorption from human milk and formula with and without iron supplementation. *Pediatr. Res.*, **15** : 822-828

**Gaub, M. P., Bellard, M., Scheuer, I., Chambon, P. & Sassone-Corsi, P.** (1990) Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the Fos-Jun complex. *Cell*, **63** : 1267-1276

**Geuze, H. J., Slot, J. W., Strous, G. J., Lodish, H. F. & Schwartz, A. L.** (1983) Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling : double-labeling immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis. *Cell*, **32** : 277-287

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

**Gnezditskaya, E. V., Bukhova, V. P., Zakharova, N. A. & Malkina, L. A.** (1987) Lactoferrin induced stimulation of Fc- $\mu$  and Fc- $\gamma$  receptor expression on the surface of human thymus lymphocytes *in vitro*. *Bull Exp. Biol. Med.*, **4** : 447-449

**Goavec, M., Mazurier, J., Montreuil, J. & 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. Sci. Paris*, **16** : 689-694

**Goodman, R. E. & Schanbacher, F. L.** (1991) Bovine lactoferrin mRNA : Sequence analysis and expression in the mammary gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **180** : 75-84

**Grove, M. L.** (1960) The isolation of a red protein from milk. *J. Amer. Chem. Soc.*, **82** : 3345-3350

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

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

**Haigler, H., Mckanna, J. A. & Cohen, S.** (1979) Rapid stimulation of pinocytosis in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factor. *J. Cell Biol.*, **83** : 82-90

- Hangoc, G., Falkenburg, J. H. & Broxmeyer, H. E.** (1991) Influence of T-lymphocytes and lactoferrin on the survival promoting effects of IL-1 and IL-6 on human bone marrow granulocytes macrophages and erythroid progenitor cells. *Exp. Hematol.*, **19** : 673-703
- Hansen, N. E., Malmquist, J. & Thorell, J.** (1975) Plasma myeloperoxidase and lactoferrin measured by radioimmunoassay. *Acta Med. Scand.*, **198** : 437-443
- Hansen, S. H., Sandvig, K. & Van Deurs, B.** (1992) Internalization efficiency of the transferrin receptor. *Exp. Cell. Res.*, **199** : 19-28
- Hashizume, S., Kuroda, K. & Murakami, H.** (1983). Identification of lactoferrin as an essential growth factor for human lymphocytic cell lines in serum-free medium. *Biochim. Biophys. Acta*, **763** : 377-382
- Hashizume, S., Kuroda, K. & Murakami, H.** (1987) Cell culture assay of biological activity of lactoferrin and transferrin. *Methods in Enzymology*, **147** : 302-315
- Hayakawa, T., Kondo, T., Murase, T., Harad, H., Ochi, K. & Tanaka, J.** (1993) Secretory component and lactoferrin in pure pancreatic juice in chronic pancreatitis. *Digestive Diseases and Sciences*, **38** : 7-11
- He, J. L. & Furmanski, P.** (1995) Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature*, **373** : 721-724
- Hekman, A. M. & Rümke, P.** (1968) The antigens of human seminal plasma with special reference to lactoferrin as a spermatozoa-coating antigen. *Fert. Steril.*, **20** : 312-323
- Herz, J., Goldstein, J. L., Strickland, D. K., Ho, Y. K. & Brown, M. S.** (1991) 39 kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/ $\alpha_2$ -macroglobulin receptor. *J. Biol. Chem.*, **266** : 21232
- Herz, J., Kowal, R. C., Ho, Y. K., Brown, M. S. & Goldstein, J. L.** (1990) LRP mediates endocytosis of monoclonal antibodies in cultured cells and rabbit liver. *J. Biol. Chem.*, **265** : 21355-21362
- Herzen P. A.** (1985) Quantitative immunoenzyme determination of lactoferrin and Alpha lactalbumin in the blood serum cancer patients. *Eksp. Onkol.*, **7** : 56-60
- Heyman, M., Ducroc, R., Desjeux, J. -F. & Morgat, J. L.** (1982) Horseradish peroxidase transport across adult rabbit jejunum *in vitro*. *Am. J. Physiol.*, **242** : G558-G564
- Heyman, M., Dumontier, A. M. & Desjeux, J. -F.** (1986) The intestinal barrier to intact peroxidase in experimental secretory diarrhea. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **5** : 463-466
- Heyman, M., Grasset, E., Ducroc, R. & Desjeux, J. -F** (1988) Antigen absorption by the jejunal epithelium of children with cow's milk allergy. *Pediatr. Res.*, **24** : 197-202
- Heyman, M., Andriantsoa, M., Crain-Denoyelle, A.-M. & Desjeux, J. -F.** (1990) Effect of oral and parenteral sensitization to cow's milk on mucosal permeability in guinea pigs. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **92** : 242-246
- Hiroshi, T., Shuichi, F., Nobuo, T., Fumiaki, T. & Haruo, O.** (1991) Iron-binding proteins in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland : A immunohistochemical study. *Tokoku J. Exp. Med.*, **163** : 1-16
- Horwitz, D. A., Barke, A. C., Abo, W. & Martin, A. W.** (1982) Characterization of an invertebrate transferrin from the crab *Cancer magister* (arthropoda). *J. Comp. Physiol.*, **148** : 101-109
- Horwitz, D. A., Bakke, A. C., Abo W. & Nishiya, K.** (1984) Monocyte and NK cell cytotoxic activity in human adherent cell preparations: discrimination effects of interferon and lactoferrins. *J. Immunol.*, **132** : 2370-2374
- Hu, W. L., Mazurier, J., Sawatzki, G., Montreuil, J. & Spik, G.** (1988) Lactotransferrin receptor of mouse small-intestinal brush border. *Biochem. J.*, **249** : 435-441

- Hu, W. L., Mazurier, J., Montreuil, J. & Spik, G. (1990) Isolation and partial characterization of a lactotransferrin receptor from mouse intestinal brush border. *Biochemistry*, **29** : 535-541
- Huettinger, M., Retzek, H., Eder, M. & Modenberg, H. (1988) Characterization of chylomicron remnant uptake into the rat liver. *Clin. Biochem.*, **21** : 87-92
- Huettinger, M., Retzek, H., Hermann, M. & Goldenberg, H. (1992) Lactoferrin specifically inhibits endocytosis of chylomicron remnants but not  $\alpha$ -macroglobulin. *J. Biol. Chem.*, **267** : 18551-18557
- Hurley, W. L., Hegarty, H. M. & Metzler, J. T. (1994) *In vitro* inhibition of mammary cell growth by lactoferrin : A comparative study. *Life Sc.*, **55** : 1955-1965
- Husson, M. O., Legrand, D., Spik, G. & Leclerc, H. (1993) Iron acquisition by *Helicobacter pylori* : Importance of human lactoferrin. *Infect. Immun.*, **61** : 2694-2697
- Imber, M. J. & Pizzo, S. V. (1983) Clearance and binding of native and defucosylated lactoferrin. *Biochem. J.*, **212** : 249-257
- Ismail, M. & Brock, J. H. (1993) Binding of lactoferrin and transferrin to the human promonocytic cell line U937 : Effect on iron uptake and release. *J. Biol. Chem.*, **268** : 21618 -21625
- Isobe, K., Sakurai, T. & 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
- Iyer, S. & Lönnerdal, B. (1993) Lactoferrin, lactoferrin receptor and iron metabolisms. *Eur. J. Clin. Nutri.* **47** : 232-241
- Jönhansson, B. (1960) Isolation of an iron containing red protein from human milk. *Acta, Chem. Scand.*, **124** : 166-175
- Jing, S., Spencer, T. K., Hospkins, C. & Trowbridge, I. S. (1990) Role of human transferrin receptor cytoplasmic domain in endocytosis : localization of a specific signal sequence for internalization. *J. Cell Biol.*, **110** : 282-294
- Jobby, A. & Kiraly, K. (1966) Chemical characterization of fluorescein isothiocyanate-protein conjugates. *Biochim. Biophys. Acta*, **124** : 166-175
- Johnston, B. J., Rinkels, P., Chung, J., Sather, J., Benz, E. J. & Berliner, N. (1992) Lactoferrin gene promoter: Structural integrity and non expression in HL-60 cells. *Blood*, **79** : 2998-3006
- Kadner, R. J., Bassford, P. J. & Pugsley, A. P. (1979) Colicin receptors and the mechanisms of colicin uptake. *Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Urogen. Reihe. A.*, **244** : 90-104
- Kalfas, S., Andersson, M., Edwardsson, S., Forsgren, A. & Naidu, A. S. (1991) Human lactoferrin binding to *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella melaninogenica*. *Oral. Microbiol. Immunol.*, **6** : 350-355
- Kälher, S., Christophers, E. & Schröder, J. M. (1988) Plasma lactoferrin reflects neutrophil activation in *psoriasis*. *Brit. J. Dermatol.*, **119** : 289-293
- Kawakami, H., & Lönnerdal, B. (1991) Isolation and function of a receptor for human lactoferrin in human fetal intestinal brush-border membranes. *Am. J. Physiol.*, **261** : 841-846
- Kawamata, T., Tooyama, I., Yamada, T., Walker, D. G. & Mc Geer, P. L. (1993) Lactotransferrin immunocytochemistry in Alzheimer and normal human brain. *Am. J. Pathol.*, **142** : 1574-1585
- Kenneth, M. P. & Alderete, J. F. (1984) Iron uptake and increase intracellular enzyme activity follow host lactoferrin binding by *Trichomonas vaginalis* receptors. *J. Exp. Med.*, **160** : 398-410

- Kijlstra, A. & Jeurissen, H. M.** (1981) The effect of an anti-complementary factor on human tears. *Am. J. Ophthalmol.*, **92** : 24-28
- Kijlstra, A. & Jeurissen, H. M.** (1982) Modulation of classical C3 convertase of complement by tear lactoferrin. *Immunology*, **47** : 263-270
- Kishore, A. R., Erdei, J., Naidu, S. S., Falsen, E., Forsgren, A. & Naidu, A. S.** (1991) Specific binding of lactoferrin to *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **83** : 115-120
- Klebanoff, S. J. & Waltersdorff, A. M.** (1990) Prooxidant activity of transferrin and lactoferrin. *J. Exp. Med.*, **172** : 1293-1303
- Kolsto Otnaess, A. B., Meberg, A. & Sande, H. A.** (1983) Plasma lactoferrin measured by an enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). *Scand. J. Haematol.*, **31** : 253-240
- Konisky, J.** (1982) Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Ann. Rev. Microbiol.*, **36** : 125-144
- Kulics, J. & Kijlstra, A.** (1987) The effect of lactoferrin on complement mediated modulation of immune complex size. *Immunol. Lett.*, **14** : 349-353
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** : 680-685
- Leclercq, Y.** (1987) Interactions transferrines-macrophage : rôle des glycanes dans la reconnaissance par les récepteurs membranaires du macrophage péritonéal de Souris. Thèse d'Université, Lille I
- Lee, B. C. & Schryvers, A. B.** (1988) Specificity of lactoferrin and transferrin receptors in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.*, **2** : 827-829
- Lee, B. P., Miller, J. M., Yang, C. Y., Ramdas, L., Yang, M., Morrisett, J. D. & Mims, M. P.** (1991) Amino acid sequence of rabbit apolipoprotein E. *Eur. J. Lipid. Res.*, **32** : 165-171
- Leffel, M. S. & Spitznagel, J. K.** (1975) Fate of human lactoferrin and myeloperoxidase in phagocytosing human neutrophils : effects of immunoglobins G subclass and immune complexes coated on latex beads. *Infect. Immun.*, **12** : 813-820
- Legrand, D., Mazurier, J., Metz-Boutique, M. H., Jollès, P., Montreuil, J. & Spik, G.** (1984) Characterization and localization of an iron binding 18 kDa glycopeptide isolated from the N-terminal half of human lactotransferrin. *Biochim. Biophys. Acta*, **787** : 90-96
- Legrand, D., Aubert, J. P., Loucheux-Lefebvre, M. H., Montreuil, J. & Spik, G.** (1986) Evidence for interaction between the 30 kDa N-t and 50 kDa C-t tryptic fragment of human lactotransferrin. *Biochem. J.*, **238** : 839-844
- Legrand, D., Mazurier, J., Montreuil, J. & Spik, G.** (1988) Structure and spatial conformation of the iron-binding sites of transferrins. *Biochim.*, **70** : 1185-1195
- Legrand, D., Mazurier, J., Maes, P., Rochard, E., Montreuil, J. & Spik, G.** (1991) Inhibition of the specific binding of human lactotransferrin to human peripheral blood PHA stimulated lymphocytes by fluorescein labelling and location of the binding site. *Biochem. J.*, **276** : 733-738
- Legrand, D., Mazurier, J., Ellass, A., Rochard, E., Vergoten, G., Maes, P., Montreuil, J. & Spik, G.** (1992) Molecular interaction between human lactotransferrin and the phytohemagglutinin activated human lymphocyte lactotransferrin receptor lie in the two loop-containing region of the N-terminal domain I of human lactotransferrin. *Biochemistry*, **31** : 9243-9251
- Lestas, A.** (1976) The effect of pH on human transferrin : Selective labelling of the two iron binding sites. *Brit. J. Haematol.*, **32** : 341-350

**Leveugle, B.** (1992) Interaction de la lactotransferrine avec les cellules du sang humain. Etude des récepteurs lymphocytaire et plaquettaire. Thèse d'Université, Lille I

**Leveugle, B., Mazurier, J., Legrand, D., Mazurier, C., Montreuil, J. & Spik, G.** (1993) Binding of lactotransferrin to platelet-receptor induces inhibition of platelet aggregation. *Eur. J. Biochem.*, **213** : 1205-1211

**Leveugle, B., Spik, G., Perl, D. P., Bouras, C., Fillit, H. M. & Hof, P. R.** (1994) The iron-binding protein lactotransferrin is present in pathologic lesions in a variety of neurodegenerative disorders : a comparative immunohistochemical analysis. *Brain Res.*, **650** : 20-31

**Lima, M. F. & Kierszenbaum, F.** (1985) Lactoferrin effects on phagocytic cell function. I. Increased uptake and killing of an intracellulaire parasite by murine macrophages and human monocytes. *J. Immunol.*, **134** : 4176-4183

**Line, W. F. & Villata, F.** (1990) *Trypanosoma cruzi* receptors for human transferrin and their role. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **38** : 245-252

**Liu, Y. & Teng, C.T.** (1991) Characterization of estrogen-responsive mouse lactoferrin promoter. *J. Biol. Chem.*, **266** : 21880-21885

**Liu, Y. & 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** : 355-363

**Liu, Y., Yang, N. & Teng, C. T.** (1993) COUP-Tf as a competitive repressor for estrogen receptor mediated activation of the mouse lactoferrin gene. *Mol. Cell. Biol.*, **13** : 1836-1846

**Lomax, K. J., Gallin, J. I., Rotrosen, D., Raphael, G. D., Kaliner, M. A., Benz, E. J. Boxer, L.A. & Malech, H. L.** (1989) Selective defect in myeloid cell lactoferrin gene expression in neutrophil specific granule deficiency. *Int. J. Clin. Invest.*, **83** : 514-519

**Lønnerdal, B. & Forsum, E.** (1985) Casein content of human milk. *Am. J. Clin. Nutr.*, **41** : 113-120

**Lønnerdal, B., Keen, C. L. & Hurley, L. S.** (1981) Iron, Copper, Zinc and Manganese in milk. *Annu. Res. Nutr.*, **11** : 149-174

**Louie, G. V.** (1993) Porphobilinogen deaminase and its structural similarity to the bidomain binding proteins. *Cur. Opin. in Structural Biology*, **3** : 401-408

**Lu, L., Shen, R. N., Zhou, S. S., Srivastava, C., Hanington, M., Miyazawa, K., Wu, B., Lin, Z. H., Ruscetti, S. & Broxmeyer, H. E.** (1991) Synergistic effect of human lactoferrin and recombinant murine interferon- $\gamma$  on disease progression in mice infected with polycythemia-inducing strain of the Friend virus complex. *Inter. J. Hematol.*, **54** : 117-124

**Luqmani, Y. A., Campbell, T. A., Bennett, C., Coombes, R. C. & Paterson, I. M.** (1992) Expression of lactoferrin in human stomach. *Int. J. Cancer.*, **49** : 684-687

**Lydon, J. P., O'Malley, B. R., Saucedo, O., Lee, T., Headon, D. R. & Conneely, O. M.** (1992) Nucleotide and primary amino acid sequence of porcine lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1132** : 97-99

**Maacks, S., Yuan, H. Z. & Wood, W. G.** (1989) Development and evaluation of luminescence based sandwich assay for plasma lactoferrin as a marker for sepsis and bacterial infections in paediatric medicine. *J. Biolumin. Chemilumin.*, **3** : 2211-2216

**Machnichi, M., Zimechi, M. & Zagulski, T.** (1993) Lactoferrin regulates the release of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 *in vivo*. *Int. J. Exp. Path.*, **74** : 433-439

**Maneva, A. I., Sirakov, L. M. & Manev, V. V.** (1983) Lactoferrin binding to neutrophilic polymorphonuclear leucocytes. *Int. J. Biochem.*, **15** : 981-984

- Maneva, A. I., Taleva, B. M., Manev, V. V. & Sirakov, L. M.** (1994) Bovine lactoferrin binds to plasma membrane receptors on human polymorphonuclear leucocytes. *Med. Sci. Res.*, **22** : 863-866
- Mann, D. M., Romm, E. & Migliorini, M.** (1994) Delineation of the glycosaminoglycan-binding site in the human inflammatory response protein lactoferrin. *J. Biol. Chem.*, **269** : 23661-23667
- Maratos-Flier, E., Yang Kao, C.-Y., Verdin, E. M. & King, G. L.** (1987) Receptor-mediated vectorial transcytosis of epidermal growth factor by Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.*, **105** : 1559-1601
- Marcon-Genty, D., Tome, D., Kheroua, O., Dumontier, A.-M., Heyman M. & Desjeux, J. F.** (1989) Transport of  $\beta$ -lactoglobulin across rabbit ileum *in vitro*. *Am. J. Physiol.*, **256** : G943-G948
- Markowetz, B., Van Snick, J. L. & Webb, J.** (1983) Binding and ingestion of human lactoferrin by Mouse alveolar macrophages. *Thorax*, **34** : 209-212
- Masson, P. L.** (1970) La lactoferrine, protéine des sécrétions externes et des leucocytes neutrophiles. *In* : Collection "Médico-Monographies d'agrégés"(ED Arscia), Bruxelles. pp 93-165
- Masson, P. L. & Heremans, J. F.** (1966) Studies on lactoferrin, the iron-binding protein of secretion. *In* " Protids of Biological Fluids", Ed. Peeters Amsterdam, Elsevier. pp 115-142
- Masson, P. L., Heremans, J. F. & Dive, C. H.** (1966) An iron binding protein common to many external secretions. *Clin. Chim. Acta*, **14** : 735-739
- Masson, P. L., Heremans, J. F. & Schonne, E.** (1969) Lactoferrin an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J. Exp. Med.*, **130** : 643-658
- Matsumoto, A., Yoshima, H., Takasaki, S. & Kobata, A.** (1982) Structural study of the sugar chains of human lactoferrin : finding of four novel complex type asparagine-linked sugar chains. *J. Biochem.*, **91** : 143-155
- Mazoyer, E., Levy-Toledano, S., Rendu, F., Hermant, L., Lu, H., Fiat, A., Jollès, P. & Caen, J. P.** (1990) KRDS a new peptide derived from lactotransferrin inhibits platelet aggregation and release reaction. *Eur. J. Biochem.*, **194** : 43-49
- Mazurier, J. & Spik, G.** (1980) Comparative study of the iron-binding properties of human transferrins. Complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactotransferrin. *Biochim. Biophys. Acta*, **629** : 399-408
- Mazurier, J., Léger, D., Torders, V., Montreuil, J. & Spik, G.** (1981) Comparative studies of the iron binding properties of transferrins. Differences in the involvement of histidine residues as revealed by carbethoxylation. *Eur. J. Biochem.*, **119** : 537-543
- Mazurier, J., Lhoste, J. M., Montreuil, J. & Spik, G.** (1983a) Comparative study of the iron binding properties of human transferrins. *Biochim. Biophys. Acta*, **745** : 44-49
- Mazurier, J., Metz-Boutigue, M. H., Jollès, J., Spik, G., Montreuil, J. & Jollès, P.** (1983b) Human lactotransferrin : molecular, functional and evolutionary comparisons with human serum transferrin and hen ovotransferrin. *Experientia*, **39** : 44-49
- Mazurier, J., Montreuil, J. & Spik, G.** (1985) Visualization of lactotransferrin brush-border receptors by ligand-blotting. *Biochim. Biophys. Acta*, **821** : 453-460
- Mazurier, J., Legrand, D., Hu, W. L., Montreuil, J. & Spik, G.** (1989) Expression of human lactotransferrin receptors in phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Eur. J. Biochem.*, **179** : 481-487
- Mazurier, J., Daucher, M., Vergoten, G., Montreuil, J. & Spik, G.** (1991) Modélisation moléculaire des glycanes : structure tridimensionnelle et interaction avec la fraction protéique. L'exemple de la sérotransferrine de lapin. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **313** : 7-14

- Mc Abee, D. D. & Esbensen, K.** (1991) Binding and endocytosis of apo- and holo-lactoferrin by isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **266** : 23624-23631
- Mc Combs, J. L., Teng, C. T., Pentecost, B. T., Magnuson, V. L., Moore, C. M. & Mc Gill, J. R.** (1988) Chromosome localization of human lactotransferrin gene by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell. Genet.*, **47** : 16-17
- McCormick, J. A., Markey, G. M. & Morris, T. C. M.** (1991a) Lactoferrin inducible monocyte cytotoxicity for K562 cells and decay of natural killer lymphocyte cytotoxicity. *Clin. Exp. Immunol.*, **83** : 154-156
- McCormick, J. A., Markey, G. M., Morris, T. C. M., Auid, P. W. & Alexander, H. D.** (1991b) Lactoferrin inducible monocyte cytotoxicity defective in esterase deficient monocytes. *Brit. J. Haematol.*, **77** : 287-290
- McKenna, W. R., Micklsen, P. A., Sparling, P. F. & Dyer, D. W.** (1988) Iron uptake from lactoferrin and transferrin by *Neisseria, gonorrhoeae*. *Infect. Immun.*, **56** : 785-791
- Mead, P. E. & Tweedie, J. W.** (1990) cDNA and protein sequence of bovine lactoferrin. *Nucl. Acid. Res.*, **18** : 7167
- Mellman, I., Fuchs, R. & Helenius, A.** (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Res. Biochem.*, **55** : 663-700
- Menozzi, F. D., Gantiez, C. & Loche, C.** (1991) Identification and purification of transferrin and lactoferrin-binding proteins of *Bordetella pertussis* and *Branchiseptia*. *Infect. Immun.*, **59** : 3982-3988
- Metz-Boutigue, M. H., Jollès, J., Jollès, P., Mazurier, J., Spik, G. & Montreuil, J.** (1980) Amino acid sequence, location and phylogenetic aspects of the glycopeptides of human lactotransferrin. *Biochim. Biophys. Acta*, **622** : 308-314
- Metz-Boutigue, M. H., Jollès, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J. & Jollès, P.** (1984) Human lactotransferrin : amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur. J. Biochem.*, **145** : 659-676
- Mikogami, T.** (1993) Rôle de la lactotransferrine et de son récepteur dans l'absorption intestinale du fer . Thèse d' Université. Lille I
- Mikogami, T., Heyman, M., Spik, G. & Desjeux, J. F.** (1994) Apical- to - basolateral transepithelial transport of human lactoferrin in the intestinal cell line Ht-29cl. 19A *Amer. J. Physiol.*, (Gastrointest. Liver Physiol.) **303** : G308-G315
- Mitra, A. & Zhang, Z.** (1994) Expression of a human lactoferrin cDNA in Tobacco cells produces antibacterial proteins. *Plant Physiological*, **106** : 977-981
- Miyazawa, K., Mantel, C., Lu, L., Morrison, D. C. & Broxmeyer, H. E.** (1991) Lactoferrin-lipopolysaccharide interactions. Effect on lactoferrin binding to monocyte/macrophage differentiated HL-60 cells. *J. Immunol.*, **146** : 723-729
- Moguilevsky, N.** (1987) La lactoferrine : Interaction avec le système réticuloendothélial en relation avec le métabolisme du fer. Thèse d'Université. Lille I
- Moguilevsky, N., Courtoy, P. J. & Masson, P. L.** (1985a) Study of lactoferrin binding sites at the surface of blood monocytes. *In* : " Proteins of Iron Storage and Transport". Eds Spik G., Montreuil J., Crichton R. R., Mazurier J. Elsevier. pp 199-202
- Moguilevsky, N., Retegui, L. A. & Masson, P. L.** (1985b) Comparison of human lactoferrins from milk and neutrophilic leucocytes. *Biochem. J.*, **229** : 353-359
- Molloy, A. L. & Winterbourn, C. C.** (1990) Release of iron from phagocytosed *Escherichia coli* and uptake by neutrophil lactoferrin. *Blood*, **75** : 984-989

**Monnard, C. & Vernet, M.** (1988) Détermination de la lactoferrine plasmatique par une méthode immunoenzymatique "double sandwich" en phase hétérogène. *Path. Biol.*, **36** : 941-944

**Montreuil, J.** (1971) Motérisation des laits était actuel de la question. *Ann. Nutr. Alim.*, **25** : A1-A37

**Montreuil, J.** (1980) Primary structure of glycoprotein glycans. Basis for the molecular biology of glycoproteins. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **37** : 157-233

**Montreuil, J.** (1983) Conformation of the glycoprotein glycans of the N-acetylglucosaminic type. *Biochem. Soc. Trans.*, **11** : 134-136

**Montreuil, J.** (1984) Spatial structure of glycans chains of glycoproteins in relation to metabolism and function. Survey of decade of research. *Pure Appl. Chem.*, **56** : 859-877

**Montreuil, J. & Mullet, S.** (1960) Isolement d'une lactosidérophiline du lait de Femme. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **250** : 1736-1737

**Montreuil, J. & Spik, G.** (1975) In "Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine". Ed R. R. Crichton. Elsevier North Holland, Amsterdam. pp 25-38

**Montreuil, J., Tonnelat, J. & Mullet, S.** (1960) Préparation et propriétés de la lactotransferrine (lactosidérophiline) du lait de Femme. *Biochim. Biophys. Acta*, **45** : 413-421

**Montreuil, J., Fournet, B., Spik, G. & Strecker, G.** (1978) Etude théorique de la conformation spatiale des glycanes de la sérotransferrine humaine. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **287D** : 837-840

**Montreuil, J., Mazurier, J., Legrand, D. & Spik, G.** (1985) Human lactoferrin : structure and function. In "Proteins of Iron storage and transport" Eds Spik, G., Montreuil, J., Crichton, R. R. Mazurier, J., Elsevier Science Publishers, Amsterdam. pp 25-38

**Morgan, O. S., Bankay, J. & Quash, G. A.** (1975) The effect of lactoferrin, an iron binding protein, on complement activity. *West. Indian. Med.*, **24** : 46-54

**Moyer, M. P.** (1979) The association of DNA and RNA with membranes. *Int. Rev. Cyt.*, **61** : 1-61

**Nagasawa, T., Kiyosawa, I. & Ogasa, K.** (1972) Amounts of lactoferrin in human colostrum and milk. *J. Dairy Sci.*, **55** : 1651-1659

**Naidu, A. S., Miedzobrodzki, J., Andersson, M., Nilsson, L. E., Forsgren, A. & Watts, J.L.** (1990) Bovine lactoferrin binding to six species of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bovine intrammary infections. *J. Clin. Microbiol.*, **28** : 21313-2131

**Naidu, S. S., Erdei, J., Czirok, E., Kalfas, S., Gado, I., Thoren, A., Forsgren, A. & Naidu, A. S.** (1991) Specific binding of lactoferrin to *Escherichia coli* isolated from human intestinal infections. *APMIS.*, **99** : 1142-1150

**Naidu, A. S., Andersson, M. & Forsgren, A.** (1992) Identification of a human lactoferrin-binding protein in *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, **36** : 177-183

**Newbold, R. R., Teng, C. T., Beckman, W. C., Jefferson, W. N., Hanson, R. B., Miller, J. V. & Mc Lachlan, J. A.** (1992) Fluctuations of lactoferrin protein and message ribonucleic acid in the reproductive tract of the mouse during estrous cycle. *Biology of Reproduction*, **47** : 903-915

**Nichols, B. L., Mac Kee, K. S. & Huebers, H. A.** (1990) Iron is not required in the lactoferrin stimulation of thymidine incorporation into the DNA of rat crypt enterocytes. *Pediatr. Res.*, **27** : 525-528

**Nichols, B. L., Mac Kee, K. S., Henry, J. F. & Nichols, V. N.** (1989) Human lactoferrin supplementation of infant formulas increases thymidine into DNA rat crypt cells. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **8** : 102-109

**Nichols, B. L., Mac Kee, K. S., Henry, J. F. & Putman, M.** (1987) Human lactoferrin stimulates thymidine incorporation into DNA of rat crypt cells. *Pediatr. Res.*, **21** : 563-567



- Nikaido, H.** (1989) Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33** : 1831-1836
- Nillesse, N.** (1994) Le récepteur de la lactotransferrine humaine. Thèse d'Université. Lille I
- Nishiya, K. & Horwitz, D. A.** (1982) Contrasting effects of lactoferrin on human lymphocytes and monocytes natural killer activity and antibody-dependent cell mediated cytotoxicity. *J. Immunol.*, **129** : 2519-2523
- Norris, G. E., Baker, H. M. & Baker, E. N.** (1989) Preliminary cristallographic studies on human apolactoferrin in its native and defucosylated forms. *J. Mol. Biol.*, **209** : 329-351
- Olofson, T., Olsson, I., Verge, P. & Elgefors, B.** (1977) Serum myeloperoxidase and lactoferrin in neutropenia. *Scand. J. Haem.*, **18** : 73-80
- Oria, R., Alvarez-Hernandez, X., Liceaga, J. & Brock, J. H.** (1988) Uptake and handling of iron from transferrin, lactoferrin and immune complexes by a macrophage cell line. *Biochem. J.*, **252** : 221-225
- Oseas, R., Yang, H. H., Baehner, R. L. & Boxer, L. A.** (1981) Lactoferrin : a promoter of polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. *Blood*, **57** : 939-945
- Parker, R. I., Mckeown, L. P., Gallin, J. I. & Gralmick, H. R.** (1992) Absence of the largest platelet-von Willebrand multimers in a patient with lactoferrin deficiency and a bleeding tendency. *Thrombosis and Haemostasis Suttgard.*, **67** : 320-324
- Peen, E., Almer, S., Bodemar, G., Rydén, B.-O., Sjölin, C., Tejle, K. & Skogh, T. T.** (1993) Anti-lactoferrin antibodies and other types of ANCA in ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis and Crohn's disease. *Gut*, **34** : 56-62
- Pentecost, B. T. & Teng, C. T.** (1987) Lactotransferrin is the major estrogen inducible protein of mouse uterine secretions. *J. Biol. Chem.*, **262** : 10134-10139
- Peter, T., Apt, L. & Ross, J. F.** (1971) Effect of phosphates upon iron absorption studied in normal human subjects and in an experimental model using dialysis. *Gastroenterology*, **61** : 315
- Peyrat, J. P. Hondermarck, H., Louchez, M. M. & Boilly, B.** (1991) Demonstration of basic fibroblast growth factor high and low affinity binding sites in human breast cancer cell lines, *Cancer Comm.* **3** : 323-329
- Pierce, A., Colavizza, D., Benaissa, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J. & Spik, G.** (1991) Molecular cloning and sequences analysis of bovine lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.*, **196** : 177-184
- Pistola, V. & Barton, J. C.** (1990) Immunoreactive lactoferrin in resting activated and neoplastic lymphocytes. *Leukemia Res.*, **14** : 441-447
- Platenburg, G. J., Kootwijk, E. P., de Boer, A., Kooiman, P. M., Woloshuk, S. L., Nuijens, J. H., Krimpenfort, P. J. A., Pieper, F. K. H & Strijker, R.** (1994) Expression of human lactoferrin in milk of transgenic mice. *Transgenic Res.*, **3** : 99-108
- Powell, M. J. & Ogden, J. E.** (1990) Nucleotide sequence of human lactoferrin cDNA. *Nucleic Acides Res.*, **18** : 4013
- Price, W. E. & Ashwell, G.** (1971) The binding of desialylated glycoproteins by plasma membranes of rat liver. *J. Biol. Chem.*, **246** : 4825-4833
- Prieels, J. P., Pizzo, S. V., Glasgow, L. R., Panlson, J. C. & Hill, R. L.** (1978) Hepatic receptor that specifically binds oligosaccharides containing fucosyl N-acetylglucosamine linkage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75** : 2215-2219
- Princiotto, J. V. & Zapolki, E. J.** (1975) Difference between the iron binding sites of transferrin. *Nature*, **255** : 87-88

- Rado, T. A., Bollekens, J., St Laurent, G., Parker, L. & Benz, E.** (1984) Lactoferrin biosynthesis during granulocytogenesis. *Blood*, **64** : 1103-1109
- Rado, T. A., Wei, X. & Benz, E. J.** (1987) Isolation of lactoferrin cDNA from a human myeloid library and expression of mRNA during normal and leukemic myelopoiesis. *Blood*, **70** : 989-993
- Raha, S., Dosquet, C., Abgrall, J. F., Jollès, P. A. M. & Caen, J. P.** (1988) KRDS, a tetrapeptide derived from lactotransferrin, inhibits binding of monoclonal antibody against glycoprotein IIb-IIIa on ADP-stimulated platelets and megakaryocytes. *Blood*, **72** : 172-178
- Ralton, J. E., Jackson, H. J., Zanoni, M. & Gleeson, P. A.** (1989) Effect of glycosylation inhibitors on the structure and function of the murine transferrin receptor. *Eur. J. Biochem.*, **186** : 637-647
- Redhead, K., Hill, T. & Chart, H.** (1987) Interaction of lactoferrin and transferrins with the outer membrane of *Bordetella pertussis*. *J. Gen. Microbiol.*, **133** : 891-898
- Redhead, K., Hill, T. & Chart, H.** (1991) Acquisition of iron from transferrin by *Bordetella pertussis*. *FEMS. Microbiol. Lett.*, **77** : 303-308
- Reese, J. H., McNeal, J. E., Goldenberg, S. L., Redwine, E. A. & Sellers, R. G.** (1992) The Prostate, **20** : 73-85
- Rey, M. W., Woloshuk, S. L., de Boer, H. A. & Piper, F. R.** (1990) Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin. *Nucl. Acids Res.*, **18** : 5288
- Rochard, E.** (1992) Etude du mécanisme de l'interaction de la lactotransferrine avec son récepteur membranaire et sa destinée intracellulaire dans les cellules cancéreuses de glande mammaire humaine. Thèse d'Université, Lille I
- Rochard, E., Legrand, D., Mazurier, J., Montreuil, J. & Spik, G.** (1989) The N-terminal domain of human lactotransferrin binds specifically to phytohemagglutinin-stimulated peripheral blood human lymphocyte receptors. *FEBS Lett.*, **255** : 201-204
- Rochard, E., Legrand, D., Lecocq, M., Hamelin, R., Crepin, M., Montreuil, J. & 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
- Rodman, J. S., Mercer, R. W. & Stachl, P. D.** (1990) Endocytosis and transcytosis. *Cur. Opinion in Cell Biology*, **2** : 664-672
- Roiron-Lagroux, D. & Figarella, C.** (1990) Evidence for a different mechanism of lactoferrin and transferrin translocation on HT-29-D4 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **170** : 837-842
- Roiron-Lagroux, D., Amouric, M. J. & Figarella, C.** (1989) Lactoferrin-binding sites at the surface of HT-29-D4 cells. *Eur. J. Biochem.*, **186** : 367-373
- Rosenmund, A., Friedli, J., Behié, H. & Werner, P.** (1988) Plasma lactoferrin and plasma lactoferrin/neutrophil ratio. *Acta Haemat.*, **80** : 40-48
- Rossiello, R., Carriero, M.V. & Giordano, G. G.** (1984) Distribution of ferritin, transferrin and lactoferrin in breast carcinoma tissue. *J. Clin. Pathol.*, **37** : 51-55
- Roth, T. F. & Porter, K. R.** (1964) Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. I. *J. Cell Biol.*, **20** : 313-332
- Rothman, J. E.** (1994) Mechanism of intracellular protein transport. *Nature*, **372** : 55-63
- Sahagian, G. G.** (1984) The mannose 6- phosphate receptor : function, biosynthesis and translocation. *J. Biol. Cell*, **51** : 207-214

- Sanchez, L. M., Vizoso, F., Diez-Itza I. & C. Lépez-Otin (1992) Identification of the major protein components in breast secretions from women with benign and malignant breast diseases. *Cancer Res.*, **52** : 95-100
- Sanchez, L., Calvo, M. & Brock, J. H. (1992) Biological role of lactoferrin. *Arch. Dis. Child.*, **67** : 657-661
- Sarrien, U. M., Simes, M.A. & Dallman, P. P. (1977) Iron absorption in infants : high bioavailability of breast milk iron as indicated by the extrinsic tag method of iron absorption and by the concentration of serum ferritin. *J. Pediatr.*, **91** : 36-39
- Sato, K., Shinmoto, H., Tanimoto, M., Dosako, S. & Nakajima, I. (1990) Uptake and resecretion of human lactoferrin by B-lymphocytes. *Agri. Biol. Chem.*, **54** : 1275-1279
- Sawatzki, G., Hoffmann, F. & Kubanek, B. (1983) The role of iron binding proteins, lactoferrin and transferrin, in *Salmonella triphimurium* infections in mice. In "Structure and function of iron Storage and Transport Protein". Eds Urushizaki, I., Aisen, P., Listows
- Scatchard, G. (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51** : 660-672
- Schade, A. L. & Caroline, L. (1944) Raw hen egg white and the role of iron in growth inhibition of *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, **100** : 14-15
- Schade, A. L. & Caroline, L. (1946) An iron binding component of human blood plasma. *Science*, **104** : 340-341
- Schmidt, A. M., Viamna, M., Gerlach, M., Brett, J., Ryan, J., Kao, J., Esposito, C., Hegarty, H., Hurley, W., Clanss, M., Wang, F., Pan, Y. C. E., Tuang, T. C. & Stern, D. (1992) Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J. Biol. Chem.*, **267** : 14987-14997
- Schryvers, A. B. & Morris, L. J. (1988) Identification and characterization of the human lactoferrin-binding protein from *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.*, **56** : 1144-1149
- Schryvers, A. B., Craig, A. & Lee, B. (1989) Comparative analysis of the transferrin and lactoferrin binding protein in the family *Neisseriaceae*. *Can. J. Microbiol.*, **35** : 409-415
- Shau, H., Kim, A. & Golub, S. H. (1992) Modulation of natural killer and lymphokine-activated killer cytotoxicity by lactoferrin. *J. Leuk. Biol.*, **51** : 243-249
- Shirsat, N. V., Bittenbender, S., Kreider, B. L. & 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*, **110** : 229-234
- Shongwe, M. S., Smith, C. A., Ainsough, E. W., Baker, H. M., Brodie, A. & Baker, E. N. (1992) Anion binding by human lactoferrin : results from crystallographic and physicochemical studies. *Biochemistry*, **31** : 4451-4458
- Sipe, D. M. & Murphy, R. F. (1991) Binding to cellular receptors results in increased iron release from transferrin at mildly acidic pH. *J. Biol. Chem.*, **266** : 8002-8007
- Slater, K. & Fletcher, J. (1987a) Lactoferrin derived from neutrophils inhibits the mixed lymphocyte reaction. *Blood*, **69** : 1328-1333
- Slater, K. & Fletcher, J. (1987b) Lactoferrin inhibits interleukin-2 production in mixed lymphocyte culture. In "The inhibitors of haematopoiesis". Eds Najman A., Guigon M. Colloque INSERM John Libbey Eurotext Ltd
- Smith, C. A., Anderson, B. F., Baker, H. M. & Baker, E. N. (1992) Metal substitutions in transferrins: the crystal structure of human copper-lactoferrin at 2,1 Å resolution. *Biochemistry*, **31** : 4527-4533

**Smythe, E. & Warren, G.** (1991) The mechanism of receptor-mediated endocytosis. *Eur. J. Biochem.*, **202** : 689-699

**Sollier, C. B. D., Drouet, L., Fiat, A. M., Jollès, P. & Caen, J. P.** (1990) L'effet anti-thrombotique des peptides de la lactotransferrine. *C. R. Sci. Biol. Paris*, **184** : 201-210

**Soukka, T., Tenuovo, J. & Rundegren, J.** (1993) Agglutination of *Streptococcus* mutants serotype c cells but inhibition of *Porphyromonas gingivalis* autoaggregation by human lactoferrin. *Archs. Oral. Biol.*, **38** : 227-232

**Spik, G.** (1981) *In* : Alimentation du nourrisson. Ed Blanc, B. Liebefeld, Berne. pp 315-347

**Spik, G. & Montreuil, J.** (1966) Etudes comparatives de la structure de la transferrine et de la lactotransferrine humaines "finger printing" des hydrolysats protéasiques des deux glycoprotéines. *C. R. Sci. Biol. Paris*, **160** : 94-98

**Spik, G. & Montreuil, J.** (1983) Rôle de la lactotransferrine dans les mécanismes moléculaires de la défense antibactérienne. *Bull. Europ. Physiopath. Resp.*, **19** : 123-130

**Spik, G., Vandersyppe, R., Fournet, B., Bayard, B., Charet, P., Bouquelet, S., Strecker, G. & Montreuil, J.** (1973) *In* "Actes du Colloque n°221 sur les Glycoconjugués", CNRS, Paris, 111-130

**Spik, G., Fournet, B., Bayard, B., Vandersyppe, R., Bouquelet, S., Charet, P., Strecker, G. & Montreuil, J.** (1974) Etudes sur les groupements glycaniques de la séro- et de la lactotransferrine humaines. *Arch. Int. Physiol. Biochem.*, **82** : 791-798

**Spik, G., Bayard, B., Fournet, B., Strecker, G., Bouquelet, S. & Montreuil, J.** (1975) Studies on glycoconjugates. Complete structure of two carbohydrate units of human transferrin. *FEBS. Lett.*, **50** : 296-299

**Spik, G., Chéron, A., Montreuil, J. & Dolby, J. M.** (1978) Bacteriostasis of a milk-sensitive strain of *Escherichia coli* by immunoglobulins and iron-binding proteins in association. *Immunology.*, **35** : 663-671

**Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouquelet, S., Montreuil, J., Dorland, L., van Halbeek, H. & Vliegthart, J. F. G.** (1982) Primary structure of the glycans from human lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.*, **121** : 413-419

**Spik, G., Coddeville, B., Legrand, D., Mazurier, J., Léger, D., Goavec, M. & Montreuil, J.** (1985a) A comparative study of the primary structure of glycans from various sero- lacto- and ovotransferrin glycans. *In* "Proteins of Iron Storage and Transport". Eds Spik, G., Montreuil, J., Crichton, R. R. and Mazurier, J. pp 47-51

**Spik, G., Debruyne, V., Montreuil, J., Dorland, L., van Halbeek, H. & Vliegthart, J. F. G.** (1985b) Primary structure of two sialylated triantennary glycans from human serotransferrin. *FEBS. Lett.*, **1983** : 65-69

**Spik, G., Coddeville, B. & Montreuil, J.** (1988) Comparative study of the primary structure of sero-, lacto- and ovotransferrin glycans from different species. *Biochimie*, **70** : 1459-1469

**Spik, G., Legrand, D., Leveugle, B., Mazurier, J., Mikogami, T., Montreuil, J., Pierce, A. & Rochard, E.** (1993) Binding properties of different lactotransferrins to human lactotransferrin receptor. *In* "New perspectives in Infant Nutrition : Symposium Antwerpen". Eds Sawatzki, G. Stuttgart : Georg Thieme Verlag. pp 77-83

**Spitznagel, J. K., Cooper, M. R., McCall, A. E., Decatelet, L. R. & Welsh, I. R. H.** (1972) Selective deficiency of granules with lysozyme and lactoferrin in human polymorphonuclear leucocytes (PMN) with reduced microbicidal capacity. *J. Clin. Invest.*, **51** : 93

**Srivastava, C. H., Rado, T. A., Bauerle, D. & Broxmeyer, H. E.** (1991) Regulation of human bone marrow lactoferrin and myeloperoxidase gene expression by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Immunol.*, **146** : 1014-1019

**Stephens, S., Dolby, J., Montreuil, J. & Spik, G.** (1980) Differences in inhibition of the growth of commensal and enteropathogenic strains of *Escherichia coli* by lactotransferrin and secretory immunoglobulin A isolated from human milk. *Immun.*, **41** : 597-603

Stowell, K. M., Rado, T. A., Funk, W. D. & Tweedie, J. W. (1991) Expression of cloned human lactoferrin in baby-hamster kidney cells. *Biochem. J.*, **276** : 349-355

Sün, I. L., Crane, F. L., Morré, J., Löw, H. & Faulk, P. (1991) Lactoferrin activates plasma membrane oxidase and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176** : 498-504

Suzuki, T., Nonaka, N., Kiyosawa, I. & Ogasa, K. (1977) Lactoferrin contents in bovine colostrum and milk. *J. Jpn. Soc. Nutr.*, **30** : 317-322

Suzuki, T., Takizawa-Mizuno, M., Yazaki, M., Wada, Y., Asai, K. & Kato, T. (1991) *Clinica Chimica Acta*, **2021** : 111-118

Teng, C. T., Walker, M.P., Bhattacharyya, S. N., Klapper, D. G., DiAugustine, R. P. & Mc Lachlan, J. A. (1986) Purification and properties of an oestrogen-stimulated mouse uterine glycoprotein (approx. 70 kDa). *Biochem. J.*, **240** : 413-420

Teng, C. T., Pentecost, B. T., Marshall, A., Salomon, A., Bowman, B., Lalley, P. & Naylor, S. (1987) Assignment of the lactoferrin gene to human chromosome 3 and to mouse chromosome 9. *Somat. Cell. Mol. Genet.*, **13** : 689-693

Teng, C. T., Pentecost, B. T., Chen, Y. H., Nawbold, R. R., Eddy, E. M. & Mc Lachlan, J. A. C. (1989) Lactoferrin gene expression in the mouse uterus and mammary gland. *Endocrinology*, **124** : 922-999

Teng, C. T., Liu, Y., Walmer, D. & Panella, T. (1992) Differential molecular mechanism of the estrogen action that regulates lactoferrin gene in human and mouse. *Mol. End.*, **6** : 1969-1981

Terent, A., Hallgren, R., Venge, P. & Bergstrom, K. (1981) Lactoferrin, lysozyme and  $\beta$ 2-microglobuline in cerebrospinal fluid. Elevated levels in patients with acute cerebrovascular lesions as indices of inflammation. *Stroke*, **12** : 40-46

Tigyi, Z., Kishore, A. R., Maeland, J. A., Forsgren, A. & Naidu, S. (1992) Lactoferrin-binding proteins in *Shigella flexneri*. *Immunology.*, **60** : 2619-2626

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **76** : 4350-4354

Trowbridge, I. S. & Collawn, J. F. (1992) Structural requirements for high efficiency endocytosis of the human transferrin receptor. *J. Inorg. Biochem.*, **47** : 209-217

Tsai, J., Dyer, D. W. & Sparling, P. F. (1988) Loss of transferrin receptor activity in *Neisseria meningitidis* correlates with inability to use transferrin as an iron source. *Infect. Immun.*, **3** : 437-443

Tuccari, G. & Barresi, G. (1985) Immunohistochemical demonstration of lactoferrin in follicular adenomas and thymoid carcinomas. *Virchows, Arch. A.*, **406** : 67-74

Tuccari, G., Barresi, G., Arena, F. & Inferrera, C. (1989) Immunocytochemical detection of lactoferrin in human gastric carcinomas and adenomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **113** : 912-915

Turkewitz, A. P. & Harrison, S. C. (1989) Concentration of transferrin receptor in human placental coated vesicle. *J. Cell Biol.*, **108** : 2127-2135

Turkewitz, A. P., Schwartz, A. L. & Harrison, S. C. (1988) A pH-dependent reversible conformational transition of the human transferrin receptor leads to self-association. *J. Biol. Chem.*, **263** : 16309-16315

Underwood, E. J. (1977) *In "Trace elements in human and Animal Nutrition, 4th edition"* Academic Press.

Valtieri, M., Tweardy, D. J., Caracciolo, D., Johnson, K., Mavilio, F., Altmann, S., Snatoli, D. & Rovera, G. (1987) Regulation of proliferation and differentiative responses in a murine progenitor cell line. *J. Immunol.*, **138** : 3829-3835

**Van Brunt, J.** (1988) Fungi, The perfect hosts? *Biotechnology*, **44** : 1057-1062

**Van Dijk, M. C. M., Ziere, G. J., Boers, W., Linthorst, L., Bijsterbosch, M. & Van Berkel, T. J. C.** (1991) Recognition of chylomicron remnants receptor of parenchymal liver cells is distinct from the liver 2-macroglobulin-recognitive site. *Biochem. J.*, **279** : 863-870

**Van Gut, H., Van Gool, J., Ladiges, N. C. J. J. & Boers, W.** (1975) Lactoferrin in Rabbit bile : its relation to iron metabolism. *J. Exp. Physiol.*, **60** : 79-88

**Van Snick, J. L. & Masson, P. L.** (1976) The binding of human lactoferrin to mouse peritoneal cells. *J. Exp. Med.*, **144** : 1568-1580

**Van Snick, J. L., Masson, P. L. & Heremans, J. F.** (1974) The involvement of lactoferrin in the hyposideremia of acute inflammation. *J. Exp. Med.*, **140** : 1068-1084

**Van Snick, J. L., Markowetz, B. & Masson, P. L.** (1977) The ingestion of human lactoferrin by mouse peritoneal macrophages and the transfer of its iron to ferritin. *J. Exp. Med.*, **146** : 817-827

**Vasil'ev, M. Y. & Avdeev, G. I.** (1985) Quantitative immunoenzyme determination of lactoferrin and a-lactalbumin in the blood serum of cancer patients. *Eksp. Onkol.*, **5** : 56-60

**Visca, P., Dalmastrri, C., Verzili, D., Antonini, G., Chiancone, E. & Valenti, P.** (1990) Interaction of lactoferrin with *Escherichia coli* cells and correlation with antibacterial activity. *Med. Microbiol. Immunol.*, **179** : 323-333

**Walmer, D. K., Wrona, M. A., Hughes, C. L. & 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

**Ward., P. A., Till, G. O., Kunkell, R. & Beauchamp, C.** (1983) Evidence for role of hydroxyl radical in complement and neutrophil-dependent tissue injury. *J. Chin. Invest.*, **72** : 789-801

**Ward, P. P., Lo, J. Y., Duke, M., May, G. S., Headon, D. R. & Conneely, O. M.** (1992a) Production of biologically active recombinant lactoferrin in *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology*, **10** : 784-789

**Ward, P. P., May, G. S., Headon, D. R. & Conneely, O. M.** (1992b) An inducible expression system for the production of human lactoferrin in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, **122** : 219-223

**Weiner, R. E., Schreiber, G. J., Hoffer, P. B. & Shamon, T.** (1981) The relative stabilities of <sup>67</sup>Ga complexes of lactoferrin and transferrin at various pH. *Inter. J. Nuc. Med. Biology.*, **8** : 371-378

**Willnow, T. E., Goldstein, J. L., Orth, K., Brown, M. S. & Herz, J.** (1992) Low density lipoprotein receptor-related protein and gp 330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnants clearance. *J. Biol. Chem.*, **267** : 26172-26180

**Winterbourn, C. C.** (1983) Lactoferrin-catalysed hydroxyl radical production : additional requirement for a chelating agent. *Biochem. J.*, **210** : 15-19

**Yamada, Y., Amagasaki, T., Jacobsen, D.W. & Green, R.** (1987) Lactoferrin binding by leukemia cell lines. *Blood*, **70** : 264-270

**Yamauchi, K., Tomita, M., Giehl, T. & Ellison, R. T.** (1993) Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin fragment. *Infect. Immun.*, **61** : 719-728

**Yong, S. P. & Aisen, P.** (1981) Transferrin receptor and the uptake and release of iron by isolated hepatocytes. *Hepatology*, **1** : 114-116

**Yong, S. P., Bomford, A. & Williams, R.** (1984) The effect of iron saturation of transferrin on its binding and uptake by rabbit reticulocytes. *Biochem. J.*, **219** : 505-510

**Yu, R. H. & 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

**Zagulski, T., Lipinski, P., Zagulski, A., Bronier, S. & Jarzabak, Z.** (1989) Lactoferrin can protect mice against a lethal dose of *Escherichia coli* in experimental infection *in vivo*. *Br. J. Exp. Pathol.*, **70** : 697-704

**Ziere, G. J., Van Dijk, M. C. M., Bijsterbosch, M. K. & Van Berkel, T. J. C.** (1992) Lactoferrin uptake by the rat liver. *J. Biol. Chem.*, **267** : 11229-11235

**Zimecki, M., Mazurier, J., Machnicki, M., Wieczorek, Z., Montreuil, J. & Spik, G.** (1991) Immunostimulation activity of lactotransferrin and maturation of CD4- CD8- murine lymphocytes. *Immunology Lett.*, **30** : 119-124

**Zimecki, M., Mazurier, J., Spik, G. & Kapp, J.** Lactotransferrin induces phenotypic and functional changes in immature B cells. Submitted in publication for *Immunology*

**Zou, S., Magura, C. E. & Hurley, W. L.** Heparin-binding properties of lactoferrin and lysosome(1992) *Comp. Biochem. Physiol.*, **103B** : 889-895

**Zucali, J. R., Broxmeyer, H. E., Levy, D. & Morse, C.** (1989) Lactoferrin decreases monocyte-induced fibroblast production of myeloid colony-stimulating activity by suppressing monocyte release of interleukin-1. *Blood*, **74** : 1531-1538

