N° d'ordre : 2351

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

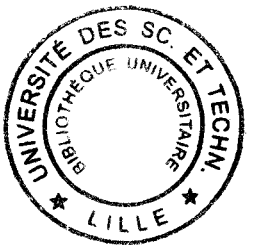
pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Option: Sciences de la Vie et de la Santé

par

Eve DAMIENS



ACTIVITE ANTINEOPLASIQUE DE LA LACTOFERRINE

MODULATION DE L'ACTIVITE CYTOTOXIQUE DES CELLULES "NATURAL KILLER" (NK) ET REGULATION DE LA TRANSITION G1/S DU CYCLE DES CELLULES EPITHELIALES CANCEREUSES MAMMAIRES ET COLIQUES

Soutenue le 6 novembre 1998 devant la commission d'examen:

Président	:	Professeur André VERBERT
Rapporteurs	:	Docteur Laurent MEIJER
		Docteur Jean-Philippe PEYRAT
Examinateurs	:	Docteur Yolande BOILLY-MARER
		Professeur Hubert HONDERMARCK
		Professeur Geneviève SPIK

A ma mère

A ma marraine

A Sylvain, Pierre, Christian, Julian, Pedro, Nikkos et Ikram

Ce travail a été réalisé sous la direction du Docteur Yolande BOILLY-MARER dans le laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Unité Mixte de Recherche du CNRS n°111: Glycobiologie structurale et fonctionnelle ; Directeur: Professeur André Verbert). Il a bénéficié d'une allocation de recherche du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et d'un financement par l'Association pour la Recherche sur le Cancer (contrat n° 3040).

AVANT-PROPOS

Je tiens à exprimer mes remerciements à Monsieur le Professeur André VERBERT, qui, malgré ses nombreuses occupations, a bien voulu me faire l'honneur de présider cette thèse. Soyez assuré Monsieur de ma profonde gratitude.

Je remercie très sincèrement Madame le Professeur Geneviève SPIK de m'avoir accueillie au sein de son équipe et de m'avoir soutenue et accordé toute sa confiance au cours de mes années de thèse. Je vous en suis très reconnaissante.

Je remercie également très chaleureusement mon directeur de thèse, Madame le Docteur Yolande BOILLY-MARER pour la disponibilité, la gentillesse, la confiance et la liberté de mouvement qu'elle m'a accordées au cours de mon DEA et mes années de thèse. Soyez assurée Madame de ma sincère reconnaissance.

Mes plus vifs remerciements à Monsieur le Docteur Laurent MEIJER pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. J'ai énormément apprécié vos conseils scientifiques, votre dynamisme ainsi que la chaleur de votre accueil lors de mon séjour à Roscoff. Votre venue en tant que rapporteur de cette thèse me fait extrêmement plaisir. Puisse notre collaboration se poursuivre...

Je remercie également Monsieur le Docteur Jean-Philippe PEYRAT pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et pour avoir consacré du temps à la lecture, l'analyse et la critique de ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Hubert HONDERMARCK pour m'avoir fait l'honneur d'être examinateur de cette thèse et de porter un intérêt à mes travaux.

Je souhaite également remercier toutes les personnes qui ont, de près ou de loin, participé à la réalisation de ce travail :

Ikram, Danielle et Agnès pour votre amitié, votre sourire, votre gentillesse et votre soutien moral.
Fabrice, pour ton aide scientifique très précieuse et tes encouragements.

Monsieur le Docteur Joël MAZURIER pour ta sympathie, tes encouragements, tes conseils et ton expérience technique, en particulier en cytofluorimétrie en flux.

Maryse, pour ton aide précieuse dans la correction orthographique et dans tu sais quoi ! !

Madame Jocelyne CELEN pour la réalisation des photos.

Pour leur sympathie et leur soutien, je n'oublie pas, en particulier, Mathieu, Isabelle, Elisabeth, Myriam, Sandrine, Sophie, Monique, Tony, Philippe, Annick, Marie-Christine, Bernadette, ...
Bon vent à tous et bon courage à ceux qui n'ont pas encore fini !!!!

SOMMAIRE

Abréviations 7

Résumé 10

Introduction 11

Généralités 15

I. BIOSYNTHESE DE LA LACTOFERRINE 15

I.1. STRUCTURE GENIQUE DE LA LACTOFERRINE 15

I.2. REGULATION DE L'EXPRESSION DU GENE DE LA LACTOFERRINE 18

I.2.1. *Expression du gène de la lactoferrine au cours de la granulopoïèse* .. 18

I.2.2. *Expression du gène de la lactoferrine dans les organes de reproduction* 19

I.2.3. *Expression du gène de la lactoferrine en fonction de la morphologie cellulaire* 21

II. STRUCTURE DE LA LACTOFERRINE 22

II.1. SEQUENCE PRIMAIRE DE LA CHAINE PEPTIDIQUE 22

II.2. STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE LA LACTOFERRINE 22

II.3. LES GLYCANNES DE LA LACTOFERRINE HUMAINE 24

III. STRUCTURE DES SITES ACTIFS ET DES SITES DE RECONNAISSANCE DES MOLECULES ET DES RECEPTEURS 25

III.1. SITES DE FIXATION DES METAUX 25

III.2. DOMAINE IMMUNOMODULATEUR DE LA LACTOFERRINE 26

III.3. SEQUENCE DE LA LACTOFERRINE A ACTIVITE ANTIBACTERIENNE 28

III.4. SITE D'INTERACTION AVEC LES LIPOPOLYSACCHARIDES 29

III.5. DOMAINES D'INTERACTION DE LA LACTOFERRINE AVEC LES GLYCOSAMINOGLYCANNES 29

III.6. DOMAINES D'INTERACTION AVEC LE RECEPTEUR LYMPHOCYTAIRE 30

III.7. DOMAINE D'INTERACTION DE LA LACTOFERRINE AVEC LE RECEPTEUR DES APOLIPOPROTEINES DE FAIBLE DENSITE 32
IV. DISTRIBUTIONS CELLULAIRE ET TISSULAIRE DE LA LACTOFERRINE 33
IV.1. LES SECRETIONS BIOLOGIQUES 33
IV.1.1. *Le lait* 33
IV.1.2. *Le sang* 33
IV.2. LOCALISATIONS TISSULAIRES NORMALE ET PATHOLOGIQUE DE LA LACTOFERRINE 34
IV.2.1. *La glande mammaire* 34
α. *La glande mammaire au repos* 34
β. *La glande mammaire en activité* 35
γ. *Les carcinomes mammaires* 35
IV.2.2. *L'endomètre* 36
α. *Endomètre sain en phase proliférative ou sécrétoire* 36
β. *Adénocarcinomes de l'endomètre* 37
IV.2.3. *Le tissu hématopoïétique* 37
α. *Moelle osseuse normale* 38
β. *Maladies leucémiques* 38
IV.2.4. *L'appareil gastro-intestinal* 38
α. *Les glandes salivaires* 38
β. *L'estomac* 39
γ. *Le pancréas* 39
V. LES RECEPTEURS DE LA LACTOFERRINE 39
V.1. INTERACTION DE LA LACTOFERRINE AVEC LES HEPATOCYTES 40
V.2. INTERACTION DE LA LACTOFERRINE AVEC LES CELLULES ENTEROCYTAIRES 41
V.3. INTERACTION DE LA LACTOFERRINE AVEC LES MONOCYTES/MACROPHAGES. 43
V.4. INTERACTION DE LA LACTOFERRINE AVEC LA POPULATION LYMPHOCYTAIRE 45
V.5. INTERACTION DE LA LACTOFERRINE AVEC LES CELLULES MAMMAIRES 47
VI. ROLES BIOLOGIQUES DE LA LACTOFERRINE 49
VI.1. EFFETS BACTERIOSTATIQUE ET BACTERICIDE DE LA LACTOFERRINE 49
VI.2. EFFET ANTI-VIRAL DE LA LACTOFERRINE 50

VI.3. EFFET ANTITHROMBOTIQUE DE LA LACTOFERRINE 51

VI.4. IMPLICATION DE LA LACTOFERRINE DANS L'ABSORPTION INTESTINALE DU FER 52

VI.5. IMPLICATIONS DE LA LACTOFERRINE DANS LA CARCINOGENESE 53

VI.5.1. *Les facteurs de la carcinogenèse* 53

VI.5.2. *La carcinogenèse* 54

VI.5.3. *Le cycle cellulaire* 55

VI.5.4. *Dysrégulation des facteurs de contrôle du cycle cellulaire et cancer* 61

VI.5.5. *Le processus métastatique* 62

VI.5.6. *Lactoferrine et prolifération néoplasique* 63

VI.5.7. *Lactoferrine et processus métastatique* 65

VI.6. IMPLICATIONS DE LA LACTOFERRINE DANS LE SYSTEME IMMUNITAIRE 66

VI.6.1. *Les monocytes/macrophages et leucocytes polymorphonucléaires* .. 66

VI.6.2. *Lactoferrine et leucocytes polymorphonucléaires* 67

VI.6.3. *Lactoferrine et monocytes/macrophages* 67

VI.6.4. *Les cellules NK* 68

VI.6.5. *Lactoferrine et cellules NK* 69

VI.6.6. *L'immunité spécifique* 70

VI.6.7. *Lactoferrine et effecteurs de la réponse immune spécifique* 71

Travaux Personnels

..... 74

ETUDE DE LA CYTOLYSE DE CELLULES CIBLES PAR LES CELLULES EFFECTRICES DE L'IMMUNITE NATURELLE (CELLULES "NATURAL KILLER" NK) ET DE SA MODULATION PAR LA LACTOFERRINE

I. INTRODUCTION 74

II. RESULTATS 75

Effects of human lactoferrin on NK cell cytotoxicity against haematopoietic and epithelial tumour cells

III. CONCLUSION 97

MECANISME MOLECULAIRE DE L'EFFET ANTIPROLIFERATIF DE LA LACTOFERRINE SUR DES LIGNEE DE CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES ET COLIQUE

I. INTRODUCTION 98

II. RESULTATS 99

Lactoferrin inhibits G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells

III. CONCLUSION 125

MISE EN EVIDENCE DE L'IMPLICATION DES PROTEOGLYCANNES DANS LA LIAISON ET LE CONTROLE DE L'ACTIVITE ANTIPROLIFERATIVE DE LA LACTOFERRINE SUR LES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES MDA-MB-231

I. INTRODUCTION 126

II. RESULTATS 127

Role of heparan sulphate in the regulation of lactoferrin binding and activity in the MDA-MB-231 breast epithelial cell line

III. CONCLUSION 149

Conclusion générale

..... 150

Appendice technique

..... 155

I. MATERIELS 155

I.1. LACTOFERRINE HUMAINE 155

I.1.1. *Préparation de la lactoferrine humaine* 155

I.1.2. *Préparation de la lactoferrine marquée sur ses glycannes par couplage avec la fluorescéine* 155

I.1.3. *Préparation de la lactoferrine marquée à l'iode radioactif (^{125}I)* 156

I.2. LIGNEES CELLULAIRES HEMATOPOÏETIQUES HUMAINES 156

I.3. CELLULES EPITHELIALES HUMAINES 157

I.3.1. *Lignée cellulaire épithéliale mammaire transformée* 157

I.3.2. *Lignées cellulaires épithéliales mammaires cancéreuses* 157

I.3.3. *Lignée cellulaire épithéliale de colon* 158

II. METHODES 158

II.1. CULTURE CELLULAIRE 158

II.1.1. *Culture des lignées hématopoïétiques* 158
II.1.2. *Culture des lignées mammaires transformées et cancéreuses* 158
II.1.3. *Culture de la lignée cellulaire de colon HT29-18-C1* 159
II.2. ANALYSE DE L'EFFET ANTIPROLIFERATIF DE LA LACTOFERRINE SUR LES CELLULES EPITHELIALES 159
II.3. PREPARATION DE LA POPULATION LYMPHOCYTAIRE EFFECTRICE 160
II.3.1. *Séparation de la population lymphocytaire totale* 160
II.3.2. *Enrichissement de la population lymphocytaire effectrice en cellules NK CD3$^-$, CD20$^-$, CD56$^+$* 160
II.4. TEST DE CYTOTOXICITE 161
II.4.1. *Principe* 161
II.4.2. *Marquage des cellules cibles* 161
α. *Cellules hématopoïétiques* 161
β. *Cellules épithéliales* 162
II.4.3. *Cytolyse* 162
II.4.4. *Conditionnement des cellules effectrices et des cellules cibles avant le test de cytolyse* 163
α. *Addition de la lactoferrine au milieu d'incubation* 163
β. *Prétraitement des cellules effectrices avec la lactoferrine* 163
γ. *Prétraitement des cellules cibles avec la lactoferrine* 163
δ. *Prétraitement des cellules cibles avec le chlorate de sodium* 164
ε. *Prétraitement des cellules cibles avec l'héparinase I ou la chondroïtinase ABC* 164
II.5. CONTROLE DE L'EFFICACITE DES TRAITEMENTS IN SITU PAR LES ENZYMES DE DEGRADATION DES PROTEOGLYCANNES OU PAR LE CHLORATE DE SODIUM 165
II.6. DETERMINATION DES PARAMETRES DE FIXATION DE LA LACTOFERRINE SUR LES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES MDA-MB-231 165
II.7. CYTOFLUORIMETRIE EN FLUX 166
II.7.1. *Etude de la fixation de la lactoferrine fluorescente par cytofluorimétrie en flux* 166
II.7.2. *Etude de l'induction de l'apoptose ou de la nécrose des cellules cibles par la lactoferrine* 166

α. *Principe* 166

β. *Protocole* 167

II.7.3. *Etude du cycle cellulaire sur les cellules épithéliales mammaires et coliques* 167

II.7.4. *Analyse des résultats* 168

II.8. TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES 168

II.8.1. *Préparation des lysats de cellules épithéliales mammaires pour l'étude de l'influence de la lactoferrine sur l'expression des protéines régulant la transition G1/S du cycle cellulaire* 168

II.8.2. *Electrophorèse en gel de polyacrylamide* 168

II.8.3. *Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose* 169

II.8.4. *Immunorévélation des protéines transférées sur la nitrocellulose* 169

II.9. MESURE DES ACTIVITES KINASES 169

II.9.1. *Préparation des lysats cellulaires de cellules épithéliales pour l'étude de l'influence de la lactoferrine sur l'activité kinase des protéines régulant la transition G1/S du cycle cellulaire* 169

II.9.2. *Mesure de l'activité kinase associée à Cdk4* 170

II.9.3. *Etude de l'activité kinase de Cdk2* 170

Bibliographie 172

Abréviations

ADCC	:	Antibody Dependent Cell Cytotoxicity
ADP	:	Adenosine Diphosphate
Al	:	Aluminium
ApoE	:	Apolipoprotéine E
Arg (R)	:	Arginine
Asn (N)	:	Asparagine
Asp (D)	:	Acide aspartique
ADN	:	Acide Désoxyribonucléique
ARN	:	Acide Ribonucléique
β-VLDL	:	Very Low Density Lipoprotein β
Cdk	:	Cyclin dependent kinase
CKI	:	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor
COUP	:	Chicken Ovalbumin Upstream Promoter
Cr	:	Chrome
Cu	:	Cuivre
DTT	:	Dithiothreitol
EDTA	:	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EGF	:	Epidermal Growth Factor
EGTA	:	Ethylene Glycol -bis (β-aminoethylether) Tetraacetic Acid
ERE	:	Estrogen Response Element
Fe	:	Fer
FITC	:	Fluorescein Isothiocyanate
Glu (E)	:	Acide glutamique
Gln (Q)	:	Glutamine
GM-CSF	:	Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor
HLA	:	Human Leukocyte Antigen
hLf	:	Lactoferrine Humaine
HSPG	:	Heparan Sulfate Proteoglycans
HyF	:	{5-[((2-(carbohydrazino)méthyl)thio)acétyl] amino-fluorescéine}

I	:	Iode
Ig	:	Immunoglobuline
Il	:	Interleukine
Kb	:	Kilobase
Kd	:	Constante de Dissociation
kDa	:	Kilodalton
KRDS	:	Lys-Arg-Asp-Ser
Lf	:	Lactoferrine
LGL	:	Large Granular Lymphocyte
LPS	:	Lipopolysaccharides
LRP	:	Lipoprotein Receptor Protein
Lys (K)	:	Lysine
mERM	:	Module de Réponse aux Oestrogènes
MOPS	:	3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid
n	:	Nombre de sites
NC	:	Non Codant
NK	:	Natural Killer
pb	:	Paire de bases
PBS	:	Phosphate Buffered Saline
PCNA	:	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PE	:	Phycoérythrine
Phe (F)	:	Phénylalanine
PMSF	:	Phenyl Methyl Sulfonyl Fluorure
Pro (P)	:	Proline
RARE	:	Retinoic Acid Responsive Element
rhLf	:	Lactoferrine Humaine Recombinante
Rb	:	Retinoblastoma Gene Product
RGDS	:	Arg-Glu-Asp-Ser
SAB	:	Serum Albumine Bovine
Ser (S)	:	Sérine
SDS	:	Sodium Dodécyl Sulfate
SVF	:	Sérum de Veau Foetal

TcR	:	T cell Receptor
Thr (T)		Thréonine
TNF		Tumor Necrosis Factor
Val (V)		Valine

Résumé

La lactoferrine est une glycoprotéine principalement sécrétée dans le lait et libérée dans le plasma par dégranulation des polynucléaires neutrophiles. Il a été démontré qu'elle augmente la cytolyse des cellules tumorales par les cellules NK, cependant le mécanisme reste mal défini.

Afin de déterminer ce mécanisme, nous avons recherché l'effet de la lactoferrine sur la cytolyse. Nous démontrons que la lactoferrine module l'activité cytotoxique des cellules NK en fonction de sa concentration et sensibilise les cellules tumorales à la lyse en fonction de leur phénotype. En particulier, la lactoferrine augmente la sensibilité à la lyse des cellules d'adénocarcinome mammaire et de colon probablement en les bloquant en phase G1 du cycle cellulaire.

Nous avons recherché le mécanisme moléculaire de l'effet anti-prolifératif de la lactoferrine sur les cellules d'adénocarcinome mammaire MDA-MB-231. Nous démontrons que la lactoferrine induit un arrêt en phase G1 en diminuant l'expression de Cdk2 et de la cycline E et en augmentant celle de $p21^{WAF1/CIP1}$ par une voie indépendante de p53. Ceci est corrélé avec l'inhibition des activités kinases de Cdk2 et Cdk4 maintenant pRb sous une forme hypophosphorylée.

Nous avons caractérisé deux types de sites de liaison de la lactoferrine sur les cellules MDA-MB-231. Le premier correspond aux protéoglycannes. Le second, moins représenté, correspond probablement au récepteur spécifique. Nous montrons que la modulation de l'activité biologique de la lactoferrine sur ces cellules requiert la présence d'héparane sulfates protéoglycannes correctement sulfatés. Nous suggérons que l'activité de la lactoferrine sur ces cellules est régulée par un équilibre entre la proportion d'HSPG et de sites de haute affinité.

Introduction

Le cancer constitue un important problème de santé publique, en particulier, dans les pays développés. Il présente une incidence maximale dans les pays occidentaux. Ainsi, en France, le cancer représente, chez les personnes du troisième âge, la seconde cause de morbidité et de mortalité après les maladies cardio-vasculaires. Par ailleurs, la mortalité par tumeur est la première cause de décès avant 65 ans chez l'homme et avant 75 ans chez la femme. Deux formes de tumeurs sont à distinguer : les tumeurs liquides et les tumeurs solides. Les tumeurs liquides sont représentées par les leucémies. Elles ont été responsables, en France, de 10711 décès en 1994. Parmi les tumeurs solides, les tumeurs épithéliales malignes ou « carcinomes » sont les plus fréquentes puisqu'elles représentent 90% des cas. En France, chez l'homme, le cancer du poumon représente à lui seul 22% de la mortalité et 17,3% de l'incidence. Chez la femme, le cancer du sein est de loin le plus important. 23000 nouveaux cas de cancers du sein sont déclarés par an. Pour une femme le risque d'en être atteinte est, au minimum, de 1 pour 14 et 1 malade sur 3 en décédera. Les carcinomes mammaires représentent 98% des tumeurs mammaires. Ils naissent du revêtement épithélial des canaux (carcinomes canalaires) et des lobules (carcinomes lobulaires) et sont définis en fonction de leur caractère *in situ* ou infiltrant. Les carcinomes canalaires infiltrants sont les plus fréquents.

Pendant longtemps, la question s'est posée de savoir ce qui transformait une cellule normale en une cellule qui se multiplie de façon anarchique, envahit les tissus avoisinants, forme des métastases et altère les fonctions vitales de l'organisme. Or, il est maintenant établi que, si dans la cellule normale il existe un équilibre entre les facteurs qui stimulent la croissance et ceux qui l'inhibent, cet ordre peut être perturbé dans la cellule cancéreuse. Ainsi, tous les cancers, aussi différents puissent-ils paraître (type cellulaire, stimuli déclenchants, mode d'évolution, formation de métastases), pourraient relever d'un processus commun responsable de la désorganisation de l'activité des gènes assurant le contrôle des fonctions cellulaires. Outre la désorganisation des activités génétiques et métaboliques, les cellules tumorales présentent, en plus, une désorganisation du cytosquelette, une modification de la composition de la matrice extracellulaire et une perte d'adhérence pouvant favoriser la formation des métastases.

Différents moyens de lutte contre le cancer tels que la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie sont utilisés à l'heure actuelle. D'autre part, l'individu lui-même, par la mise en jeu du système immunitaire va développer une barrière naturelle anti-tumorale. En effet, l'existence de relations étroites entre l'activité du système immunitaire et le développement

des tumeurs ne fait plus aucun doute. Le système immunitaire spécifique développé par les lymphocytes T et l'immunité naturelle assurée par les monocytes / macrophages et les cellules "natural killer" (NK) jouent un rôle dans la prévention de l'apparition initiale des tumeurs. Ils pourraient également limiter le développement des tumeurs et la formation des métastases. Le développement d'une large masse tumorale serait dû à l'échappement immunitaire soit parce que le système immunitaire ne fonctionne plus normalement, soit parce que la tumeur possède certaines propriétés lui donnant un avantage sélectif majeur.

Les voies de recherche dans les protocoles anti-cancéreux sont donc basées soit sur la stimulation de la réponse immunitaire anti-tumorale, soit sur l'éradication des cellules tumorales en réprimant leur capacité de prolifération et en induisant la mort cellulaire.

En 1960, dans notre laboratoire, une glycoprotéine dénommée lactotransferrine a été isolée et purifiée à partir du lait de femme où elle est présente en grande quantité. Au cours de différentes études, il a, d'une part, été constaté que l'expression du gène de la lactoferrine est réprimée dans les cancers (Farley *et al.*, 1997 ; Luqmani *et al.*, 1991), en particulier dans le cancer du sein (Campbell *et al.*, 1992). D'autre part, il a été observé que la lactoferrine est capable de réduire la prolifération des cellules mammaires transformées et cancéreuses (Rejman *et al.*, 1992 ; Hurley *et al.*, 1994). Ces résultats ont permis de suggérer que la lactoferrine pourrait être impliquée dans le contrôle de la prolifération des cellules mammaires. Cependant le mécanisme d'action de la lactoferrine dans cet effet anti-néoplasique reste à ce niveau mal défini.

Par ailleurs, la lactoferrine est également un constituant majeur des granules secondaires des polynucléaires neutrophiles. Elle est libérée par dégranulation des polynucléaires neutrophiles au niveau des sites inflammatoires. Différents auteurs ont donc recherché son influence potentielle sur l'activité des cellules de l'immunité. Aucun effet n'a été constaté sur l'activité des cellules lymphocytaires T cytotoxiques. Par contre, la lactoferrine semble augmenter l'activité cytotoxique anti-tumorale des monocytes / macrophages (Nishiya et Horwitz, 1982 ; Horwitz *et al.*, 1984 ; Mc Cormick *et al.*, 1991) et des cellules NK (Shau *et al.*, 1992). Dans ce cas également le mécanisme d'action impliqué dans cet effet reste inconnu.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes attachés à définir les mécanismes de l'activité anti-néoplasique de la lactoferrine. Nous avons choisi d'étudier l'effet anti-tumoral de la lactoferrine sur les 2 formes de tumeurs. Les lignées cellulaires K-562, Jurkat et HL-60 ont été utilisées comme modèle de tumeurs liquides. En ce qui concerne les tumeurs solides,

nous avons choisi des lignées de cellules épithéliales mammaires transformées (HBL-100) et tumorales (MCF-7 et MDA-MB-231) et des cellules épithéliales mammaires normales (CEMN) comme témoin. D'une part, le choix de ces cellules a été motivé par le fait qu'elles sont représentatives du type de cancer le plus fréquemment rencontré chez la femme. D'autre part, la lactoferrine étant présente en grande quantité dans les sécrétions lactées, il existe une forte probabilité qu'elle puisse avoir un effet sur ces cellules.

Le premier point a été de vérifier la sensibilité des cellules tumorales à la lyse par la population effectrice enrichie en cellules NK. Les tests de cytotoxicité ont été réalisés en suivant différents protocoles. La lactoferrine a été ajoutée simultanément aux cellules cibles et aux cellules effectrices au moment du test de cytolyse pour rechercher l'effet anti-tumoral global. Elle a également été utilisée pour pré-traiter les cellules effectrices ou les cellules cibles avant le test de cytotoxicité afin de déterminer ses effets sur chacun des types cellulaires.

Le second point a été d'étudier la spécificité de l'effet de la lactoferrine sur les cellules NK en vérifiant la fixation spécifique de la lactoferrine sur ces cellules et en observant si cette interaction induit un signal de transduction dans ces cellules.

Le dernier point de ce travail a été de rechercher l'effet de la lactoferrine sur les cellules tumorales. Un effet anti-prolifératif de la lactoferrine bovine ayant été suggéré sur les cellules épithéliales mammaires bovines transformées mais non tumorigènes, nous avons recherché et vérifié cet effet avec la lactoferrine humaine sur les lignées mammaires humaines utilisées dans notre étude. Notre travail a ensuite consisté à déterminer le profil du cycle cellulaire des cellules traitées par la lactoferrine. Nous avons étudié les modifications d'expression et d'activité des protéines contrôlant les transitions et la progression dans les différentes phases du cycle cellulaire particulièrement au niveau de la transition G1/S.

Il a également été décrit que la lactoferrine humaine est capable d'interagir avec les protéoglycannes (Mann *et al.*, 1994 ; Wu *et al.*, 1995). Nous avons donc évalué l'influence des composants de la matrice extracellulaire, en particulier des protéoglycannes, sur la fixation et l'activité de la lactoferrine sur ces cellules. Cette influence a été recherchée sur les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 dont la matrice extracellulaire est très riche en protéoglycannes.

L'ensemble de ces travaux a permis de mieux définir et comprendre les effets de la lactoferrine, aux concentrations trouvées dans les conditions physiologiques et pathologiques,

sur le développement tumoral. Les résultats obtenus ont fait l'objet des communications et publications suivantes :

PRESENTATIONS

- Damiens E., Mazurier J., Spik G., Boilly-Marer Y. "Activité cytotoxique anti-tumorale des cellules NK et modulation par la lactoferrine".
  Forum des Jeunes Chercheurs en Biochimie et Biologie Moléculaire, 2-5 juillet 1996, Poitiers, France.

- Damiens E., Masson M., Mazurier J., Spik G., Boilly-Marer Y. "Effects of lactoferrin on Natural Killer cell cytotoxicity".
  International Iron Club, 11-14 septembre 1996, Jaca, Spain.

- Damiens E., Masson M., El Yazidi I., Mazurier J., Spik G., Boilly-Marer Y. "Antineoplastic activities of lactoferrin".
  Colloque Lille-ULB, 9 janvier1997, Bruxelles, Belgique.

- Damiens E., El Yazidi I., Mazurier J., Masson M., Spik G., Boilly-Marer Y. "Effects of human lactoferrin on NK cell cytotoxicity and on the inhibition of epithelial tumor cell growth".
  Third international conference on lactoferrin, 5-9 mai 1997, Le Touquet, France.

- Damiens E., El Yazidi I., Mazurier J., Duthille I., Masson M., Spik G., Boilly-Marer Y. "Lactoferrin inhibits G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells"
  25th Silver Jubilee FEBS Meeting, 5-10 juillet 1998, Copenhague, Danemark.

PUBLICATIONS

- Damiens E., Mazurier J., El Yazidi I., Masson M., Duthille I., Spik G., Boilly-Marer Y. (1998). « Effects of human lactoferrin on NK cell cytotoxicity against haematopoietic and epithelial tumour cells ». *Biochim. Biophys. Acta*, **1402**, 277-287.

- Damiens E., El Yazidi I., Mazurier J., Duthille I., Spik G., Boilly-Marer Y. (1998). « Lactoferrin inhibits G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells ». Soumis *à J. Cell. Biochem.*

- Damiens E., El Yazidi I., Mazurier J., Elass-Rochard E., Duthille I., Spik G., Boilly-Marer Y. (1998). Role of heparan sulphate proteoglycans in the regulation of human lactoferrin binding and activity in the MDA-MB-231 breast cancer cell line ». Sous presse dans *Eur. J. Cell Biol.*

Généralités

La lactoferrine humaine, encore appelée lactotransferrine, est une glycoprotéine isolée du lait de femme et décrite pour la première fois par Montreuil et collaborateurs (1960). La lactoferrine est un membre de la famille des transferrines (Montreuil *et al.*, 1997). Cette famille comprend également la sérotransferrine détectée dans le sérum de tous les vertébrés (Schade et Caroline, 1946) et la mélanotransferrine isolée à la surface des mélanomes humains (Brown *et al.*, 1980, 1982). Ces transferrines présentent un ensemble de caractéristiques communes. En effet, toutes les transferrines sont des glycoprotéines constituées d'une seule chaîne peptidique de masse moléculaire voisine de 80000 daltons. Elles transportent des ligands polyanioniques en fixant réversiblement le ligand à l'interface de 2 domaines structuraux (Louie, 1993). Le ligand polyanionique fixé par les transferrines est un ion carbonate associé à un ion métallique qui est le plus souvent le fer ferrique. Ces glycoprotéines en complexant l'ion ferrique empêchent la formation d'hydroxydes insolubles et maintiennent donc le fer disponible pour l'organisme dans les conditions physiologiques.

Au cours des chapitres suivants nous rappellerons les connaissances actuelles concernant la biosynthèse, l'expression et la structure de la lactoferrine. Nous étudierons ensuite ses rôles biologiques, en particulier dans les processus de prolifération et le développement des cancers.

I. BIOSYNTHESE DE LA LACTOFERRINE

I.1. STRUCTURE GENIQUE DE LA LACTOFERRINE

L'isolement d'un ADN complémentaire contenant la séquence codante de la lactoferrine a permis la localisation du gène sur le chromosome 9 chez la souris (Teng *et al.*, 1987). La lactoferrine murine est codée par un gène unique d'une longueur de 30 kb. Le gène est organisé en 17 exons de longueur comprise entre 48 et 190 pb. Il existe de fortes homologies entre les régions codantes, ainsi 14 de ces exons constituent 7 paires homologues codant les domaines N- et C- terminaux de la protéine. Ces exons sont séparés par 16 séquences introniques de 0,2 à 4,3 kb. De plus, l'analyse structurale de ce gène a permis la mise en évidence d'un modèle de distribution intron-exon similaire à ceux trouvés pour la sérotransferrine humaine et l'ovotransferrine (Cunningham *et al.*, 1992). Ces résultats suggèrent que les gènes de la famille des transferrines proviennent de la duplication d'un gène ancestral commun (Bowman *et al.*, 1988 ; Shirsat *et al.*, 1992). L'analyse de la région 5' non

codante (5'NC) a permis de montrer l'existence d'une boîte TATA imparfaite (GATAA) entourée de séquences riches en GC immédiatement en amont du site d'initiation de la transcription ainsi que d'un motif CCAAT en position -66 à -70 (Shirsat *et al.*, 1992). Il a également été trouvé des séquences homologues au site consensus de liaison de Sp1 (PU box), une région de 200 pb présentant une très grande homologie avec une séquence consensus identifiée dans la région 5' flanquante du gène de la myéloperoxydase, gène également exprimé dans les granulocytes neutrophiles (Shirsat *et al.*, 1992). De plus, un élément de réponse aux oestrogènes (ERE) imparfait chevauchant une séquence consensus COUP ("Chicken Ovalbumin Upstream Promoter") a été mis en évidence dans le promoteur du gène de la lactoferrine murine. ERE/COUP forme un module de réponse aux oestrogènes composite désigné mERM (Liu et Teng, 1991, 1992 ; Teng *et al.*, 1992). Shi et Teng (1994) ont également identifié une séquence «mitogen response module» de réponse à l'EGF/TGF-α, à l'AMP cyclique, à la forskoline et au TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate). Cette séquence située à -75, -40 pb en amont du site d'initiation de la transcription comporte également un site mLf-CRE capable de fixer les facteurs de transcription AP1 et CREB ("Cyclic AMP Responsive Element Binding Protein") (Figure 1, p. 17).

Le gène de la lactoferrine humaine a été localisé sur le chromosome 3 (q21 à q23) (Mc Coombs *et al.*, 1988). L'organisation génomique reste encore mal définie. La région 3'NC comporte un codon STOP et un site potentiel de polyadénylation (Rado *et al.*, 1987). L'ADN complémentaire de la lactoferrine humaine, cloné à partir d'une lignée cellulaire de leucémie myéloïde chronique (Johnston *et al.*, 1992) et d'une banque génomique placentaire humaine (Teng *et al.*, 1992), a permis l'étude de la région 5'NC et du promoteur du gène. L'analyse et la comparaison des séquences nucléotidiques des ADN complémentaires humain et murin montrent 76% d'homologies, les régions 5' flanquantes présentent 49% d'homologies et 70% au niveau des promoteurs. Leurs organisations structurales sont compatibles et un certain nombre d'éléments sont conservés. Le promoteur du gène de la lactoferrine humaine comporte une TATA box en position -32 à -27 pb en amont du site d'initiation de la transcription et une séquence CAAC en position -55 à -52 pb. La région -26 à 1 pb est très riche en GC (77%). Une séquence consensus pour Sp1 a été localisée de -50 à -45 pb ainsi qu'une PU box (Pu1/Sp1). Un élément de réponse composite ERE/COUP a également été identifié en position -342 à -326 pb (Teng *et al.*, 1992). De plus, Lee et coll. (1995a) ont mis en évidence

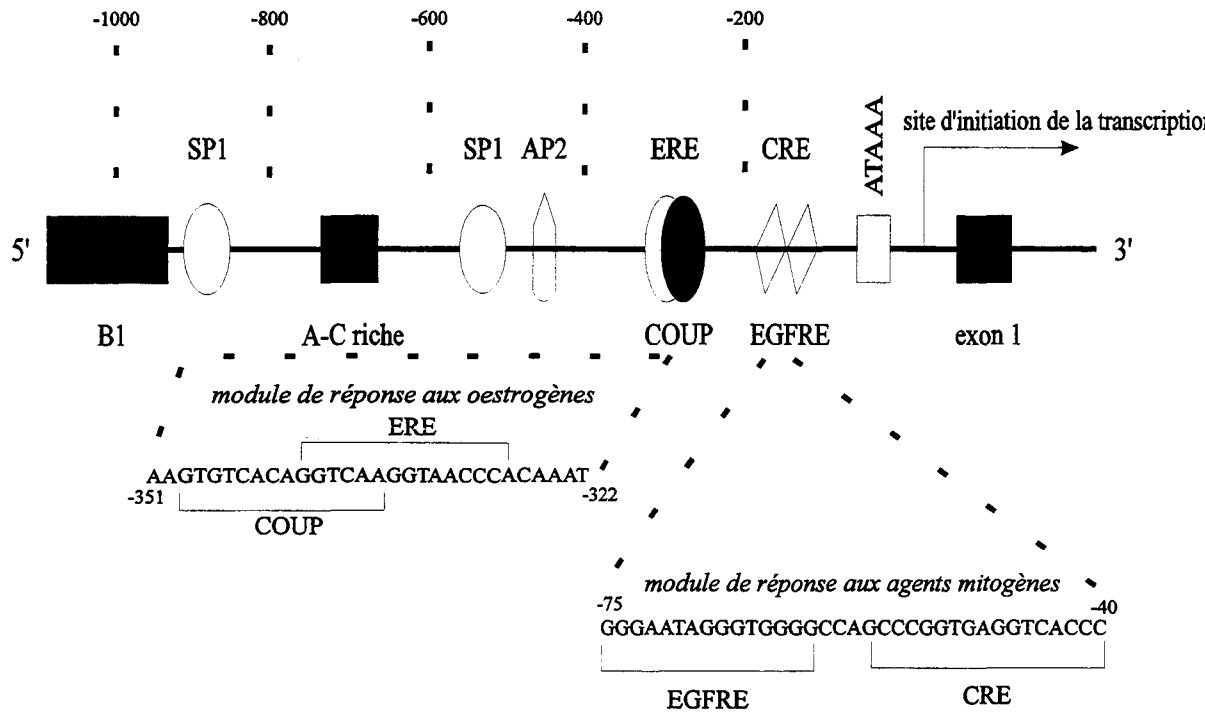


Figure 1. Représentation schématique des éléments régulateurs putatifs de la région 5' flanquante du gène de la lactoferrine murine (Teng, 1995).
Les régions 5' flanquantes humaine et murine présentent 49 % d'homologies et 70 % au niveau du promoteur (Teng *et al.*, 1992).

un élément de réponse à l'acide rétinoïque (RARE) chevauchant un élément de réponse aux oestrogènes (ERE).

L'utilisation d'enzymes de restriction Xba I et Msp I ont permis de montrer que le gène de la lactoferrine humaine est polymorphe et présente des variations dans le profil de méthylation de l'ADN entre les tissus normaux et cancéreux. En effet, le profil de méthylation de l'ADN est très variable dans les tissus cancéreux mais l'ADN est en général moins méthylé que dans les tissus normaux (Panella *et al.*, 1991).

Le gène de la lactoferrine humaine est transcrit en deux ARN messagers de 2.5 kb: Lf ARNm et ΔLf ARNm. Le ΔLf ARNm est obtenu par utilisation d'un promoteur alternatif et d'un épissage alternatif au niveau de l'exon I remplaçant ainsi la séquence du peptide signal du Lf ARNm par une séquence exonique nommée 1β. La distribution de ces transcrits semble être corrélée au phénotype normal ou malin des tissus. En effet, le ΔLf ARNm présent dans les tissus normaux n'est pas détectable dans diverses lignées cellulaires tumorales de différentes origines (Siebert et Huang, 1997).

I.2. Regulation de l'expression du gene de la lactoferrine

De nombreuses études portant sur la localisation cellulaire et tissulaire de la lactoferrine ont montré que le gène de la lactoferrine est exprimé dans de nombreux tissus en particulier la moelle osseuse, la glande mammaire et l'utérus. Il est apparu par ailleurs que l'expression de ce gène est régulée différemment selon le stade de différenciation et le type cellulaire.

I.2.1. *Expression du gène de la lactoferrine au cours de la granulopoïèse*

L'isolement d'un clone d'ADN complémentaire de la lactoferrine à partir d'une lignée cellulaire myéloïde a permis d'étudier l'expression du gène de la lactoferrine aux différents stades de la granulopoïèse (Rado *et al.*, 1984, 1987). Il est apparu que ce gène est fortement exprimé aux stades tardifs de la différenciation granulocytaire. En effet, il n'y a pas de biosynthèse de la lactoferrine dans les myéloblastes et les promyélocytes. Par contre, cette biosynthèse est importante dans les myélocytes, les métamyélocytes et la population granulocytaire circulante, à la fois dans les tissus normaux et dans le cas de leucémie myéloïde chronique. Cette biosynthèse de la lactoferrine est donc liée à l'apparition d'ARNm

au stade myélocytaire et coïncide avec le développement des granules secondaires (Rado *et al.*, 1984, 1987 ; Lomax *et al.*, 1989 ; Johnston *et al.*, 1992). Cependant, la régulation de l'expression de ce gène dans les cellules myéloïdes reste mal connue.

L'acide rétinoïque est un inducteur potentiel du processus de différenciation terminale des cellules myéloïdes (Breitman *et al.*, 1980, 1981). Récemment, l'identification d'une séquence RARE ("Retinoic Acid Responsive Element") a permis d'émettre une nouvelle hypothèse concernant le mécanisme de régulation de l'expression de ce gène dans le tissu hématopoïétique. En effet, l'élément de réponse RARE fonctionnel dans le promoteur du gène de la lactoferrine des cellules hématopoïétiques ne l'est pas dans celui des cellules épithéliales mammaires cancéreuses. Ces observations suggèrent que l'acide rétinoïque et ses récepteurs nucléaires pourraient être impliqués dans la régulation de l'expression du gène de la lactoferrine dans les cellules hématopoïétiques. Cependant, le promoteur du gène de la lactoferrine ne peut être activé par l'acide rétinoïque et ses récepteurs dans les cellules leucémiques HL-60 et U937 bien que le promoteur soit activé dans les cellules CV-1 (Lee *et al.*, 1995a). Ces résultats confirment l'absence d'expression du gène de la lactoferrine dans les cellules HL-60 bloquées à un stade de différenciation précédant la formation des granules secondaires (Rado *et al.*, 1984 ; Johnston *et al.*, 1992). De plus, ils suggèrent que des facteurs autres que l'acide rétinoïque et ses récepteurs sont requis dans l'activation de l'expression du gène de la lactoferrine dans les cellules hématopoïétiques. Le fait que les éléments de réponse aux oestrogènes et à l'acide rétinoïque se chevauchent laisse à penser qu'il peut exister une compétition entre ces facteurs pour la liaison à l'élément composite ERE/RARE. D'une part, l'élément ERE/RARE pourrait servir de module majeur conférant différentes sensibilités hormonales en fonction du type cellulaire. D'autre part, en se liant fortement sur cette séquence composite, le facteur de transcription de COUP (COUP-Tf) semble pouvoir réguler négativement l'activation du promoteur par l'acide rétinoïque ou les oestrogènes selon les tissus.

I.2.2. *Expression du gène de la lactoferrine dans les organes de reproduction*

La glande mammaire ainsi que les organes de reproduction sont sous le contrôle d'une régulation hormonale tissu spécifique. La régulation de l'expression du gène de la lactoferrine par les oestrogènes dans l'utérus murin a été clairement établie (Teng *et al.*, 1986 ; Pentecost et Teng, 1987). Les oestrogènes régulent la synthèse et la sécrétion de la lactoferrine dans

l'utérus de façon dépendante de la dose et du temps (Teng *et al.*, 1989). D'autre part, une étude clinique chez la femme a montré que l'expression de ce gène dans l'endomètre est également corrélée aux taux d'oestrogènes circulants pendant le cycle menstruel (Teng *et al.*, 1992). Par contre, les oestrogènes ne stimuleraient pas la production de lactoferrine au niveau de la glande mammaire de souris immature. Les taux d'ARNm et de la protéine dans la glande mammaire en période de lactation ne sont pas corrélés avec les taux d'oestrogènes circulants. En effet, l'analyse d'explants mammaires de souris en gestation a montré que la sécrétion de lactoferrine serait stimulée non par les oestrogènes mais par la prolactine (Green et Pastewka, 1978).

L'existence d'une régulation de l'expression du gène de la lactoferrine dans le tissu utérin a permis d'envisager l'existence d'éléments de réponse aux hormones (HRE) et en particulier aux oestrogènes (ERE) dans le promoteur du gène de la lactoferrine. En effet, l'analyse de la région 5'NC et du promoteur du gène de la lactoferrine a permis la mise en évidence d'une séquence consensus ERE/COUP (voir p. 16). Le facteur de transcription de COUP (COUP-Tf) régule négativement l'activation du gène par les oestrogènes. Cependant, le mécanisme moléculaire de régulation de l'expression du gène de la lactoferrine semble différent chez l'homme par rapport à la souris. En effet, COUP-Tf se lie à des séquences différentes de l'élément composite ERE/COUP dans le promoteur du gène de la lactoferrine humaine (Teng *et al.*, 1992 ; Yang et Teng, 1994).

Les promoteurs des gènes des cellules eucaryotes sont constitués d'éléments de régulation modulant positivement ou négativement l'activité transcriptionnelle (Yamamoto, 1985). En ce qui concerne les gènes sensibles à l'action d'hormones stéroïdes, la régulation est modulée par la fixation de récepteurs d'hormone stéroïde à leurs éléments de réponse respectifs au niveau du promoteur du gène. Dans de nombreux cas, d'autres facteurs de transcription, se liant près de ces éléments de réponse, interagissent avec les récepteurs des hormones stéroïdes afin de moduler la réponse hormonale (Bruggemeier *et al.*, 1991 ; Espinas *et al.*, 1994). Il apparaît donc que la réponse d'un gène à un stimulus hormonal est le résultat d'interactions complexes entre les récepteurs des stéroïdes et d'autres facteurs de transcription. Récemment, une séquence désignée FP1 a été identifiée en amont de l'élément composite ERE/COUP du promoteur du gène de la lactoferrine humaine. Cette séquence FP1 comporte 3 domaines de liaison de protéines nucléaires à l'ADN (c1, c2 et c3). COUP-Tf se lie au domaine c2, alors que le domaine c1 est capable de fixer un récepteur nucléaire orphelin désigné hERR1. hERR1 ne serait pas un coactivateur de l'action des oestrogènes mais

pourrait être, par contre, impliqué à part entière dans le module de réponse aux oestrogènes agissant spécifiquement au niveau du gène de la lactoferrine humaine (Yang *et al.*, 1996).

Les facteurs régulant l'expression de la lactoferrine au niveau de la rate, des poumons, des reins, des glandes submaxillaires sont encore inconnus. Il apparaît intéressant de rechercher des facteurs tissu-spécifiques pouvant réguler l'expression du gène de la lactoferrine en le rendant sensible à certaines hormones en fonction des différents tissus.

I.2.3. *Expression du gène de la lactoferrine en fonction de la morphologie cellulaire*

La morphologie des cellules épithéliales mammaires, comme d'autres cellules adhérentes, est très sensible à la densité cellulaire et aux changements survenant au niveau de la matrice extracellulaire environnante (Hynes et Yamada, 1982 ; Burridge *et al.*, 1988). Un même type cellulaire présente donc différentes morphologies en fonction des ligands de la matrice extracellulaire (West *et al.*, 1984). Or, la modulation de la morphologie cellulaire est connue pour réguler certaines fonctions cellulaires. Ainsi, il a été démontré que la matrice extracellulaire, en régulant la fixation et l'étalement de cellules endothéliales et d' hépatocytes sur leur support, contrôle leur croissance (Chen *et al.*, 1997) et que l'arrondissement de ces cellules ainsi que la diminution de leur adhérence stimulent la transcription sélective de gènes spécifiques (DiPersio *et al.*, 1991). Il a récemment été observé que cette régulation de l'expression génique est également applicable à la lactoferrine (Close *et al.*, 1997). *In vitro*, la lactoferrine est exprimée dans les cellules arrondies en absence de tout facteur microenvironnemental exogène à l'exception de l'insuline qui constituerait un facteur de survie (Merlo *et al.*, 1995). Cette expression du gène de la lactoferrine est abolie dans les cellules étalées (Close *et al.*, 1997). La régulation en fonction de la morphologie cellulaire serait fonctionnelle au cours de la grossesse, de la lactation et de l'involution mammaire (Roskelley *et al.*, 1995). Elle est contrôlée par des mécanismes transcriptionnels mais également post-transcriptionnels probablement par la transcription d'un facteur labile responsable de la dégradation de l'ARNm de la lactoferrine. La suppression de l'expression de la lactoferrine pourrait donc être le reflet d'une morphologie cellulaire et de modifications du cytosquelette "inappropriées" survenant au cours de circonstances particulières telles que le développement de tissus cancéreux ou la culture de lignées cellulaires en monocouche (Close *et al.*, 1997).

II. STRUCTURE DE LA LACTOFERRINE

II.1. SEQUENCE PRIMAIRE DE LA CHAINE PEPTIDIQUE

La séquence complète en acides aminés de la lactoferrine humaine a été déterminée par Metz-Boutigue et coll. (1984). Elle a ensuite été confirmée et affinée par séquençage nucléotidique d'un clone d'ADN complémentaire de la lactoferrine humaine avec déduction de la séquence peptidique (Rey *et al.*, 1990 ; Powell et Ogden, 1990). La lactoferrine est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 692 résidus d'acides aminés et possède une masse moléculaire de 80,6 kDa (Rey *et al.*, 1990). L'alignement de cette séquence a permis de mettre en évidence une homologie interne de 37% entre les moitiés N- et C-terminales de la protéine (Metz-Boutigue *et al.*, 1984).

La comparaison de toutes les séquences de transferrines déjà déterminées avec celle de la transferrine sérique a montré une homologie de 12% avec conservation de 84 résidus d'acides aminés (Baldwin, 1993). Parmi ceux-ci, les résidus de cystéine formant les 16 ponts disulfures ainsi que les 4 résidus ligands du fer présents dans chaque lobe de ces molécules sont intégralement conservés (Metz-Boutigue *et al.*, 1984 ; Anderson *et al.*, 1987, 1989).

II.2. STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE LA LACTOFERRINE

La structure tridimensionnelle de la lactoferrine humaine a été établie par diffraction des rayons X aux résolutions de 3,2 et 2,8 Å (Anderson *et al.*, 1987, 1989). La molécule est constituée de deux lobes dont la séquence en acides aminés possède une homologie d'environ 50%, le lobe N-terminal comprenant les résidus d'acides aminés 1 à 332 et le lobe C-terminal contenant les résidus 344 à 692. Ces deux lobes sont reliés entre eux par une hélice α de 3 tours de spire. Ils sont orientés en position antiparallèle (angle de 150°) (Figure 2, p. 23). Le lobe N-terminal peut se superposer au lobe C-terminal après une rotation de 180° et une translation de 25 Å.

Chaque lobe de la protéine est subdivisé en deux domaines d'environ 160 résidus d'acides aminés. Ces domaines possèdent une organisation structurale similaire basée sur l'alternance de feuillets plissés β recouverts de chaque côté par des boucles et des hélices α. Les premiers domaines appelés NI pour le lobe N-terminal et CI pour le lobe C-terminal sont constitués des extrémités N- et C-terminales de chaque moitié de la protéine. Ces domaines comprennent les résidus 1 à 91 et 253 à 320 pour NI, 345 à 433 et 596 à 663 pour CI. Les

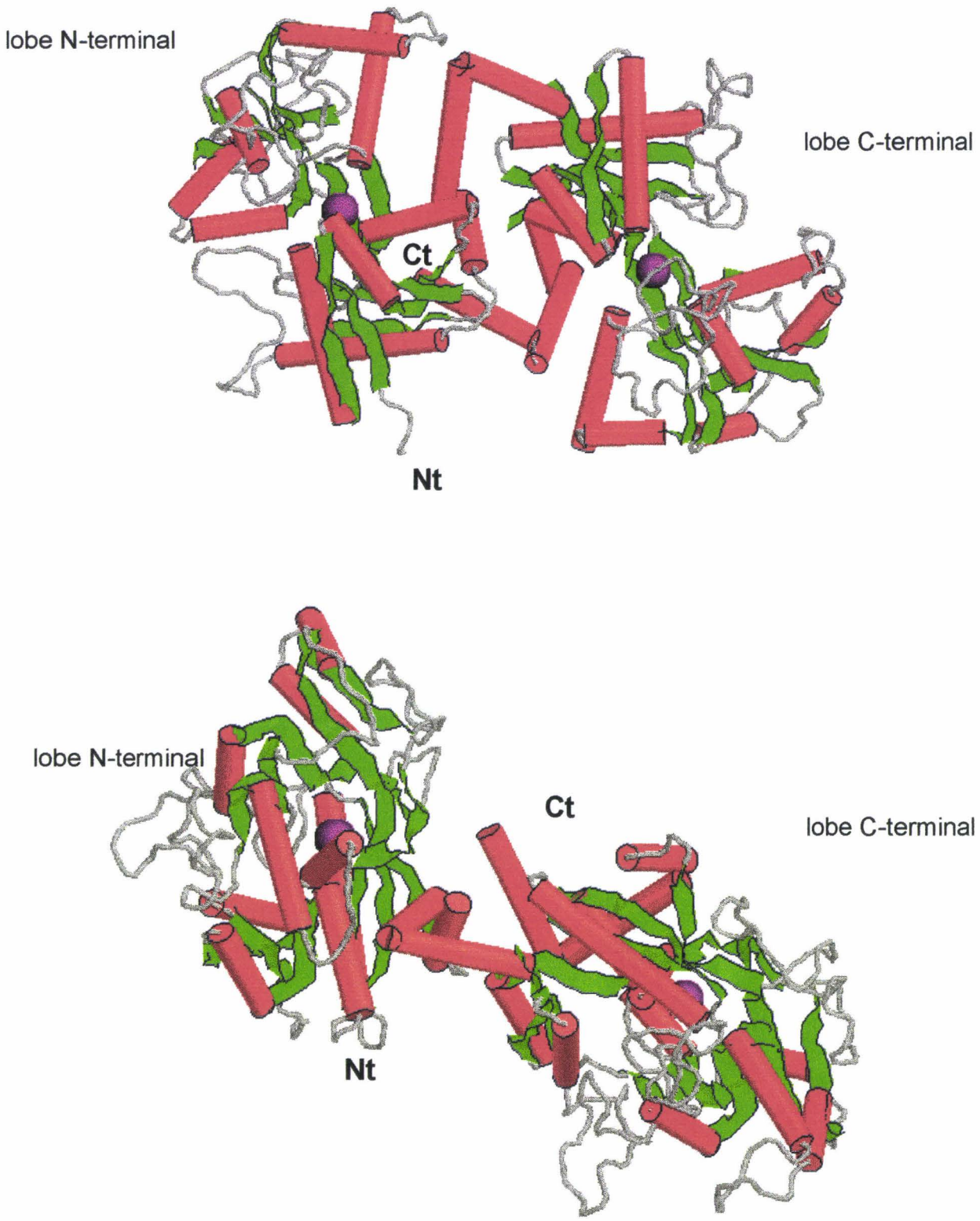


Figure 2. Structure tridimensionnelle de la lactoferrine.

seconds domaines désignés NII et CII sont constitués de la partie médiane de la chaîne peptidique. NII contient les résidus 92 à 252 et CII est constitué des résidus 434 à 595. Les sites de fixation du fer sont situés à l'interface des deux domaines de chaque lobe.

Dans la structure de l'apolactoferrine, le site de fixation du fer du lobe N-terminal est largement ouvert pendant que celui du lobe C-terminal est beaucoup plus fermé. La liaison du fer dans le lobe N-terminal de l'apolactoferrine s'accompagne d'une rotation de 54° du domaine NII. Le domaine NII se déplace sous la forme d'un ensemble rigide entraînant peu de modifications dans le repliement de la chaîne peptidique. Ce changement conformationnel se fait par l'intermédiaire d'une charnière formée de deux feuillets β plissés antiparallèles s'étendant en arrière du site de fixation du fer. Dans cette charnière, les résidus 90-92 et 250-252 des feuillets β plissés fléchissent de concert pour faire bouger le domaine NII. De plus, il existe une région hydrophobe entre les hélices α 5 et 11. Cette région hydrophobe fournit une surface glissante permettant aux deux hélices de bouger, maintenant dans le même temps les deux domaines NI et NII adjacents (Anderson *et al.*, 1994).

Le site de fixation du fer dans le lobe C-terminal de l'apolactoferrine est fermé. Cette conformation est probablement liée à une moins grande flexibilité du lobe C-terminal. En effet, il existe dans le lobe C-terminal un pont disulfure (483-677) liant les deux hélices α équivalentes aux hélices 5 et 11 trouvées dans le lobe N-terminal. La présence de ce pont disulfure pourrait restreindre les mouvements du domaine CII. De plus, les interactions entre les lobes N- et C- terminaux joueraient un rôle crucial dans la stabilisation de la conformation du site de liaison du fer dans la ferriprotéine (Day *et al.*, 1992).

II.3. Les glycannes de la lactoferrine humaine

De nombreuses protéines et notamment la lactoferrine (Spik *et al.*, 1982) sont modifiées au niveau post-traductionnel par N-glycosylation, un processus enzymatique au cours duquel des oligosaccharides sont liés de façon covalente sur des résidus Asn dans des séquences de type Asn-Xaa-Thr/Ser (Opdenakker *et al.*, 1993). Approximativement un tiers de ces séquences n'est pas glycosylé. Une des explications avancées est que ces sites ne sont pas accessibles aux enzymes de glycosylation (Grinnell *et al.*, 1991 ; Allen *et al.*, 1995).

D'après la séquence en acides aminés, la lactoferrine possède trois sites potentiels de N-glycosylation sur les résidus Asn 138 dans le lobe N-terminal et les résidus Asn 479 et 624 du lobe C-terminal. Cependant seuls les Asn 138 et 479 semblent préférentiellement

glycosylés. En effet, 85 % des molécules de lactoferrine humaine sont glycosylées sur ces deux sites. La glycosylation sur un seul site Asn 479 ou sur les trois sites ne se produit respectivement que dans 5 % et 9 % des cas. Il semble que la glycosylation sur le résidu Asn 479 limite la glycosylation sur le résidu Asn 624 (van Berkel *et al.*, 1996).

En plus de cette hétérogénéité de glycosylation sur les résidus Asn 138 et 624, il existe une microhétérogénéité au niveau de la structure des glycannes de la lactoferrine humaine (Spik *et al.*, 1982, 1988, 1993 ; Derisbourg *et al.*, 1990). En effet, une étude comparative de la structure primaire des glycannes de 19 sérotransferrines, lactoferrines et ovotransferrines de différentes espèces a révélé que ces glycannes sont caractéristiques de chaque espèce (Spik *et al.*, 1988 ; Montreuil *et al.*, 1997). De plus, dans le cas de la lactoferrine humaine, la structure des glycannes au sein de la même espèce présente des microhétérogénéités en fonction du lieu de biosynthèse (Derisbourg *et al.*, 1990). Ces microhétérogénéités sont liées au nombre variable d'acide sialique, à la présence ou à l'absence de fucose et à la polyanténisation (Spik *et al.*, 1982).

La lactoferrine isolée du lait de femme possède deux glycannes localisés dans les domaines NII et CII. Ces glycannes sont de type N-acétyllactosaminique, mono- ou disialylés et fucosylés. Les résidus de fucose sont branchés en α-1,6 sur la N-acétylglucosamine du point d'attache et parfois en α-1,3 sur la N-acétylglucosamine de l'antenne liée en α-1,6 (Spik *et al.*, 1982). La lactoferrine leucocytaire diffère de la précédente par l'absence totale des résidus de fucose (Derisbourg *et al.*, 1990).

III. STRUCTURE DES SITES ACTIFS ET DES SITES DE RECONNAISSANCE DES MOLECULES ET DES RECEPTEURS

De nombreuses fonctions biologiques ont été attribuées à la capacité de la lactoferrine à fixer le fer. Cependant de nombreuses études ont permis de définir différents sites et domaines de la lactoferrine possédant une activité biologique propre, indépendante de toute fixation de métal. Dans ce chapitre, nous ferons une synthèse de ces différents sites et domaines et de leurs activités respectives.

III.1. SITES DE FIXATION DES METAUX

Le fer ferrique (Fe^{3+}) est l'ion métallique communément fixé par la lactoferrine *in vivo*. L'affinité de la lactoferrine pour le fer est 260 fois plus forte que celle de la

sérotransferrine (Aisen et Listowsky, 1980), cependant l'apolactoferrine ne déplace pas le fer de la sérotransferrine. Le métal est fixé à l'interface des domaines NI et NII du lobe N-terminal et CI et CII du lobe C-terminal. La nature des ligands du fer a été précisée par diffraction des rayons X (Anderson *et al.*, 1987). Il s'agit de trois ligands anioniques (une histidine et deux tyrosines), d'un anion carbonate lié à un résidu d'arginine, d'un acide aspartique et d'une molécule d'eau. Pour chaque cation lié à la lactoferrine, un atome de carbonate est incorporé au site de liaison. Un tel anion est essentiel à la liaison du métal et sa présence facilite la saturation de la lactoferrine en fer (Anderson *et al.*, 1989, 1994 ; Baker *et al.*, 1994) (Figure 3, p. 27). La lactoferrine conserve particulièrement bien son fer à pH acide (Montreuil *et al.*, 1960). Il est nécessaire de descendre à un pH voisin de 2,5 pour désaturer complètement la lactoferrine humaine (Montreuil *et al.*, 1960 ; Princiotto et Zapolski, 1975).

Dans les systèmes biologiques, la lactoferrine peut également lier d'autres ions métalliques tels que le Cu II, le Mn II, et l'Al III (Harrington, 1992). Cependant, la proportion de molécules de lactoferrine occupées par ces autres cations que le fer est relativement faible (Lönnerdal *et al.*, 1985).

III.2. Domaine immunomodulateur de la lactoferrine

Une boucle formée par un pont disulfure est exposée à la surface de chaque lobe de la lactoferrine. Dans le lobe N-terminal, cette boucle comporte les résidus d'acides aminés 231-245. Son homologue dans le lobe C-terminal comprend les résidus 575-589. La boucle présente dans le lobe N-terminal a été identifiée comme étant une région à activité immunosuppressive. Cette activité immunosuppressive semble liée à la séquence Arg-Lys-Pro-Val-Asp. Cette séquence ressemble à celle de la thymopentine, un fragment actif de la thymopoïétine qui est un peptide immunostimulant produit par le thymus (Goldstein *et al.*, 1979). L'acide aspartique en position C-terminal de cette séquence favorise cette activité immunosuppressive. En effet, la même séquence est retrouvée dans le lobe C-terminal avec cependant le remplacement de l'acide aspartique par la thréonine. Cette séquence de la boucle C-terminale n'a aucune activité sur la réponse humorale (Siemion *et al.*, 1995).

De même, le résidu de lysine semble jouer un rôle très important dans l'activité de ce peptide. La délétion de la lysine dans le peptide de la boucle du lobe N-terminal provoque une nette diminution de l'activité. Par contre, cette délétion dans la séquence homologue du lobe

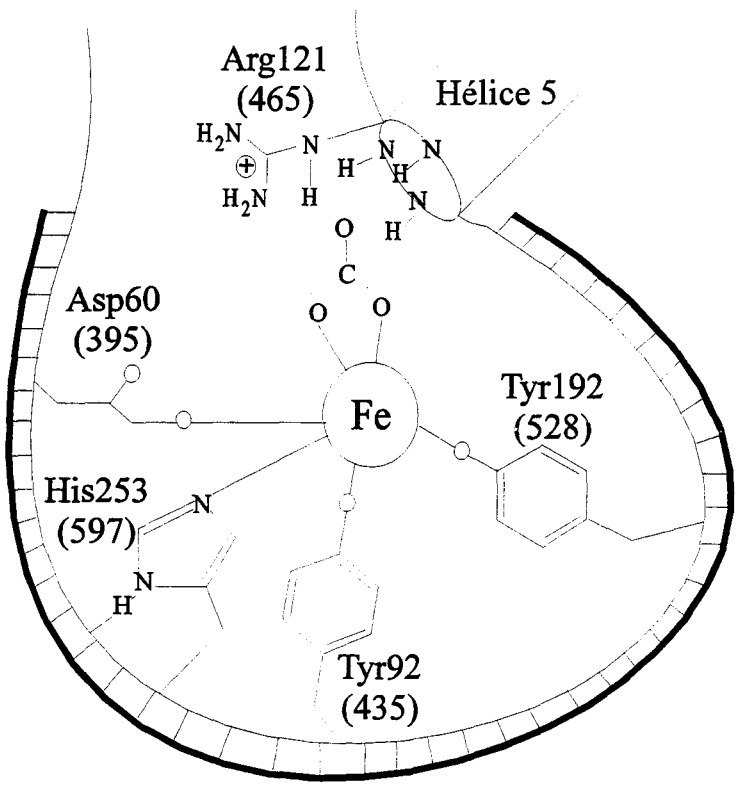


Figure 3. Représentation schématique du site de fixation du fer de la lactoferrine humaine (Anderson *et al.*, 1987, 1989, 1994)

C-terminal entraîne l'apparition d'une activité immunosuppressive à la fois humorale et cellulaire (Slon *et al.*, 1995).

D'autre part, deux régions à activité immunostimulante ont été mises en évidence. Il s'agit des régions 27-34 et 309-315 qui stimulent la réponse humorale *in vivo*. La région 27-34 appartient à la boucle 20-37 identifiée comme ayant des activités bactéricides et immunostimulantes (Bellamy *et al.*, 1992).

III.3. SEQUENCE DE LA LACTOFERRINE A ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

Récemment un peptide actif représentant le domaine antimicrobien de la lactoferrine humaine a été isolé et caractérisé par Bellamy et coll. (1992) dans la région N-terminale de la lactoferrine (Figure 4A, p. 31). Ce peptide désigné «lactoferricin H» est constitué des 47 premiers résidus d'acides aminés de la séquence polypeptidique de la lactoferrine humaine. Dans la lactoferricine H, la séquence antimicrobienne est essentiellement liée aux 18 résidus d'acides aminés de la boucle formée par un pont disulfure entre les cystéines 20 et 37 (Figure 4B, p. 31). De façon similaire à de nombreux peptides antimicrobiens, cette séquence est riche en acides aminés basiques. Son activité antibactérienne sur *Escherichia coli* 0111 est deux fois supérieure à celle de la lactoferrine entière (Tomita *et al.*, 1994).

Une séquence similaire a également été identifiée pour la lactoferrine bovine. Elle est constituée des résidus d'acides aminés 17-41 N-terminaux de la molécule (Tomita *et al.*, 1991). Cette séquence comporte une boucle d'acides aminés homologue à celle de la lactoferricine H. Cependant, son activité est beaucoup plus importante que celle de la lactoferricine H (Tomita *et al.*, 1994). La relation structure / activité de la lactoferricine B a été plus étudiée que celle de la lactoferricine H. Les dix premiers résidus N-terminaux de la lactoferricine B semblent être très importants dans cette activité antimicrobienne (Hoek *et al.*, 1997 ; Dionysius et Milne, 1997). L'analyse structurale de la lactoferricine B, par spectroscopie RMN 2D, révèle une structure tridimensionnelle en feuillets β anti-parallèles (Hwang *et al.*, 1998) qui contraste avec la structure en hélice α des résidus 1-13 définie par cristallisation et analyse par rayons X (Moore *et al.*, 1997). Il semble en fait que la structure secondaire adoptée dépend du contexte environnemental (Minor et Kim, 1996). Le polymorphisme α–β observé avec la lactoferricine B a déjà été décrit notamment pour le peptide Aβ impliqué dans la maladie d'Alzheimer (Mihara et Takahashi, 1997). La structure

cyclique ou linéarisée de la lactoferricine B n'influence pas de façon critique son efficacité antimicrobienne (Hoek *et al.*, 1997).

III.4. Site d'interaction avec les lipopolysaccharides

Le mécanisme d'action des peptides basiques antibactériens est basé sur leur capacité à interagir avec les molécules chargées négativement, présentes dans la membrane des bactéries. Ces molécules sont pour les bactéries $Gram^+$, l'acide lipotechoïque, et les lipopolysaccharides (LPS) pour les bactéries $Gram^-$. De même, il semble que l'activité antibactérienne de la lactoferricine soit liée à l'interaction avec ces molécules. En effet, la lactoferrine est capable de se fixer aux LPS (Ellison et Giehl, 1991) sur un site de fixation de haute affinité, le lipide A (Appelmelk *et al.*, 1994). Elass-Rochard et coll. (1995) ont ensuite montré que le peptide 28-34 appartenant au domaine antibactérien de la lactoferrine est essentiel pour la liaison de haute affinité aux LPS. Cette région interagit directement avec le lipide A. Cette interaction provoquerait une altération de la paroi bactérienne en désorganisant l'arrangement phospholipidique de la paroi. Elle entraînerait ainsi une libération de LPS à partir de la surface des bactéries $Gram^-$ (Ellison *et al.*, 1988, 1990).

III.5. Domaines d'interaction de la lactoferrine avec les glycosaminoglycannes

La chromatographie d'affinité sur héparine-Sépharose a été utilisée en routine pour purifier la lactoferrine (Blackberg et Hernell, 1980). En effet, la lactoferrine est capable de fixer les polysaccharides anioniques tels que les glycosaminoglycannes sulfatés (Zou *et al.*, 1992). Ces glycosaminoglycannes sont les composants sucrés majeurs des protéoglycannes trouvés dans les membranes de très nombreuses cellules.

Il a été établi que la lactoferrine humaine se lie aux glycosaminoglycannes par l'intermédiaire d'une région localisée au niveau des 33 premiers résidus d'acides aminés de la protéine mature. Cette région contient deux zones riches en acides aminés basiques ressemblant aux séquences consensus trouvées dans d'autres protéines liant les glycosaminoglycannes (Cardin et Weintraub, 1989). Dans la structure tridimensionnelle, ces deux séquences consensus, juxtaposées et exposées à la surface de la protéine, agissent en synergie pour lier les glycosaminoglycannes (Figure 4C, p. 31). D'après Mann et coll. (1994), il semble que la capacité de la lactoferrine à lier ces glycosaminoglycannes soit principalement due aux cinq premiers résidus d'acides aminés Gly^1-Arg^2-Arg^3-Arg^4-Arg^5. Particulièrement, les deux résidus d'arginine en position 4 et 5 auraient un rôle crucial dans

cette liaison. Cependant, en se basant sur la structure cristallographique et leurs observations, Wu et coll. (1995) ont défini un motif unique de fixation aux glycosaminoglycannes formé des arginines 5, 25, 28 et 31 et de la lysine 29.

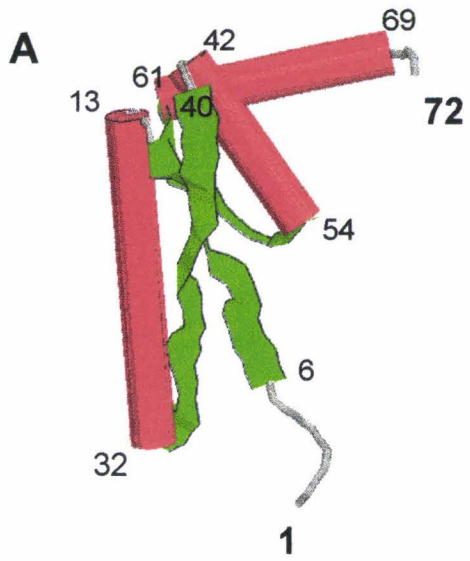
D'autre part, Legrand et coll. (1997) ont recherché l'importance des résidus Arg2, 3, 4 et 5 dans la fixation de la lactoferrine aux cellules de la lignée T lymphoblastique Jurkat. Pour ceci, ils ont utilisé différentes lactoferrines délétées en position N-terminale (hLf^{2N}, hLf^{3N}, hLf^{4N}) par traitement à la trypsine ainsi qu'une lactoferrine recombinante dépourvue des 5 premiers résidus N-terminaux ($rhLf^{5N}$). Les auteurs ont ainsi montré que la fixation à un nombre réduit de sites correspondant probablement au récepteur de haute affinité est indépendante du groupe basique N-terminal. Ces résidus N-terminaux semblent même perturber la fixation de la lactoferrine à ces sites. En effet, après l'élimination du groupe basique, l'affinité de la lactoferrine pour ce site est fortement augmentée (hLf native Kd = 70 nM ; $rhLf^{5N}$ Kd = 12 nM). Par contre l'interaction de la lactoferrine avec le plus grand nombre de sites (sites de basse affinité) est dépendante des résidus Arg2, 3, 4 mais pas du résidu Arg5.

Les conclusions restent donc relativement contradictoires et le site de fixation aux glycosaminoglycannes, imputant les deux séquences consensus, n'a pas encore été clairement défini.

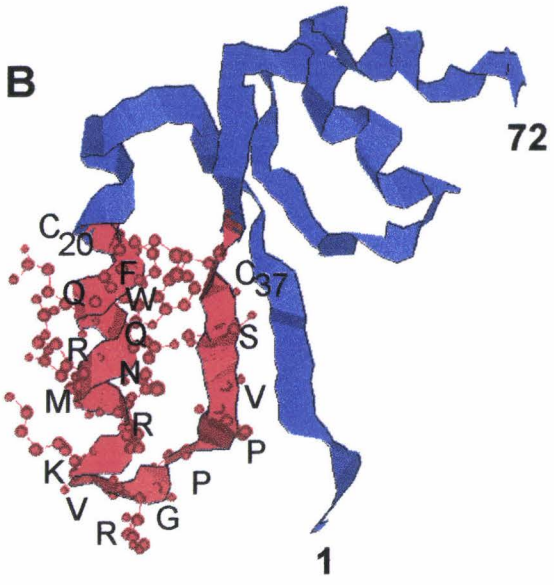
III.6. Domaines d'interaction avec le recepteur lymphocytaire

Un récepteur spécifique de haute affinité dont le rôle biologique reste mal défini a été caractérisé sur les plaquettes (Leveugle *et al.*, 1993) et à la surface des lymphocytes du sang périphérique stimulés par la phytohémagglutinine (Mazurier *et al.*, 1989). Ce récepteur est également exprimé à la surface des cellules de la lignée T-lymphoblastique Jurkat (Bi *et al.*, 1994).

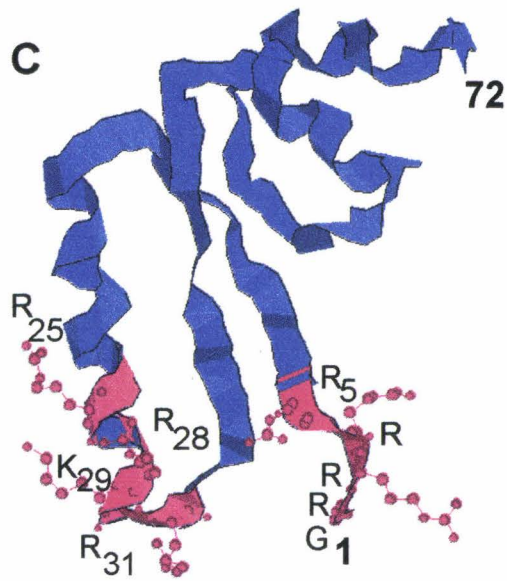
L'étude de la fixation de lactoferrines modifiées et de fragments protéolytiques obtenus par protéolyse ménagée de la lactoferrine a permis de montrer que le site de fixation au récepteur se situe dans le lobe N-terminal de la lactoferrine au niveau d'une région contenant les résidus 4 à 52 de la molécule (Rochard *et al.*, 1989). L'analyse par modélisation moléculaire de la région 4-52 du lobe N-terminal a permis d'envisager que les zones 28-34 et 39-45 soient impliquées dans le site d'interaction avec le récepteur lymphocytaire (Legrand *et al.*, 1991, 1992) (Figure 4D, p. 31).



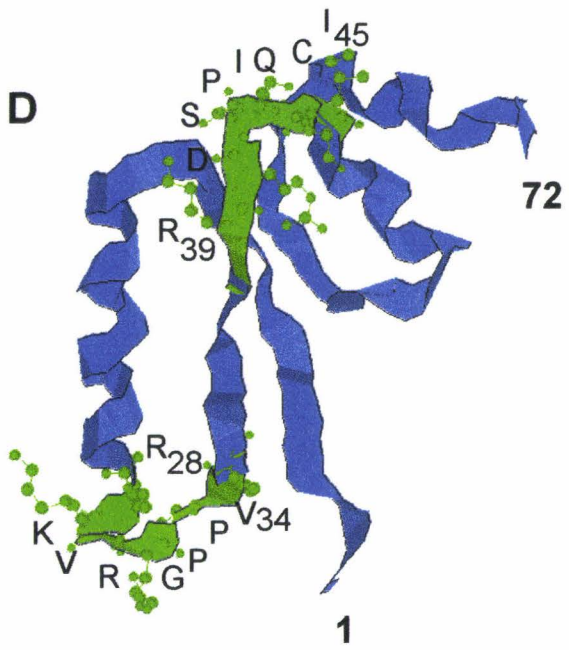
Structure conformationnelle de la région N-terminale (1-71) de la lactoferrine humaine



Domaine à activité antimicrobienne de la lactoferrine



Sites d'interaction de la lactoferrine avec les glycosaminoglycannes.

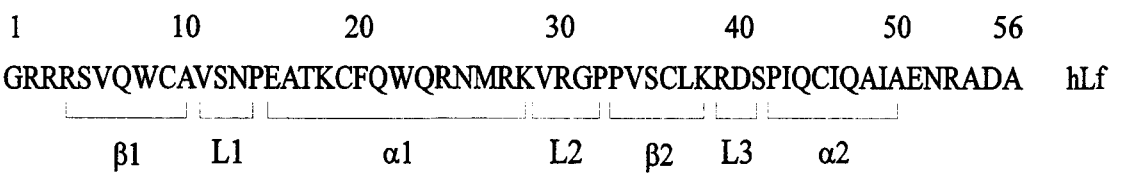


Domaine d'interaction de la lactoferrine avec le récepteur lymphocytaire.

Figure 4. Structure des sites actifs et des sites de reconnaissance des molécules et des récepteurs.

Plus récemment, l'utilisation combinée des méthodes QSAR ("Quantitative Structure Activity Relationship") et CoMFA ("Comparative Molecular Fields Analysis") a montré l'importance de l'établissement de liaisons hydrogène dans l'interaction spécifique lactoferrine-récepteur. Ces deux méthodes ont permis de définir deux sites de liaison impliqués dans l'interaction avec le récepteur. Le premier, localisé au niveau de l'hélice α1 et du feuillet β2 plissé, est important dans la sélectivité d'espèce. Il fait intervenir les groupements chimiques des résidus d'acides aminés [Arg3 (-NH), Gln7 (=O), Gln23 (=O), Arg24 (-NH) et Ser38 (-OH)]. Le second site de liaison interviendrait dans la force de liaison au récepteur. Ce site, localisé au niveau des boucles L1 et L3, impliquerait les résidus d'acides aminés Pro14, Phe20, Asp43, Ser44, Pro45 et la Gln47 (Elass *et al.*, 1996a) (Figure 5, p. 32). De plus, l'analyse des énergies d'interaction stérique suggère que les résidus d'acides aminés Arg3, Phe20, Gln21, Gln23, Arg24, Arg27, Ser38 et Gln47 sont essentiels à l'interaction lactoferrine-récepteur (Elass *et al.*, 1996b).

Figure 5. Séquence N-terminale (résidus 1-56) : Disposition des feuillets β, des hélices α et des boucles (Elass *et al.*, 1996a)



III.7. Domaine d'interaction de la lactoferrine avec le recepteur des apolipoproteines de faible densite

L'excès de lactoferrine humaine réduit la clairance hépatique des chylomicrons résiduels de la circulation sanguine du rat (Huettinger *et al.*, 1988, 1992 ; Ziere *et al.*, 1992). Le récepteur responsable de la capture hépatique des lipoprotéines portant l'apolipoprotéine E (β-VLDL ou chylomicrons résiduels) est appelé récepteur "remnant". La nature de ce récepteur n'a pas encore été clairement identifiée. Il a été suggéré que la lactoferrine entre en compétition avec l'apolipoprotéine E pour la liaison au récepteur "remnant". Cette compétition serait liée à l'existence d'une séquence riche en résidus cationiques dans la lactoferrine humaine. Cette séquence $Lf^{25\text{-}31}$ (Arg^{25}-X^{26}-X^{27}-Arg^{28}-Lys^{29}-X^{30}-Arg^{31}) mimerait la structure de reconnaissance de l'apolipoprotéine E par les cellules hépatiques ($ApoE^{142\text{-}147}$: Arg^{142}-X^{143}-X^{144}-Arg^{145}-Lys^{146}-Arg^{147}) (Huettinger *et al.*, 1992).

IV. DISTRIBUTIONS CELLULAIRE ET TISSULAIRE DE LA LACTOFERRINE

IV.1. LES SECRETIONS BIOLOGIQUES

IV.1.1. *Le lait*

La lactoferrine a été initialement décrite comme une protéine de couleur saumon présente dans le lait de vache (Sørensen et Sørensen, 1939). D'autres études ont révélé que la lactoferrine est présente dans les sécrétions lactées de nombreux mammifères et, en particulier, chez la femme (Montreuil *et al.*, 1960 ; Montreuil et Mullet, 1960 ; Johansson, 1960 ; Masson et Heremans, 1971).

Le lait de femme est particulièrement riche en lactoferrine. La concentration en lactoferrine est de 5 à 7 g/l dans le colostrum, elle diminue ensuite dans le lait de transition (3,7 g/l) pour atteindre une concentration de 1 à 3 g/l dans le lait mature (Hirai *et al.*, 1990 ; Levay et Viljoen, 1995 pour revue générale). La concentration en fer et le taux de saturation en fer de la lactoferrine dans le lait humain ne varient pas significativement au cours des trois stades précédemment cités. La lactoferrine se trouve essentiellement sous une forme faiblement saturée en fer. En effet, la quantité de fer fixée ne correspond qu'à 6 à 8% de la capacité totale de fixation du fer par la protéine. La concentration du lait en lactoferrine ne semble pas varier en fonction du statut martial (Prentice *et al.*, 1989). Par contre, un état de malnutrition semble affecter la concentration du lait en lactoferrine (Houghton *et al.*, 1985 ; Hennart *et al.*, 1991).

La lactoferrine n'est pas seulement présente dans le lait humain. On la trouve également dans de nombreuses sécrétions exocrines telles que les larmes (Broekhuyse, 1974), la salive (Masson, 1970), le liquide synovial, le plasma séminal (Hekman et Rümke, 1969), la bile (van Gut *et al.*, 1975), les sécrétions bronchiques (Biserte *et al.*, 1963), le mucus cervical et gastro-intestinal (Masson, 1970) et le sang. Dans ces sécrétions, la lactoferrine est généralement associée au lysozyme et à des immunoglobulines A de sécrétion (IgAs) synthétisées par le système lymphoïde affleurant les épithélia (Jorieux *et al.*, 1985).

IV.1.2. *Le sang*

La lactoferrine plasmatique humaine provient en grande partie de la dégranulation des polynucléaires neutrophiles (Iyer et Lönnerdal, 1993). La concentration plasmatique de la

lactoferrine varie de façon importante selon les études: 0,02-0,20 µg/ml (Otnaess *et al.*, 1983) jusqu'à 1,520 ± 0.560 µg/ml (Olofsson *et al.*, 1977). Elle semble corrélée au nombre de polynucléaires neutrophiles circulants et à leur capacité de dégranulation (Baynes *et al.*, 1986). En effet, la lactoferrine est présente dans les granules secondaires des polynucléaires neutrophiles mais également, quoiqu'en plus faible concentration, dans d'autres granules, probablement des granules tertiaires (Saito *et al.*, 1993). La moelle osseuse, l'endomètre et le placenta pourraient également influer sur les taux sanguins de lactoferrine (Niemelä *et al.*, 1989). D'autre part, de nombreuses études suggèrent que les taux plasmatiques de lactoferrine seraient sous contrôle hormonal. Ainsi, les taux plasmatiques de lactoferrine sont plus élevés chez l'homme que chez la femme (Antonsen *et al.*, 1993). Ils varient au cours du cycle menstruel (Antonsen, 1993), et sont plus élevés chez la femme après la ménopause (Bennett et Mohla, 1976). Les processus inflammatoires, les maladies infectieuses et le développement de tumeurs induisent aussi une augmentation des taux sanguins de lactoferrine (Adeyemi *et al.*, 1990 ; Nuijens *et al.*, 1992). Ces observations démontrent un mécanisme de stimulation multifactoriel de la libération de la lactoferrine par les neutrophiles.

IV.2. LOCALISATIONS TISSULAIRES NORMALE ET PATHOLOGIQUE DE LA LACTOFERRINE

De nombreuses études utilisant des méthodes d'immunohistochimie, d'hybridation *in situ* et de "Northern blot" ont également permis de définir les lieux de synthèse et la localisation de la lactoferrine dans les tissus humains normaux et pathologiques.

IV.2.1. *La glande mammaire*

α. La glande mammaire au repos

Les lobules de la glande mammaire forment des îlots de tissu glandulaire dans une vaste masse de tissu conjonctif dense fibreux et adipeux. Ces lobules sont constitués de canaux alvéolaires bordés par un épithélium cubique reposant sur une membrane basale. Dans cette glande mammaire au repos, l'épithélium des canaux subit des changements cycliques sous l'influence des hormones ovariennes.

Campbell et coll. (1992) ont montré que la lactoferrine est exprimée sous la forme d'un ARNm de 2,5 kb dans le tissu mammaire normal au repos. L'analyse immunohistochimique a

confirmé la présence de lactoferrine au niveau des lobules (îlots de tissu glandulaire) et de l'épithélium des canaux.

β. La glande mammaire en activité

Sous l'influence des oestrogènes et de la progestérone, l'épithélium des canaux alvéolaires prolifère pour former de nombreuses alvéoles sécrétoires. La prolifération de la glande mammaire est également sous le contrôle de la prolactine. Les glandes alvéolaires commencent à sécréter le colostrum qui s'accumule et dilate les lumières des glandes alvéolaires et des canaux. Après l'accouchement, les taux de progestérone et d'oestrogènes circulants chutent provoquant l'activité de la prolactine. La prolactine stimule la production de lait. La glande mammaire est alors presque uniquement constituée de tissu glandulaire. Les alvéoles sont largement dilatées par le lait. En fin d'allaitement, la cessation du stimulus de succion inhibe la libération d'hormones hypophysaires, dont la prolactine, et conduit à la régression de la glande mammaire et à la reprise du cycle ovarien.

Dans la glande lactante, l'analyse en "Northern Blot" a permis de mettre en évidence une quantité très importante d'ARNm de la lactoferrine de 2,5 kb. La lactoferrine est exprimée au niveau de l'épithélium des corps glandulaires, de l'épithélium des canaux et au niveau des sécrétions canalaires (Miyauchi, 1984 ; Campbell *et al.*, 1992).

γ. Les carcinomes mammaires

Les différentes études d'immunohistochimie réalisées dans le cas de carcinomes mammaires humains ont conduit à des résultats très variables. En effet, Rossiello et coll. (1984) n'ont pas mis en évidence de lactoferrine dans les épithéliums de 40 cas de carcinomes mammaires analysés. Mason et Taylor (1978) ont rapporté un cas positif sur 12 carcinomes. De même Charpin et coll. (1985) ont détecté la lactoferrine dans cinq carcinomes sur 67 étudiés. Par contre, Wurster et coll. (1980) ont trouvé 42% de carcinomes positifs et Wrba et coll. (1986) ont rapporté 60,4% de positivité dans les 91 carcinomes analysés. En dernier lieu, les travaux de Campbell et coll. (1992) ont montré qu'un clone d'ADN complémentaire de la lactoferrine désigné J16 est exprimé de façon variable dans 31 des 59 tumeurs primaires invasives analysées. Dans ces carcinomes, la présence de ce clone J16 apparaît inversement corrélée à l'expression des récepteurs des oestrogènes. De plus, dans les coupes de carcinomes

analysées par immunohistochimie, la lactoferrine est distribuée de façon moins intense et plus hétérogène par rapport aux tissus normaux.

En conclusion, l'expression de la lactoferrine semble être régulée négativement dans certaines formes de cancers mammaires, en particulier les cancers oestrogéno-dépendants. Cette diminution d'expression pourrait être liée à l'absence du transcrit ΔLf ARNm dans les tissus cancéreux. Nous rappelons que le gène de la lactoferrine code pour deux transcrits de 2,5 kb (Lf ARNm et ΔLf ARNm) exprimés tous les deux dans les tissus mammaires normaux. Par contre, le transcrit ΔLf ARNm n'est pas exprimé dans la lignée tumorale mammaire T47D (Siebert et Huang, 1997).

IV.2.2. *L'endomètre*

L'endomètre est divisé en trois couches qui diffèrent par leurs caractéristiques histologiques et leur évolution en fonction des conditions physiologiques. La couche la plus profonde ou basale est adjacente au myomètre. Une épaisse couche intermédiaire caractérisée par un stroma d'apparence spongieuse est désignée couche spongieuse. Enfin, la couche superficielle mince et très compacte est formée d'un épithélium cylindrique.

Sous l'influence des oestrogènes et de la progestérone sécrétés par l'ovaire au cours du cycle ovarien, l'endomètre subit des changements réguliers cycliques. Le cycle des changements de l'endomètre comporte deux phases distinctes: la phase proliférative et la phase sécrétoire suivies par la période de menstruation lorsqu'il n'y a pas d'implantation d'un ovule fécondé.

La couche basale présente les changements les moins importants durant le cycle menstruel. Elle n'est pas expulsée au cours de la menstruation. Par contre, les couches spongieuse et compacte, réunies sous le terme de couche fonctionnelle, subissent des changements importants au cours du cycle et disparaissent au moment de la menstruation.

α. *Endomètre sain en phase proliférative ou sécrétoire*

L'expression des ARNm de la lactoferrine et celle de la protéine correspondante ont été étudiées respectivement par des techniques de "Northern Blot", d'hybridation *in situ*, de "Western Blot" et d'immunohistochimie. Ces techniques ont permis de montrer que la lactoferrine est exprimée au niveau d'un nombre restreint de cellules épithéliales glandulaires

localisées dans la couche basale de l'endomètre (Walmer *et al.*, 1995). L'expression de la lactoferrine est importante dans l'endomètre prolifératif par rapport à l'endomètre sécrétoire (Kelver *et al.*, 1996). Les oestrogènes pourraient avoir un rôle dans cette augmentation de production de lactoferrine en phase proliférative. Teng et coll. (1992) ont ainsi trouvé chez la souris une corrélation positive entre les taux d'oestrogènes circulants et l'expression de la lactoferrine au niveau des cellules épithéliales de l'endomètre en phase proliférative.

β. *Adénocarcinomes de l'endomètre*

Deux tiers (8/12) des carcinomes examinés surexpriment la lactoferrine. Cette augmentation d'expression de la lactoferrine dans les tissus tumoraux est liée à une élévation du taux d'ARNm et de la protéine dans les cellules épithéliales glandulaires ne possédant pas de récepteurs à la progestérone. De plus, une augmentation du nombre de ces cellules a également été constatée. Le niveau d'expression de la lactoferrine ne semble cependant pas être corrélé au stade ou à la gravité de l'invasion tumorale dans les 12 cas étudiés (Walmer *et al.*, 1995).

Par contre, Farley et coll. (1997) ont démontré que l'ARNm de la lactoferrine et l'expression de la protéine sont fortement diminués dans les adénocarcinomes du col de l'utérus *in situ* par rapport à l'épithélium cervical normal. Les auteurs en ont conclu que la lactoferrine pourrait constituer un marqueur précoce et un facteur pronostic des adénocarcinomes du col de l'utérus.

IV.2.3. *Le tissu hématopoïétique*

L'hématopoïèse est le processus de formation des cellules sanguines adultes à partir des cellules souches. Chez l'homme adulte, l'hématopoïèse se déroule exclusivement au niveau de la moelle osseuse. La moelle osseuse est apte à répondre aux processus inflammatoires aigus par la mise en circulation dans le courant sanguin de cellules presque ou totalement matures. Le myeloblaste est le premier stade de la granulopoïèse. Il donne naissance aux promyélocytes caractérisés par leurs granulations azurophiles ou granulations primaires. Au stade myélocyte, la segmentation nucléaire s'accentue et les granulations secondaires spécifiques apparaissent.

α. *Moelle osseuse normale*

La lactoferrine est présente dans la moelle osseuse normale. Elle est faiblement exprimée au stade promyélocytaire (6% des cellules sont positives en immunocytochimie). Elle apparaît nettement au stade myélocytaire où 32% des cellules sont positifs. Cependant, c'est aux stades métamyélocytaire et neutrophile que l'expression de la lactoferrine est la plus importante (Rado *et al.*, 1984 ; Panella *et al.*, 1991).

β. *Maladies leucémiques*

Les leucémies aiguës sont caractérisées par le remplacement du tissu hématopoïétique normal par des cellules présentant un défaut de maturation. Ces cellules ont une morphologie et une cytochimie caractéristiques des précurseurs précoces des granulocytes. En effet, les myéloblastes prédominent dans les leucémies myéloblastiques aiguës et les promyélocytes dans les formes aiguës promyélocytaires (Rado *et al.*, 1984, 1987 ; Panella *et al.*, 1991 ; Johnston *et al.*, 1992). D'autre part, il a été montré par analyse RT-PCR que la lactoferrine n'est que très faiblement exprimée dans les lignées promyélocytaire HL-60 et T-lymphoblastique Jurkat et absente dans la lignée T-lymphoblastique MOLT-4. Par contre, dans la leucémie granulocytaire chronique caractérisée par une expression dans la circulation sanguine des précurseurs granulocytaires matures et des granulocytes, l'expression de la lactoferrine est similaire à celle observée dans les tissus normaux (Rado *et al.*, 1984, 1987).

En conclusion, il apparaît que dans de nombreuses tumeurs liquides la tendance est à une expression plus faible de la lactoferrine. Dans ces cas, la diminution de production de lactoferrine pourrait refléter le stade non différencié de ces cellules qui ne produisent normalement pas de lactoferrine. Cependant, un rôle direct de la lactoferrine dans le processus malin ne peut être exclu.

IV.2.4. *L'appareil gastro-intestinal*

α. *Les glandes salivaires*

Dans le tissu sain, la lactoferrine est produite dans les cellules des canaux intercalaires, des canaux striés et au niveau des acini séreux (Miyauchi, 1984 ; Huang *et al.*, 1992). Par contre, la lactoferrine est peu exprimée dans les carcinomes mucoépidermoïdes (7,1%). De

même, la fréquence d'expression de la lactoferrine dans les adénomes pléomorphiques est assez faible (Sehested *et al.*, 1985 ; Huang *et al.*, 1992).

β. *L'estomac*

La lactoferrine est sécrétée par les cellules mucosécrétantes de l'antre pylorique et du corps gastrique sain. Par contre, elle est faiblement et irrégulièrement exprimée dans le cytoplasme des tissus glandulaires des carcinomes gastriques. De plus, elle est totalement absente dans les carcinomes diffus (Tuccari *et al.*, 1989). Luqmani et coll. (1991) ont également suggéré que la lactoferrine est régulée négativement dans les états précancéreux et cancéreux. Par contre, la présence de lactoferrine est associée au développement de gastrite à *Helicobacter pylori* (Nakao *et al.*, 1997) et d'hyperplasie bénigne.

γ. *Le pancréas*

Le gène de la lactoferrine est exprimé sous la forme de deux transcrits de 2,5 kb dans le pancréas de sujets sains (Siebert et Huang, 1997). L'expression de la lactoferrine n'augmente pas dans le cancer du pancréas. Par contre, elle est significativement plus élevée dans les cas inflammatoires de pancréatites chroniques (Dite *et al.*, 1989).

En conclusion, l'expression de la lactoferrine augmente dans les tissus présentant des processus inflammatoires chroniques. Par contre, à l'exception des carcinomes de l'endomètre où l'on constate une surexpression de la lactoferrine, l'expression de la lactoferrine semble réprimée dans les états cancéreux. Ces observations suggèrent que la lactoferrine pourrait avoir un effet direct sur le développement tumoral.

V. LES RECEPTEURS DE LA LACTOFERRINE

Les travaux concernant les récepteurs de la lactoferrine sur les cellules humaines sont peu avancés et restent relativement contradictoires. La lactoferrine est capable d'interagir avec un grand nombre de cellules telles que les hépatocytes, les entérocytes, les cellules hématopoïétiques ou encore les cellules épithéliales mammaires. L'interaction prédominante entre la lactoferrine et les diverses cellules implique des récepteurs de basse affinité. Des récepteurs spécifiques de haute affinité n'ont été décrits que pour les hépatocytes, les lymphocytes activés, les cellules de la lignée T-lymphoblastique Jurkat et les plaquettes.

Ainsi, dans la majorité des cas, ces cellules permettent la liaison de la lactoferrine mais pas son internalisation. Le processus d'internalisation n'a été décrit que pour la lignée érythroleucémique K562, la lignée T-lymphoblastique Jurkat, les hépatocytes et les cellules d'adénocarcinome de colon HT-29.

Dans ce chapitre, nous ferons une synthèse des différentes cellules eucaryotes fixant la lactoferrine, ainsi que des molécules membranaires impliquées dans les interactions lactoferrine-cellules.

V.1. INTERACTION DE LA LACTOFERRINE AVEC LES HEPATOCYTES

Le foie est un organe important régulant la demi-vie de la lactoferrine dans la circulation sanguine (Bennett et Kokocinski, 1979 ; Imber et Pizzo, 1983). La clairance de la lactoferrine est assurée par les cellules de Kupffer, les cellules endothéliales du foie et surtout les hépatocytes (Courtoy *et al.*, 1984 ; Ziere *et al.*, 1992 ; Hu *et al.*, 1993). L'élévation de la concentration plasmatique pourrait avoir divers effets néfastes tels que l'induction de neutropénie (Boxer *et al.*, 1982), ou encore l'inhibition de la liaison des β-VLDL aux cellules parenchymateuses hépatiques (Huettinger *et al.*, 1988 ; Willnow *et al.*, 1992). Il apparaît donc que la clairance de la lactoferrine plasmatique constitue une fonction homéostatique importante du foie.

McAbee et Esbensen (1991) ont précisé la nature du transport de la lactoferrine bovine dans les hépatocytes de rat. En effet, ils ont montré que les hépatocytes isolés de rat lient de façon similaire l'apo- et l'holo-lactoferrine bovine. Ces cellules expriment deux types de sites de liaison. Un site de haute affinité dépendant du calcium (Kd = 20 nM ; n = 1.10^6 sites) qui serait le récepteur d'asialoglycoprotéines RHL-1 (Bennatt *et al.*, 1997). L'autre site, de basse affinité (Kd = 700 nM ; n = 20.10^6 sites), indépendant des cations divalents, pourrait être constitué en partie par les héparane sulfates (Hu *et al.*, 1993), les chondroïtine sulfates protéoglycannes (Ziere *et al.*, 1996) ou par le récepteur remnant des chylomicrons (Huettinger *et al.*, 1988, 1992 ; Ziere *et al.*, 1992). Les hépatocytes internalisent la lactoferrine via une endocytose dépendante de la clathrine. Des deux catégories de sites, seuls les sites de haute affinité dépendants du calcium assurent l'internalisation de la lactoferrine.

Les études de McAbee et coll. (1993) suggèrent également qu'il existe une relative spécificité d'espèce dans l'interaction des lactoferrines bovine et humaine avec les récepteurs des cellules hépatiques de rat. En effet, la lactoferrine humaine se lie aux hépatocytes de rat,

sur les sites calcium-dépendants, avec une plus faible affinité (Kd = 10 µM). La liaison de la lactoferrine humaine n'est pas potentialisée par le calcium (Ziere *et al.*, 1992). La modification des résidus d'arginine de la lactoferrine humaine par la cyclohexane dione altère son habilité à interagir avec les hépatocytes de rat. Un traitement similaire de la lactoferrine bovine n'a pas d'effet sur sa fixation et son internalisation (Ziere *et al.*, 1992).

Ces données suggèrent qu'il existe des différences d'espèces pour la lactoferrine dans l'interaction ligand-récepteur. En ce qui concerne la liaison initiale de la lactoferrine humaine avec les cellules parenchymateuses hépatiques de rat, elle se ferait par interaction avec le récepteur remnant et d'autres sites pas encore identifiés. Le LRP "Lipoprotein Receptor Related Protein" pourrait être ensuite impliqué dans l'internalisation de la lactoferrine humaine (Ziere *et al.*, 1996).

V.2. INTERACTION DE LA LACTOFERRINE AVEC LES CELLULES ENTEROCYTAIRES

Cox et coll. (1979) ont réalisé les premières expériences *in vitro* suggérant l'existence d'un récepteur spécifique de la lactoferrine à la surface du duodénum humain. Le récepteur de la lactoferrine a ensuite été isolé de l'intestin grêle du foetus et de l'enfant (Kawakami et Lönnerdal, 1991). La fixation spécifique de la lactoferrine a pu également être observée sur différentes lignées intestinales d'adénocarcinomes coliques humains (Roiron *et al.*, 1989 ; Mikogami *et al.*, 1994, 1995). Chez le foetus humain, l'interaction de la lactoferrine avec le récepteur entérocytaire semble être spécifique d'espèce. En effet, les récepteurs entérocytaires du foetus humain sont capables de fixer la lactoferrine humaine mais pas la lactoferrine bovine (Kawakami et Lönnerdal, 1991). L'influence du degré de saturation en fer de la lactoferrine sur la fixation au récepteur a également été étudiée. L'apo-lactoferrine, la lactoferrine partiellement saturée et l'holo-lactoferrine sont capables de se fixer au récepteur. Cependant la lactoferrine partiellement saturée et l'holo-lactoferrine semblent avoir une affinité plus importante pour la fixation au récepteur. Par ailleurs, la lactoferrine déglycosylée se fixe sur ce récepteur avec une affinité comparable à celle de la lactoferrine native suggérant que les glycannes n'interviennent pas dans la fixation au récepteur (Hu *et al.*, 1990 ; Lönnerdal et Hernell, 1994).

La mise au point d'un protocole de purification du récepteur par chromatographie d'affinité sur colonne de lactoferrine immobilisée (Hu *et al.*, 1990) a permis l'étude des caractéristiques biochimiques de ce récepteur (Kawakami et Lönnerdal, 1991). Ce récepteur entérocytaire humain a été caractérisé comme étant une protéine de 114 kDa constituée de

trois sous-unités de 33 à 35 kDa. Chaque sous-unité contient deux chaînes glycanniques de 4 kDa. Le récepteur intact pourrait donc contenir six glycannes. Le pH optimal pour la fixation de la lactoferrine à ce récepteur est compatible avec le pH physiologique de l'intestin grêle de l'enfant (6,5 à 7,5). L'addition d'un chélateur du fer, l'acide picolinique, au milieu de culture des cellules d'adénocarcinome de colon HT29-18-C1, provoque une diminution du taux de fer intracellulaire corrélée à une augmentation de la liaison de la lactoferrine aux cellules. Cette liaison plus importante de la lactoferrine serait due à une biosynthèse *de novo* du récepteur car cette synthèse provoque une augmentation du nombre de récepteurs fonctionnels induisant une plus grande incorporation dans les cellules du fer lié à la lactoferrine. Ces résultats suggèrent que la biosynthèse du récepteur et l'incorporation du fer lié à la lactoferrine pourraient être régulées par le taux de fer intracellulaire dans les cellules épithéliales (Mikogami *et al.*, 1995).

La lactoferrine est donc capable de céder son fer aux cellules mais le chemin emprunté pour délivrer ce fer reste controversé. En effet, selon Roiron-Lagroux et Figarella (1990), la lactoferrine n'est pas internalisée dans les cellules HT29 D4 mais reste à la surface cellulaire. Par contre, Derisbourg (1990) a montré que la lactoferrine se fixe aux récepteurs de la bordure en brosse des cellules HT29 différenciées et pénètre dans ces cellules par un mécanisme d'endocytose absorptive. La lactoferrine est alors dégradée dans les lysosomes, et les produits de dégradation sont retrouvés à l'extérieur. Mikogami et coll. (1994) ont pour leur part suggéré que la lactoferrine traverse les monocouches de cellules HT29 cl-19A par l'intermédiaire d'un transport de type transcellulaire. L'utilisation d'une chambre d'Ussing leur a permis de montrer que la lactoferrine est transportée du côté apical vers le côté basolatéral de la cellule *via* deux voies intracellulaires. La première voie, majeure, est une voie de dégradation par les lysosomes. Elle conduit à la libération du fer de la lactoferrine humaine dégradée. Les fragments de lactoferrine subissent un transport transcellulaire alors que le fer est stocké à l'intérieur de la cellule. La seconde voie, mineure, permet le passage transcellulaire de la lactoferrine humaine intacte et de son fer lié. Cette seconde voie permet d'expliquer la présence de lactoferrine intacte, d'origine maternelle, dans l'urine de prématurés nourris au lait de femme (Hutchens *et al.*, 1991).

L'ensemble de ces observations permet donc d'envisager un rôle de la lactoferrine et de son récepteur entérocytaire dans l'absorption du fer.

V.3. INTERACTION DE LA LACTOFERRINE AVEC LES MONOCYTES / MACROPHAGES

La capacité de la lactoferrine à se fixer à la surface des monocytes/macrophages a été mise en évidence pour la première fois par van Snick et coll. (1974). Cette fixation de la lactoferrine sur les monocytes a ensuite été confirmée par de nombreuses études (Bennett et Davis, 1981 ; Birgens *et al.*, 1983, 1988 ; Govaec *et al.*, 1985 ; Oria *et al.*, 1988). Cependant la nature de cette interaction et ses rôles biologiques sont encore mal définis.

Birgens et coll. (1983, 1988) ont proposé l'existence de récepteurs spécifiques de haute affinité (Kd = $4{,}5.10^{-9}$ M) à la surface des monocytes humains. D'autres auteurs ont trouvé des affinités beaucoup plus faibles jusqu'à $3{,}6.10^{-6}$ M (Britigan *et al.*, 1991) suggérant que la liaison de la lactoferrine sur ces cellules serait relativement peu spécifique (Tableau 1, p. 44).

Au cours de ces études, différents mécanismes permettant d'expliquer cette interaction ont été évoqués. En effet, selon les auteurs, l'interaction de la lactoferrine avec les monocytes pourrait se faire:

- par l'intermédiaire des lipopolysaccharides bactériens présents à la surface des macrophages (Miyazawa *et al.*, 1991).
- par l'intermédiaire des charges cationiques de la lactoferrine (van Snick et Masson, 1976).
- par l'interaction avec l'ADN fixé à la surface des cellules (Bennett *et al.*, 1983).
- en partie par l'intermédiaire d'une interaction avec des chaînes saccharidiques de type polylactosaminique de la lactoferrine (chaîne saccharidique comportant des répétitions de type N-acétyllactosaminique) (Eda *et al.*, 1996). Les auteurs ont montré que la fixation de la lactoferrine radiomarquée à l'iode^{125} sur les cellules THP-1 différenciées en macrophages est inhibée de 30% par les oligosaccharides de la lactoferrine et le LNnT (Gal β1→ 4 Glc NAc β1→3 Gal β1→ 4 Glc). Cette fixation est également réduite de 30% lorsque les glycannes de la lactoferrine marquée sont détruits par une endo-β-galactosidase (Eda *et al.*, 1996). De plus, récemment Eda et coll. (1997) ont isolé, au niveau de la membrane des cellules THP-1, différentes fractions protéiques contenant des molécules de 35, 50 et/ou 80 et 35-37 kDa fixant la lactoferrine et ayant l'habilité de lier les chaînes polylactosaminiques. Ces observations ont suggéré que la fixation de la lactoferrine sur ces cellules THP-1 serait partiellement liée à ces chaînes saccharidiques. La contribution majeure à la fixation serait cependant assurée par la partie protéique de la lactoferrine.

Tableau 1. Paramètres de fixation de la lactoferrine sur les monocytes/macrophages.

Références	Type cellulaire	Kd (10^{-9} M)	Sites/cellule (x 10^6)
Campbell, 1982	Macrophages alvéolaires humains	1700	54
Govaec *et al.*, 1985	Macrophages alvéolaires humains	500	12
Bennett et Davis, 1981	Monocytes sanguins humains	1800	33
Birgens *et al*, 1983	Monocytes sanguins humains	4,5	1,6
Moguilevsky *et al.*, 1985	Monocytes sanguins humains	430	10

La signification biologique de l'interaction de la lactoferrine avec les monocytes/macrophages reste également mal établie. La lactoferrine serait capable de céder son fer à la ferritine intracellulaire des macrophages péritonéaux de souris (van Snick *et al.*, 1977) et des monocytes humains (Birgens *et al.*, 1988). Ces observations ont permis de suggérer que la lactoferrine serait impliquée dans la séquestration du fer lors de l'hyposidérémie inflammatoire. Cependant, d'autres auteurs n'ont pas pu mettre en évidence cette capture du fer de la lactoferrine par les monocytes (Oria *et al.*, 1988 ; Ismail et Brock, 1993). L'hypothèse de l'implication de la lactoferrine dans l'hyposidérémie inflammatoire apparaît donc peu probable d'autant plus qu'il a été montré que, *in vivo*, le développement de l'hyposidérémie inflammatoire ne serait pas lié au taux de lactoferrine (Baynes *et al.*, 1986 ; Gordeuk *et al.*, 1988).

Ismail et Brock (1993) ont suggéré que la lactoferrine agirait comme un chélateur du fer plutôt que comme une protéine de transport du fer. Elle paraît prévenir la capture du fer par des mécanismes incontrôlés. Elle réduirait ainsi la génération de lésions par les radicaux libres et préviendrait la croissance des micro-organismes pathogènes ayant besoin de fer. De plus, cette interaction de la lactoferrine avec les monocytes aurait un rôle dans la modulation du système immunitaire de défense en contrôlant la libération des cytokines telles que l'interleukine 1 (IL-1), le "tumor necrosis factor α" (TNF-α) et indirectement de l'interleukine 2 (IL-2) (Zucali *et al.*, 1989 ; Crouch *et al.*, 1992).

V.4. INTERACTION DE LA LACTOFERRINE AVEC LA POPULATION LYMPHOCYTAIRE

La présence de récepteurs membranaires pour la lactoferrine humaine a été mise en évidence pour la première fois par Bennett et Davis (1981) sur des sous-populations de lymphocytes B et T probablement activés. En effet, les lymphocytes non activés du sang périphérique n'expriment pas de récepteur membranaire ou intracellulaire pour la lactoferrine humaine (Mazurier *et al.*, 1989 ; Hammarström *et al.*, 1995). Par contre, l'activation de la population lymphocytaire du sang périphérique par la phytohémagglutinine entraîne l'apparition des récepteurs de surface de la lactoferrine humaine. L'analyse des paramètres de fixation par la méthode de Scatchard révèle la présence de 2.10^6 récepteurs de haute affinité (Kd = 83.10^{-9} M) par cellule après 48 heures de stimulation par la phytohémagglutinine (Tableau 2, p. 46). L'expression de ce récepteur serait liée à l'activation par un stimulus mitogène d'un gène codant pour le récepteur de la lactoferrine (Mazurier *et al.*, 1989).

L'expression du récepteur sur la population lymphocytaire activée *in vitro* et *in vivo* a également été mise en évidence par Hammarström et coll. (1995) et Mincheva-Nilsson et coll. (1997). Les auteurs ont montré qu'une large proportion de lymphocytes (B, γδ T, NK) activés expriment simultanément le récepteur de la transferrine et de la lactoferrine. De plus, ils ont observé qu'une fraction significative de la population lymphocytaire activée n'exprime que le récepteur de la lactoferrine. Dans des conditions normales de culture, la proportion de cellules exprimant le récepteur de la transferrine est plus importante que celle exprimant le récepteur de la lactoferrine. Cependant, l'addition de lactoferrine au milieu de culture conduit à l'augmentation d'expression du récepteur de la lactoferrine. A terme, le nombre de cellules exprimant le récepteur de la lactoferrine devient supérieur à celui des cellules exprimant le récepteur de la transferrine (Mincheva-Nilsson *et al.*, 1997). Ces résultats ont permis aux auteurs de suggérer que la concentration de lactoferrine présente pendant l'activation des lymphocytes influence l'induction et la durée d'expression du récepteur de la lactoferrine sur ces cellules. De façon similaire, ils ont constaté que la lactoferrine est présente dans le tissu décidual. Dans ce tissu riche en lymphocytes activés, la proportion de lymphocytes exprimant le récepteur de la lactoferrine dépasse largement celle exprimant le récepteur de la transferrine.

Le récepteur de la lactoferrine sur les lymphocytes activés par la phytohémagglutinine a été partiellement purifié. Il s'agit d'une glycoprotéine membranaire, monomérique, de masse

moléculaire égale à 105 kDa. Ce récepteur est également libéré dans le milieu de culture sous la forme d'un récepteur soluble de 95 kDa capable de lier la lactoferrine (Bi *et al.*, 1994).

Afin d'étudier les interactions entre la lactoferrine et les cellules lymphocytaires *in vitro*, un modèle d'étude a été établi dans notre laboratoire à partir de la lignée lymphoblastique Jurkat. Le récepteur lymphocytaire de la lactoferrine est présent à la surface de ces cellules. Il fixe réversiblement la lactoferrine avec une constante de dissociation de l'ordre de Kd = 40.10^{-9} M et un nombre de sites estimés à 3.10^5 par cellules. Les cellules Jurkat libèrent dans le milieu de culture une forme tronquée du récepteur similaire à celle trouvée pour les lymphocytes activés du sang périphérique.

La localisation cellulaire du récepteur a été déterminée par étude immunocytochimique. Ce récepteur est présent à la surface de la cellule, localement concentré et le plus souvent associé à des puits recouverts. Le récepteur intracellulaire est localisé à la périphérie de la membrane cytoplasmique. La lactoferrine est endocytée par les cellules Jurkat et concentrée dans des structures vésiculaires. L'endocytose est très rapide et concerne 80% de la lactoferrine fixée au récepteur. Une partie de la lactoferrine est dégradée après l'endocytose. Les produits de dégradation sont relâchés dans le milieu extérieur (Bi *et al.*, 1996).

Tableau 2. Paramètres de fixation de la lactoferrine sur les lymphocytes

Références	Type cellulaire	Kd (10^{-9} M)	Sites/cellule (x 10^6)
Birgens *et al.*, 1984	Lymphocytes circulants humains	43	1,9
Birgens *et al.*, 1984	Lymphoblastes et myéloblastes humains	20	10
Mazurier *et al.*, 1989	Lymphocytes circulants humains activés	80	2
Bi *et al.*, 1994	Lignée lymphocytaire-T Jurkat	40	0,3

Les effets biologiques induits par cette interaction de la lactoferrine avec les cellules lymphocytaires sont encore mal définis. Dans les tissus où elle est présente, en particulier les muqueuses, le tractus digestif, l'appareil génital et les sites inflammatoires, la lactoferrine

pourrait jouer un rôle important dans la réponse immune. Elle induirait une réponse immune en favorisant la croissance et la prolifération de sous-populations activées (Hashizume *et al.*, 1983 ; Mazurier *et al.*, 1989 ; Hammarström *et al.*, 1995 ; Mincheva-Nilsson *et al.*, 1997). Par contre, la lactoferrine favoriserait la différenciation dans le cas de la lignée lymphoblastique Jurkat.

V.5. Interaction de la lactoferrine avec les cellules mammaires

La lactoferrine sécrétée par les cellules épithéliales mammaires est un composant majeur du lait humain. Ceci a permis d'envisager la présence de récepteurs de la lactoferrine et la possibilité d'un rôle majeur de la lactoferrine sur ces cellules. Les récepteurs de la lactoferrine sur les cellules épithéliales mammaires ont été mis en évidence pour la première fois par Rochard et coll. (1992). Dans ce travail, les méthodes de Scatchard et de cytofluorimétrie en flux ont permis d'étudier l'expression des récepteurs et les paramètres de fixation de la lactoferrine en fonction des conditions physiopathologiques. L'expression des récepteurs de la lactoferrine n'apparaît pas être corrélée à l'état normal, transformé ou pathologique de ces cellules. Cette expression n'est pas altérée par la transformation des cellules HBL-100 par l'oncogène *hst* et n'est pas augmentée à la surface des cellules immortalisées, des mastopathies bénignes ou encore des lignées cellulaires cancéreuses.

Campbell et coll. (1992) ont montré que les taux d'ARN messager de la lactoferrine trouvés dans la glande lactante et le tissu normal en involution mammaire sont inversement corrélés à l'expression des récepteurs des oestrogènes sur ces cellules. Ces observations permettaient d'envisager que l'expression des récepteurs de la lactoferrine soit également liée à l'environnement hormonal. En fait, l'environnement hormonal ne semble pas influencer l'expression des récepteurs de la lactoferrine sur ces cellules. En effet, les paramètres de fixation de la lactoferrine sur les cellules cancéreuses hormono-indépendantes BT-20 sont similaires à ceux trouvés pour les cellules cancéreuses hormono-dépendantes T-47D et MCF-7 (Rochard *et al.*, 1992). Les constantes de dissociation sont en moyenne de 300.10^{-9} M jusqu'à 960.10^{-9} M pour les cellules MDA-MB-231 et les nombres de site de $1,5.10^{6}$ par cellule en moyenne jusqu'à $4,8.10^{6}$ pour les cellules MDA-MB-231 (Tableau 3, p. 48 et tableau 4, p. 49). Ces paramètres de fixation étant élevés, ils reflètent probablement l'interaction de la lactoferrine avec des sites de basse affinité ou plus globalement avec la totalité des récepteurs de la lactoferrine bien que la méthode de Scatchard n'ait permis de détecter qu'un seul type de site. En effet, l'utilisation d'anticorps marqués, dirigés contre le

récepteur lymphocytaire de la lactoferrine a permis de montrer l'existence de récepteurs spécifiques de la lactoferrine sur les cellules mammaires à l'exception des cellules MDA-MB-231. Dans le cas des cellules MDA-MB-231, la très grande proportion de sites de basse affinité pourrait masquer les sites de haute affinité. L'importance du compartiment de basse affinité est généralement proportionnel à la teneur en protéoglycannes. Bien qu'aucune expérimentation n'ait directement montré la participation des protéoglycannes dans la fixation de la lactoferrine sur les cellules épithéliales, de nombreux arguments sont en faveur de cette hypothèse. Ces composants de la matrice extracellulaire, fortement chargés négativement, sont capables de lier de nombreuses substances dont les facteurs de croissance (Iozzo, 1988) et la lactoferrine (Mann *et al.*, 1994 ; Wu *et al.*, 1995).

Les chondroïtine sulfates et les héparane sulfates sont les glycosaminoglycannes retrouvés en majorité sur les membranes des lignées cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et MCF-7. Cependant, les cellules MCF-7 possèdent des quantités beaucoup plus faibles d'héparane sulfates que les cellules MDA-MB-231. De plus, ces héparane sulfates sont moins retenus dans la matrice extracellulaire et sont libérés dans le milieu (Chandrasekaran et Davidson, 1979 ; Delehedde *et al.*, 1997). Ceci permettrait d'expliquer le faible nombre de sites de basse affinité retrouvé sur les cellules MCF-7 par rapport aux autres cellules et en particulier les cellules MDA-MB-231. De plus, il a été constaté dans notre laboratoire que le traitement des cellules MCF-7 avec l'héparinase réduit de 80% la fixation de la lactoferrine sur ces cellules (non publié). Toutes ces observations suggèrent donc que les protéoglycannes sont directement responsables de la fixation de faible affinité sur ces cellules.

Tableau 3. Paramètres de fixation de la lactoferrine sur différentes lignées cellulaires non cancéreuses (Rochard *et al.*, 1992).

	Cellules transformées, non malignes			Mastopathies bénignes	
	NB54T	HBL-100	HBL-100 HH9	NPM14T	NPM21T
Kd (nM)	572 ± 40	216 ± 30	340± 15	288 ± 30	350 ± 20
n (x 10^6)	1,7 ± 0,03	1,4 ± 10,02	1,21 ± 0,02	1,4 ± 0,02	1,6 ± 0,01

Tableau 4. Paramètres de fixation de la lactoferrine sur différentes lignées cellulaires cancéreuses (Rochard *et al.*, 1992).

	Lignées cellulaires cancéreuses				
	T47D	MCF-7	VHB1	BT20	MDA-MB-231
Kd (nM)	120 ± 20	190± 130	288± 30	160 ± 20	960 ± 30
n (x 10^6)	1,2 ± 0,03	1,28 ± 0,02	1,21 ± 0,03	1,18 ± 0,03	4,8 ± 0,03

VI. ROLES BIOLOGIQUES DE LA LACTOFERRINE

VI.1. EFFETS BACTERIOSTATIQUE ET BACTERICIDE DE LA LACTOFERRINE

La lactoferrine possède un large spectre antimicrobien. Il s'étend des bactéries Gram- et Gram+, aux levures et champignons (Brock *et al.*, 1984 ; Boesman-Finkelstein et Finkelstein, 1985 ; Bellamy *et al.*, 1992 ; Bellamy *et al.*, 1993, 1994). La très haute affinité de la lactoferrine pour le fer (Ka $\approx 10^{23}$ M^{-1}) (Aisen et Leibman, 1971) a permis de suggérer que l'activité bactériostatique de la lactoferrine était liée à sa capacité à chelater le fer et priver ainsi les micro-organismes d'un nutriment essentiel à leur croissance et prolifération (Finkelstein *et al.*, 1983 ; Bullen *et al.*, 1987). L'effet bactériostatique est cependant temporaire (Brock *et al.*, 1984). En effet, certaines bactéries sont capables de sécréter des sidérophores qui vont reprendre le fer de la lactoferrine ou d'autres protéines liant le fer et le céder ensuite aux micro-organismes (Otto *et al.*, 1992). D'autres micro-organismes tels que *Neisseria spp* et *Haemophilus influenzae* expriment des protéines membranaires agissant comme des récepteurs de la lactoferrine (Schryvers et Morris, 1988 ; Schryvers, 1989). Ces protéines faciliteraient le transfert du fer de la lactoferrine à la bactérie (McKenna *et al.*, 1988). Enfin, plus récemment, des protéines FBP « Ferric-ion-Binding Protein » ont été caractérisées chez *Haemophilus influenzae* (hFBP), *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* (nFBP), *Serratia marcescens* ou encore *Yersinia enterocolitica* (yFBP). Ces protéines FBP présentent une forte homologie structurale avec celles de la famille des transferrines. Elles proviendraient en fait de l'évolution divergente d'une molécule ancestrale

commune liant un anion. Par contre, les sites de liaison du fer des FBP et des transferrines auraient évolué indépendamment. Ces FBP auraient pour rôle de capter le fer de la lactoferrine et des transferrines et de le transporter à travers la membrane périplasmique (Bruns *et al.*, 1997).

Par ailleurs, plusieurs études ont démontré une action directe de la lactoferrine, non liée à sa fonction de chélateur du fer (Arnold *et al.*, 1982 ; Ellison *et al.*, 1988, 1990). Il s'agit d'un effet bactéricide impliquant l'interaction de la lactoferrine avec des structures membranaires des micro-organismes telles que le lipide A (Appelmelk *et al.*, 1994) ou encore les porines (Erdei *et al.*, 1994) aboutissant à une désorganisation ou des changements de perméabilité de la membrane.

Bien que cet effet antibactérien soit important *in vitro* , les données *in vivo* notamment dans l'intervention directe de la lactoferrine dans la protection des nouveau-nés contre les infections gastro-intestinales semblent moins convaincantes. Les enfants nourris au sein semblent plus résistants aux infections (Bullen *et al.*, 1972). La lactoferrine pourrait promouvoir l'établissement d'une flore riche en bifidobactéries remplaçant la flore initiale constituée d'entérobactéries de type *Escherichia coli*, de streptocoques et de clostridium (Balmer *et al.*, 1989). Cependant, la supplémentation de l'alimentation du nouveau-né avec la lactoferrine bovine ne semble pas influencer la microflore intestinale (Balmer *et al.*, 1989 ; Roberts *et al.*, 1992) indiquant que le mécanisme d'action de la lactoferrine est complexe. En fait, la lactoferrine n'est pas capable d'agir seule mais en conjonction avec d'autres facteurs présents dans le lait humain tels que les sialoglycopeptides, les immunoglobulines A sécrétoires et le lysozyme (Jorieux *et al.*, 1985 ; Spik *et al.*, 1985).

VI.2. Effet anti-viral de la lactoferrine

Au cours d'infections virales chez l'homme, il a été constaté un déficit acquis de synthèse de lactoferrine par les polynucléaires neutrophiles (Baynes *et al.*, 1988). Une diminution significative de la concentration en lactoferrine et IgA sécrétoires a également été détectée dans la salive de patients sidéens (Muller *et al.*, 1992). Ces déficits en lactoferrine pourraient favoriser le développement de l'infection virale et expliquer les surinfections bactériennes fréquentes au cours de contaminations virales. En effet, chez la souris contaminée par le virus Friend, la progression de l'infection virale est stoppée par un traitement associant l'interféron γ et la lactoferrine (Lu *et al.*, 1991). D'autre part, Shimizu et coll. (1996) ont montré que, au cours d'une infection à cytomegalovirus chez la souris,

l'administration de lactoferrine induit une protection par une augmentation de l'activité des cellules NK *via* les cellules T. La lactoferrine agirait donc *in vivo* en stimulant la réponse immune. Elle pourrait également être directement effective en perturbant l'interaction entre le virus et la cellule hôte. En effet, diverses études *in vitro* ont montré que l'effet anti-viral de la lactoferrine s'exerce aux stades précoces de l'infection. La lactoferrine prévient l'adsorption et / ou la pénétration de différents virus (rotavirus, herpes virus simplex 1, HIV-1 ou encore le cytomegalovirus humain) dans les cellules hôtes (Harmsen *et al.*, 1995 ; Marchetti *et al.*, 1996 ; Superti *et al.*, 1997). Marchetti et coll. (1996) ont ainsi observé que la liaison aux cellules Vero de particules virales du virus herpes simplex 1 marquées à la méthionine ^{35}S est fortement inhibée lorsque la lactoferrine est ajoutée au cours de la phase d'attachement du virus à la cellule. De même, Superti et coll. (1997) ont mis en évidence la liaison de particules virales du rotavirus par l'apo-lactoferrine gênant ainsi la fixation aux récepteurs des cellules sensibles. Cet effet anti-viral de la lactoferrine est indépendant de la présence d'acide sialique et du degré de saturation en fer (Hasegawa *et al.*, 1994). Il semble en fait qu'il soit en relation avec la capacité de la lactoferrine à lier les protéoglycannes, en particulier les HSPG qui constitueraient notamment pour le virus herpes simplex 1 les sites de fixation initiaux lors de l'interaction du virus avec la cellule hôte (Trybala *et al.*, 1994 ; Banfield *et al.*, 1995 ; Herold *et al.*, 1995 ; Marchetti *et al.*, 1996).

VI.3. Effet antithrombotique de la lactoferrine

L'interaction du fibrinogène avec les plaquettes est essentielle à l'agrégation plaquettaire. Le fibrinogène se lie au complexe glycoprotéique GPIIa-IIIb présent à la surface des plaquettes (Bennett, 1985). Cette liaison est assurée par un tétrapeptide (RGDS) présent dans la région C-terminale de la chaîne α du fibrinogène et par un décapeptide de la région C-terminale de la chaîne γ. Mazoyer et coll. (1990) ont ensuite montré qu'un tétrapeptide (KRDS) localisé entre les acides aminés 39-42 du lobe N-terminal de la lactoferrine présente des homologies structurales et conformationnelles avec la séquence RGDS du fibrinogène.

In vitro, sur les plaquettes humaines, le KRDS inhibe l'agrégation plaquettaire et la liaison du fibrinogène induite par l'ADP mais de façon moins importante que le RGDS (Mazoyer *et al.*, 1990). L'octodécapeptide (résidus N-terminaux 20-37) et la lactoferrine ont également une activité respectivement 25 fois et 16000 fois supérieure à celle du KRDS. Ces observations suggèrent que l'inhibition de l'agrégation plaquettaire par la lactoferrine n'est pas totalement initiée par le KRDS. Cet effet antithrombotique n'est pas lié à l'interaction

avec le complexe GPIIa-IIIb (Leveugle *et al.*, 1993) mais semble plutôt médié par la liaison de la lactoferrine au récepteur spécifique de haute affinité (Kd = 13,6 10^{-9} M) présent à la surface plaquettaire (Leveugle *et al.*, 1993 ; Maneva *et al.*, 1993). Pour les plaquettes de sujets sains ou atteints de thrombasthénies de Glanzmann (absence d'expression de GPIIa-IIIb), le KRDS inhibe également la libération de sérotonine induite par la thrombine (Mazoyer *et al.*, 1990). De plus, le KRDS inhibe la synthèse de thromboxane par une voie indépendante de la cyclo-oxygénase (Mazoyer *et al.*, 1990 ; Lévy-Toledano *et al.*, 1995). Le défaut de synthèse de thromboxane A_2 et de l'agrégation plaquettaire induit par le KRDS résulterait de l'inactivation de kinases, en particulier de deux kinases de 100-105 kDa associées au complexe GPIIa-IIIb. Ces kinases n'assureraient plus l'activation des MAP kinases conduisant donc à une absence d'activité de la phospholipase A_2. Or la phospholipase A_2 apparaît indispensable à l'induction des fonctions plaquettaires (Lévy-Toledano *et al.*, 1995). Cette activité anticoagulante du KRDS, *in vitro*, est confirmée *in vivo*. Ainsi, il a été montré que le KRDS possède un effet antithrombotique dans différents modèles expérimentaux de thrombose artériolaire chez le rat et le cochon de Guinée (Drouet *et al.*, 1990) ou encore chez le chien (Wu *et al.*, 1992).

L'effet anticoagulant de la lactoferrine pourrait également être lié à l'interaction avec un récepteur spécifique de l'apoE présent à la surface de la membrane plaquettaire (Ridell et Owen, 1996). Le LRP pourrait jouer le rôle de protéine de surface candidate pour la médiation des effets antithrombotiques de l'ApoE et de la lactoferrine. En effet, la lactoferrine possède des homologies de séquences avec le domaine de liaison de l'ApoE au LRP "LDL-receptor-related protein" (Huettinger *et al.*, 1992) exprimé sur les plaquettes.

VI.4. Implication de la lactoferrine dans l'absorption intestinale du fer

L'hypothèse selon laquelle la lactoferrine serait impliquée dans l'absorption intestinale du fer contenu dans le lait humain (Montreuil *et al.*, 1960) a été argumentée par différentes observations. D'une part, le colostrum et le lait humain contiennent des taux très élevés de lactoferrine à laquelle la majorité du fer est lié (Fransson et Lönnerdal, 1980). De plus, malgré un taux relativement faible de fer libre dans le lait humain, seuls les nouveau-nés nourris exclusivement au lait maternel maintiennent des réserves de fer correctes jusqu'à plus de six mois d'âge (Duncan *et al.*, 1985 ; Lönnerdal et Hernell, 1994) suggérant une très grande biodisponibilité du fer lié à la lactoferrine dans le lait humain. D'autre part, des expériences avec un radioisotope du fer (Fe^{59}) ont montré que l'absorption du fer est plus élevée à partir du lait maternel qu'avec les aliments lactés pour nourrisson (Saarinen *et al.*, 1977). Dans une

étude récente, l'absorption du fer a été évaluée chez des enfants de quatre mois et plus en utilisant deux isotopes stables du fer (Davidsson *et al.*, 1994). Les enfants ont été nourris au lait maternel intact ou privé de lactoferrine. L'absorption du fer, estimée par l'incorporation du fer dans les érythrocytes, a été plus faible avec le lait intact qu'avec le lait dépourvu de lactoferrine. Cette observation indique donc que la lactoferrine ne faciliterait pas l'absorption du fer et supporte même l'hypothèse selon laquelle la lactoferrine inhiberait l'absorption du fer chez les enfants plus âgés dont les besoins en fer sont moindres (Brock, 1985).

En conclusion, la lactoferrine semble jouer un rôle mixte dans l'absorption intestinale du fer à partir du lait maternel. Elle favoriserait l'absorption chez les nouveau-nés, et réduirait celle-ci chez les sujets plus âgés dont les besoins en fer sont moins importants.

VI.5. IMPLICATIONS DE LA LACTOFERRINE DANS LA CARCINOGENESE

VI.5.1. *Les facteurs de la carcinogenèse*

La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse est multifactorielle. Dans un tissu donné, le risque qu'une cellule se singularise est lié au nombre de cellules sensibles aux facteurs impliqués dans le processus de carcinogenèse et à la fréquence d'exposition à ces facteurs. En effet, certaines personnes peuvent présenter des prédispositions à la maladie, mais elle ne se développera que si d'autres facteurs interviennent afin de promouvoir la modification cellulaire.

Généralement, il n'y a pas un risque unique, mais une addition de risques faibles qui peuvent être d'origine endogène :

- Influence du groupe HLA
- Syndromes autosomiques récessifs comme le *Xeroderma pigmentosum* qui favorise les cancers cutanés (Sarasin, 1991; Daya-Grosjean *et al.*, 1993).
- Maladies génétiques dont la trisomie 21 pour laquelle on retrouve une prédisposition au développement de leucémies aiguës.
- Influence du système endocrinien notamment les oestrogènes dans le cancer du sein (Kelsey et Gammon, 1991).

Ces facteurs peuvent être également d'origine exogène :

- Facteurs chimiques : hydrocarbures, amines aromatiques
- Tabagisme, alcool
- Facteurs physiques : radiations ionisantes (rayons X, UV) (Dumaz *et al.*, 1994)

- Facteurs viraux (Wang *et al.*, 1990).

Les agressions par ces facteurs créent une désorganisation croissante de la cellule résultant de changements dans l'expression de nombreux gènes cellulaires, comme nous le verrons plus loin.

Lorsque la cellule cancéreuse est constituée, de nombreuses divisions cellulaires interviennent avant l'obtention d'une tumeur clinique. Au cours de cette phase, la mise en jeu du système immunitaire, spécifique avec les lymphocytes T et / ou naturel avec les cellules NK ("Natural Killer") et les macrophages, permet de ralentir ou d'empêcher le développement de la tumeur. Cependant, il existe encore, dans ce cas, des mécanismes d'échappement au processus d'immunosurveillance.

Le cancer est donc une maladie multi-étapes, très complexe pouvant impliquer de très nombreux facteurs de la physiologie cellulaire. Cette maladie reste très fréquente et difficile à soigner en raison de sa complexité. Elle constitue la première cause de décès devant les maladies cardio-vasculaires.

VI.5.2. *La carcinogenèse*

La survie, la croissance et la différenciation cellulaires sont des processus hautement régulés par un ensemble de mécanismes complexes. Ces mécanismes maintiennent un équilibre entre les facteurs qui stimulent la croissance et ceux qui l'inhibent. L'équilibre de ces facteurs de contrôle est souvent modifié dans les cellules tumorales à la suite d'altérations du matériel génétique. Ces altérations peuvent toucher de nombreux gènes désignés oncogènes. Les dommages au niveau de ces gènes qui passent d'une génération de cellules somatiques à une autre génération sont à l'origine du cancer. Cette évolution génétique éloigne peu à peu le génome des cellules cancéreuses de celui des cellules normales qui leur ont donné naissance.

Parmi les gènes les plus souvent modifiés, sont trouvés ceux qui ont la particularité d'intervenir dans diverses étapes de la transmission d'un signal de la membrane au noyau. Il s'agit des gènes des facteurs de croissance (Waterfield *et al.*, 1983 ; Doolittle *et al.*, 1983) et de leurs récepteurs (Grieco *et al.*, 1990 ; Khazaie *et al.*, 1993 ; Bacus *et al.*, 1994), des protéines cytoplasmiques intervenant dans la transduction des signaux (Bos, 1989 ; Yan *et al.*, 1993) et des facteurs de transcription. Les conséquences de ces altérations font que, d'une part, l'expression de ces gènes devient très forte et dérégulée. D'autre part, des formes oncogéniques de récepteurs de facteurs de croissance membranaires transmettent un signal

prolifératif en absence de ligand. Des protéines intracellulaires impliquées dans la transduction des signaux, et qui sont normalement exprimées dans un état d'équilibre entre une forme inactive et une forme active, peuvent être maintenues dans une configuration constitutivement active (protéines Ras, Raf). Etant donné le rôle important des cyclines et des kinases dépendant des cyclines (Cdk) dans le contrôle du cycle cellulaire, les gènes qui codent ces protéines constituent également des proto-oncogènes potentiels (Karp et Broder, 1995). Dans les cellules tumorales, les déficiences dans ces mécanismes de contrôle jouent un rôle important dans l'initiation et l'aggravation de la malignité (Hunter et Pines, 1994 ; Hartwell et Kastan, 1994).

VI.5.3. *Le cycle cellulaire*

Par convention, le cycle cellulaire est subdivisé en quatre phases. La phase G1 au cours de laquelle la cellule se prépare à répliquer l'ADN. Après cette phase de préparation, la cellule entre en phase S. Durant cette phase, l'ADN est dupliqué et les histones sont synthétisées de manière synchrone. Suit une deuxième phase G2 qui est une période de préparation à la division cellulaire. Enfin se produit la phase de mitose (M). Elle est divisée en quatre sous-phases pendant lesquelles les chromosomes s'individualisent, se séparent, puis disparaissent en se transformant en chromatine interphasique. A la fin de cette phase, deux cellules identiques à la première sont obtenues. Ces deux cellules entrent en phase G1 et le cycle reprend. Si les cellules arrêtent de se diviser, elles entrent en phase de repos ou de quiescence (G0) (Anderson *et al.*, 1982). Lorsque les cellules se divisent de façon continuelle, la phase G1 d'un nouveau cycle commence immédiatement après la fin de la mitose précédente. Deux points sont critiques pour le déroulement du nouveau cycle. Il s'agit du point de restriction correspondant au passage de la phase G1 à S et de l'entrée en mitose au niveau du passage de la phase G2 à M. Ces points de contrôle permettent aux cellules de rester identiques quel que soit le nombre de divisions. Des anomalies au niveau de ces points de contrôle augmentent l'instabilité génétique contribuant à la prolifération non contrôlée des cellules (Hartwell et Kastan, 1994).

Le déroulement du cycle cellulaire est régulé positivement par des complexes protéiques formés d'une sous-unité enzymatique à activité sérine /thréonine kinase (Cdk) associée à une sous-unité régulatrice appelée cycline (Figure 6, p. 56). L'activation d'une kinase dépend de son association avec une cycline dont la synthèse varie au cours du cycle (King *et al.*, 1994) mais également de modifications post-traductionnelles de cette kinase par

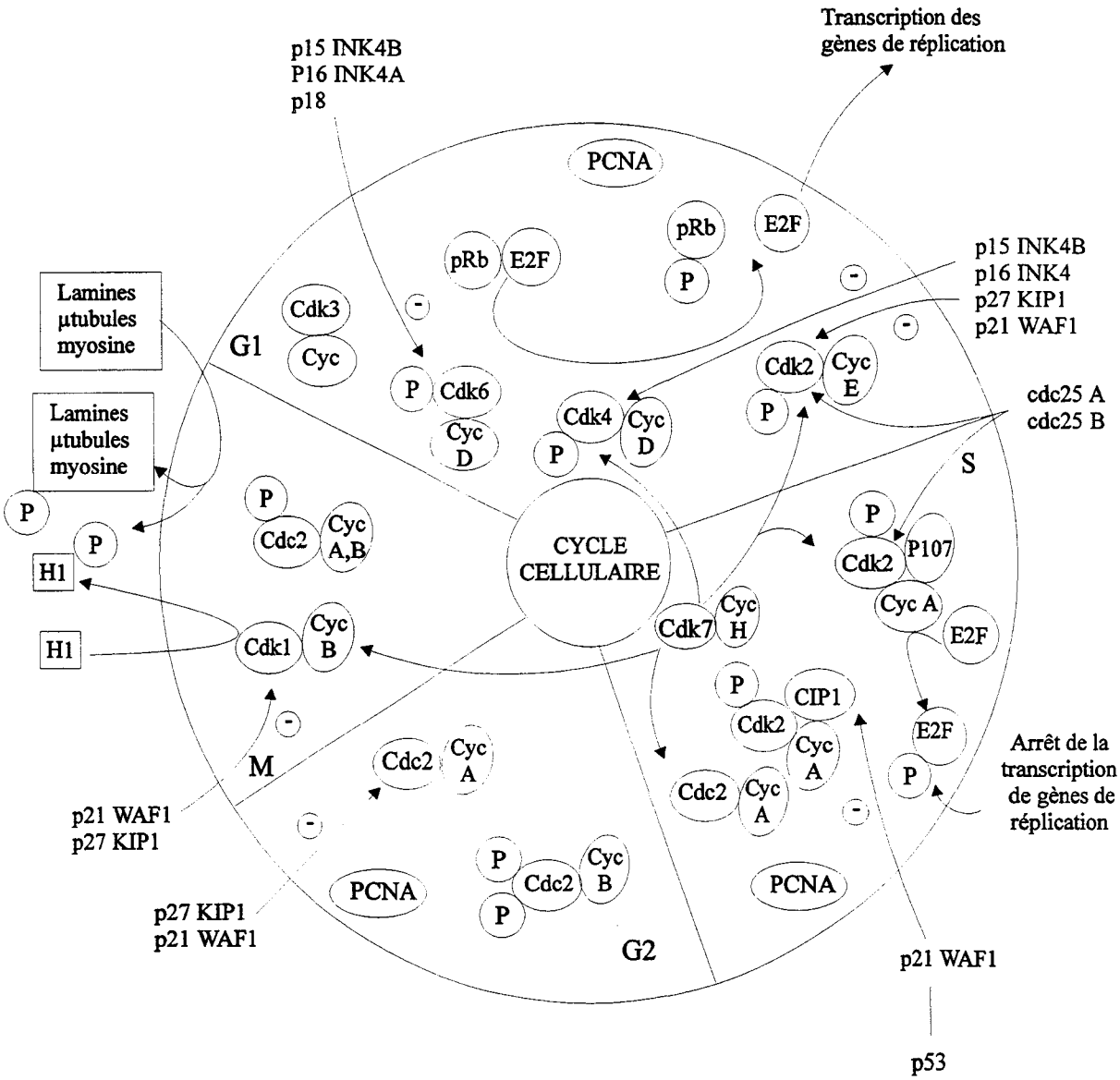


Figure 6. Mécanismes moléculaires de régulation du cycle cellulaire

des réactions de phosphorylation / déphosphorylation (Dulic *et al.*, 1992 ; Xiong *et al.*, 1993 ; Draetta, 1994 ; Coleman et Dunphy, 1994). Par exemple, Cdk2 est phosphorylée sur le résidu de thréonine 160. Cette modification est essentielle à l'acquisition de l'activité catalytique (Desai *et al.*, 1992). Ces phosphorylations sont sous le contrôle du complexe enzymatique CAK « Cdk-activating kinase » constitué lui-même d'une Cdk (Cdk7) associée à la cycline H (Fisher et Morgan, 1994 ; Mäkalä *et al.*, 1994).

Les cyclines D1, D2 et D3 en association avec leur partenaire catalytique Cdk6 et Cdk4 interviennent au cours de la phase G1 (Matsushime *et al.*, 1991). Elles lèvent l'inhibition de l'entrée en cycle provoquée par la protéine Rb non phosphorylée. La protéine Rb est le produit du gène du rétinoblastome, prototype des gènes suppresseurs de tumeurs. Lorsqu'elle est phosphorylée par ces complexes protéiques, la protéine Rb libère les facteurs de transcription de la famille E2F qui, avec d'autres protéines (DP-1, 2, 3), contrôlent l'expression de gènes essentiels pour la phase S et la croissance cellulaire tels que *c-myc, B-myb*, les gènes de Cdc2, de la dihydrofolate reductase, de la thymidine kinase, de la PCNA « Proliferating Cell Nuclear Antigen » et des cycline E et A (Chellappan *et al.*, 1991 ; La Thangue, 1994 ; Weinberg, 1995a). Parmi les 5 facteurs de transcription de la famille E2F, seuls E2F 1, 2, 3 associés à DP-1, 2, 3 sont sous le contrôle direct de pRb (Lees *et al.*, 1993 ; Livingston *et al.*, 1995). E2F 4 et 5 semblent être plus probablement sous le contrôle de molécules proches de pRb : p107 et p130 (Cao *et al.*, 1992 ; Ginsberg *et al.*, 1994). Le mécanisme précis par lequel pRb régule la transcription de divers gènes serait plus subtile qu'une simple alternance de séquestration et de libération de E2F. En effet, des expériences de gel retard ont permis de montrer que les complexes pRb-E2F-DP sont capables de se lier à la séquence consensus cible présente dans un certain nombre de promoteurs (Nevins, 1992 ; La Thangue, 1994). La protéine Rb réprimerait fortement l'activation de promoteurs sur lesquels le complexe est fixé. La suppression du site de liaison de pRb à E2F libérerait le promoteur de la répression de transcription induite par pRb (Weintraub *et al.*, 1992 ; Qin *et al.*, 1995). La transition G1/S suppose la participation du complexe Cdk2-cycline E (Koff *et al.*, 1992). La progression en phase S implique le couple Cdk2-cycline A et le passage de G2 à M est régulé par l'activation de Cdk1-cycline A et Cdk1-cycline B (King *et al.*, 1994). Quant au complexe Cdk7-cycline H, il pourrait intervenir tout au long du cycle cellulaire en assurant l'activation par phosphorylation des autres kinases (Darbon *et al.*, 1994).

La cellule dispose, en outre, d'une famille de régulateurs désignés CKI « inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines » pour réguler l'activité kinase des divers couples Cdk-

cyclines. Ces CKI contrôlent la prolifération cellulaire en régulant les transitions entre les différentes phases du cycle cellulaire. Ils modulent l'activité des Cdk en réponse à des signaux intra- ou extracellulaires. Ils sont classés en 2 catégories selon leur analogie de séquence et leur mode d'action :

- Les membres de la famille de $p16^{INK4a}$ (Serrano *et al.*, 1993 ; Quelle *et al.*, 1995) avec $p15^{INK4b}$ (Guan *et al.*, 1994 ; Quelle *et al.*, 1995), $p18^{INK4c}$ (Guan *et al.*, 1994 ; Hirai *et al.*, 1995), $p19/20^{INK4d}$ (Chan *et al.*, 1995 ; Guan *et al.*, 1996) qui entrent en compétition avec les cyclines pour la liaison aux Cdks.
- Les membres de la famille de $p21^{CIP1/WAF1}$ (Gu *et al.*, 1993 ; Harper *et al.*, 1993) avec $p27^{KIP1}$ (Polyak *et al.*, 1994 ; Toyoshima et Hunter, 1994) et $p57^{KIP2}$ (Lee *et al.*, 1995b) qui se lient aux complexes cyclines/Cdks et inhibent leur activité.

Parmi ces inhibiteurs, $p21^{CIP1/WAF1}$ se distingue par sa capacité à interagir avec le PCNA, un facteur auxiliaire des ADN polymérases δ et ε nécessaires à la réplication de l'ADN. Lorsque l'ADN est endommagé, $p21^{CIP1/WAF1}$ pourrait ralentir la progression du cycle cellulaire *via* l'inhibition de la réplication dépendante du PCNA et des complexes cyclines/Cdks. Les complexes cycline E/Cdk2, cycline A/Cdk2, cycline D /Cdk4 sont les cibles préférentielles de p21 (Elledge *et al.*, 1996). Ainsi, la surexpression du gène de p21 provoque l'arrêt du cycle en phase G1 par inhibition de l'entrée en phase S (Sheer et Roberts, 1995). La protéine $p21^{CIP1/WAF1}$ s'associe également, avec une affinité plus faible, au complexe cycline A/Cdc2 et pourrait moduler l'activité kinase impliquée dans le contrôle de l'entrée en mitose. Contrairement à $p27^{KIP1}$ qui semble empêcher l'activation des complexes cyclines/Cdks cibles par la CAK (Kato *et al.*, 1994), $p21^{CIP1/WAF1}$ supprime leurs activités kinase. Dans certains types cellulaires, l'induction de $p21^{CIP1/WAF1}$ est indépendante de la fonction du suppresseur de tumeurs p53. Elle joue alors un rôle important dans l'arrêt du cycle en réponse à des facteurs variés tels que le TGFβ ("Transforming Growth Factor β") (Li *et al.*, 1995), les espèces oxygénées toxiques (Qiu *et al.*, 1996), la vitamine D (James *et al.*, 1996), le TPA ("tetradecanoylphorbol acetate") (Zeng et El-Deiry, 1996), MyoD (Halevy *et al.*, 1995), le "Nerve Growth Factor" (NGF). P21 est également induite en réponse aux lésions de l'ADN provoquées par les anticancéreux ou les rayonnements UV. La synthèse de $p21^{CIP1/WAF1}$ peut également dépendre de la liaison de p53 au promoteur du gène *CIP1/WAF1*.

Dans la cellule normale, la protéine p53 est présente à faible concentration en raison notamment de sa demi-vie très courte (20 minutes). Les protéases responsables de sa dégradation ne sont pas connues, cependant la protéolyse médiée par l'ubiquitine pourrait

jouer un rôle dans sa dégradation. En plus de sa faible concentration, dans certaines cellules, p53 existe sous une forme latente incapable d'assurer sa fonction de facteur de transcription. Les signaux induisant p53 sont déclenchés par différentes situations de stress, des phénomènes d'hypoxie (Graeber *et al.*, 1996), une forte diminution du pool de ribonucléoside triphosphate (Linke *et al.*, 1996) ainsi que plusieurs types de lésions de l'ADN. Il en résulte une rapide augmentation du taux de p53 dans la cellule et l'activation de la fonction de facteur de transcription. Cette augmentation de p53 est proportionnelle à l'étendue des lésions. P53 active alors la transcription de différents gènes dont p21 *CIP1/WAF1* (El Deiry *et al.*, 1993), et *GADD45* dont le produit se lie à la PCNA et pourrait bloquer le cycle en G1 dans une voie indépendante de p21. La protéine p53 intervient également au niveau de la transition G2/M en empêchant une entrée prématurée dans une autre phase S (Cross *et al.*, 1995). De plus, p53 semble faire partie intégrante d'un processus régulant le nombre de centrosomes dans la cellule (Fukasawa *et al.*, 1996). La transition G1-G0-S serait également sous le contrôle de p53. P53 n'agit pas dans ce cas en tant que facteur de transcription mais se lie à une protéine membranaire codée par le gène *Gas* permettant ainsi l'entrée et l'arrêt des cellules en G0 (Del Sal *et al.*, 1995).

L'apparition et la croissance d'une tumeur ne sont pas seulement la conséquence d'une prolifération cellulaire excessive. Elles résultent aussi d'un déséquilibre entre prolifération et apoptose qui s'installe dès les premières étapes de la carcinogenèse. Un certain nombre de facteurs sont capables d'affecter la décision pour une cellule d'entrer dans un processus d'arrêt du cycle cellulaire ou d'apoptose. Ainsi, la surexpression de l'inhibiteur de Cdk $p27^{KIP1}$ serait capable d'induire l'apoptose de divers types de cellules cancéreuses (Wang *et al.*, 1997). Un taux faible de $p27^{KIP1}$ constitue d'ailleurs un important facteur de mauvais pronostic dans les cancers du sein et du colon (Porter *et al.*, 1997 ; Catzavelos *et al.*, 1997). D'autre part, l'apoptose peut être déclenchée par l'intermédiaire de p53. Elle prévaut lorsque les lésions de l'ADN persistent, que les facteurs de survie des cellules sont fortement limités ou qu'un oncogène activé force la cellule à se répliquer (E1A, E7, E2F-1 ou myc). P53 utiliserait pour initier l'apoptose un mécanisme d'activation transcriptionnelle, une interaction protéine-protéine ou les 2 à la fois (Figure 7, p. 60). Deux gènes (*Bax* et *IGF-BP3*) régulés par p53 peuvent influencer la décision d'entrée en apoptose (Miyashita et Reed, 1995 ; Buckbinder *et al.*, 1995). Ainsi, Bax induit par p53 peut se lier à Bcl-2 et bloquer sa capacité à empêcher l'apoptose. Le second gène régulé par p53 code pour "l'insulin like growth factor-binding protein-3". Cette protéine se lie à l'IGF pour empêcher l'interaction avec son récepteur et

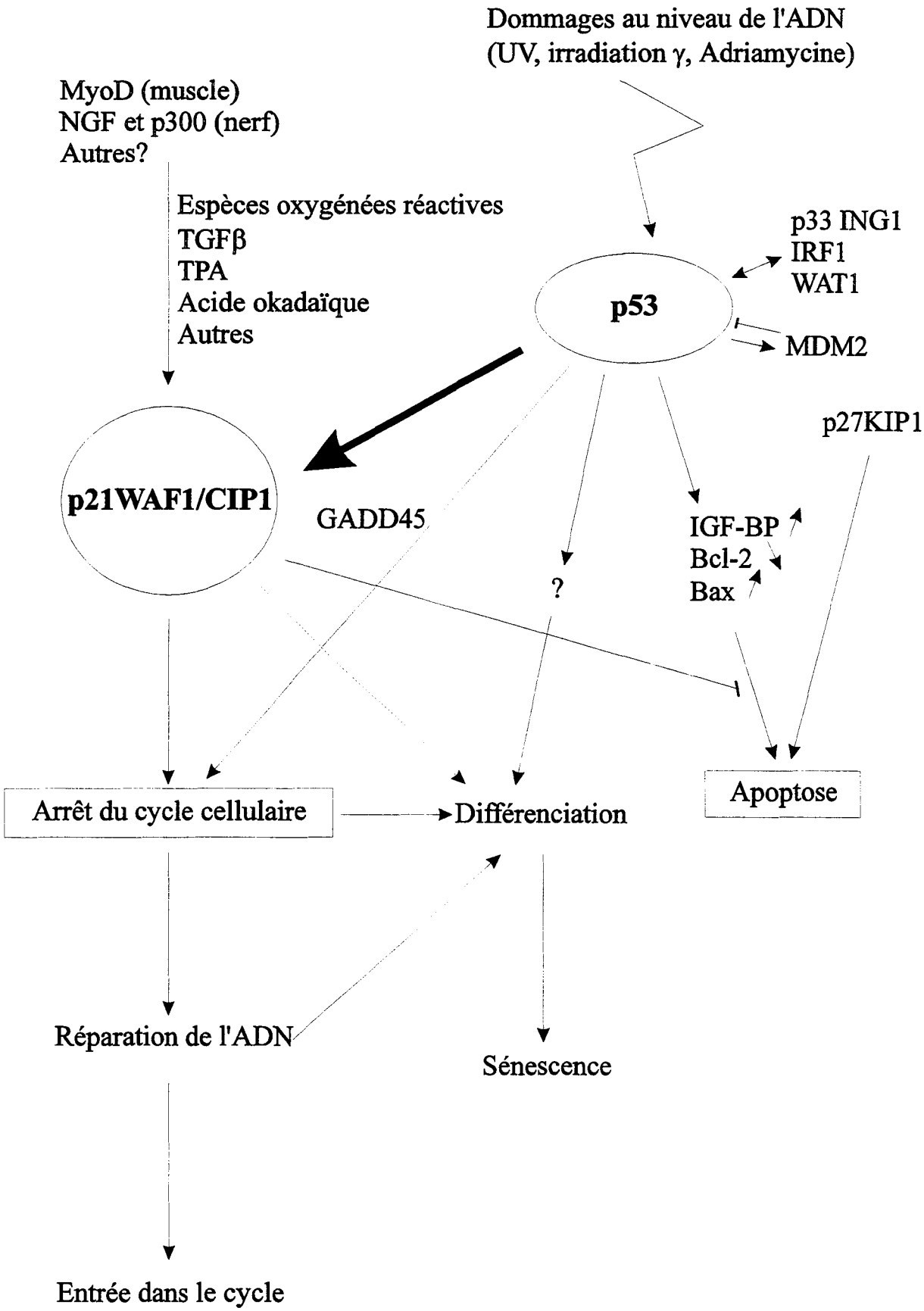


Figure 7 : Importance de p53 dans le contrôle de la prolifération cellulaire

bloquer son activité mitotique (Buckbinder *et al.*, 1995) favorisant ainsi l'apoptose ou une réponse mitogène beaucoup plus faible. Enfin, il a également été montré que le gène *fas/APO-1* pouvait être régulé par p53. Fas/APO-1 est une molécule de surface appartenant à la famille des récepteurs au TNF ("Tumor Necrosis Factor") et au NGF qui, une fois reconnue par des anticorps spécifiques, provoque la mort des cellules qui l'expriment (Nagata et Golstein, 1995).

La protéine p53 agit donc physiologiquement comme un des "gardiens" du génome cellulaire en arrêtant le cycle cellulaire ou en provoquant l'apoptose des cellules altérées. Elle n'assure pas seule ces fonctions mais semble requérir l'association avec un partenaire intime codé par un autre gène suppresseur de tumeur tel que *ING1* (Garkavtsev *et al.*, 1998), *IRF1* (Tanaka *et al.*, 1996) ou *WT1* (Maheswaran *et al.*, 1995). Ces associations avec les différents partenaires pourraient se faire en même temps, mais il est également possible que p53 choisisse une de ces protéines en fonction des circonstances. La défaillance de ce système provoque une importante susceptibilité au cancer.

VI.5.4. *Dysrégulation des facteurs de contrôle du cycle cellulaire et cancer*

Dans les cancers, les altérations les plus fréquemment rencontrées concernent les facteurs de contrôle impliqués dans la transition G1/S du cycle cellulaire. La voie p16-cycline D1-Cdk4-Rb joue un rôle majeur dans la régulation de la transition G1/S et dans la compréhension des développements de cancers. Au moins un des 4 gènes codant pour ces protéines est altéré ou muté dans la très grande majorité des cancers. De fait, il a été constaté:

- Une surexpression de la cycline D1 qui est provoquée, dans les lymphomes B, par une translocation du gène (Hall et Peters, 1996). Dans les cancers du sein, de l'oesophage et de l'estomac, cette augmentation de la cycline D1 est liée à une amplification et une surexpression du gène (Hall et Peters, 1996 ; Barnes, 1997).

- Une dérégulation du gène de la cycline E avec une surexpression de la protéine a été décrite dans divers cancers dont le cancer du sein (Buckley *et al.*, 1993 ; Keyomarsi et Pardee, 1993, 1996). Cette surexpression de la cycline E serait corrélée au stade d'évolution, à l'agressivité et à l'oestrogéno-indépendance de la tumeur (Keyomarsi *et al.*, 1994 ; Nielsen *et al.*, 1996).

- Cdk4 paraît également impliquée dans la prolifération néoplasique. L'amplification de son gène ainsi que de certains gènes voisins (MDM2 et GLI) a été observée dans deux lignées

d'ostéosarcomes. Les expressions de l'ARN messager de Cdk4 et de la protéine sont augmentées (Khatib *et al.*, 1993). Une mutation de Cdk4 a également été constatée dans un mélanome humain. Cette mutation empêche l'interaction de Cdk4 avec l'inhibiteur p16 et la rend insensible à cet inhibiteur de Cdks (Wölfel *et al.*, 1995).

- Des mutations du gène de Rb ont également été trouvées dans plusieurs types de cancer tels que les rétinoblastomes, les adénocarcinomes mammaires, les cancers pulmonaires à petites cellules et les ostéosarcomes (Horowitz *et al.*, 1990). Bien que le gène Rb soit intact dans certains cancers, sa fonction de suppresseur de tumeur peut être bloquée à la fois par la surexpression d'une kinase phosphorylant Rb, par la liaison de Rb à une oncoprotéine virale (papillomavirus humain) ou encore par la perte d'un inhibiteur des kinases de Rb (Weinberg, 1995b).

A côté des altérations chromosomiques et des dysrégulations d'expression, des pertes de matériel génétique sont observées. Ces pertes concernent le plus souvent les gènes suppresseurs de tumeurs qui permettent normalement à la cellule de restreindre sa prolifération en réponse à des signaux physiologiques. De fait, le gène suppresseur de tumeur p53 est fréquemment inactivé par délétion ou mutation dans divers types de cancers humains. En plus de ces mutations, p53 peut être inactivée dans certaines tumeurs (1/3 des sarcomes) par l'amplification du gène *MDM2* (Oliner *et al.*, 1992). Les traitements de néoplasie à base de radiothérapie et chimiothérapie conduisent à d'importants dommages au niveau de l'ADN et à l'induction de p53. Dans certains cas, l'apoptose dépendante de p53 module l'effet toxique des agents anticancéreux. Les tumeurs comportant fréquemment une p53 mutée répondent le plus souvent faiblement à ces traitements. Les mutations de p53 constituent dans ces cas un facteur de mauvais pronostic avec des taux de survie faibles (Aas *et al.*, 1996).

De nombreux travaux ont également montré que le gène p16 est fréquemment inactivé par délétion, mutation intragénique ou méthylation de l'ADN, dans un grand nombre de tumeurs solides et de leucémies aiguës lymphoblastiques (Larsen, 1997). La transmission d'allèles de $p16^{INK4a}$ mutés se traduit par une prédisposition héréditaire au développement de mélanomes et de cancers du pancréas et du foie (Foulkes *et al.*, 1997 ; Chaubert *et al.*, 1997).

VI.5.5. *Le processus métastatique*

La majorité des tumeurs sont des carcinomes, c'est-à-dire des tumeurs d'origine épithéliale qui évoluent généralement en plusieurs phases. Dans une première phase, les

cellules prolifèrent localement dans leur compartiment d'origine. Elles renforcent leur adhérence à la membrane basale épithéliale. Dans une deuxième phase, la membrane basale est lysée. Dans la troisième phase, les cellules cancéreuses se mobilisent, lysent la matrice extracellulaire du compartiment stromal et envahissent l'espace tissulaire ainsi libéré. A ce stade le cancer évolue par dissémination métastatique, provoquant le développement de tumeurs secondaires (Liotta *et al.*, 1986).

La dissémination métastatique est un processus crucial dans le développement agressif et néfaste de la maladie. Elle implique l'acquisition de propriétés invasives liées à l'activation de gènes codant des protéases (plasmine, héparinase, chondroïtinase) (Duffy, 1990 ; Monsky et Chen, 1993 ; Mignatti et Rifkin, 1993), des facteurs de croissance mitogènes et/ou motogènes (Valles *et al.*, 1990 ; Aaronson, 1991 ; Boyer *et al.*, 1994) ou à la répression des gènes codant des molécules d'adhérence intercellulaire (cadhérines, intégrines, protéoglycannes) (Glukhova *et al.*, 1995 ; Albelda, 1993).

En résumé, la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse et dans certains cas en cellule métastatique, est un processus complexe multifactoriel et multi-étapes.

VI.5.6. *Lactoferrine et prolifération néoplasique*

L'action de la lactoferrine sur la prolifération de lignées cellulaires *in vitro* et sur le développement de tumeurs et de métastases *in vivo* a fait l'objet de diverses études. L'effet de la lactoferrine varie selon les systèmes tumoraux et les lignées cellulaires utilisés au cours des expérimentations.

La lactoferrine humaine, utilisée aux concentrations de 1 µg/ml et jusqu'à 35 µg/ml, stimule la prolifération de lignées lymphocytaires humaines en milieu dépourvu de sérum. Cette stimulation de la prolifération n'est pas retrouvée pour des lignées de type épithélial Hela ou fibroblastique Flow 7000 ni pour des lignées lymphocytaires murines (Hashizume *et al.*, 1983). Le mécanisme par lequel l'effet mitogène de la lactoferrine dépend du phénotype cellulaire et de l'espèce n'est pas encore élucidé.

La lactoferrine humaine est également capable de stimuler la croissance de lignées tumorales intestinales. En effet, Amouric et coll. (1984) ont montré que, sous certaines conditions, la lactoferrine est capable de stimuler la prolifération d'une lignée cellulaire d'adénocarcinome de colon (HT-29). L'apo-lactoferrine seule ne permet pas la prolifération des cellules HT-29, alors que l'apo-transferrine stimule nettement cette prolifération. Cependant, si le milieu de culture est complémenté avec de l'apo-lactoferrine (7 µg/ml) et du

chlorate ferrique (0,5 µg/ml), la prolifération des cellules HT-29 augmente nettement. La fixation du fer ferrique à la lactoferrine qui le cède ensuite aux cellules permettrait d'expliquer la stimulation de la croissance de ces cellules. Cet effet est transitoire, la lactoferrine ne peut être substituée à la transferrine pour stimuler la prolifération à long terme. La stimulation de la prolifération des cellules intestinales par la lactoferrine humaine a été confirmée sur les cellules épithéliales intestinales de rat IEC-18 montrant ainsi que l'effet de la lactoferrine n'est pas strictement spécifique d'espèce (Hagiwara *et al.*, 1995). Cependant, à la différence des travaux de Amouric et coll. (1984), la stimulation de la prolifération est observée de la même façon avec l'apo- et l'holo-lactoferrine en présence de faibles concentrations de sérum (0,2 à 2%) alors que seule la ferritransferrine est capable de stimuler la prolifération. Ces observations indiquent clairement que la lactoferrine stimule la prolifération par un mécanisme différent de celui de la transferrine (Byatt *et al.*, 1990 ; Hagiwara *et al.*, 1995). Il a été constaté que la lactoferrine stimule la prolifération de façon plus intense que l'EGF ("Epidermal Growth Factor"). L'EGF présent dans le lait humain est considéré comme un agent mitogène majeur (Carpenter, 1980), physiologiquement important dans le développement du tractus digestif de l'enfant (Berseth, 1987). La présence d'EGF seul ne permet pas d'expliquer l'activité mitogène du lait. En effet, l'activité du lait sur les cellules intestinales IEC-18 est plus importante que celle de l'EGF purifié. Aussi, il a été suggéré que certaines substances du lait, dont la lactoferrine, pourraient potentialiser l'activité de l'EGF. Ainsi, Hagiwara et coll. (1995) ont montré que l'addition simultanée de lactoferrine et d'EGF au milieu de culture provoque un effet synergique de ces molécules sur la prolifération. La lactoferrine pourrait donc avoir à long terme un effet modulateur sur l'action des facteurs de croissance présents dans le sérum du milieu de culture.

Par contre, Sekine et coll. (1997a) ont récemment montré des effets anti-prolifératifs de la lactoferrine bovine *in vivo* chez le rat. Ainsi, l'administration de lactoferrine bovine à la concentration de 0.2 à 2% réduit significativement l'incidence et le nombre d'adénocarcinomes du colon chez les rats F344 traités par l'azoxyméthane. La réduction de la formation de foyers de cryptes intestinales anormales pourrait être liée à une activation de la cytotoxicité anti-tumorale des cellules NK chez ces animaux (Sekine *et al.*, 1977b).

L'effet antimitogène *in vitro* de la lactoferrine a essentiellement été mis en évidence sur les cellules mammaires. Rejman et coll. (1992) ont dans un premier temps observé que la lactoferrine bovine inhibe la prolifération d'une lignée bovine de cellules alvéolaires mammaires immortalisées par transfection stable du virus SV-40 (MAC-T). Cette inhibition

est détectée en présence ou en absence de 10% de sérum. Elle est d'autant plus importante que la concentration de lactoferrine est élevée (la concentration variant de 19,5 à 625 µg/ml). Cette étude a été confirmée par Hurley et coll. (1994). Ces auteurs ont montré que la lactoferrine induit l'inhibition de la prolifération d'une lignée de cellules épithéliales mammaires bovines transformées mais non tumorigènes (MAC-E). L'effet de la lactoferrine humaine a également été recherché sur les lignées de cellules mammaires humaines cancéreuses hormono-dépendante (MCF-7) ou hormono-indépendante (MDA-MB-231). Il a été observé que la lactoferrine humaine à forte concentration (500 µg/ml) a un effet inhibiteur modéré sur la prolifération des cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Cet effet inhibiteur serait spécifique d'espèce (Hurley *et al.*, 1994).

Comme nous le verrons dans les résultats, nous avons confirmé l'inhibition de prolifération induite par la lactoferrine sur ces cellules épithéliales mammaires humaines cancéreuses. Cette inhibition est en fait liée à l'action de la lactoferrine sur les acteurs contrôlant la transition G1/S du cycle cellulaire.

L'implication de la lactoferrine dans le développement de tumeurs chez l'homme a également été envisagée. Il a été observé que les patients atteints de leucémie myéloïde chronique présentent des anomalies quantitatives et qualitatives de la lactoferrine (Broxmeyer *et al.*, 1983, 1991). Ainsi, la production de lactoferrine par les granulocytes neutrophiles est fortement diminuée (Olofsson *et al.*, 1977 ; Brown *et al.*, 1985). De plus, la lactoferrine présente des anomalies dans sa capacité à interagir avec les cellules sanguines des patients atteints de leucémie (Broxmeyer *et al.*, 1983). Ces anomalies s'accompagnent d'une incapacité de la lactoferrine à inhiber la production de GM-CSF ("Granulocyte Monocyte-Colony stimulating factor") et de ferritine acide par les cellules mononucléées favorisant donc la prolifération anormale des cellules leucémiques (Broxmeyer *et al.*, 1977, 1978, 1991).

VI.5.7. *Lactoferrine et processus métastatique*

Récemment, Yoo et coll. (1997) ont étudié l'influence de la lactoferrine dans l'évolution des tumeurs et des métastases chez la souris. Ils ont constaté que la lactoferrine humaine inhibe *in vivo* la croissance de cellules de fibrosarcome murin MCA 4-P5 et de cellules NIH 3T3 transformées par l'oncogène *v-ras*. La lactoferrine humaine empêche également la formation de métastases pulmonaires induites par l'injection chez la souris de cellules de mélanome B16-F10. Cependant, dans ce même modèle expérimental, elle n'inhibe pas la croissance de cellules de mélanome B16-BL6 ni leur capacité à former des métastases

pulmonaires. L'utilisation d'un système hétérologue souris-homme rend difficile l'extrapolation de l'effet de la lactoferrine humaine en système homologue. L'effet de la lactoferrine pourrait être dépendant de l'espèce. En effet, les auteurs ont constaté que l'apo-lactoferrine bovine inhibe la formation de métastases et supprime le processus d'angiogenèse quel que soit le type cellulaire utilisé, alors que l'apo-lactoferrine humaine très semblable à la bovine possède une activité anti-tumorale spécifique du type cellulaire. Les mécanismes d'action de la lactoferrine humaine et bovine semblent être différents. Ainsi l'apo-lactoferrine bovine possède une activité anti-tumorale mais pas l'holo-lactoferrine. Par contre, Bezault et coll. (1994) ont montré que la lactoferrine humaine inhibe le développement des métastases chez la souris par un mécanisme dépendant de la saturation en fer. Selon ces auteurs, l'effet anti-néoplasique de la lactoferrine humaine serait essentiellement lié à la modulation de l'activité des cellules effectrices cytotoxiques naturelles ou NK. En effet, l'immunosurveillance anti-cellules tumorales assurée par les systèmes immunitaires naturel et spécifique joue un rôle important dans le contrôle du développement des tumeurs et des métastases.

VI.6. IMPLICATIONS DE LA LACTOFERRINE DANS LE SYSTEME IMMUNITAIRE

Le système d'immunosurveillance non restreint par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) met en jeu des cellules effectrices capables de lyser spontanément les cellules tumorales.

Au sens strict, les effecteurs de l'immunité naturelle sont les monocytes/macrophages, les leucocytes polymorphonucléaires et les cellules NK. Ces cellules immunes forment une première ligne de défense avant la mise en place de la réponse immune spécifique adéquate.

VI.6.1. *Les monocytes/macrophages et leucocytes polymorphonucléaires*

Les monocytes/macrophages et les leucocytes polymorphonucléaires sont impliqués dans la surveillance du développement des tumeurs. En effet, des études *in vitro* ont montré que ces cellules ont la capacité de détruire différents types de cellules tumorales (Mantovani *et al.*, 1979 ; Horwitz *et al.*, 1979 ; Rinehart *et al.*, 1979 ; McCormick *et al.*, 1991).

L'interaction des monocytes/macrophages et des polymorphonucléaires avec les cellules cibles ne semble pas dépendre de la reconnaissance d'antigènes spécifiques bien définis. Ces cellules immunes ont cependant une remarquable capacité à distinguer les cellules tumorales des cellules normales (Korec, 1980).

VI.6.2. *Lactoferrine et leucocytes polymorphonucléaires*

Les leucocytes polymorphonucléaires contribuent à la mise en jeu très rapide du système immunitaire non spécifique. Cette activité précoce est liée à leur mobilité qui leur permet d'arriver rapidement sur le site d'inflammation et à leur activité cytotoxique due en grande partie à la formation d'espèces oxygénées réactives. Or il a été observé que la mobilité des leucocytes polymorphonucléaires est fortement augmentée par la lactoferrine humaine purifiée à partir du colostrum (Gahr *et al.*, 1991). La réduction des charges de surface liée à la fixation de la lactoferrine sur les polymorphonucléaires pourrait expliquer cette augmentation de mobilité (Boxer *et al.*, 1982).

De plus, l'incubation de ces cellules pendant 30 minutes avec 500 µg/ml de lactoferrine stimule la production de superoxyde (Gahr *et al.*, 1991). La lactoferrine saturée en fer agirait en tant que catalyseur dans la réaction d'Haber-Weiss stimulant donc la production de radicaux hydroxyl (Ambruso et Jonhston, 1981).

VI.6.3. *Lactoferrine et monocytes/macrophages*

La lactoferrine présente dans les granules secondaires des polynucléaires neutrophiles régule, par rétroaction négative, la production des colonies de granulocytes-macrophages. Lorsque les monocytes sont isolés des lymphocytes, la lactoferrine n'a plus aucune action sur la myélopoïèse. En effet, la lactoferrine agit par un mécanisme d'action indirect. Elle inhibe la sécrétion d'interleukine 1 (Bagby *et al.*, 1986 ; Zucali *et al.*, 1989) qui est responsable de la synthèse de GM-CSF par les lymphocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Bagby *et al.*, 1981, 1983a, b). Cet effet inhibiteur de la lactoferrine, qui serait médié par l'interleukine 1β, s'effectue au niveau transcriptionnel (Penco *et al.*, 1995).

Il a été constaté que la lactoferrine exerce aussi un effet inhibiteur sur la libération de "tumor necrosis factor α", d'interleukine 1 et d'interleukine 6 par les monocytes préalablement stimulés par les lipopolysaccharides (Crouch *et al.*, 1992 ; Mattsby-Baltzer *et al.*, 1996). Plus récemment, Wlaszczyk et coll. (1998) ont montré que, *in vitro*, sous l'effet des LPS, la production de TNFα par les cellules mononucléées du sang périphérique humain de patients en chirurgie cardiaque est augmentée par la lactoferrine, mais une forte production de TNFα par ces cellules est au contraire inhibée par la lactoferrine. Les auteurs ont également confirmé que la lactoferrine réduit la production d'IL-6 par ces cellules stimulées par les LPS. Cet effet de la lactoferrine sur la libération de cytokines a également été observé chez la

souris. Ainsi, Zagulski et coll. (1989) ont montré l'effet protecteur de l'administration de lactoferrine bovine chez la souris 24 h avant le déclenchement d'une infection bactérienne expérimentale sévère. Cet effet protecteur pourrait s'expliquer par la réduction du choc septique induit par le TNFα. En effet, Machnicki et coll. (1993) ont constaté que l'administration en intraveineuse de lactoferrine bovine 24 h avant l'injection intraveineuse de 50 µg de LPS réduit significativement la libération d'IL-6 et de TNFα. L'inhibition de la libération de ces cytokines par la lactoferrine bovine a été mise en évidence, *in vivo*, chez la souris, au cours d'interventions telles que des thymectomie ou splénectomie (Zimecki *et al.*, 1998). La lactoferrine posséderait donc des propriétés anti-inflammatoires en empêchant la libération de cytokines qui permettent le recrutement et l'activation des cellules immunes sur le lieu de l'inflammation.

D'autre part, la lactoferrine semble capable de moduler l'activité cytotoxique des monocytes/macrophages. Le pré-traitement des monocytes avec la lactoferrine augmente la cytotoxicité de type "natural killer" vis-à-vis des cellules tumorales suggérant que la modulation de l'activité cytotoxique est liée à l'interaction directe de la lactoferrine avec les monocytes (Nishiya et Horwitz, 1982 ; Horwitz *et al.*, 1984 ; McCormick *et al.*, 1991). Par contre, la lactoferrine diminue de façon dépendante de la concentration l'activité ADCC ("antibody dependent cell cytotoxicity") des monocytes/macrophages (Nishiya et Horwitz, 1982). Ces effets opposés de la lactoferrine sur les différents mécanismes de cytotoxicité des monocytes/macrophages ne sont pas encore expliqués.

VI.6.4. *Les cellules NK*

Les cellules NK sont originellement décrites comme des grands lymphocytes granuleux (LGL). Les critères phénotypiques sont considérés comme essentiels pour définir les cellules NK. Elles constituent une sous-population lymphocytaire qui se distingue des lymphocytes T par l'absence d'expression du complexe CD3/TcR (Trinchieri, 1989). Cependant, comme les lymphocytes T, elles expriment la chaîne ζ associée à la molécule CD16 (Anderson *et al.*, 1990).

Différents marqueurs sont retrouvés sur toute ou une partie de la population. Parmi ces marqueurs, le CD56 et le CD16 sont usuellement utilisés pour distinguer les cellules NK des autres populations lymphocytaires. Ces cellules présentent également les molécules de surface CD94 (Kp43) (Aramburu *et al.*, 1991), CD2, CD8, CD57 et les molécules d'activation NKRP-1 (Lanier *et al.*, 1994) et p38 (Valiante et Trinchieri, 1993). Les cellules NK forment

cependant une population hétérogène avec les marqueurs caractéristiques exprimés plus ou moins fortement sur ces cellules conduisant donc à des phénotypes distincts $CD56^{bright}$ $CD16^{-}$ ou $CD56^{dim}$ $CD16^{+}$ (Nagler *et al.*, 1989).

Les différentes fonctions biologiques des cellules NK (cytotoxicité spontanée ou ADCC) vont être plus ou moins prédominantes selon les phénotypes exprimés. Ainsi, chez l'homme, l'ADCC est assurée par les cellules NK $CD56^{dim}$ $CD16^{+}$ (Trinchieri, 1989). Toutes les cellules NK possèdent également une activité cytotoxique spontanée médiée par l'intermédiaire du CD2, du NK-TR1 (Frey *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1993) et du NKG2-C (une protéine transmembranaire de 36 kDa possédant un domaine lectinique de type C (Duchler *et al.*, 1995), cependant l'essentiel de cette fonction est assuré par les cellules $CD56^{bright}$ $CD16^{-}$. L'interaction des cellules NK avec les cellules tumorales aboutit à l'apoptose des cellules cibles.

VI.6.5. *Lactoferrine et cellules NK*

Hammarström et coll. (1995) ont montré que la lactoferrine se fixe sur la population NK $CD56^{+}$. Cette interaction suggère que la lactoferrine pourrait agir directement sur ces cellules. En fait, les résultats obtenus sont relativement contradictoires. En effet, aucune action de la lactoferrine n'a été mise en évidence sur l'activité cytotoxique NK d'une population lymphocytaire totale (Nishiya et Horwitz, 1982 ; Horwitz *et al.*, 1984 ; McCormick *et al.*, 1991). Shau et coll. (1992) ont montré que la lactoferrine augmente la cytolyse des cellules tumorales K562 et des cellules LAK ("lymphokine activated killer")-sensibles UCLA-SO-M14 lorsqu'elle est ajoutée aux cellules effectrices et aux cellules cibles au début du test d'activité cytotoxique. Cependant, le pré-traitement des cellules effectrices (population lymphocytaire totale) avec 500 µg/ml de lactoferrine pendant 30 minutes n'a pas permis de mettre en évidence une activité de la lactoferrine sur ces cellules. Ce pré-traitement très court des cellules et leur utilisation très rapide après le conditionnement pourrait expliquer l'absence de réponse des cellules effectrices à la lactoferrine. En effet, à l'exception de l'induction d'un signal de transduction activant à terme un gène précoce et conduisant donc à une réponse très rapide des cellules à un stimulus, on peut envisager qu'un temps plus important après le pré-traitement soit nécessaire pour observer un quelconque effet de la lactoferrine. Ainsi, par exemple, il faut trois à six heures pour observer l'action de l'interleukine 2 sur la stimulation de l'activité cytotoxique des cellules NK et plus de 72 heures pour mettre en évidence une prolifération de ces cellules (Trinchieri *et al.*, 1984).

L'effet de la lactoferrine sur l'activité cytotoxique anti-tumorale *in vivo* a également été recherché. L'administration intrapéritonéale de 1 mg de lactoferrine humaine 24 heures avant l'injection de cellules de mélanome B16-F10 aux souris C57BL/6 réduit de façon notable la formation de métastases pulmonaires. L'utilisation de silice pour neutraliser l'activité des macrophages augmente légèrement l'incidence des métastases pulmonaires, suggérant un effet cytotoxique modéré des macrophages sur ce type de tumeurs. D'autre part, le traitement des souris C57BL/6 par la lactoferrine permet de réduire les métastases chez ces animaux. Le pouvoir anti-métastatique de la lactoferrine serait donc lié à l'interaction avec d'autres cellules effectrices. Les anticorps anti-asialo-GM1 qui neutralisent l'activité des cellules NK, administrés chez ces souris, provoquent une nette augmentation de la formation de métastases pulmonaires. De plus, la lactoferrine n'a plus aucun effet chez ces animaux. Les auteurs ont donc suggéré l'implication des cellules NK dans l'activité anti-métastatique de la lactoferrine (Bezault *et al.*, 1994).

Par ailleurs, Garré et coll. (1992) ont montré que la lactoferrine se fixe sur les cellules K562. Cette liaison forte et spécifique de la lactoferrine est suivie par l'internalisation et la localisation nucléaire de la protéine. Il apparaît donc que la lactoferrine sécrétée par une cellule pourrait être capturée par une autre cellule cible notamment les cellules NK. Elle serait transportée intacte jusqu'au noyau. Trois séquences consensus pour la liaison de la lactoferrine à l'ADN ont été déterminées (He et Furmanski, 1995). En interagissant avec ces séquences consensus, la lactoferrine pourrait agir en tant que facteur de transcription. Les gènes spécifiques régulés par la lactoferrine n'ont pas encore été identifiés.

VI.6.6. *L'immunité spécifique*

Dans la réponse anti-tumorale spécifique, les antigènes tumoraux libérés par la cellule tumorale sont endocytés par les cellules présentatrices de l'antigène. L'antigène, après avoir été apprêté par ces cellules, est présenté sous forme de peptides antigéniques associés aux molécules HLA de classe II. Le signal antigénique est délivré aux lymphocytes T $CD4^+$ lors de la reconnaissance du complexe par le récepteur de l'antigène (TcR). Ce signal provoque l'activation des lymphocytes T $CD4^+$ lorsqu'il est associé à un second signal dit signal de co-stimulation. Ce signal de co-stimulation résulte de l'interaction de la molécule de surface B7 exprimée sur les cellules présentant l'antigène avec le récepteur CD28 des cellules $TCD4^+$. Ces deux signaux associés engendrent le développement de la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Les lymphocytes $TCD4^+$ activés prolifèrent et sécrètent des cytokines.

Certains de ces médiateurs solubles vont permettre l'amplification de la réponse immune cytotoxique spécifique.

La réponse cytotoxique spécifique est relayée par les lymphocytes $TCD8^+$. Dans ce cas, les protéines endogènes, produits d'expression des gènes des cellules tumorales, sont présentées sous la forme de complexes peptide antigénique-molécules HLA de classe I. Les lymphocytes $TCD8^+$ qui reconnaissent ces complexes par l'intermédiaire de leur TcR vont alors proliférer et se différencier en lymphocytes cytotoxiques. Ces lymphocytes cytotoxiques induisent l'apoptose des cellules tumorales par un mécanisme de cytolyse. Ils produisent également des cytokines qui vont agir sur différentes catégories cellulaires et assurer l'amplification de la réponse immune anti-tumorale.

VI.6.7. *Lactoferrine et effecteurs de la réponse immune spécifique*

Comme nous l'avons cité précédemment, le récepteur de la lactoferrine est exprimé à la surface des lymphocytes activés (Mazurier *et al.*, 1989 ; Hammarström *et al.*, 1995). L'interaction de la lactoferrine avec ces cellules favoriserait leur prolifération (Mazurier *et al.*, 1989). Cependant, d'autres auteurs ont montré que la lactoferrine réduirait la prolifération d'une culture lymphocytaire mixte (Richie *et al.*, 1987 ; Slater et Fletcher, 1986). Comme nous l'avons vu précédemment, cet effet négatif de la lactoferrine sur la prolifération pourrait s'expliquer par une inhibition de la sécrétion d'interleukine 1 et de TNFα par les macrophages, entraînant la diminution de production d'interleukine 2 par les lymphocytes (Bagby *et al.*, 1986 ; Crouch *et al.*, 1992) et donc une réduction de prolifération.

Il a également été mis en évidence que les thymocytes murins $CD4^-$ $CD8^-$ incubés *in vitro* avec la lactoferrine acquièrent le phénotype $CD4^+$ caractéristique des lymphocytes T auxiliaires. De plus, la lactoferrine humaine, injectée à la concentration de 10 µg/ml en intrapéritonéale chez la souris trois heures avant l'immunisation avec des globules rouges de mouton, provoque une augmentation de la réponse immune humorale qui pourrait être liée aux lymphocytes T auxiliaires ($CD4^+$) (Zimecki *et al.*, 1991). D'autre part, la lactoferrine stimulerait la production des médiateurs solubles sécrétés par les lymphocytes T auxiliaires et augmenterait ainsi l'activité des cellules NK induisant chez la souris une résistance aux infections par le cytomégalovirus (Shimizu *et al.*, 1996). Ces observations sont cependant controversées. En effet, Duncan et Mc Arthur (1981) ont montré que la lactoferrine exerce un effet suppresseur sur la réponse humorale des lymphocytes T. Les conditions expérimentales,

notamment dans ce cas la présence de macrophages, pourraient expliquer ces conclusions contradictoires.

L'influence de la lactoferrine sur l'activité cytotoxique de la population lymphocytaire a également été recherchée. Il a ainsi été montré que la lactoferrine, aux concentrations de 0,8 à 80 µg/ml, ne modifie pas l'activité cytotoxique de la population lymphocytaire totale (Nishiya et Horwitz, 1982 ; Mc Cormick *et al.*, 1991). Ces observations suggèrent que la lactoferrine n'influence pas directement la réponse à médiation cellulaire des lymphocytes cytotoxiques. La lactoferrine ne semble pas non plus capable d'agir indirectement sur la cytotoxicité en modifiant la production de facteurs solubles par les lymphocytes $TCD4^+$. De plus, la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) ne varie pas en présence de lactoferrine humaine.

En conclusion, il apparaît que la lactoferrine est capable d'interagir avec les cellules effectrices de l'immunité naturelle et de l'immunité spécifique. Elle semble agir sur ces cellules en modulant directement ou indirectement leurs activités dans les processus inflammatoire et cytotoxique (Figure 8, p. 73). Cependant, ces effets restent relativement controversés et les mécanismes d'action sont mal définis.

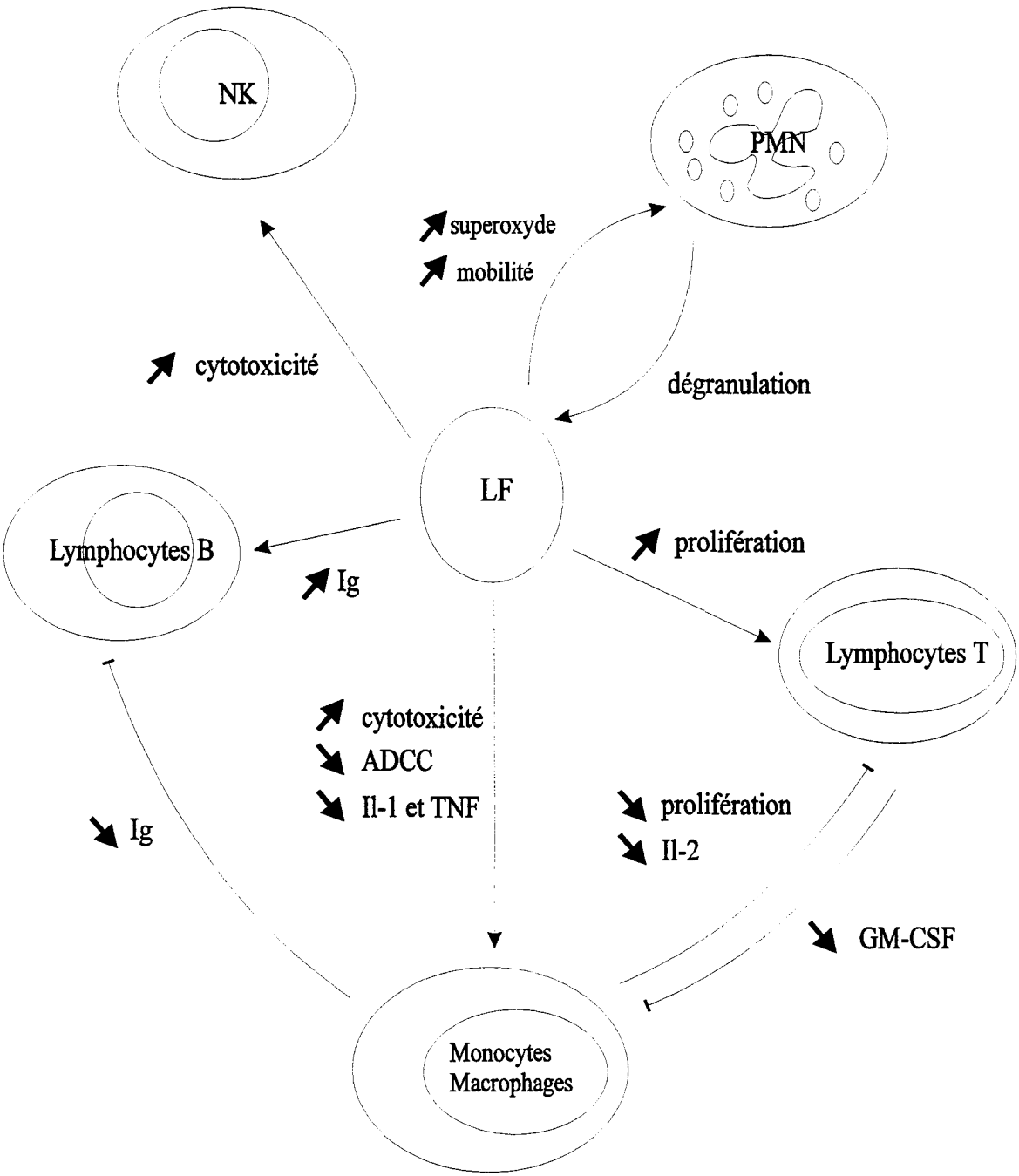


Figure 8. Implications de la lactoferrine dans le système immunitaire

Travaux Personnels

ETUDE DE LA CYTOLYSE DE CELLULES CIBLES PAR LES CELLULES EFFECTRICES DE L'IMMUNITE NATURELLE (CELLULES "NATURAL KILLER" NK) ET DE SA MODULATION PAR LA LACTOFERRINE

I. INTRODUCTION

Le développement d'une tumeur, son extension locorégionale, voire l'implantation de métastases à distance sont les conséquences de processus complexes au niveau de la cellule tumorale elle-même mais également au niveau des interactions entre la tumeur et le système immunitaire de l'hôte.

La lactoferrine libérée lors de la dégranulation des polynucléaires neutrophiles au niveau des sites inflammatoires constitue la source principale de lactoferrine circulante. Elle pourrait influer sur l'activité cytotoxique naturelle en particulier des cellules NK comme l'ont montré diverses études *in vivo* et *in vitro*. Divers epithelia expriment et sécrètent également la lactoferrine qui apparaît être régulée négativement lorsque ces tissus deviennent cancéreux, suggérant que la lactoferrine pourrait avoir un effet direct sur le développement tumoral.

Afin de vérifier ces différentes hypothèses dans le but de déterminer puis d'approfondir le mécanisme d'action de l'effet antiprolifératif de la lactoferrine, nous avons étudié la cytolyse par les cellules NK de diverses cellules cibles en suivant différents protocoles de traitement par la lactoferrine. Le choix des cellules cibles a été dicté (i) par leur capacité à fixer la lactoferrine, (ii) par le devenir de la lactoferrine après la fixation sur ces cellules, (iii) par les phénotypes cellulaires différents et la probabilité du contact *in vivo* avec les types cellulaires similaires dans les conditions physiologiques et/ou pathologiques.

L'action globale de la lactoferrine sur la cytolyse des cellules cibles par les cellules NK a été évaluée en ajoutant la lactoferrine au milieu d'incubation contenant les cellules cibles et les cellules effectrices au début du test de cytotoxicité. L'effet de la lactoferrine sur les cellules NK a ensuite été déterminé en traitant ces cellules avec différentes concentrations de lactoferrine avant de réaliser le test de cytotoxicité. Enfin, en préincubant les cellules cibles avec la lactoferrine, nous avons pu apprécier son effet sur la sensibilisation de ces cellules à l'activité cytotoxique ainsi que sur la prolifération cellulaire.

Cette approche constitue une base de travail devant ensuite permettre d'approfondir les mécanismes moléculaires de l'effet de la lactoferrine dans le développement tumoral.

II. RESULTATS

Ce travail a fait l'objet d'un premier article intitulé :

" **Effects of human lactoferrin on NK cell cytotoxicity against haematopoietic and epithelial tumour cells**"

publié dans la revue : "Biochimica et Biophysica Acta", section "Molecular cell Research".

Effects of human lactoferrin on NK cell cytotoxicity against haematopoietic and epithelial tumour cells

Eve Damiens, Joël Mazurier, Ikram El Yazidi, Maryse Masson, Isabelle Duthille , Geneviève Spik*, Yolande Boilly-Marer

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

*Address correspondence and reprint requests to Pr. Geneviève Spik, Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du CNRS n°111, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

Fax number: 33.3.20.43.65.55 ; e-mail: Genevieve. Spik @ univ-lille1.fr

Keywords : Lactoferrin ; NK cells ; Cytotoxicity ; Tumour cells

Abstract

Lactoferrin is an iron-binding glycoprotein implicated in particular in the control of immune functions and cell proliferation. We have investigated its involvement, at inflammatory concentrations, in cancer progression. We report that lactoferrin has a significant effect on NK cell cytotoxicity against haematopoietic and breast epithelial cell lines. Lactoferrin increases cytolysis at a low concentration (10 μg/ml) while at a high concentration (100 μg/ml) it modulates cytolysis depending on the target cell phenotype. By pre-treatment of either NK cells or target cells with lactoferrin, we have demonstrated that the lactoferrin effect is due both to a modulation of NK cell cytotoxicity and the target cell sensitivity to lysis. Lactoferrin binds to 91% of the naturally heterogeneous $CD56^{dim/bright}$ NK cell population and increases the NK cell cytotoxic activity at low concentrations. High concentrations of lactoferrin seem to be toxic for the $CD56^{bright}$ NK cells and decrease NK cell cytotoxicity. Lactoferrin also exerts an effect on target cells depending on the cell phenotype. It does not modify the susceptibility to lysis of haematopoietic cells such as Jurkat and K-562 cells, but does significantly increase that of the breast and colon epithelial cells. We have also demonstrated that lactoferrin inhibits epithelial cell proliferation by blocking the cell cycle progression.

Abbreviations: mAbs, monoclonal antibodies; PE, phycoerythrin; BSA, bovine serum albumin; Lf, lactoferrin; HyF-Lf, 5-({[2-(carbohydrazino)methyl]-thio}acetyl)amino-fluorescein labelled lactoferrin; NK cells, natural killer cells.

1. Introduction

Lactoferrin, also called lactotransferrin [1], is an iron binding glycoprotein synthesized by epithelial cells and precursors of polymorphonuclear cells. Lactoferrin is mainly found in external secretions such as breast milk and in neutrophil secondary granules [2]. More recently, some observations possibly suggest an important role for lactoferrin in the primary defence against tumorigenesis [3]. It has been shown that lactoferrin regulates the development of tumour by a direct effect on tumour cells [4]. However, the activity of lactoferrin on cell proliferation remains highly controversial. In fact, it has been reported that lactoferrin promotes the proliferation of cell lines [5] and has no effect on lymphocyte proliferation [6] or inhibits mammary cell growth [7]. These opposite effects on tumour cells may be correlated to the phenotype and the lactoferrin receptor expression. In fact, lactoferrin binds to both high affinity specific receptors [8, 9] and to low affinity binding sites such as glycosaminoglycans [10-12].

In previous works, the binding parameters of human lactoferrin to haematopoietic and epithelial cell lines of various origins were investigated. Lactoferrin binds to haematopoietic cells such as the lymphoblastic T cells Jurkat and the K-562 erythroleukemia cells. The Jurkat cell line possesses a membrane bound receptor which interacts with lactoferrin with a dissociation constant of 80 nM and 0.3 x 10^6 sites [13]. Garré et al. found that K-562 cells exhibit 10 x 10^6 binding sites for lactoferrin with a high affinity (25 nM) [14]. Lactoferrin enters these cells via receptor mediated endocytosis where it is almost degraded in the lysosomal compartment [14, 15]. Human lactoferrin also binds to various epithelial cells, in particular to breast non malignant SV-40 immortalized cells (HBL-100), to breast carcinoma cells (MCF-7) [16] and to various subclones of the colon adenocarcinoma cell line HT-29 [17, 18]. The dissociation constant is about 200 nM with more than 1 x 10^6 sites for these breast cells. HT29-18-C1 cells exhibit 5.8 x 10^6 binding sites with relatively low affinity (840 nM). In the colon cells, a large part of surface bound lactoferrin is not internalized under physiological conditions [17, 18]. In contrast to haematopoietic cells, lactoferrin binds to these epithelial cells and remains for the most part at the cell surface [16, 18, 19]. Lactoferrin is not internalized in these various cells, suggesting that the intracellular effects of lactoferrin in these breast and colon epithelial cells differ from those in haematopoietic cell lines.

Recently, it was shown that the antitumoral activity of lactoferrin may be explained by the modulation of the natural killer (NK) cell and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity

[3, 20]. The mechanisms by which lactoferrin modulates the cytolysis of tumour cells by NK cells is poorly understood. We have hypothesized that lactoferrin could modulate the biological responses of either NK cells or target cells by interactions with lactoferrin receptors found on these two cell types.

As the parameters for the lactoferrin binding to Jurkat cells and epithelial cell lines are different, we compared the cytolysis of these two kinds of cells by NK cells, in the presence or absence of lactoferrin. In a second step, to understand the events induced by the presence of lactoferrin, we analysed the effects of lactoferrin on cytolysis when it is incubated with NK cells or target cells, respectively. Finally, to define the mechanism of lactoferrin activity on cancerous epithelial cells, we determined its effects on proliferation and induction of cell death.

The NK cell population is naturally heterogeneous ; it contains a majority of $CD56^{dim}$ cells and a minority of $CD56^{bright}$ [21]. We demonstrated that on the heterogeneous NK cell population, 91% of the cells bind lactoferrin. Low concentrations of lactoferrin lead to the activation of NK cell cytotoxicity. High concentrations of lactoferrin seem to be toxic for the $CD56^{bright}$ NK cells. Lactoferrin also acts on target cell sensitization to lysis according to the phenotype and the nature of the lactoferrin receptor. We demonstrated that lactoferrin inhibits breast and colon epithelial cell proliferation by blocking the cell cycle progression at the G1 to S transition or at the beginning of the S phase. This result points to the potential role of lactoferrin in providing protection from tumour development.

2. Materials and methods

2.1. Cells

The effector cells were prepared from the citrated blood of healthy donors by lymphoprep gradient separation [22]. Monocytic cells were extensively depleted by adherence to plastic. Preparations of CD56+ NK cells (purity: 85.5 ± 5.5%) were isolated by negative selection using monoclonal antibodies (mAbs) against CD3 (Immunotech; Marseille, France). The effect of lactoferrin on NK cells was measured simultaneously on this preparation and on cells that had undergone a second negative selection (purity of NK cells: 95 ± 3.2%) using anti-CD20 mAbs (Immunotech) to eliminate an increase of NK cell cytotoxicity after activation of B cells by lactoferrin. Briefly, anti-CD3 or anti-CD20 mAbs were fixed on a tissue culture dish in Tris (0.05 M) -HCl buffer pH 9.5 for 4 h at 20°C. The cellular

suspension was added to the fixed mAbs for 1 h at 37°C. Effector cells were finally resuspended in the RPMI medium.

Cancerous haematopoietic cells and various epithelial cells were used as target cells. Jurkat cells (lymphoblastic T-cell line) ECACC and the erythroleukemia cell line K-562 (ATCC) were grown in RPMI 1640 medium (Gibco-BRL; Eragny, France) supplemented with 2 mM L-glutamine (Eurobio ; Les Ulis, France), 50 µg/ml of gentamycin (Gibco-BRL) and 10% of foetal calf serum (FCS). Human breast cancer epithelial cells MCF-7 (ATCC), and HBL-100 (SV40 immortalized human breast epithelial cell line, reportedly non tumorigenic in nude mice), were grown in Eagle's minimal essential medium (Gibco-BRL) containing 10% FCS, 1% non essential amino acids (Eurobio), 2 mM L-glutamine, 5 µg/ml insulin (Endopancrine, Organon; Serifontaine, France), penicillin and gentamycin at 37°C, 5% CO_2. HT29-18-C1, a subclone of the human colon adenocarcinoma cell line HT-29, was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco-BRL) supplemented with 10 % FCS, 2 mM L-glutamine and 50 mg/l gentamycin (Gibco-BRL) at 37°C, 10 % CO_2.

2.2 Preparation of lactoferrin

Lactoferrin was prepared from a single human lactoserum by ion-exchange chromatography as previously described [23]. The degree of purity (>99%) of human lactoferrin was checked by 10 % SDS polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and HPLC (High Pressure Liquid Chromatography). Lipopolysaccharides were removed by chromatography through a detoxi-gel column (Pierce Chemicals Co., Rockford, IL, USA). The effects observed with our purified lactoferrin were verified with lactoferrin purchased from Calbiochem (purity >99%) (La Jolla, CA, USA).

Fluorescent lactoferrin (HyF-Lf) was obtained by complexing the 5-({[2-(carbohydrazino)methyl]-thio}acetyl)amino-fluorescein to lactoferrin according to the technique described by Leveugle et al. [9].

2.3. Cytotoxicity assay

Target cells were incubated with 20 µCi ^{51}Cr $Na_2{}^{51}CrO_4$, (ICN Biomedical; Irvine, CA, USA) at a cell density of 2.10^5 in 100 µl RPMI. The adherent epithelial cells, at a cell density of 5.10^3/well in 100µl of medium, were labelled by addition of 1 µCi ^{51}Cr/well. Effector cells were added at effector / target ratios ranging from 5:1 to 80:1. At the end of the 12 h ^{51}Cr

assay, cells were collected by centrifugation ; an aliquot of supernatant was collected from each well and the ^{51}Cr released was counted using a gamma counter (1282 Compugamma, LKB Wallac; Turky, Finland). The percentage of chromium released was calculated according to the following equation: (experimental cpm - control cpm) / (maximal cpm - control cpm) x 100.

Maximum ^{51}Cr release was obtained by incubating target labelled cells (5.10^3 cells) into medium containing 1% Triton X-100. Spontaneous release (control cpm) was determined by incubation of 5.10^3 target labelled cells into medium. The ratio Tmin / Tmax did not exceed 3.7 % for all the cytotoxic assays performed.

Global effect of lactoferrin on cytotoxicity was determined by adding lactoferrin at the beginning of the cytotoxicity assay at concentrations of 10 µg/ml or 100 µg/ml. Lactoferrin was maintained throughout the chromium release assay. The effects of lactoferrin on either NK cell activity or target cell sensitivity to lysis were also investigated. In order to determine the lactoferrin effect on NK cell cytotoxicity, cells were pre-treated with lactoferrin (concentration ranging from 0 to 100 µg/ml) for 12 h at 37°C in RPMI medium. Cells were washed just before the cytotoxicity assay to eliminate lactoferrin excess. Similar protocol was used to evaluate the effect of lactoferrin on target cell sensitivity to lysis.

2.4. lactoferrin binding to NK cells

We first verified the lactoferrin binding to NK cells by cytofluorimetry. NK cells were washed twice with PBS and 5.10^5 cells were stained with 10 µl of mAbs against CD56 (Sigma) for 1 h at 4°C. Then, 5 µl of antibodies against mouse IgG coupled to phycoerythrin (PE), 10 µl of HyF-lactoferrin at concentrations ranging from 1 to 20 µg/ml and 50 molar excess of unlabelled lactoferrin were added for 1 h at 4°C. The non-specific control was performed by incubating the cells with Abs against mouse IgG, HyF-lactoferrin and unlabelled lactoferrin in the absence of a staining with mAbs against CD56. Stained cells were washed and analysed on a Becton-Dickinson FACScan flow cytofluorimeter. (Becton Dickinson Immunocytometry Systems; San Jose, CA, USA).

2.5. Effect of lactoferrin on target cells

Cell proliferation was evaluated by thymidine uptake. Epithelial cell lines MCF-7, HBL-100 and HT29-18-C1 were cultured in a 12 well plate at a cell density of 40,000 cells per 500 µl of medium per well. Then, cultures were incubated in the presence of lactoferrin at

concentrations ranging from 0 to 100 μg/ml. After 24 h, 2 μCi of (methyl-^{3}H) thymidine (specific activity 50 Ci/mmol, ICN, Biomedical) were added to each well for 4 h at 37°C. The cells were washed with PBS, and treated with cold 5% trichloracetic acid for 45 min at 4°C. Cells were rinsed with water and solubilised with 0.3 M NaOH for 1 h at 37°C. The radioactivity of the cells was measured using a beta counter (Beckman; Fullerton CA, USA).

The effect of lactoferrin on cell cycle progression was determined by cytofluorimetry analysis. Epithelial cell lines HBL-100, MCF-7 and HT29-18-C1 were grown to 50% confluence, and placed in a serum-free medium for 24 h for the starvation-synchronized experiments. The cells were cultured in a medium of 1% FCS in the presence of 100 μg/ml lactoferrin for 48 h. They were then trypsinized and fixed in cold 70% ethanol for 4 h. The fixed cells were washed with PBS and incubated with 5 μg of RNAse A (Sigma) per ml and stained with 25 μg/ml of propidium iodine for 1 h at 37°C. The stained cells were analysed on a FACscan cytofluorimeter using the cellFIT Software program.

3. Results

3.1. Effect on cytolysis of lactoferrin added simultaneously to NK cells and target cells

To test NK cell cytotoxicity in the presence of lactoferrin, lactoferrin was added to the medium and maintained throughout the chromium release assay. Divergent results were obtained depending on cellular type and lactoferrin concentration. Whatever the effector / target ratio chosen, the addition of lactoferrin (10 μg/ml) resulted in a slight but significant increase of up to 15% in the lytic ability of the NK cells with regard to the haematopoietic Jurkat and K-562 cell lines (Fig. 1A). In contrast, a high concentration of lactoferrin (100 μg/ml) decreased by about 16 to 20% the lysis of these haematopoietic cells (Fig. 1B).

Lactoferrin used at a low concentration (10 μg/ml) increased NK cell cytotoxicity against the HBL-100, MCF-7 and HT29-18-C1 epithelial cells by about 25 to 35% (Fig. 2A). A high concentration of lactoferrin (100 μg/ml) increased cytotoxicity by 40 to 55% on the MCF-7 cancer cell line and by 60 to 65% on the HBL-100 and HT29-18-C1 cell lines (Fig. 2B).

The increase of cytolysis in the presence of lactoferrin at a low concentration, whatever the target cells used in this study, may be correlated to an activation of the NK cells by lactoferrin. However, the divergent results observed on haematopoietic and epithelial cells at a

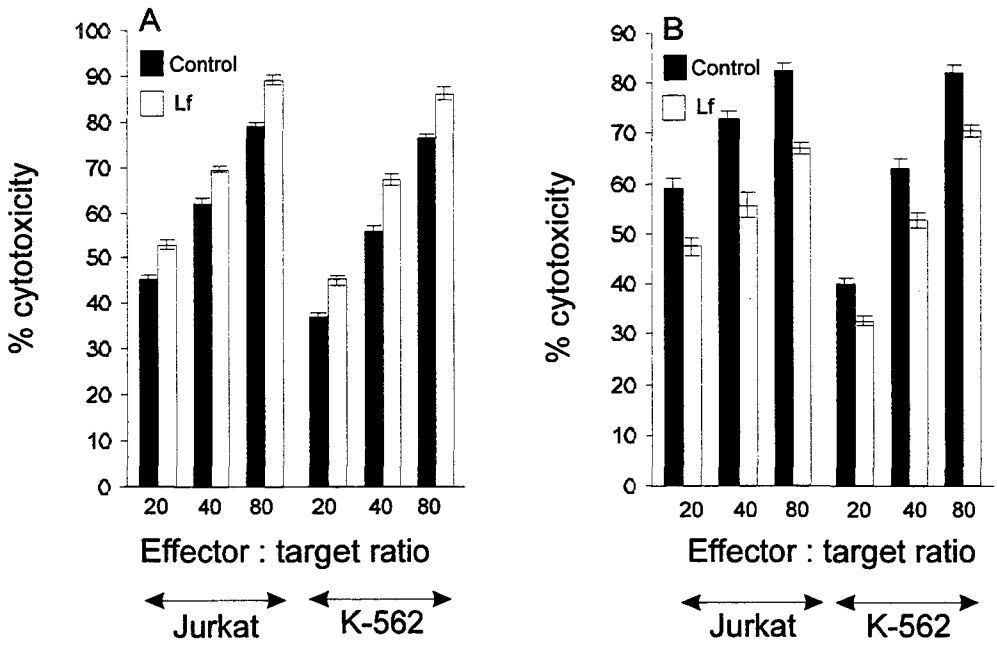


Fig. 1. Effect of lactoferrin on haematopoietic cell cytolysis by NK cells. Lactoferrin is added simultaneously to the effector and target cells at the beginning of NK cytotoxic assay. At a low concentration (10 μg/ml) lactoferrin (□) enhances spontaneous cytotoxicity on the haematopoietic cell lines (A) while at high concentration (100 μg/ml) it decreases cytolysis of the haematopoietic cells (B) as compared to the control (■). Cytolysis is measured at the three arbitrarily chosen effector / target ratios of 20, 40, and 80 respectively. Results are expressed as the mean ± SEM of three experiments using three different donors.

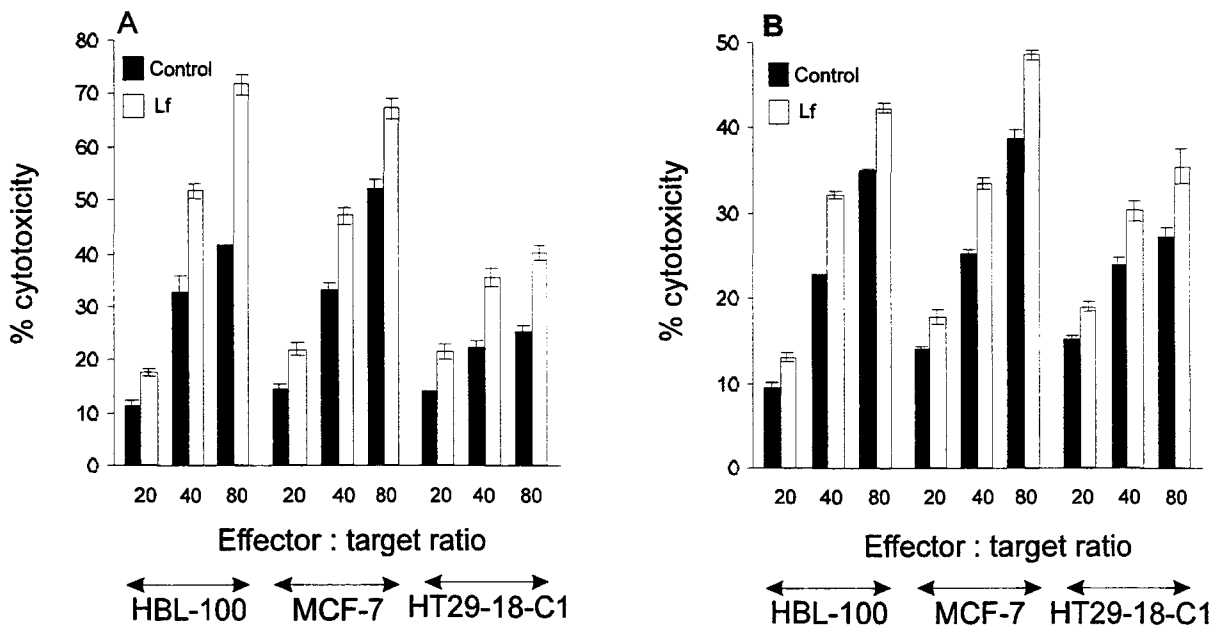


Fig. 2. Effect of lactoferrin on breast epithelial cell cytolysis by NK cells. Lactoferrin is added to the effector and the target cells at the beginning of NK cytotoxic assay. At a low concentration (10 μg/ml) (A) or high concentration (100 μg/ml) (B), Lactoferrin (□) increases the cytolysis of both human breast and colon epithelial cells as compared to the control (■). Cytolysis is measured at the three arbitrarily chosen effector / target ratios, of 20, 40, and 80 respectively. The mean ± SEM of experiments with three different donors are shown.

high concentration of lactoferrin suggest that lactoferrin acts not only on the effector cells but also on the target cells, depending on the cell phenotype and the cell lactoferrin receptor expression. To verify this hypothesis, we pre-treated the effector cells and the target cells separately with lactoferrin.

3.2. Binding of lactoferrin to NK cells

In a first step, we checked the ability of NK cells to bind lactoferrin using a double fluorescence staining in a cytofluorimetric analysis. The staining with anti CD56 mAbs and HyF-lactoferrin revealed that 91 % of the CD56+ cell population bound lactoferrin (Fig. 3A, 3B). The NK cell population was heterogeneous with a majority of $CD56^{dim}$ cells and a minority of $CD56^{bright}$ NK cells which bound more lactoferrin. The binding was reversible in the presence of unlabelled lactoferrin and was saturable at a concentration of 10 μg/ml, indicating that the binding of lactoferrin was specific with an affinity of about 10^{-8} M.

3.3. Effect of lactoferrin on NK cell cytotoxicity

To confirm the modulation of NK cell cytotoxicity in the presence of lactoferrin, the NK cells were pre-treated with lactoferrin and the cytotoxicity of NK cells with regard to the various target cells was analysed. No significant effect of lactoferrin on NK cells was observed with the haematopoietic cells which showed a high sensitivity to lysis (data not shown). In contrast, the HBL-100 and HT29-18-C1 cells showed less cytolysis than the haematopoietic cells and permitted greater observation of NK cell cytotoxicity activation by lactoferrin. Lactoferrin modulated the cytotoxic activities of NK cells as a function of its concentration. At low concentrations of lactoferrin (10-25 μg/ml), we observed a 25 to 40% increase in NK cytotoxicity. This result confirms the stimulation previously obtained in the presence of lactoferrin at 10 μg/ml added simultaneously to NK and target cells. Higher concentrations of lactoferrin (50-100 μg/ml) induced a significant decrease in NK cell activity (Fig. 4), as confirmed by the global effect of lactoferrin at 100 μg/ml on haematopoietic cell cytolysis.

3.4. Effect of lactoferrin on target cell sensitivity to lysis

After pre-treatment of the target cell with lactoferrin, an effect of the lactoferrin on target cell sensitivity to lysis was observed according to cell phenotype and lactoferrin

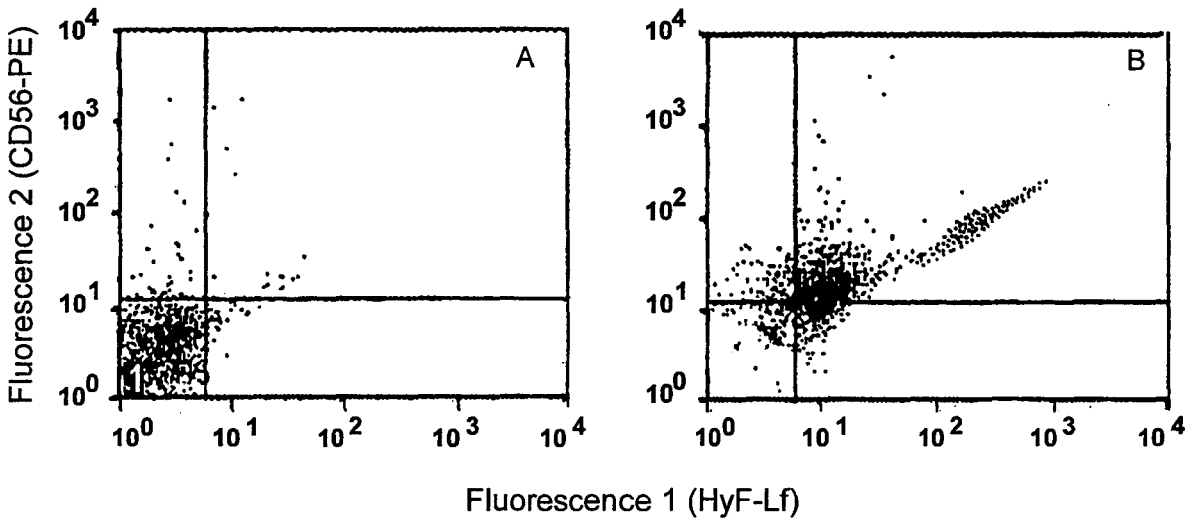


Fig. 3. FACScan detection of lactoferrin binding to NK cells. The negative control (A) is determined by incubating cells with a 100-fold molar excess of unlabelled lactoferrin and without CD56 mAbs. NK cells (CD56) are analysed for expression of lactoferrin receptor as described in « Materials and Methods » (B). Quadrants were arranged such that non-specifically lactoferrin stained cells remained in the left quadrant. Fluorescence 1 = HyF-Lf signal; Fluorescence 2 = anti-CD56 phycoerythrin signal. Data are representative of separate experiments with similar results.

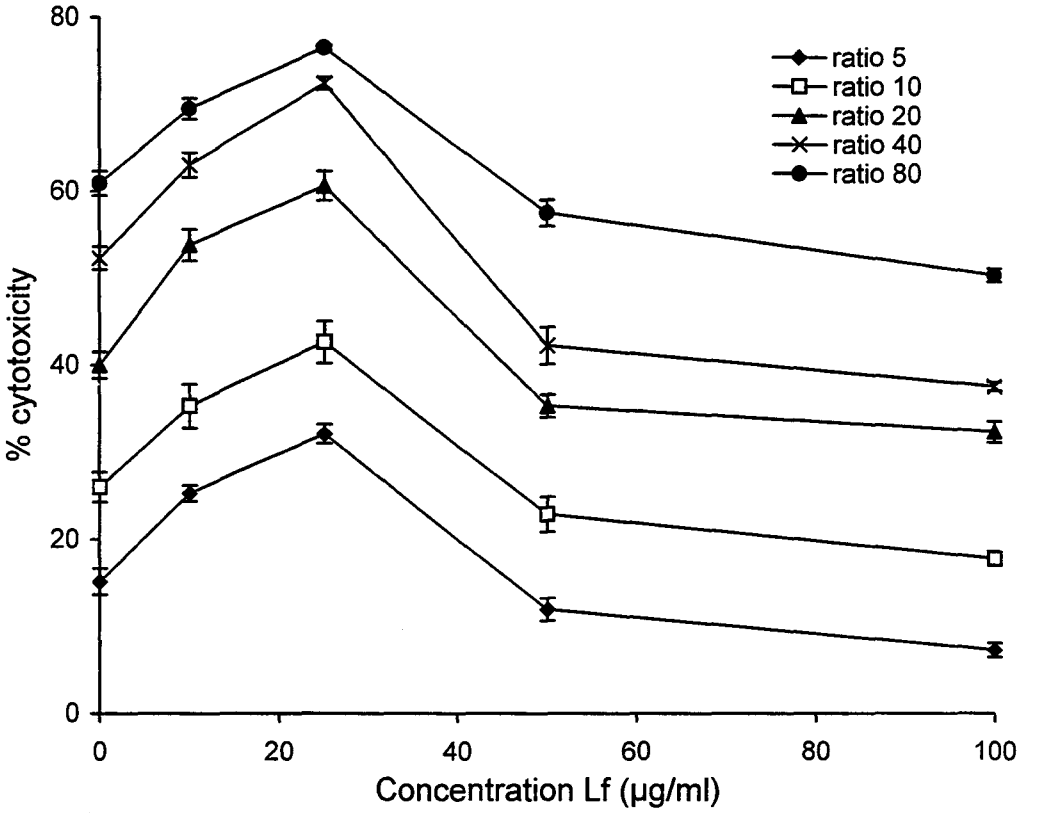


Fig. 4. Effect of lactoferrin on NK cells. ^{51}Cr release assay is performed by using HBL-100 target cells. NK cells are pre-incubated with lactoferrin (concentration ranging from 0 to 100 µg/ml) for 12 h, in RPMI medium supplemented with 10% FCS. The bars indicate the mean ± SEM of experiments performed with three donors. $p<0.01$, Student's-t test.

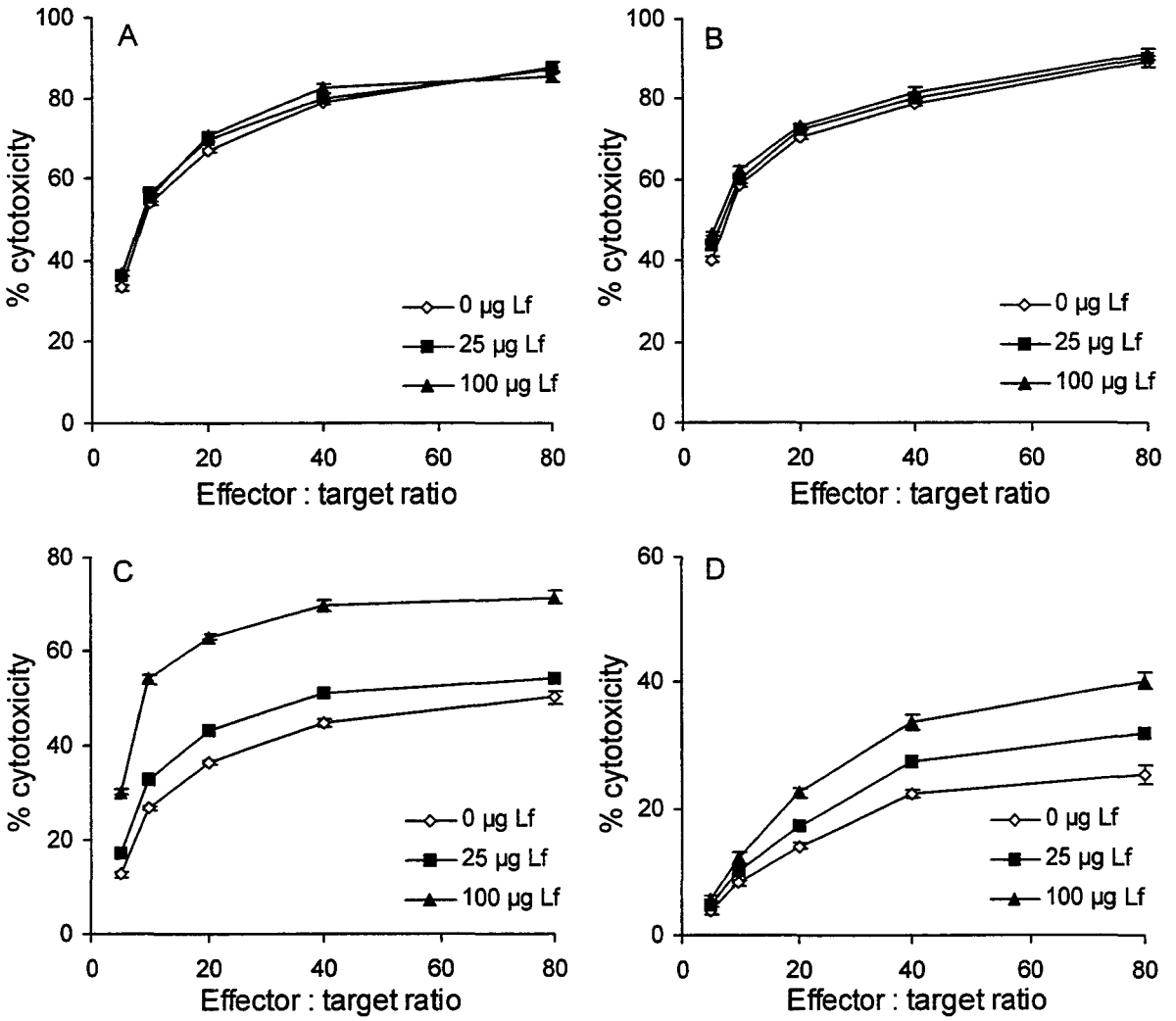


Fig. 5. Effect of lactoferrin on target cell sensitivity to lysis. Target cells are pre-incubated with lactoferrin (concentration ranging from 0 to 100 µg/ml) for 12 h in medium supplemented with 10 % FCS. Target cell sensitization to lysis by lactoferrin was investigated on Jurkat (A), K-562 (B), HBL-100 (C) and HT29-18-C1 (D) cells. Error bars indicate ± SEM. $p<0.05$, Student's-t test.

concentration. Lactoferrin did not induce significant variation in the haematopoietic Jurkat (Fig. 5A) and K-562 (Fig. 5B) cell sensitivity to NK cells. In contrast, the epithelial cell lines MCF-7, HBL-100 (Fig. 5C) and HT29-18-C1 (Fig. 5D) were more sensitive to lysis in the presence of lactoferrin. The increase in sensitivity of these two types of epithelial cells to NK cell lysis was similar and dose dependent. These results were in agreement with our previous experiment in Figure 2A, which showed that cytolysis of transformed or tumour epithelial cells was greatly increased when lactoferrin at 100 μg/ml was added to the mixture containing the effector and target cells. Furthermore, these results suggested that the effects of lactoferrin were variable depending on the cellular type.

Our results suggested that the modulation of cytolysis by lactoferrin was mainly due to a sensitization of certain target cells to NK cell lysis. In fact, lactoferrin added to the medium during the chromium release assay increased cytolysis of epithelial tumour cells at 100 μg/ml although lactoferrin slightly inhibited NK cell activity at this concentration. Thus, we tried to explain the mechanism of the biological activity of lactoferrin on the epithelial cells.

3.5. Effect of lactoferrin on breast epithelial cell proliferation and cell cycle

Lactoferrin (at concentrations ranging from 0 to 100 μg /ml) reduced ^{3}H-thymidine incorporation in a dose dependent manner in HBL-100, MCF-7 and HT29-18-C1 cell lines. In particular, for the HBL-100 and HT29-18-C1 cell lines, ^{3}H-thymidine incorporation was respectively decreased by about 47% (Fig. 6A) and 56% (Fig. 6B) at a lactoferrin concentration of 100 μg/ml as compared to the control (medium alone).

To understand the mechanism by which lactoferrin inhibited epithelial cell proliferation, we investigated the activity of lactoferrin on the cell cycle. Exponentially growing HBL-100 cell culture exposed to 100 μg/ml lactoferrin rapidly showed growth inhibition as indicated by the lack of cell number increase after 48 h. Trypan Blue dye exclusion did not indicate toxicity with this dose of lactoferrin (> 90% viability after 48 h). FACS analysis revealed that compared to untreated cells (Fig. 7A), a 48 h treatment with lactoferrin resulted in a higher proportion of cells in S phase (Fig. 7B) consistent with a block in the S phase progression. Indeed, as described in the proliferation test, lactoferrin inhibits the DNA synthesis. The cell cycle of the MCF-7 and HT29-18-C1 cells was also modified by lactoferrin. In fact, in the absence of lactoferrin, MCF-7 and HT29-18-C1 cells proceeded to enter the G2/M phase (Fig. 7C). In contrast, lactoferrin-treated cells remained arrested in the

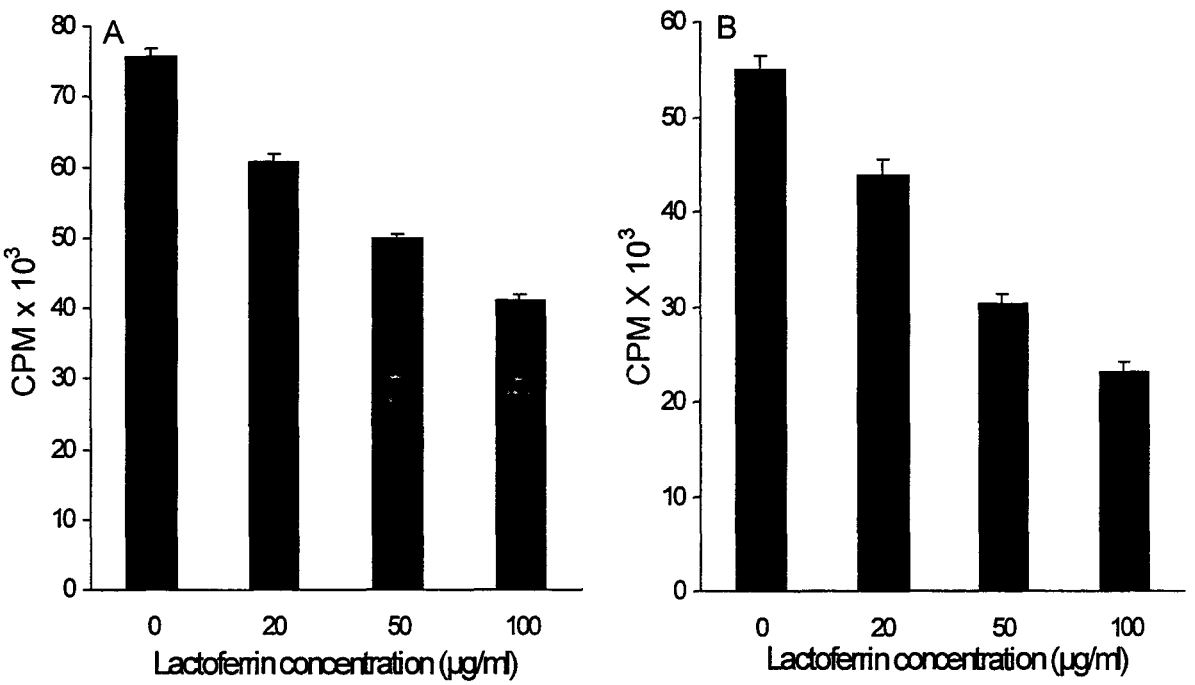


Fig. 6. Effect of lactoferrin on ^{3}H-thymidine incorporation in HBL-100 (A) and HT29-18-C1 (B) cell lines. Sub-confluent cells are cultured with lactoferrin (concentration ranging from 0 to 100 µg/ml) in 12-well plates for 24 h. After incubation with methyl ^{3}H-thymidine for 4 h, the cells are lysed and incorporated methyl ^{3}H-thymidine is counted. Each point is the mean ± SEM of three experiments.

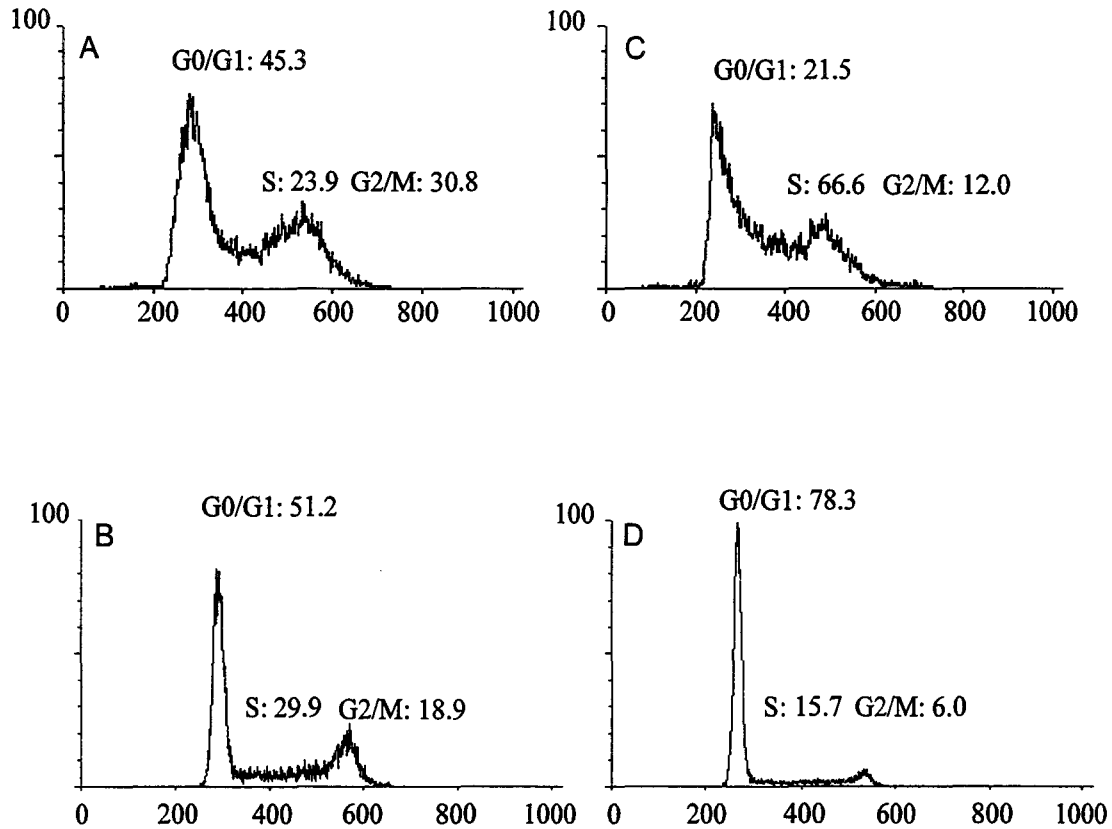


Fig. 7. FACScan analysis of untreated HBL-100 (A) and HT29-18-C1 (B) cells or lactoferrin (100 µg/ml)-treated HBL-100 (C) and HT29-18-C1 (D) cultures. Cells are treated for 48 h prior to fixation and FACS analysis, as described in « Materials and Methods ». Numbers indicate the percentage of cells in the different phases of the cell cycle.

G1 phase (Fig. 7D). These results confirm the potential antiproliferative mechanism of lactoferrin on these cells.

4. Discussion

The present findings represent the first demonstration that lactoferrin modulates cytolysis as a function of the lactoferrin concentration and the target cell phenotype, suggesting that lactoferrin acts on both NK cells and target cells.

In agreement with Nagler et al. [21], we have shown that NK cell population is heterogeneous with a majority of $CD56^{dim}$ cells and a minority of $CD56^{bright}$. We have demonstrated for the first time, that both the $CD56^{dim}$ and $CD56^{bright}$ sub-populations bind lactoferrin with however the $CD56^{bright}$ NK cells binding more lactoferrin than the $CD56^{dim}$ cells. The binding of lactoferrin on these cells suggests that lactoferrin may act directly and specifically on the NK cells. Indeed, we have demonstrated that pre-treatment of NK cells for 12 h with low concentrations of lactoferrin (10-25 μg/ml) enhanced NK activity. Our results differ from those of Shau et al. [20] who found an increase in cytotoxicity only when lactoferrin was added simultaneously to NK cells and tumour cells at concentrations ranging from 7.5 to 750 μg/ml. They did not observe any modification of the cytotoxic activity when the NK cells were pre-treated with lactoferrin. The differences in the results may be due to the fact that firstly, the authors did not use purified NK cells, but a total lymphocytic population which may affect the lactoferrin effect on the NK cell population, and secondly to the fact that the pre-treatment of the NK cells was carried out only for 30 min with very a high concentration of lactoferrin (500 μg/ml). This short-term treatment of the NK cells with lactoferrin did not allow the observation of the NK cell cytotoxicity modulation by lactoferrin. Indeed, in the particular case of interleukin-2, it was necessary to activate NK cells more than 3 to 6 h in order to enhance cytotoxic activity [24]. Furthermore, we have demonstrated that the increase in NK cell cytotoxicity induced by lactoferrin is only observed at low concentrations of lactoferrin ; at high concentrations, lactoferrin decreased NK cell activity. The physiologic level of lactoferrin in plasma does not exceed 2 μg/ml in healthy subjects [25]. Therefore, the slight increase in lactoferrin concentration caused by degranulation of neutrophils [2] during inflammation induced by tumour development could enhance NK cell functions in vivo. In contrast, the high concentrations of lactoferrin (50-100 μg/ml) used in vitro, can exert a toxic effect on NK cells and decrease their cytotoxic activity. In fact, all NK cells have the ability to mediate spontaneous cytotoxicity. The $CD56^{bright}$ cells, which exert

the highest cytotoxic activity in the total CD56 NK cell population, bind more lactoferrin than the $CD56^{dim}$ cells. These $CD56^{bright}$ NK cells are sensitive to high concentrations of lactoferrin. Thus, at a high concentration of lactoferrin, only the $CD56^{dim}$ cells maintained spontaneous cytotoxic activity, explaining the decrease in but not the disappearance of the cytotoxicity.

The antineoplastic activity of lactoferrin seems also to be due to the direct action on target cells. We have demonstrated a variability in the target cell response to pre-treatment by lactoferrin. The difference in sensitivity of the haematopoietic and the epithelial cells can be correlated to the target cell phenotype. Indeed, lactoferrin presents a variety of activities in vitro including control of proliferation and differentiation. Lactoferrin mRNA, mainly detected in normal breast epithelial tissues and in benign proliferative lesions, is down-regulated in some forms of cancer, such as human breast and colon epithelial cancers [26, 27], suggesting that lactoferrin is implicated in the tumour epithelial cell progression. In fact, Hurley et al. reported that lactoferrin inhibits mammary cell growth [7]. Furthermore, this effect was also observed on the HT-29 cells. Indeed, when transferrin was replaced by lactoferrin, HT-29 cells were unable to proliferate for a long time [28]. In our work, we have confirmed these previous observations and demonstrated that lactoferrin rapidly inhibits the proliferation of the transformed and tumour epithelial cell lines by a block in the cell cycle progression at the G1 to S transition. The extensive and rapid modification of the cell cycle can explain the increase in the sensitivity to lysis of the transformed and tumour epithelial cells. In contrast, lactoferrin induces a long term differentiation of the Jurkat cell line (unpublished data). Furthermore, lactoferrin does not rapidly influence the K-562 cell proliferation, although there is a close relationship between lactoferrin binding to these cells and their proliferative status [29]. The absence of rapid cell cycle modifications in these haematopoietic cells does not modify their sensitivity to NK cell lysis.

An alternative hypothesis is that the variability in the target cell response to lactoferrin could depend on the difference in the lactoferrin remaining at the cell surface. Indeed, lactoferrin remaining at the target cell surface could increase the contact with the NK cells through its glycan moiety and lectins expressed on the NK cell surface. Such an interaction has been described for the rat c-lectin NKRP-1 and oligosaccharides of proteoglycans [30]. In the case of the Jurkat cells, lactoferrin binding to these cells occurs mainly through a high affinity receptor which allows internalization of lactoferrin [13, 15]. Therefore, the low concentration of lactoferrin at the target cell surface can not enhance contact with NK cells

and does not increase the cytolysis of the Jurkat cells. In contrast, the epithelial cells showed a dose-dependent increase in their sensitivity to lysis. Lactoferrin bound at the cell surface is not internalized and remains at the cell surface [16, 18, 19] where it can enhance the cytolysis of these cells by NK cells.

In conclusion, the cell phenotype, the binding of lactoferrin and the internalization process can explain the variability in sensitivity of the cells studied. It appears that the binding of lactoferrin to the cells is mediated by various types of molecules which are able to induce variable effects. However, the interaction with the various lactoferrin receptors found on these cells is not yet known and remains to be determined.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité mixte de Recherche n°111; Relations Structure-Fonction des Constituants Membranaires; Director: Prof. A. Verbert), by the Université des Sciences et Technologies de Lille and by a grant (n° 3040) from the French Association for Cancer Research (ARC).

We thank Pr. Crepin for providing the HBL-100 cells, Dr. Louvard (Institut Pasteur, Paris, France) for the HT29-18-C1 cell line. We also thank David Stock for reviewing the manuscript. We are very grateful to the Etablissement de Transfusion Sanguine (Dir: Dr J.J Huart), Lille, France, who generously provided citrated blood of healthy donors.

References

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

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

[3] J.A. Bezault, R. Bhimani, J. Wiprovnick, P. Furmanski, Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice, Cancer Res. 54 (1994) 2310-2312.

[4] T. Campbell, R.A. Skilton, R.C. Coombes, S. Shousha, M.D. Graham, Y.A. Luqmani, Isolation of a lactoferrin cDNA clone and its expression in human breast cancer, Br. J. Cancer 65 (1992) 19-26.

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

[6] A. Djeha, J.H. Brock, Effect of transferrin, lactoferrin and chelated iron on human T-lymphocytes, Br. J. Haematol. 80 (1992) 235-241.

[7] W.L. Hurley, H.M. Hegarty, J.T. Metzler, Inhibition of mammary cell growth by lactoferrin: a comparative study, Life Sc. 55 (1994) 1955-1965.

[8] J. Mazurier, 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 (1989) 481-487.

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

[10] H.F. Wu, D.M. Monroe, F.C. Church, Characterisation of the glycosaminoglycan-binding region of lactoferrin, Arch. Biochem. Biophys. 317 (1995) 85-92.

[11] D.M. Mann, E. Romm, M. Migliorini, Delineation of the glycosaminoglycan-binding site in the human inflammatory response protein lactoferrin, J. Biol. Chem. 269 (1994) 23661-23667.

[12] D. Legrand, P.H.C. van Berkel, V. Salmon, H.A. van Veen, M.C. Slomianny, J.H. Nuijens, G. Spik. The N-terminal Arg2, Arg3 and Arg4 of human lactoferrin interact with sulfated molecules but not with the receptor present on Jurkat human lymphoblastic T-cells, Biochem J. 327 (1997) 841-846.

[13] B.Y. Bi, 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 (1994) 164-171.

[14] C. Garré, G. Bianchi-Scarra, M. Sirito, M. Musso, R. Ravazzolo, Lactoferrin binding sites and nuclear localization in K562 (s) cells, J. Cell. Physiol. 153 (1992) 477-482.

[15] B.Y. Bi, J.L. Liu, D. Legrand, A.C. Roche, M. Capron, G. Spik, J. Mazurier, Internalization of human lactotransferrin by the Jurkat human lymphoblastic T-cell line, Eur. J. Cell Biol. 69 (1995) 288-296.

[16] E. Rochard, D. Legrand, M. Lecocq, R. Hamelin, M. Crepin, 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 (1992) 2047-2052.

[17] D. Roiron-Lagroux, M. Amouric, J. Marvaldi, C. Figarella, Lactoferrin-binding sites at the surface of HT-29 D4 cells, Eur. J. Biochem. 186 (1989) 367-373.

[18] T. Mikogami, T. Marianne, G. Spik, Effect of intracellular iron depletion by picolinic acid on expression of the lactoferrin receptor in the human colon carcinoma cell subclone HT29-18-C1, Biochem. J. 308 (1995) 391-397.

[19] D. Roiron-Lagroux, C. Figarella, Evidence for a different mechanism of lactoferrin and transferrin translocation on HT-29-D4 cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 170 (1990) 837-842.

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

[21] A. Nagler, L.L. Lanier, S. Cwirla, J.H. Phillips, Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells, J. Immunol. 143 (1989) 3183-3191.

[22] A. Boyum, Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood, Scand. J. Clin. Invest. 21 (1968) 77-89.

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

[24] G. Trinchieri, M. Matsumoto-Kobayashi, S.C. Clark, J. Shachra, L. London, B. Perussia, Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin-2, J. Exp. Med. 160 (1984) 1147-1169.

[25] T. Olofsson, I. Olsson, P. Venge, Myeloperoxydase and lactoferrin of blood neutrophils and plasma in chronic granulocytic leukaemia, Scand. J. Haematol. 18 (1977) 113-120.

[26] R. Rossiello, M.V. Carriero, G.G. Giordano, Distribution of ferritin, transferrin and lactoferrin in breast carcinoma tissue, J. Clin. Biol. 37 (1984) 51-55.

[27] P.D. Siebert, B.C.B. Huang, Identification of an alternative form of human lactoferrin mRNA that is expressed differentially in normal tissues and tumor-derived cell lines, Proc. Natl. Sci. Acad. USA 94 (1997) 2198-2203.

[28] M. Amouric, J. Marvaldi, J. Pichon, F. Bellot, C. Figarella, Effect of lactoferrin on the growth of a human adenocarcinoma cell line: comparison with transferrin, In Vitro 20 (1984) 543-548.

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

[30] K. Bezouska, C.T. Yuen, J. O'Brien, R.A. Childs, W. Chai, A.M. Lawson, K. Drbal, A. Fiserova, M. Pospisil, T. Feizi, Oligosaccharides ligands for NKR-P1 protein activate NK cells and cytotoxicity, Nature 372 (1994) 150-157.

III. CONCLUSION

Les différents protocoles de traitement par la lactoferrine utilisés pour analyser son effet sur la cytolyse de cellules tumorales par les cellules NK nous ont permis de définir un double mécanisme antiprolifératif.

D'une part, la lactoferrine module l'activité cytotoxique des cellules NK en fonction de sa concentration. A faible concentration, après s'être fixée aux cellules NK, la lactoferrine augmente leur potentiel cytotoxique quel que soit le type de cellules tumorales. Par contre, à forte concentration, elle semble toxique en particulier pour la population $CD56^{bright}$ entraînant donc une diminution de la cytolyse des cellules tumorales.

D'autre part, la lactoferrine exerce un effet anti-tumoral directement sur les cellules cibles en fonction de leur phénotype. Elle n'influence pas la sensibilité à la lyse des cellules hématopoïétiques mais augmente sensiblement celle des cellules épithéliales cancéreuses. Cette sensibilisation des cellules épithéliales à la lyse peut s'expliquer :

- Par le fait que la lactoferrine n'est pas internalisée dans ces cellules. Elle faciliterait l'interaction cellules cibles / cellules effectrices favorisant ainsi la lyse des cellules épithéliales tumorales.
- Par le fait que la lactoferrine induit un arrêt de prolifération des cellules épithéliales tumorales en les bloquant en phase G1 du cycle cellulaire. La modification du comportement cellulaire provoquée par la lactoferrine constitue l'hypothèse la plus probable pour expliquer la sensibilisation de ces cellules à la lyse par les cellules NK.

MECANISME MOLECULAIRE DE L'EFFET ANTIPROLIFERATIF DE LA LACTOFERRINE SUR DES LIGNEES DE CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES ET COLIQUE

I. INTRODUCTION

Les innombrables travaux consacrés aux mécanismes moléculaires de la carcinogenèse ont bien montré que les régulateurs du cycle cellulaire, en particulier ceux qui contrôlent la progression cellulaire en phase G1, sont des cibles privilégiées des processus oncogéniques. Une des raisons est que les cellules restent sensibles à divers stimuli mitogènes tant qu'elles n'ont pas atteint le point de restriction G1 tardif (point R). Passé ce point, les cellules deviennent réfractaires à ces stimuli et la suite du cycle se déroule de façon autonome. Il est donc logique qu'une pression de sélection s'exerce en faveur d'une levée de blocage existant à ce niveau du cycle et, en effet, l'incidence des lésions affectant les gènes de Rb, cycline D1, Cdk4, $p16^{INK4a}$, $p27^{KIP1}$ et cycline E dans un large spectre de tumeur est en accord avec cette interprétation. Il semble également que l'altération d'un seul membre de cette voie Rb est suffisant pour invalider la voie entière. Ces données suggèrent donc de nouvelles cibles et approches moléculaires pour les laboratoires de pharmacologie anti-tumorale expérimentale.

Dans la première partie des résultats, nous avons montré que la lactoferrine bloque la prolifération des cellules d'adénocarcinomes mammaires et de colon au niveau de la phase G1 du cycle cellulaire.

Dans ce deuxième chapitre de résultats, l'expression de protéines régulatrices de la phase G1 et de la transition G1/S telles que Cdk4, Cdk2, cycline D1, cycline E et les CKIs $p16^{INK4a}$, $p21^{WAF1/CIP1}$, $p27^{KIP1}$ a été étudiée par "western blot" en présence et en absence de lactoferrine. Nous avons également évalué dans les mêmes conditions l'activité kinase des complexes cycline D/Cdk4 et cycline E/Cdk2 afin de définir le mécanisme moléculaire de l'effet antiprolifératif de la lactoferrine sur des cellules d'adénocarcinome mammaire et colique.

II. RESULTATS

Les résultats obtenus font l'objet d'un deuxième article :

"Lactoferrin inhibits G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells"

soumis pour publication dans "Journal of Cellular Biochemistry ".

BU LILLE I

Lactoferrin Inhibits G1 Cyclin-Dependent Kinases During Growth Arrest of Human Breast Carcinoma Cells

Eve Damiens, Ikram El Yazidi, Joël Mazurier, Isabelle Duthille, Geneviève Spik* and Yolande Boilly-Marer

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

Short tittle : Cell cycle effects of lactoferrin

* Address correspondence and reprint requests to Pr. Geneviève Spik, Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du CNRS n°111, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.
Tel. (33) 3 20 33 72 39 ; Fax (33) 3 20 43 65 55.
E-mail: genevieve. spik @ univ-lille1.fr

Abbreviations : Cdks, cyclin-dependent kinases ; NK cells, Natural Killer cells ; pRb, Retinoblastoma protein ; CKIs, cyclin-kinase inhibitory proteins ; LF, lactoferrin.

Abstract

Lactoferrin inhibits cell proliferation and suppresses tumor growth *in vivo*. However, the molecular mechanisms underlying these effects remain unknown. In this *in vitro* study, we demonstrate that treatment of breast carcinoma cells MDA-MB-231 with human lactoferrin induces growth arrest at the G1 to S transition of the cell cycle. This G1 arrest is associated with a dramatic decrease in the protein levels of Cdk2 and cyclin E correlated with an inhibition of the Cdk2 kinase activity. Cdk4 activity is also significantly decreased in the treated cells and is accompanied by an increased expression of the Cdk inhibitor $p21^{CIP1}$. Additional experiments with synchronized cells by serum depletion confirm the anti-proliferative activity of human lactoferrin. We show that lactoferrin blocks cell cycle progression at the G1 to S transition and that the kinase activity of Cdk4 and Cdk2, normally increased by serum stimulation, remain unchanged in lactoferrin-treated cells. Furthermore, lactoferrin maintains the cell cycle progression regulator retinoblastoma protein pRb in a hypophosphorylated form. These effects of lactoferrin occur through a p53-independent mechanism. These findings demonstrate that lactoferrin induces growth arrest by modulating the expression and the activity of key G1 regulatory proteins.

Key words: lactoferrin; breast cancer cells; cell cycle; cyclin-dependent kinases; $p21^{WAF1/CIP1}$

1. Introduction

Lactoferrin also called lactotransferrin [Montreuil et al., 1960] is an iron-binding glycoprotein synthesized by epithelial cells and polymorphonuclear cell precursors. Lactoferrin is mainly found in external secretions such as breast milk and in neutrophil secondary granules [Masson et al.,1969]. Recently, some data have suggested a possible anti-tumor activity for lactoferrin. This effect remains however highly controversial. In fact, it has been reported that, *in vitro*, lactoferrin promotes the proliferation of cell lines [Azuma et al., 1989], has no effect on lymphocyte proliferation [Djeha and Brock, 1992], or inhibits mammary cell growth [Hurley et al., 1994; Damiens et al., 1998]. Furthermore, Campbell et al. (1992) showed that lactoferrin may be down-regulated in some forms of cancers such as human breast carcinoma suggesting that lactoferrin might regulate cell proliferation. Bezault et al. also demonstrated that lactoferrin suppresses, *in vivo*, the growth of tumor cells and inhibits experimental metastasis in mice [Bezault et al., 1994]. However, in this case, they suggest that the anti-tumor activity of human lactoferrin is mediated in part by Natural Killer (NK) cells. In fact, as regards immunological functions of lactoferrin, it has been shown that lactoferrin activates NK cells [Bezault et al., 1994; Shau et al., 1992] and lymphokine activated killer cells [Shau et al., 1992]. These observations suggest that the anti-proliferative effect of lactoferrin may be mediated by two distinct mechanisms, on one hand, a modulation of NK cell activity and on the other hand, a direct effect on tumor cell growth.

In eukaryotic cells, each phase of the cell division cycle is controlled by the sequential activation of various cyclin-dependent kinases (Cdks). These kinases are known to phosphorylate various proteins whose activity is critical for cell cycle progression (Morgan, 1995). Among these proteins is the retinoblastoma tumor suppressor protein (pRb), which plays an essential role in the progression of cells from G1 to S through its regulation of the transcription factor E2F [Weinberg, 1995]. In vitro, Rb is phosphorylated by several Cdk-cyclin complexes including cyclin Ds- Cdk6 or Cdk4, cyclin E-Cdk2 and cyclin A-Cdk2 [Dowdi et al., 1993; Soucek et al., 1997]. Cyclin Ds with their catalytic partners Cdk6 and Cdk4 regulate events in the G1 phase of the cell cycle while cyclin E-Cdk2 complex operates at the G1 to S transition [Scherr and Roberts, 1995; Resnitszky and Reed, 1995]. However, the role of these complexes and their interactions in cell cycle progression remains to be determined.

The cell cycle is subject to various controls which arrest cell cycle in the events of unfavourable conditions. Controls operate at major points of restriction termed checkpoints localized at the G1 and G2 phases of the cell cycle. These regulatory mechanisms include: alteration of Cdk levels, variations in cyclin abundance [scherr, 1994], positive and negative-acting phosphorylation of the kinase subunit [Morgan, 1995], and the actions of cyclin dependent kinase inhibitory proteins (CKIs). The CKIs appear to be the most diverse and flexible regulators. Among them, $p21^{CIP1}$ binds to all the G1 and G1 to S Cdk complexes but preferentially inhibits the ones containing Cdk2 [Harper et al., 1995]. The major non redundant function identified for $p21^{CIP1}$ *in vivo,* appears to be in regulating p53 mediated growth arrest following DNA damage [Dulic et al., 1994]. However, recent studies indicate that $p21^{CIP1}$ is also regulated by p53-independent mechanisms such as during cell differentiation [Steinman *et* al., 1994; Macleod et al., 1995].

In this study, we have analyzed the effects of lactoferrin on the growth of human breast carcinoma cell lines and particularly on the MDA-MB-231 cell line. We demonstrate that treatment of MDA-MB-231 cells with lactoferrin results in growth arrest at the G1 to S transition of the cell cycle. To further investigate the molecular mechanisms associated with the effects of lactoferrin, we analyzed the influence of lactoferrin on the proteins involved in the G1 to S transition. We demonstrate that lactoferrin induces an increase of the CKI $p21^{CIP1}$ protein level by a p53-independent mechanism. The induction of $p21^{CIP1}$ is associated with a decrease of the Cdk4 kinase activity without modification of cyclin D1 and Cdk4 protein levels. This is accompanied by a great decrease of Cdk2 and cyclin E protein levels, thereby reducing Cdk2 kinase activity. Thus lactoferrin appears to exert its anti-proliferative effect via a modulation of key proteins which regulate the G1 to S transition.

2. Materials and Methods

2.1. Cell culture

The human breast cancer epithelial cells MDA-MB-231 and MCF-7 were from the ATCC. The SV-40 transformed epithelial cells HBL-100 were also used. They were grown in Eagle's minimal essential medium (Gibco-BRL) containing 10% FCS, 1% non-essential amino acids (Eurobio), 2 mM L-glutamine, 5 µg/ml insulin (Endopancrine, Organon), penicillin and gentamicin (Gibco-BRL) at 37°C, 5% CO_2. The colon adenocarcinoma HT29-18-C1 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) supplemented with

10% FCS, 2 mM L-glutamine and gentamycin at 37°C, 10% CO_2. For the starvation-synchronization assays, MDA-MB-231 cells were grown to 50% confluence and placed in serum-free medium for 48 h. Cells were then stimulated to grow by the addition of medium 5% FCS.

2.2. Lactoferrin

Lactoferrin was prepared from a single human lactoserum by ion-exchange chromatography and iron saturated as previously described [Mazurier and Spik, 1980; Spik et al., 1982]. The degree of purity (>99%) of human lactoferrin was checked by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and high pressure liquid chromatography (HPLC). Lipopolysaccharides were removed by chromatography through a detoxi-gel column (Pierce chemicals Rockford). Lactoferrin prepared in PBS was added directly into the medium to a final concentration of 50 µg /ml for cell cycle analysis and immunoprecipitation and kinase assays.

2.3. Thymidine uptake

Breast epithelial cancer cells were cultured in a 12 well plate at a cell density of 4.10^4 cells per 500 µl of medium per well. Cultures were then incubated in the presence of lactoferrin at concentrations ranging from 0 to 100 µg/ml. After 24 h, 2 µCi of (methyl-^{3}H) thymidine (specific activity 50 Ci/mMol) (ICN Biomedical) were added to each well for 4 h at 37°C. The cells were washed with PBS, and treated with cold 5% trichloracetic acid for 45 min at 4°C. Cells were rinsed with water and solubilized with 0.3 M NaOH for 1h at 37°C. The radioactivity of the cells was measured with a beta counter (Beckman).

2.4. Cell cycle analysis

The adherent cells (1.10^6) were trypsinized, and fixed in cold 70% ethanol for 4 h. Fixed cells were washed with PBS and incubated with 5 µg of RNAse A (Sigma Chemical Co.) per ml and stained with 25 µg/ml of propidium iodine (Aldrich Chemie) for 1 h at 37°C. The stained cells were analysed on a FACScan cytofluorimeter using the cellFIT Software program (Becton Dickinson immunocytometry systems).

2.5. Immunoprecipitation and kinase assays

For immunoprecipitation, cells were washed once in ice-cold PBS and lysed for 2 h at 4°C in lysis buffer containing (155 mM NaCl, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 1% deoxycholic acid, 1mM EGTA) supplemented with phosphatase and protease inhibitors (10 mM NaF, 200 μM sodium orthovanadate, 200 μM aprotinin, 50 μg/ml leupeptin, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF)). Cellular debris were removed from soluble extracts by centrifugation at 10,000 x g for 15 min at 4°C. Total lysates (500 μg total protein) containing endogenous CDk4 complexes were immunoprecipitated using a mouse monoclonal anti-human Cdk4 for 1 h at 4°C. Immunoprecipitates were washed twice with immunoprecipitation buffer (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.2 mM sodium orthovanadate, 0.2 mM PMSF, 0.5% NP-40), and twice with glutathione S-transferase-(GST)-Rb kinase buffer (60 mM glycerophosphate, 30 mM nitrophenylphosphate, 25 mM MOPS, pH7.0, 5 mM EGTA, 15 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 0.1 mM sodium orthovanadate) and then resuspended in 10 μl of GST-Rb kinase buffer.
The kinase activity associated with anti-Cdk4 immunocomplexes was assayed with purified retinoblastoma protein (fused with glutathione-S-transferase) prepared as previously described [Vesely et al., 1994], in the presence of 15 μM [γ-^{32}P] ATP (4500 mCi/mMol) (Amersham), in a final volume of 30 μl. After a 15 min incubation at 37°C, 30μl 2X Laemmli sample buffer was added. The phosphorylated substrate was resolved by 7.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and analyzed by autoradiography by exposure to Scientific Imaging Film Biomax MR (Kodak).

For Cdk2 immunoprecipitation, cells were processed as described above and immunoprecipitated for 1 h at 4°C with a mouse monoclonal anti-human Cdk2. Immunoprecipitates were washed twice with immunoprecipitation buffer and twice with H1 kinase buffer (20 mM MOPS, pH 7.2, 25 mM β-glycerol phosphate, 15 mM p-nitrophenylphosphate, 15 mM $MgCl_2$, 5mM EGTA, 1mM sodium orthovanadate, 1 mM dithiothreitol), and then resuspended in 20 μl of histone H1 kinase buffer.

Histone H1 kinase assay was performed with 20 μg histone H1 (Upstate Biotechnology Incorporated) in the presence of 10 μCi of [γ-^{32}P] ATP in a final volume of 40 μl histone H1 kinase buffer. After 10 min incubation at 30°C, 25 μl aliquots of supernatant were spotted onto pieces of Whatman p81 phosphocellulose paper. Then, the filters were washed ten fold in a solution of 0.75% phosphoric acid. The wet filters were transferred into

plastic scintillation vials, 3.5 ml scintillation fluid (Zinsser Analytic) were added and the radioactivity measured in a gamma counter (LS 3801 Beckman). Activities were calculated as a percentage of maximal activity.

2.6. Western blot analysis

Protein concentrations were determined using the BioRad protein assay reagent with bovine serum albumin as a standard. Fifty-microgram and for Rb two hundred-microgram samples of total cell lysates were resolved by 10% - 12% SDS/PAGE and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Schleicher & Schuell). Cdk4, cyclin D1, Cdk2, cyclin E and $p21^{CIP1}$, $p16^{INK4a}$, $p27^{KIP1}$, p53 and pRb were detected with the ECL system (Amersham) after incubation with the appropriate antibodies monoclonal mouse anti-human Cdk2, monoclonal mouse anti-human Cdk4, monoclonal mouse anti-human cyclin D1, monoclonal mouse anti-human $p21^{CIP1}$, monoclonal mouse anti-human p53 (Transduction Laboratories) monoclonal rabbit anti-human cyclin E (Upstate Biotechnology Incorporated), monoclonal mouse anti-human pRb, monoclonal mouse anti-human $p16^{INK4a}$, monoclonal mouse anti-human $p27^{KIP1}$ (Santa Cruz Biotechnology).

3. Results

3.1. Effect of lactoferrin treatment on tumor epithelial cell proliferation

The concentration of lactoferrin used was determined according to the dissociation constants calculated from Scatchard plot analysis. We thus analysed the effect of lactoferrin at concentrations ranging from 0 to 100 µg/ml on cell proliferation.

Human lactoferrin reduced ^{3}H-thymidine incorporation in a dose-dependent manner in MDA-MB-231 (Fig. 1A) and MCF-7 cells (Fig 1B). We did not observed any effect at 5 µg/ml, while the effect was important at 50 µg /ml which corresponds to the constant dissociation of the total binding site on these cells. As compared to the control (medium alone) ^{3}H-thymidine incorporation was decreased by about 45% to 50% at a lactoferrin concentration of 50 µg/ml. As we previously described, similar results were obtained for the HBL-100 cell line [Damiens et al., 1998].

Since lactoferrin inhibits epithelial cell line proliferation without induction of cell death, we investigated the effects of lactoferrin on cell cycle progression.

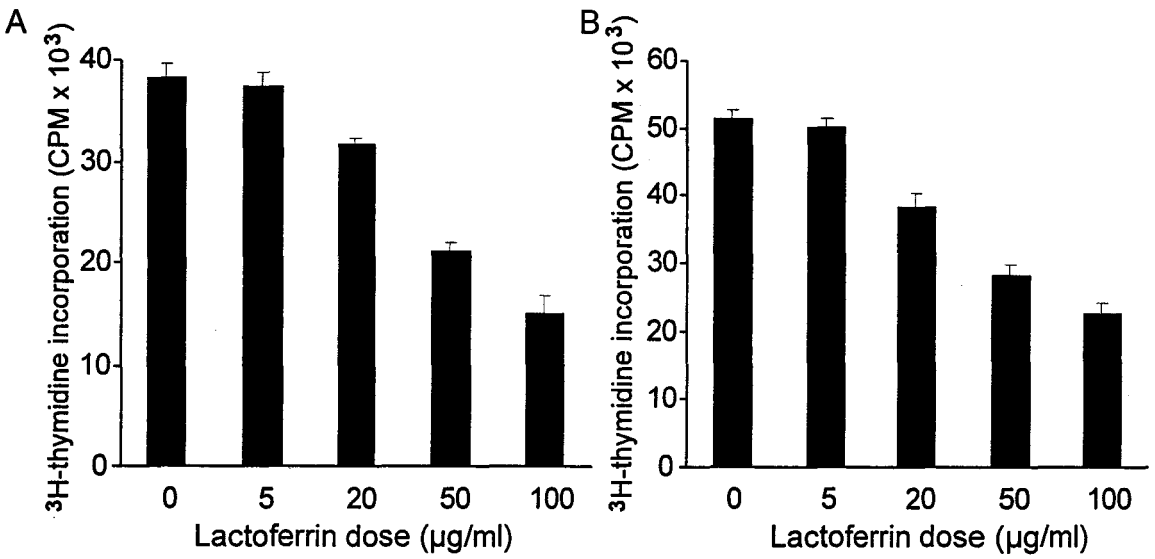


Fig. 1. Effect of lactoferrin on ^{3}H-thymidine incorporation in MDA-MB-231 (A) and MCF-7 (B) cell lines. Sub-confluent cells were cultured with lactoferrin (concentration ranging from 0 to 100 µg/ml) in 12-well plates for 24 h. After incubation with methyl ^{3}H-thymidine for 4 hr, the cells were harvested and incorporated methyl ^{3}H-thymidine was counted. Each points represents the mean ± SEM of three experiments.

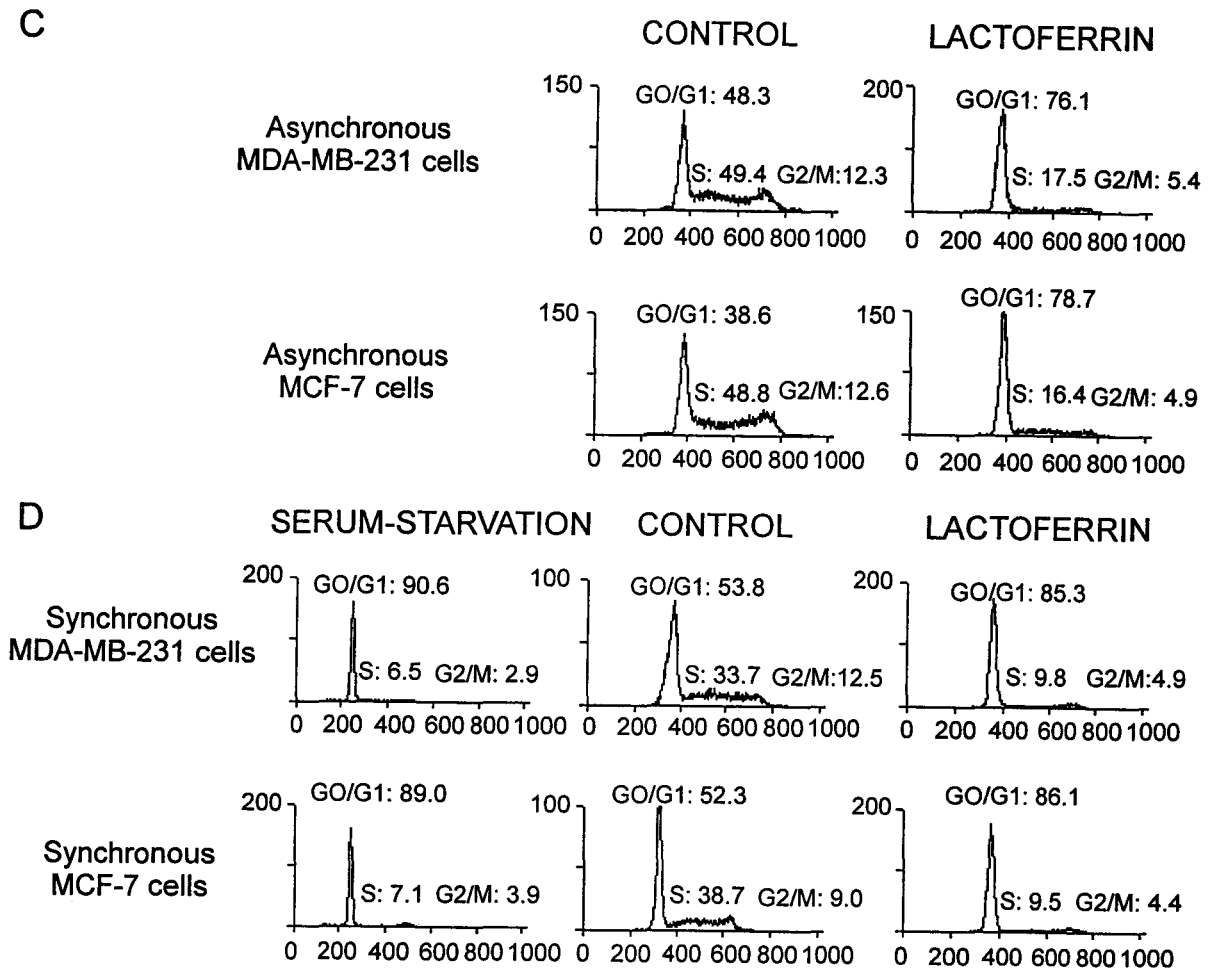


Fig. 1. (C) FACScan analysis of untreated (control) or lactoferrin (50 µg/ml)-treated MDA-MB-231 and MCF-7 cultures. Cells were treated for 24 h prior to fixation and FACS analysis as described in « materials and methods ». Numbers indicate the percentage of cells in the different phases of the cell cycle. (D) FACScan analysis of untreated and lactoferrin-treated cells show the cell cycle distribution of MDA-MB-231 cultures that were serum-starved and then restimulated to proliferate by addition of 5% FCS. Lactoferrin was added 12 h prior the serum stimulation.

Exponentially growing MDA-MB-231 and MCF-7 cultures exposed to 50 μg/ml lactoferrin rapidly showed growth inhibition as indicated by the lack of cell number increase after 24 h. FACS analysis revealed that compared to untreated cells, a 24 h treatment by lactoferrin resulted in a higher proportion of cells in G1 consistent with a G1 arrest (Fig. 1C). This effect was further confirmed when cells were presynchronized by serum-starvation. Cells were restimulated to proliferate by addition of 5% FCS for 24 h. For the treated cells, lactoferrin was added to the medium during the last 12 hr of the serum starvation. As shown in figure (Fig. 1D), in the absence of lactoferrin, serum-stimulated cells proceeded to enter into the S and G2/M phases. In contrast, lactoferrin-treated cells remained arrested in the G1 phase. These results confirm the inhibition of proliferation of tumor epithelial cells at the G1 level. A blockage of the cell cycle progression was also observed in the presence of lactoferrin for the HBL-100 breast epithelial transformed cells [Damiens et al., 1998]. In the following results, we essentially presented the potential mechanism of the lactoferrin anti-proliferative activity observed on MDA-MB-231 cells.

3.2. Protein levels and activity of Cdk4/cyclin D1 in MDA-MB-231 cells following lactoferrin treatment

Western blot analysis was used to determine the effect of lactoferrin on the expression of cyclins and kinases regulating G1 progression. We first examined the protein levels of Cdk4 and cyclin D1, two components of the Cdk-cyclin complex which is active in early G1. Cyclin D1 and Cdk4 protein levels in asynchronous MDA-MB-231 cells were found to be unaltered by lactoferrin treatment as compared to the control (Fig. 2A). The expression of Cdk4 and cyclin D1 was further monitored in synchronized MDA-MB-231 cells. Cells were growth-arrested by serum starvation and then pretreated for 12 h with 50 μg /ml lactoferrin or untreated prior stimulation by serum. Similarly, we did not detect any variation in the Cdk4 and cyclin D1 protein levels, as compared to the untreated cells (Fig 2B).

The effect of lactoferrin on Cdk4 kinase activity was also examined in the synchronized cells to determine if modifications in Cdk4 kinase activity might contribute to the G1 arrest. Cdk4 was immunoprecipitated with anti-Cdk4 monoclonal antibodies and the kinase activity associated with the immunocomplex was evaluated using GST-Rb as a substrate. The GST-Rb kinase activity associated with Cdk4 immunocomplex remained extremely low in lactoferrin-treated MDA-MB-231 cells throughout the entire time course of the experiment. In the absence of lactoferrin, the GST-Rb kinase activity increased in a time-

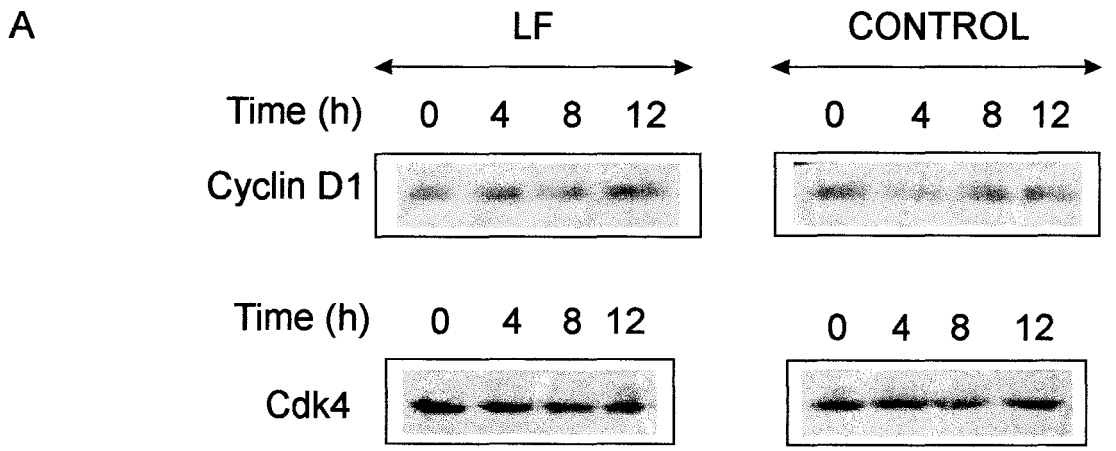


Fig. 2A. Effect of lactoferrin on the protein levels of Cdk4 and cyclin D1. Cells untreated (control) or treated with 50µg/ml lactoferrin for 4 h, 8 h, and 12 h were analyzed for the determination of Cdk4 (33 kDa) and cyclin D1 (36 kDa) protein levels by Western Blot analysis as described in « materials and methods ».

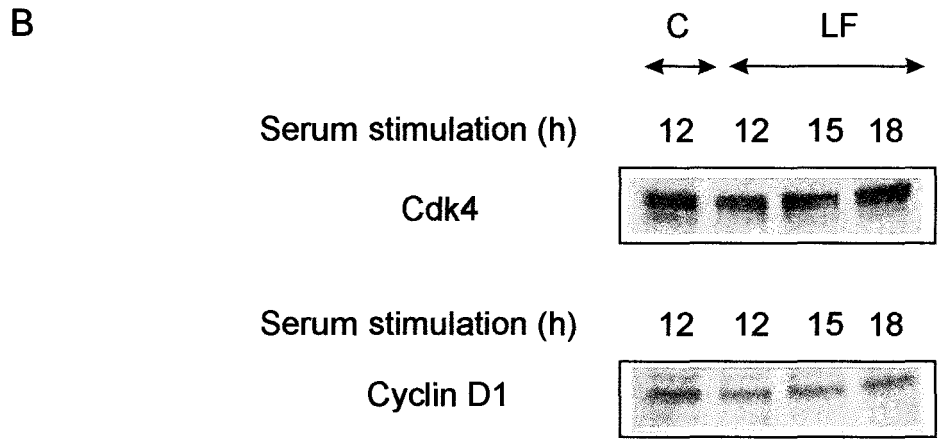


Fig. 2B. Synchronous cells, either untreated (control) or treated for 12 h by 50 µg/ml lactoferrin, were serum-stimulated for the indicated times. To determine Cdk4 and cyclin D1 protein levels, samples were then subjected to SDS PAGE and incubated with the appropriate antibodies according with theWestern Blot procedure described in the materials and methods section.

dependent manner with a maximal incorporation at 12-15 h following the release from serum starvation (Fig. 2C).

Since evidence supports that pRb is a critical substrat by which G1 cyclins and their associated kinases control cell cycle progression at the G1 to S transition, we examined the phosphorylation profile of Rb in synchronized control and lactoferrin MDA-MB-231 treated cells following serum addition. Hypophosphorylated forms of Rb migrate faster than hyperphosphorylated forms and can be easily separated by Western blot analysis. Rb became progressively hyperphosphorylated following serum stimulation of control cell proliferation. In contrast, Rb remained hypophosphorylated even after 24 h of serum addition in lactoferrin-treated cells (Fig. 2D). This result is consistent with a decrease of the Cdk4 activity and the growth arrest of the lactoferrin-treated cells at the G1 to S transition of the cell cycle.

3.3. Protein levels and activity of Cdk2/cyclin E in MDA-MB-231 cells following lactoferrin treatment

We also examined by Western Blot analysis the effect of lactoferrin on the expression of proteins implicated in control of the restriction point at the G1 to S transition. In this context, we analyzed the protein levels of Cdk2 and cyclin E. Interestingly, Cdk2 and cyclin E protein levels decreased dramatically in asynchronous lactoferrin-treated cells (> 80% decline by 12 h of treatment) as compared to the control cells, in absence of lactoferrin (Fig. 3A). The expression of Cdk2 and cyclin E was further monitored in synchronized cells. Cdk2 and Cyclin E protein levels were found to be extremely low in lactoferrin-treated cells during the experiment. In contrast, these proteins were abundant in control cells (Fig. 3B). Similar results were obtained for the two other breast cell lines (data not shown).

The effect of lactoferrin on Cdk2 kinase activity was also investigated in asynchronous and synchronized cells. Cdk2 containing complexes from untreated and lactoferrin asynchronous treated cells were immunoprecipitated by anti-Cdk2 mAbs and assayed with histone H1 as a substrate. We observed that Cdk2 kinase activity was high in control cells and markedly decreased following exposure to lactoferrin (Fig. 3C). The effect of lactoferrin on Cdk2 kinase activity in synchronized cells is shown in Figure 3D. As was shown for Cdk4 kinase activity, the histone H1 kinase activity was very low during the experiment for lactoferrin-treated cells. In the absence of lactoferrin, the histone H1 kinase activity increased in a time-dependent manner with a maximum at 15 h-18 h following serum stimulation. This result together with our observation for Cdk4 kinase activity are consistent with the model of

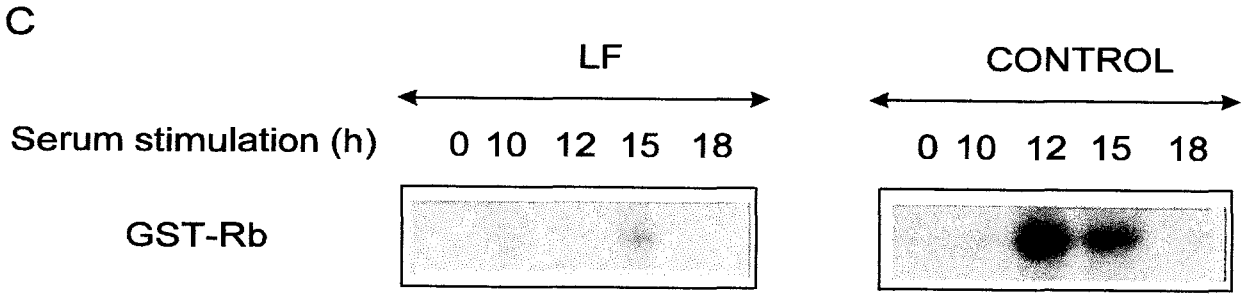


Fig. 2C. The kinase activity of Cdk4 was determined following immunoprecipitation of the enzyme in untreated and lactoferrin-treated synchronized cells serum stimulated for the indicated times. The kinase activity associated with the Cdk4 immunocomplexes was assayed with GST-Rb as a substrate. ^{32}P-labeled GST-Rb is shown.

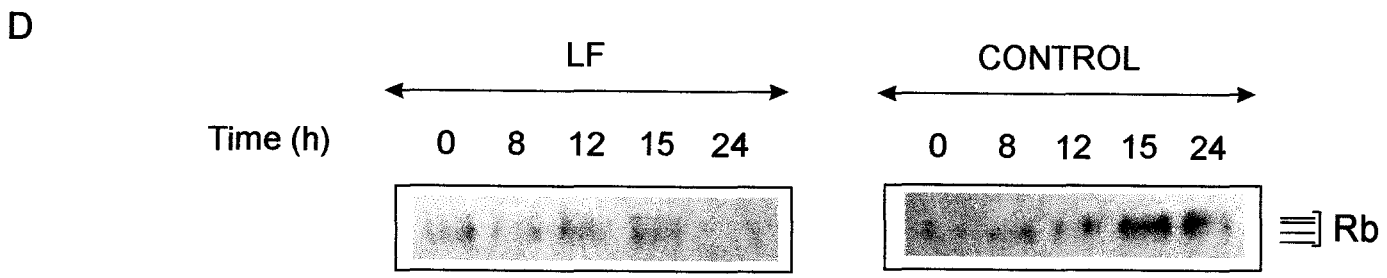


Fig. 2D. Rb phosphorylation patterns in lactoferrin-treated and untreated MDA-MB-231 cells. Synchronous cells were either untreated (control) and treated with 50 μg/ml lactoferrin prior to serum addition for the indicated times. The profile of Rb phosphorylation was analyzed by Western blot analysis using 200 μg of whole cell lysate. The lower band corresponding to unphosphorylated Rb migrates faster than phosphorylated Rb (more slowly migrating bands).

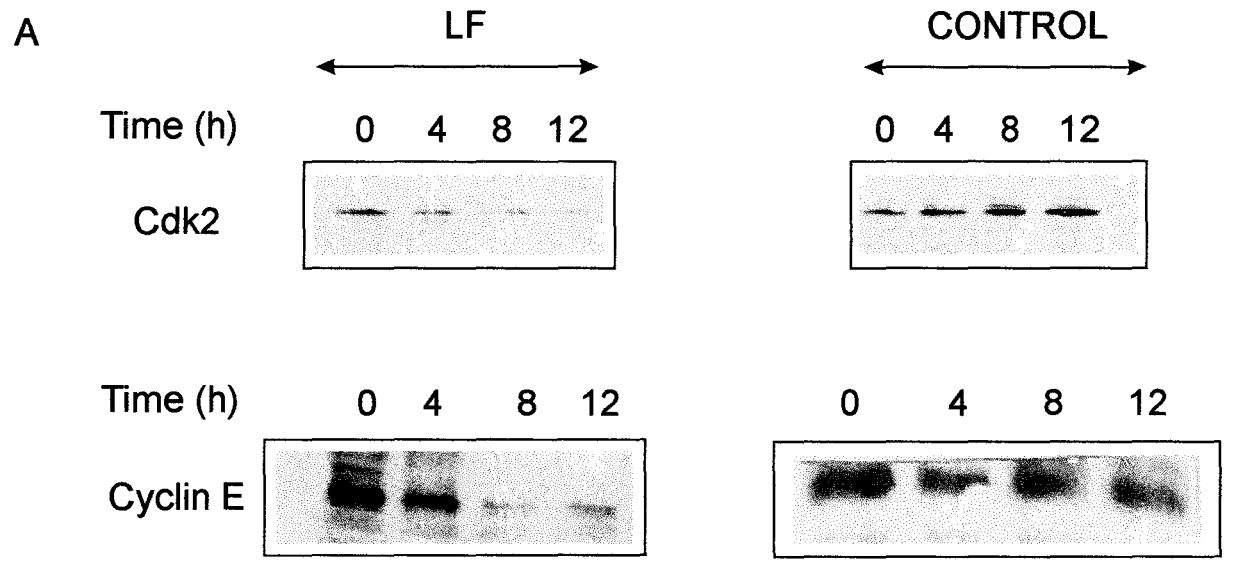


Fig. 3A. (A) Effect of lactoferrin on the cyclin E and Cdk2 protein levels. Untreated (control) or treated cells with 50 μg/ml lactoferrin for 4 h, 8h, 12 h were analyzed for the expression of Cdk2 (33 kDa) and cyclin E (52 kDa) by Western Blot analysis.

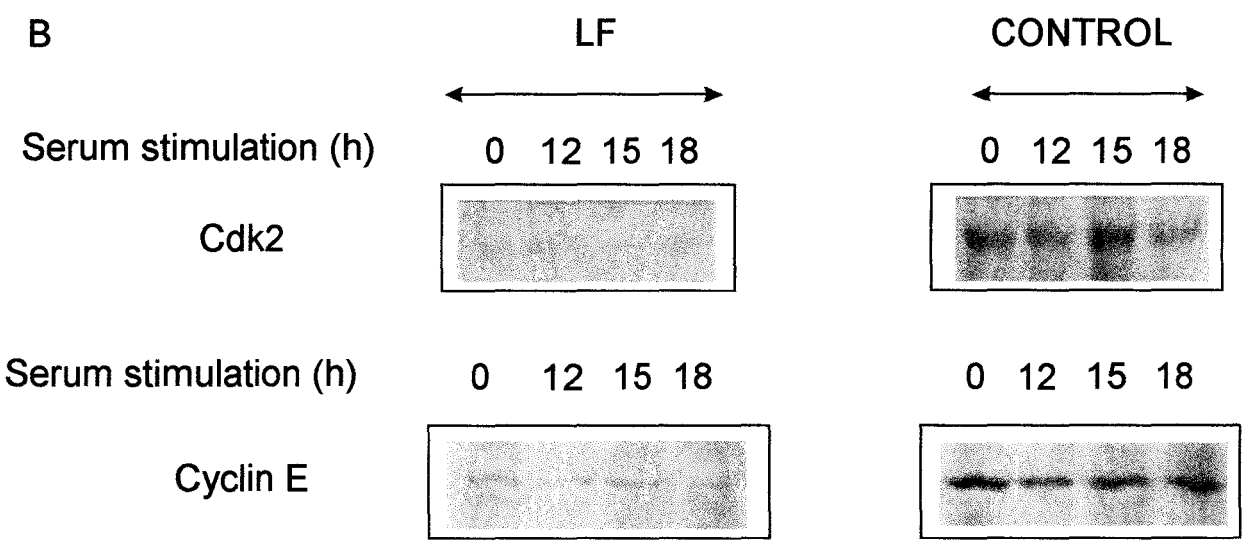


Fig. 3B. Protein levels of Cdk2 and cyclin E were further investigated on synchronized cells. MDA-MB-231 untreated (control) or lactoferrin-treated synchronized cells were release from serum starvation by serum addition for the indicated times. The protein levels of Cdk2 and cyclin E were then evaluated by Western Blot analysis using the appropriate antibodies.

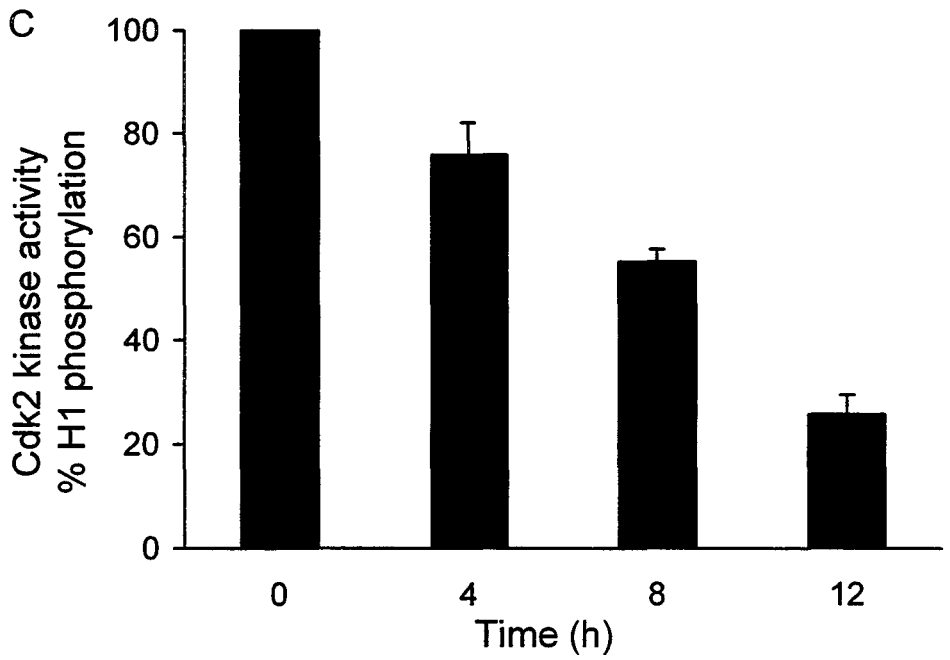


Fig. 3C. Effect of lactoferrin on Cdk2 kinase activity. Asynchronously cells were treated with 50 µg/ml lactoferrin for the indicated times. The kinase activities of the Cdk2 immunocomplexes were measured with histone H1 as substrate as described in « materials and methods ».

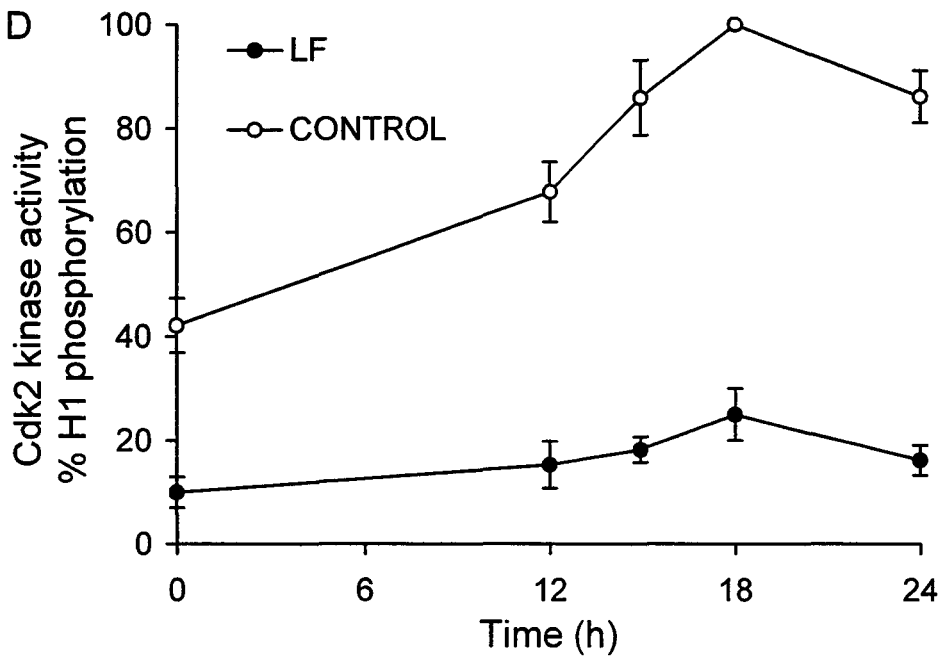


Fig. 3D. Kinase activities associated with Cdk2 in untreated and lactoferrin-treated MDA-MB-231 synchronized cells. Synchronized cells either untreated (control) or treated with 50 µg/ml lactoferrin for 12 h were serum-stimulated for the indicated times. The kinase activities of Cdk2 immunocomplexes were tested with histone H1 as substrate.

cell cycle regulation and progression whereby activation of Cdk4 precedes that of Cdk2 in association with cyclin E.

3.4. Protein levels of the cyclin-dependent inhibitors $p16^{INK4a}$ $p21^{CIP1}$, $p27^{KIP1}$ in MDA-MB-231 cells following lactoferrin treatment

Cdk inhibitors (CKIs) mediate cell cycle arrest in response to various anti-proliferative signals. Protein levels of different Cdk inhibitors such as $p21^{CIP1}$, p16 and $p27^{KIP1}$ known to act in G1 phase, were evaluated in lactoferrin-MDA-MB-231 treated cells. In order to investigate the involvement of these CKIs in the lactoferrin-induced inhibition of cyclin E/Cdk2 and cyclin D1/Cdk4 kinase activity, we first determined by immunoblotting the effect of lactoferrin on their expression. As can be seen in figure 4A, no change in p16 and $p27^{KIP1}$ expression was observed in lactoferrin-MDA-MB-231treated cells. In contrast, lactoferrin induces a great elevation in $p21^{CIP1}$ protein level in asynchronous MDA-MB-231 cells. Similarly, the protein level of $p21^{CIP1}$ in synchronized cells rapidly increased as compared to untreated MDA-MB-231 cells in which the level of $p21^{CIP1}$ was extremely low (Fig. 4B).

3.5. Effect of p53status on the induction of $p21^{CIP1}$ in response to lactoferrin treatment in breast and colon cell lines

The expression of $p21^{CIP1}$ can be induced by p53 or independently of p53. The increase of $p21^{CIP1}$ appears to be mediated through a p53-independent mechanism in the MDA-MB-231 cell line. Indeed, MDA-MB-231 is a particular cell line which express a mutant form (non functional) of p53 [Sheikh et al., 1994]. To determine whether the growth arrest observed on the two other breast cell lines (MCF-7 and HBL-100) is mediated by $p21^{CIP1}$independently of p53, we examined by western blot their $p21^{CIP1}$ and p53 protein levels in the absence and presence of lactoferrin. Indeed, when p53 is involved in such phenomenon, its protein level increases rapidly in the cell before its activation as a transcription factor for genes such as $p21^{CIP1/WAF1}$. Furthermore, in order to evaluate whether this mechanism of growth arrest is specific of breast cell lines or can be found in an other carcinoma cell line, we investigated the modulation of these protein levels in the non-breast epithelial cancer cell line HT29-18-C1 (functional p53) which cell cycle progression is arrested by lactoferrin in the G1 phase [Damiens et al., 1998]. We demonstrated that exposure of the various breast and colon asynchronized cells to lactoferrin resulted in a significant increase of $p21^{CIP1}$ protein level (4C). In contrast, p53 protein levels in either breast or colon carcinoma cells were found to be

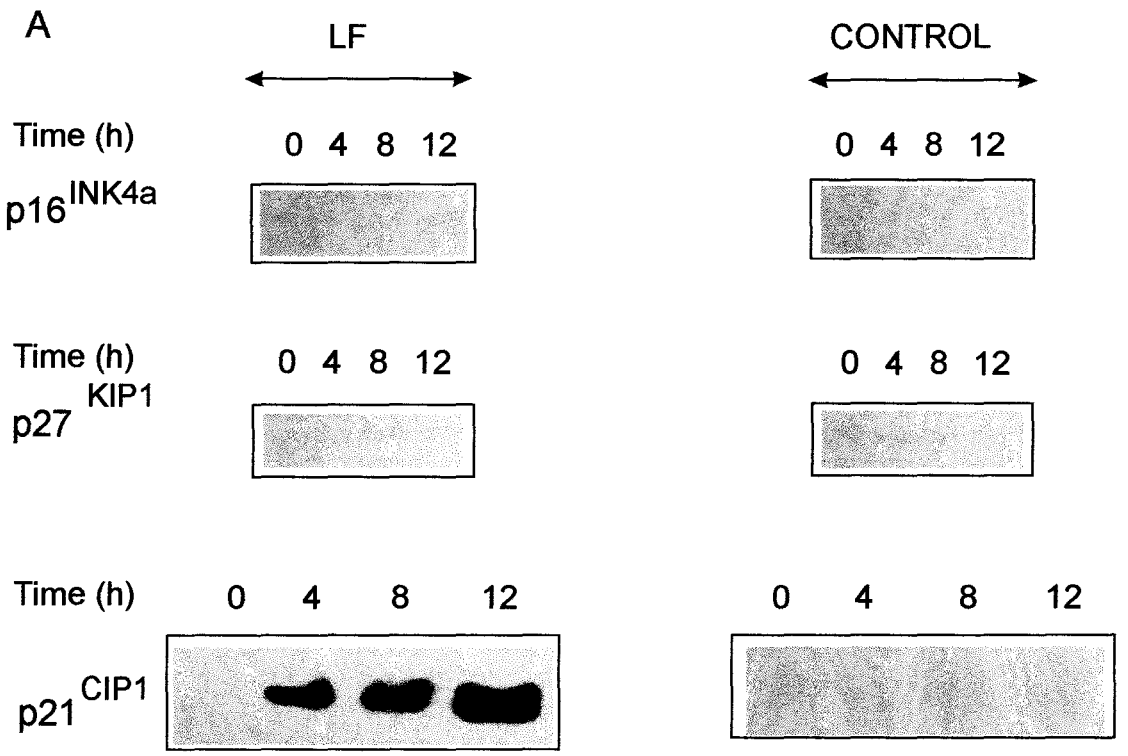


Fig. 4A. Effect of lactoferrin on p16, $p21^{CIP1}$ and $p27^{KIP1}$ protein levels. MDA-MB-231 cells untreated (control) or treated with 50 µg/ml lactoferrin for 4 h, 8 h, 12 h, were analyzed for expression of p16 (16 kDa), $p21^{CIP1}$ (21 kDa) and $p27^{KIP1}$ (27 kDa) by Western blotting.

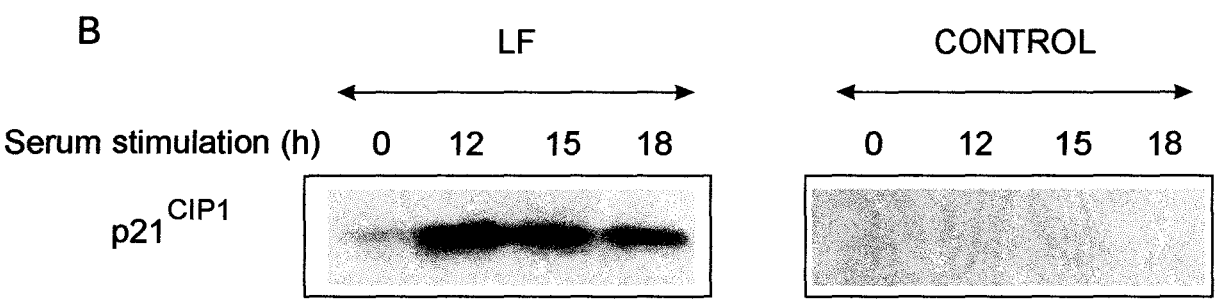


Fig. 4B. Protein level of $p21^{CIP1}$ was further determined in MDA-MB-231 synchronized cells. Synchronized untreated (control) or lactoferrin-treated cells were released from serum starvation by serum addition for the time indicated. Protein levels of $p21^{CIP1}$ were then evaluated by Western Blot using the appropriate antibody as described in « materials and methods ».

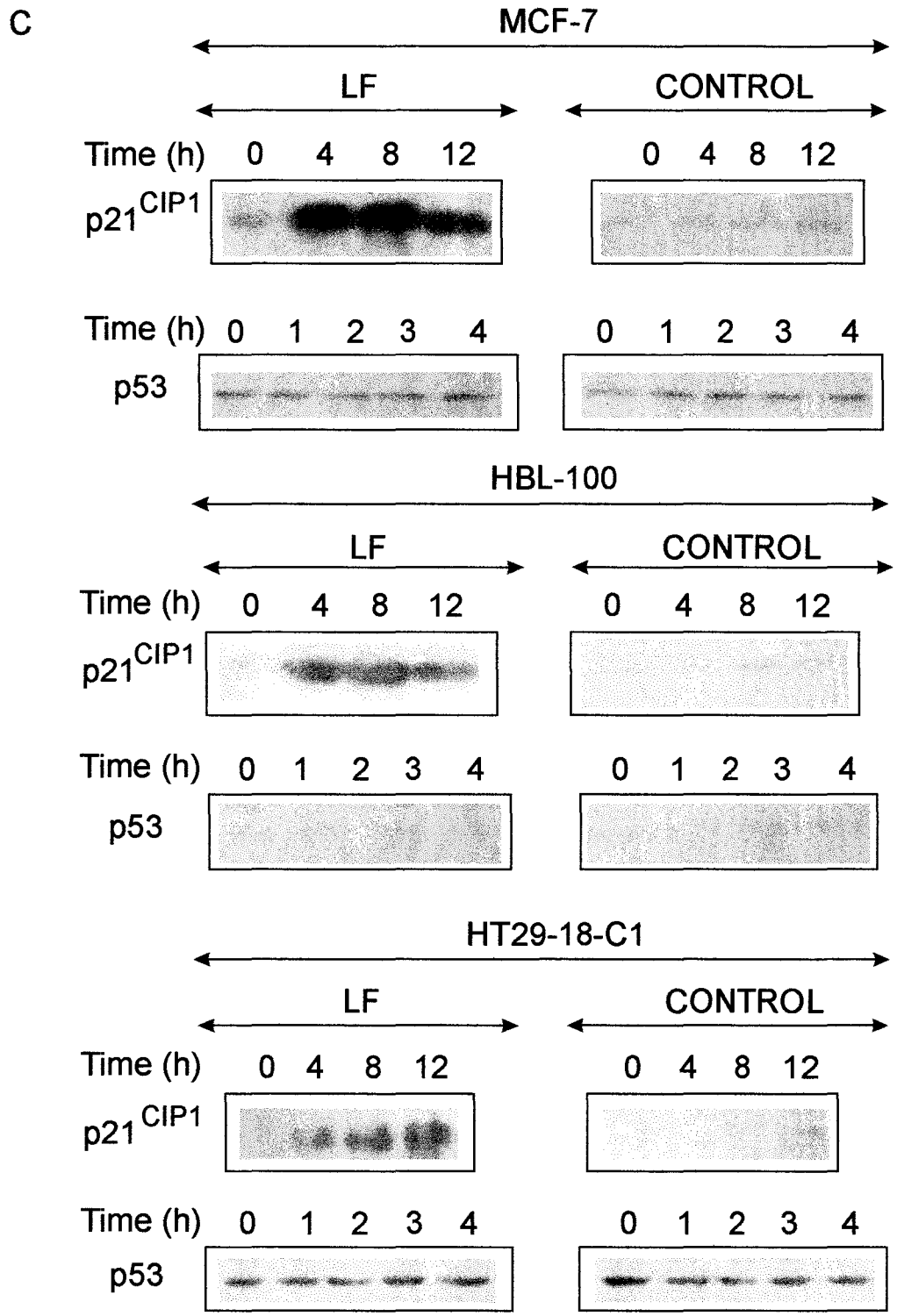


Fig. 4C. Effect of p53 status on the induction of $p21^{CIP1}$ in response to the lactoferrin treatment. P21 (21kDa) and p53 (53 kDa) protein levels of various breast and colon asynchronized cells were determined by Western Blot analysis in the absence or presence of 50 μg/ml lactoferrin.

unchanged by lactoferrin treatment as compared to untreated cells (4C). These results suggest that p53 function is not required for $p21^{CIP1}$ induction by lactoferrin in cells with both functional and non functional p53.

3.6. Association of $p21^{CIP1}$ with Cdk2 and Cdk4 in MDA-MB-231 Treated Cells

As $p21^{CIP1}$ was expressed in the lactoferrin-treated cells, we sought to determine if $p21^{CIP1}$ was associated with Cdk2 and / or Cdk4. We immunoprecipitated Cdk2 and Cdk4 complexes from extracts of asynchronously 4 h and 12 h lactoferrin-treated cells and untreated cells. The amount of $p21^{CIP1}$ in these immunoprecipitates was measured by immunoblotting. Co-immunoprecipitation analysis showed that $p21^{CIP1}$ is associated with Cdk2 and Cdk4 in cells (Fig. 5). Although no enrichment of Cdk2 was seen in 12 h-lactoferrin treated cells, lactoferrin was also associated with Cdk2. The absence of enrichment may be explained by the decline of Cdk2 protein level following 12 h-lactoferrin treatment. Indeed, co-immunoprecipitation analysis of extract from asynchronously 4 h-lactoferrin-treated cells showed that $p21^{CIP1}$ was associated with Cdk2.

4. Discussion

In this report, we demonstrate that human lactoferrin is inhibitory to growth of various human mammary epithelial cell lines. Moreover, we found that lactoferrin inhibits the proliferation of these cells by a block in the cell cycle progression at the G1 to S transition. Investigating the mechanism of the lactoferrin effect in particular on the MDA-MB-231 cell line, we showed that the growth arrest is associated with an inhibition in the activities of both Cdk4 and Cdk2. These results are in agreement with the current model of cell cycle regulation whereby activation of Cdk4 and Cdk2 by cyclin D and cyclin E respectively, plays a key role in the progression through G1 and at the G1 to S transition [Quelle et al., 1993 ; Resnitszky et al., 1994]. Moreover, in the view of the results, we show that the cellular mechanisms leading to the reduction of these view of the results, we show that the molecular mechanisms leading to the reduction of these two kinases activities differ quite widely. In the case of Cdk4/cyclin D1, protein levels are unaffected by lactoferrin treatment. It appears that Cdk4 inactivation occurs concomitantly with the increase of the Cdk inhibitor $p21^{CIP1}$ protein level. In contrast, strong reduction of Cdk2 kinase activity appears to be due to a dramatic decrease of both cyclin E and Cdk2 protein levels following treatment with lactoferrin.

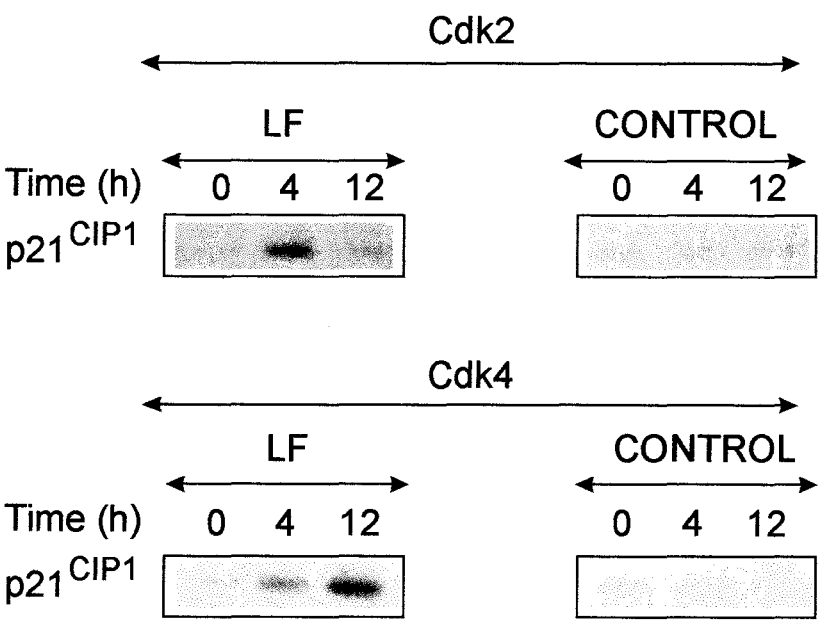


Fig. 5. Association of $p21^{CIP1}$ with Cdk2 and Cdk4 in untreated (control) and lactoferrin-treated cells for 12 h. Cell extracts containing 500 μg protein were immunoprecipitated with anti-human Cdk2 or anti-human Cdk4 antibodies. The immunoprecipitates were separated on a 12 % polyacrylamide gel, and the level of $p21^{CIP1}$ associated with the immunoprecipitates was determined by Western Blot analysis and ECL.

Examination of the pattern of Cdk activity reveals that kinase activities appear to be correlated with the phosphorylation profile of the retinoblastoma protein pRb. We have shown that in lactoferrin-treated cells pRb remains hypophosphorylated throughout the entire time course of the experiment. In contrast, in control cells, pRb is substantially phosphorylated by the cyclin D1-Cdk4 complex by 12 h to 15 h serum addition. pRb is extensively phosphorylated thereafter with a peak phosphorylation at 15 h-18 h induced by cyclin E-Cdk2 complex. These findings are in agreement with the current view that the phosphorylation of the retinolastoma gene product pRb is an essential event required for cell proliferation [Weinberg, 1995]. Our experimental data are also consistent with the notion that the cyclin Ds dependent kinases are responsible for triggering the phosphorylation of Rb thereby releasing free E2F, a transcription factor essential to initiate the cell cycle [DeGregori et al., 1995]. Furthermore it seems that pRb is the major substrate of cyclin E-Cdk2 and cyclin A-Cdk2 [Soucek et al., 1997]. The role of these complexes may be to maintain Rb in a phosphorylated state throughout the remainder of the cell cycle.

It remains to be determined how treatment by lactoferrin decreases the expression of cyclin E and Cdk2. Cyclin E mRNA is known to be regulated through changes in its rate of transcription. In fact, the cyclin E promoter contains E2F sites and activation of E2F leads to cyclin E overexpression [Geng et al., 1996]. With respect to the regulation of cyclin E expression, we can emit the hypothesis that the extensively hypophosphorylation of Rb induced by lactoferrin treatment keeps E2F inactive and inhibits cyclin E expression in MDA-MB-231 cells. Regarding Cdk2, the mechanism of expression control is unknown. However, Reynisdottir et al. suggest that the Transforming Growth Factor (TGF-β) blocks the cell cycle by invoking the actions of Cdk inhibitory proteins (CKIs) to arrest cells, a subsequent mechanism down-modulating Cdk levels [Reynisdottir et al., 1995]. The induction of $p21^{CIP1}$ by lactoferrin may act similarly on the protein level of Cdk2 in the various breast cell lines analysed in this study.

We have shown that the growth inhibitory response to lactoferrin treatment induces the increase of the $p21^{CIP1}$ protein level. Transcription of the $p21^{CIP1}$ gene is activated by p53-dependent and -independent mechanisms. Indeed, the major non-redundant function identified for $p21^{CIP1}$ *in vivo* appears to be in regulating p53-mediated growth arrest following DNA damage [Dulic et al., 1994]. Nevertheless, p53-independent induction of p21 transcription has been observed with anti-mitogenic agents such as Staurosporine or prostaglandin A_2 (PGA_2) in the mammary epithelial cancer cell line MCF-7 [Jeoung et al., 1995; Gorospe et al., 1996]

as well as with TGF-β treatment [Elbendary, 1994]. Furthermore, it has been described that a synthetic retinoid (AHPN) is able to induce G1 arrest with simultaneous upregulation of $p21^{CIP1}$ in the human breast epithelial cell line MDA-MB-231 that contains mutant p53 [Shao et al., 1995]. Furthermore, it has been found that growth arrest induced by serum-starvation as well as DNA-damaging agents did not increase p53 levels but did significantly increase WAF1/CIP1 mRNA levels carrying mutant p53 [Sheikh et al., 1994]. Incubation with lactoferrin did not result in elevated p53 levels in both HBL-100 and MCF-7 breast cell lines as well as non-breast HT29-18-C1 adenocarcinoma cells. Thus, it appears that the lactoferrin-mediated increase of the $p21^{CIP1}$ level in MDA-MB-231 cells and presumably in the other breast and colon epithelial cell lines must occur through a p53-independent mechanism.

In conclusion, the present study demonstrates that lactoferrin inhibits both tumor mammary and colon epithelial cell proliferation by induction of G1 growth arrest. The growth inhibitory response to lactoferrin appears to involve activation of the downstream effector $p21^{CIP1}$ in a p53-independent manner. This is accompanied by a reduction of Cdk4 / cyclin D1 activity and a decrease of both Cdk2 / cyclin E protein level and activity. A better knowledge of how lactoferrin acts to alter the expression of specific protein implicated in the G1 progression and the G1 to S transition to arrest proliferation could be beneficial in devising new treatment and combination with other agents acting in the different stages of the cell cycle. Such information could be of practical significance for the treatment of cancers lacking functional p53.

Acknowledgments

We thank Dr. L. Meijer (CNRS, Station biologique de Roscoff, France) for his valuable comments on this manuscript and for the generous provision of purified Retinoblastoma protein fused with Glutathione-S-Transferase (pRb-GST). We are very grateful to Dr. Louvard (Institut Pasteur, Paris, France) for the HT29-18-C1 cell line. The MDA-MB-231 cell line was a kind gift of Pr. Mareel (University hospital of Gent, Dpt. of experimental Oncology). This work was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche n°111, Relations Structure/Fonction des constituants Membranaires, director : Prof. A. Verbert), by the Université des Sciences et Technologies de Lille, by the Ministère de l'Education Nationale and by a grant from the « Association pour la Recherche sur le Cancer (contract n° 3040).

References

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.

Bezault JA, Bhimani R, Wiprovnick J, Furmanski P (1994): Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. Cancer Res 54: 2310-2312.

Campbell T, Skilton RA, Coombes RC, Shousha S, Graham MD, Luqmani YA (1992): Isolation of a lactoferrin cDNA clone and its expression in human breast cancer. Br J Cancer 65: 19-26.

Damiens E, Mazurier J, El Yazidi I, Masson M, Duthille I, Spik G, Boilly-Marer Y (1998): Effects of human lactoferrin on NK cell cytotoxicity against haematopoietic and tumour epithelal cells. Biochem Biophys Acta 1402: 277-287.

DeGregori JT, Kowalik T, Nevins JR (1995): Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. Mol Cell Biol 15: 4215-4224.

Djeha A, Brock JH (1992): Effect of transferrin, lactoferrin and chelated iron on human T-lymphocytes. British J Haematol 80: 235-241.

Dowdy SF, Hinds PW, Louie K, Reed SI, Arnold A, Weinberg RA (1993): Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. Cell 73: 499-511.

Dulic V, Kaufman WK, Wilson SJ, Tisty TD, Lees E, Harper JW, Elledge SJ, Reed SI (1994): p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during irradiation-induced G1 arrest. Cell 76: 1013-1023.

Elbendary E (1994): Transforming growth factor β can induce CIP1/WAF1 expression independent of the p53 pathway in ovarian cancer cells. Cell Growth Differ 5: 1301-1307.

Geng YE, Ng Eaton E, Picon M, Roberts J, Lundberg A, Gifford A, Sardet C, Weinberg R (1996): Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. Oncogene, 12: 1173-1180.

Gorospe M, Liu Y, Xu Q, Chrest FJ, Holbroock NJ (1996): Inhibition of G1 cyclin-dependent kinase activity during growth arrest of human breast carcinoma cells by Prostaglandin A_2. Mol Cell Biol 16: 762-770.

Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai L, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E, Fox MP, Wei N (1995): Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. Mol. Biol. Cell 6: 387-400.

Hurley WL, Hegarty HM, Metzler JT (1994): Inhibition of mammary cell growth by lactoferrin : a comparative study. Life Sc 55: 1955-1963.

Jeoung DI, Tang B, Sonenberg M (1995): Induction of tumor suppressor p21 protein kinase inhibitors in MCF-7 cells. Biochem Biophys Res Commun 214: 361-366.

Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, Vogelstein B, Jacks T (1995): p53-dependent and -independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. Genes Dev 9: 935-944.

Masson PL, Heremans JF, Schönne E (1969): Lactoferrin an iron binding protein in neutrophilic leukocytes. J Exp Med 130: 643-658.

Mazurier J, Spik G (1980): Comparative study of the iron-binding properties of human transferrins. I. Complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactotransferrin. Biochem Biophys Acta 629: 399-408.

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

Morgan DO (1995): Principles of CDK regulation. Nature 374: 131-134.

Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato J, Bar-Sagi D, Roussel MF, Sherr CJ (1993): Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. Genes Dev 7: 1559-1571.

Resnitszky D, Gossen M, Bujard H, Redd SI (1994): Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. Mol Cell Biol 14: 1669-1679.

Resnitszky D, Reed S (1995): Different roles for cyclin D1 and E in regulation of the G1 to S transition. Mol Cell Biol 15: 3463-3469.

Reynisdottir I, Polyak K., Iavarone A, Massague J (1995): Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. Genes Dev 9: 1831-1845.

Shao ZM, Dawson MI, Li XS, Rishi AK, Sheikh MS, Han QX, Ordonez JV, Shroot B, Fontana JA (1995): p53 independent G0/G1 arrest and apoptosis induced by a novel retinoid in human breast epithelial cells. Oncogene 11: 493-504.

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

Sheikh MS, Li XS, Chen JC, Shao ZM, Ordonez JV, Fontana JA (1994): Mechanisms of regulation of WAF1/CIP1 gene expression in human breast carcinoma : role of p53-dependent and independent signal transduction pathways. Oncogene 9: 3407-3415.

Sherr CJ (1994): G1 phase progression : cycling on cue. Cell 79: 551-555.

Sherr CJ, Roberts J (1995): Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. Genes Dev 9: 1149-1163.

Soucek T, Pusch O, Hengstschläger-Ottnad E, Adams PD, Hengstschläger M (1997): Deregulated expression of E2F-1 induces cyclin A-and E-associated kinase activities independently from cell cycle position. Oncogene 14: 2251-2257.

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

Steinman R, Hoffman B, Iro A, Guillouf C, Liebermann D, El-Houseini M (1994): Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. Oncogene 9: 3389-3396.

Vesely J, Havlicek L, Strnad M, Blow JJ, Donella-Deana A, Pinna L, Letham DS, Kato JY, Detivaud L, Leclerc S, Meijer L (1994): Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogue. Eur J Biochem 224: 771-786.

Weinberg RA (1995): The retinoblastoma and cell cycle control. Cell 81: 323-330.

III. CONCLUSION

Au cours de cette deuxième partie de notre travail, nous avons défini le mécanisme d'action de la lactoferrine responsable de l'arrêt de prolifération des cellules d'adénocarcinome mammaire. Nous avons montré que la lactoferrine inhibe l'activité kinase du complexe cycline D/Cdk4 qui intervient dans la progression cellulaire au cours de la phase G1. En ne phosphorylant pas pRb, le complexe cycline D/Cdk4 ne permettrait pas la libération des facteurs de transcription de la famille E2F responsables entre autres de l'activation de la transcription du gène de la cycline E. Nous avons en effet constaté une diminution importante de l'expression et de l'activité de la cycline E et de la sous-unité catalytique associée (CDK2) bloquant ainsi la transition G1/S du cycle cellulaire. Il apparaît dans nos résultats que l'inhibition de l'activité du complexe cycline D/Cdk4 est liée à l'induction de l'expression de l'inhibiteur de Cdks $p21^{CIP1/WAF1}$ par une voie p53 indépendante. Par immunoprécipitation et "western blot", nous avons en effet montré que p 21 s'associe aux complexes cycline D/Cdk4 et cycline E/Cdk2 et inhibe leurs activités.

Ces résultats, en corrélation avec les différentes études ayant montré une diminution d'expression de la lactoferrine dans les tissus cancéreux, permettent d'envisager que, *in vivo*, dans les conditions physiologiques, la lactoferrine contrôle la prolifération cellulaire dans les tissus où elle est exprimée en particulier le tissu épithélial mammaire.

MISE EN EVIDENCE DE L'IMPLICATION DES PROTEOGLYCANNES DANS LA LIAISON ET LE CONTROLE DE L'ACTIVITE ANTIPROLIFERATIVE DE LA LACTOFERRINE SUR LES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES MDA-MB-231

I. INTRODUCTION

Les protéoglycannes sont des macromolécules complexes composées d'une protéine "core protein" sur laquelle sont greffées des chaînes polysaccharidiques sulfatées dénommées glycosaminoglycannes (GAGs). Le caractère anionique des GAGs leur confère une très grande capacité interactive avec des composants matriciels, cellulaires et des médiateurs solubles. Par ces interactions, les protéoglycannes vont être capables de réguler l'activité, la biodisponibilité, la stabilité de ces molécules. Ce phénomène appelé "crinopexie" a été particulièrement étudié dans le cas des FGFs qui interagissent avec les protéoglycannes à héparane sulfate.

En ce qui concerne la lactoferrine, deux zones riches en acides aminés basiques ressemblant aux séquences consensus de liaison aux glycosaminoglycannes ont été mises en évidence dans la région N-terminale (Mann *et al.*, 1994 ; Wu *et al.*, 1995 ; Legrand *et al.*, 1997). Nous avons précédemment étudié l'activité antiproliférative de la lactoferrine sur les cellules de lignées épithéliales mammaires et colique humaines. Ces cellules et plus particulièrement les cellules épithéliales cancéreuses mammaires MDA-MB-231 produisent des quantités importantes de protéoglycannes membranaires à héparane et chondroïtine sulfate. Dans ce chapitre, nous avons donc entrepris de caractériser, d'une part, les capacités d'interactions des protéoglycannes des cellules MDA-MB-231 avec la lactoferrine, et d'autre part, d'évaluer leur influence sur l'activité anti-tumorale de la lactoferrine.

Les paramètres de fixation de la lactoferrine sur les cellules MDA-MB-231 ont été déterminés par la méthode de Scatchard. La spécificité de l'interaction de la lactoferrine avec les GAGs de type héparane et chondroïtine sulfate a été étudiée après modification structurale de ces macromolécules à l'aide d'enzymes spécifiques. Par ailleurs, l'importance de la sulfatation des GAGs dans l'interaction avec la lactoferrine a été évaluée en utilisant le chlorate de sodium. Enfin, en suivant ces mêmes protocoles de modifications des GAGs, nous avons évalué l'influence de ces GAGs et de leur degré de sulfatation dans la modulation de l'activité biologique de la lactoferrine sur les cellules MDA-MB-231.

II. RESULTATS

Ce travail a fait l'objet d'un troisième article intitulé :

"Role of heparan sulphate proteoglycans in the regulation of lactoferrin binding and activity in the MDA-MB-231 breast epithelial cell line"

sous presse dans la revue : "European Journal of Cell Biology".

Role of heparan sulphate proteoglycans in the regulation of human lactoferrin binding and activity in the MDA-MB-231 breast cancer cell line

Eve Damiens, Ikram El Yazidi, Jöel Mazurier, Elisabeth Elass-Rochard, Isabelle Duthille, Geneviève Spik[1], Yolande Boilly-Marer

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

Short title: Regulation of the lactoferrin effects in MDA-MB-231 cells

1. To whom correspondence should be addressed: Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche n° 111 du CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Tel. (33) 3 20 33 41 55; Fax (33) 3 20 43 65 55.

e-mail : genevieve. spik @ univ-lille1.fr

Abbreviations used :

CSPG, chondroitin sulphate proteoglycans; FGF, fibroblast growth factor; GAGs, glycosaminoglycans; HSPG, heparan sulphate proteoglycans; Lf, lactoferrin; mAbs, monoclonal antibodies; NK, natural killer.

Abstract

We previously demonstrated that lactoferrin increases breast cell sensitivity to Natural Killer cell cytotoxicity whereas haematopoietic cells are unaffected by lactoferrin. It has been described that lactoferrin binds to various glycosaminoglycans. Compared to haematopoietic cells, breast cancer cells and particularly the breast cell line MDA-MB-231, possess a high level of proteoglycans. Scatchard's analysis of ^{125}I-lactoferrin binding to MDA-MB-231 cells revealed the presence of two classes of binding sites : a low affinity site with a Kd of about 700 nM and 3.9 x 10^6 sites and a higher affinity class with a Kd of 45 nM and 2.9 x 10^5 sites per cell. To investigate the potential regulation of lactoferrin activity by proteoglycans expressed on the MDA-MB-231 cells, we treated these cells with glycosaminoglycan-degrading enzymes or sodium chlorate, a metabolic inhibitor of proteoglycan sulphation. We showed that chondroitinase ABC treatment has no effect, while heparinase I or chlorate treatment significantly reduces both the binding of lactoferrin to cell surface sulphated molecules such as heparan sulphate proteoglycans (HSPG) and the affinity of lactoferrin for the higher affinity binding sites. The modulation of the lactoferrin binding was correlated with a decrease in lactoferrin activities on both MDA-MB-231 cell sensitisation to lysis and proliferation. Taken together, these results suggest that the presence of adequately sulphated molecules, in particular HSPG, is important for lactoferrin interaction and activity on the breast cancer cells MDA-MB-231.

Key words : lactoferrin, breast cancer, glycosaminoglycans, cytotoxicity, proliferation.

1. Introduction

Lactoferrin, also called lactotransferrin [21] is a widely distributed iron-binding glycoprotein. Lactoferrin is found in external secretions, especially in milk and in secondary granules of neutrophils [16]. Some biological activities of lactoferrin are linked to its ability to chelate iron whereas other functions belong to the interactions of the polypeptide chain with target cells including monocytes/macrophages [2, 11], human non-activated platelets [14], human peripheral activated lymphocytes [18], natural killer (NK) cells [5], enterocytes [20, 25] and human epithelial mammary cells [24]. The interaction of lactoferrin with these cells might involve multiple classes of binding sites. In a previous study, we found that lactoferrin sensitizes breast and colon cancer cells to NK cell lysis by inducing an arrest of the cell cycle at the G1 to S transition [5]. Colon and breast adenocarcinoma cells, particularly the breast cancer cells MDA-MB-231, possess a high content of proteoglycans. The predominant MDA-MB-231 cell surface associated glycosaminoglycans chains (GAGs) are heparan and chondroitin sulphate [4, 7]. These GAGs interact with lactoferrin by creating a high number of low affinity ionic binding sites. Indeed, lactoferrin presents in the N-terminal domain two specific regions, at positions 1-6 and 28-31, which contain consensus sequences found in many other glycosaminoglycan binding proteins [15, 30]. The cationic region (tetrapeptide R^2-R^3-R^4-R^5) has been shown to be involved in the large volume and low affinity binding sites to hepatocyte, possibly through a proteoglycan component [31]. Recently, Legrand *et al.* (1997) demonstrated that the basic cluster R^2-R^3-R^4 is important in lactoferrin interaction with a large number of binding sites on Jurkat cells. The authors suggest that this interaction may modulate the specific binding and the lactoferrin effects on cellular physiology [13]. In fact, considering the wide distribution of proteoglycans, their functions are conceivably diverse. Among these, the heparan sulphate proteoglycans (HSPG) have been implicated in cell attachment, in the regulation of mammalian proliferation and differentiation [9], in growth factor stability and transfer to specific high receptors [12]. To define the biological effects induced by the binding of lactoferrin to breast tumor epithelial cells, we investigated the presence of low and high affinity binding sites for lactoferrin on the breast carcinoma cells MDA-MB-231. Scatchard's analyses [26] of the isotopic dilution of labelled lactoferrin revealed that MDA-MB-231 binding data fit by a two-class binding site model. We found a higher affinity binding site with an apparent dissociation constant of Kd = 45 nM and a second class of binding site with a lower affinity estimated at approximately 680 nM. We

demonstrated that these lower affinity binding sites are associated with the presence of cell surface sulphated molecules, in particular HSPG. We thus analyzed the role of these GAGs in the human breast cancer MDA-MB-231 cell responsiveness to lactoferrin. Using enzymatic and chemical reagents which degrade or alter the heparan or chondroitin sulphate chains in cell cultures, we showed that heparan sulphate proteoglycans (HSPG) and the level of sulphation of the cell surface associated sulphated molecules, in particular HSPG are involved in the modulation of lactoferrin binding to the higher affinity site while chondroitin sulphate proteoglycans (CSPG) have no effect. Furthermore, we suggested that adequately sulphated molecules such as HSPG can regulate the activities of lactoferrin on both MDA-MB-231 cell proliferation and sensitisation to NK cell lysis.

2. Materials and Methods

2.2. Effector cells

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were prepared from the citrated blood of healthy donors by lymphoprep gradient separation [3]. Monocytic cells were extensively depleted by adherence to plastic. Preparations of CD56+ NK cells (purity: 85.5 ± 5.5%) were isolated by negative selection using monoclonal antibodies (mAbs) against CD3 (Immunotech; Marseille, France). The effect of lactoferrin on NK cells was determined simultaneously on this preparation and after a second negative selection (purity of NK cells: 95 ± 3.2%) using anti-CD20 mAbs (Immunotech). Briefly, mAbs anti CD3 or anti CD20 were fixed on a tissue culture dish in Tris (0.05 N)-HCl pH 9.5 for 4 h at 20°C. The cellular suspension was then added for 1 h at 37°C. Effector cells were finally resuspended in RPMI 1640 medium pH 7.4 (Gibco-BRL; Eragny, France) supplemented with 25 mM HEPES (Eurobio; Les Ullis, France), 20 mM sodium bicarbonate (Eurobio), 10% heat-inactivated FCS (DAP; Vogelgrun, France), 2 mM L-glutamine, 50 mg/l gentamycin (Gibco-BRL).

2.2. Cell culture

Human breast tumour cell line MDA-MB-231 was grown in Eagle's minimal essential medium containing 0.22% sodium bicarbonate, 25 mM HEPES, 10% heat-inactivated FCS, 1% non essential amino acids (Eurobio), 2 mM L-glutamine, 5 μg/ml insulin (Endopancrine*)

(Organon; Serifontaine, France), penicillin (40 IU/ml) / streptomycin (40 µg/ml) (Gibco-BRL). Cells were maintained in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO_2 at 37°C.

2.3. Lactoferrin

Human lactoferrin was purified from human milk of a single donor by ion-exchange chromatography and saturated with iron as previously described [17, 28]. The degree of purity (>99%) of human lactoferrin was checked by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and high pressure liquid chromatography (HPLC). Lipopolysaccharides were removed by chromatography through a Detoxi-gel column (Pierce chemicals Rockford, IL, USA).

2.4. Cytotoxicity assay

The adherent MDA-MB-231 epithelial cells, at a cell density of 5.10^3/well in 100µl of medium, were labelled by the addition of 1 µCi ^{51}Cr/well ($Na_2\,^{51}CrO_4$) (Amersham; Les Ullis, France). Effector cells were added at effector/target ratios ranging from 5:1 to 80:1. At the end of the 12 h-^{51}Cr assay, cells were deposited by centrifugation and an aliquot of supernatant was collected from each well to evaluate the ^{51}Cr released with a 1282 compugamma LKB-Wallac (Turku, Finland) γ-radiation counter. The percentage of chromium released was calculated according to the following equation:

(experimental cpm - control cpm) / (maximal cpm - control cpm) x 100.

Maximum ^{51}Cr release was obtained by incubating target labelled cells (5 x 10^3 cells) into medium containing 1% Triton 100X. Spontaneous release (control cpm) was determined by incubation of 5 x 10^3 target labelled cells into medium. The ratio Tmin / Tmax did not exceed 5% for all the cytotoxic assays performed.

For the cytotoxicity assay in the presence of sodium chlorate, adherent cells were maintained for 12 h in a serum-free medium containing 30 mM sodium chlorate (Sigma Chemical Co.; Saint-Quentin-Fallavier, France). Then, lactoferrin was added in chlorate containing medium enriched with 0.5% BSA (Boehringer Manheim; Meylan, France) for 6 h during the labelling with ^{51}Cr.

For the cytotoxicity assay in the presence of glycosaminoglycan-degrading enzymes, adherent cells were treated with 0.1 IU/ml heparinase I or 0.1 IU/ml chondroitinase ABC (respectively lot 043H 4054 and 01H 3892 : protease free) (Sigma Chemical Co.) in serum

free-medium, 4 h before lactoferrin addition. Lactoferrin was added to enzyme containing medium enriched with 0.5% BSA for 6 h during the incubation period with ^{51}Cr.

2.5. Thymidine uptake

Breast epithelial cells MDA-MB-231 were cultured in a 12 well plate at a cell density of 4.10^4 cells per 500 µl of medium per well. Then, cultures were incubated in the presence of lactoferrin at concentrations ranging from 0 to 100 µg/ml. After 12 h, 2 µCi of (methyl-^{3}H) thymidine (specific activity 50 Ci / mMol) (ICN Biomedical; Irvine, CA, USA) were added to each well for 4 h at 37°C. The cells were washed with PBS and treated with cold 5% trichloracetic acid for 45 min at 4°C. Cells were rinsed with water and solubilized with 0.3 M NaOH for 60 min at 37°C. The radioactivity of the cells was measured using a beta counter Beckman (Fullerton, CA, USA).

For the proliferation assay in the presence of sodium chlorate, cells were maintained in a serum-free medium containing 30 mM chlorate for 24 h. Then, lactoferrin was added in chlorate containing medium enriched with 0.5% BSA for 12 h.

For the treatment with glycosaminoglycan-degrading enzymes, cells were maintained in serum-free medium and then treated with 0.1 IU/ml heparinase I or 0.1 IU/ml chondroitinase ABC in serum free-medium 4 h before lactoferrin addition. Lactoferrin was added to enzymes containing medium enriched with 0.5% BSA during the 12 h incubation period.

2.6. Control of in situ activity of glycosaminoglycan-degrading enzymes and sodium chlorate

For the treatment with glycosaminoglycan-degrading enzymes, cells were maintained for 24 h in serum-free medium containing 0.5% BSA and 25 µCi/ml $Na_2{}^{35}SO_4$ (Amersham). Heparinase I (0.1 IU/ml) and/or chondroitinase ABC (0.1 IU/ml) were then added to the culture medium for 8h.

For the control of the inhibition of proteoglycan sulphation by chlorate treatment, cells were maintained for 24 h in a serum-free medium containing 0.5% BSA and 25 µCi/ml $Na_2{}^{35}SO_4$.

Thereafter cell layers were washed three times with 5 ml PBS pH 7.4 and scrapped into buffer containing 4 M guanidinium chloride (Aldrich Chemie; Saint-Quentin Fallavier, France), 50 mM sodium acetate, 10 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 10 mM NaF, 200 µM

aprotinin (Sigma Chemical Co.), 50 μg/ml leupeptin (Sigma Chemical Co.), and 0.3 % triton X-100, pH5.8. The cell extracts were stirred overnight at 4°C before further chromatographic separation. Then they were diluted and applied to DEAE-Sephacel columns (Pharmacia LKB Biotechnology; Upsala, Sweden) equilibrated in 0.1 M NaCl Tris-HCl buffer pH7.4. The columns were extensively washed with buffer containing 0.1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0.5% CHAPS (Sigma Chemical Co.) pH 7.4 until no radioactivity came through. Remaining bound material was eluted at the flow rate of 0.9 ml/min with a discontinuous gradient (0.15 M, 0.3 M, 0.6 M, 1 M, 1.5 M NaCl) in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 containing 0.5% CHAPS. Fractions (1 ml) were collected and aliquots taken for radioactivity measurement using a beta counter Beckman.

2.7. Radiolabelling of lactoferrin

^{125}I labelling of lactoferrin was carried out with 0.2 mCi of Na ^{125}I (Amersham) in PBS, pH 7.4, in the presence of Iodogen (Pierce; Rockford, IL, USA) as previously described [18]. After 10 min of incubation, free iodine was removed by gel filtration through a Sephadex G-25 PD10 column (Pharmacia-LKB Biotechnology; Uppsala, Sweden). The specific activity of the radioiodinated protein was estimated by measuring the absorbance at 280 nm and the radioactivity using a gamma radiation counter.

2.8. ^{125}I labelled lactoferrin binding assays

Binding experiments of lactoferrin to MDA-MB-231 cells were performed at 4°C. Different concentrations of ^{125}I labelled lactoferrin (1nM to 850 nM) were added to a constant number of subconfluent cells (4.10^5/well in a 12 well plate) in PBS pH 7.4 containing 0.2% BSA in order to limit the high level of adsorption of lactoferrin onto the walls of the incubation vials. Non-specific binding of lactoferrin was measured by adding a 100 fold molar excess of unlabelled lactoferrin to the incubation medium. After 90 min incubation, 60 μl of the incubation medium were collected and the remainder was aspirated. The cell monolayer was rinsed three times with 0.5 ml of ice cold PBS pH 7.4 and scraped with PBS-EDTA. Cell associated and medium radioactivities were determined using a gamma counter. The dissociation constants and number of binding sites were evaluated according to Scatchard [26] with the aid of Enzfitter, an Elsevier-Biosoft computer program for non-linear regression data analysis (Cambridge, UK).

3. Results

3.1. Surface binding of human lactoferrin to MDA-MB-231 cells

We studied the ^{125}I-lactoferrin binding to MDA-MB-231 cells at concentrations ranging from 0 to 850 nM. The binding was found to be concentration dependent and saturable at a concentration greater than 850 nM. It was specifically inhibited in the presence of a 100 fold molar excess of unlabelled lactoferrin, while the non-specific binding never represented more than 15% of the total binding (Fig. 1a). The binding data obtained from a Scatchard plot analysis revealed, after subtraction of the non-specific binding, the presence of two classes of binding sites (Fig. 1b): a high capacity/low affinity class of binding site with a Kd estimated at 680 ± 116 nM and a low capacity/high affinity class of binding site with a Kd of 45 ± 8.6 nM. The number of sites was estimated at 3.9 ± 0.43 x 10^6/cell and 2.9 ± 0.39 x 10^5/cell, respectively (Table 1).

3.2. ^{125}I -lactoferrin binding to enzyme treated cells

Electrostatic interactions are involved in the binding of most ligands to sulphated glycosaminoglycans (GAGs). The predominant glycosaminoglycan chains associated with the human breast carcinoma cell line MDA-MB-231 are heparan sulphate and chondroitin sulphate [4, 7]. To further investigate whether these cell associated GAGs are involved in the low affinity binding of lactoferrin to MDA-MB-231 cells, the cells were treated with heparinase I or chondroitinase ABC prior to conducting human lactoferrin binding. We studied the interaction of ^{125}I-labelled human lactoferrin with treated cells at concentrations ranging from 0 to 850 nM. As shown in Table 2, treatment of the cells with heparinase I resulted in a decrease of 67% of the $^{35}SO_4$ incorporation in the MDA-MB-231 cell layer, and after chondroitinase ABC treatment, the amount of $^{35}SO_4$ incorporation was reduced by 23%. Furthermore, the association of heparinase I and chondroitinase ABC resulted in a degradation of most of the cell-layer associating proteoglycans (88%) demonstrating the activity of these enzymes. Heparinase I treatment decreased by 54% the specific ^{125}I-lactoferrin cellular binding. The affinity of human lactoferrin for the low affinity class sites was not modified in heparinase-treated cells as compared with untreated cells. However, the affinity for the high affinity class of binding sites was significantly decreased when compared with untreated cells. The number of lactoferrin binding sites on heparinase-treated cells was the same for the high

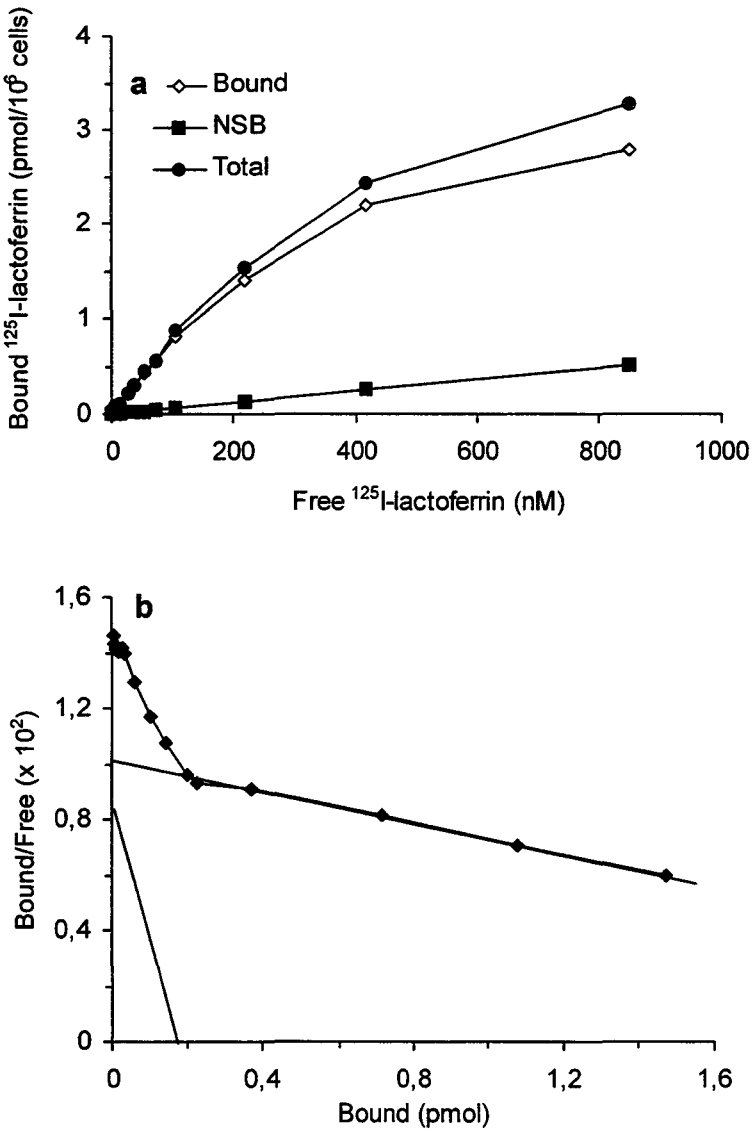


Fig. 1. Saturability of ^{125}I-human lactoferrin binding to MDA-MB-231 cell monolayers. (a) Confluent MDA-MB-231 cells are incubated with the indicated concentrations of ^{125}I-human lactoferrin for 90 min at 4°C. Cell associated and medium radioactivities are determined in the collected incubation medium and in the scraped cells. Non-specific binding is estimated in the presence of a 100-fold molar excess of unlabelled lactoferrin. Results are representative of four separate experiments. (b) Scatchard plot analysis of the specific binding of ^{125}I-human lactoferrin to MDA-MB-231 cells. Values are the means of four separate experiments.

Table 1. Binding constants for human lactoferrin interaction with high and low affinity sites on untreated and treated MDA-MB-231 cells.

	High affinity		Low affinity	
Cell treatment	Kd (nM)	Sites x 10^5/cell	Kd (nM)	Sites x 10^6/cell
None	45 ± 8.6	2.9 ± 0.39	680 ± 116	3.9 ± 0.43
Heparinase I	122.8 ± 12.3	2.6 ± 0.34	613 ± 113	1.6 ± 0.5
Chondroitinase ABC	52 ± 10.1	3.2 ± 0.52	591 ± 105	4.3 ± 0.6
Sodium chlorate	111 ± 9.8	2.75 ± 0.37	700 ± 127	1.5 ± 0.3

Confluent cultures are incubated with various concentrations of ^{125}I-human lactoferrin for 90 min at 4°C. Then, the medium is removed and the cells are washed and extracted with PBS-EDTA. The binding data are analyzed by the method of Scatchard. Values are the means ± SEM of three or four separate experiments.

Table 2. Control of *in situ* activity of glycosaminoglycan-degrading enzymes and sodium chlorate.

	Control	Heparinase I	Chondroitinase ABC	Heparinase I + Chondroitinase ABC	Na ClO_3
Cell associated [35S] (cpm/10^6 cells)	23858 ± 950	7873 ± 820	18370 ± 861	2862 ± 450	6680 ± 617

Exponentially growing cells were incubated with or without sodium chlorate for 24 h in the presence of 25 µCi/ml $Na_2{}^{35}SO_4$. Glycosaminoglycan-degrading enzymes were directly added to culture medium at 0.1 IU/ml for 8 h. The amount of radioactivity was determined as described in Materials and Methos. Results are expressed in cpm of [^{35}S]/10^6 cells and corresponded to the mean value of two independent experiments.

affinity class sites and significantly decreased for the low affinity class of binding sites (Table 1). In contrast, Scatchard's analysis revealed that, in the range of the human lactoferrin concentrations used, chondroitinase ABC treatment had no effect either on low affinity or high affinity binding sites (Table 1). These observations suggest that the low affinity class of binding sites probably does represent binding to cell associated heparan sulphate which are degraded by heparinase I. Furthermore, the decrease in the lactoferrin affinity for the high affinity class of binding sites in heparinase-treated cells suggests that HSPG may play a role in the storage of lactoferrin and facilitate its interaction with the high affinity binding sites.

3.3. ^{125}I-lactoferrin binding to chlorate-treated cells

To determine the importance of sulphation of GAGs in human lactoferrin binding to MDA-MB-231 cells, cells were pre-treated with 30 mM sodium chlorate. Chlorate is an inhibitor of ATP sulfurylase and hence of the production of phosphoadenosine phosphosulphate, the active donor for sulphotransferase [1]. We showed a decrease of 72 % in the $^{35}SO_4$ incorporation when the cells were cultured in the presence of sodium chlorate (Table 2).

After the chlorate treatment, binding of ^{125}I-lactoferrin to MDA-MB-231 cells was reduced by 61%. According to the results of Scatchard analysis, chlorate treatment of MDA-MB-231 cells decreased the number of low affinity binding sites for lactoferrin, whereas the Kd was not modified as compared to untreated cells. Chlorate treatment did not affect the number of high affinity binding sites but induced a significant decrease in their affinity for lactoferrin (Table 1).

These results indicate that cell associated sulphated molecules, in particular HSPG, are involved in lactoferrin binding to low affinity sites on MDA-MB-231 cells. Furthermore, the decrease in lactoferrin affinity for its high affinity class sites suggests that sulphated molecules are required to optimise lactoferrin interaction with the high affinity sites.

3.4. Effect of enzymatical and chemical treatments on MDA-MB-231 cell sensitisation by lactoferrin to NK lysis

As proteoglycans are involved in the modulation of a number of biological activities, we investigated whether the degradation of chondroitin and heparan sulphate chains, mainly present on the MDA-MB-231 cell surface, affects the lactoferrin activities on these cells. We

also investigated the influence of sulphation of GAGs on cell sensitisation to lysis by lactoferrin. In order to determine the function of these GAGs and their degree of sulphation in cell sensitisation to NK cell lysis by lactoferrin, we pre-incubated the cells with 30 mM sodium chlorate, heparinase I (1 IU/ml) or chondroitinase ABC (0.5 IU/ml) before adding lactoferrin at concentrations ranging from 0 to 100 µg/ml.

In the absence of lactoferrin, heparinase I cell-treatment increased the sensitivity of MDA-MB-231 cells to NK cell lysis by about 15% (Fig. 2a), whereas chondroitinase ABC did not modify their sensitivity (Fig. 2b). In contrast, sodium chlorate treatment decreased the cell sensitivity to lysis by about 25% as compared to untreated cells (Fig. 2c). In view of these results, it appears that the intrinsic susceptibility of the target cells to NK cell lysis depends to a certain extent on components of the cell membrane such as cell surface associated glycosaminoglycans.

The addition of lactoferrin sensitized the untreated and treated cells to lysis. However, the increase in sensitivity induced by lactoferrin was less on heparinase I or sodium chlorate treated cells (Fig. 2b, 2c). The cell sensitisation to lysis by lactoferrin was dose dependent and was similar for both control and chondroitinase ABC treated cells (Fig. 3a). In contrast, whatever the concentration of lactoferrin used, its activity on heparinase I or chlorate treated cell sensitisation to NK cell lysis was reduced by about 20 to 30% as compared to untreated cells (Fig. 3b, 3c). These results suggest that CSPG are not implicated in the lactoferrin effect on cell sensitisation to NK cell lysis. In contrast, it appears that the cooperation between the sulphated domains of cell surface associated molecules, in particular HSPG, and the high affinity site for lactoferrin is important for the modulation of lactoferrin activity on MDA-MB-231 cells.

3.5. Effect of glycosaminoglycan-degrading enzymes and sodium chlorate on the lactoferrin anti-proliferative activity

As shown in figure 4a, heparinase I treatment reduces ^{3}H-thymidine incorporation by about 13% in the absence of lactoferrin. In contrast, chlorate treatment increased this incorporation (12%) (Fig. 4b), whereas chondroitinase ABC treatment did not influence the cell proliferation as compared to untreated cells (Fig. 4c). In the presence of lactoferrin at concentrations ranging from 0 to 100 µg/ml, a dose-dependent decrease of ^{3}H-thymidine incorporation was observed in MDA-MB-231 untreated cells. Compared to the control cells,

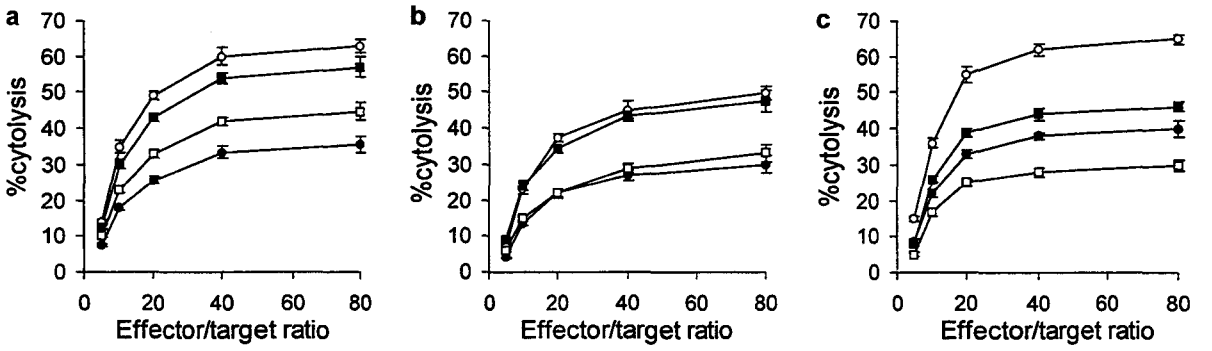


Fig. 2. Effect of glycosaminoglycan-degrading enzyme and sodium chlorate treatments on cell sensitization by lactoferrin to NK cell lysis.

MDA-MB-231 cells are treated with heparinase I (a) or chondroitinase ABC (b) for 4 h. For chlorate treatment (c), cells are cultured for 12 h in a serum-free medium containing 30 mM sodium chlorate. Then, they are maintained for 6 h in medium containing either heparinase I or chondroitinase ABC or sodium chlorate and 0 μg/ml (□) or 100 μg/ml (■) of human lactoferrin before the incubation with NK cells. Control cells are incubated in parallel in medium alone (●) or enriched with 100 μg/ml of lactoferrin (○) before the cytotoxicity assay. The cell sensitisation by lactoferrin to lysis is similar for both control and chondroitinase treated cells, whereas heparinase I and sodium chlorate reduce this lactoferrin activity on MDA-MB-231 cells. Error bars indicate the means ± SEM of three to five experiments. $p<0.01$. Student's-t test.

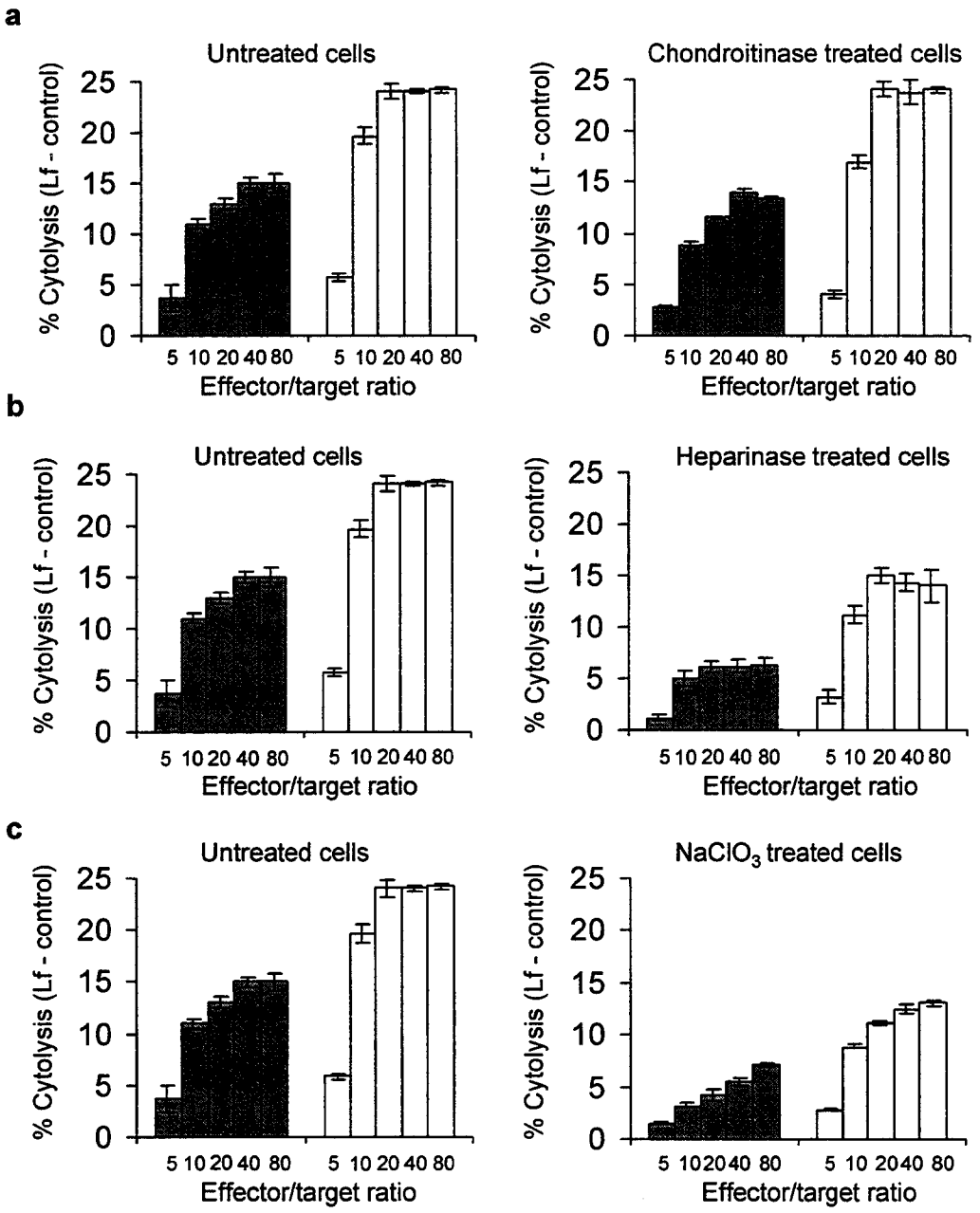


Fig. 3. Dose effect of lactoferrin on MDA-MB-231 cells pre-treated with glycosaminoglycan-degrading enzymes or sodium chlorate.

Cells are untreated or pre-treated with chondroitinase ABC (a), heparinase I (b) or ($NaClO_3$) sodium chlorate (c). Then, they are incubated without lactoferrin, 50 µg/ml or 100 µg/ml of lactoferrin as described under Materials and Methods. The results are expressed in the form : % cytolysis in the absence (untreated cells) or in the presence of enzyme or $NaClO_3$ with 50 µg/ml (*grey bar*) or 100 µg/ml lactoferrin (*white bar*) minus % cytolysis in the absence (untreated cells) or in the presence of enzyme or $NaClO_3$ without lactoferrin. As compared to the control experiment, chondroitinase treatment does not modify the cell sensitisation to lysis by lactoferrin whereas heparinase I and sodium chlorate reduce this effect whatever the lactoferrin concentration used. The means ± SEM of three to five experiments are shown. $p<0.05$. Student's-t test.

^{3}H-thymidine incorporation was decreased by about 50% at a concentration of 100 µg/ml lactoferrin. MDA-MB-231 cell treatment with heparinase I (Fig. 4a) or sodium chlorate (Fig. 4b) induced a significant decrease in the lactoferrin anti-proliferative activity. At a concentration of 100 µg/ml, the decrease in the lactoferrin effect did not exceed 27% with respect to the control cells. In contrast, the digestion of GAGs chains by chondroitinase ABC did not modify the antiproliferative activity of lactoferrin (Fig. 4c). In fact, at all the concentrations of lactoferrin tested, lactoferrin showed a similar inhibitory effect on the chondroitinase-treated cell proliferation as compared to untreated cells. Thus, these results suggest the contribution of sulphated domains of cell surface molecules in particular HSPG and the absence of implication of the cell surface CSPG in the modulation of the lactoferrin effect on MDA-MB-231 cell sensitisation to lysis and growth arrest.

4. Discussion

In the present paper, we determine the parameters of two classes of MDA-MB-231 cell lactoferrin binding sites and we analyze their respective influence on lactoferrin activities with regard to cell sensitisation to lysis and the inhibition of epithelial cell proliferation.

The results demonstrate the presence of human lactoferrin interaction sites. Scatchard's analysis of the isotopic dilution of labelled lactoferrin shows that the data are best fitted by a two classes of binding site model. The MDA-MB-231 cells exhibit 2.9 x 10^5 binding sites for lactoferrin with high affinity (Kd = 45 ± 8.6 nM). As high affinity binding sites are considered to mediate specific biological effect, the presence of these receptors indicates that lactoferrin can exert specific effects on these cells. In particular, Shau *et al.* have described that lactoferrin increases cytolysis of tumour cells by NK cells when it is added simultaneously to the target cells and the NK cells, at the beginning of the cytotoxicity assay. They have suggested that lactoferrin modulates NK cell cytotoxic activity [27]. However, it cannot be excluded that lactoferrin also acts on target cell sensitivity to lysis. In fact, using the breast epithelial tumour cells MDA-MB-231, we demonstrate that treatment of these cells with lactoferrin significantly increases the cytolysis in a concentration-dependent manner. Moreover, we observe that the pre-treatment of the cells with lactoferrin does not affect their viability but significantly reduces their level of DNA synthesis and consequently their proliferation [5].

We found a second class of binding sites on the MDA-MB-231 cells. The dissociation

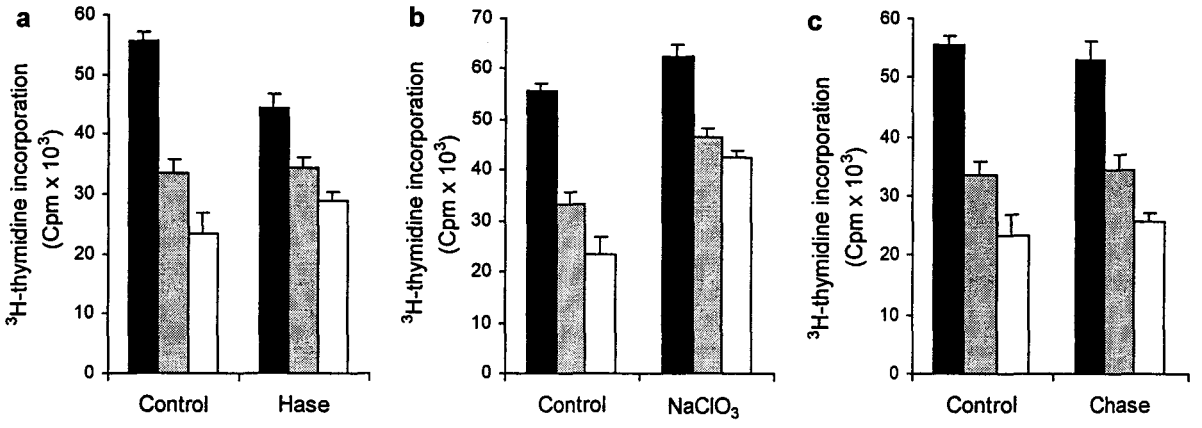


Fig. 4. Effect of glycosaminoglycan-degrading enzymes and sodium chlorate cell treatments on the lactoferrin antimitogenic activity.

Cells are untreated (control) or pre-treated with (Hase) heparinase I (a), ($NaClO_3$) sodium chlorate (b) or (Chase) chondroitinase ABC (c) as described under Materials and Methods. Then, they are cultured in the presence of lactoferrin at concentrations of 0 µg/ml (*black bar*), 50 µg/ml (*grey bar*) and 100 µg/ml (*white bar*) for 24 h in medium alone or containing either enzymes or sodium chlorate. After 20 h in the presence of lactoferrin, ^{3}H-methyl thymidine is added for 4 h. Incorporated radioactivity is then measured with a beta counter. Chondroitinase does not influence the antiproliferative effect of lactoferrin. In contrast, heparinase I or chlorate treatment decreases the antimitogenic activity of lactoferrin whatever the lactoferrin concentration used. Each point is the mean ± SEM of three experiments.

constant estimated at (680 ± 116 nM) and the number of low affinity binding sites (3.9 x 10^6) are of the same order as the values obtained by Rochard *et al.* [24]. The predominant glycosaminoglycans associated with this cell line are heparan sulphate and chondroitin sulphate [4]. A recent study on fibroblast growth factor (FGF-2) activity using in part, chlorate, heparinase and chondroitinase treatments revealed that these cell-surface associated molecules and particularly heparan sulphate are low affinity binding sites for FGF [6]. Human lactoferrin is also able to interact with anionic cell surface molecules such as glycosaminoglycans. The heparin-binding sites of human lactoferrin have been located at the N-terminal position of the molecule and the interaction is thought to be mediated through a $G^1R^2R^3R^4R^5S^6$ sequence in synergy with the $R^{28}K^{29}V^{30}R^{31}$ sequence [15, 30]. Recently, Legrand *et al.* confirmed the important role of the amino acids of one of these two clusters (R^2-R^3-R^4-R^5) in interaction with the sulphated molecules present at the Jurkat cell surface [13]. In our study, we demonstrate that chlorate treatment of MDA-MB-231 results in a 61% decrease in the human lactoferrin total binding suggesting that at the very least, over two thirds of the binding sites which interact with lactoferrin include sulphate containing molecules. This result is confirmed by Pejler [22] who also showed that the binding of lactoferrin might require a specific sequence containing both (one or more) 6-*O*-sulphate, 2-*O*-sulphate or *N*-sulphate groups. Furthermore, we show that heparinase I treatment of MDA-MB-231 cells decreases by 54% the total ^{125}I-labelled lactoferrin cellular binding whereas treatment with chondroitinase ABC does not have any significant effect on binding. These results confirm the importance of sulphated molecules and particularly heparan sulphate proteoglycans in lactoferrin binding to MDA-MB-231 cells. This preference of lactoferrin to bind to heparin and heparan sulphate over chondroitin sulphate is supported by previous reports [22, 32]. Moreover, we observe that the number of high affinity sites is not modified in the chlorate or heparinase I treated cells, while the lactoferrin affinity for these sites is decreased. Thus, we conclude that HSPG are not strictly required for lactoferrin binding to its high affinity sites but the two types of sites may cooperate in increasing the affinity of lactoferrin interaction, as described for FGF-2 [29].

Proteoglycans have been described to bind and sequester biologically active molecules such as fibroblast growth factor (FGF), to present them to specific receptor and to modulate their activity [23, 19, 10]. As proteoglycans bind lactoferrin, we considered that they could modulate lactoferrin activity on epithelial cells as is the case for FGF. On the one hand, we found that in the absence of lactoferrin, chlorate treatment induces an increase in ^{3}H-

thymidine incorporation. The down-regulation of proteoglycans sulphation caused by chlorate may increase the release of endogenous growth factors such as FGF which stimulate cell proliferation [8]. On the other hand, we showed that inhibition of sulphation by chlorate significantly reduces cell responsiveness to lactoferrin. The reduced effect of lactoferrin on chlorate treated cells may be due to (i) a disruption of the balance between the proportion of lactoferrin low and high affinity sites as described for FGF [6], (ii) an effect on the other sulphated molecules expressed at the MDA-MB-231 cell surface or (iii) to the opposite effects between endogenous FGF mitogenic activity and lactoferrin anti-proliferative function. Moreover, we observed that heparan sulphate proteoglycan degradation by heparinase I reduces both lactoferrin binding to cell surface and lactoferrin affinity for high affinity class of binding site as well as its effects on MDA-MB-231 cells, whereas cell treatment by chondroitinase ABC does not. Thus, it appears that cell surface-associated molecules, in particular heparan sulfate proteoglycans, are required to increase lactoferrin affinity for the high affinity sites and consequently can regulate the biological activity of lactoferrin on MDA-MB-231 cells.

In conclusion, our observations support the concept that heparan sulphate proteoglycans and the normal sulphation of cell associated sulphated molecules such as HSPG are key parameters for the positive regulation of lactoferrin activity in breast cancer cells. In fact, lactoferrin binds cell surface sulphated molecules in particular heparan sulphate proteoglycans which are involved in the binding to high affinity class sites. Consequently, these proteoglycans may control the modulation by lactoferrin of the cell proliferation and cancer progression induced. Therefore further investigations are needed to confirm their potential significance in the development of chemotherapeutic agents for the treatment of mammary cancer.

Acknowledgements

We thank the University Hospital of Gent, Dpt. of Experimental Cancerology (Pr. Mareels), for providing the MDA-MB-231 cell line and the Etablissement de Transfusion Sanguine (Director : Dr. J.J. Huart) Lille, France, for the citrated blood of healthy donors. This work was supported in part by the CNRS (Unité Mixte de Recherche n° 111, Relations Structure / Fonction des Constituants Membranaires, Pr. A. Verbert), Université des Sciences et Technologies de Lille, by the Ministère de l'Education Nationale and by a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer (Contract n° 3040).

References

[1] Baeuerle, P.A., W.B. Huttner: Chlorate—a potent inhibitor of protein sulfation in intact cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. **141**, 870-877 (1986).

[2] 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).

[3] Bøyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Invest. **21**, 77-89 (1968).

[4] Chandrasekaran, E.V., E.A. Davidson: Glycosaminoglycans of normal and malignant cultured human mammary cells. Cancer Res. **39**, 870-880 (1979).

[5] Damiens, E., J. Mazurier, I. El Yazidi, M. Masson, I. Duthille, G. Spik, Y. Boilly-Marer: Effects of human lactoferrin on NK cell cytotoxicity against haematopoietic and epithelial tumour cells. Biochim. Biophys. Acta **1402**, 277-287 (1998).

[6] Delehedde, M., E. Deudon, B. Boilly, H. Hondermarck: Heparan sulfate proteoglycans play a dual role in regulating fibroblast growth factor-2 mitogenic activity in human breast cancer cells. Exp. Cell. Res. **229**, 398-406 (1996).

[7] Delehedde, M., E. Deudon, B. Boilly, H. Hondermarck: Production of sulfated proteoglycans by human breast cancer cell lines: binding to fibroblast growth factor-2. J. Cell Biochem. **64**, 605-617 (1997).

[8] El Yazidi, I., Y. Boilly-Marer: Production of acidic and basic fibroblast growth factor by the hormone-independent breast cancer cell line. Anticancer Res. **15**, 783-790. (1995)

[9] Gallagher, J.T., M. Lyon, W.P. Steward: Structure and function of heparan sulfate proteoglycans. Biochem. J. **236**, 313- 325 (1986).

[10] Gallagher, J.T.: Heparan sulphates as membrane receptors for the fibroblast growth factors. Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **32**, 239-247 (1994).

[11] Ismail, M., J.H. Brock: Binding of lactoferrin and transferrin to the human promonocytic cell line U937. J. Biol. Chem. **268**, 21618-21625 (1993).

[12] Klagsbrun, M.: The affinity of fibroblast growth factors (FGFs) for heparin; FGF-heparan sulfate interactions in cells and extracellular matrix. Curr. Opin. Cell Biol. **2**, 857-863 (1990).

[13] Legrand, D., P.H.C. van Berkel, V. Salmon, H.A. van Veen, M.C. Slomianny, J.H. Nuijens, G. Spik: The N-terminal Arg^2, Arg^3 and Arg^4 of human lactoferrin interact with

sulphated molecules but not with the receptor present on Jurkat human lymphoblastic T-cells. Biochem. J. **327**, 841-846 (1997).

[14] 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).

[15] Mann, D.M., E. Romm, M. Migliorini: Delineation of the glycosaminoglycan-binding site in the human inflammatory response protein lactoferrin. J. Biol. Chem. **269**, 23661-23667 (1994).

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

[17] Mazurier, J., G. Spik: Comparative study of the iron-binding properties of human transferrins. I. Complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactotransferrin. Biochim. Biophys. Acta **629**, 399-408 (1980).

[18] 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).

[19] Miao, H.Q., R. Ishai-Michaeli, R. Atzmon, T. Peretz, I. Vlodavsky: Sulfate moieties in the subendothelial extracellular matrix are involved in basic fibroblast growth factor sequestration, dimerization, and stimulation of cell proliferation. J. Biol. Chem. **271**, 4879-4886 (1996).

[20] Mikogami, T., T. Marianne, G. Spik: Effect of intracellular iron depletion by picolinic acid on expression of the lactoferrin receptor in the human carcinoma cell subclone HT29-18-C1. Biochem. J. **308**, 391-397 (1995).

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

[22] Pejler, G.: Lactoferrin regulates the activity of heparin proteoglycan-bound mast cell chymase: characterization of the binding of heparin to lactoferrin. Biochem. J. **320**, 897-903 (1996).

[23] Richard, C., J.P. Liuzzo, D. Moscatelli: Fibroblast growth factor-2 can mediate cell attachment by linking receptors and heparan sulfate proteoglycans on neighboring cells. J. Biol. Chem. **271**, 24188-24196 (1995).

[24] Rochard, E., D. Legrand, M. Lecocq, R. Hammelin, M. Crépin, J. Montreuil, G. Spik: Characterization of lactotransferrin receptors in epithelial cell lines from non-malignant

human breast, begnin mastopathies and breast carcinomas. Anticancer Res. **12**, 2047-2052 (1992).

[25] Roiron-Lagroux D., M. Amouric, J. Marvaldi, C. Figarella: Lactoferrin-binding sites at the surface of HT-29 D4 cells. Eur. J. Biochem. **186**, 367-373 (1989).

[26] Scatchard, G.: The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci. **51**, 660-672 (1949).

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

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

[29] Steinfeld, R., H. van Den Berghe, G. David: Stimulation of fibroblast growth factor receptor-1 occupancy and signaling by cell surface-associated syndecans and glypican. J. Cell Biol. **133**, 405-416 (1996).

[30] Wu, H.F., D.M. Monroe, F.C. Church: Characterisation of the glycosaminoglycan-binding protein region of lactoferrin. Arch. Biochem. Biophys. **317**, 85-92 (1995).

[31] Ziere G.J., M.K. Bijsterbosch, J.C. van Berkel: Lactoferrin uptake by the rat liver. J. Biol. Chem. **268**, 27069-27075 (1993).

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

III. CONCLUSION

L'analyse de la fixation de la lactoferrine radiomarquée par la méthode de Scatchard nous a permis de montrer que cette protéine se fixe spécifiquement à la surface des cellules MDA-MB-231 par l'intermédiaire de 2 classes de sites:

- des sites de faible affinité Kd ≈ 700 nM et de forte capacité n = 3.9. 10^6 sites/cellule,
- des sites plus faiblement représentés n = 4. 10^5 sites/cellule avec une affinité plus élevée Kd = 40 nM.

Les capacités d'interaction de la lactoferrine avec les GAGs majoritairement représentés à la surface des cellules MDA-MB-231 ont alors été étudiées après digestion enzymatique. Nous avons ainsi pu montrer que la destruction spécifique des chaînes d'héparane sulfate par l'héparinase I réduit la fixation de la lactoferrine de l'ordre de 65% sur les sites de basse affinité et provoque une diminution de l'affinité pour la lactoferrine des sites de plus haute affinité. Par contre, une digestion des GAGs par la chondroïtinase ABC ne modifie en rien la fixation de la lactoferrine sur ces cellules. L'utilisation d'un inhibiteur de la sulfatation nous a ensuite permis d'étudier le rôle de la sulfatation des GAGs dans l'interaction de la lactoferrine avec les cellules MDA-MB-231. Il s'avère que la diminution de la sulfatation des GAGs réduit la fixation de la lactoferrine aux sites de basse affinité et diminue l'affinité des sites de plus haute affinité pour la lactoferrine.

Par ces différents résultats, nous avons clairement mis en évidence le rôle des GAGs de type héparane sulfate et de leur sulfatation dans la fixation de la lactoferrine sur les cellules épithéliales mammaires cancéreuses MDA-MB-231.

Nous avons précédemment montré que la lactoferrine possède une activité anti-tumorale. Elle agit en sensibilisant les cellules cancéreuses à la lyse par les cellules NK et en inhibant directement leur capacité à proliférer. Dans ce présent travail, nous avons montré que le traitement des cellules MDA-MB-231 par l'héparinase I ou le chlorate de sodium réduit significativement la sensibilisation par la lactoferrine des cellules cibles à la lyse et l'activité anti-proliférative de la lactoferrine.

L'ensemble de ces résultats suggère que les chaînes de GAGs de type héparane sulfate jouent un rôle important dans la modulation de la fixation de la lactoferrine sur les cellules MDA-MB-231 et donc dans l'activité biologique de la lactoferrine sur ces cellules.

Conclusion Générale

Le cancer est une maladie du présent et restera manifestement une maladie de l'avenir. La mortalité par cancer n'a pas diminué de façon significative depuis plusieurs décennies. Quant aux résultats obtenus dans le traitement des cancers les plus fréquents, ils plafonnent ou ne s'améliorent que lentement. En effet, le développement tumoral est la conséquence de processus complexes au niveau de la tumeur mais également au niveau des interactions entre la tumeur et le système immunitaire de l'hôte. La mise au point de thérapeutiques efficaces est donc délicate et nécessite l'exploration et la mise en place d'approches innovatrices permettant la découverte de molécules d'activité certes parfois modeste, mais néanmoins réelle et utile.

Au cours de ces dernières années, la recherche fondamentale a ouvert d'importantes perspectives avec notamment la découverte des oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeurs et des cytokines anti-tumorales. Ces avancées suggèrent de nouvelles cibles et approches moléculaires pour lesquelles la traduction pharmaceutique est en cours. Ainsi, plusieurs objectifs ont été fixés dans le traitement du cancer, les principaux étant d'augmenter la réponse immune contre les cellules tumorales, de normaliser le cycle cellulaire ou encore d'empêcher l'angiogenèse.

Or, pour la lactoferrine une activité anti-tumorale et anti-métastasique a été évoquée dans de nombreux travaux réalisés *in vivo* et *in vitro*. Le mécanisme d'action de l'effet anti-tumoral de la lactoferrine n'est pas encore connu cependant deux hypothèses ont été retenues pour le définir :

- La lactoferrine agirait en modulant l'activité cytotoxique des cellules effectrices de l'immunité naturelle et en particulier des cellules NK.
- La lactoferrine induirait une modification du comportement cellulaire provoquant ainsi une sensibilisation à la lyse des cellules cibles sensibles.

Afin d'élargir nos connaissances sur l'activité anti-tumorale de la lactoferrine humaine, nous avons analysé son effet sur la cytolyse de cellules tumorales de différentes origines (hématopoïétiques, épithéliales mammaires ou coliques) par une population lymphocytaire enrichie en cellules NK. Les conclusions que nous pouvons tirer de nos travaux sont les suivantes:

- **La lactoferrine se fixe sur les cellules NK et module leur activité cytotoxique en fonction de sa concentration.**

La lactoferrine interagit avec la très grande majorité de la population NK composée de cellules $CD56^{dim}$ responsables de l'ADCC et d'une minorité de cellules $CD56^{bright}$ assurant

pour une grande part l'activité cytotoxique spontanée. La fixation de la lactoferrine apparaît cependant plus importante sur les cellules $CD56^{bright}$ que sur les cellules $CD56^{dim}$.

Nous avons également montré que la lactoferrine module l'activité cytotoxique des cellules NK. Pour observer cet effet, les cellules NK doivent être prétraitées avec la lactoferrine longtemps (12 h) avant la réalisation du test de cytotoxicité suggérant que la lactoferrine induit un signal de transduction activant à terme la transcription d'un ou plusieurs gènes tardifs conduisant à une réponse lente des cellules au stimulus.

Cette modulation de l'activité cytotoxique des cellules NK par la lactoferrine dépend de sa concentration. En effet, nous avons constaté qu'à faible concentration (10-25 µg/ml), la lactoferrine stimule l'activité cytotoxique des cellules NK. Cette stimulation reste néanmoins modeste si on la compare à celle induite par une molécule telle que l'IL-2. A forte concentration (50-100 µg/ml), nous avons par contre observé une diminution de l'activité cytotoxique des cellules NK. Il est possible qu'à ces concentrations, la lactoferrine soit toxique pour une partie de la population en particulier pour les cellules $CD56^{bright}$. En effet, après coloration au bleu Trypan, nous avons constaté que la viabilité des cellules effectrices en présence de concentrations élevées de lactoferrine est diminuée en moyenne de 10% par rapport à la population témoin.

- **La lactoferrine sensibilise les cellules cibles à la lyse par les cellules NK en fonction de leur phénotype.**

La lactoferrine se fixe sur un grand nombre de cellules d'origines différentes et son devenir après fixation sur ces cellules varie selon le type cellulaire. Ces observations nous ont logiquement amené à penser que la lactoferrine pouvait avoir des effets cellules- voire tissus-spécifiques. En effet, comme Shau et coll. (1992), nous n'avons pas constaté de variation de sensibilité à la lyse pour les cellules des lignées hématopoïétiques K-562 et Jurkat. Par contre, nous avons montré pour la première fois que la lactoferrine humaine augmente la sensibilité à la lyse des cellules des lignées d'origine épithéliale mammaire HBL-100, MCF-7 et MDA-MB-231 ou colique HT29-18-C1.

- **La lactoferrine inhibe la prolifération des lignées cellulaires épithéliales mammaires et colique.**

Cette différence d'effets sur la sensibilité pourrait s'expliquer par une action de la lactoferrine sur le comportement cellulaire en fonction du phénotype. En effet, il n'a pas été

décrit d'effet de la lactoferrine sur la prolifération des lignées de cellules hématopoïétiques dans les conditions normales de culture. Par contre un effet antimitogène de la lactoferrine bovine sur des cellules mammaires bovines a été déjà évoqué par Rejman et coll. (1992) et Hurley et coll. (1994).

Cette hypothèse est probable puisque, dans notre étude, la lactoferrine ne semble pas modifier la morphologie ni la croissance des cellules cancéreuses hématopoïétiques. Par contre, nous avons observé une inhibition de la prolifération des cellules des lignées épithéliales mammaires et coliques précédemment citées. L'inhibition de prolifération de ces lignées cellulaires épithéliales augmente avec la concentration de lactoferrine. Elle n'est pas liée à un phénomène toxique de la lactoferrine conduisant à une nécrose ou à l'apoptose de ces cellules mais à un blocage du cycle cellulaire.

Ces résultats ajoutés aux nombreux travaux ayant montré que l'expression de la lactoferrine est réprimée dans certaines formes de cancers (en particulier les adénocarcinomes mammaires) suggèrent que la lactoferrine pourrait jouer un rôle *in vivo* dans le contrôle du développement de ces cancers.

- **La lactoferrine inhibe l'activité des Cdks de la phase G1 et de la transition G1/S du cycle cellulaire par l'intermédiaire d'un inhibiteur de Cdks $p21^{CIP1/WAF1}$.**

Nous avons en effet démontré que l'effet anti-prolifératif de la lactoferrine sur certains types cellulaires résulte de l'induction d'un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines $p21^{CIP1/WAF1}$. $p21^{CIP1/WAF1}$, induit par la lactoferrine, s'associe au complexe cycline D/Cdk4 et inhibe sa capacité à phosphoryler la protéine Rb. La protéine Rb hypophosphorylée empêche la libération des facteurs de transcription de la famille E2F nécessaires à l'expression de gènes requis par la transition G1/S et la phase S du cycle cellulaire tels que le gène de la cycline E. Nous avons en effet observé une diminution d'expression de la cycline E et de sa sous-unité catalytique Cdk2 s'accompagnant d'une réduction de leur activité enzymatique dans les cellules traitées par la lactoferrine. Cette cascade d'événements aboutit à terme à l'arrêt du cycle cellulaire par inhibition de l'entrée en phase S.

La synthèse de $p21^{CIP1/WAF1}$ dépend en partie de la fonction du suppresseur de tumeur p53. En effet, le gène p21 a été initialement identifié comme l'un des gènes cibles de p53. Cependant, dans certains types cellulaires, l'induction de $p21^{CIP1/WAF1}$ peut être indépendante de p53 et jouer également un rôle très important dans l'arrêt du cycle cellulaire. Dans le cas de

la lactoferrine, il apparaît que l'induction de $p21^{CIP1/WAF1}$ est indépendante de p53. En effet, la lactoferrine induit l'expression de $p21^{CIP1/WAF1}$ dans les cellules MDA-MB-231 dont la p53 mutée est non fonctionnelle et dans les cellules HBL-100 et MCF-7 (p53 sauvage). Dans les cellules HBL-100 et MCF-7, nous n'avons pas constaté d'augmentation d'expression de p53 pouvant entraîner une forte induction du gène p21. Cette observation laisse à penser que même dans les cellules où la p53 est fonctionnelle, l'induction de $p21^{CIP1/WAF1}$ est également indépendante de p53.

- **Un équilibre adéquat entre le nombre de sites de haute affinité et de basse affinité semble nécessaire à l'obtention d'une activité biologique optimale de la lactoferrine sur les cellules d'adénocarcinome mammaire MDA-MB-231.**

Rochard et coll. (1992) ont montré que la lactoferrine interagit avec les cellules épithéliales mammaires MDA-MB-231. Les auteurs ont trouvé un site de fixation dont les paramètres semblent correspondre à un site de basse affinité pour la lactoferrine (Kd = 960 nM ; n = 4,8. 10^6). Or les effets de la lactoferrine sur ces cellules suggèrent l'existence d'un récepteur spécifique en plus de ces sites de basse affinité. Nous avons donc déterminé les paramètres de fixation de la lactoferrine sur les cellules MDA-MB-231 par la méthode de Scatchard. En utilisant une gamme de dilution de la ^{125}I-lactoferrine humaine plus étendue, en particulier sur les plus faibles concentrations, nous avons pu mettre en évidence 2 sites de fixation de la lactoferrine sur les cellules MDA-MB-231: un premier site de haute affinité et faible capacité (Kd = 45 nM ; n = 2,9 x 10^6) et un second site de basse affinité (Kd = 680 nM ; n = 3,9 x 10^6) dont les paramètres sont comparables à ceux trouvés par Rochard et coll. (1992).

Le site de basse affinité est constitué pour une grande part de molécules sulfatées en particulier d'héparane sulfate protéoglycannes. Les chondroïtine sulfate protéoglycannes n'interviennent pas, quant à eux, dans la fixation de la lactoferrine sur les cellules MDA-MB-231. Cette fixation spécifique de la lactoferrine sur les chaînes polysaccharidiques de l'héparine et des héparane sulfates a également été décrite par Pejler et coll. (1996). Ces héparine/héparane sulfates n'apparaissent pas nécessaires à la fixation de la lactoferrine sur les sites de haute affinité. Néanmoins leur présence permet une interaction de la lactoferrine avec son site de haute affinité avec une meilleure affinité. Ces sites de basse affinité pourraient jouer un rôle de réservoir pour la lactoferrine sur les cellules MDA-MB-231. Ils pourraient

ainsi permettre une meilleure présentation de la molécule aux sites de haute affinité et en conséquence un effet optimal de la lactoferrine sur ces cellules.

L'ensemble de nos travaux a donc permis de montrer que la lactoferrine présente un effet anti-tumoral complexe lié à la modulation des défenses naturelles de l'hôte et à une action anti-proliférative directe et tissu-spécifique.

- Afin d'approfondir cette étude, il serait intéressant de caractériser le récepteur de la lactoferrine sur les cellules NK. Son clonage ainsi que l'étude des voies de signalisation transmembranaires engagées par la fixation de la lactoferrine sur son récepteur devraient permettre de mieux comprendre l'effet biologique observé.
- Cette même étude sur les cellules tumorales sensibles à la lactoferrine devrait permettre de définir la voie de transduction conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire.
- Une étude systématique *in vitro* de l'effet de la lactoferrine en fonction de la dose demande à être poursuivie sur un large spectre de tumeurs et sur des cellules normales en culture primaire afin de déterminer l'activité (IC_{50}), la spécificité et la sélectivité d'action de la lactoferrine.
- Ces études *in vitro* devraient être confortées *in vivo* par des mesures simultanées de l'efficacité et de la toxicité de la lactoferrine en prenant en compte la bioactivité ou la biodégradation de la molécule en fonction des protocoles d'administration et des concentrations sanguines.

Ces différents travaux ont pour but d'évaluer l'intérêt de la lactoferrine notamment comme complément nutritionnel chez des patients sous chimiothérapie. L'apport de lactoferrine pourrait rendre certaines cellules tumorales plus sensibles et plus réceptives à la chimiothérapie.

Matériels et Méthodes

I. MATERIELS

I.1. LACTOFERRINE HUMAINE

I.1.1. *Préparation de la lactoferrine humaine*

La lactoferrine est préparée dans notre laboratoire selon le protocole établi par Chéron et coll. (1977) modifié par Spik et coll. (1982). Le lait est délipidé par centrifugation à 2000g et à 4°C pendant 45 min. La caséine est ensuite éliminée par précipitation à pH 4,6 avec de l'HCl 3 M. Après une dialyse de 72 h contre de l'eau distillée, le précipité est éliminé par une centrifugation à 2000g et à 4°C pendant 30 min. Le lactosérum est chromatographié sur une colonne SP-Sephadex C-50 stabilisée dans l'acétate de sodium 0,22 M. La colonne est lavée successivement avec des solutions d'acétate de sodium à 0,22 et 0,4 M. La lactoferrine est ensuite éluée avec une solution d'acétate de sodium 1 M. Cette étape de chromatographie est répétée une deuxième fois dans les mêmes conditions pour assurer une bonne purification de la lactoferrine. En dernier lieu, la fraction contenant la lactoferrine est chromatographiée sur une colonne de détoxigel (1,5 x 5 cm Pierce) équilibrée par une solution de bicarbonate d'ammonium. Après dialyse contre de l'eau distillée, la lactoferrine est lyophilisée.

I.1.2. *Préparation de la lactoferrine marquée sur ses glycannes par couplage avec la fluorescéine*

Cette méthode de marquage a été décrite par Leveugle et coll. (1993). Elle nécessite, dans un premier temps, l'oxydation périodique des résidus Neu Ac des glycannes de la lactoferrine humaine. Pour ceci, 5 mg de lactoferrine dissous dans 230 µl de phosphate de sodium 0,1 M pH 5,6 sont mélangés avec 100 µl de périodate de sodium 0,018 M et incubés à 4 °C pendant 10 minutes. La réaction est arrêtée par addition de 10 µl d'éthylène glycol. La solution est alors déssalée sur une colonne Sephadex G-25 équilibrée dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M, NaCl 0,15 M pH 7,4.

Dans un second temps, le marquage est réalisé en faisant réagir les fonctions aldéhydiques formées avec le {5-[((2-(carbohydrazino)méthyl)thio)acétyl] amino-fluorescéine} (HyF). La lactoferrine oxydée est incubée avec le réactif fluorescent (650 µg de HyF dans 10 µl de diméthylformamide) pendant 20 h à température ambiante. La solution est passée sur colonne Sephadex G-25 équilibrée dans le tampon PBS pH 7,4 contenant 5% (V/V) de butanol afin d'éliminer l'excès de réactif. Elle est ensuite dialysée contre du PBS pH 7,4.

Le nombre de molécules de HyF fixées par molécule de lactoferrine humaine est estimée à 1,5 par mesure de l'absorbance à 280 nm et à 495 nm selon la méthode de Jobbagy et Kiraly (1966).

I.1.3. *Préparation de la lactoferrine marquée à l'iode radioactif (^{125}I)*

Le marquage est réalisé en présence de catalyseur. L'iodogen (1, 3, 4, 6-tétrachloro-3a, 6a-diphényl glucoril, Pierce) est dissous dans du chloroforme à la concentration de 1 mg/ml. Des fractions de 100 µl sont réparties dans des tubes en verre enveloppés dans de l'aluminium et le chloroforme est éliminé par évaporation sous azote. Des fractions de 200 µg de lactoferrine à marquer sont dissoutes dans 500 µl de PBS pH 7,4 et déposées dans les tubes traités à l'iodogen en présence de 300 µCi d'iode (Na ^{125}I, Amersham, Les Ulis, France). La réaction s'effectue à 4°C pendant 10 min en agitant doucement toutes les 3 min.

L'iode libre est ensuite éliminé par passage de la solution sur une colonne Sephadex G-25 (2 x 15 cm, Pharmacia Biotech) préalablement saturée avec 500 µg de lactoferrine froide et équilibrée avec le PBS pH 7,4. Des aliquotes de 0,5 ml sont recueillies.

La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur gamma (LKB Wallac) et la concentration est déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm.

I.2. LIGNEES CELLULAIRES HEMATOPOÏETIQUES HUMAINES

- La lignée cellulaire K562 (ATCC) a été établie par Lozzio et Lozzio (1975) à partir d'une effusion pleurale d'une patiente atteinte de leucémie myéloïde chronique en phase aiguë. Les cellules de cette lignée sont très peu différenciées, cependant, grâce à l'identification de marqueurs de surface, cette lignée a été classée comme étant de type érythroleucémique (Andersson *et al.*, 1979). Les cellules K562 sont multipotentes. Elles sont capables de se différencier spontanément en progéniteurs érythrocytaire, granulocytaire et monocytaire (Lozzio *et al.*, 1981). Elles possèdent des récepteurs pour la lactoferrine (Garré *et al.*, 1992). Cette lignée est considérée comme étant l'une des plus sensible *in vitro* à la lyse par les cellules NK. Elle est donc utilisée en routine pour mesurer l'activité cytotoxique spécifique et naturelle (Ortaldo, 1977 ; Pross et Maroun, 1984).
- Jurkat est une lignée de cellules lymphoblastiques T humaines. Ces cellules présentent le phénotype CD3, $CD4^-$, $CD8^-$ (ECACC). Elles expriment des récepteurs de haute affinité pour la lactoferrine (Bi *et al.*, 1994).

I.3. CELLULES EPITHELIALES HUMAINES

I.3.1. *Lignée cellulaire épithéliale mammaire transformée*

HBL-100 est une lignée de cellules épithéliales mammaires humaines issues d'un individu sain. Ces cellules ont été immortalisées *in vivo* par intégration du génome du virus SV-40 administré par erreur au cours d'une vaccination contre la poliomyélite. Ces cellules, isolées par Gaffney et ses associés à partir du lait de femme, présentent un caryotype anormal malgré l'absence de lésions mammaires bénigne ou maligne. Elles possèdent des récepteurs permettant la fixation de la lactoferrine (Rochard *et al.*, 1992).

Les cellules HBL-100 ne sont pas tumorigènes chez la souris BALB/c immunodéprimée (souris nude). Elles forment cependant des colonies en agar mou (Caron de Fromentel *et al.*, 1985). La lignée HBL-100 nous a été généreusement offerte par le Pr. Crépin (Paris).

I.3.2. *Lignées cellulaires épithéliales mammaires cancéreuses*

- MDA-MB-231 est une lignée cellulaire établie à partir d'une effusion pleurale d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome métastasique du sein. Cette lignée se caractérise par une morphologie de cellules épithéliales et possède un nombre de chromosomes hypotriploïdes (67 en moyenne) (Cailleau *et al.*, 1974).

  Les cellules MDA-MB-231 n'expriment pas de récepteurs pour les oestrogènes, la progestérone et la prolactine. Elles possèdent par contre des récepteurs pour la lactoferrine (Rochard *et al.*, 1992). Chez la souris nude, les cellules MDA-MB-231 sont tumorigènes et forment des métastases.

- MCF-7 est une lignée établie à partir d'une effusion pleurale d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome du sein de type canalaire invasif (Soule *et al.*, 1973). Le nombre de chromosomes varie entre les formules hypertriploïdes et hypotétraploïdes. Cette lignée a conservé certaines caractéristiques d'épithélium mammaire différencié. Ainsi, les cellules MCF-7 présentent des récepteurs de haute affinité pour les hormones stéroïdiennes telles que les oestrogènes, la progestérone et les glucocorticoïdes (Brooks *et al.*, 1973 ; Lippman *et al.*, 1976, 1977 ; Horwitz *et al.*, 1978). Ces cellules possèdent également des récepteurs pour la lactoferrine (Rochard *et al.*, 1992).

I.3.3. *Lignée cellulaire épithéliale de colon*

La lignée cellulaire HT29 a été isolée par Fogh en 1964 à partir d'une tumeur primaire d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome de colon humain. Les cellules de cette lignée se caractérisent par un nombre de chromosomes hypertriploïdes, une morphologie de cellules épithéliales, mais elles ne présentent pas les caractéristiques de différenciation des cellules intestinales lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu standard contenant du glucose. Cependant des phénotypes semblables à ceux des entérocytes et des cellules caliciformes peuvent apparaître dans les cultures en monocouche de cellules HT29 lorsque le glucose est substitué par le galactose et l'inusine ou l'uridine utilisée comme source de carbone (Pinto *et al.*, 1982 ; Wice *et al.*, 1985) ou même en absence de ces additifs (Zweibaum *et al.*, 1985). L'hétérogénéité de la lignée cellulaire HT29 a conduit à l'isolement de différents clones et sous-clones. Huet et coll. (1987) ont ainsi isolé le clone HT29-18.

Le sous-clonage des cellules HT29-18 différenciées par dilution limite et réensemencement dans un milieu contenant du glucose a permis l'obtention du clone HT29-18-C1 dont les cellules possèdent un phénotype d'entérocyte.

II. METHODES

II.1. CULTURE CELLULAIRE

II.1.1. *Culture des lignées hématopoïétiques*

Les cellules K562 et Jurkat sont cultivées en milieu RPMI 1640 (Gibco-BRL) enrichi de 10% de SVF décomplémenté, 2 mM de L-glutamine (Eurobio), et de la gentamycine (50 µg/ml) (Gibco-BRL).

Les cellules sont maintenues en phase exponentielle de croissance à la densité de 2.10^5 à 1.10^6 cellules/ml, dans une étuve humidifiée maintenue à 37°C et une atmosphère enrichie de 5% de CO_2.

II.1.2. *Culture des lignées mammaires transformée et cancéreuses*

Les cellules épithéliales immortalisées HBL-100 ainsi que les cellules cancéreuses MCF-7 et MDA-MB-231 sont cultivées en boîte 25 cm^2 ou 75 cm^2 (Falcon) dans un milieu composé de MEM (Milieu essentiel minimum de Eagle's avec sels de Earle) (Eurobio) ou dans certains cas pour les cellules MDA-MB-231 du milieu DMEM (Gibco-BRL)

complémenté avec 10% de SVF décomplémenté, 1% d'acides aminés non essentiels (Eurobio), 2 mM de L-glutamine, 5 µg/ml d'insuline (Endopancrine, Organon) et de la pénicilline (40 UI/ml) et de la streptomycine (40 µg/ml) (Gibco-BRL). Le milieu est ajusté à pH 7,4 avec de l'HEPES (25 mM), et 0,22% de bicarbonate de sodium. Les cellules sont incubées à 37°C en atmosphère humidifiée et enrichie de 5% de CO_2.

Lorsque les cellules sont à confluence, le milieu de culture est éliminé et les cellules fixées sont rincées avec du PBS stérile pH 7,4 afin d'éliminer les traces de sérum. Les cellules sont ensuite incubées en présence de 1 à 2 ml de trypsine/EDTA (Versène) solution 1X (Eurobio). Lorsqu'elles sont décollées, l'action de la trypsine est stoppée en ajoutant 5 ml de milieu complet. Les cellules sont ensuite réensemencées au 1/10 de la confluence dans de nouvelles boîtes de culture en présence de milieu complet.

II.1.3. *Culture de la lignée cellulaire de colon HT29-18-C1*

Les cellules HT29-18-C1 sont cultivées en boîte de 25 cm^2 dans un milieu DMEM dépourvu de pyruvate et contenant 25 mM de glucose, 2 mM de L-glutamine, 10% de sérum de veau foetal et 50 µg/ml de gentamycine (Gibco-BRL). Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide enrichie de 10% de CO_2. Le milieu est changé chaque jour. Lorsque les cellules sont à confluence, les cellules sont décollées et divisées comme précédemment cité pour les lignées mammaires transformées et cancéreuses.

II.2. ANALYSE DE L'EFFET ANTIPROLIFERATIF DE LA LACTOFERRINE SUR LES CELLULES EPITHELIALES

La prolifération cellulaire est évaluée par la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée. Les cellules épithéliales sont ensemencées à la densité de 4.10^4 cellules par 500 µl de milieu par puits dans une plaque 12 puits (Corning).

Le test est réalisé sur des cellules subconfluentes synchronisées ou non par un sevrage de 24 h avec le milieu DMEM contenant 2 mM L-glutamine, 1% d'acides aminés non essentiels, 20 mM d'HEPES et 0,22% de bicarbonate de sodium. Les cellules sont ensuite placées pendant 24 h dans un milieu de sevrage contenant la lactoferrine aux concentrations de 0, 10, 25, 50, 100 µg/ml. La (méthyl-^{3}H) thymidine (ICN Biomedical, Irvine, USA) est ajoutée à raison de 2 µCi par puits 4 h avant la fin du test.

L'incorporation de thymidine tritiée est stoppée en éliminant le milieu et en rinçant les cellules avec du PBS pH 7,4. Les cellules sont ensuite fixées à l'acide trichloracétique 5%

pendant 45 min à 4°C. Elles sont rincées à l'eau courante et les puits sont séchés à la trompe à vide. Enfin les cellules sont lysées dans 500 µl d'une solution de NaOH 0,3 M pendant 1 h à 37°C.

Le contenu de chaque puits est transféré dans une fiole à scintillation contenant 2,5 ml de liquide scintillant (Aqualite, Baker). La radioactivité de chaque puits est mesurée à l'aide d'un compteur β (Beckman, Fullerton).

II.3. PREPARATION DE LA POPULATION LYMPHOCYTAIRE EFFECTRICE

II.3.1. *Séparation de la population lymphocytaire totale*

L'isolement de la population lymphocytaire est réalisé selon la technique décrite par Boyum (1976). Le sang prélevé stérilement sur citrate de sodium est dilué au demi avec du PBS pH 7,4 stérile et dépourvu de calcium. Dans un tube de 50 ml (Falcon), un volume de 25 ml de sang dilué est déposé délicatement sur 15 ml de lymphoprep (Dominique Dutscher sa). Après 30 min de centrifugation à 2500 tr/min et à température ambiante, les cellules mononucléées qui forment un anneau dense sont recueillies à l'aide d'une pipette en plastique. Ces cellules sont lavées 2 fois avec 10 ml de PBS pH 7,4 et centrifugées à 1100 tr/min pendant 10 min à température ambiante. Elles sont ensuite resuspendues à la densité de 2.10^6 cellules/ml dans le milieu RPMI 1640 tamponné à pH 7,4 avec 25 mM Hepes, 20 mM de bicarbonate de sodium et enrichi avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté, 2 mM L-glutamine, 50 µg/ml de gentamycine.

Des fractions de 15 ml de suspension cellulaire sont incubées en boîte de culture 75 cm^2 à 37°C sous une atmosphère enrichie de 5% de CO_2 pendant 45 min.

Cette étape permet de séparer les monocytes des lymphocytes en se basant sur la propriété d'adhérence des monocytes sur support plastique. La population lymphocytaire totale non adhérente est alors recueillie.

II.3.2. *Enrichissement de la population lymphocytaire effectrice en cellules NK $CD3^-$, $CD20^-$, $CD56^+$.*

Les cellules NK sont isolées par immunocytoadhérence. Cette technique repose sur la capacité des anticorps à se fixer sur des surfaces de polystyrène.

Après fixation sur le plastique, les anticorps sont capables d'interagir avec l'antigène spécifique exprimé à la surface des différents types de lymphocytes. Ils permettent ainsi d'isoler de façon sélective une sous-population cellulaire.

Cette méthode permet aussi bien de réaliser une sélection positive (population adhérente) qu'une sélection négative (population non adhérente).

Les anticorps anti-CD3 (dirigés contre la population lymphocytaire T) (Immunotech) ou anti-CD20 (dirigés contre la population lymphocytaire B) (Immunotech) sont dilués dans un tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 9,5 à la concentration de 0,5 µg/ml. La solution d'anticorps est déposée dans une boîte de Pétri de façon à ce que le fond de la boîte soit entièrement recouvert de liquide (soit 7 ml pour une boîte 100 x 20 mm, Corning).

Après incubation 2 h à température ambiante, l'excès d'anticorps non fixés est éliminé par aspiration. La suspension lymphocytaire totale est alors déposée dans la boîte à raison de 10 ml par boîte à la densité de 1.10^6 cellules/ml.

A la fin des 25 min d'incubation, les cellules $CD3^-$, $CD20^-$ non adhérentes sont récupérées par aspiration. Cette étape d'immunocytoadhérence est répétée 2 fois afin d'obtenir un enrichissement en cellules NK de l'ordre de 90%.

II.4. TEST DE CYTOTOXICITE

II.4.1. *Principe*

L'activité cytotoxique des cellules NK est quantifiée par le test de libération du ^{51}Cr par les cellules cibles lysées. Les cellules cibles mammaires ou hématopoïétiques sont marquées avec du chromate de sodium ($Na_2{}^{51}CrO_4$) se fixant sur une gamme de protéines de poids moléculaires variés. Il est à noter que lors de sa fixation aux cellules le ^{51}Cr change de valence et ainsi, lorsqu'il est libéré dans le surnageant, il ne peut être incorporé dans d'autres cellules (Brunner *et al.*, 1968).

II.4.2. *Marquage des cellules cibles*

α. *Cellules hématopoïétiques*

Les cellules hématopoïétiques en culture sont prélevées et centrifugées à 1200 tr/min pendant 5 minutes. Elles sont reprises à raison de 2.10^5 cellules dans 100 µl de RPMI 1640 complémenté et incubées 6 h à 37°C en présence de 20 µCi de ^{51}Cr ($Na_2{}^{51}CrO_4$, ICN

Biomedical) dans une atmosphère enrichie de 5% de CO_2. A la fin du marquage, les cellules sont lavées pour éliminer l'excès de radioactivité et sont remises en suspension à 5.10^4 cellules/ml. Elles sont alors réparties dans une plaque 96 puits à fond rond (Nunc).

β. *Cellules épithéliales mammaires*

Les cellules épithéliales sont décollées au versène puis sont centrifugées et reprises à la densité de 5.10^5 cellules/ml. Elles sont alors réparties dans une plaque 96 puits à fond plat (Nunc) à raison de 5000 cellules/puits. Lorsque les cellules ont adhéré au plastique, 1 µCi de ^{51}Cr repris dans 20 µl de milieu est ajouté dans chaque puits pour 6 h à 37°C dans une atmosphère humidifiée et enrichie de 5% de CO_2. Après incubation, le surnageant contenant le ^{51}Cr non incorporé est éliminé par aspiration. Les cellules fixées sont lavées 3 fois avec du milieu de culture et replacées ensuite dans 100 µl de milieu.

II.4.3. *Cytolyse*

Des suspensions lymphocytaires sont préparées aux densités de 2.10^5 et 4.10^5 cellules/100 µl de milieu RPMI 1640 complémenté. Elles sont ajoutées aux cellules cibles (5000 cellules/puits) marquées de façon à obtenir des rapports lymphocytes/cellules cibles de 5 :1, 10 :1, 20 :1, 40 :1, 80 :1. Dans chaque puits, le volume final est ajusté à 200 µl en ajoutant du milieu RPMI 1640 complémenté.

En parallèle sont réalisés : - Un témoin minimum correspondant à la lyse spontanée observée en incubant 5000 cellules cibles pendant la durée du test dans 200 µl de milieu RPMI complémenté.

- Un témoin maximum obtenu en incubant 5000 cellules cibles en présence de 2% de Triton X-100 dans 200 µl de milieu RPMI 1640 complémenté.

Chaque expérience est réalisée en triplicate. Après incubation sur la nuit à 37°C en atmosphère enrichie de 5% de CO2, la radioactivité libérée dans le surnageant est évaluée au compteur γ (Compugamma 1282 LKB Wallac).

Le pourcentage de cytolyse est obtenu par le rapport :

$$\frac{\text{Cpm test - cpm témoin minimum}}{\text{Cpm témoin maximum -cpm témoin minimum}} \times 100$$

II.4.4. *Conditionnement des cellules effectrices et des cellules cibles avant le test de cytolyse*

Afin d'étudier l'action de la lactoferrine sur la cytolyse, l'activité cytotoxique des cellules NK et la sensibilité à la lyse des cellules cibles, différents protocoles de traitement ont été définis :

α. *Addition de la lactoferrine au milieu d'incubation*

L'action globale de la lactoferrine est appréciée en réalisant la cytolyse en présence de lactoferrine. Pour les cellules mammaires, après lavage des puits pour éliminer l'excès de radioactivité non incorporée dans les cellules, 100 µl de milieu RPMI complet additionné de 10 ou 100 µg/ml de lactotransferrine sont répartis dans chaque puits. La population lymphocytaire est ensuite ajoutée suivant les différents rapports indiqués précédemment.

En ce qui concerne les cellules hématopoïétiques non adhérentes, la lactoferrine est ajoutée dans la suspension de cellules cibles juste avant la répartition dans la plaque 96 puits.

β. *Prétraitement des cellules effectrices avec la lactoferrine*

L'effet de la lactoferrine sur l'activité cytotoxique des cellules effectrices est évaluée en incubant la population lymphocytaire pendant 12 h avant le test de cytolyse, à raison de 1.10^6 cellules/ml, en présence de 10, 25, 50, 100 µg/ml de lactoferrine. Après cette incubation, les cellules sont lavées avec du RPMI complet pour éliminer l'excès de lactoferrine et ajoutées aux cellules cibles suivant les différents rapports précédemment indiqués.

γ. *Prétraitement des cellules cibles avec la lactoferrine*

L'incubation des cellules cibles avec la lactoferrine permet de déterminer son effet sur la sensibilité à la lyse de ces cellules. Les cellules hématopoïétiques (2.10^5 cellules pour 100 µl de milieu) sont incubées avec 10 et 100 µg/ml de lactoferrine pendant 12 h avant le test de cytolyse. Elles sont marquées en ajoutant 20 µCi de ^{51}Cr pendant les 5 dernières heures de prétraitement. Les cellules sont ensuite lavées avec le milieu pour éliminer l'excès de lactoferrine et de radioactivité et sont réparties à raison de 5000 cellules/puits dans 100 µl de milieu.

En ce qui concerne les cellules mammaires, la lactoferrine est ajoutée aux concentrations de 10 , 25, 50, 100 µg/ml au milieu de culture au moment de la mise en plaque des cellules. L'incubation est maintenue 12 h à 37°C en atmosphère humidifiée et enrichie de

5% de CO_2. Dans certains cas la lactoferrine est ajoutée aux cellules fixées 6 h avant le début du test de cytolyse.

Après le marquage au ^{51}Cr, les cellules sont lavées pour éliminer l'excès de lactoferrine et de ^{51}Cr. Le test de cytolyse est alors effectué dans le milieu RPMI 1640 complémenté en ajoutant la population lymphocytaire aux différents rapports précédemment cités.

δ. *Prétraitement des cellules cibles avec le chlorate de sodium*

Ce test a été réalisé en particulier sur les cellules épithéliales MDA-MB-231 dont la matrice extracellulaire est riche en protéoglycannes.

La fixation de la lactoferrine aux protéoglycannes a été précédemment décrite. Afin d'étudier l'influence des protéoglycannes dans l'activité de la lactoferrine, les cellules sont traitées au chlorate de sodium. Le chlorate de sodium est un inhibiteur de l'ATP sulfurylase. Il empêche la formation de phosphoadénosine phosphosulfate qui est le donneur actif de groupements sulfatés pour la sulfotransférase (Baeuerle et Huttner, 1986).

Après fixation en plaque 96 puits, les cellules sont lavées avec du milieu de sevrage constitué de milieu DMEM complémenté avec 2 mM de L-glutamine, 1% d'acides aminés non essentiels, 0,5% SAB, 25 mM d'Hepes, 0,22% de bicarbonate de sodium. Elles sont ensuite placées 24 h dans le milieu de sevrage enrichi de 30 mM de chlorate de sodium (Sigma). Le test de cytolyse est également réalisé en milieu RPMI 1640 enrichi de 30 mM de chlorate de sodium.

ε. *Prétraitement des cellules cibles avec l'héparinase I ou la chondroïtinase ABC*

Lorsque les cellules épithéliales ont adhéré dans les puits des plaques 96 puits, elles sont lavées avec le milieu de sevrage précédemment indiqué. Les cellules sont ensuite placées en milieu de sevrage contenant 0,1 UI/ml d'héparinase I (Sigma) ou 0,1 UI/ml de chondroïtinase ABC (Sigma) 10 h avant le test de cytolyse (soit 4 h avant l'ajout de la lactoferrine), en atmosphère humidifiée, enrichie de 5% de CO_2 et maintenue à 37°C.

Les cellules sont marquées au ^{51}Cr en même temps que le traitement enzymatique. A la fin du traitement, elles sont lavées et placées en milieu RPMI 1640 complet pour le test de cytolyse.

II.5. CONTROLE DE L'EFFICACITE DES TRAITEMENTS IN SITU PAR LES ENZYMES DE DEGRADATION DES PROTEOGLYCANNES OU PAR LE CHLORATE DE SODIUM

Les cellules MDA-MB-231 en phase exponentielle de croissance (60-70% de confluence) sont incubées pendant 24 h en présence ou non de 30 mM de chlorate de sodium dans le milieu de sevrage contenant 0.5% SAB et 25 µCi/ml de $Na_2{}^{35}SO_4$ (Amersham). L'héparinase I et/ou la chondroïtinase ABC sont ajoutées à la concentration de 0,1 UI/ml 8 h avant l'extraction des protéoglycannes. Le milieu de culture est éliminé à la fin de la période d'incubation et les cellules sont rincées 3 fois par 5 ml de PBS pH 7,4. Les cellules sont ensuite décollées par grattage et lysées dans 3 ml de tampon de dissociation pH 5,8 (4 M de chlorure de guanidine, 50 mM d'acétate de sodium, 10 mM EDTA, 0,1 mM PMSF, 50 µg/ml de leupeptine (Sigma), 200 µM d'aprotinine (Sigma), 0,3% de Triton X-100). Les lysats cellulaires sont placés sous agitation à 4°C pendant 12 h. La quantité de protéines est évaluée par dosage à l'aide du kit Micro BCA (Pierce). Les extraits cellulaires sont ensuite dilués 40 fois à l'aide d'un tampon de dilution pH 7,4 (10 mM Tris-HCl, 0.3% Triton X-100, 10 mM EDTA, 0,1 mM PMSF, 50 µg/ml de leupeptine, 200 µM d'aprotinine) afin que la concentration en sels soit inférieure à la molarité du tampon d'équilibration de la colonne (0,1 M NaCl).

Les échantillons sont déposés sur des colonnes DEAE-Sephacel (Pharmacia LKB Biotechnology) (1 cm) équilibrées dans un tampon pH 7,4 (50 mM Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 0,3% Triton X-100). Les colonnes sont ensuite rincées à l'aide d'un tampon pH 7,4 (50 mM Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 0,5% CHAPS (Sigma)) afin d'éliminer le sulfate libre et les glycoprotéines sulfatées.

L'élution est réalisée à 0,9 ml/min par un gradient discontinu de NaCl (0,15, 0,3, 0,6, 1, 1,5 M) en présence de 50 mM Tris-HCl, 0,5% CHAPS, pH 7,5. Des fractions de 1 ml sont collectées et des aliquotes de 100 µl sont prélevées pour la détermination de la radioactivité des échantillons à l'aide d'un compteur β (Beckman).

II.6. DETERMINATION DES PARAMETRES DE FIXATION DE LA LACTOFERRINE SUR LES CELLULES EPITHELIALES MAMMAIRES MDA-MB-231

Les cellules sont mises en culture en plaque 12 puits à la densité de 2.10^4 cellules/ml de milieu et par puits.

Le test de fixation est réalisé lorsque les cellules sont à confluence (4.10^5 cellules/puits). Les cellules sont alors lavées 3 fois avec du milieu de sevrage puis incubées avec des concentrations croissantes de lactoferrine marquée (^{125}I) dans un milieu de sevrage contenant 0,2% de SAB.

La fixation non spécifique est évaluée en incubant les cellules en présence de lactoferrine marquée et 100 excès molaire de lactoferrine non marquée.

A la fin de l'incubation, une aliquote (60 µl) de surnageant est prélevée afin de déterminer la quantité de lactoferrine libre. Le reste de surnageant est éliminé par aspiration et les cellules sont lavées 3 fois avec 500 µl de PBS pH 7,4. Les cellules sont ensuite décollées à l'aide de PBS-EDTA afin de compter la radioactivité fixée aux cellules. La radioactivité est mesurée au compteur γ.

Les paramètres de fixation sont déterminés par la méthode de Scatchard à l'aide du programme Enzfitter Software 1.05 (Biosoft). Les paramètres de fixation sont également déterminés sur les cellules conditionnées selon les protocoles précédemment décrits dans les tests de cytotoxicité.

II.7. CYTOFLUORIMETRIE EN FLUX

II.7.1. *Etude de la fixation de la lactoferrine fluorescente par cytofluorimétrie en flux*

Les cellules effectrices (5.10^5) sont lavées 2 fois avec du PBS pH 7,4 froid. Elles sont incubées 1 h à 4°C dans 150 µl de PBS pH 7,4 en présence de 0,5 µg d'anticorps anti-CD56 (Immunotech).

Les cellules sont lavées 2 fois au PBS pH 7,4 et incubées ensuite pour 1 h à 4°C avec 0,5 µg d'anticorps anti-IgG de souris couplés à la phycoérythrine, 10 µl de lactoferrine HyF aux concentrations de 0 à 20 µg/ml et 50 excès molaire de lactoferrine non marquée. Les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS pH 7,4 et analysées par cytofluorimétrie en flux.

II.7.2. *Etude de l'induction de l'apoptose ou de la nécrose des cellules cibles par la lactoferrine*

α. *Principe*

Dans les deux processus de mort cellulaire que sont l'apoptose et la nécrose, il est observé, de façon précoce, une perte d'asymétrie des phospholipides membranaires avec

translocation des résidus de phosphatidylsérine du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane.

L'annexine V qui est une protéine se fixant avec une forte affinité sur les résidus de phosphatidylsérine permet de visualiser ces processus de mort cellulaire précoce (Koopman *et al.*, 1994).

Pour distinguer l'apoptose de la nécrose, un double marquage annexine V-FITC / iodure de propidium est utilisé (Vermes *et al.*, 1995). L'iodure de propidium est un agent intercalent qui pénètre dans les cellules dont la membrane est perméabilisée (cellules en nécrose) et pas dans les cellules en apoptose dont la membrane est intacte.

β. *Protocole*

Les cellules épithéliales sont placées en milieu de sevrage contenant 0,5% de SAB en présence de 0 µg/ml ou 100 µg/ml de lactoferrine pendant 48 h. Les cellules sont ensuite trypsinisées et resuspendues à raison de 5.10^5 cellules dans un tampon "cold binding" (Apoptest-FITC kit, Brand application b.v, Rotterdam). A cette suspension cellulaire sont ajoutés 5 µl d'annexine V-FITC (Apoptest-FITC kit) et 25 µg/ml d'iodure de propidium (Aldrich Chemie) pendant 10 min à l'obscurité et à 4°C. Les échantillons sont ensuite analysés en cytofluorimétrie en flux.

II.7.3. *Etude du cycle cellulaire sur les cellules épithéliales mammaires et coliques*

Le test est réalisé sur les cellules non synchronisées ou synchronisées par un sevrage dans un milieu minimum de culture ne contenant ni SVF ni insuline. Les cellules sont ensuite placées pendant 48 h dans ce milieu contenant 5% de SVF et 0 ou 100 µg /ml de lactoferrine.

Après les 48 h d'incubation, elles sont décollées au versène. Elles sont centrifugées et reprises à raison de 1.10^6 cellules dans 100 µl de milieu complet. La suspension est ajoutée goutte à goutte à 2,5 ml d'éthanol 70° réfrigéré en agitant vigoureusement et placée à -20°C pendant 4 h minimum.

Après centrifugation à 1200 tr/min, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS pH 7,4 et incubées dans 300 µl de PBS pH 7,4 contenant 5 µg de RNAse (Sigma) et 25 µg d'iodure de propidium.

Les cellules sont analysées en cytofluorimétrie en flux à l'aide du logiciel CellFit de Becton-Dickinson.

II.7.4. *Analyse des résultats*

La fluorescence émise par les cellules est analysée à l'aide d'un cytofluorimètre en flux (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) équipé d'un laser argon émettant à 488 nm et d'un filtre à bande passante étroite centrée 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 FACScan et analysées avec le logiciel PC-lysis.

II.8. TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES

II.8.1. *Préparation des lysats de cellules épithéliales mammaires pour l'étude de l'influence de la lactoferrine sur l'expression des protéines régulant la transition G1/S du cycle cellulaire*

Les cellules épithéliales non synchronisées ou synchronisées sont lavées et placées dans le milieu de sevrage contenant 5% de SVF et 0 ou 50 µg/ml de lactoferrine pour des temps respectivement de 0, 4 , 8, 12 h et 12, 15, 18 h. A la fin de l'incubation, les cellules sont décollées au versène, lavées avec du PBS pH 7,4, 1 mM Na_3VO_4 et lysées pendant 2 h à 4°C dans un tampon de lyse (155 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% déoxycholate, 1 mM EGTA (Sigma), 0,2 mM Na_3VO_4 (Sigma), 100 mM NaF, 1 mM PMSF, 50 µg/ml de leupeptine, 200 µM d'aprotinine). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 10000 tr/min à 4°C pendant 15 min. La quantité de protéines est évaluée par dosage à l'aide du kit Micro BCA. Les échantillons sont bouillis 5 min en présence de tampon échantillon 3X.

II.8.2. *Electrophorèse en gel de polyacrylamide*

Les électrophorèses en gel de polyacrylamide sont réalisées sur plaques (1,5 x 140 x 180 mm ou 1,5 x 73 x 102 mm) dans un appareil vertical de marque BioRad. La migration est réalisée dans le système tampon (20 mM Tris, 200 mM glycine, 0,1% SDS) indiqué par Laemmli (1970). Selon la masse moléculaire des protéines recherchées, le gel de séparation, préparé dans un tampon Tris-glycine pH 6,8, 0,1% SDS, possède une réticulation de 7,5, 10, 12% en acrylamide.

Une aliquote de chaque échantillon contenant 50 µg de protéines est déposée dans chaque puits. Les poids moléculaires sont déterminés par rapport à des témoins de masse

standard (Pharmacia Biotech). L'électrophorèse est réalisée sous réfrigération à 50 V sur la nuit pour les grandes plaques ou 150 V pendant 90 min pour les petites plaques. Elle est arrêtée lorsque le témoin de migration s'apprête à sortir du gel.

II.8.3. *Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose*

Après la migration, le gel est équilibré quelques minutes dans le tampon de transfert (25 mM Tris, 200 mM glycine, 20% méthanol) puis les protéines sont électrotransférées sur membrane de nitrocellulose (Shleicher et Schüll). Le transfert est réalisé à 4°C et à 250 mA pendant 3 h. Le transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose est contrôlé par coloration au rouge Ponceau (Sigma).

II.8.4. *Immunorévélation des protéines transférées sur la nitrocellulose*

La membrane de nitrocellulose est saturée 1 h à température ambiante dans une solution de TBS pH 7,6 (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,1% Tween 20) contenant 3% de SAB. Après 3 lavages au TBS pH 7,6 contenant 0,1% SAB, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire. La membrane est ensuite lavée 5 fois pendant 5 min avec la solution de TBS, 0,1% SAB puis incubée 90 min à température ambiante avec l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase et dirigé soit contre le sérum de souris soit contre le sérum de lapin selon la préparation de l'anticorps primaire (dilution au 1/1000). La membrane est lavée 5 fois avec la solution de TBS pH 7,6 et le complexe antigène-anticorps est révélé par chimioluminescence à l'aide du kit ECL (Amersham).

II.9. MESURE DES ACTIVITES KINASES

II.9.1. *Préparation des lysats cellulaires de cellules épithéliales pour l'étude de l'influence de la lactoferrine sur l'activité kinase des protéines régulant la transition G1/S du cycle cellulaire*

Les cellules épithéliales non synchronisées ou synchronisées sont lavées et placées dans le milieu de sevrage contenant 5% de SVF et 0 ou 50 µg/ml de lactoferrine pour des temps respectivement de 0, 4 , 8, 12 h et 12, 15, 18 h. A la fin de l'incubation, les cellules sont décollées au versène, lavées avec du PBS pH 7,4, 1 mM Na_3VO_4 et lysées selon le protocole précédemment décrit. Le lysat total (500 µg de protéines totales) est immunoprécipité avec 5 µg d'anticorps monoclonal anti-Cdk4 (Transduction Laboratories, Interchim, Montluçon,

France) ou anti-CDk2 (Transduction Laboratories) pendant 1 h à 4°C sous agitation douce. Les immunoprécipités sont lavés 2 fois avec un tampon d'immunoprécipitation (1% Triton-X100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,2 mM PMSF, 0,5% NP-40, 0,2 mM Na_3VO_4) et resuspendus dans 10 µl de ce tampon.

II.9.2. *Mesure de l'activité kinase associée à Cdk4*

L'immunoprécipité obtenu avec l'anticorps anti-Cdk4 est lavé 2 fois avec un tampon kinase glutathion-S transférase (GST)-Rb (60 mM glycérophosphate, 30 mM nitrophénylphosphate, 25 mM MOPS pH 7,0, 5 mM EGTA, 15 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 0,1 mM Na_3VO_4) et resuspendu dans 10 µl de ce tampon.

L'activité kinase associée à Cdk4 est évaluée sur la protéine du rétinoblastome (pRb) purifiée et fusionnée avec la GST en présence de 15 µM [$^{32}\gamma$-P] ATP (Amersham). Après 15 min d'incubation à 37°C, les échantillons sont placés dans la glace et 30 µl de tampon de Laemmli 2X sont ajoutés pour stopper la réaction. Les échantillons sont soumis à une électrophorèse comme précédemment décrit. Les protéines sont ensuite colorées au bleu de Coomassie et le gel est décoloré dans un tampon (acide acétique 15%, méthanol 30%, eau 55%). Le gel est ensuite séché sous vide et mis en contact avec un film d'autoradiographie puis révélé après impression.

II.9.3. *Etude de l'activité kinase de Cdk2*

L'immunoprécipité préparé avec l'anticorps anti-Cdk2 est lavé 2 fois avec un tampon kinase H1 (20 mM MOPS pH 7,2, 25 mM glycérophosphate, 15 mM p-nitrophénylphosphate, 15 mM $MgCl_2$, 5 mM EGTA, 1 mM Na_3VO_4, 1 mM DTT) et repris dans 20 µl de ce tampon.

L'activité kinase liée à Cdk2 est évaluée sur 20 µg d'histone H1 (Upstrate Biotechnology) en présence de 10 µCi de [$^{32}\gamma$-P] ATP dans un volume final de 50 µl. Après 10 min d'incubation à 30°C, des aliquotes de 25 µl sont déposées sur des morceaux de papier phosphocellulose Whatman p81 (1 x 1 cm). Les papiers sont lavés 10 fois dans une solution d'acide phosphorique à 0,75% et une dernière fois dans l'acétone. Ils sont ensuite placés dans des fioles à scintillation contenant 3,5 ml de liquide scintillant (Zinsser Analytic). La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur β (Beckman).

Tableau 5. Origine et utilisation des anticorps primaires

Anticorps primaire	Origine	Dilution	Protocole
Anti-phosphotyrosine polyclonal IgG souris	Transduction Laboratories	1/1000	2 h à t° ambiante.
Anti-Cdk2 humaine monoclonal IgG2a souris	Transduction Laboratories	1/2500	2 h à t° ambiante.
Anti-Cdk4 humaine polyclonal IgG1 souris	Transduction Laboratories	1/250	2 h à t° ambiante.
Anti-cycline A humaine purifiée par affinité	Transduction Laboratories	1/125	2 h à t° ambiante.
Anti-cycline D1 humaine monoclonal IgM souris	Transduction Laboratories	1/250	2 h à t° ambiante.
Anti-cycline E humaine polyclonal IgG lapin	Upstrate Biotechnology	1/400	12 h à 4°C.
Anti-$p21^{CIP1}$ humaine monoclonal IgG2 souris	Transduction Laboratories	1/500	12 h à t° ambiante.
Anti-$p27^{KIP1}$ humaine polyclonal IgG chèvre	Santa Cruz Biotechnology	1/400	1 h à t° ambiante.
Anti-$p16^{INK4a}$ polyclonal IgG lapin	Santa Cruz Biotechnology	1/400	1 h à t° ambiante.
Anti-pRb humaine polyclonal IgG chèvre	Santa Cruz Biotechnology	1/400	1 h à t° ambiante.
Anti-p53 monoclonal IgG3 souris	Transduction Laboratories	1/500	2 h à t° ambiante

Bibliographie

- **Aaronson S.A.** (1991). Growth factors and cancer. *Science*, **254**, 1146-1152.
- **Aas T., Borresen A.L., Geisler S., Smith-Sorensen B., Johnsen H., Vargaug J.E., Akslen L.A., Lonning P.E.** (1996). Specific p53 mutations are associated with *de novo* resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nature Med.*, **2**, 811-814.
- **Adeyemi E.O., Campos L.B., Loizou S., Walport M.J., Hodgson H.J.** (1990). Plasma lactoferrin and neutrophil elastase in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Br. J. Rheumatol.*, **29**, 15-20.
- **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 proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 357-393.
- **Albelda S.** (1993). Role of integrins and other adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab. Invest.*, **68**, 4-17.
- **Allen S.A., Naim H.Y., Bulleid N.J.** (1995). Intracellular folding of tissue-type plasminogen activator. Effects of disulfide bond formation on N-linked glycosylation and secretion. *J. Biol. Chem.*, **270**, 4797-4804.
- **Ambruso D.R., Jonhston R.B. Jr.** (1981). Lactoferrin enhances hydroxyl radical production by human neutrophils, neutrophil particulate fractions, and an enzymatic generating system. *J. Clin. Invest.*, **67**, 352-360.
- **Amouric M., Marvaldi J., Pichon J., Bellot F., Figarella C.** (1984). Effect of lactoferrin on the growth of a human 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**, 1769-1773.
- **Anderson B.F., Baker H.M., Norris G.E., Rice D.W., Baker E.N.** (1989). Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **209**, 711-734.
- **Anderson B.F., Norris G.E., Rumball S.V., Thomas D.H., Baker E.N.** (1994). A comparison of the three-dimensional structures of human lactoferrin in its iron free and iron saturated form. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **357**, 227-230.

- **Anderson D.C., Wible L.J., Hughes B.J., Smith C.W., Brinkley B.R.** (1982). Cytoplasmic microtubules in polymorphonuclear leukocytes : Effects of chemotactic stimulation and colchicine. *Cell*, **31**, 719-729.
- **Anderson P., Caligiuri M., O'Brien C., Manley T., Ritz J., Schlossman S.F.** (1990). Fcγ receptor type III (CD16) is included in the ζ NK receptor complex expressed by human NK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2274-2278.
- **Anderson S.K., Gallinger S., Roder J., Frey J., Young H.A., Ortaldo J.R.** (1993). A cyclophilin-related protein involved in the function of natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 542-546.
- **Andersson L.C. Nilsson K., Gahmberg C.G.** (1979). K-562 : a human erythroleukemic cell line. *Int. J. Cancer*, **23**, 143-147.
- **Antonsen S.** (1993). Within subject variation of elastase/α1 protease inhibitor complexes and lactoferrin in plasma. *Scand. J. Lab. Invest.*, **53**, 611-616.
- **Antonsen S., Wiggers P., Dalhoj J., Blaabjerg O.** (1993). An enzyme linked immunosorbent assay for plasma lactoferrin. Concentrations in 362 healthy adults blood donors. *Scand. J. Lab. Invest.*, **53**, 133-144.
- **Appelmelk B.J., An Y.Q., Geerts M., Thijs B.G., De Boer H.A., MacLaren D.M., De Graaf J., Nuijens J.H.** (1994). Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infect. Immun.*, **62**, 2628-2632.
- **Aramburu J., Balboa M.A., Izqiuerdo M., Lopez-Botet M.** (1991). A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by Natural killer cells and γ/δ TCR+ T-lymphocytes. II. Modulation of natural killer cytotoxicity by anti-Kp43 monoclonal antibody. *J. Immunol.*, **147**, 714-721.
- **Arnold R.R., Russel J.E., Champion W.J., Brewer M., Gauthier J.J.** (1982). Bactericidal activity of human lactoferrin: differentiation from the stasis of iron deprivation. *Infect. Immun.*, **35**, 792-799.
- **Bacus S., Zelnick C., Plowman G., Yarden Y.** (1994). Expression of the ErbB-2 family of growth factor receptors and their ligands in breast cancers. *Am. J. Clin. Pathol.*, **102**, S13-S24.
- **Baeuerle P.A., Huttner W.B.** (1986). Chlorate—apotent inhibitor of protein sulfation in intact cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **141**, 870-877.

- **Bagby G.C., Rigas V.D., Bennett R.M., Vandenbark A.A., Garewal H.S.** (1981). Interaction of lactoferrin, monocytes and T-lymphocytes subsets in the regulation of steady state granulopoiesis in vitro. *J. Clin. Invest.*, **68**, 56-63.
- **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.
- **Baker E.N., Anderson B.F., Baker H.M., Day C.L., Haridas M., Norris G.E., Rumball S.V., Smith C.A., Thomas D.H.** (1994). Three-dimensional structure of lactoferrin in various functional states. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **357**, 1-12.
- **Baldwin G.S.** (1993). Comparison of transferrin sequences from different species. *Comp. Biochem. Physiol.*, **106B**, 203-218.
- **Balmer S.E., Scott P.H., Wharton B.A.** (1989). Diet and faecal flora in the newborn : lactoferrin. *Arch. Dis. Child.*, **64**, 1685-1690.
- **Banfield B.W., Leduc Y., Esford L., Visalli R.J., Brandt CR., Tufaro F.** (1995). Evidence for an interaction of herpes simplex virus with chondroitin sulfate proteoglycans during infection. *Virology*, **208**, 531-539.
- **Barnes D.M.** (1997). Cyclin D1 in mammary carcinoma. *J. Pathol.*, **181**, 267-269.
- **Baynes R., Bezwoda W., Bothwell T., Khan Q., Mansoor N.** (1986). The non immune inflammatory response : serial changes in plasma iron, iron binding capacity, lactoferrin, ferritin and C reactive protein. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **46**, 695-704.
- **Baynes R.D., Bezwoda W.R., Mansoor N.** (1988). Neutrophil lactoferrin content in viral infections. *Am. J. Clin. Pathol.*, **2**, 225-228.
- **Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K., Tomita M.** (1992). Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1121**, 130-136.
- **Bellamy W., Wakabayashi H., Takase M., Kawase K., Shimamura S., Tomita M.** (1993). Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide

derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Med. Microbiol. Immunol.*, **182**, 97-105.

- **Bellamy W., Yamauchi K., Wakabayashi H., Takase M., Takakura N., Shimamura S., Tomita M.** (1994). Antifungal properties of lactoferricin B, a peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Lett. Appl. Microbiol.*, **18**, 230-233.
- **Bennatt D.J., Ling Y.Y., McAbee D.D.** (1997). Isolated rat hepatocytes bind lactoferrins by the RHL-1 subunit of the asialoglycoprotein receptor in a galactose-independent manner. *Biochemistry*, **36**, 8367-8376.
- **Bennett J.S.** (1985). In *Platelet membrane glycoproteins* (George J.N., Nurden A.T., Phillips D.R. Eds). Plenum Press, New York & London. 193-210.
- **Bennett R.M., Mohla C.T.** (1976). A solid phase radio-immunoassay for the measurement of lactoferrin in human plasma: variations with age, sex and disease. *J. Lab. Clin.*, **88**, 156-166.
- **Bennett R.M., Kokocinski T.** (1979). Lactoferrin turnover in man. *Clin. Sci.*, **37**, 453-460.
- **Bennett R.M., Davis J.D.** (1981). Lactoferrin binding to human peripheral blood cells: An interaction with B-enriched population of lymphocytes and a subpopulation of adherent mononuclear cells. *J. immunol.*, **127**, 126-127.
- **Bennett R.M., Davis J., Campbell S., Portnoff S.** (1983). Lactoferrin binds to cell membrane DNA: association of surface DNA with an enriched population of B cells and monocytes. *J. Clin. Invest.*, **71**, 611-618.
- **Berseth C.L.** (1987). Enhancement of intestinal growth in neonatal rats by epidermal growth factor in milk. *Am. J. Physiol.*, **253**, G662-G665.
- **Bezault J., Bhimani R., Wiprovnik J., Furmanski P.** (1994). Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors 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., Capron M., 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., Liu J.L., Legrand D., Roche A.C., Capron M., Spik G., Mazurier J.** (1996). Internalization of human lactoferrin by the Jurkat human lymphoblastic T-cell line. *Eur. J. Cell. Biol.*, **69**, 288-296.

- **Birgens H.S., Hansen N.E., Karle H., Kristensen L.O.** (1983). Receptor binding of lactoferrin to human monocytes. *Br. 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). Glycoprotéines des sécrétions bronchiques. *Exp. Annu. Biochim. Med.*, **25**, 85-120.
- **Blackberg L., Hernell O.** (1980). Isolation of lactoferrin from human whey by a single chromatographic step. *FEBS lett.*, **109**, 180-184.
- **Boesman-Finkelstein M., Finkelstein R.A.** (1985). Antimicrobial effects of human milk: inhibitory activity on enteric pathogens. *FEMS Microbiol. Immunol.* **27**, 167-174.
- **Bos J.** (1989). Ras oncogenes in human cancer : a review. *Cancer Res.*, **49**, 4682-4689.
- **Boxer L.A., Haak R.A., Yang H.H., Wolac J.B., Whitcomb J.A., Butterick C.J., Baehner R.L.** (1982). Membrane-bound lactoferrin alters the surface properties of polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.*, **70**, 1049-1057.
- **Bowman B.H., Yang F., Adrian G.S.** (1988). Transferrin evolution and genetic regulation of expression. *Adv. Genet.*, **25**, 1-38.
- **Boyer B., Vallès A.M., Jouanneau J., Delouvée A., Thiery J.P.** (1994). Implication of scatter/growth factors in tumor progression. Proceedings of the 24th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund. Inc. Princeton NJ USA. *Priceton Scientific Publishing Co.*, 223-242.
- **Boyum A.** (1976). Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand. J. Immunol.*, **5**, suppl. 5, 9-15.
- **Breitman T.R., Selonick S.E., Collins S.J.** (1980). Induction of differentiation of human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2936-2940.
- **Breitman T.R., Collins S.J., Keene B.** (1981). Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells in primary culture in response to retinoic acid. *Blood*, **57**, 1000-1007.

- **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.** (1984). The role of antibody and enterochelin in controlling growth of *Escherichia coli* in human milk, and the acquisition of lactoferrin- and transferrin-bound iron. *Infect. Immunity.*, **40**, 453-459.
- **Brock J.H.** (1985). Lactoferrin in human milk : its role in iron absorption and protection against enteric infection in the newborn infant. *Arch. Dis. Child.*, **55**, 417-421.
- **Broekhuyse R.N.** (1974). Tear lactoferrin: a bacteriostatic and complexing protein. *Invest. Ophtalm.*, **13**, 550-554.
- **Brooks S.C., Locke E.R., Soule H.D.** (1973). Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J. Biol. Chem.*, **248**, 6251-6253.
- **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.
- **Brown R.D., Rickard K.A., Kronenberg H.** (1985). Lactoferrin in the myeloproliferative disorders: a search for granulopoietic regulator defects. *Br. J. Haematol.*, **59**, 617-626.
- **Broxmeyer H.E., Moore M.A.S., Ralph P.** (1977). Abnormal granulocyte feed-back regulation of colony forming and colony stimulatory activity - producing cells from patients with chronic myelogenous leukaemia. *Leuk Res.*, **1**, 3-12.
- **Broxmeyer H.E., Jacobsen N., Kurland J., Mendelsohn N., Moore M.A.S.** (1978). In vitro suppression of normal granulocyte stem cells by inhibitory activity derived from leukemic cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, **60**, 497-511.
- **Broxmeyer H.E., Gentile P., Bognacki J., Ralph P.** (1983). Lactoferrin, transferrin and acidic isoferritins: Regulatory molecules with potential therapeutic value in leukemia. *Blood Cells*, **9**, 83-105.
- **Broxmeyer H.E., Bicknell D.C., Cooper S., Sledge G. Jr., Williams D.E., McGuire W.A., Coates T.D.** (1991). Qualitative functional deficiency of affinity-purified lactoferrin from neutrophils of patients with chronic myelogenous leukemia, and lactoferrin/H-ferritin-

cell interactions in a patient with lactoferrin-deficiency with normal numbers of circulating leukocytes. *Pathobiology*, **59**, 26-35.

- **Bruggemeier U., Kalff M., Franke S., Scheidereit C., Beato M.** (1991). Ubiquitous transcription factor OTF-1 mediates induction of the MMTV promoter through synergistic interaction with hormone receptors. *Cell*, **64**, 565-572.
- **Brunner K.T., Mauel J., Cerottini J.C., Chapuis B.** (1968). Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on a ^{51}Cr labelled allogeneic target cells in vitro: inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology*, **14**, 181-196.
- **Bruns C.M., Nowalk A.J., Arvai A.S., McTigue M.A., Vaughan K.G., Mietzner T.A., McRee D.E.** (1997). Structure of haemophilus influenzae Fe^{3+}-binding protein reveals convergent evolution within a superfamily. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 919-924.
- **Buckbinder L., Talbott R., Valesco-Miguel S., Takenaka I., Faha B., Seizinger B.R., Kley N.** (1995). Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature*, **377**, 646-649.
- **Buckley M.F., Sweeney K.J.E., Hamilton J.A., Sini R.L., Manning D.L., Nicholson R.I., DeFazio A., Watts C.K.W., Musgrove E.A., Sutherland R.L.** (1993). Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene*, **8**, 2127-2133.
- **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.
- **Bullen J.J. Rogers H.J., Griffiths E.** (1987). Role of iron in bacterial infection. *Curr. Top. Microbiol. Iimmunol.*, **80**, 1-35.
- **Burridge K., Fath K., Kelly T., Nuckolls G., Turner C.** (1988). Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **4**, 487-525.
- **Byatt J.C., Schuke J.J., Comens P.G., Johnson D.A., Collier R.J.** (1990). The effect of lactoferrin on muscle growth *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 548-553.
- **Cailleau R., Young R., Olivé M., Reeves W.J. Jr.** (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J. Natl. Cancer Inst.*, **53**, 661-674.
- **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.
- **Cao L., Faha B., Dembski M., Tsai L.H., Harlow E., Dyson N.** (1992). Independent binding of the retinoblastoma protein and p107 to the transcription factor E2F. *Nature*, **355**, 176-179.
- **Cardin A.D., Weintraub H.J.R.** (1989). Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis*, **9**, 21-32.
- **Caron de Fromentel C., Nardeux P.C., Soussi T., Lavialle C., Estrade S., Carloni G., Chandrasekaran K., Cassingena R.** (1985). Epithelial HBL-100 cell line derived from milk of an apparently healthy woman harbours SV40 genetic information. *Exp. Cell. Res.*, **160**, 83-94.
- **Carpenter G.** (1980). Epidermal growth factor is a major growth-promoting agent in human milk. *Science*, **210**, 198-199.
- **Catzavelos C., Bhattacharya N., Ung Y.C., Wilson J.A., Roncari L., Sandhu C., Shaw P., Yeger H., Morava-Protzner I., Kapusta L., Fransssen E., Pritchard K.I., Slingerland J.M.** (1997). Decreased levels of the cell-cycle inhibitor $p27^{KIP1}$ protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat. Med.*, **3**, 227-230.
- **Chan F., Zhang J., Cheng L., Shapiro D., Winoto A.** (1995). Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to $p16^{INK4}$. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 2682-2688.
- **Chandrasekaran E.V., Davidson E.A.** (1979). Glycosaminoglycans of normal and malignant cultured human mammary cells. *Cancer Res.*, **39**, 870-880.
- **Charpin C., Lachard A., Pourreau-Schneider N., Jacquemeir J., Lavaut M.N., Andonian C., Martin P.M., Toga M.** (1985). Localisation of lactoferrin and non-specific cross-reacting antigen in human breast carcinomas. *Cancer*, **55**, 2612-2617.
- **Chaubert P., Gayer R., Zimmermann A., Fontolliet C., Stamm B., Bosman F., Shaw P.** (1997). Germ-line mutations of the $p16^{INK4a}$ (MTS1) gene occur in a subset of patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **25**, 1376-1381.
- **Chellappan S.O.P., Hiebert S., Mudryj M., Horowitz J.M., Nevins J.R.** (1991). The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*, **65**, 1053-1061.

- **Chen C.S., Mrksich M., Huang S., Whitesides G.M., Ingber D.E.** (1997). Geometric control of cell life and death. *Science*, **276**, 1425-1428.
- **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.
- **Close M.J., Howlett A.R., Roskelley C.D., Desprez P.Y., Rowning B., Teng C.T., Stamfer M.R., Yaswen P.** (1997). Lactoferrin expression in mammary epithelial cells is mediated by changes in cell shape and actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.*, **110**, 2861-2871.
- **Coleman T.R., Dunphy W.G.** (1994). Cdc2 regulatory factors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**, 877-882.
- **Courtoy P.J., Moguilevsky N., Retegui L.A., Castracane C.E., Masson P.L.** (1984). Uptake of lactoferrin by the liver. II Endocytosis by sinusoidal cells. *Lab. Invest.*, **50**, 329-334.
- **Cox T.M., Mazurier J., Spik G., Montreuil J., Peters T.J.** (1979). Iron binding proteins and influx of iron across the duodenal brush border. Evidence for specific lactotransferrin receptors in the human intestine. *Biochim. Biophys. Acta*, **588**, 120-128.
- **Cross S.M., Sanchez C.A., Morgan C.A., Schimke M.K., Ramel S., Idzerda R.L., Rasking W.H., Reid B.J.** (1995). A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science*, **267**, 1353-1356.
- **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). Structural organization of the mouse lactoferrin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **189**, 1725-1731.
- **Darbon J.M., Devault A., Taviaux S., Fesquet D., Martinez A.M., Galas S., Cavdore J.C., Dorée M., Blanchard J.M.** (1994). Cloning, expression and subcellular localisation of the human homolog of p40^{MO15} catalytic subunit of cdk-activating kinase. *Oncogene*, **9**, 3127-3138.
- **Davidsson L., Kastenmayer P., Yuen M., Lönnerdal B., Hurrell R.F.** (1994). Influence of lactoferrin on iron absorption from human milk in infants. *Pediatr. Res.*, **35**, 117-124.
- **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.

- **Daya-Grosjean L., Robert C., Drougard C., Suarez H.G., Sarasin A.** (1993). High mutation frequency in ras genes of skin tumors isolated from DNA repair deficient xeroderma pigmentosum patients. *Cancer Res.*, **53**, 1625-1629.
- **Delehedde M., Deudon E., Boilly B., Hondermarck H.** (1997). Production of sulfated proteoglycans by human breast cancer cell lines: binding to fibroblast growth factor-2. *J. Cell Biochem.*, **64**, 605-617.
- **Del Sal G.D., Ruaro E.M., Utrera R., Cole C.N., Levine A.J., Schneider C.** (1995). Gas1-induced growth suppression requires a transactivation-independent p53 function. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 7152-7160.
- **Derisbourg P.** (1990). Etude des récepteurs entérocytaires de la lactotransferrine humaine: caractérisation des récepteurs sur les cellules entérocytaires humaines HT-29: étude du mécanisme d'endocytose de la lactotransferrine. Thèse d'université Lille 1.
- **Derisbourg P., Wieruszeski J.M., Montreuil J., Spik G.** (1990). Primary structure of glycans isolated from leukocyte lactotransferrin. Absence of fucose residues question the proposed mechanism of hyposideraemia. *Biochem. J.*, **269**, 821-825.
- **Desai D., Gu Y., Morgan D.O.** (1992). Activation of human cyclin-dependent kinases *in vitro*. *Mol. Biol. Cell.*, **3**, 571-582.
- **Dionysius D.A., Milne J.M.** (1997). Antibacterial peptides of bovine lactoferrin : purification and characterization. *J. Dairy Sci.*, **80**, 667-674.
- **DiPersio C.M., Jackson D.A., Zaret K.S.** (1991). The extracellular matrix coordinately modulates liver transcription factors and hepatocyte morphology. *Mol. Cell Biol.*, **11**, 4405-4414.
- **Dite P., Bartova M., Skaunic V.** (1989). Determination of lactoferrin in the diagnosis of disease of the pancreas. *Vnitr. Lek.*, **35**, 132-136.
- **Doolittle R.F., Hunkapiller M.W., Hood L.E., Devare S.G., Robbins K.C., Aaronson S.A., Antoniades H.N.** (1983). Simian sarcoma virus oncogene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science*, **221**, 275-277.
- **Draetta G.F.** (1994). Mammalian G1 cyclins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**, 842-846.
- **Drouet L., Bal dit Sollier C., Cisse M., Pignaud G., Mazoyer E., Fiat A.M., Jolles P., Caen J.P.** (1990). The antithrombotic effect of KRDS, a lactotransferrin peptide, compared with RGDS. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, **32**, 59-62.

- **Duchler M., Offterdinger M., Holzmuller H. Lipp J., Chu C.T., Aschauer B., Bach F.H., Hofer E.** (1995). NKG2-C is a receptor on human natural killer cells that recognizes structures on K562 cells. *Eur. J. Immunol.*, **25**, 2923-2931.
- **Duffy M.J.** (1990). Plasminogen activators and cancer. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, **1**, 681-687.
- **Dulic V., Lees E., Reed S.I.** (1992). Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science*, **257**, 1958-1961.
- **Dumaz N., Stary A., Soussi T., Daya-Grosjean L., Sarasin A.** (1994). Can we predict solar ultraviolet radiation as a causal event in human tumors by analysing the mutation spectra of the p53 gene ? *Mut. Res.*, **307**, 375-386.
- **Duncan R.L. Jr., McArthur W.P.** (1981). Lactoferrin-mediated modulation mononuclear cell activities. I. Suppression of the murine *in vitro* primary antibody responses. *Cell Immunol.*, **63**, 308-320.
- **Duncan B., Schifman R.B., Corrigan J.J., Schaefer C.** (1985). Iron and the exclusively breast-fed infant from birth to six month. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **4**, 421-425.
- **Eda S., Kikugawa K., Beppu M.** (1996). Binding characteristics of human lactoferrin to the human monocytic leukemia cell line THP-1differenciated into macrophages. *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 167-175.
- **Eda S., Kikugawa K., Beppu M.** (1997). Characterization of lactoferrin-binding proteins of human macrophage membrane : multiple species of lactoferrin-binding proteins with polylactosamine-binding ability. *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 127-133.
- **Elass A., Vergoten G., Legrand D., Mazurier J., Elass-Rochard E., Spik G.** (1996a). Processes underlying interactions of human lymphoblastic T-cell line receptor. I - Quantitative structure-affinity relationship studies. *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **15**, 94-101.
- **Elass A., Vergoten G., Legrand D., Mazurier J., Elass-Rochard E., Spik G.** (1996b). Processes underlying interactions of human lymphoblastic T-cell line receptor. II - Comparative molecular field analysis. *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **15**, 102-107.
- **Elass-Rochard E., Roseanu A., Legrand D., Trif M., Salmon V., Motas C., Montreuil J., Spik G.** (1995). Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to *Escherichia coli* 055B5 lipopolysaccharide. *Biochem. J.*, **312**, 839-845.

- **El Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M., Lin D., Mercer W.E., Kinzler K.W., Vogelstein B.** (1993). *WAF1*, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, **75**, 817-825.
- **Elledge S.J., Winston J., Harper W.A.** (1996). A question of balance: the role of cyclin-kinase inhibitors in development and tumorogenesis. *Trends Cell biol.*, **6**, 388-392.
- **Ellison R.T., Giehl T.J., Laforce F.M.** (1988). Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect. Immun.*, **56**, 2774-2781.
- **Ellison R.T., Laforce F.M., Giehl T.J., Boose D.S., Dunn B.E.** (1990). Lactoferrin and transferrin damage of the gram-negative outer membrane is modulated by Ca2+ and Mg2+. *Gen. Microbiol.*, **136**, 1437-1446.
- **Ellison R.T., Giehl T.J.** (1991). Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin. Invest.*, **88**, 1080-1091.
- **Erdei J., Forsgren A., Naidu A.S.** (1994). Lactoferrin binds to porin omp F and omp C in *Escherichia coli. Infect. Immun.*, **62**, 1236-1240.
- **Espinas M.L., Roux J., Ghysdael J., Pictet R., Grange T.** (1994). Participation of Ets transcription factor in the glucocorticoid response of the rat tyrosine aminotransferase gene. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 4116-4125.
- **Farley J., Loup D., Nelson M., Mitchell A., Esplund G., Macri C., Harrison C., Gray K.** (1997). Neoplastic transformation of the endocervix associated with downregulation of lactoferrin expression. *Mol. Carcinog.*, **20**, 240-250.
- **Finkelstein R.A., Sciortino C.V., McIntosh M.A.** (1983). Role of iron in microbe-host interactions. *Rev. Infect. Dis.*, **5**, 5759-5777.
- **Fisher R.P., Morgan D.O.** (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell*, **78**, 713-724.
- **Foulkes W.D., Flanders T.Y., Pollock P.M., Hayward N.K.** (1997). The *CDKN2A* (p16) gene and human cancer. *Mol. Med.*, **3**, 5-20.
- **Fransson G.B., Lönnerdal B.** (1980). Iron in human milk. *J. Pediatr.*, **2**, 693-701.
- **Frey J.L., Bino T., Kantor R.R. Segal D.M., Giardina S.L., Roder J., Anderson S., Ortaldo J.R.** (1991). Mechanism of target cell recognition by natural killer cells : characterization of a novel triggering molecule restricted to CD3- large granular lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **174**, 1527-1536.

- **Fukasawa K., Choi T., Kuriyama R., Rulong S., Van de Woude G.F.** (1996). Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science*, **271**, 1744-1747.
- **Gahr M., Speer C.P. , Damerau B., Sawatzki G.** (1991). Influence of lactoferrin on the function of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J. Leukoc. Biol.*, **49**, 427-433.
- **Garkatsev I., Grigorian I.A., Ossovskaya V.S., Chernov M.V., Chumakov P.M., Gudkov A.V.** (1998). The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control. *Nature*, **391**, 295-298.
- **Garré C., Bianchi-Scarra G., Sirito M., Musso M., Ravazzolo R.** (1992). Lactoferrin binding sites and nuclear localization in K562(s) cells. *J. Cell Physiol.*, **153**, 477-482.
- **Ginsberg D., Vairo G., Chittenden T., Xiao Z.X., Xu G., Wydner K.L., DeCaprio J.A., Lawrence J.B., Livingston D.M.** (1994). E2F-4, a new member of the E2F transcription factor family, interacts with p107. *Genes Dev.*, **8**, 2939-2952.
- **Glukhova M., Deugnier M.A., Thiery J.P.** (1995). Cadherins and integrins in malignancy. *Mol. Med. Today*, **1**, 84-89.
- **Goldstein G., Scheid M.P., Boyse A., Schlesinger D.H., Van Wauve J.** (1979). A synthetic pentapeptide with biological activity. Characteristic of the thymic hormone thymopoïetin. *Science*, **204**, 1309-1310.
- **Gordeuk V.R., Prithviraj P., Dolinar T., Brittenham G.M.** (1988). Interleukin 1 administration in mice produces hypoferremia despite neutropenia. *J. Clin. Invest.*, **82**, 1934-1938.
- **Govaec M., Mazurier J., Montreuil J., Spik G.** (1985). Rôle des glycannes dans la fixation de la sérotransferrine et de la lactotransferrine humaines sur les macrophages alvéolaires humains. *C.R. Acad. Sci. Paris (III)*, **301**, 689-694.
- **Graeber A.J., Osmanian C., Jack T., Housman D.E., Koch C.J., Lowe S.W., Graccia A.J.** (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in tumors. *Nature*, **379**, 88-91.
- **Green M.R., Pastewka J.V.** (1978). Lactoferrin is a marker for prolactin response in mouse mammary explants. *Endocrinology*, **103**, 1510-1513.
- **Grieco M., Santoro M., Berlingieri M.T., Melillo R.M., Donghi R., Bongarzone I., Pierotti M.A., Della Porta G., Fusco A., Vecchio G.** (1990). PTC is a novel rearranged

form of the ret proto-oncogene and is frequently detected *in vivo* in human thyroid papillary carcinomas. *Cell*, **60**, 557-563.

- **Grinnell B.W., Walls J.D., Gerlitz B.** (1991). Glycosylation of human protein C affects its secretion, processing, functional activities, and activation by thrombin. *J. Biol. Chem.*, **226**, 9778-9785.
- **Gu Y., Turck C., Morgan D.** (1993). Inhibition of Cdk2 activity *in vivo* by an associated 20K regulatory subunit. *Nature*, **366**, 707-710.
- **Guan K.L., Jenkins C.W., Li Y., Nichols M.A., Wu X., O'Keefe C.L., Matera A.G., Xiong Y.** (1994). Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev.*, **8**, 2939-2952.
- **Guan K., Jenkins C., Li Y., Zariwala M., Noh S., Wu X., Xiong Y.** (1996). Molecular cloning of the CDK6 inhibitor p20 and demonstration of the opposite effects of cyclin on the two CDK inhibitor families' binding to CDKs. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 57-70.
- **Hagiwara T., Shinoda I., Fukuwatari Y., Shimamura S.** (1995). Effects of lactoferrin and its peptides on proliferation of rat intestinal epithelial cell line, IEC-18, in the presence of epidermal growth factor. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1875-1881.
- **Halevy O., Novitch B.G., Spicer D.B., Skapek S.X., Rhee J., Hannon G.J., Beach D., Lassar A.B.** (1995). Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science*, **267**, 1018-1021.
- **Hall M., Peters G.** (1996). Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv. Cancer Res*, **68**, 67-108.
- **Hammarström M.L., Mincheva-Nilsson L., Hammarström S.** (1995). Functional lactoferrin receptors on activated human lymphocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **371A**, 47-53.
- **Harmsen M.C., Swart P.J., de Bethune M.P., Pauwels R., De Clercq E., The T.H., Meijer D.K.** (1995). Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro. *J. Infect. Dis.*, **172**, 380-388.
- **Harper J.W., Adami G.R., Wei N., Keyomarsi K., Elledge S.J.** (1993). The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, **75**, 805-816.
- **Harrington J.P.** (1992). Spectroscopic analysis of the unfolding of transition metal-ion complexes of human lactoferrin and transferrin. *Int. J. Biochem.*, **24**, 275-280.

- **Hartwell L.H., Kastan M.B.** (1994). Cell cycle control and cancer. *Science*, **266**, 1821-1828.
- **Hasegawa K., Motsuchi W., Tanaka S., Dosako S.** (1994). Inhibition of lactoferrin of in vitro infection in human herpes virus. *Jpn. J. Med. Biol.*, **47**, 73-85.
- **Hashizume S., Kuroda K., Murakami H.** (1983). Identification of lactoferrin as a essential growth factor for human lymphocytic cell lines in serum-free medium. *Biochim. Biophys. Acta*, **763**, 377-382.
- **He J., Furmanski P.** (1995). Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature*, **373**, 721-724.
- **Hekman A.M., Rümke P.** (1969). The antigens of human seminal plasma with special reference to lactoferrin as a spermatozoa-coating antigen. *Fert. Steril.*, **20**, 312-323.
- **Hennart P.F., Brasseur D.J., Delogne-Desnoeck J.B., Dramaix M.M., Robyn C.E.** (1991). Lysozyme, lactoferrin and secretory immunoglobulin A content in breast milk : influence of duration of lactation, nutrition status, prolactin status and parity of mother. *Am. J. Clin. Nutr.*, **53**, 32-39.
- **Herold B.C., Gerber S.I., Polonsky T., Belval B.J., Shaklee P.N., Holme K.** (1995). Identification of structural features of heparin required for inhibition of herpes simplex virus type 1 binding. *Virology*, **206**, 1108-1116.
- **Hirai H., Roussel M., Kato J., Ashmun R., Sherr C.** (1995). Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 2672-2681.
- **Hirai Y., Kawataka N., Satoh K., Ikeda Y., Hisayasu S., Orimo H., Yoshino Y.** (1990). Concentrations of lactoferrin and iron in human milk at different stages of lactation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **36**, 531-544.
- **Hoek K.S., Milne J.M., Grieve P.A., Dionysius D.A., Smith R.** (1997). Antibacterial activity in bovine lactoferrin-derived peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 54-59.
- **Horowitz J.M., Park S.H., Bogenmann E., Cheng J.C., Yandell D.W., Kaye F.J., Minna J.D., Dryja T.P., Weinberg R.A.** (1990). Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2775-2779.

- **Horwitz K.B., Koseki Y., Mc Guire W.L.** (1978). Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer : role of estradiol and antiestrogen. *Endocrinology*, **103**, 1742-1751.
- **Horwitz D.A., Knight N., Temple A., Allison A.C.** (1979). Spontaneous and induced cytotoxic properties of human adherent mononuclear cells. Killing of nonsensitized and antibody-coated non erythroid cell. *J. Immunol.*, **36**, 221-228.
- **Horwitz D.A., Bakke A.C., Abo W., Nishiya K.** (1984). Monocyte and NK cell cytotoxic activity in human adherent cell preparations : discriminating effects of interferon and lactoferrin. *J. Immunol.*, **132**, 2370-2374.
- **Houghton M.R., Gracey M., Burke V., Botrell C., Spargo R.M.** (1985). Breast milk levels in relation to maternal nutrition status. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **4**, 230-233.
- **Hu W.L., Mazurier J., Montreuil J., Spik G.** (1990). Isolation and partial characterization of a lactotransferrin receptor from mouse intestinal brush border. *Biochemistry*, **29**, 535-541.
- **Hu W.L., Regoeczi E., Chindemi P.A., Bolyos M.** (1993). Lactoferrin interferes with uptake of iron from transferrin and asialo-transferrin by the rat liver. *Am. J. Physiol.*, **264**, G112-G117.
- **Huang J.W., Mori M., Yamada K., Isono K., Ueno K., Shinohara M., Harada T., Oka M.** (1992). Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: Immunohistochemical distribution of intermediate filament proteins, involucrin and secretory proteins. *Anticancer Res.*, **12**, 811-820.
- **Huet C., Sahuquillo-Merino C., Coudrier E., Louvard D.** (1987). Absorptive and mucus-secreting subclones isolated from a multipotent intestinal cell line (HT-29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation. *J. Cell. Biol.*, **105**, 345-357.
- **Huettinger M., Retzek H., Eder M., Goldenberg 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 α-macroglobulin. *J. Biol. Chem.*, **267**, 18551-18557.
- **Hunter T., Pines J.** (1994). Cyclins and cancer II : cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*, **79**, 573-582.

- **Hurley W.L., Hegarty H.M., Metzler J.T.** (1994). *In vitro* inhibition of mammary cell growth by lactoferrin : a comparative study. *Life Sci.*, **55**, 1955-1963.
- **Hutchens T.W., Henry J.F., Yip T.T., Hachey D.L., Schanler R.J., Motil K.J., Garza C.** (1991). Origin of intact lactoferrin and its DNA-binding fragments found in the urine of human milk-fed preterm infants - evaluation by stable isotopic enrichment. *Pediatr. Res.*, **29**, 243-250.
- **Hwang P.M., Zhou N., Shan X., Arrowsmith C.H., Vogel H.J.** (1998). Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. *Biochemistry*, **37**, 4288-4298.
- **Hynes R.O., Yamada K.M.** (1982). Fibronectins: multifonctional modular glycoproteins. *J. Cell Biol.*, **95**, 369-377.
- **Imber M.J., Pizzo S.V.** (1983). Clearance and binding of native and defucosylated lactoferrin. *Biochem.. J.*, **212**, 249-257.
- **Iozzo R.V.** (1988). Cell surface heparan sulfate proteoglycan and the neoplastic phenotype. *J. Cell. Biochem.*, **37**, 61-78.
- **Ismail M., Brock J.H.** (1993). Binding of lactoferrin and transferrin to the human promonocytic cell line U937. *J. Biol. Chem.*, **268**, 21618-21625.
- **Iyer S., Lönnerdal B.** (1993). Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. *Eur. Clin. Nutr.*, **47**, 232-241.
- **James S.Y., MacKay A.G., Colston K.W.** (1996). Effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and its analogues on induction of apoptosis in breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **58**, 395-401.
- **Jobbagy A., Kiraly K.** (1966). Chemical characterization of fluorescein isothiocyanate-protein conjugates. *Biochim. Biophys. Acta*, **124**, 166-175.
- **Johansson B.G.** (1960). Isolation of an iron-containing red protein from human milk. *Acta Chem. Scand.*, **14**, 510-512.
- **Johnston J.J., Rintels P., Chung J., Sather J., Benz E.J., Berliner N.** (1992). Lactoferrin gene promoter : structural integrity and nonexpression in HL60 cells. *Blood*, **79**, 2998-3006.
- **Jorieux S., Mazurier J., Montreuil J., Spik G.** (1985). Characterization of lactotransferrin complexes in human milk. *Prot. Biol. Fluids*, **32**, 115-118.

- **Karp J.E., Broder S.** (1995). Molecular foundations of cancer: new targets for intervention. *Nat. Med.*, **1**, 309-320.
- **Kato J.Y., Matsuoka M., Polyak K., Massagué J., Sherr C.J.** (1994). Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor ($p27^{Kip1}$) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell*, **79**, 487-496.
- **Kawakami H., Lönnerdal B.** (1991). Isolation and function of a receptor for human lactoferrin in human fetal intestinal brush border membranes. *Am. J. Physiol.*, **261**, G841-G846.
- **Kelsey J.L., Gammon M.D.** (1991). The epidemiology of breast cancer. *CA. Cancer J. Clin.*, **41**, 146-165.
- **Kelver M.E., Kaul A., Nowicki B., Findley W.E., Hutchens T.W., Nagamani M.** (1996). Estrogen regulation of lactoferrin expression in human endometrium. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **36**, 243-247.
- **Keyomarsi K., Pardee A.** (1993). Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc. Acad. Sci. USA*, **90**, 1112-1116.
- **Keyomarsi K., O'Leary N., Molnar G., Lees E., Fingert H.J., Pardee A.B.** (1994). Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Res.* **54**, 380-385.
- **Keyomarsi K., Pardee A.** (1996). Cyclin E-a better prognostic marker for breast cancer than cyclin D ?. *Nature Med.*, **2**, 254.
- **Khatib Z.A., Matsushime H., Valentine M., Shapiro D.N., Sherr C.J., Look A.T.** (1993). Coamplification of the CDK4 gene with *MDM2* and *GLI* in human sarcomas. *Cancer Res.*, **53**, 5535-5541.
- **Khazaie K., Schirrmacher V., Lichtner R.** (1993). EGF receptor in neoplasia and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, **12**, 255-274.
- **King R.W., Jackson P.K., Kirschner M.W.** (1994). Mitosis in transition. *Cell*, **79**, 563-571.
- **Koff A., Giordano A., Desai D., Yamashita K., Harper W., Elledge S., Nishimoto T., Morgan D., Franza R., Roberts J.** (1992). Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell-cycle. *Science*, **257**, 1689-1693.
- **Koopman G., Reutelingsperger C.P., Kuijten G.A., Keehnen R.M., Pals S.T., van Oers M.H.** (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, **84**, 1415-1420.

- **Korec S.** (1980). In Natural Cell-Mediated Immunity Against Tumors. *R.B. Herberman, Ed (Acad. Press, New York)*, p 1301.
- **Laemmli U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- **Lanier L.L., Chang C.W., Phillips J.H.** (1994). Human NKR-P1A : a disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J. Immunol.*, **153**, 2417-2428.
- **Larsen C.J.** (1997). Les tribulations du gène suppresseur de tumeur p16/MTS1/CDKN2 : un feuilleton à rebondissements. *Bull. Cancer*, **84**, 427-430.
- **La Thangue N.B.** (1994). DRTF-1/E2F: an expanding family of hetero-dimeric transcription factors implicated in cell cycle control. *Trends Biochem. Sci.*, 19, 108.
- **Lee M., Reynisdottir I., Massague J.** (1995). Cloning of $p57^{Kip2}$ cyclin dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev.*, **9**, 639-649.
- **Lee M.O., Liu Y., Zhang X.K.** (1995a). A retinoic acid response element that overlaps an estrogen response element mediates multihormonal sensitivity in transcriptional activation of the lactoferrin gene. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4194-4207.
- **Lee M., Reynisdottir I., Massague J.** (1995b). Cloning of $p57^{Kip2}$ cyclin dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev.*, **9**, 639-649.
- **Lees J.A., Sito M., Vidal M., Valentine M., Look T., Harlow E., Dyson N., Helin K.** (1993). The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 7813-7825.
- **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 phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes by fluorescein labeling and location of the binding site. *Biochem. J.*, **276**, 733-738.
- **Legrand D., Mazurier J., Elass A., Rochard E., Vergoten G., Maes P., Montreuil J., Spik G.** (1992). Molecular interactions between human lactotransferrin and the phytohemagglutinin-activated human lymphocyte lactotransferrin receptor lie in two loop-containing regions of the N-terminal domain I of human lactotransferrin. *Biochemistry*, **31**, 9243-9251.

- **Legrand D., van Berkel P.H.C., Salmon V., van Veen H.A., Slomianny M.C., Nuijens J.H., Spik G.** (1997). The N-terminal Arg2, Arg3 and Arg4 of human lactoferrin interact with sulfated molecules but not with the receptor present on Jurkat human lymphoblastic T-cells. *Biochem. J.*, **327**, 841-846.
- **Leveugle B., Mazurier J., Legrand D., Mazurier C., Montreuil J., Spik G.** (1993). Lactotransferrin binding to its platelet receptor inhibits platelet aggregation. *Eur. J. Biochem.*, **213**, 1205-1211.
- **Lévy-Toledano S., Grelac F., Caen J.P., Maclouf J.** (1995). KRDS, a peptide derived from human lactotransferrin, inhibits thrombin-induced thromboxane synthesis by a cyclooxygenase-independent mechanism. *Throm. Haemostasis*, **5**, 857-861.
- **Li C.Y., Suardet L., Little J.B.** (1995). Potential role of WAF1/CIP1/p21 as a mediator of TGF-beta cytoinhibitory effect. *J. Biol. Chem.*, **270**, 4971-4974.
- **Linke S.P., Clarkin K.C., Di Leonardo A., Tsou A., Wahl G.M.** (1996). A reversible p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes Dev.*, **10**, 934-947.
- **Liotta L.A., Nageswara R.C., Wewer U.M.** (1986). Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. *Annu. Rev. Biochem.*, **55**, 1037-1057.
- **Lippman M.E., Bolan G., Huff K.** (1976). The effects of estrogens and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer Res.*, **36**, 4595-4601.
- **Lippman M.E., Osborne C.K., Knazek R., Young N.** (1977). In vitro model system for the study of hormone-dependent human breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, **270**, 4797-4804.
- **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 containing overlapping chicken ovalbumin up-stream promoter transcription factor and estrogen receptor-binding element. *Mol. Endocr.*, **6**, 355-363.
- **Livingston D.M., Ewen M., Sellers W.R., Arany Z., Kaelin W.G.** (1995). The transcription factor E2F-1 is a downstream target of RB action. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 742-755.

- **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.
- **Lönnerdal B., Keen C.L., Hurley L.S.** (1985). Manganese binding proteins in human and cow's milk. *Am. J. Clin. Nutr.*, **41**, 550-559.
- **Lönnerdal B., Hernell O.** (1994). Iron, zinc, copper and selenium status of breast-fed infants and infants fed trace element fortified milk-based infant formula. *Acta Paediatr.*, **83**, 367-373.
- **Louie G.V.** (1993). Porphobilinogen deaminase and its structural similarity to the bidomain binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **3**, 401-408.
- **Lozzio B.B., Lozzio C.B., Bamberger E.G., Feliu A.S.** (1981). A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **166**, 546-550.
- **Lozzio C.B., Lozzio B.B.** (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, **45**, 321-334.
- **Lu L., Shen R.N., Zhou S.Z., Srivastava C., Harrington 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 the polycythemia-inducing strain of the Friend virus complex. *Int. J. Hematol.*, **54**, 117-124.
- **Luqmani Y.A., Campbell T.A., Bennet C., Coombes R.C., Paterson I.M.** (1991). Expression of lactoferrin in human stomach. *Int. J. Cancer*, **49**, 684-687.
- **Machnicki M., Zimecki M., Zagulski T.** (1993). Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 in vivo. *Int. J. Exp. Path.*, **74**, 433-439.
- **Maheswaran S., Englert C., Bennett P., Heinrich G., Haber D.A.** (1995). The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes Dev.*, **9**, 2143-2156.
- **Mäkalä T.P., Tassan J.P., Nigg E.A., Frutiger S., Hughes G.J., Weinberg E.A.** (1994). A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15. *Nature*, **371**, 254-257.
- **Maneva A., Taleva B., Manev V., Sirakov L.** (1993). Lactoferrin binding to human platelets. *Int. J. Biochem.*, **25**, 707-712.
- **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.

- **Mantovani A., Tagliabue A.D., Dean J.H., Jerrells T.R., Herberman R.B.** (1979). Cytolytic activity of circulating human monocytes on transformed and untransformed human fibroblasts. *Int. J. Cancer*, **23**, 28-31.
- **Marchetti M., Longhi C., Conte M.P., Pisani S., Valenti P., Seganti L.** (1996). Lactoferrin inhibits herpes simplex virus type 1 adsorption to Vero cells. *Antiviral Res.*, **29**, 221-231.
- **Mason D.Y., Taylor C.R.** (1978). Distribution of transferrin, ferritin and lactoferrin in human tissues. *J. Clin. Pathol.*, **31**, 316-327.
- **Masson P.L.** (1970). La lactoferrine. Dans : Collection "Médico-Monographies d'Agrégés". Arscia, Bruxelles, 93-165.
- **Masson P.L., Heremans J.F.** (1971). Lactoferrin in milk from different species. *Comp. Biochem. Physiol.*, **39B**, 119-129.
- **Matsushime H., Roussel M.F., Ashmun R.A., Sherr C.J.** (1991). Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell*, **65**, 701-713.
- **Mattsby-Baltzer I., Roseanu A., Motas C., Elverfors J., Engberg I., Hanson L.A.** (1996). Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells. *Pedriatr. Res.*, **40**, 257-262.
- **Mazoyer E., Lévy-Toledano S., Rendu F., Hermant L., Lu H., Fiat A.M., Jollès P., Caen J.** (1990). KRDS, a new peptide derived from human lactotransferrin inhibits platelet aggregation and release reaction. *Eur. J. Biochem.*, **194**, 43-49.
- **Mazurier J., Legrand D., Hu W., Montreuil J., Spik G.** (1989). Expression of human lactotransferrin receptors in phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Eur. J. Biochem.*, **179**, 481-487.
- **McAbee D.D., Esbensen K.** (1991). Binding and endocytosis of Apo- and Holo-lactoferrin by isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **266**, 23624-23631.
- **McAbee D.D., Nowatzke W., Oehler C., Sitaram M., Sbaschnig E., Opferman J.T., Carr J., Esbensen K.** (1993). Endocytosis and degradation of bovine apo- and holo-lactoferrin by isolated rat hepatocytes are mediated by recycling calcium-dependent binding sites. *Biochemistry*, **32**, 13749-13760.
- **McCoombs 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.** (1991). Lactoferrin-inducible monocyte cytotoxicity for K562 cells and decay of natural killer lymphocyte cytotoxicity. *Clin. Exp. Immunol.*, **83**, 154-156.
- **McKenna W.R., Mickelsen P.A., Sparling P.F., Dyer W.** (1988). Iron uptake from lactoferrin and transferrin by *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immunity*, **56**, 785-791.
- **Merlo G.R., Bassolo F., Fiore L., Duboc L., Hynes N.E.** (1995). p53-dependent and p53-independent activation of apoptosis in mammary epithelial cells reveals a survival function of EGF and insulin. *J. Cell Biol.*, **128**, 1185-1196.
- **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.
- **Mignatti P., Rifkin D.B.** (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol. Rev.*, **73**, 161-195.
- **Mihara H., Takahashi Y.** (1997). Engineering peptides and proteins that undergo alpha-to-beta transitions. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7, 501-508.
- **Mikogami T., Heyman M., Spik G., Desjeux J.F.** (1994). Apical-to-basolateral transepithelial transport of human lactoferrin in the intestinal cell line HT-29 cl. 19A. *Am. J. Physiol.*, **267**, G308-G315.
- **Mikogami T., Marianne T., Spik G.** (1995). Effect of intracellular iron depletion by picolinic acid on expression of the lactoferrin receptor in the human colon carcinoma cell subclone HT-29-18-C1. *Biochem. J.*, **308**, 391-397.
- **Mincheva-Nilsson L., Hammarström S., Hammarström M.L.** (1997). Activated human γδ T lymphocytes express functional lactoferrin receptors. *Scand. J. Immunol.*, **46**, 609-618.
- **Minor D.L. Jr., Kim P.S.** (1996). Context-dependent secondary structure formation of a designed protein sequence. *Nature*, **380**, 730-734.
- **Miyashita T., Reed J.C.** (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, **80**, 293-299.
- **Miyauchi J.** (1984). Distribution and subcellular localization of lactoferrin in human tissues with special reference to the submandibular gland. *Acta Histochem. Cytochem.*, **17**, 77-89.

- **Miyazawa K., Mantel C., Lu L., Morrison D.C., Broxmeyer H.E.** (1991). Lactoferrin-lipopolysaccharide interactions. Effects of lactoferrin binding to monocyte/macrophage-differenciated HL-60 cells. *J. Immunol.*, **146**, 723-729.
- **Moguilevsky N., Courtoy P.J., Masson P.L.** (1985). 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.
- **Monsky W.L., Chen W.T.** (1993). Proteases of cell adhesion proteins in cancer. *Cancer Biol.*, **4**, 251-258.
- **Montreuil J., Tonnelat J., Mullet S.** (1960). Préparation et propriétés de la lactosidérophiline (lactotransferrine) du lait de femme. *Biochim. Biophys. Acta*, **45**, 413-421.
- **Montreuil J., Mullet S.** (1960). Isolement de la lactosidérophiline du lait. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 250, 1736-1737.
- **Montreuil J., Spik G., Mazurier J.** (1997). Transferrin superfamily. An outstanding model for studying biochemical evolution. *In glycoprotein II, New Comprehensive Biochemistry*. Eds. J. Montreuil, J.F.G. Vligenthart and H. Schachter. Elsevier Sciences B.V., Vol 29b, pp 203-242.
- **Moore S.A., Anderson B.F., Groom C.R., Haridas M., Baker E.N.** (1997). Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **274**, 222-236.
- **Muller F., Holberg-Petersen M., Rollag H., Dgre M., Brandtzaeg P., Froland S.S.** (1992). Nonspecific oral immunity in individuals with HIV infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, **5**, 46-51.
- **Nagata S., Golstein P.** (1995). The Fas death factor. *Science*, **267**, 1449-1456.
- **Nagler A., Lanier L.L., Cwirla S., Phillips J.H.** (1989). Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J. Immunol.*, **143**, 3183-3191.
- **Nakao K., Imoto I., Ikemura N., Shibata T., Takaji S., Taguchi Y., Misaki M., Yamauchi K., Yamazaki N.** (1997). Relation of lactoferrin levels in gastric mucosa with *Helicobacter pylori* infection and with the degree of gastric inflammation. *Am. J. Gastroenterol.*, **92**, 1005-1011.
- **Nevins J.R.** (1992). E2F : a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science*, **258**, 424-429.

- **Nielsen N.H., Arnerlöv C., Emdin S.O., Landberg G.** (1996). Cyclin E overexpression, a negative prognostic factor in breast cancer with strong correlation to oestrogen receptor status. *Br. J. Cancer*, **74**, 874-880.
- **Niemelä A., Kulomaa M., Vilja P., Tuohimaa P., Saarikoski S.** (1989). Lactoferrin in human amniotic fluid. *Hum. Reprod.*, **4**, 99-101.
- **Nishiya K., Horwitz D.A.** (1982). Contrasting effects of lactoferrin on human lymphocyte and monocyte natural killer activity and antibody-dependent cell-mediated cytoyoxicity. *J. Immunol.*, **129**, 2519-2523.
- **Nuijens J.H., Abbink J.J., Wachtfogel Y.T., Colman R.W., Eerenberg A.J.M., Dors D., Kamp A.J.M., Strack van Schyndel R.J.M., Thijs L.G., Hack C.E.** (1992). Plasma elastase, a-1 antitrypsin and lactoferrin in sepsis: evidence for neutrophils as mediators in fatal sepsis. *J. Lab. Clin. Med.*, **119**, 159-168.
- **Oliner J.D., Kinzler K.W., Meltzer P.S., George D., Vogelstein B.** (1992). Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*, **358**, 80-83.
- **Olofsson T., Olsson I., Venge P.** (1977). Myeloperoxidase and lactoferrin of blood neutrophils and plasma in chronic granulocytic leukaemia. *Scand. J. Haematol.*, **18**, 113-120.
- **Opdenakker G., Rudd P.M., Ponting C.P., Dwek R.A.** (1993). Concepts and principles of glycobiology. *FASEB J.*, 7, 1330-1337.
- **Oria R., Alvarez-Hernandez X., Liceaga J., Brock J.H.** (1988). Uptake and handling of iron from transferrin, lactoferrin and immune complexes by macrophage cell line. *Biochem. J.*, **252**, 221-225.
- **Ortaldo J.R.** (1977). Specificity of natural cytotoxic reactivity of normal human lymphocytes against a myeloid leukemia cell line. *J. Natl. Cancer Int.*, **59**, 77-82.
- **Otnaess A.B.K., Meberg A., Sande H.A.** (1983). Plasma lactoferrin measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) - Measurements on adult and infant plasma. *Scand. J. Haematol.*, **31**, 235-240.
- **Otto B.R., Verweij-van Vugt A.M.J.J., MacLaren D.M.** (1992). Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.*, **18**, 217-233.

- **Panella T.J., Liu Y., Huang A.T., Teng C.T.** (1991). Polymorphism and altered methylation of the lactoferrin gene in normal leukocytes, leukemic cells, and breast cancer. *Cancer Res.*, **51**, 3037-3043.
- **Penco S., Pastorino S., Bianchi-Scarrà G., Garré C.** (1995). Lactoferrin down-modulates the activity of the granulocyte macrophage colony-stimulating factor promoter in interleukin-1β-stimulated cells. *J. Biol. Chem.*, **270**, 12263-12268.
- **Pentecost B.T., Teng C.T.** (1987). Lactotransferrin is the major estrogen inducible protein of mouse uterine secretions. *J. Biol. Chem.*, **262**, 10134-10139.
- **Pejler G.** (1996). Lactoferrin regulates the activity of heparin proteoglycan-bound mast cell chymase: characterization of the binding of heparin to lactoferrin. *Biochem. J.*, **320**, 897-903
- **Pinto M., Appay M.D., Simon-Assmann P., Chevalier G., Dracopoli N., Fogh J., Zweibaum A.** (1982). Enterocytic differentiation of cultured human cancer cells by replacement of glucose by galactose in the medium. *Biol. Cell.*, **44**, 193-196.
- **Polyak K., Lee M.H., Erdjument-Bromage H., Koff A., Roberts J.M., Tempst P., Massague J.** (1994). Cloning of $p27^{Kip1}$, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*, **78**, 59-66.
- **Porter P.L., Malone K.E., Heagerty P.J., Alexander G.M., Gatti L.A., Firpo E.J., Daling J.R., Roberts J.M.** (1997). Expression of cell-cycle regulators $p27^{KIP1}$ and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat. Med.*, **3**, 222-225.
- **Powell M.J., Ogden J.E.** (1990). Nucleotide sequence of human lactoferrin cDNA. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 4013.
- **Prentice A., MacCarthy A., Stifling D.M., Vasquez-Velasquez L., Ceesay S.M.** (1989). Breast milk IgA and lactoferrin survival in the gastrointestinal tract - a study of rural gambian children. *Acta Paedriatr. Scand.*, **78**, 505-512.
- **Princiotto J.V., Zapolski E.J.** (1975). Difference between the two iron binding sites of transferrin. *Nature*, **255**, 87-88.
- **Pross H.F., Maroun J.A.** (1984). The standardization of NK cell assays for use in studies of biological response modifiers. *J. Immunol. Methods*, **68**, 235-249.

- **Quelle D., Ashmun R., Hannon G., Rehberger P., Trono D., Richter H., Walker C., Beach D., Sherr C., Serrano M.** (1995). Cloning and characterization of murin $p16^{INK4a}$ and $p15^{INK4b}$ genes. *Oncogene*, **11**, 635-645.
- **Qin X.Q., Livingston D.M., Ewen M., Sellers W.R., Arany Z., Kaelin W.G. Jr.** The transcription factor E2F-1 is a downstream target of RB action. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 742-755, 1995.
- **Qiu X., Forman H.J., Schonthal A.H., Cadenas E.** (1996). Induction of p21 mediated by reactive oxygen species formed during the metabolism of aziridinylbenzoquinones by HCT116 cells. *J. Biol. Chem.*, **271**, 31915-31921.
- **Rado T.A., Bollekens J., St Laurent G., Parker L., Benz E.J. Jr.** (1984). Lactoferrin biosynthesis during granulocytopoiesis. *Blood*, **64**, 1103-1109.
- **Rado T.A., Xiping W., Benz E.J.** (1987). Isolation of lactoferrin cDNA from a human myeloid library and expression of mRNA during normal and leukemic myelopoiesis. *Blood*, **4**, 989-993.
- **Rejman J.J., Oliver S.P., Muenchen R.A., Turner J.D.** (1992). Proliferation of the MAC-T bovine mammary epithelial cell line in the presence of mammary secretion whey proteins. *Cell Biol. Int. Rep.*, **16**, 993-1001.
- **Rey M.W., Woloshuk S.L., deBoer H.A., Pieper F.R.** (1990). Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 5288.
- **Richie E.R., Hilliard J.K., Gilmore R., Gillepsie D.J.** (1987). Human milk-derived lactoferrin inhibits mitogen and alloantiogen induced human lymphocyte proliferation. *J. Reprod. Immunol.*, **12**, 137-148.
- **Riddell D.R., Owen J.S.** (1996). Inhibition of ADP-induced platelet aggregation by ApoE is not mediated by membrane cholesterol depletion. *Thrombosis Res.*, **80**, 499-508.
- **Rinehart J.J., Vessella R., Langue P., Kaplan M.I., Gormus B.J.** (1979). Characterization and comparison of human monocyte and macrophage induced tumor cytotoxicity. *J. Lab. Clin. Med.*, **93**, 361-369.
- **Roberts A.K., Chierici R., Sawatzki G., Hill M.J., Volpato S., Vigi V.** (1992). Supplementation of an adapted formula with bovine lactoferrin. 1. Effect on the infant faecal flora. *Acta Paediatr. Scand.*, **66**, 719-722.

- **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 lymphocytes 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.
- **Roiron D., Amouric M., Marvaldi J., Figarella C.** (1989). Lactoferrin-binding sites at the surface of HT29-D4 cells. *Eur. J. Biochem.*, **186**, 367-373.
- **Roiron-Lagroux D., Figarella C.** (1990). Evidence for a different mechanism of lactoferrin and transferrin translocation on HT29-D4 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **170**, 837-842.
- **Roskelley C.D., Srebrow A., Bissell M.J.** (1995). A hierarchy of ECM-mediated signalling regulates tissue-specific gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **4**, 736-747.
- **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.
- **Saarinen U.M., Siimes M., Dallman 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.
- **Saito N., Takemori N., Onodera R., Watanabe S., Namiki M.** (1993). Ultrastructural localization of lactoferrin in the granules other than typical secondary granules of human neutrophils. *Hum. Cell*, **6**, 42-48.
- **Sarasin A.** (1991). The paradox of DNA repair-deficient diseases. *Cancer J.*, **4**, 233-237.
- **Schade A.L., Caroline L.** (1946). An iron binding component of human blood plasma. *Science*, **104**, 340-341.
- **Schryvers A.B., Morris L.J.** (1988). Identification and characterization of the human lactoferrin-binding protein from *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immunity*, **56**, 1144-1149.
- **Schryvers A.B.** (1989). Identification of the transferrin- and lactoferrin-binding proteins in *Haemophilus influenzae*. *J. Med. Microbiol.*, **29**, 212-230.
- **Sehested M., Barfold C., Krogdahl A., Bretau P.** (1985). Immunohistochemical investigation of lysozyme, lactoferrin, α1-antichymotrypsin in salivary pleomorphic adenoma. *Virchow Arch.*, [A] **408**, 107-116.

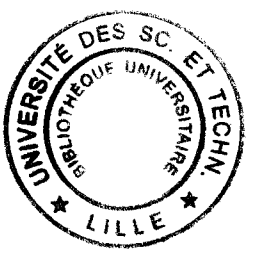
- **Sekine K., Watanabe E., Nakamura J., Takasuka N., Kim D.J., Asamoto M., Krutovskikh V., Baba-Toriyama H., Ota T., Moore M.A., Masuda M., Sugimoto H., Nishino H., Kakizoe T., Tsuda H.** (1997a). Inhibition of azoxymethane-initiated colon tumor by bovine lactoferrin administration in F344 rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, **88**, 523-526.
- **Sekine K., Ushida Y., Kuhara T., Ligo M., Baba-Toriyama H., Moore M.A., Murakoshi M., Satomi Y., Nishino H., Kakizoe T., Tsuda H.** (1997b). Inhibition of initiation and early stage development of abberant crypt foci and enhanced natural killer activity in male rats administered bovine lactoferrin concomitantly with azoxymethane. *Cancer Lett.*, **121**, 211-216.
- **Serrano M., Hannon G.J., Beach D.** (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclinD/Cdk4. *Nature*, **366**, 704-707.
- **Shau H., Kim A., Golub S.H.** (1992). Modulation of natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity by lactoferrin. *J. Leukoc. Biol.*, **51**, 343-349.
- **Sherr C.J., Roberts J.R.** (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.*, **9**, 1149-1163.
- **Shi H., Teng C.T.** (1994). Characterization of a mitogen-response unit in the mouse lactoferrin gene promoter. *J. Biol. Chem.*, **269**, 12973-12980.
- **Shimizu K., Matsuzama H., Okada K., Tazume S., Dosako S., Kawasaki Y., Hashimoto K., Koga Y.** (1996). Lactoferrin-mediated protection of the host from murine cytomegalovirus infection by a T-cell-dependent augmentation of natural killer cell activity. *Arch. Virol.*, **141**, 1875-1889.
- **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 myeloperoxydase. *Gene*, **110**, 229-234.
- **Siebert P.D., Huang B.C.B.** (1997). Identification of an alternative form of human lactoferrin mRNA that is expressed differentially in normal tissues and tumor-derived cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2198-2203.
- **Siemion I.Z., Slon J., Wieczorek Z.** (1995). The immunosuppressive mini-domain of human lactoferrin. *J. Peptide Sci.*, **1**, 295-302.
- **Slater K., Fletcher J.** (1986). Lactoferrin derived from neutrophils inhibits the mixed lymphocyte reaction. *Blood*, **69**, 1328-1333.

- **Slon J.I., Siemion I.Z., Zimecki M., Wieczorek Z.** (1995). Influence of Lys-residue deletion on the immunomodulatory activity of peptides related to immunosuppressive region of lactoferrin. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **43**, 211-216.
- **Sørensen M., Sørensen S.P.L.** (1939). The protein in whey. *C.R. Trav. Lab. Carlsberg*, **23**, 55-99.
- **Soule H.D., Vasquez J., Long A., Albert S., Brennan M.J.** (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, **51**, 1409-1416.
- **Spik G., Strecker G., Fournet B., Bouquelet S., Montreuil J., Dorland L., van Halbeek H., Vliegenthart J.F.G.** (1982). Primary structure of glycans from human lactoferrin. *Eur. J. Biochem.*, **121**, 413-419.
- **Spik G., Montreuil J., Crichton R.R., Mazurier J.** (1985). Proteins of iron storage and transport, Elsevier, Amsterdam.
- **Spik G., Coddeville B., Montreuil J.** (1988). Comparative study of the primary structures of sero-, lacto- and ovotransferrin glycans from different species. *Biochimie*, **70**, 1459-1469.
- **Spik G., Legrand D., Leveugle B., Mazurier J., Mikogami T., Montreuil J., Pierce A., Rochard E.** (1993). Binding properties of different lactotransferrins to human lactotransferrin receptor. *In « New perspectives in infant nutrition : Symposium Antwerpen »*. Ed Sawatzki, G. Stuttgont : Georg Thieme Verlog, pp. 77-83.
- **Superti F., Ammendolia M.G., Valenti P., Seganti L.** (1997). Antirotaviral activity of milk proteins: lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29. *Med. Microbiol. Immunol.*, **186**, 83-91.
- **Tanaka N., Ishihara M., Lamphier M.S., Nozawa H., Matsuyama T., Mak T.W., Aizawa S., Tokino T., Oren M., Taniguchi T.** (1996). Cooperation of the tumour suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage. *Nature*, **382**, 816-818.
- **Teng C.T., Walker M.P., Bhattacharya S.N., Klapper D.G., DiAugustine R.P., McLachlan J.A.** (1986). Purification and properties of an estrogen-stimulated mouse uterine glycoprotein (approx. 70 kDa). *Biochem. J.*, **240**, 413-422.
- **Teng C.T., Pentecost B.T., Marshall A., Salomon A., Bowman B., Lalley P., Naylor S.** (1987). Assigment 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 expression in the mouse uterus and mammary gland. *Endocrinology*, **124**, 922-999.
- **Teng C.T., Liu Y.H., Yang N., Walmer D., Panella T.** (1992). Differential molecular mechanism of the estrogen action that regulates lactoferrin gene in human and mouse. *Mol. Endocrinol.*, **6**, 1969-1981.
- **Teng C.T.** (1995). Mouse lactoferrin gene: a marker for estrogen and epidermal growth factor. *Environ. Health Perspect.*, **103**, 17-20.
- **Tomita M., Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K.** (1991). Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.*, **74**, 4137-4142.
- **Tomita M., Takase M., Wakabayashi H., Bellamy W.** (1994). Antimicrobial peptides of lactoferrin. *In Lactoferrin: Structure and Function.* Eds. Hutchens T.W. *et al.*, Plenum Press, New York, pp 200-209.
- **Toyoshima H., Hunter T.** (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*, **78**, 67-74.
- **Trinchieri G., Matsumoto-Kobayashi M., Clark S.C., Shachra J., London L., Perussia B.** (1984). Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin-2. *J. Exp. Med.*, **160**, 1147-1169.
- **Trinchieri G.** (1989). Biology of human natural killer cells. *Adv. Immunol.*, **47**, 187-376.
- **Trybala E., Bergstrom T., Svennerholm B., Jeansson S., Gloriosos J.C., Olofsson S.** (1994). Localization of a functional site of herpes simplex virus type 1 glycoprotein C involved in binding to cell surface heparan sulphate. *J. Gen. Virol.*, **75**, 743-752.
- **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.
- **Valiante N.M., Trinchieri G.** (1993). Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **178**, 1397-1406.
- **Valles A.M., Boyer B., Badet J., Tucker G.C., Barritault D., Thiery J.P.** (1990). Acidic fibroblast growth factor is a modulator of epithelial plasticity in a rat bladder carcinoma cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1124-1128.

- **Van Berkel P.H.C., van Veen H.A., Geerts M.E.J., de Boer H.A., Nuijens J.H.** (1996). Heterogeneity in utilization of N-glycosylation sites Asn^{624} and Asn^{138} in human lactoferrin : a study with glycosylation-site mutants. *Biochem. J.*, **319**, 117-122.
- **Van Gut H., Van Gool J., Ladiges N.C.J.J., Boers W.** (1975). Lactoferrin in rabbit bile : its relation to iron metabolism. *Q. J. Exp. Pysiol.*, **60**, 79-88.
- **Van Snick J.L., Masson P.L., Heremans J.L.** (1974). The involvement of lactoferrin in the hyposideremia of acute inflammation. *J. Exp. Med.*, **140**, 1068-1084.
- **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.** (1977). The ingestion of human lactoferrin by mouse peritoneal macrophages and the transfer of its iron to ferritin. *J. Exp. Med.*, **146**, 817-827.
- **Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C.** (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometry detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods*, **184**, 39-51.
- **Walmer D.K., Padin C.J., Wrona M.A., Healy B.E., Bentley R.C., Tsao M.S., Kohler M.F., McLachlan J.A., Gray K.D.** (1995). Malignant transformation of the human endometrium is associated with overexpression of lactoferrin messenger RNA and protein. *Cancer Res.*, **55**, 1168-1175.
- **Wang J., Chenivesse X., Henglein B., Brechot C.** (1990). Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature*, **343**, 555-557.
- **Wang X., Gorospe M., Huang Y., Holbrook N.J.** (1997). p27Kip1 overexpression causes apoptotic death of mammalian cells. *Oncogene*, **15**, 2991-2997.
- **Waterfield M., Scrace G., Whittle N., Stroobant P., Johnson A., Wasteson A., Westermark B., Heldin C.H., Huang J.S., Deuel T.F.** (1983). Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein $p28^{sis}$ of simian sarcoma virus. *Nature*, **304**, 35-39.
- **Weinberg R.A.** (1995a). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, **81**, 323-330.
- **Weinberg R.A.** (1995b). The retinoblastoma gene and cell control. *Cell*, **81**, 669-671.
- **Weintraub S.J., Prater C.A., Dean D.C.** (1992). Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature*, **358**, 259-261.

- **West C.M., de Weerd H., Dowdy K., de la Paz A.** (1984). A specificity for cellular fibronectin in its effect on cultured chondroblasts. *Differentiation*, **27**, 67-73.
- **Wice B.M.L., Trugnan G., Pinto M., Rousset M., Chevalier G., Dussaulx E., Lacroix B., Zweibaum A.** (1985). The intracellular accumulation of UDP-N-acetylhexosamines is concomitant with the inability of human cancer colon cell to differentiate. *J. Biol. Chem.*, **260**, 139-146.
- **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.
- **Wlaszczyk A., Zimecki M., Adamik B., Durek G., Kubler A.** (1998). Immunological status of patients subjected to cardiac surgery: effect of lactoferrin on proliferation and production of interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha by peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (Warsz), **45**, 201-212.
- **Wölfel T., Hauer M., Schneider J., Serrano M., Wölfel C., Klehmann-Hieb E., De Plaen E., Hankeln T., Meyer zum Büschenfelde K., Beach D.** (1995). A $p16^{INK4a}$-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in human melanoma. *Science*, **269**, 1281-1284.
- **Wrba F., Reiner A., Ritzinger E., Reiner G., Holzner J.H.** (1986). Immunohistochemie von alfa-laktalbumin, laktoferrin und transferrinrezeptor in invasiven mammakarzinomen unter berucsichtigung von tumorgrading, ostrogenrezeptorstatus und staging. *Verh. Dtsch. Ges. Path.*, **70**, 247-250.
- **Wu H.F., Monroe D.M., Churh F.C.** (1995). Characterization of the glycosaminoglycan-binding region of lactoferrin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **317**, 85-92.
- **Wu G., Ruan C., Drouet L., Caen J.** (1992). Inhibition effects of KRDS, a peptide derived from lactotransferrin, on platelet function and arterial thrombus formation in dogs. *Haemostasis*, **22**, 1-6.
- **Wurster K., Heberling D., Rapp W.** (1980). Carcinoembryonic antigen (CEA) and lactoferrin (LF) in benign and malignant disease of the breast. A contribution to the immunohistochemical demonstration of marker substances. *Geburtshulfe Frauenheilk*, **40**, 412-422.

- **Yamamoto K.R.** (1985). Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu. Rev. Genet.*, **19**, 209-252.
- **Yan G., Fukabori Y., McBride G., Nikolaropolou S., McKeehan W.** (1993). Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 4513-4522.
- **Yang N., Teng C.T.** (1994). Identification of COUP-TF binding element in the human lactoferrin promoter. *Endocrine J.*, **2**, 241-248.
- **Yang N., Shigeta H., Shi H., Teng C.T.** (1996). Estrogen-related receptor, hERR1, modulates estrogen receptor-mediated response of human lactoferrin gene promoter. *J. Biol. Chem.*, **271**, 5795-5804.
- **Yoo Y.C., Watanabe S., Watanabe R., Hata K., Shimazaki K.I., Azuma I.** (1997). Bovine lactoferrin and lactoferricin, a peptide derived from bovine lactoferrin, inhibit tumor metastasis in mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, **88**, 184-190.
- **Zagulski T., Lipinski P., Zagulska A., Broniek S., Jarzabek 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.
- **Zeng Y.X., El Deiry W.S.** (1996). Regulation of p21WAF1/Cip1 expression by p53-independent pathways. *Oncogene*, **12**, 1557-1564.
- **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.
- **Ziere G.J., Kruijt J.K., Bijsterbosch M.K., van Berkel T.J.C.** (1996). Recognition of lactoferrin and aminopeptidase M-modified lactoferrin by the liver: involvement of proteoglycans and the remnant receptor. *Biochem. J.*, **313**, 289-295.
- **Zimecki M., Mazurier J., Machnicki M., Wieczorek Z., Montreuil J., Spik G.** (1991). Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4- CD8- murine thymocytes. *Immunol. Lett.*, **30**, 119-124.
- **Zimecki M., Wlaszczyk A., Zagulski T., Kubler A.** (1998). Lactoferrin lowers serum interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha levels in mice subjected to surgery. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (Warsz), **46**, 97-104.
- **Zou S., Magura C.E., Hurley W.L.** (1992). Heparin-binding properties of lactoferin and lysozyme. *Comp. Biochem. Physiol. [B]*, **103**, 889-895.

- **Zucali J.R., Broxmeyer H.E., Levy D., Morse C.** (1989). Lactoferrin decreases monocyte-induced fibroblast production of myeloid colony-stimulating actvity by suppressing monocyte release of interleukin-1. *Blood*, **74**, 1531-1538.
- **Zweibaum A., Pinto M., Chevalier G., Dussaulx E., Triadou N., Lacroix B., Haffen K., Brun J., Rousset M.** (1985). Enterocytic differentiation of subpopulation of the human colon tumor cell line HT29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. *J. Cell Physiol.*, **122**, 21-29.