

Université des Sciences et Technologies de Lille

THESE

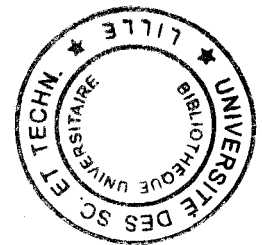
présentée par

Carine FILLEBEEN

pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université

Option : Sciences de la Vie et de la Santé



La lactoferrine cérébrale :

**Origines et mécanismes d'accumulation au
cours des maladies neurodégénératives**

Soutenue le 6 juillet 1999 devant la commission d'examen :

Président : Professeur André VERBERT

Rapporteurs : Docteur David DEXTER

Professeur François LASBENNES

Examineurs : Professeur Marie-Madeleine RUCHOUX

Professeur Roméo CECHELLI

Professeur Geneviève SPIK

Docteur Annick PIERCE

Ce travail a été réalisé sous la direction du Docteur Annick Pierce dans le laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Unité Mixte de Recherche N° 8576 du CNRS, Directeur : Professeur André Verbert).

Il a bénéficié d'une Allocation du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

A Paolo,

*A Rémy, Lucas, Julie et Clara les petits monstres
et leurs parents,*

A mes parents,

*Avec toute mon affection et ma reconnaissance
pour m'avoir soutenue et encouragée tout au long de mes études.*

Je remercie vivement les membres de ce jury,

Monsieur le Professeur André Verbert,

Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire. Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et soyez assuré de ma profonde gratitude.

Annick,

Tu as dirigé ce travail durant ces quatre années : ton expérience scientifique, ton énergie et tes nombreux conseils m'ont énormément apporté. Je voudrais que tu trouves dans ces quelques lignes toute l'expression de mes remerciements pour ta grande disponibilité, ta patience et la confiance que tu m'as témoignée. Sois assurée de ma sincère reconnaissance et amitié.

Madame le Professeur Geneviève Spik,

Je vous remercie très sincèrement de m'avoir accueillie au sein de votre équipe et de m'avoir soutenue et accordé votre confiance au cours de ces années. Je vous en suis très reconnaissante.

Monsieur le Docteur François Lasbennes,

Je suis particulièrement honorée que vous ayez accepté avec bienveillance de juger cette thèse en qualité de rapporteur. Soyez assuré de mes profonds remerciements.

Monsieur le Docteur David Dexter,

Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour avoir accepté de juger ces travaux que vous avez toujours suivis avec beaucoup d'intérêt. Votre venue en tant que rapporteur m'honore. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et soyez assuré de ma profonde gratitude.

Roméo,

Je tiens à te remercier de m'avoir accueillie au sein de ton équipe. Tes compétences scientifiques en terme de « BHE » m'ont beaucoup appris et permis de mener à bien cette partie de mon travail qui je l'espère se poursuivra. Aussi je te remercie d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Madame le Professeur Marie-Madeleine Ruchoux,

Je trouve ici l'occasion de vous remercier d'avoir suivi mes travaux avec beaucoup d'intérêt, en me prodiguant des conseils toujours bienveillants et en me consacrant votre temps si précieux. Vous me faites l'honneur et le plaisir de siéger dans ce jury, soyez assurée de ma respectueuse et très sincère gratitude.

Je tiens également à remercier tout particulièrement,

Tous les membres de l'équipe « **lacto** » pour leur soutien et la gentillesse qu'ils me témoignent, *Dominique* et *Mazu* pour leurs incontournables discussions, *Elisabeth* pour ses petits moments de stress, *Sophie* pour son imperturbable calme.

Monique, ma compagne de paillasse qui m'a initiée à la **B.M.**, pour ta gentillesse et ta grande disponibilité.

Maryse, pour ton aide précieuse dans la correction orthographique de cette thèse et d'autres de mes petites « bafouilles ».

Marie-Christine, qui m'a initiée aux techniques d'études des protéines lors de mes premiers pas dans le domaine de la recherche.

Isabelle, *Mathieu*, *Fabrice* et *Sandrine*, mes compagnons de bureau et de discussions hautement « scientifiques » que nous avons pu avoir dans cette pièce très prisée, pour les bons moments que nous avons partagés.

Sans oublier les petits *DEA* qui un jour deviendront grands ...

Mais également tous *les ex-membres de l'équipe*, sans les citer pour n'oublier personne. Ces quelques années à travailler à vos côtés furent un réel plaisir. Trouvez ici l'expression de toute ma sympathie.

Silvia, *Marie-Ange*, *Sandrine*, *Isabelle*, *Vincent*, *Frédéric P*, *Eric*, *Frédéric K*, *Christophe* ... et bien d'autres encore pour leur soutien, leur amitié et tous les bons moments que nous avons passés ensemble et ceux à venir.

Les membres de l'équipe « **BHE** »,

Marie-Pierre, pour ta gentillesse, ton exceptionnelle disponibilité et tes précieux conseils. Trouve ici tous mes remerciements et l'expression de mon plus profond respect.

Et, plus particulièrement, *Laurence F, Laurence D, Christian et Joëlle* pour m'avoir si gentiment accueillie au sein de leur équipe depuis 2 ans mais également pour leurs nombreux conseils, leur disponibilité et leur bonne humeur quotidienne. Travailler à vos côtés a été un grand plaisir.

Jean-Marc pour la réalisation de nombreuses photos.

Les membres du laboratoire du *Professeur Jean-Claude Beauvillain*,

Valérie, qui m'a initiée aux techniques histologiques et plus particulièrement à l'hybridation *in situ*. Pour avoir su me faire profiter de tes compétences scientifiques et pour ta disponibilité, je te remercie sincèrement.

Sébastien, Vincent et les autres, pour m'avoir si chaleureusement accueillie au sein de votre laboratoire. Je tiens à vous remercier pour vos conseils scientifiques, votre aide technique et votre sympathie.

Enfin, je tiens à remercier tous les membres du **C9** qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, pour leur sympathie et leur encouragement tout au long de ces années.

RÉSUMÉ

Les mécanismes neuropathologiques impliqués dans les maladies dégénératives du système nerveux central (SNC) sont encore mal connus, cependant certains d'entre eux font intervenir un stress oxydatif. Ces processus neurodégénératifs vont également générer des foyers inflammatoires importants. La lactoferrine, qui est associée aux lésions caractéristiques de différentes maladies neurodégénératives, semble être impliquée dans ces processus eux-mêmes, mais également au niveau des réactions inflammatoires qu'ils génèrent. De manière à définir le rôle de la lactoferrine cérébrale, il était indispensable d'identifier son ou ses origines, ainsi que les mécanismes qui aboutissent à son accumulation en conditions pathologiques. Ainsi, nous avons montré que cette origine était double, à la fois périphérique et locale.

La lactoferrine traverse la barrière hémato-encéphalique (BHE). L'utilisation d'un modèle *in vitro* de BHE nous a permis de mettre en évidence son transport au travers des cellules endothéliales de capillaires cérébraux. Ce transport explique la présence de cette protéine dans le SNC et tout particulièrement au niveau des capillaires cérébraux. Nous avons ensuite montré que ce transport était augmenté en conditions inflammatoires, aboutissant à l'accumulation de la lactoferrine dans le compartiment cérébral. Cette accumulation pourrait mener à l'augmentation du taux de lactoferrine observée au niveau des lésions caractéristiques de différentes maladies neurodégénératives.

La lactoferrine est synthétisée *in situ* au niveau du mésencéphale par des cellules microgliales activées pigmentées. L'utilisation d'un modèle animal de la maladie de Parkinson nous a ensuite permis de mettre en évidence l'augmentation de cette expression en conditions pathologiques. Le processus neuropathologique à l'origine de cette maladie semble faire intervenir un stress oxydatif. La lactoferrine pourrait donc être produite et s'accumuler en réponse à ce stress.

ABSTRACT

The mechanisms responsible for the neuronal death in neurodegenerative disorders are not well understood. Among the risk factors, oxidative stress and alterations in iron metabolism have been pointed out. These neuropathological processes lead to the generation of major inflammatory foci. Several lines of evidence indicate that excessive iron deposits and/or immune-mediated pathophysiology might contribute to neuronal loss. Recently, lactoferrin, an iron-binding protein and a modulatory agent of the inflammatory response has been associated with these pathologies. In order to determine the function of lactoferrin in the central nervous system (CNS), we first determined the origin of the brain lactoferrin, and further investigated the mechanisms by which lactoferrin accumulates in pathological conditions. We have shown that the source of lactoferrin in brain tissues is double originating either from the circulating blood or is synthesized *in situ*.

Lactoferrin crosses the blood-brain barrier (BBB). An *in vitro* model of the BBB was used to characterize the transport of lactoferrin through the brain capillary endothelial cells. This transport explains the presence of lactoferrin in the CNS, particularly in brain capillaries. We next showed that this transport was increased in inflammatory conditions, leading to lactoferrin accumulation in the cerebral compartment. This accumulation may account for the increased level of lactoferrin observed in the vicinity of the characteristic lesions in the neurodegenerative disorders.

Lactoferrin is synthesized *in situ* in the mesencephalon by pigmented activated microglial cells. An animal model of Parkinson's disease was used to study the expression of lactoferrin in pathological conditions. Lactoferrin expression was increased after treatment with MPTP which is selectively toxic to the dopaminergic neurons, suggesting that lactoferrin might be produced in response to the oxidative stress generated by the neurodegenerative process occurring in Parkinson's disease.

ABREVIATIONS

ADCC	: antibody dependent cell cytotoxicity
ADP	: adénosine diphosphate
AMPc	: adénosine monophosphate cyclique
AR	: acide rétinoïque
BHE	: barrière hémato-encéphalique
VLDL	: very low density lipoprotein
CAT	: chloremphenicol acetyl transferase
CD	: cluster of differentiation
COUP	: chicken ovalbumin upstream promoter
CMH	: complexe majeur d'histocompatibilité
EDTA	: acide éthylène diamine tétracétique
EGF	: epidermal growth factor
FBP	: ferric ion binding protein
FGF	: fibroblast growth factor
FITC	: fluorescéine isothyocyanate
GAG	: glycosaminoglycane
G-CSF	: granulocyte-colony stimulating factor
GFAP	: glial fibrillary acidic protein
GM-CSF	: granulocyte/macrophage-colony stimulating factor
HCMV	: cytomégalovirus humain
HIV	: virus de l'immunodéficience humaine
HSV	: virus de l'herpès
ICAM	: intercellular adhesion molecule
IFN	: interféron
Ig	: immunoglobuline
IGF	: insulin-like growth factor
IL	: interleukine
kb	: kilobase
kD	: constante de dissociation
kDa	: kilodalton
Lbp	: lactoferrin binding protein
LBP	: lipopolysaccharide binding protein
LCR	: liquide céphalo-rachidien
LDL	: low density lipoprotein
Lf	: lactoferrine
LIF	: leukocyte migration inhibitory factor
LPS	: lipopolysaccharide
LRP	: lipoprotein receptor-related protein
MCMV	: cytomégalovirus murin
MPP+	: ion 1-méthyl-4-phénylpyridium
MPTP	: 1-méthyl-4-phényl-1,2,2,6-tétrahydropyridine
NGF	: nerve growth factor
NK	: natural killer
PBS	: phosphate buffer saline

pb : paire de bases
PHA : phyto-hémagglutinine
PMA : phorbol 12-myristate-13-acetate
RAP : receptor associated protein
RT-PCR : reverse transcription polymerase chain reaction
SNC : système nerveux central
TGF : transforming growth factor
TNF : tumor necrosis factor
ZO : zonula occludentes

SOMMAIRE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 :	Distribution de la lactoferrine dans le système nerveux central sain ou pathologique.	13
Figure 2 :	Représentation schématique des éléments régulateurs putatifs de la région 5' flanquante du gène de la lactoferrine murine (Teng, 1995).	17
Figure 3 :	Structure tridimensionnelle de la lactoferrine humaine.	25
Figure 4 :	Représentation schématique de la structure du site de fixation du fer de la lactoferrine humaine (Anderson <i>et al.</i> , 1987, 1989, 1994).	27
Figure 5 :	Sites de reconnaissance de la lactoferrine avec ses ligands.	31
Figure 6 :	Distribution des différents récepteurs de la lactoferrine sur les cellules du système nerveux central.	47
Figure 7 :	Implication de la lactoferrine dans le processus inflammatoire.	69
Figure 8 :	Formation des radicaux libres dans les neurones dopaminergiques (d'après Gerlach <i>et al.</i> , 1994).	73
Figure 9 :	Boucle hypothétique qui pourrait être responsable de la mort neuronale dans certaines maladies neurodégénératives (d'après McGeer et McGeer, 1995).	80
Figure 10 :	Origines potentielles de la lactoferrine dans le système nerveux central sain.	84
Figure 11 :	Structure des capillaires cérébraux (Goldstein et Betz, 1986).	86
Figure 12 :	Place stratégique des astrocytes au sein du SNC (Goldstein et Betz, 1986).	89
Figure 13 :	Modèle <i>in vitro</i> de barrière hémato-encéphalique : coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux (microscopie à contraste de phase) et d'astrocytes (immunomarquage fluorescent de la GFAP). Barres d'échelle = 100 μ m.	96

Figure 14 :	Transport de la lactoferrine au niveau des cellules endothéliales de capillaires cérébraux.	106
Figure 15 :	Activation du modèle <i>in vitro</i> de barrière hémato-encéphalique par la cytokine pro-inflammatoire TNF- α .	109
Figure 16 :	Processus d'accumulation de la lactoferrine dans le parenchyme cérébral au niveau de lésions neuropathologiques à caractères inflammatoires.	141
Figure 17 :	Coupe latérale du SNC humain présentant le système nigro-striatal qui est à la base des relations existant entre le striatum et la substance noire.	144
Figure 18 :	Mécanisme hypothétique de la formation de la 5-S-cystéinyldopamine et de l'accumulation de neuromélanine.	146
Figure 19 :	Mécanismes potentiels de l'action neurotoxique du MPTP sur les neurones dopaminergiques (d'après Gerlach et Riederer, 1996).	169
Figure 20 :	Rôle potentiel de la lactoferrine dans le processus de détoxification mis en place afin de lutter contre le stress oxydatif généré par le processus neurodégénératif.	204

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
GENERALITES	7
I. LA LACTOFERRINE	7
A. Distribution tissulaire et cellulaire de la lactoferrine	7
1. La lactoferrine issue des cellules épithéliales	7
a. <i>La glande mammaire</i>	7
• Le lait	7
• Les cellules épithéliales de la glande mammaire	8
b. <i>L'endomètre</i>	8
c. <i>L'appareil digestif</i>	9
2. La lactoferrine issue des leucocytes	9
a. <i>Le sang</i>	9
b. <i>Les cellules myéloïdes</i>	10
3. La lactoferrine de système nerveux central	10
a. <i>Le liquide céphalo-rachidien</i>	10
b. <i>Le système nerveux central sain</i>	11
c. <i>Le système nerveux central pathologique</i>	12
B. Biosynthèse de la lactoferrine	15
1. Gène de la lactoferrine	15
2. Régulation du gène de la lactoferrine	18
a. <i>Régulation au cours de la différenciation</i>	18
• Régulation au cours de la myélopoïèse	18
• Régulation au cours de modifications morphologiques	20
b. <i>Régulation hormonale</i>	20
• Régulation hormonale dans la glande mammaire	20
• Régulation hormonale dans l'utérus	21
c. <i>Régulation au cours d'un stress oxydatif</i>	23
d. <i>Régulation transcriptionnelle</i>	23
C. Structure de la lactoferrine	23
1. Séquence de la lactoferrine	23
a. <i>Séquence primaire de la lactoferrine</i>	23
b. <i>Structure tridimensionnelle de la lactoferrine</i>	24
c. <i>Les sites de fixation du fer de la lactoferrine</i>	26
d. <i>Les glycanes de la lactoferrine</i>	28
2. Sites de reconnaissance de la lactoferrine avec ses ligands	29
a. <i>Zone d'interaction de la lactoferrine avec le récepteur lymphocytaire</i>	29
b. <i>Zone d'interaction de la lactoferrine avec les protéoglycannes</i>	30
c. <i>Zone d'interaction de la lactoferrine avec le LRP (Lipoprotein Receptor-related Protein)</i>	32
d. <i>Zone d'interaction de la lactoferrine avec les lipopolysaccharides</i>	33

II. LES RECEPTEURS DE LA LACTOFERRINE	34
A. Interaction de la lactoferrine avec des molécules de surface ubiquitaires	34
1. Les protéoglycannes	34
2. Les lectines	35
3. Les composés acides	35
B. Interaction de la lactoferrine avec les cellules de l'organisme	36
1. Les hépatocytes	36
a. <i>Le LRP</i>	36
b. <i>Le récepteur des asialoprotéines</i>	37
2. Les entérocytes	38
3. Les cellules épithéliales de la glande mammaire	41
4. Les cellules de la circulation sanguine	42
a. <i>Les neutrophiles</i>	42
b. <i>Les monocytes/macrophages</i>	43
c. <i>Les lymphocytes</i>	44
d. <i>Les plaquettes/mégacaryocytes</i>	45
5. Les cellules du système nerveux central	46
C. Interaction de la lactoferrine avec des micro-organismes	48
1. Les bactéries	48
2. Les parasites	49
III. LES ROLES BIOLOGIQUES DE LA LACTOFERRINE	50
A. Effet antiviral de la lactoferrine	50
B. Effets antibactérien et antifongique	52
1. Activités bactériostatique et bactéricide	52
2. Activité antifongique	53
C. Modulation de la prolifération cellulaire	54
D. Régulation de la myélopoïèse	55
E. Implication dans le système immunitaire	56
1. Maturation des lymphocytes	56
2. Modulation de la synthèse d'anticorps	57
3. Modulation de l'activité cytotoxique des cellules mononucléées du sang	57
a. <i>Modulation de l'activité cytotoxique des cellules NK</i>	57
b. <i>Modulation de l'activité cytotoxique des monocytes</i>	58
F. Implication dans la réponse inflammatoire	59
1. Modulation de la migration des cellules immunitaires sur le lieu de l'infection	60

2. Modulation de l'activation des cellules immunitaires par les LPS	61
<i>a. Modulation de l'activation des monocytes/macrophages</i>	62
<i>b. Modulation de l'activation des neutrophiles</i>	62
3. Modulation des dommages oxydatifs liés à l'activation des cellules phagocytaires	63
4. Modulation de l'activation des monocytes/macrophages	64
5. Implication dans l'hyposidérémie inflammatoire	65
6. Modulation de la production de cytokines	65
7. Modulation de l'activation du complément	67
8. Modulation du processus de coagulation	67
9. Conclusion	68
G. Lactoferrine et maladies neurodégénératives	70
1. Les processus neurodégénératifs	70
<i>a. Implication du peptide β-amyloïde dans la maladie d'Alzheimer</i>	71
<i>b. Implication du fer et du stress oxydatif dans la maladie de Parkinson</i>	72
2. Inflammation et maladies neurodégénératives	75
<i>a. Les cellules microgliales</i>	76
<i>b. Les astrocytes</i>	77
<i>c. Les cytokines pro-inflammatoires</i>	78
<i>d. Le complément</i>	79
<i>e. Conclusion</i>	79
OBJECTIFS	82
TRAVAUX PERSONNELS	85
I. ETUDE DU TRANSPORT DE LA LACTOFERRINE A TRAVERS LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE	85
Introduction	85
A. La barrière hémato-encéphalique	85
1. Les jonctions serrées	87
2. Caractéristiques métaboliques	87
3. Induction des propriétés de la BHE	88
B. Mécanismes de transport spécifique à travers la BHE	89
1. Transport des ions, du glucose et des acides aminés	89
2. Transport des peptides, protéines et lipoprotéines	90
3. Structures cellulaires impliquées dans les transports spécifiques	91
C. BHE, inflammation et maladies neurodégénératives	92
1. Cytokines et maladies neurodégénératives	92

2. Origine des cytokines impliquées dans l'inflammation cérébrale	93
3. Cytokines et BHE	94
Conclusion	95
<u>Article 1</u> : Transcytose de la lactoferrine à travers la barrière hémato-encéphalique	96
Introduction	96
Résultats	98
Conclusion	105
<u>Article 2</u> : Le TNF-α augmente le transport de la lactoferrine à travers la barrière hémato-encéphalique	108
Introduction	108
Résultats	110
Conclusion	140
II. ETUDE DE LA SYNTHÈSE <i>IN SITU</i> DE LA LACTOFERRINE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL	143
Introduction	143
A. Les neurones dopaminergiques mélanisés	144
1. Caractéristiques des neurones dopaminergiques mélanisés	144
2. La neuromélanine	145
3. Fonction de la substance noire	147
B. Les cellules microgliales	148
1. Caractéristiques des cellules microgliales	148
2. Origine des cellules microgliales	149
3. Fonction des cellules microgliales	150
Conclusion	150
<u>Article 3</u> : Etude de l'expression de la lactoferrine dans le mésencéphale humain	151
Introduction	151
Matériels et méthodes	151
Préparation des coupes de cerveau humain	151

Immunohistochimie	152
Hybridation <i>in situ</i>	153
Préparation et marquage de la lactoferrine humaine	154
Fixation de la lactoferrine humaine sur mélanine immobilisée	154
Résultats	155
Localisation cellulaire de la lactoferrine dans le mésencéphale	155
Expression de la lactoferrine dans le mésencéphale	157
Identification des cellules qui expriment les messagers de la lactoferrine dans le mésencéphale	159
Interaction de la lactoferrine avec la mélanine	159
Conclusion	164
<u>Article 4</u> : La lactoferrine est synthétisée par le cerveau de souris et son expression est augmentée après un traitement au MPTP	168
Introduction	168
Résultats	170
Conclusion	203
CONCLUSION GENERALE	206
BIBLIOGRAPHIE	211

INTRODUCTION

Le système nerveux central (SNC) est la cible de pathologies dégénératives diverses qui touchent une proportion de la population de plus en plus importante. A l'heure actuelle, les progrès en matière de médecine permettent chaque jour d'augmenter l'espérance de vie de la population. Cependant, ce phénomène est à l'origine d'un véritable problème de santé publique lié au vieillissement de la population. En effet, ce vieillissement s'accompagne de processus neurodégénératifs qui sont à la base de différents désordres neuropathologiques. Ces affections sont particulièrement préoccupantes en raison de leur évolution progressive et inexorable et du handicap moteur et/ou intellectuel qui en résulte. En raison de leur apparition à un âge tardif, les conséquences sociales, et donc d'économie de santé, en font une des priorités pour la recherche médicale dans nos sociétés. Or, les mécanismes impliqués dans ces maladies neurodégénératives sont encore très mal connus ce qui réduit les possibilités thérapeutiques.

Récemment, plusieurs auteurs ont mis en évidence la présence de la lactoferrine dans le SNC et tout particulièrement au niveau des lésions caractéristiques de différentes maladies neurodégénératives. Ainsi, la lactoferrine et son récepteur sont localisés dans le mésencéphale de patients sains et plus précisément dans les neurones dopaminergiques de la substance noire et de l'aire tegmento-ventrale (Leveugle *et al.*, 1996 ; Faucheux *et al.*, 1995). Par ailleurs, le taux de lactoferrine et de son récepteur est augmenté chez des patients atteints de la maladie de Parkinson, et notamment dans les neurones dopaminergiques survivants (Leveugle *et al.*, 1996 ; Faucheux *et al.*, 1995), cette population neuronale étant fortement affectée lors de la maladie de Parkinson. La lactoferrine s'accumule également au niveau des capillaires cérébraux et des lésions neuropathologiques qui sont caractéristiques de désordres dégénératifs du SNC, tels que la maladie d'Alzheimer, la trisomie 21, le syndrome de l'île de Guam, la maladie de Pick et la sclérose latérale amyotrophique (Leveugle *et al.*, 1994).

Une augmentation du taux de lactoferrine apparaît donc dans le SNC lors de maladies neurodégénératives. Cette observation nous amène à penser que la lactoferrine pourrait jouer un rôle important dans le SNC et être associée aux processus neurodégénératifs. Les régions affectées par les lésions neuropathologiques sont le siège de réactions inflammatoires importantes et d'un stress oxydatif qui pourraient être en relation avec le métabolisme de la lactoferrine. Ces découvertes posent des questions quant à l'origine et à

la fonction biologique de la lactoferrine présente dans le SNC, et tout particulièrement au niveau des lésions neuropathologiques.

La lactoferrine a été caractérisée dans un premier temps dans tous les milieux de sécrétion et plus particulièrement à la surface des muqueuses, puis dans un second temps dans le sang. La lactoferrine, stockée dans les granules secondaires des leucocytes neutrophiles (Masson *et al.*, 1969), est libérée dans la circulation après dégranulation des neutrophiles au niveau des sites inflammatoires. Les rôles de la lactoferrine dans le compartiment sanguin et au niveau des surfaces sécrétrices ne sont pas encore bien définis. Cependant, la lactoferrine est impliquée dans les mécanismes de défense de l'organisme et semble intervenir à chacune des étapes clés du processus inflammatoire. Son action permettrait de protéger les tissus sains bordant le foyer infectieux du stress oxydatif généré par les réactions inflammatoires. Il pourrait bien exister un lien entre la fonction de la lactoferrine cérébrale et l'état inflammatoire et oxydatif rencontré lors de certaines maladies dégénératives du SNC. Afin de répondre à ces questions, le travail qui nous a été confié s'attachait à établir l'origine de la lactoferrine cérébrale et à définir les mécanismes qui aboutissent à l'accumulation de la lactoferrine au niveau des régions affectées par les processus neurodégénératifs.

Deux hypothèses peuvent être proposées quant à l'origine de la lactoferrine cérébrale : une origine périphérique et/ou une origine locale.

Afin de vérifier la première hypothèse, selon laquelle la lactoferrine pourrait être apportée au SNC par la circulation, nous avons étudié son transport à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette barrière, qui sépare le compartiment sanguin du parenchyme cérébral, protège le SNC des modifications de la composition du plasma afin de maintenir les fonctions cérébrales. Les capillaires cérébraux constituent le support anatomique de cette barrière. Les travaux ont été entrepris en collaboration avec le groupe du Professeur Cecchelli qui a mis au point un modèle *in vitro* de BHE, reconstituée par la co-culture de part et d'autre d'un filtre de cellules endothéliales de capillaires cérébraux (compartiment vasculaire) et de cellules gliales (compartiment cérébral).

Les maladies neurodégénératives présentent des perturbations des propriétés de barrière de l'endothélium vasculaire cérébral, ainsi qu'un caractère inflammatoire

indéniable. Il nous semblait donc intéressant d'étudier les conséquences d'un état inflammatoire sur le transport de la lactoferrine à travers la BHE, et plus particulièrement par l'intermédiaire des médiateurs de l'inflammation. En effet, les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α sont impliquées dans la pathogenèse des infections du SNC et dans les modifications de perméabilité vasculaire caractéristique des pathologies cérébrales. Ainsi, l'activation du modèle *in vitro* de BHE par le TNF- α nous a permis d'étudier les cellules endothéliales cérébrales dans un état proche de celui d'un stress inflammatoire, qui pourrait aboutir à l'accumulation de la lactoferrine au cours de certaines maladies neurodégénératives.

Afin de vérifier la seconde hypothèse, selon laquelle la lactoferrine pourrait être synthétisée par des cellules spécialisées *in situ* dans le SNC, nous avons étudié l'expression de la lactoferrine dans le SNC, et tout particulièrement dans la région du mésencéphale qui présente de nombreuses cellules immunomarquées par la lactoferrine. De manière à identifier la ou les populations cellulaires responsables de sa synthèse cérébrale, la distribution cellulaire précise de la lactoferrine a été déterminée. L'expression des messagers de la lactoferrine a ensuite été étudiée.

L'accumulation de lactoferrine, observée au niveau de lésions caractéristiques de différentes neuropathologies, pourrait être due à une stimulation de la production de lactoferrine *in situ* en réponse au stress oxydatif induit par le processus neurodégénératif. Ce phénomène pourrait témoigner de l'intervention de la lactoferrine dans le processus de détoxification mis en œuvre afin de lutter contre ce stress oxydatif. Il était donc intéressant d'étudier l'expression de la lactoferrine dans le SNC pathologique, et plus particulièrement dans le cas de la maladie de Parkinson où le stress oxydatif semble être fortement impliqué. Ainsi, l'utilisation de souris traitées au MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine), puissant neurotoxique sélectif des neurones dopaminergiques, nous a permis de réaliser cette étude sur un modèle animal de la maladie de Parkinson. Parallèlement à cette étude, de manière à montrer le rôle de la lactoferrine dans le processus de détoxification, son expression a été comparée à celle d'enzymes anti-oxydantes.

L'ensemble des travaux que nous avons mené a fait l'objet des publications et des communications suivantes :

Publications

1. **Carine FILLEBEEN**, Laurence DESCAMPS, Marie-Pierre DEHOUCK, Laurence FENART, Monique BENAÏSSA, Geneviève SPIK, Roméo CECHELLI & Annick PIERCE. (1999) Receptor mediated-transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.* **274** : 7011-7017.
2. **Carine FILLEBEEN**, David DEXTER, Valérie MITCHELL, Monique BENAÏSSA, Jean-Claude BEAUVILLAIN, Geneviève SPIK & Annick PIERCE. (1999) Lactoferrin is synthesized by mouse brain tissue and its expression is enhanced after MPTP treatment. Accepté pour publication dans *Mol. Brain Res.*
3. **Carine FILLEBEEN**, Marie-Pierre DEHOUCK, Isabelle DHENNIN-DUTHILLE, Monique BENAÏSSA, Roméo CECHELLI & Annick PIERCE. (1999) TNF- α increases lactoferrin transcytosis through the blood-brain barrier. Soumis à publication dans *J. Neurochem.*

Présentations

Communications par affiche

1. **Annick PIERCE**, Carine FILLEBEEN, Nathalie NILLESSE, Béatrice LEVEUGLE, Baptiste FAUCHEUX, Etienne HIRSCH & Geneviève SPIK
 « *La lactotransferrine et son récepteur sont présents au niveau de lésions pathologiques de nombreux désordres neurodégénératifs.* »
 Deuxièmes rencontres du GDR 1154 : Transport du fer dans les systèmes biologiques. De la chimie de coordination à la biologie moléculaire et cellulaire. Seillac, France, 14-17 février 1996.
2. **Carine FILLEBEEN**, Valérie MITCHELL, Monique BENAÏSSA, Jean-Claude BEAUVILLAIN, Geneviève SPIK & Annick PIERCE
 « *Is the iron binding protein lactoferrin synthesized by mouse brain tissue ?* »
 European Iron Club Meeting. Jaca, Huesca, Spain, 11-14 septembre 1996.

3. Carine FILLEBEEN, Valérie MITCHELL, Monique BENAÏSSA, Jean-Claude BEAUVILLAIN, Geneviève SPIK & Annick PIERCE.
 « *La lactotransferrine est-elle synthétisée par le cerveau de souris ?* »
 Troisièmes rencontres du GDR 1154 : Transport du fer dans les systèmes biologiques. De la chimie de coordination à la biologie moléculaire et cellulaire. Seillac, France, novembre 1996.
4. Carine FILLEBEEN, David DEXTER, Valérie MITCHELL, Monique BENAÏSSA, Jean-Claude BEAUVILLAIN, Geneviève SPIK & Annick PIERCE.
 « *Lactoferrin is synthesized by mouse brain tissue and its expression is enhanced after MPTP treatment.* »
 Quatrièmes rencontres du GDR 1154 : Transport du fer dans les systèmes biologiques. De la chimie de coordination à la biologie moléculaire et cellulaire. Seillac, France, janvier 1998.

Communications orales

1. Carine FILLEBEEN, Valérie MITCHELL, Monique BENAÏSSA, Jean-Claude BEAUVILLAIN, Geneviève SPIK & Annick PIERCE.
 « *Is the iron binding protein lactoferrin synthesized by mouse brain tissue ?* »
 Colloque Lille-ULB, Université libre de Bruxelles, Belgique, 9 janvier 1997.
2. Carine FILLEBEEN, David DEXTER, Valérie MITCHELL, Monique BENAÏSSA, Jean-Claude BEAUVILLAIN, Geneviève SPIK & Annick PIERCE.
 « *Lactoferrin is synthesized by mouse brain tissue and its expression is enhanced after MPTP treatment.* »
 Third international conference on lactoferrin, Le Touquet, France, 5-9 mai 1997.
3. Carine FILLEBEEN, Laurence DESCAMPS, Laurence FENART, Marie-Pierre DEHOUCQ, Monique BENAÏSSA, Geneviève SPIK, Roméo CECHELLI & Annick PIERCE.
 « *Receptor mediated-transcytosis of lactoferrin through the blood-brain-barrier* »
 European Iron Club Meeting. Utrecht, The Netherlands, 9-12 juillet 1998.
4. Carine FILLEBEEN, Monique BENAÏSSA, David DEXTER, Roméo CECHELLI & Annick PIERCE.
 « *Brain lactoferrin in neurodegenerative disorders* »
 Fourth international conference on lactoferrin : structure, function and applications, Sapporo, Japan, 18-22 mai 1999.

5. **Carine FILLEBEEN**, Laurence FENART, Marie-Pierre DEHOUCK, Monique BENAÏSSA, Roméo CECHELLI & Annick PIERCE.

« TNF- α increased receptor mediated-transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier »

World congress on iron metabolism, BioIron. Sorrento, Italy, 22-27 mai 1999.

GÉNÉRALITÉS

I. LA LACTOFERRINE

La lactoferrine ou lactotransferrine, glycoprotéine isolée du lait de femme, a été décrite pour la première fois par Montreuil et Mullet (1960). Cette protéine, seulement caractérisée chez les mammifères (Baldwin, 1993), appartient à la famille des transferrines qui comprend également la transferrine, principalement localisée dans le sérum (Schade et Caroline, 1946) et la mélanotransferrine (gp96), protéine membranaire isolée de mélanomes humains (Brown *et al.*, 1982). Ces protéines, par leur capacité à fixer le fer, sont impliquées dans l'homéostasie de ce métal.

A. Distribution tissulaire et cellulaire de la lactoferrine

La lactoferrine, présente dans divers liquides de sécrétions, est issue des épithéliums glandulaires. Ainsi, elle est localisée dans les sécrétions bronchiques (Masson *et al.*, 1965), les larmes (Masson *et al.*, 1966), le liquide synovial (Bennett *et al.*, 1973), les sécrétions du système digestif, le liquide séminal (Hekman et Rümke, 1968), les sécrétions vaginales (Masson *et al.*, 1968) et plus particulièrement dans le lait (Montreuil *et al.*, 1985 pour revue générale). La lactoferrine, présente dans le sang, provient quant à elle des leucocytes neutrophiles (Masson *et al.*, 1969). Elle est également localisée dans le système nerveux central (Osmand et Switzer, 1991) mais son origine est inconnue.

1. La lactoferrine issue des cellules épithéliales

a. La glande mammaire

- Le lait

C'est en 1939 qu'une protéine de couleur rose saumon a été décrite pour la première fois dans le lait de vache (Sørensen et Sørensen, 1939). Elle a ensuite été identifiée à la lactoferrine et caractérisée dans le lait de nombreux mammifères. Sa concentration varie énormément selon les espèces. Le lait humain est le plus riche en lactoferrine avec des

concentrations allant de 1 à 2 g/l (Montreuil et Mullet, 1960). La concentration de lactoferrine est également importante dans le lait de truie et de souris (Masson et Heremans, 1971). Par contre, le lait de vache contient moins de lactoferrine (100 mg/l) (Grove, 1960). Il existe des espèces qui produisent également du lait dépourvu de lactoferrine telles que le rat et le chien (Masson et Heremans, 1971), ces espèces restent néanmoins minoritaires.

La richesse en lactoferrine du lait humain varie au cours de la lactation. En effet, la production de lactoferrine est maximale juste après la naissance, le colostrum en contenant jusqu'à 6,7 g/l. Cette production diminue ensuite au cours de la lactation pour atteindre une concentration d'environ 2 g/l dans le lait mature (Hirai *et al.*, 1990). Le statut martial de la mère ne semble pas affecter la production de lactoferrine (Prentice *et al.*, 1989). Par contre, la concentration en lactoferrine du lait diminue lorsque la mère souffre de malnutrition (Hennart *et al.*, 1991).

- Les cellules épithéliales de la glande mammaire

La lactoferrine est synthétisée par les cellules épithéliales de la glande mammaire et plus particulièrement par les cellules glandulaires. En effet, ses ARNm ont été mis en évidence dans la glande mammaire. En parallèle, l'analyse immunohistochimique a confirmé la présence en quantité importante de lactoferrine dans les cellules de l'épithélium des canaux glandulaires et au niveau des îlots de tissu glandulaire (Campbell *et al.*, 1992). La production de la lactoferrine par les cellules de la glande mammaire varie dans le cas de cancer du sein. En général, une diminution de la production de la lactoferrine est observée dans les cellules affectées (Panella *et al.*, 1991).

b. L'endomètre

La lactoferrine a été découverte dans les sécrétions vaginales (Masson *et al.*, 1968). Son expression au niveau de cellules épithéliales glandulaires situées dans la couche basale de l'endomètre a été mise en évidence par des techniques immunohistochimiques (Mason et Taylor, 1978). La production de la lactoferrine est en corrélation avec le stade physiologique de l'endomètre. En effet, l'expression de la lactoferrine est plus importante

au cours de la phase proliférative que de la phase sécrétoire (Kelder *et al.*, 1996). Ce niveau d'expression varie également dans le cas de cancer de l'endomètre où une augmentation du taux de lactoferrine est observée (Farley *et al.*, 1997).

c. L'appareil digestif

La lactoferrine est présente tout le long du tractus digestif. Elle est produite par les glandes salivaires (Masson *et al.*, 1966) au niveau des canaux intercalaires, des canaux striés et des acini séreux (Miyachi, 1984). La lactoferrine est également sécrétée par les cellules muqueuses gastriques (Mason et Taylor, 1978) de l'antrum pylorique et du corps gastrique (Luqmani *et al.*, 1991), ainsi que par l'épithélium glandulaire duodénal (Tuccari *et al.*, 1989). La vésicule biliaire (Saito et Nakanuma, 1992) et le pancréas (Masson, 1970) produisent également la lactoferrine.

Une augmentation de la présence de la lactoferrine a été observée dans le développement de gastrites (Luqmani *et al.*, 1991). Une surproduction de lactoferrine apparaît également dans les glandes biliaires obstruées par des calculs. Cette obstruction engendrera une réaction inflammatoire localisée responsable de l'augmentation de la lactoferrine (Saito et Nakanuma, 1992).

2. La lactoferrine issue des leucocytes

a. Le sang

La lactoferrine est présente dans le plasma à des concentrations relativement peu élevées allant de 0,4 à 2 µg/ml, cette faible concentration est en relation avec la courte durée de demi-vie de la lactoferrine. La lactoferrine plasmatique provient en majeure partie de l'activité des neutrophiles (Iyer et Lönnardal, 1993). En effet, la concentration plasmatique de la lactoferrine semble être en relation avec le nombre de neutrophiles circulants (Baynes *et al.*, 1986). Des variations importantes du taux plasmatique de la lactoferrine ont été observées et sont le reflet des différentes méthodes de dosages utilisées (Levay et Viljoen, 1995 ; Antonsen *et al.*, 1993). Néanmoins, des variations individuelles sont notées : l'âge, le sexe et l'état physiologique des différents sujets étudiés influenceront sur cette concentration. Bien qu'il n'y ait pas de différence significative de

la concentration plasmatique de la lactoferrine entre l'homme et la femme (Antonsen *et al.*, 1993), ce taux peut être néanmoins influencé par des activités endocrines apparaissant durant la phase sécrétoire du cycle menstruel (Masson *et al.*, 1968) ou la grossesse (Sykes *et al.*, 1982). Par ailleurs, une augmentation du taux de la lactoferrine apparaît dans le plasma de patients atteints de leucémie myéloïde chronique (Bennett et Mohla, 1976).

b. Les cellules myéloïdes

La lactoferrine est présente dans les neutrophiles, où elle est stockée dans les granules secondaires (Masson *et al.*, 1969) mais également en moindre quantité dans d'autres granules qui sont probablement des granules tertiaires (Saito *et al.*, 1993). Sa localisation ultrastructurale dans les cellules immatures de la moelle osseuse, au niveau de granules intracytoplasmiques mais également dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi, semble montrer que la protéine suit des voies de maturation qui sont destinées aux protéines sécrétées (Miyachi et Watanabe, 1987 ; Olsson *et al.*, 1988).

3. La lactoferrine du système nerveux central

a. Le liquide céphalo-rachidien

La présence de la lactoferrine dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) a initialement été observée chez des patients atteints de lésions cérébrovasculaires aiguës (Terent *et al.*, 1981), puis chez des patients contrôles ne présentant pas de lésions neurologiques ni de lésions cérébrovasculaires (Hällgren *et al.*, 1982). L'origine de la lactoferrine ainsi que celle d'autres protéines sériques dans le LCR d'individus sains demeurent obscures. La présence de protéines sériques telles que l'albumine s'explique par leur passage à travers la barrière hémato-liquidienne par diffusion passive. Cependant, ces protéines sont 200 fois moins concentrées dans le LCR que dans le plasma (Felgenhauer, 1974 ; Ganrot-Norlin, 1978). La concentration de lactoferrine dans le LCR de patients sains est égale à environ 7,3 µg/l, toutefois, si la lactoferrine présente provenait uniquement de la diffusion passive la valeur attendue serait cinq fois moins élevée que la valeur observée. Le transport actif de la lactoferrine à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE), ou la production de la

lactoferrine directement par les cellules du SNC pourraient expliquer sa concentration dans le LCR.

Le taux de lactoferrine contenue dans le LCR de patients présentant des lésions cérébrales aiguës, suivies ou non d'hémorragies cérébrales, est maximal 2 à 3 jours après l'accident, puis diminue pour atteindre un taux normal 12 jours plus tard (Terent *et al.*, 1981). Cette augmentation pourrait être corrélée à la rupture de la BHE qui est détectée par une élévation du taux d'albumine. Néanmoins, l'afflux de lactoferrine n'est pas concomitant de celui de l'albumine et est beaucoup plus important, ce qui va à l'encontre de cette hypothèse (Terent *et al.*, 1981). Par contre, l'accident vasculaire cérébral est suivi d'une réaction inflammatoire locale qui se traduit par l'activation de cellules spécialisées et la migration de neutrophiles au niveau de la BHE qui pourront déverser le contenu de leurs granules et favoriser ainsi l'augmentation du taux de lactoferrine. En effet, il existe une relation entre le taux de lactoferrine dans le LCR et le nombre de neutrophiles présents (Gutteberg *et al.*, 1986). Le taux de lactoferrine augmente dans le LCR et suit la réponse au stress inflammatoire observé au cours d'infections bactériennes et du développement de certaines tumeurs (Hällgren *et al.*, 1982 ; Gutteberg *et al.*, 1986 ; Oberg *et al.*, 1987), les infections virales quant à elles n'affectent pas le taux de lactoferrine.

b. Le système nerveux central sain

La lactoferrine a été mise en évidence dans le SNC humain (Osmand et Switzer, 1991). Sa distribution varie selon l'âge des patients étudiés. Ainsi, dans le SNC du nourrisson la lactoferrine n'est présente que dans quelques neutrophiles résiduels situés dans les vaisseaux. Chez le jeune adulte, quelques neurones pyramidaux sont marqués par la lactoferrine, ils sont essentiellement localisés dans le cortex frontal, pariétal et temporal, ainsi que dans l'hippocampe, le noyau amygdalien et le cortex entorhinal. La lactoferrine est également présente dans quelques neurones moteurs et dans les neurones dopaminergiques de la substance noire et de l'aire tegmento-ventrale. Chez les patients les plus âgés, plusieurs types cellulaires contiennent de la lactoferrine, des cellules gliales non identifiées et également des neurones qui sont plus largement distribués et plus intensément marqués que chez les patients jeunes (Kawamata *et al.*, 1993 ; Leveugle *et al.*, 1994). En

général, ce marquage intracellulaire de la lactoferrine augmente en distribution et en densité avec l'âge.

En plus de sa localisation dans des cellules spécialisées, la lactoferrine est également présente le long de la paroi de certains capillaires cérébraux situés dans la région du cortex (Leveugle *et al.*, 1994).

c. *Le système nerveux central pathologique*

La distribution de la lactoferrine a également été étudiée chez des patients atteints de différents désordres neuropathologiques et neurodégénératifs. La lactoferrine est présente au niveau des mêmes types cellulaires que chez les patients contrôles (figure 1, page 13).

Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, les études réalisées montrent qu'il existe une relation entre la lactoferrine et les lésions caractéristiques de la maladie (Osmand et Switzer, 1991 ; Kawamata *et al.*, 1993). En effet, la lactoferrine est présente au niveau des plaques séniles et des lésions neurofibrillaires extracellulaires de tous les patients étudiés, ces deux types de lésions étant caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. De plus, le marquage de la lactoferrine est situé dans le lobe temporal, plus précisément au niveau de l'hippocampe, du noyau amygdalien et du cortex entorhinal qui sont les régions les plus précocement affectées et les plus impliquées lors de cette maladie (Osmand et Switzer, 1991). Par contre, la lactoferrine n'est pas présente dans les régions qui sont tardivement affectées. Ces résultats suggèrent que la lactoferrine apparaît dès le début du processus conduisant à l'établissement des lésions. La lactoferrine est présente au niveau des plaques séniles, mais également au niveau de dépôts consolidés ou diffus de peptide amyloïde A β , composant majeur des plaques séniles (Glennner, 1992). Une distribution similaire a été trouvée au niveau des lésions neurofibrillaires, qui sont caractérisées par la présence de la protéine tau fibrillaire (Delacourte, 1997). Ainsi, la lactoferrine est associée à de nombreuses lésions neurofibrillaires extracellulaires, alors que peu de lésions intracellulaires le sont (Kawamata *et al.*, 1993 ; Leveugle *et al.*, 1994).

L'étude a ensuite été étendue à d'autres neuropathologies et a montré que la lactoferrine était associée aux lésions caractéristiques des différentes maladies étudiées (Leveugle *et al.*, 1994). Ainsi, chez les patients atteints de trisomie 21, la lactoferrine est présente au niveau des lésions neurofibrillaires et des plaques séniles, les patients les plus

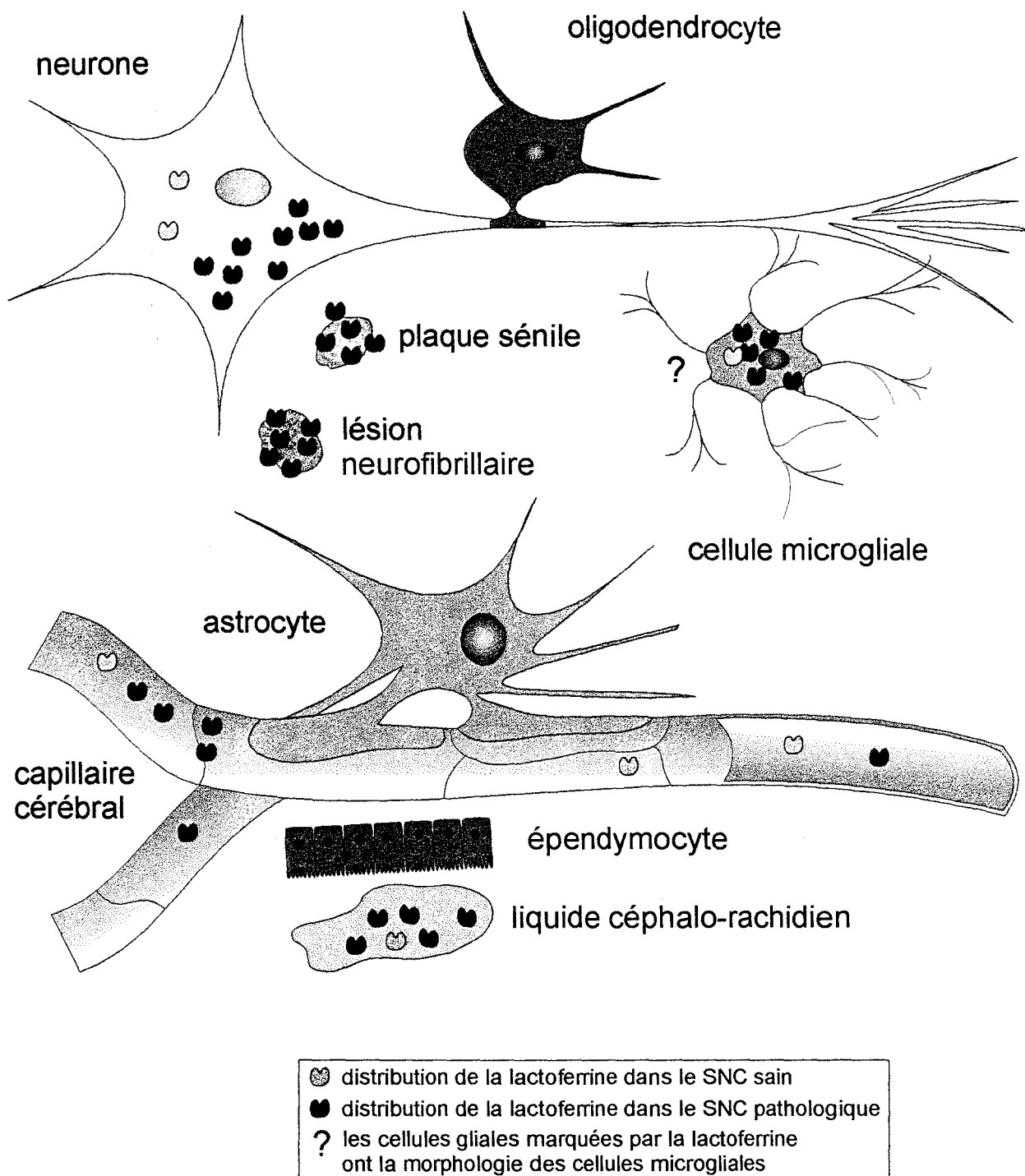


Figure 1 : Distribution de la lactoferrine dans le système nerveux central sain ou pathologique.

âgés présentant les lésions les plus intensément marquées. La lactoferrine est également associée à de nombreuses lésions neurofibrillaires chez les patients atteints de la maladie de l'île de Guam et dans les corps de Pick situés dans le lobe temporal des patients atteints de la maladie de Pick.

Il existe des maladies neurodégénératives qui ne présentent pas de lésions neuropathologiques extracellulaires mais qui sont caractérisées par la dégénérescence spécifique de certaines populations neuronales. Ainsi, chez les patients atteints de la sclérose latérale amyotrophique, seuls certains neurones moteurs sont affectés lors de la maladie. Ces mêmes neurones sont fortement immunomarqués par la lactoferrine (Leveugle *et al.*, 1994). Les patients atteints de la maladie de Parkinson présentent une perte sévère de neurones dopaminergiques situés dans la substance noire et l'aire tegmento-ventrale du mésencéphale. La lactoferrine est présente au niveau de nombreux neurones affectés par ce processus. L'analyse densitométrique montre, d'une part, que la population neuronale marquée par la lactoferrine diminue fortement lors de la maladie de Parkinson et, d'autre part, que l'intensité de marquage est supérieure dans les neurones survivants (Leveugle *et al.*, 1996).

En conclusion, la lactoferrine intracellulaire présente sous forme de granules semble être associée avec le développement normal du processus de vieillissement, ainsi qu'avec le mécanisme de dégénérescence de certaines populations neuronales, contrairement à la lactoferrine extracellulaire située sur les lésions neuropathologiques qui semble être en relation avec le processus de formation de ces lésions. La présence de la lactoferrine à l'intérieur des cellules du système nerveux central pourrait être due soit à la synthèse *in situ* de la lactoferrine, soit à la capture et l'accumulation de la lactoferrine exogène qui serait apportée par relargage des neutrophiles ou par la circulation par l'intermédiaire d'un mécanisme de transport à travers la BHE. Par contre, l'association de la lactoferrine avec les lésions extracellulaires pourrait être une conséquence des dommages occasionnés aux membranes cellulaires ou d'un relargage spécifique de la lactoferrine aux sites des lésions.

B. Biosynthèse de la lactoferrine

1. Le gène de la lactoferrine

Le clonage de l'ADNc de la lactoferrine murine (Pentecost et Teng, 1987) a permis la localisation chromosomique des gènes codant les lactoferrines humaine et murine, sur le chromosome 3 et le chromosome 9 respectivement (Teng *et al.*, 1987 ; Mc Combs *et al.*, 1988), le chromosome 9 murin étant l'homologue du chromosome 3 humain.

Le gène de la lactoferrine murine est codé par un locus unique organisé en 17 exons, de tailles comprises entre 48 et 90 pb, entrecoupés de 16 introns mesurant de 0,2 à 4,3 kb (Teng *et al.*, 1987). La mise en évidence d'une forte identité entre les régions codantes formées par 14 des 15 exons constituant 7 paires homologues qui codent les domaines N- et C-terminaux de la protéine explique l'homologie qui existe entre les deux domaines. L'organisation exon-intron du gène de la lactoferrine est très similaire à celle des gènes codant les autres protéines de la famille des transferrines (Cunningham *et al.*, 1992). Ces résultats confirment l'hypothèse d'une origine commune des gènes codant les protéines de la famille des transferrines, lesquels seraient issus de duplications d'un gène ancestral commun de la taille d'un demi-gène de la famille des transferrines (Shirsat *et al.*, 1992). Chez l'homme tous ces gènes sont localisés sur le chromosome 3 au loci 3q21 (Yang *et al.*, 1984), le gène de la lactoferrine humaine étant plus précisément situé sur les régions 3q21-q23 (Mc Combs *et al.*, 1988). D'autres gènes impliqués dans le métabolisme du fer sont également localisés sur le chromosome 3 au loci 3q21, notamment les gènes codant le récepteur de la transferrine (Van de Rijn *et al.*, 1983) et la chaîne lourde de la ferritine (Mc Gill *et al.*, 1987).

L'analyse de la région 5' flanquante du gène de la lactoferrine murine a mis en évidence la présence de plusieurs séquences promotrices situées juste en amont du site d'initiation de la transcription, ainsi une séquence ATAAA (boîte TATA imparfaite), une séquence CCAAT, et des séquences riches en GC ont été identifiées (Shirsat *et al.*, 1992). Cette région possède une zone d'homologie de 200 pb avec des séquences consensus présentes dans la région promotrice du gène de la myéloperoxydase, cette protéine étant également exprimée spécifiquement dans les neutrophiles (Shirsat *et al.*, 1992). Il a également été trouvé des séquences homologues aux séquences consensus SP1, cet élément de réponse étant commun aux gènes impliqués dans la phase aiguë de l'inflammation. Un

module composite de réponse aux oestrogènes (mERM), situé de -341 à -329 en amont du site d'initiation de la transcription a été identifié (Liu et Teng, 1991). Ce module est constitué de la séquence consensus imparfaite ERE (« Estrogen Responsive Element ») de réponse aux oestrogènes chevauchant une séquence similaire à l'élément COUP (« Chicken Ovalbumin Upstream Promoter »), les séquences consensus ne diffèrent chacune des séquences parfaites que d'un seul nucléotide (Liu et Teng, 1992). Un deuxième module composite a ensuite été localisé de -40 à -80 en amont du site d'initiation de la transcription, une séquence EGFRE (« EGF Responsive Element ») de réponse à l'EGF/TGF α ainsi qu'un élément CRE (« AMPc Responsive Element ») constituent ce module (Shi et Teng, 1994, 1996) (figure 2, page 17).

La comparaison de la région 5' flanquante des gènes de la lactoferrine murine et humaine a révélé l'existence d'une grande homologie entre ces deux régions, un nombre important d'éléments de réponse ont été conservés. Ainsi, la séquence ATAAA, la séquence consensus CAAT imparfaite (CAAC), la région riche en GC et la région homologue à la séquence SP1 ont été retrouvées. De plus, le module composite mERM est également présent dans la région promotrice du gène de la lactoferrine humaine, bien que l'élément COUP ne soit pas totalement homologue à celui de la région promotrice du gène de la lactoferrine murine, un seul nucléotide diffère entre les deux séquences (Teng *et al.*, 1992). La région promotrice du gène de la lactoferrine humaine possède un module composite supplémentaire de réponse aux acides rétinoïques (AR), constitué d'un élément RARE (« Retinoic Acid Responsive Element ») chevauchant une séquence ERE (Lee *et al.*, 1995).

Récemment, Siebert et Huang (1997) ont identifié un deuxième transcrit de la lactoferrine humaine (Δ Lf ARNm). Le Δ Lf ARNm provient de l'utilisation d'un promoteur alternatif conduisant à un épissage alternatif. L'exon 1 est remplacé par une séquence exonique appelée 1 β . Cet ARNm dont le premier exon plus court que celui de la lactoferrine de sécrétion ne code ni pour la séquence signal ni pour le premier domaine protéique (acides aminés 1-26). Le promoteur alternatif se différencie par la présence d'éléments régulateurs supplémentaires, tels que les séquences NF-E2, IRF, d'un activateur NF- κ B et de l'absence de l'élément ERE (Siebert et Huang, 1997).

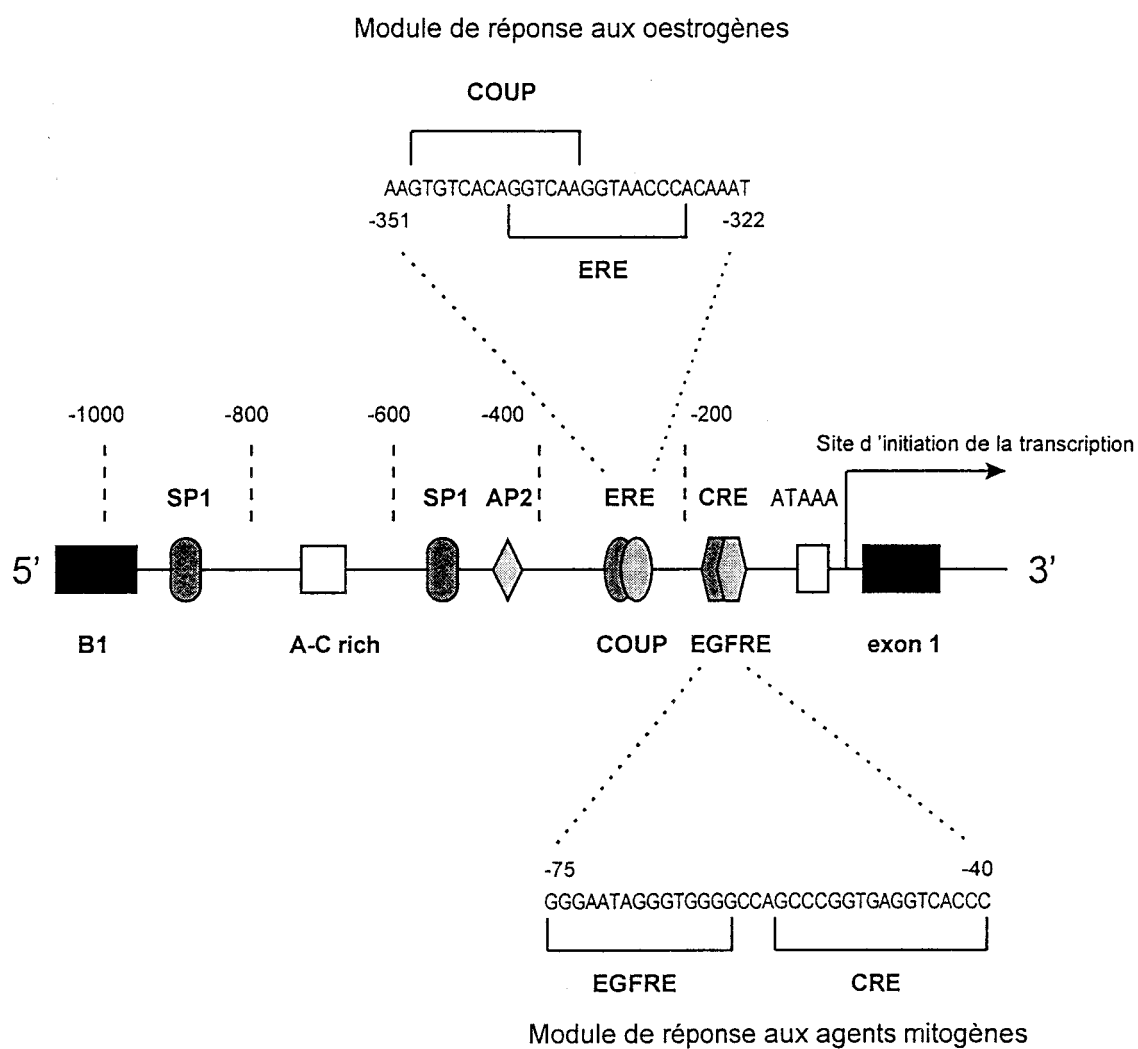


Figure 2 : Représentation schématique des éléments régulateurs putatifs de la région 5' flanquante du gène de la lactoferrine murine (Teng, 1995).

La présence de séquences consensus inductibles dans la région promotrice du gène de la lactoferrine devrait contribuer à une régulation différentielle de ce gène qui est exprimé différemment dans de nombreux tissus.

2. Régulation du gène de la lactoferrine

L'expression différentielle du gène de la lactoferrine se traduit par la production de cette protéine majoritairement dans trois organes : la moelle osseuse, la glande mammaire et l'utérus, et en moindre quantité par les cellules sécrétrices des muqueuses respiratoires et digestives et dans le SNC. Le taux de synthèse de la lactoferrine est régulé selon le tissu et l'étape de différenciation des cellules. Ainsi, le gène de la lactoferrine est exprimé au cours de la différenciation terminale dans les neutrophiles, alors qu'il est régulé par voie hormonale dans la glande mammaire et l'utérus.

a. Régulation au cours de la différenciation

- Régulation au cours de la myélopoïèse

Le clonage de l'ADNc de la lactoferrine humaine a permis l'étude de l'expression du gène de la lactoferrine au cours de la myélopoïèse (Rado *et al.*, 1987). Cette expression apparaît au cours des étapes tardives de la différenciation des cellules myéloïdes en neutrophiles et plus précisément durant la transition entre les stades promyélocytes et myélocytes (Rado *et al.*, 1984). Cette expression est affectée lors de leucémies présentant des défauts de maturation des cellules myéloïdes (Miyachi *et al.*, 1983 ; Hirata *et al.*, 1993 ; Panella *et al.*, 1991). L'ARNm de la lactoferrine est exprimé dans les cellules myéloïdes de la moelle osseuse normale et dans les cellules myélocytaires circulantes de patients atteints de leucémie touchant les différents stades de différenciation de la lignée myéloïde. Par contre, les ARNm de la lactoferrine ne sont produits ni par les leucocytes de patients atteints de leucémie promyélocytaire aiguë (Hirata *et al.*, 1993), ni par les cellules de la lignée promyélocytaire leucémique humaine HL60 (Johnston *et al.*, 1992a) et les cellules de la lignée myéloblastique leucémique humaine PBL-985. L'utilisation d'agents permettant l'induction des caractères morphologiques des myélocytes ne conduit pas à la

production d'ARNm de la lactoferrine, la différenciation de ces cellules étant incomplète ou défectueuse (Johnston *et al.*, 1992a), la lactoferrine pourrait ainsi être impliquée dans le développement du myélocyte mature normal (Lomax *et al.*, 1989).

La synthèse des ARNm de la lactoferrine coïncide avec le développement des granules secondaires. L'apparition des transcrits est suivie de la production de la lactoferrine qui va s'accumuler dans ces cellules au cours de leur différenciation jusqu'au début du stade ultime de maturation (Rado *et al.*, 1987).

Breitman et coll. (1980) ont mis en évidence l'action des AR et de leurs récepteurs dans la régulation du processus de différenciation myélocytaire. La région 5' flanquante du gène de la lactoferrine humaine possède un élément RARE fonctionnel, cet élément peut être activé par les AR dans les cellules HL60 (Lee *et al.*, 1995). De plus, les AR sont capables d'induire la différenciation des cellules de la lignée leucémique promyélocytaire NB4 vers la maturation en neutrophile. Les cellules NB4 ne produisent pas de lactoferrine, néanmoins après un traitement aux AR les ARNm de la lactoferrine apparaissent en faible quantité dans les cellules traitées (Hirata *et al.*, 1993). Ainsi, les AR et leurs récepteurs pourraient intervenir dans le système de régulation du gène de la lactoferrine dans les cellules myéloïdes. La réponse aux AR peut être réduite par le facteur de transcription COUP-TF qui a la capacité de se dimériser avec le récepteur des AR : RXR en empêchant ainsi l'activation de l'élément RARE (Kliwer *et al.*, 1992). L'élément RARE fait partie du module composite RARE/ERE, qui intervient dans la régulation multi-hormonale de l'expression du gène de la lactoferrine, le facteur COUP-TF pourrait également être impliqué dans ce système de régulation (Lee *et al.*, 1995).

Un élément régulateur négatif a été identifié dans la région promotrice du gène de la lactoferrine humaine, cet élément est reconnu par le facteur CDP/cut (CCAAT « displacement protein »). Ce facteur permet de réguler l'expression du gène de la protéine gp91-phox (« phagocyte-specific cytochrome heavy chain gene ») qui est exclusivement produite dans les cellules myéloïdes différenciées. Cependant, l'expression de ce gène précède celle du gène de la lactoferrine au cours de la maturation des neutrophiles, le rôle de CDP/cut dans la régulation temporelle du gène de la lactoferrine et celle d'autres gènes exprimés au cours de la maturation des neutrophiles reste à élucider (Khanna-Gupta *et al.*, 1997). L'interaction de CDP/cut avec l'élément de régulation du gène de la lactoferrine humaine permettrait la suppression de l'activité de base du promoteur de ce gène dans les

cellules non différenciées. De plus, l'augmentation de l'expression de CDP/cut dans les cellules souches myéloïdes en culture bloque l'expression du gène de la lactoferrine au cours de l'induction de la maturation des cellules en neutrophiles par le G-CSF. Le blocage de l'expression de la lactoferrine pourrait être dû, en partie, à la persistance de la fixation de CDP/cut à l'élément de régulation (Khanna-Gupta *et al.*, 1997).

- Régulation au cours de modifications morphologiques

L'expression de la lactoferrine est modulée par des changements de forme cellulaire et de structure cytosquelettique dans les cellules des lignées épithéliales mammaires murines CID-9 et SCp2 (Close *et al.*, 1997). Ainsi, l'absence de tout facteur micro-environnemental exogène, à l'exception de l'insuline qui constitue un facteur de survie, aboutit à l'expression de la lactoferrine dans les cellules arrondies. Par contre, l'adhésion des cellules à un substrat ou le contact des cellules entre elles suspend l'expression de la lactoferrine, suggérant que l'interaction de la matrice extracellulaire exogène avec les cellules épithéliales pourrait réguler l'expression du gène de la lactoferrine dans ces cellules (Close *et al.*, 1997).

b. Régulation hormonale

La lactoferrine est un constituant majeur des milieux de sécrétion, elle est synthétisée par les cellules de la glande mammaire et de l'utérus. Ces deux organes sont continuellement placés sous contrôle hormonal, régulant en même temps l'expression de la lactoferrine.

- Régulation hormonale dans la glande mammaire

L'expression du gène de la lactoferrine dans les cellules de la glande mammaire de souris varie selon l'état physiologique de la glande, immédiatement après la mise bas la production de la lactoferrine est très importante, alors qu'elle diminue au cours de la lactation, jusqu'à une nouvelle augmentation qui apparaît juste avant le sevrage (Masson et Heremans, 1971). La synthèse de la lactoferrine dans les cellules de la glande mammaire

est inductible par la prolactine, en effet cette hormone provoque une augmentation de l'expression de la lactoferrine dans des explants de glande mammaire de souris en gestation (Green et Pastewka, 1978).

Les oestrogènes quant à eux n'induisent pas la synthèse de la lactoferrine dans la glande mammaire immature (Teng *et al.*, 1989). Par ailleurs, l'absence de lactoferrine dans les tumeurs primaires invasives mammaires semble être inversement corrélée à la surexpression des récepteurs des oestrogènes, suggérant qu'il puisse exister une relation entre le niveau d'expression de la lactoferrine et la présence des récepteurs des oestrogènes (Campbell *et al.*, 1992).

- Régulation hormonale dans l'utérus

L'ADNc de la lactoferrine murine a été isolé à partir d'une banque d'ADNc d'utérus de souris (Pentecost et Teng, 1987). L'expression du gène de la lactoferrine dans cet organe est sous le contrôle des oestrogènes. En effet, 3 jours après l'administration de diéthylstilbestrol, le taux d'expression des ARNm de la lactoferrine est augmenté par 300 dans l'utérus de souris immature (Teng *et al.*, 1989). L'expression des ARNm de la lactoferrine varie également au cours du cycle oestrus/pro-oestrus de la souris qui est sous le contrôle continu des oestrogènes (Newbold *et al.*, 1992). De plus, il existe une corrélation entre le niveau d'expression de la lactoferrine dans le tractus génital de la souris et la concentration sérique d'estradiol, ainsi la lactoferrine et son messager apparaissent dans les cellules épithéliales de l'utérus et du vagin au moment d'une forte libération d'estradiol dans la circulation sanguine, le niveau d'induction dépendant de la dose et de la durée du traitement (Walmer *et al.*, 1992).

Des séquences consensus inductibles par les hormones sont présentes dans la région promotrice du gène de la lactoferrine. En effet, la région 5' flanquante possède un élément de réponse aux oestrogènes ERE qui est capable de répondre à une stimulation oestrogénique en présence de récepteurs des oestrogènes (Liu et Teng, 1991). Cet élément fait partie d'un module composite fonctionnel de réponse aux oestrogènes mERM. Un complexe composé du facteur de transcription COUP-TF et du récepteur des oestrogènes interagit avec le module composite afin de stimuler l'expression du gène de la lactoferrine (Liu et Teng, 1992). Néanmoins, le facteur de transcription COUP-TF est capable seul de

réprimer la réponse induite par les oestrogènes (Liu *et al.*, 1993). Le mécanisme moléculaire de cette répression est dû à la compétition existant entre COUP-TF et le récepteur des oestrogènes au même site de chevauchement sur la séquence mERM. L'expression du gène de la lactoferrine murine est modulée par l'association de deux membres de la superfamille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes.

L'EGF est également capable de stimuler l'expression de la lactoferrine dans l'utérus de souris (Nelson *et al.*, 1991). Le promoteur de la lactoferrine murine contient un module composite de réponse mitogène fonctionnel qui répond à une stimulation par l'EGF (Shi et Teng, 1994). La distribution spatiale des éléments EGF-RE et CRE est essentielle à l'activation par l'EGF (Shi et Teng, 1996). L'activation du gène de la lactoferrine par l'élément CRE passe par des voies de transduction utilisant les seconds messagers de type protéine kinase (PKC, PKA), CRE peut être un élément crucial pour le maintien d'une activité de base dans les surfaces sécrétrices des muqueuses qui expriment continuellement la lactoferrine (pour revue Teng, 1995).

La production de la lactoferrine par l'endomètre de l'utérus humain est également stimulée par les oestrogènes, toutefois le mécanisme moléculaire de régulation (Teng *et al.*, 1992) reste encore mal connu. La région promotrice du gène de la lactoferrine humaine possède un module de réponse aux oestrogènes homologue à celui du gène murin, néanmoins le facteur de transcription COUP-TF ne se fixe pas à l'élément COUP, à moins qu'un nucléotide ne soit muté (Yang et Teng, 1994). Le promoteur du gène de la lactoferrine humaine possède un deuxième module de réponse RARE/ERE, dont la fonction serait de moduler la régulation multi-hormonale de l'expression de ce gène (Lee *et al.*, 1995). Récemment, Yang et coll. (1996) ont mis en évidence la possible participation d'un récepteur nucléaire orphelin hERR1 dans la stimulation du gène de la lactoferrine par les oestrogènes.

Une diminution de l'expression de la lactoferrine apparaît au niveau d'adénomes du col de l'utérus, cette réduction s'accompagne d'une baisse de l'expression des récepteurs des oestrogènes (Farley *et al.*, 1997). Ces résultats confirment le rôle des oestrogènes dans la régulation de la production de la lactoferrine au niveau de l'utérus.

c. Régulation au cours d'un stress oxydatif

Une augmentation de l'expression des ARNm de la lactoferrine apparaît dans des cellules épithéliales bronchiques exposées à des particules de pollution aérienne contenant des traces de métaux actifs susceptibles d'induire des dommages oxydatifs aux cellules (Ghio *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression de la lactoferrine serait induite par la présence de métaux entraînant une réduction du stress oxydatif induit par ces éléments.

d. Régulation transcriptionnelle

Le gène de la lactoferrine humaine est transcrit en deux ARNm différents (Siebert et Huang, 1997). Le Δ Lf ARNm est présent dans tous les tissus sains synthétisant également le transcript de la lactoferrine de sécrétion, mais il est absent des cellules de lignées cancéreuses qui synthétisent l'ARNm de la lactoferrine de sécrétion. Le promoteur du gène de la lactoferrine humaine et le promoteur alternatif présentent des éléments régulateurs différents qui sont certainement responsables de l'expression différentielle des deux transcrits de la lactoferrine (Siebert et Huang, 1997).

C. Structure de la lactoferrine

1. Séquence de la lactoferrine

Les protéines de la famille des transferrines présentent un ensemble de caractères communs. Ce sont des glycoprotéines monocaténaires bilobées, possédant une masse moléculaire proche de 80 kDa et capables de fixer réversiblement deux ions ferriques.

a. Séquence primaire de la lactoferrine

L'analyse de la séquence peptidique de fragments issus de l'hydrolyse de la lactoferrine isolée du lait de femme a permis de déterminer la séquence complète de la lactoferrine humaine (Metz-Boutique *et al.*, 1984). Cette séquence a été confirmée par le clonage de l'ADNc de la lactoferrine humaine (Rey *et al.*, 1990 ; Powell et Ogden, 1990).

Les ADNc de la lactoferrine de souris (Pentecost et Teng, 1987), de vache (Pierce *et al.*, 1991 ; Mead et Tweedie, 1990 ; Goodman et Schanbacher, 1991) et de porc (Alexander *et al.*, 1992 ; Lydon *et al.*, 1992) ont également été séquencés. La lactoferrine humaine est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 692 résidus d'acides aminés comprenant des résidus de cystéine qui forment 16 ponts disulfures (Rey *et al.*, 1990), elle possède une masse moléculaire de 80,6 kDa. Il existe 37 % d'homologie entre les moitiés N- et C-terminales, qui constituent les 2 lobes de la protéine (Metz-Boutigue *et al.*, 1984).

L'étude comparative de la séquence peptidique de la lactoferrine et de la transferrine met en évidence 59 % d'homologie entre les deux protéines (Mazurier *et al.*, 1983 ; Metz-Boutigue *et al.*, 1984).

b. Structure tridimensionnelle de la lactoferrine

La cristallisation des lactoferrines humaine et bovine a permis l'étude de leurs structures tridimensionnelles à l'aide de la diffraction des rayons X (Anderson *et al.*, 1987, 1989). Ainsi, la lactoferrine humaine est formée de deux lobes, le lobe N-terminal comprenant les résidus d'acides aminés 1 à 332 et le lobe C-terminal comprenant les résidus 344 à 692. L'hydrolyse enzymatique ménagée de la lactoferrine humaine libère 2 fragments de 30 et 50 kDa correspondant aux deux moitiés N- et C-terminales de la protéine. En proportion équimolaire, ces deux fragments sont capables de se réassocier en un complexe non covalent qui possède des propriétés électrophorétiques et spectroscopiques voisines de celles de la lactoferrine humaine (Legrand *et al.*, 1986). Ces deux lobes sont reliés par un petit peptide en hélice α (Legrand *et al.*, 1986) et sont orientés en position antiparallèle (angle 150°). Le lobe N-terminal peut se superposer au lobe C-terminal après une rotation de 180° et une translation de 25\AA (figure 3, page 25).

Chacun des lobes de la lactoferrine est subdivisé en deux domaines d'environ 160 résidus d'acides aminés à l'interface desquels se trouve le site de fixation du fer. Les deux domaines possèdent la même organisation structurale basée sur l'alternance de feuilletts β et d'hélices α (Anderson *et al.*, 1987, 1989 ; Baker *et al.*, 1987). Ainsi, les domaines N I (résidus 1 à 91 et 253 à 664) et N II (résidus 92 à 252) constituent le lobe N-terminal alors que les domaines C I (résidus 345 à 433 et 596 à 663) et C II (résidus 434 à 595) forment le lobe C-terminal.

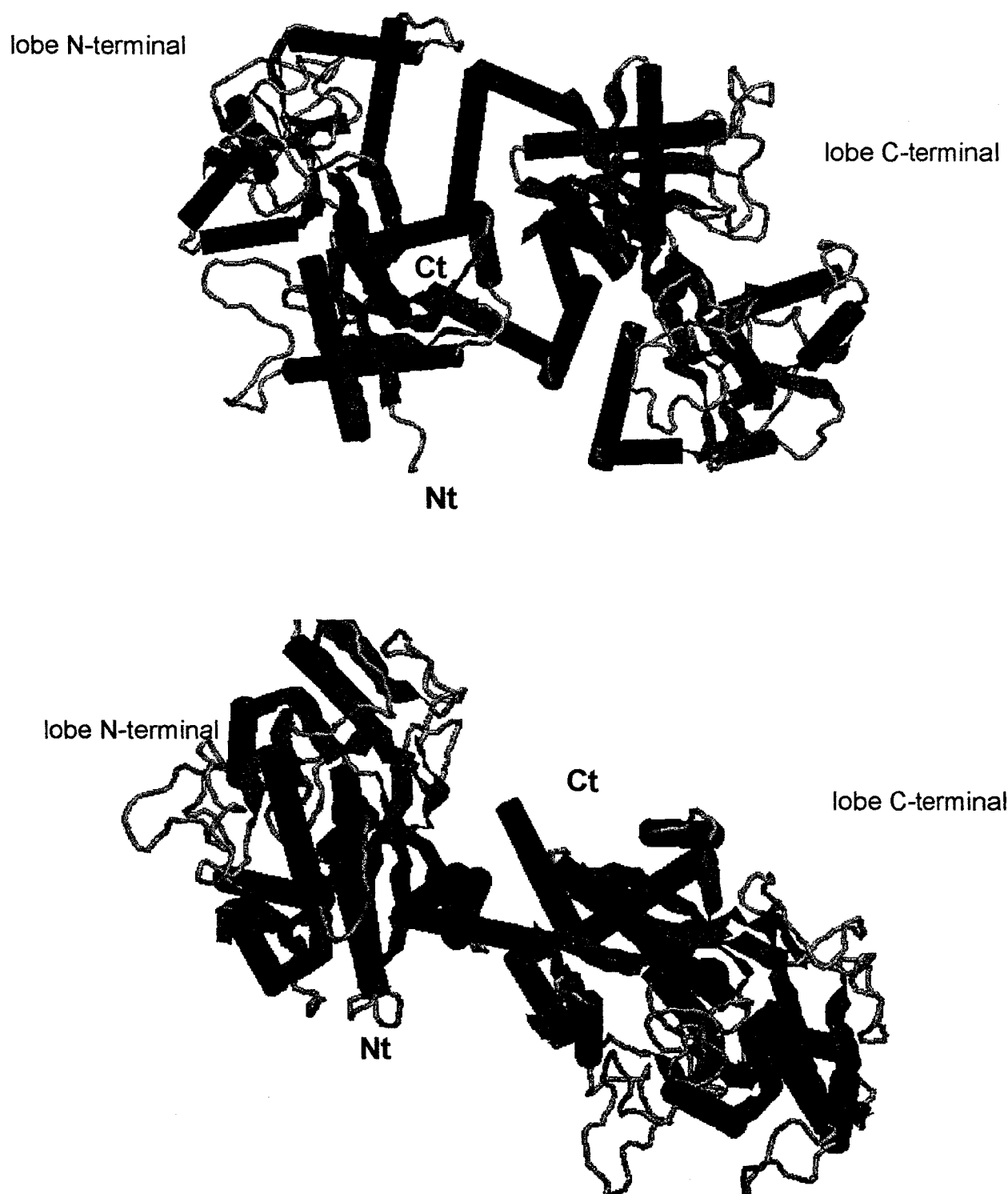


Figure 3 : Structure tridimensionnelle de la lactoferrine humaine.

La lactoferrine humaine peut adopter deux conformations : une conformation ouverte préférentiellement rencontrée dans la forme apo-protéine et une conformation fermée trouvée plus fréquemment sur la forme saturée en fer. Ce phénomène s'explique par la mobilité du domaine N I de la lactoferrine humaine qui peut pivoter de 30° par rapport au domaine II, cette rotation s'effectuant autour des résidus His⁹¹ et Pro²⁵¹ localisés dans la région interdomaine entre deux feuillets β et deux hélices α (Anderson *et al.*, 1990).

La lactoferrine possède non seulement une structure primaire mais également une conformation spatiale très proche de celle de la transferrine. Ainsi, le repliement de la chaîne peptidique est identique entre les deux protéines (Baldwin, 1993).

c. Les sites de fixation du fer de la lactoferrine

La lactoferrine, comme la transferrine, peut fixer de manière réversible deux ions ferriques, la fixation de chaque ion ferrique nécessitant la liaison simultanée d'un ion carbonate (Aisen et Listowsky, 1980). La lactoferrine du lait est principalement présente sous forme non saturée en fer (Lønnerdal *et al.*, 1985), le pourcentage de saturation en fer variant de 6 à 8 % (Levay et Viljoen, 1995 ; Lønnerdal et Iyer, 1995 pour revues générales). L'affinité de la lactoferrine pour le fer ferrique est 260 fois plus forte que celle de la transferrine, la constante d'association de la transferrine avec deux ions ferriques étant de l'ordre de 10^{24} M à pH 6,4 (Aisen et Liebman, 1972). Ces résultats suggèrent que la lactoferrine fixe le fer préférentiellement à la transferrine en présence de cette dernière (Aisen et Listowsky, 1980). Bien que la structure tridimensionnelle des sites de fixation du fer de la lactoferrine soit similaire à celle des sites de la transferrine, le fer est libéré à des pH différents. La lactoferrine est complètement désaturée à un pH voisin de 2,5 (Montreuil et Mullet, 1960 ; Mazurier et Spik, 1980).

Les sites de fixation du fer de la lactoferrine humaine ont été précisément déterminés par diffraction des rayons X à 3,5 Å (Anderson *et al.*, 1987 ; Baker *et al.*, 1987), à 2,5 Å (Anderson *et al.*, 1989), à 2,2 Å (Haridas *et al.*, 1995) et montrent l'implication d'un ion carbonate et d'une molécule d'H₂O dans la liaison du fer au site de fixation (figure 4, page 27). De plus, les résidus d'acides aminés sont identiques dans chacun des lobes :

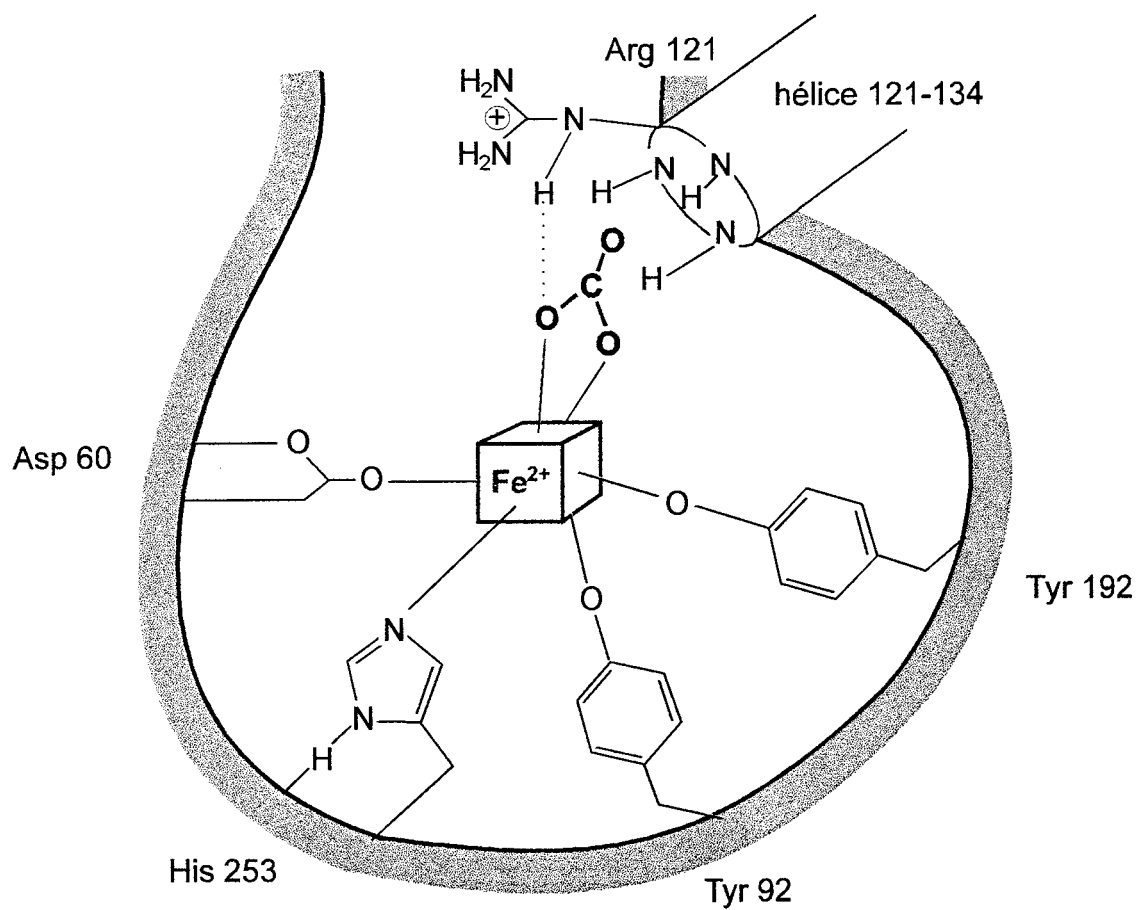


Figure 4 : Représentation schématique de la structure du site de fixation du fer de la lactoferrine humaine (Anderson *et al.*, 1987, 1989, 1994).

- Asp⁶¹, Tyr⁹³, Tyr¹⁹³, His²⁵⁴, dans le lobe N-terminal,
- Asp³⁹⁶, Tyr⁴³⁶, Tyr⁵⁰⁹, His³⁷⁸, dans le lobe C-terminal.

Cependant, il existe une différence de stabilité pour chacun des sites. Ainsi, après séparation des deux lobes par hydrolyse ménagée, le fer est libéré du lobe N-terminal à pH 5,8, et du lobe C-terminal à pH 4 (Mazurier et Spik, 1980). Les changements conformationnels qui se produisent lors de la fixation du fer pourraient expliquer cette modification. En effet, le site de fixation du fer du lobe N-terminal de l'apolactoferrine est largement ouvert, alors que celui du lobe C-terminal est beaucoup plus étroit. La liaison du fer dans le lobe N-terminal s'accompagne d'une rotation du domaine N II qui referme le site de fixation stabilisant ainsi la protéine (Anderson *et al.*, 1994 ; Haridas *et al.*, 1995). Par ailleurs, le lobe C-terminal possède une structure plus compacte, qui est due à la présence de ponts disulfure supplémentaires dans ce lobe (Baker *et al.*, 1987, 1991 ; Anderson *et al.*, 1989). La présence de ces ponts pourrait conférer une flexibilité réduite au lobe C-terminal, et donc augmenter la stabilité du complexe avec le fer. La fixation du fer sur la lactoferrine stabilise la molécule qui devient moins sensible à la dénaturation et la dégradation protéolytique (Anderson *et al.*, 1989 ; Baker *et al.*, 1991).

La lactoferrine peut également fixer d'autres ions métalliques tels que le Cu²⁺, le Mn²⁺ et l'Al³⁺ (Harrington, 1992). Cependant la présence de ces ions liés à la lactoferrine reste mineure par rapport au fer, ce métal étant majoritaire dans l'organisme.

d. Les glycanes de la lactoferrine

Des études réalisées dans notre laboratoire ont mis en évidence la structure des glycanes portés par les protéines de la famille des transferrines et en particulier de la lactoferrine (Spik *et al.*, 1982). Il existe une grande diversité, d'une part, au niveau du nombre et de la localisation des sites de glycosylation et, d'autre part, au niveau de la structure de ces glycanes (Spik *et al.*, 1982, 1994). Les glycanes semblent caractéristiques de chaque espèce (Spik, 1988 ; Montreuil *et al.*, 1997).

La lactoferrine isolée du lait de femme possède trois sites potentiels de N-glycosylation sur les résidus Asn¹³⁸ dans le lobe N-terminal et sur les résidus Asn⁴⁷⁹ et Asn⁶²⁴ dans le lobe C-terminal. Les résidus Asn font partie de séquences de type Asn-Xaa-Thr/Ser, qui caractérisent les sites de N-glycosylation. La glycosylation semble s'effectuer

préférentiellement sur les résidus Asn¹³⁸ et Asn⁴⁷⁹ dans 85 % des molécules de lactoferrine humaine, alors que la glycosylation d'un seul site sur l'Asn⁴⁷⁹ apparaît seulement dans 5 % des cas. Cependant, les trois sites peuvent simultanément être glycosylés pour 9 % des molécules (van Berkel *et al.*, 1996).

Les glycanes de la lactoferrine humaine sont de type N-acétyllactosaminique mono- ou disialylés et fucosylés (Spik *et al.*, 1982). Les résidus de fucose sont branchés en α -1,6 sur la N-acétylglucosamine du point d'attache ou en α -1,3 sur la N-acétylglucosamine 5' de l'antenne liée en α -1,6. La lactoferrine leucocytaire diffère de la précédente par l'absence de résidus de fucose (Derisbourg *et al.*, 1990).

2. Sites de reconnaissance de la lactoferrine avec ses ligands

La lactoferrine est capable de se fixer à de nombreuses molécules et récepteurs. Ces interactions s'effectuent par l'intermédiaire de différents sites de reconnaissance qui ont tous été identifiés dans le domaine N1 de la molécule (figure 5 A, page 31).

a. Zone d'interaction de la lactoferrine avec le récepteur lymphocytaire

La lactoferrine interagit avec les lymphocytes de la circulation périphérique par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique dont l'expression est induite après stimulation des cellules par la phytohémagglutinine (Mazurier *et al.*, 1989). Ce récepteur est également présent à la surface d'autres types cellulaires tels que les cellules de la lignée lymphoblastique T Jurkat (Bi *et al.*, 1994), les plaquettes (Leveugle *et al.*, 1993), les mégacaryocytes (Nillesse *et al.*, 1994) et des cellules du système nerveux central (Faucheux *et al.*, 1995).

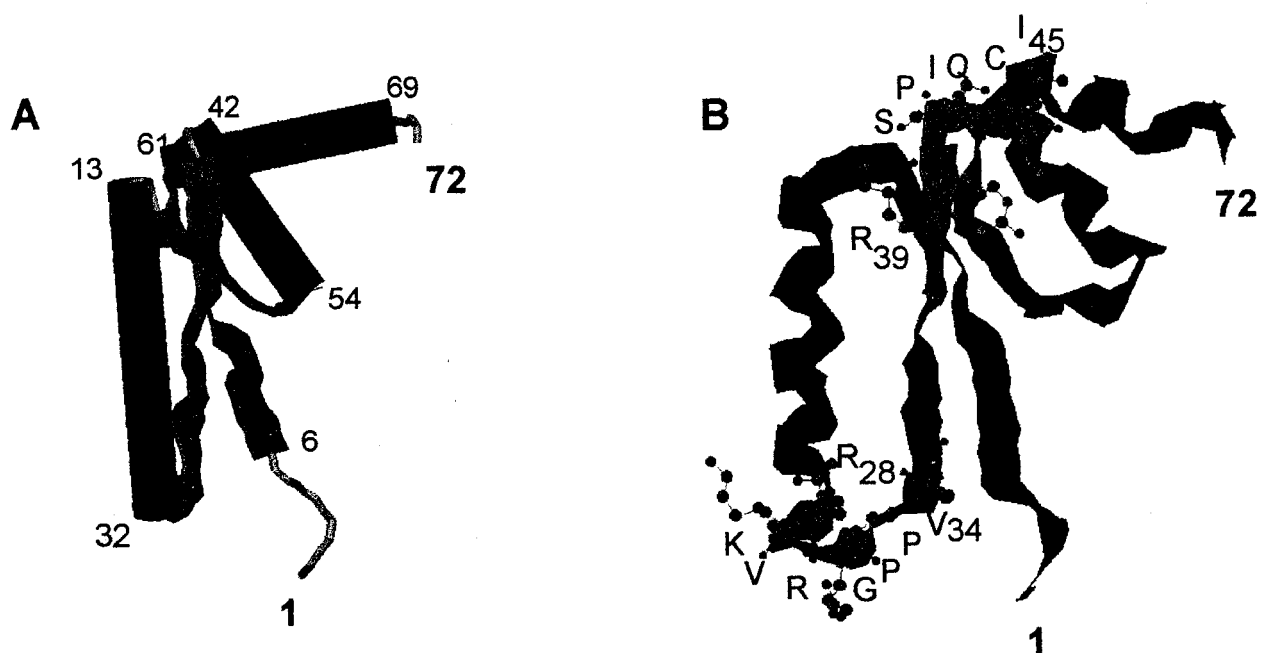
Le fragment N-terminal de 30 kDa (résidus 4 à 281), produit par hydrolyse trypsique ménagée de la lactoferrine, interagit avec les lymphocytes activés avec la même affinité que la protéine native, alors que le domaine N II du lobe N-terminal (résidus 91 à 257), ainsi que le fragment trypsique de 50 kDa ne sont pas reconnus par les cellules (Rochard *et al.*, 1989). Ces résultats suggèrent que le site de reconnaissance de la lactoferrine au

récepteur lymphocytaire est localisé au niveau du lobe N-terminal et plus précisément dans le domaine N I (résidus 4 à 90 et/ou 258 à 281). L'hydrolyse ménagée du fragment N-terminal conduit à l'obtention d'un peptide de 6 kDa (résidus 4 à 52) qui est capable d'inhiber la fixation de la lactoferrine aux lymphocytes activés, cette région est constituée de deux feuillets plissés β reliés par des structures en hélice α . De plus, la modification de la lactoferrine par fixation de FITC (« fluorescein isothiocyanate ») ou d'agents chimiques perturbe les paramètres de fixation de la protéine aux cellules de la lignée lymphoblastique T Jurkat en masquant la région 4-52 de la lactoferrine.

La région 4-52 de la lactoferrine est constituée de deux boucles accessibles en surface correspondant aux résidus d'acides aminés 28 à 34 et 38 à 45 qui sont probablement impliquées dans le site de reconnaissance de la lactoferrine au récepteur lymphocytaire (Legrand *et al.*, 1991, 1992) (figure 5 B, page 31). Plus récemment, l'analyse de cette région a montré l'importance de l'établissement de liaisons hydrogène dans l'interaction spécifique de la lactoferrine au récepteur lymphocytaire, deux sites de liaison seraient impliqués dans cette fixation. Le premier site de liaison est localisé au niveau de l'hélice $\alpha 1$ et du feuillet plissé $\beta 2$, et serait impliqué dans la sélectivité de l'interaction. 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, localisé dans les boucles L1 et L3, interviendrait dans l'affinité de la liaison au récepteur. Il implique les résidus d'acides aminés Pro¹⁴, Phe²⁰, Asp⁴³, Ser⁴⁴, Pro⁴⁵ et Gln⁴⁷. De plus, l'analyse des énergies d'interactions stériques suggère que les résidus d'acides aminés Arg³, Phe²⁰, Gln²¹, Gln²³, Arg²⁴, Arg²⁷, Ser³⁸ et Gln⁴⁷ sont également essentiels à l'interaction de la lactoferrine au récepteur (Elass *et al.*, 1996a, b).

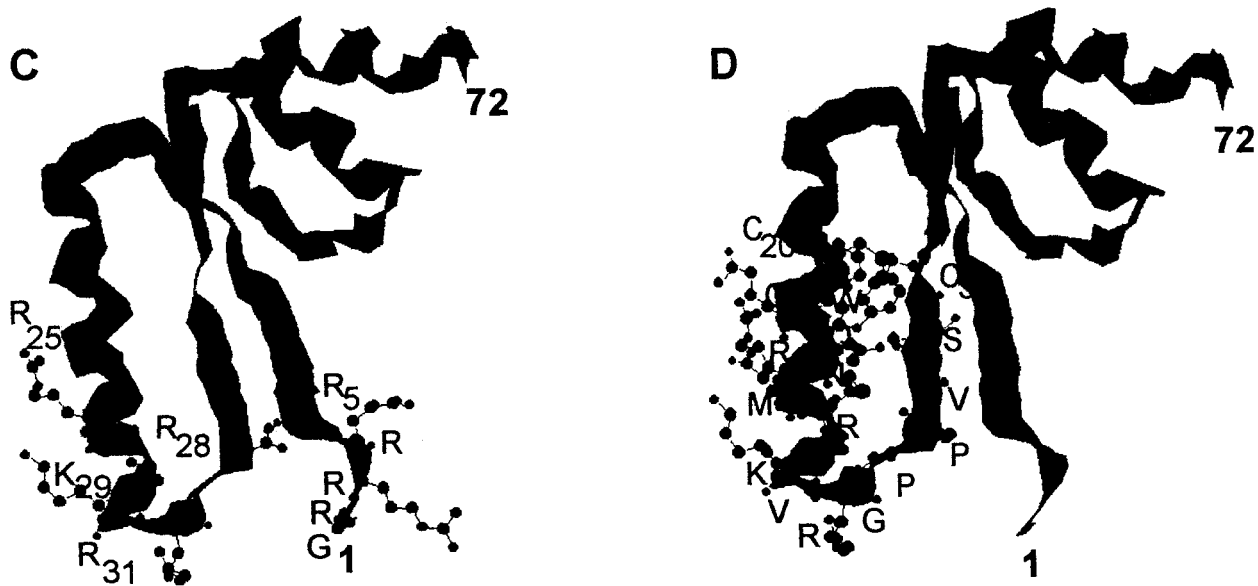
b. Zone d'interaction de la lactoferrine avec les protéoglycannes

De part sa composition fortement basique, la lactoferrine humaine possède la capacité de fixer des macromolécules polyanioniques telles que les glycosaminoglycannes (GAG) sulfatés (Blackberg et Hernell, 1980). Ainsi, la technique de chromatographie sur héparine-Sépharose a largement été utilisée pour purifier la lactoferrine humaine. La fixation de la lactoferrine sur l'héparine est également inhibée par les héparanes sulfates et les chondroïtines sulfates (Zou *et al.*, 1992). L'analyse des séquences de plusieurs



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

B Site d'interaction de la lactoferrine avec le récepteur lymphocytaire



C Sites d'interaction de la lactoferrine avec les glycosaminoglycannes

D Site d'interaction de la lactoferrine avec les lipopolysaccharides

Figure 5 : Sites de reconnaissance de la lactoferrine avec ses ligands.

fragments protéolytiques de la lactoferrine, qui sont retenus sur une colonne d'héparine-Sépharose, suggère que la fixation de la lactoferrine sur les GAG s'effectue par l'intermédiaire de la partie N-terminale de la molécule, et plus précisément les 33 premiers résidus d'acides aminés N-terminaux (Mann *et al.*, 1994). Cette région se lie à l'héparine de la même manière que la lactoferrine native. Par contre, cette même région déletée des 6 premiers résidus d'acides aminés (Glu¹-Arg²-Arg³-Arg⁴-Arg⁵-Ser⁶) ne fixe que très faiblement les GAG. Ce domaine N-terminal contient également une deuxième région très basique Arg-Lys-Val-Arg en position 28 à 31. Ces deux séquences de résidus d'acides aminés basiques ressemblent à des sites potentiels de fixation à l'héparine qui sont présents sur d'autres protéines (Cardin et Weintraub, 1989). Ces résultats suggèrent que les deux séquences agissent en synergie pour former un site d'interaction avec les protéoglycannes (figure 5 C, page 31). La modélisation moléculaire de cette région de la lactoferrine conforte cette hypothèse, les deux séquences étant positionnées en surface de la protéine à proximité l'une de l'autre. Cette région forme un domaine très basique qui peut interagir avec les GAG (Mann *et al.*, 1994). Cependant, les travaux de Wu et coll. (1995a) basés sur la structure cristallographique de la lactoferrine suggèrent que le domaine d'interaction avec les protéoglycannes serait formé par un motif structural unique composé des résidus d'acides aminés : Arg⁵, Arg²⁵, Arg²⁸, Arg³¹ et Lys²⁹.

Les GAG sont un des constituants majeurs des protéoglycannes qui se trouvent à la surface de la plupart des cellules et de la matrice extracellulaire. Il semble que les résidus d'Arg²⁻⁵ de la lactoferrine jouent un rôle important dans l'interaction de la protéine avec les cellules de la lignée T lymphoblastique Jurkat établie majoritairement par l'intermédiaire de molécules sulfatées (Legrand *et al.*, 1997). En effet, l'utilisation de différentes lactoferrines déletées dans leur extrémité N-terminale (hLf^{2N}, hLf^{3N}, hLf^{4N}, rhLf^{5N}) montre que l'interaction de la lactoferrine avec des sites de fixation présents en un nombre important à la surface des cellules Jurkat dépend de la séquence Arg²⁻⁴ mais pas de l'Arg⁵ (Legrand *et al.*, 1997).

c. Zone d'interaction de la lactoferrine avec le LRP (« Lipoprotein Receptor-related Protein »)

Meilinger et coll. (1995) ont montré que la lactoferrine interagit avec le LRP présent dans une fraction endosomale de foie de rat. La lactoferrine est également capable d'inhiber la clearance hépatique des chylomicrons résiduels et les β VLDL (Huettinger *et al.*, 1988, 1992). Le LRP est un récepteur multiligand qui permet l'internalisation de nombreuses molécules telles que les chylomicrons résiduels par reconnaissance de l'apolipoprotéine E (Brown *et al.*, 1991). Afin d'étudier l'importance des résidus d'Arg de la lactoferrine dans la fixation au récepteur des chylomicrons résiduels ces acides aminés ont été chimiquement modifiés. Après modification, la lactoferrine est incapable de bloquer la clearance des chylomicrons (Ziere *et al.*, 1992), alors que la seule délétion des 14 premiers résidus d'acides aminés N-terminaux de la lactoferrine n'affecte pas cette compétition (Ziere *et al.*, 1993). Il semble que seul le deuxième cluster basique de l'extrémité N-terminale de la lactoferrine soit impliqué dans la liaison avec le LRP (figure 5 C, page 31). Ce cluster contient la séquence Arg²⁵-X²⁶-X²⁷-Arg²⁸-Lys²⁹-X³⁰-Arg³¹ qui est similaire au site de reconnaissance du récepteur de l'apolipoprotéine E : Arg¹⁴²-X¹⁴³-X¹⁴⁴-Arg¹⁴⁵-Lys¹⁴⁶-Arg¹⁴⁷ (Huettinger *et al.*, 1992). Ainsi, la lactoferrine pourrait entrer en compétition avec l'apolipoprotéine E pour la liaison au LRP par l'intermédiaire de cette séquence de reconnaissance.

d. Zone d'interaction de la lactoferrine avec les lipopolysaccharides

La lactoferrine est capable de se fixer à la paroi bactérienne par l'intermédiaire des lipopolysaccharides (LPS) (Ellison et Giehl, 1991). Cette fixation s'effectue plus précisément sur le lipide A des LPS (Appelmelk *et al.*, 1994). Il s'ensuit une libération de LPS endommageant irrémédiablement la membrane externe des bactéries (Ellison *et al.*, 1988, 1990). L'activité antibactérienne de la lactoferrine a été localisée sur une région de la molécule nommée lactoferricine, elle est située dans une boucle du lobe N-terminal formée par un pont disulfure entre les résidus d'acides aminés Cys²⁰ et Cys³⁷ comprenant ainsi 18 acides aminés (Bellamy *et al.*, 1992a, b) (figure 5 D, page 31). Ellass-Rochard et coll. (1995) ont ensuite montré que la boucle 28 à 34 de la lactoferrine humaine est essentielle pour sa liaison aux LPS, cette région interagissant directement avec le lipide A.

II. LES RECEPTEURS DE LA LACTOFERRINE

La lactoferrine interagit avec un grand nombre de types cellulaires par l'intermédiaire de molécules de surface ubiquitaires ou des récepteurs spécifiques qui ont été plus ou moins bien caractérisés. Elle se lie également aux micro-organismes.

A. Interaction de la lactoferrine avec des molécules de surface ubiquitaires

1. Les protéoglycannes

L'interaction de la lactoferrine avec les GAG sulfatés est bien connue (Blackberg et Hernell, 1980 ; Zou *et al.*, 1992 ; Mann *et al.*, 1994). Bien que ces molécules soient des constituants majeurs de la surface de nombreux types cellulaires, leur participation dans la fixation de la lactoferrine aux cellules n'a pas été directement démontrée. Cependant, de nombreux arguments sont en faveur de cette hypothèse.

Ainsi, les polysaccharides et les dextrans sulfatés sont des inhibiteurs compétitifs de la fixation de la lactoferrine sur les hépatocytes (Mc Abee et Esbensen, 1991) et les macrophages (Imber et Pizzo, 1983 ; Moguilevsky *et al.*, 1987). L'addition d'agent inhibant la sulfatation pendant la croissance des cellules de la lignée lymphoblastique T Jurkat provoque la chute du nombre de sites de fixation de la lactoferrine (Legrand *et al.*, 1997) suggérant que la protéine interagit principalement avec des molécules sulfatées à la surface de ces cellules.

La fixation de la lactoferrine aux protéoglycannes pourrait également jouer un rôle dans les phénomènes biologiques. En effet, la protéase RMCP1 (« Rat Mast Cell Protease » 1) est sécrétée dans la circulation où elle forme un complexe avec des composés hépariniques, qui lui permettent de résister aux inhibiteurs de protéases. Par son affinité à l'héparine, la lactoferrine entre en compétition avec le RMPC1. Cette protéase devient ainsi très vulnérable aux attaques protéolytiques ce qui inhibe son activité (Pejler, 1996). La lactoferrine pourrait également perturber la régulation négative de facteurs de

coagulation tels que la thrombine, qui sont inhibés par l'héparine. En se fixant aux GAG qui ont un effet anti-thrombique reconnu (Pratt, 1993) la lactoferrine serait capable d'interférer avec le processus de coagulation (Wu *et al.*, 1995b).

2. Les lectines

La présence de résidus de fucose dans les chaînes glycaniques de la lactoferrine humaine semble être essentielle à sa fixation sur le récepteur entérocytaire simien (Davidson et Lonnerdal, 1988), cette interaction intervenant par l'intermédiaire de récepteurs de type lectinique, spécifiques du fucose. En parallèle, la fixation de la lactoferrine humaine sur les macrophages alvéolaires humains est inhibée par des néoglycoprotéines à mannose et fucose, suggérant l'existence d'un récepteur de type lectinique capable de reconnaître des chaînes glycaniques renfermant à la fois des résidus de fucose et/ou de mannose en position externe (Goavec *et al.*, 1985).

3. Les composés acides

La lactoferrine est une glycoprotéine possédant un pHi très basique et pourrait de ce fait interagir avec des groupements anioniques présents à la surface des cellules tels que les acides nucléiques attachés ou associés aux membranes.

La lactoferrine est ainsi capable de se lier à des molécules d'ADN membranaires présentes à la surface des monocytes. En effet, le traitement des cellules par des endonucléases provoque une chute de la fixation de la lactoferrine. L'addition d'ADN exogène aux cellules traitées restaure la capacité de fixation des cellules à la lactoferrine (Bennett *et al.*, 1983). La lactoferrine interagit également avec de l'ADN membranaire à la surface des neutrophiles (Bennett *et al.*, 1986).

L'affinité de la lactoferrine pour l'ADN pourrait également permettre sa liaison à l'ADN nucléaire. Il semble que de la lactoferrine pourrait être transportée jusqu'au noyau (Garré *et al.*, 1992). Le transcrite de Δ Lf qui ne code pas pour le peptide signal de la lactoferrine mène certainement à la traduction d'une protéine qui n'emprunte pas les voies de sécrétion naturelle mais qui pourrait par l'intermédiaire de ses séquences d'adressage nucléaire atteindre le noyau (Siebert et Huang, 1997). Ainsi, He et Furmanski (1995) ont

mis en évidence trois séquences consensus d'ADN, auxquelles la lactoferrine se lie. En interagissant avec ces séquences consensus placées en amont d'un gène reporter CAT (« Chloremphenicol Acetyl Transferase ») la lactoferrine est capable d'activer le gène CAT dans les cellules K562 (He et Furmanski, 1995). La lactoferrine pourrait ainsi agir en tant que facteur de transcription.

B. Interaction de la lactoferrine avec les cellules de l'organisme

1. Les hépatocytes

La concentration plasmatique de la lactoferrine est toujours maintenue à un niveau peu élevé. Cette régulation s'explique par son élimination très rapide par le foie (Bennett et Kokocinski, 1979). Ce phénomène d'endocytose suggère l'existence de récepteurs spécifiques de la lactoferrine à la surface des cellules hépatiques. Debanne et coll. (1985) ont initialement montré que des préparations membranaires de foie de rat interagissent avec la lactoferrine humaine, et que 88 % des molécules fixées sont associées avec les cellules parenchymateuses. La fixation de la lactoferrine sur les hépatocytes serait de nature électrostatique, due à la forte basicité de la molécule. Ces travaux ont ensuite été controversés par la découverte de récepteurs spécifiques de la lactoferrine à la surface des hépatocytes. Cependant, la majorité de ces études a été réalisée en système hétérologue posant le problème de la réalité physiologique de ces interactions.

a. Le LRP

La lactoferrine humaine possède la capacité de réduire la clearance hépatique des chylomicrons résiduels (Huettinger *et al.*, 1988, 1992 ; Ziere *et al.*, 1992), elle interagit également avec le LRP (Meilinger *et al.*, 1995). Ce récepteur ubiquitaire fixe de nombreux ligands tels que les lipoprotéines plasmatiques et les complexes protéase-antiprotéase. Il est composé de deux sous-unités, une première sous-unité transmembranaire de 85 kDa et une deuxième sous-unité extracellulaire de 515 kDa sur laquelle se fixe la lactoferrine. Cette fixation est spécifique et dépend du Ca^{2+} . La lactoferrine possède une région qui est similaire au site de reconnaissance des récepteurs LDL présent sur l'apolipoprotéine E qui

lui permet d'entrer en compétition avec les LDL (Huettinger *et al.*, 1992 ; Willnow *et al.*, 1992). Il existe un inhibiteur naturel du LRP : la protéine RAP (« Receptor Associated Protein »), qui est toujours présente dans les préparations purifiées de LRP. De plus, cette protéine est capable d'empêcher la fixation de tous les ligands du LRP (Herz *et al.*, 1991). La RAP est une protéine résidante du réticulum endoplasmique (Bu *et al.*, 1995 ; Bu et Rennke, 1996), elle semble avoir une fonction de protéine chaperonne pour le LRP afin de le maintenir sous une forme inactive le long de la voie de sécrétion (Willnow *et al.*, 1996). Ainsi, la RAP inhibe l'interaction de la lactoferrine humaine sur le LRP immobilisé (Mielinger *et al.*, 1995). L'endocytose et la dégradation de la lactoferrine par des fibroblastes sont également inhibées par la RAP (Willnow *et al.*, 1992). Récemment, les sites de fixation de la RAP, de la lactoferrine et de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène sur le LRP ont été identifiés. Il s'agit d'une région de la protéine qui contient trois répétitions successives de type complément appelées C5 à C7. Des expériences de compétition ont montré que la fixation des différentes protéines pouvait être inhibée en présence des autres, suggérant que la RAP agirait par compétition directe pour inhiber la fixation des différents ligands du LRP (Vash *et al.*, 1998).

b. La sous-unité majeure du récepteur des asialoprotéines (RHL-1)

La lactoferrine bovine interagit avec des hépatocytes isolés du foie de rat de manière spécifique et indépendamment de son degré de saturation en fer, à un pH optimal égal à 7. Cette interaction met en jeu deux classes de sites de fixation. Un site de fixation de haute affinité dépendant du Ca^{2+} ($K_d = 20 \text{ nM}$; $N = 1.10^6$ sites/cellule), et un deuxième site de fixation de basse affinité indépendant du Ca^{2+} ($K_d = 700 \text{ nM}$; $N = 20.10^6$ sites/cellule) mais sensible aux dextrans sulfatés, qui pourrait être en partie des héparanes sulfates (Hu *et al.*, 1993) et des chondroïtines sulfates (Ziere *et al.*, 1996). Plusieurs techniques d'études ont permis de mettre en évidence la nature biochimique du récepteur hépatocytaire de haute affinité de la lactoferrine bovine. Il s'agit de la sous-unité majeure du récepteur des asialoprotéines (RHL-1) qui est une protéine monocaténaire de 45 kDa. L'interaction de la lactoferrine avec les hépatocytes est inhibée en présence de lactose (Bennatt et Mc Abee, 1997 ; Bennatt *et al.*, 1997). De la même manière, l'asialo-orosomucoïde bloque la fixation et l'endocytose de la lactoferrine par les hépatocytes (Mc Abee et Ling, 1997). Cependant, la déglycosylation de la lactoferrine n'affecte pas son interaction avec ce récepteur (Bennatt

et Mc Abee, 1997a). Ces résultats suggèrent que la lactoferrine pourrait interagir avec les hépatocytes au niveau du domaine de reconnaissance des glycanes de RHL-1, de manière indépendante de ses chaînes glycaniques (Bennatt et Mc Abee, 1997 ; Bennatt *et al.*, 1997).

L'apolactoferrine, aussi bien que la forme saturée de la lactoferrine, sont endocytées dans les hépatocytes par l'intermédiaire des sites de fixation dépendants du Ca^{2+} . Cette internalisation fait intervenir des puits recouverts de clathrine (Mc Abee et Esbensen, 1991). L'endocytose de la lactoferrine est suivie du recyclage sous forme intacte de 70 % des molécules endocytées (Mc Abee *et al.*, 1993). Le reste des molécules endocytées est dégradé, les fragments produits sont ensuite relargués à la surface des cellules, tandis que le fer ainsi libéré s'accumule dans les cellules (Mc Abee, 1995). L'endocytose par l'intermédiaire de ce récepteur n'est pas affectée par la présence de chélateurs de fer (Mc Abee *et al.*, 1993).

Par contre, la culture des cellules hépatocytaires en présence d'une surcharge de fer provoque l'augmentation de la fixation et de l'internalisation de la lactoferrine bovine par les cellules d'un facteur 2 à 6 par rapport aux cellules contrôles. Cet effet est réversible en présence de chélateur de fer. Cette augmentation serait due à la présence accrue de récepteurs de la lactoferrine à la surface des cellules (Mc Abee et Ling, 1997).

Ces résultats suggèrent l'existence de spécificités d'espèces dans l'interaction lactoferrine-récepteurs hépatocytaires. La liaison initiale de la lactoferrine humaine avec les cellules parenchymateuses hépatiques semble impliquer le LRP, alors que la lactoferrine bovine interagirait avec les cellules par l'intermédiaire de RHL-1 et d'un récepteur spécifiquement induit par un excès de fer.

2. Les entérocytes

La lactoferrine humaine est présente en faible quantité dans l'intestin de l'enfant nouveau-né sous forme intacte (Spik, 1988), elle est également capable de céder son fer au tissu intestinal de biopsie humaine (Cox *et al.*, 1979). Cette capture du fer à partir de la lactoferrine dans les cellules intestinales suggère l'existence d'un récepteur spécifique de la lactoferrine à la surface des cellules épithéliales de la bordure en brosse de l'intestin.

Mazurier et coll. (1985) ont montré que des préparations de vésicules membranaires de la bordure en brosse d'intestin de lapin interagissent avec la lactoferrine humaine, cette fixation est spécifique, saturable et dépend de la concentration en ions Ca^{2+} . Des expériences de fixation sur des protéines membranaires immobilisées ont montré que la lactoferrine interagit avec une molécule membranaire de 100 kDa. Il existe également un récepteur entérocytaire de la lactoferrine chez la souris. Ce récepteur est spécifique de la lactoferrine isolée du lait mais interagit également avec la lactoferrine d'autres espèces animales, cependant l'affinité du récepteur est plus importante pour le ligand homologue. La fixation de la lactoferrine murine sur son récepteur est dépendante du pH avec un pH optimal de 5,5, ainsi que de la concentration en Ca^{2+} et semble être indépendante de la glycosylation de la molécule (Hu *et al.*, 1988). La chromatographie d'affinité sur lactoferrine immobilisée a permis la purification de ce récepteur, il s'agit d'une protéine monocaténaire dont la masse moléculaire est environ de 130 kDa et le pHi est égal à 5,8. La digestion à la N-glycanase et à l'endo N- β -D-glucosaminidase B de ce récepteur provoque une perte de 25 kDa de masse moléculaire, alors que l'endo N- β -D-glucosaminidase H n'altère pas la molécule, suggérant que le récepteur murin porte des glycanes bi- et tri-antennés. L'utilisation d'agents de couplage montre qu'une molécule de récepteur fixe une seule molécule de lactoferrine (Hu *et al.*, 1990).

Un modèle d'étude simien, plus proche de l'espèce humaine, a également été utilisé afin de mettre en évidence le récepteur entérocytaire de la lactoferrine. Ainsi, les lactoferrines humaine et simienne sont capables d'interagir avec des préparations de vésicules membranaires de la bordure en brosse d'intestin grêle de singe Rhésus, de manière spécifique et saturable, la fixation étant dépendante de la glycosylation de la molécule. Ainsi, la défucosylation de la lactoferrine provoque une chute importante de la fixation de la molécule (Davidson et Lönnerdal, 1988). Ces préparations de vésicules membranaires sont également capables de capter le fer de la lactoferrine et de l'accumuler. La lactoferrine partiellement saturée en fer délivre avec efficacité son fer, bien que son affinité pour le récepteur soit plus basse que la forme complètement saturée. Des expériences de compétition ont ensuite montré que le degré de saturation en fer de la lactoferrine et sa dégradation partielle par protéolyse n'affectent que très légèrement ses capacités d'interaction (Davidson *et al.*, 1990).

La chromatographie d'affinité sur lactoferrine humaine immobilisée a permis l'isolement du récepteur entérocytaire humain de la lactoferrine à partir de préparations de vésicules membranaires de tissu fœtal d'intestin grêle humain. Ce récepteur possède une masse moléculaire de 114 kDa, il est composé de trois sous-unités de 37 kDa chacune. La fixation de la lactoferrine sur son récepteur est spécifique et dépendante du pH avec un pH optimal allant de 6,5 à 7,5. Le récepteur est capable d'interagir avec une demi-molécule de lactoferrine avec la même affinité que la molécule intacte (Kawakami et Lønnerdal, 1991).

L'étude de l'interaction de la lactoferrine a également été réalisée sur les cellules de la lignée HT29D4 dérivée d'un adénocarcinome colique humain. La lactoferrine interagit avec les cellules entérocytaires de manière spécifique, saturable et réversible, suggérant l'existence d'un récepteur spécifique de la lactoferrine humaine à la surface de ces cellules. La lactoferrine forme un complexe avec son récepteur de 300 kDa de masse moléculaire (Roiron *et al.*, 1989). Le lysozyme, l'albumine et le fucose n'affectent pas la fixation de la lactoferrine sur les cellules, montrant que l'interaction de la lactoferrine avec son récepteur ne dépend pas de forces électrostatiques ni de la fucosylation de la protéine. Le degré de saturation de la lactoferrine n'intervient pas non plus dans la fixation, le fer n'étant pas impliqué dans le phénomène de reconnaissance (Roiron-Lagroux et Figarella, 1994). Par contre, l'addition d'acide picolinique, qui est un chélateur de fer, au milieu de culture des cellules de la lignée HT29-18-C1 provoque une augmentation de la fixation de la lactoferrine sur la face apicale des cellules entérocytaires qui est dépendante de la concentration et de la durée du traitement. Cette augmentation de fixation est due à une apparition accrue de sites de fixation de la lactoferrine à la surface des cellules, l'affinité des sites de fixation n'étant pas affectée. Cet effet est aboli en présence d'anisomycine qui est un inhibiteur de synthèse protéique. Ainsi, la biosynthèse du récepteur de la lactoferrine pourrait être régulée en réponse à la concentration intracellulaire de fer dans les cellules épithéliales entérocytaires (Mikogami *et al.*, 1995).

Roiron-Lagroux et Figarella (1990) ont montré qu'après fixation aux cellules HT29D4 la lactoferrine n'est pas internalisée. Par contre, la lactoferrine pénètre à l'intérieur des cellules HT29 différenciées par un mécanisme d'endocytose qui est suivie de la dégradation de la protéine dans les lysosomes (Derisbourg *et al.*, 1990). La culture en monocouche des cellules de la lignée HT29cl.19A sur un filtre poreux a permis l'étude du transport transépithélial de la lactoferrine et de son fer. La lactoferrine interagit avec la face

apicale des cellules de la monocouche, elle traverse ensuite la monocouche de cellules par un mécanisme transcellulaire et non paracellulaire. Après le transport, l'analyse électrophorétique montre que la molécule est majoritairement transportée sous forme dégradée, alors que seule une faible quantité de protéine reste intacte. Il semble que la lactoferrine traverse les cellules de la monocouche par l'intermédiaire de deux mécanismes de transport différents : une voie majeure de dégradation qui conduit à la libération du fer de 90 % des molécules de lactoferrine, le fer étant retenu dans les cellules et les fragments de la protéine transportés vers le compartiment basolatéral et une voie mineure qui aboutit au transport de la protéine sous forme intacte et saturée en fer (Mikogami *et al.*, 1994).

Il semble que la fixation de la lactoferrine à la surface des cellules entérocytaires est majoritairement suivie de sa dégradation à l'intérieur des cellules, seul un faible pourcentage des protéines endocytées traverse les cellules sans être dégradé.

3. Les cellules épithéliales de la glande mammaire

Les récepteurs de la lactoferrine ont été mis en évidence pour la première fois sur les cellules épithéliales de la glande mammaire par Rochard et coll. (1992). Les méthodes de Scatchard et de cytofluorimétrie en flux ont permis d'étudier l'expression de ces récepteurs et les paramètres de fixation de la lactoferrine en fonction de conditions physiopathologiques. L'expression des récepteurs de la lactoferrine n'apparaît pas être corrélée à l'état normal, transformé ou pathologique de ces cellules. L'environnement hormonal ne semble pas davantage influencer cette expression. En effet, les paramètres de fixation de la lactoferrine sur les cellules cancéreuses hormono-dépendantes sont similaires à ceux trouvés pour les cellules cancéreuses hormono-indépendantes. Chacune des lignées étudiées fixe la lactoferrine mais avec des affinités faibles et très variables allant de 120 à 960 nM, reflétant probablement l'interaction de la lactoferrine avec des sites de fixation de basse affinité. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus pour le facteur de croissance FGF pour lequel l'importance du compartiment de faible affinité est proportionnelle à la teneur en protéoglycannes de la cellule et est maximale pour la lignée MDA-MB-231 (Peyrat *et al.*, 1991). Cependant, l'utilisation d'anticorps 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, la

forte proportion de protéoglycannes à la surface des cellules mammaires pouvant masquer la présence de ces récepteurs de haute affinité (Rochard *et al.*, 1992).

Il semblerait que la lactoferrine interagisse avec les cellules mammaires par l'intermédiaire de deux types de sites de fixation, un site de fixation de haute affinité et un site de fixation de basse affinité majoritaire de type protéoglycanne.

4. Les cellules de la circulation sanguine

De nombreuses études concernant l'interaction de la lactoferrine avec les cellules du compartiment sanguin ont été réalisées et montrent que la lactoferrine se lie avec plusieurs types cellulaires dérivant de différentes lignées hématopoïétiques présents dans la circulation périphérique tels que les neutrophiles, les monocytes, les lymphocytes et les plaquettes.

a. Les neutrophiles

La lactoferrine est synthétisée par les leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles puis stockée dans leurs granules secondaires (Masson *et al.*, 1969). La dégranulation des neutrophiles lors du processus inflammatoire conduit à la libération de la lactoferrine qui se fixe à la surface de ces cellules. En effet, Maneva et coll. (1983) ont mis en évidence la présence de deux types de sites de fixation de la lactoferrine à la surface des neutrophiles. Un site de fixation de haute affinité ($K_d = 0,44 \text{ nM}$; $N = 4 \cdot 10^4$ sites/cellule) et un deuxième site de fixation de basse affinité ($K_d = 160 \text{ nM}$; $N = 8 \cdot 10^4$ sites/cellule). Par contre, Birgens et coll. (1984) n'ont caractérisé qu'un seul site de fixation de la lactoferrine sur ces cellules ($K_d = 200 \text{ nM}$; $N = 4,6 \cdot 10^6$ sites/cellule). Le nombre de ces sites de fixation est augmenté sur les précurseurs myéloïdes des neutrophiles chez des patients atteints de leucémie (Birgens *et al.*, 1984). Leur expression pourrait ainsi être régulée au cours de la différenciation des neutrophiles.

b. Les monocytes/macrophages

Van Snick et Masson (1976) ont mis en évidence pour la première fois l'interaction de la lactoferrine avec les monocytes et les macrophages. De nombreux auteurs ont ensuite également décrit cette fixation (Bennett et Davis, 1981 ; Campbell, 1982 ; Birgens *et al.*, 1983 ; Goavec *et al.*, 1985), cependant la nature de cette interaction et sa signification biologique sont encore mal définies.

Différents auteurs ont déterminé des paramètres de fixation très variables de la fixation de la lactoferrine sur les monocytes et les macrophages. Ainsi, Birgens et coll. (1983) suggèrent que les monocytes humains lient la lactoferrine avec une forte affinité ($K_d = 4,5 \text{ nM}$), alors que Britigan et coll. (1991) ont observé une affinité beaucoup plus faible ($K_d = 3600 \text{ nM}$). Des études concernant les macrophages péritonéaux de souris (Van Snick *et al.*, 1977) et les monocytes humains (Birgens *et al.*, 1988) ont montré que la lactoferrine est endocytée à l'intérieur de ces cellules, suggérant l'existence de récepteurs spécifiques. Ces résultats très divers indiquent que l'interaction de la lactoferrine avec ces cellules pourrait être réalisée par l'intermédiaire de plusieurs sites de fixation plus ou moins spécifiques. En effet, selon les auteurs pourraient être impliqués :

- des sites de fixation apparentés au récepteur des LPS (Miyazawa *et al.*, 1991) ;
- des lectines spécifiques du fucose (Goavec *et al.*, 1985) ;
- des charges électrostatiques (Moguilevski *et al.*, 1985) ;
- des molécules d'ADN membranaire (Bennett *et al.*, 1983) ;
- et des récepteurs spécifiques, non encore identifiés (Ismail et Brock, 1993).

Les sites de reconnaissance de la lactoferrine impliqués dans sa fixation aux cellules THP1 différenciées en macrophages ont également été étudiés. Cette interaction mettrait en jeu les chaînes glycaniques de type polylactosaminique de la molécule. En effet, la fixation de la lactoferrine est inhibée en présence des chaînes oligosaccharidiques spécifiques de la lactoferrine et également après élimination de ses chaînes poly-N-acétyllactosaminiques à l'aide d'un traitement par une endo- β -D-galactosidase (Eda *et al.*, 1996). De plus, Eda et coll. (1997) ont récemment isolé par chromatographie d'affinité sur lactoferrine immobilisée des fractions protéiques issues de préparations membranaires de cellules THP1 différenciées en macrophages. Ces protéines interagiraient avec la lactoferrine par l'intermédiaire de ses chaînes polylactosaminiques.

c. Les lymphocytes

L'interaction de la lactoferrine humaine avec la population lymphocytaire a été bien étudiée. Ainsi, la présence de récepteurs spécifiques de la lactoferrine a été suggérée pour la première fois à la surface des lymphocytes péritonéaux de souris par Van Snick et Masson en 1976, puis à la surface des lymphocytes humains en 1981 par Bennett et Davis. L'expression du récepteur de la lactoferrine semble liée au stade de différenciation des lymphocytes. En effet, la lactoferrine humaine ne se lie pas aux lymphocytes non activés du sang périphérique (Mazurier *et al.*, 1989 ; Hammarström *et al.*, 1995), alors que l'activation de la population lymphocytaire par le biais d'un agent mitogène, la phytohémagglutinine, entraîne l'apparition de récepteurs spécifiques de la protéine à la surface des cellules ($K_d = 80 \text{ nM}$; $N = 2.10^5 \text{ sites/cellule}$). Butler et coll. (1990) montrent également que la fixation de la lactoferrine à la surface des lymphocytes B est fonction de l'état de maturation des cellules. Ainsi, les cellules pré-B représentatives d'un stade précoce de différenciation ne fixent pas la lactoferrine, alors que les lymphocytes B immatures, représentatifs d'un stade plus tardif, expriment les récepteurs de la lactoferrine à leur surface. La maturation des cellules en plasmocytes s'accompagne ensuite de la chute de l'expression de ces récepteurs. Une étude plus large concernant plusieurs populations lymphocytaires a récemment été réalisée et montre qu'une proportion significative de lymphocytes activés tels que les lymphocytes T $CD4^+$, $CD8^+$, $\gamma\delta$, les lymphocytes B et les cellules NK interagissent spécifiquement avec la lactoferrine (Mincheva-Nilsson *et al.*, 1997). Ces auteurs ont également observé que l'addition de lactoferrine au milieu de culture des cellules conduit à l'augmentation de l'expression du récepteur de la lactoferrine. Ces résultats suggèrent que la concentration de lactoferrine présente pendant l'activation des lymphocytes influence l'induction et la durée de l'expression du récepteur de la lactoferrine sur ces cellules.

La chromatographie d'affinité sur anticorps anti-lactoferrine immobilisés a permis la purification partielle d'un complexe de la lactoferrine avec le récepteur des lymphocytes activés par la phytohémagglutinine (Mazurier *et al.*, 1989). Ce récepteur se présente sous la forme d'une glycoprotéine membranaire monomérique de masse moléculaire égale à 105 kDa, il existe également une forme soluble de 95 kDa qui est sécrétée dans le milieu de culture des cellules (Bi *et al.*, 1994). Le récepteur lymphocytaire de la lactoferrine a également été identifié à la surface des cellules de la lignée lymphoblastique T Jurkat (K_d

= 40 nM ; $N = 3.10^5$ sites/cellule), ces cellules libèrent une forme tronquée du récepteur de la même manière que les lymphocytes activés du sang périphérique. Le récepteur est réparti non uniformément à la surface des cellules Jurkat de manière localement concentré et le plus souvent associé à des puits recouverts de clathrine, le récepteur est également présent à l'intérieur des cellules, localisé à la périphérie de la membrane cytoplasmique, ce qui suggère l'internalisation du complexe lactoferrine-récepteur (Bi *et al.*, 1994).

Sato et coll. (1990) ont été les premiers à montrer que la fixation de la lactoferrine à la surface des lymphocytes B était suivie de son internalisation puis de son relargage dans le milieu extracellulaire. Bi et coll. (1994, 1996) ont étudié plus précisément ce processus d'endocytose de la lactoferrine par les lymphocytes à l'aide des cellules Jurkat. En effet, la lactoferrine est internalisée par les cellules Jurkat indépendamment de son degré de saturation en fer. La microscopie confocale a permis la localisation intracellulaire de la lactoferrine après internalisation. Ainsi, la protéine est concentrée dans des structures vésiculaires, puis relarguée dans le milieu de culture à la fois sous forme intacte et dégradée. En effet, 30 à 40 % de la lactoferrine serait dégradée à chaque cycle d'endocytose (Bi *et al.*, 1996).

d. Les plaquettes /mégacaryocytes

La présence de récepteurs de la lactoferrine humaine a été mise en évidence à la surface des plaquettes non activées. Cependant, il existe des controverses quant à la présence d'un ou de plusieurs types de sites de fixation. En effet, Nillesse et coll. (1994) ont mis en évidence un seul site de fixation ($K_d = 242$ nM ; $N = 125.10^3$ sites/cellule), alors que Maneva et coll. (1993) identifient un site de fixation de haute affinité ($K_a = 13,6.10^9$ M ; $N = 40$ sites/cellules) et un deuxième site de fixation de basse affinité ($K_a = 1,23.10^9$ M ; $N = 135$ sites/cellules). Le récepteur plaquettaire a été purifié, il possède des propriétés immunologiques et physico-chimiques similaires à celles du récepteur lymphocytaire humain (Leveugle *et al.*, 1993).

Des études ont ensuite été réalisées afin de mettre en évidence la présence de récepteurs spécifiques de la lactoferrine à la surface des précurseurs hématopoïétiques des plaquettes. Ainsi, les cellules de la lignée mégacaryocytaire Dami fixent la lactoferrine de manière spécifique et réversible ($K_d = 446$ nM ; $N = 5,2.10^6$ sites/cellule). Cependant, une

partie de la population cellulaire est impliquée dans l'interaction, seules les cellules de grande taille fixent la lactoferrine. De plus, l'augmentation du nombre de cellules de grande taille au cours de la culture est en corrélation avec l'apparition d'un nombre plus important de cellules capables d'interagir avec la lactoferrine, le récepteur de la lactoferrine apparaissant au cours de la différenciation des cellules avant la phase d'endomitose (Nillesse *et al.*, 1994).

La lactoferrine interagit donc avec de nombreuses cellules présentes dans la circulation sanguine. Ces interactions sont généralement caractérisées par des sites de fixation de haute et de basse affinité. La fixation de la lactoferrine est suivie ou non d'internalisation spécifique du type cellulaire étudié.

5. Les cellules du système nerveux central

Plusieurs études ont décrit la présence de la lactoferrine dans le SNC, d'une part, dans le LCR (Terent *et al.*, 1981 ; Hällgren *et al.*, 1982) et, d'autre part, dans les différents types cellulaires qui constituent le SNC (Kawamata *et al.*, 1993 ; Leveugle *et al.*, 1994, 1996). Cette localisation implique l'existence de récepteurs spécifiques de la lactoferrine à la surface des cellules du SNC. Ainsi, deux des récepteurs connus de la lactoferrine ont été décrits dans le SNC : le LRP et le récepteur de type lymphocytaire (figure 6, page 47).

La distribution du LRP a été étudiée dans le SNC et montre que ce récepteur est présent sur les neurones (Bu *et al.*, 1994 ; Tooyama *et al.*, 1995), sur quelques cellules gliales dont les astrocytes et de manière discontinue le long des capillaires cérébraux (Tooyama *et al.*, 1995). Le LRP est associé avec certains désordres neurodégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer (Rebeck *et al.*, 1995) et, dans ce cas, il est présent en quantité plus importante sur certains neurones. Le LRP pourrait donc permettre l'accumulation de la lactoferrine dans certaines régions spécifiques du cerveau.

Le marquage de coupes de tissu cérébral humain à l'aide d'anticorps spécifiques du récepteur lymphocytaire humain de la lactoferrine montre la présence de ce récepteur sur plusieurs types cellulaires du SNC (Faucheux *et al.*, 1995). En effet, de nombreux neurones sont immunomarqués au niveau du périkaryon, des dendrites et de l'axone. La présence de neuromélanine dans certains neurones marqués suggère que plusieurs d'entre eux soient

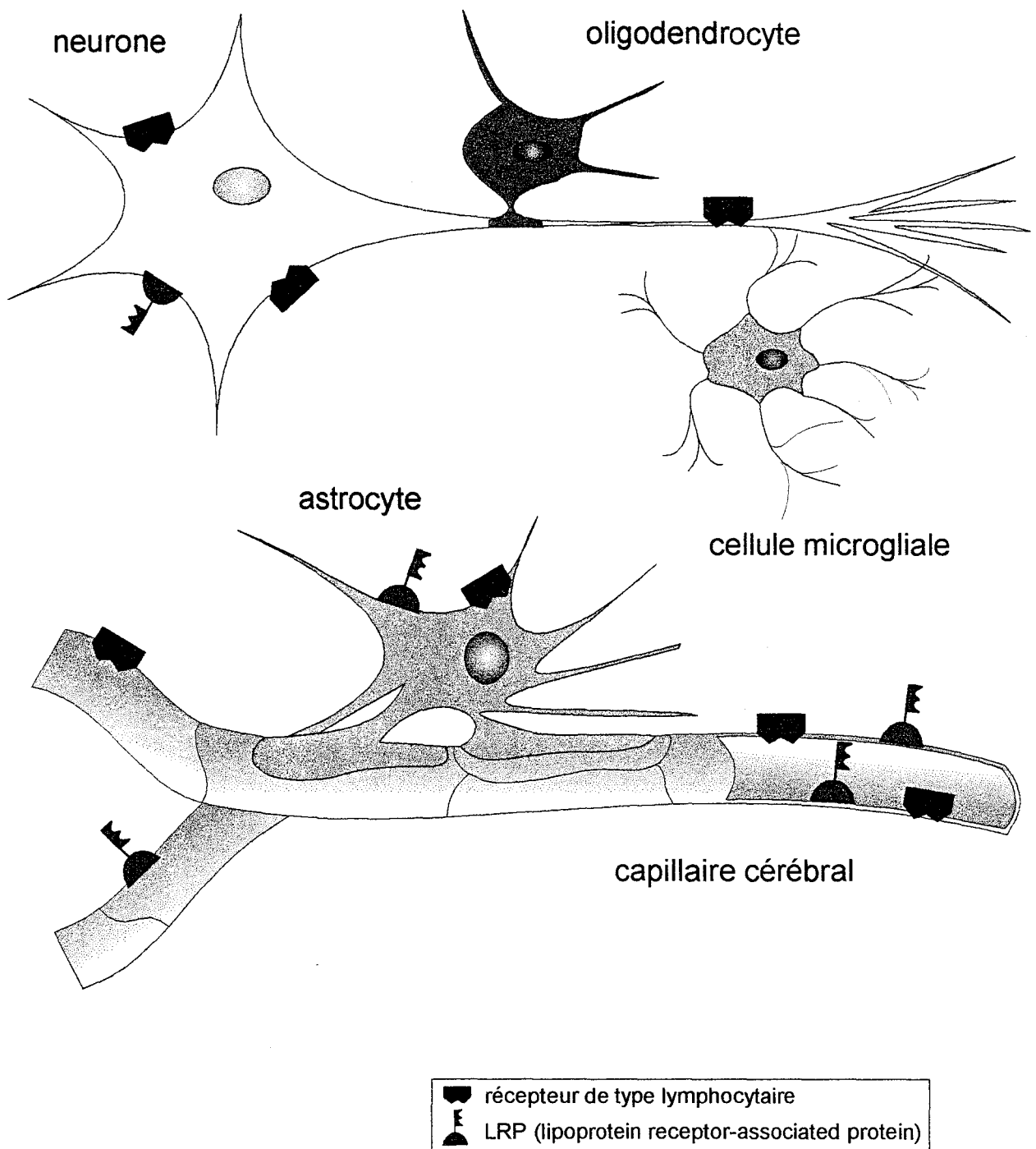


Figure 6 : Distribution des différents récepteurs de la lactoferrine sur les cellules du système nerveux central.

des neurones dopaminergiques. Des capillaires cérébraux sont également marqués ainsi que quelques cellules gliales. La morphologie et la taille de ces cellules suggèrent que la majorité d'entre elles sont des astrocytes. Parmi toutes les régions étudiées, le mésencéphale se caractérise par un marquage plus intense. Une étude comparative entre des patients contrôles et des patients atteints de la maladie de Parkinson montre que le nombre de neurones et de capillaires sur lesquels se situe le récepteur de la lactoferrine est augmenté dans les régions du mésencéphale où la perte neuronale est la plus sévère. De plus, dans la substance noire, l'intensité du marquage des neurones et des capillaires est plus importante chez les patients les plus atteints (Faucheux *et al.*, 1995). En parallèle, la distribution cellulaire de la lactoferrine est augmentée dans les neurones survivants des patients atteints de la maladie de Parkinson (Leveugle *et al.*, 1996). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression du récepteur de la lactoferrine pourrait contribuer à l'apport de la lactoferrine aux cellules et à son accumulation dans le mésencéphale.

C. Interaction de la lactoferrine avec les micro-organismes

1. Les bactéries

De nombreuses bactéries à Gram- fixent la lactoferrine (Gray-Owen et Schryvers, 1996 pour revue générale). La lactoferrine interagit avec ces bactéries par l'intermédiaire d'un des composants majeurs de leur membrane externe le LPS (Ellison et Giehl, 1991) et plus précisément grâce au lipide A (Appelmelk *et al.*, 1994). Cependant, certaines bactéries possèdent des récepteurs spécifiques de la lactoferrine. Ainsi, les récepteurs de la famille des *Neisseriaceae* ont été bien étudiés. Ces protéines monocaténaires appelées Lbp possèdent de nombreuses homologues avec les récepteurs bactériens de la transferrine. Deux formes de Lbp ont été identifiées, la LbpA qui a une masse moléculaire de 100 kDa et la LbpB qui possède une masse moléculaire de 85 kDa (pour revue générale Gray-Owen et Schryvers, 1996). Récemment, une Lbp a été identifiée sur la membrane externe de *Helicobacter pylori* (Dhaenens *et al.*, 1997). Ce récepteur, très spécifique de la lactoferrine humaine, n'est exprimé que lorsque les bactéries sont cultivées dans un milieu dépourvu de fer.

Les bactéries interagissent avec la lactoferrine afin de capter son fer, ce phénomène apparaît seulement lorsque les bactéries ont un besoin important de fer, suggérant que

l'expression des récepteurs bactériens de la lactoferrine serait régulée par le taux de fer disponible dans le milieu.

2. Les parasites

La lactoferrine humaine est capable d'interagir avec des parasites de l'homme tels que *Trichomonas vaginalis* (Kenneth *et al.*, 1984) et *Trypanosoma cruzi* (Lima et Kierszenbaum, 1985) par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques présents à la surface de ces parasites. La lactoferrine fixée aux macrophages pourrait jouer un rôle dans la phagocytose de *Trypanosoma cruzi* par les monocytes, en facilitant l'interaction du parasite avec ces cellules (Lima et Kierszenbaum, 1985).

III. LES ROLES BIOLOGIQUES DE LA LACTOFERRINE

Les premiers rôles décrits pour la lactoferrine étaient basés sur sa capacité à fixer le fer et concernaient plus particulièrement son activité bactériostatique et sa participation dans l'absorption intestinale du fer. Le rôle possible de la lactoferrine dans la nutrition martiale résultait de plusieurs observations. D'une part, le lait de femme est extrêmement riche en lactoferrine et la majeure partie du fer présent dans le lait humain est fixée à cette dernière (Fransson et Lönnerdal, 1980). Ensuite, seuls les nouveau-nés nourris au lait maternel maintiennent des réserves en fer correctes jusqu'à l'âge de six mois (Duncan *et al.*, 1985 ; Lönnerdal, 1985), suggérant une très grande biodisponibilité en fer du lait maternel. D'autre part, des études réalisées *in vivo* utilisant un radio-isotope du fer ont montré que l'absorption du fer est plus importante à partir du lait maternel que du lait reconstitué pour nourrisson (Saarinen *et al.*, 1977). Cependant, ces résultats sont insuffisants pour prouver que la biodisponibilité en fer du lait maternel serait due à la lactoferrine.

Depuis ces dernières années, les rôles biologiques décrits pour la lactoferrine sont centrés presque exclusivement sur la défense de l'organisme. Bien que ses rôles soient nombreux et largement distribués dans l'organisme, ils sont encore très controversés et restent à élucider.

A. Effet antiviral de la lactoferrine

L'activité antivirale de la lactoferrine a récemment été mise en évidence. En effet, la lactoferrine est capable d'inhiber *in vitro* l'infection de certains virus, tels que le cytomégalovirus humain (HCMV), le virus de l'herpès (HSV-1) (Hasegawa *et al.*, 1994) et le virus HIV-1 (Harmsen *et al.*, 1995). Cette activité antivirale est indépendante de la présence d'acide sialique, du degré de saturation en fer de la lactoferrine (Hasegawa *et al.*, 1994) et également du type de métal fixé à la molécule (Marchetti *et al.*, 1998). La lactoferrine agit en prévenant l'adsorption et/ou la pénétration des virus dans les cellules hôtes. En effet, la seule pré-incubation des cellules en présence de la lactoferrine est

suffisante pour empêcher l'infection par le virus HCMV (Hasegawa *et al.*, 1994). La liaison des particules virales HSV-1 aux cellules hôtes est également fortement inhibée lorsque la lactoferrine est ajoutée au cours de la phase d'attachement du virus aux cellules (Marchetti *et al.*, 1996). Par contre, elle est incapable d'inhiber l'infection du virus HCMV lorsque cette dernière est déjà engagée (Harmsen *et al.*, 1995), suggérant qu'elle interviendrait sur les événements précoces de l'infection virale. Les voies infectieuses de certains virus font intervenir un mécanisme d'adsorption aux GAGs des membranes des cellules hôtes (Compton *et al.*, 1993). La lactoferrine est connue pour interagir avec des molécules de type héparinique (Wu *et al.*, 1995a). Ainsi, en se fixant aux GAGs des cellules hôtes, elle pourrait inhiber l'adsorption de ces virus. Par contre, la lactoferrine est incapable d'interférer avec la synthèse ou la production des virus de type rotavirus lorsqu'elle est incubée avec les cellules HT-29 avant l'infection virale. Cependant, elle est capable d'inhiber la réplication des rotavirus quand elle est présente au cours de l'étape d'adsorption virale. Les rotavirus reconnaissent des récepteurs présents à la surface des cellules HT-29 qui sont différents des GAGs, suggérant que la lactoferrine ne pourrait pas entrer en compétition avec les particules virales pour la fixation à leurs récepteurs cellulaires, mais préviendrait l'infection virale par fixation directe sur les rotavirus (Superti *et al.*, 1997).

L'effet antiviral de la lactoferrine a également été étudié *in vivo*. En effet, un traitement associant la lactoferrine et l'IFN- γ diminue fortement la charge virale de souris infectées par le virus Friend. Ce traitement augmente également le taux de survie des souris infectées (Lu *et al.*, 1991). De plus, l'administration de lactoferrine à des souris infectées par le virus MCMV les protège complètement de la mort due à l'infection. Ce phénomène s'accompagne de l'augmentation significative de l'activité des cellules NK. Ainsi, l'effet antiviral *in vivo* de la lactoferrine serait réalisé par l'intermédiaire des cellules NK (Shimizu *et al.*, 1996). Ces résultats suggèrent que la lactoferrine pourrait exercer un effet significatif sur la réponse immunitaire lors de la phase précoce de l'infection virale en activant les cellules compétentes du système immunitaire indépendant du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité).

Cette action antivirale de la lactoferrine ouvre une nouvelle voie dans la prévention et la thérapie des infections virales.

B. Effets antibactérien et antifongique

La lactoferrine possède un large spectre antimicrobien qui s'étend des bactéries Gram- et Gram+, aux levures et champignons (Brock *et al.*, 1984 ; Boesman-Finkelstein et Finkelstein, 1985 ; Bellamy *et al.*, 1992a, 1993).

1. Activités bactériostatique et bactéricide

Le fer est un élément essentiel à la croissance et à la prolifération de nombreux micro-organismes. La lactoferrine est sécrétée dans les fluides biologiques sous forme non saturée ou faiblement saturée en fer (entre 6 et 8 %). Ainsi, l'apolactoferrine par sa très forte affinité pour le fer contribue à inhiber la croissance des bactéries par compétition avec les sidérophores bactériens pour la séquestration du fer libre (Fe^{3+}). C'est le principal mécanisme par lequel la lactoferrine exerce son action bactériostatique (Spik et Montreuil, 1983). Cependant, l'effet bactériostatique de la lactoferrine pourrait être temporaire (Brock *et al.*, 1984). En effet, certaines bactéries libèrent des sidérophores qui sont capables de capter le fer de la lactoferrine et d'autres protéines afin de le céder ensuite aux micro-organismes (Otto *et al.*, 1992). Des protéines FBP (« Ferric ion Binding Protein ») ont ensuite été mises en évidence chez plusieurs espèces bactériennes et présentent une forte homologie structurale avec les protéines de la famille des transferrines. Ces FBP agiraient en séquestrant le fer de la lactoferrine et des autres transferrines pour ensuite le transporter à l'intérieur des bactéries (Bruns *et al.*, 1997).

A côté de cette activité bactériostatique, la lactoferrine a aussi une activité bactéricide *in vitro* indépendante de sa fonction de chélateur du fer. La lactoferrine pourrait déstabiliser la membrane des bactéries Gram- et provoquer le relargage de LPS (Soukka *et al.*, 1991). Les parois deviennent ainsi plus fragiles et sensibles à l'action de certains antibiotiques (Ellison *et al.*, 1988 ; Ellison et Giehl, 1991). L'utilisation de la microscopie électronique a confirmé l'effet déstabilisateur de la lactoferrine sur la paroi des bactéries Gram- (Yamauchi *et al.*, 1993). La lactoferrine interagit également avec plusieurs constituants de la membrane externe de différentes bactéries Gram- tels que les porines Omp F et Omp C des bactéries *Escherichia coli*. La lactoferrine perturberait le transport de substances nutritives passant par les porines (Erdei *et al.*, 1994 ; Sallman *et al.*, 1999).

Un peptide de la lactoferrine possédant une activité bactéricide a ensuite été isolé par hydrolyse enzymatique des lactoferrines bovine et humaine (Tomita *et al.*, 1994). Ce peptide correspond aux résidus d'acides aminés 1-47 pour la lactoferrine humaine et 17-41 pour la lactoferrine bovine. Il montre un large spectre d'activité antimicrobienne allant des bactéries Gram-, Gram+, des levures et également des champignons microscopiques. L'activité bactéricide de la lactoferrine est indépendante du domaine de fixation du fer de la lactoferrine (Saito *et al.*, 1991).

Bien que ces effets antibactériens soient importants *in vitro*, les études réalisées *in vivo* semblent moins convaincantes notamment concernant l'intervention directe de la lactoferrine dans la protection des nouveau-nés contre les infections gastro-intestinales. Les enfants nourris au lait maternel semblent plus résistants aux infections (Bullen *et al.*, 1972). La lactoferrine pourrait promouvoir la mise en place d'une flore riche en bifidobactéries remplaçant la flore initiale composée d'entérobactéries de type *Escherichia coli*, de streptocoques et de clostridium (Balmer et Wharton, 1989). Cependant, la lactoferrine bovine ajoutée à l'alimentation des nouveau-nés ne semble pas influencer la microflore intestinale (Balmer *et al.*, 1989). En fait, la lactoferrine agit seulement en conjonction avec d'autres facteurs présents dans le lait, tels que les immunoglobulines de sécrétions (IgA) et le lysozyme, avec lesquels elle est associée par des interactions ioniques (Jorieux *et al.*, 1984).

2. Activité antifongique

La lactoferrine humaine possède une action antifongique sur plusieurs souches de *Candida* (Soukka *et al.*, 1992 ; Nikawa *et al.*, 1993, 1994). La lactoferrine bovine quant à elle intervient à la fois sur des levures et des champignons filamenteux. La lactoferrine bovine agit également, cependant son effet est supérieur à celui de la lactoferrine bovine intacte. La lactoferrine B interviendrait directement à la surface des champignons en induisant des modifications ultrastructurales (Bellamy *et al.*, 1994). De plus, contrairement à leurs actions bactéricides synergiques, les effets antifongiques de la lactoferrine et du lysozyme ne s'associent pas contre les différentes espèces de *Candida* (Samaranayake *et al.*, 1997).

C. Modulation de la prolifération cellulaire

L'activité facteur de croissance de la lactoferrine a été mise en évidence *in vitro* sur plusieurs lignées cellulaires en présence d'un milieu de culture dépourvu de sérum. Cette activité a tout d'abord été décrite sur des lignées lymphocytaires humaines B et T (Hashizume *et al.*, 1983). La lactoferrine stimule également la prolifération des cellules de la lignée humaine d'adénocarcinome de côlon HT-29 (Amouric *et al.*, 1984) et de la lignée macrophagique murine (Oria *et al.*, 1988). La technique d'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN a ensuite permis l'étude plus précise de l'action de la lactoferrine sur la croissance cellulaire. Ainsi, la lactoferrine active cette incorporation dans l'ADN de cellules isolées de cryptes d'intestin de rat (Nichols *et al.*, 1987, 1989), de fibroblastes embryonnaires de souris de la lignée BALB/C 3T3 (Azuma *et al.*, 1989), de lymphocytes humains activés à la PHA isolés du sang périphérique (Mazurier *et al.*, 1989) et de cellules de la lignée myéloblastique L6 (Byatt *et al.*, 1990). Cette activité facteur de croissance de la lactoferrine ne semble donc pas être strictement spécifique de l'espèce. Cependant, la lactoferrine humaine est incapable d'activer la croissance des cellules d'une lignée lymphocytaire murine alors qu'elle stimule celle de lignées équivalentes humaines (Hashizume *et al.*, 1983).

Le mécanisme d'action de la lactoferrine sur la prolifération cellulaire n'est pas encore élucidé. Le rôle du fer dans cette action reste également très controversé. Ainsi, la lactoferrine pourrait agir par l'intermédiaire de son fer en apportant aux cellules cet élément qui est indispensable à la croissance cellulaire, seule la lactoferrine sous forme saturée en fer étant capable d'activer la prolifération des cellules de la lignée humaine épithéliale intestinale Caco 2 (Oguchi *et al.*, 1995) et de la lignée fibroblastique 3T3 (Azuma *et al.*, 1989). Cependant, elle intervient également indépendamment de son degré de saturation en fer sur la prolifération de plusieurs lignées cellulaires (Oria *et al.*, 1988 ; Byatt *et al.*, 1990 ; Hagiwara *et al.*, 1995), suggérant que la protéine elle-même aurait une action mitogène. D'autre part, l'addition simultanée de lactoferrine et d'EGF (« Epidermal Growth Factor ») au milieu de culture des cellules épithéliales d'intestin de rat (IEC-18) provoque un effet synergique de ces deux molécules sur la prolifération (Hagiwara *et al.*, 1995). La lactoferrine pourrait donc avoir un effet modulateur de l'action des facteurs de croissance présents dans le sérum du milieu de culture.

Une activité inhibitrice de la croissance cellulaire a également été décrite *in vitro* pour la lactoferrine. En effet, la lactoferrine bovine inhibe la prolifération des cellules de lignées mammaires bovines, en présence ou en absence de sérum (Rejman *et al.*, 1992). Hurley et coll. (1994) ont ensuite confirmé et étendu cette étude. Ainsi, la lactoferrine humaine possède également un effet antimitogène sur plusieurs lignées cellulaires humaines mammaires. Cette action de la lactoferrine est indépendante de son degré de saturation en fer et serait spécifique de l'espèce. De plus, des effets antiprolifératifs de la lactoferrine bovine ont récemment été mis en évidence *in vivo* chez le rat. En effet, l'administration de la lactoferrine bovine réduit significativement l'incidence et le nombre d'adénocarcinomes du côlon chez des rats f344 traités par l'azoxyméthane. La réduction de la formation de foyers de cryptes anormales intestinales pourrait être liée à une activation des cellules NK (Sekine *et al.*, 1997a, b).

D. Régulation de la myélopoïèse

L'hématopoïèse est un processus complexe régulé par un grand nombre de cytokines capables de stimuler ou d'inhiber la croissance et la maturation des cellules souches hématopoïétiques. La lactoferrine fait partie de ces facteurs agissant sur la myélopoïèse. Ainsi, elle régule négativement par un mécanisme rétroactif *in vitro* (Broxmeyer *et al.*, 1978, 1983, 1985) et *in vivo* (Broxmeyer *et al.*, 1986, 1987) la production des colonies de granulocytes/macrophages. Les études de Broxmeyer et coll. (1978, 1983, 1985) émettent initialement l'hypothèse d'un mécanisme d'action direct, par inhibition de la production par les macrophages de GM-CSF (« Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor ») responsable de la prolifération et de la différenciation des cellules souches formant les colonies de granulocytes/macrophages. Cependant, le mécanisme mis en jeu semble plus complexe, la lactoferrine étant sans effet sur la production de GM-CSF lorsque les monocytes sont séparés de la population lymphocytaire (Bagby *et al.*, 1981). La lactoferrine agirait par un mécanisme indirect en inhibant la libération de l'IL1 par les macrophages (Zucali *et al.*, 1989). Cette cytokine est responsable de la libération de GM-CSF par les lymphocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Bagby *et al.*, 1981, 1983a, b). D'autre part, la lactoferrine réduit la survie des cellules souches des granulocytes/macrophages et des érythrocytes en culture par inhibition de la libération de

l'IL1 (Hangoc *et al.*, 1991). Cet effet inhibiteur de la lactoferrine s'effectuerait à un niveau transcriptionnel (Penco *et al.*, 1995).

E. Implication dans le système immunitaire

1. Maturation des lymphocytes

La maturation des cellules lymphocytaires est caractérisée par l'apparition de différents marqueurs à la surface des cellules.

Des études ont été réalisées concernant l'action de la lactoferrine sur les cellules lymphocytaires immatures. Ainsi, Zimecki et coll. (1991) ont mis en évidence que la lactoferrine induit, *in vitro* chez les thymocytes murins immatures CD4⁻ CD8⁻, l'expression du marqueur de surface CD4 et, par conséquent, l'acquisition d'une activité de type auxiliaire. De plus, l'administration intrapéritonéale de lactoferrine à des souris trois heures avant l'injection de cellules étrangères immunogènes provoque *in vivo* une augmentation de la réponse immune humorale aussi importante que celle induite par l'IL1. Ces résultats suggèrent que la lactoferrine stimule la réponse immunitaire par un processus qui implique l'induction de la différenciation des cellules T. En effet, la lactoferrine est capable d'induire une augmentation de l'expression des récepteurs des immunoglobulines G ou M à la surface des thymocytes humains (Gnezditskaya *et al.*, 1987). Elle exerce également une action sur la maturation des cellules lymphocytaires B. En effet, l'incubation de la lactoferrine avec des cellules lymphocytaires B spléniques isolées de souris amène des changements phénotypiques et fonctionnels des cellules (Zimecki *et al.*, 1995). D'autre part, la culture des cellules de la lignée lymphoblastique T Jurkat en présence de lactoferrine et de 10 % de sérum de veau fœtal provoque une diminution du volume cellulaire, la perte du marqueur de surface CD71, la diminution de l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules et également une augmentation du pourcentage de cellules en phase G0/1 du cycle cellulaire. Ces modifications s'accompagnent de l'apparition du marqueur de surface CD4. De plus, en présence continue de lactoferrine, les cellules en prolifération entrent lentement dans un état quiescent qui les mène vers la différenciation (Bi *et al.*, 1997).

L'interaction de la lactoferrine avec les cellules de la population lymphocytaire pourrait jouer un rôle important dans la réponse immunitaire. Ainsi, la lactoferrine induirait une réponse immune en favorisant la croissance et la prolifération des sous-populations activées (Hashizume *et al.*, 1983 ; Mazurier *et al.*, 1989 ; Hammarström *et al.*, 1995 ; Mincheva-Nilsson *et al.*, 1997), elle permettrait également la différenciation de certaines cellules lymphocytaires (Gnezditskaya *et al.*, 1987 ; Zimecki *et al.*, 1991, 1995).

2. Modulation de la synthèse d'anticorps

La réponse immunitaire des cellules spléniques de souris peut être inhibée *in vitro* par la lactoferrine. En effet, l'incubation des cellules spléniques en présence de lactoferrine et de macrophages réduit significativement la production d'IgM (Duncan et McArthur, 1981). L'action de la lactoferrine semble impliquer un mécanisme indirect qui fait intervenir les macrophages, par inhibition de la libération d'agents responsables de l'induction de la synthèse d'anticorps par les lymphocytes B. De plus, le mode d'action de la lactoferrine est identique à celui conduisant à l'inhibition de la libération du facteur GM-CSF.

3. Modulation de l'activité cytotoxique des cellules mononucléées du sang

Les cellules mononucléées isolées du sang périphérique possèdent une activité cytotoxique vis-à-vis de cellules tumorales ou anormales. Cette activité est liée à deux populations cellulaires distinctes : les cellules NK (« Natural Killer ») et les cellules monocytaires (monocytes/macrophages).

a. Modulation de l'activité cytotoxique des cellules NK

La lactoferrine possède la capacité d'interagir avec les cellules NK (Hammarström *et al.*, 1995). Cependant, l'action de la lactoferrine sur cette population de cellules est assez controversée. 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 ; Mc Cormick *et al.*, 1991). Par contre, l'ajout de lactoferrine aux cellules effectrices mises en présence de cellules tumorales K562 provoque l'augmentation de la cytolysse des cellules cibles. Cependant, le pré-traitement des cellules effectrices avec la lactoferrine n'est pas efficace (Shau *et al.*, 1992). Damiens et coll. (1998) ont ensuite montré que l'action de la lactoferrine sur la cytotoxicité des cellules NK est dépendante du phénotype des cellules cibles. Ainsi, la lactoferrine ne modifie pas la susceptibilité à la lyse des cellules de type hématopoïétique telles que les cellules Jurkat ou K562, par contre, elle réduit significativement celles des cellules de carcinome épithélial mammaire ou d'adénocarcinome colique. De plus, la lactoferrine agirait par inhibition de la prolifération des cellules épithéliales en les bloquant à la transition de la phase G1 et de la phase S du cycle cellulaire.

L'effet de la lactoferrine sur l'activité cytotoxique antitumorale *in vivo* a également été recherché. Ainsi, l'administration intrapéritonéale de lactoferrine 24 heures avant l'injection de cellules de mélanome B16-F10 aux souris C57bl/6 réduit de façon notable la formation de métastases pulmonaires. Cet effet est aboli par l'injection d'anticorps anti-asialo-GM1 capable de neutraliser l'activité des cellules NK, ce qui suggère l'implication des cellules NK dans l'activité antimétastatique de la lactoferrine (Bezault *et al.*, 1994). De plus, Shimizu et coll. (1996) ont montré que l'injection de lactoferrine avant l'infection de souris Balb/c par le cytomégalovirus murin les protège complètement de la mort provoquée par l'infection virale, l'activité des cellules NK est également fortement augmentée chez les souris traitées avec la lactoferrine. Cette action de la lactoferrine sur l'augmentation de l'activité des cellules NK interviendrait de façon indirecte par l'intermédiaire de l'activation des lymphocytes T qui produiraient des cytokines capables d'agir sur les cellules NK.

b. Modulation de l'activité cytotoxique des monocytes

La lactoferrine intervient sur l'activité cytotoxique des monocytes/macrophages. En effet, le traitement de monocytes humains isolés du sang périphérique avec la lactoferrine augmente la cytotoxicité de ces cellules par rapport aux cellules tumorales K562 (Horwitz *et al.*, 1984 ; Mc Cormick *et al.*, 1991). La lactoferrine semble affecter plus particulièrement l'activité de la population de cellules monocytaires montrant des

propriétés d'adhérence (Nishiya et Horwitz, 1982), en effet seul ce type de cellules monocytaires peut présenter une activité NK. Par contre, la lactoferrine provoque une diminution de l'activité ADCC (« Antibody Dependant Cell Cytotoxicity ») des cellules monocytaires (Nishiya et Horwitz, 1982). Ces actions de la lactoferrine sur les différents mécanismes de cytotoxicité des cellules monocytaires restent à élucider.

F. Implication dans la réponse inflammatoire

La présence d'agents pathogènes dans l'organisme active le système immunitaire et déclenche le processus inflammatoire. Les cellules phagocytaires du système de l'immunité naturelle telles que les macrophages ou les leucocytes granulocytes constituent la première ligne de défense de l'organisme contre ces agents et ont un rôle essentiel dans le contrôle des infections bactériennes courantes. Les leucocytes granulocytes ont une activité précoce dans ce processus qui est liée à leur très forte mobilité, leur permettant de rejoindre rapidement le site de l'inflammation, et à leur activité cytotoxique due en grande part à la production d'espèces oxygénées réactives. Les macrophages et les granulocytes possèdent des récepteurs membranaires qui ont la capacité d'interagir avec des constituants de la surface de nombreuses bactéries. Cette reconnaissance conduit à l'ingestion et à la destruction de ces bactéries, et également à l'induction de la sécrétion de cytokines et d'autres médiateurs chimiques. Cette étape est suivie de la migration des leucocytes neutrophiles vers l'endothélium vasculaire dont les propriétés adhésives sont modifiées et de l'activation des leucocytes neutrophiles qui aboutit à la libération de nombreux composés dont la lactoferrine.

La lactoferrine est présente tout le long du processus inflammatoire et semble intervenir à chacune des étapes clés de l'inflammation. Par ailleurs, l'absence de libération de lactoferrine lors du processus inflammatoire semble provoquer de graves perturbations sur le profil inflammatoire. Ainsi, des patients atteints d'une maladie congénitale caractérisée par l'absence de granules secondaires ne produisent pas de lactoferrine et souffrent d'un défaut chronique de la réponse inflammatoire (Johnston *et al.*, 1992b). Ces résultats suggèrent que l'absence de libération de lactoferrine pourrait provoquer la perturbation du processus inflammatoire.

1. Modulation de la migration des cellules immunitaires sur le lieu de l'infection

Lors du processus inflammatoire, les leucocytes neutrophiles vont rejoindre le lieu de l'infection sous l'influence de facteurs chimiotactiques. L'interaction des neutrophiles avec les cellules endothéliales est une étape essentielle à la migration des cellules. Cette étape passe par l'intermédiaire de l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales qui sont activées par des médiateurs libérés lors de l'inflammation. Ainsi, la P-sélectine apparaît dès que les cellules endothéliales sont exposées au leucotriène B₄, au C5a ou à l'histamine. La E-sélectine apparaît quant à elle ensuite, après exposition des cellules endothéliales au LPS ou au TNF- α . La fixation des leucocytes à la P-sélectine ou la E-sélectine conduit à l'adhérence de ces cellules aux cellules endothéliales et à leur roulement le long de l'endothélium vasculaire. Les interactions entre les cellules sont ensuite renforcées par la liaison des intégrines leucocytaires aux molécules de l'endothélium appartenant à la superfamille des immunoglobulines dont l'expression est induite par le TNF- α . Cette étape est suivie du passage des cellules à travers l'endothélium qui est appelé diapédèse permettant le recrutement des cellules phagocytaires telles que les monocytes et les neutrophiles au site de l'infection. La lactoferrine libérée au cours de la dégranulation des neutrophiles pourrait jouer un rôle important dans ce processus.

En effet, la lactoferrine augmente fortement la mobilité des granulocytes (Garh *et al.*, 1991). L'adhérence de ces cellules augmente également *in vitro* en présence de lactoferrine (Oseas *et al.*, 1981). De plus, il existe une corrélation entre le relargage de la lactoferrine par les neutrophiles pendant la phase précoce de la dégranulation en réponse à un stimulus chimiotactique et l'augmentation de la capacité d'adhérence des cellules. La lactoferrine conduit également *in vivo* à l'adhérence des granulocytes aux endothéliums vasculaires chez le hamster et induit une neutropénie transitoire (Boxer *et al.*, 1982). De même, l'injection intra-artérielle de lactoferrine chez le rat provoque des lésions microvasculaires de l'intestin qui sont associées avec une augmentation de l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales, cet effet de la lactoferrine serait dépendant de la présence de la P-sélectine (Kurose *et al.*, 1994). Ainsi, la lactoferrine libérée aurait un rôle d'autorégulation et permettrait la migration des granulocytes vers les sites infectieux afin d'amplifier la réponse inflammatoire, elle contribuerait également au phénomène de neutropénie qui a

lieu lors de l'activation des granulocytes par des facteurs chimiotactiques (Boxer *et al.*, 1982).

Cependant, cette théorie est très controversée. En effet, Kijlstra et Broersma (1984) ont montré que la lactoferrine était capable d'inhiber la migration des granulocytes *in vitro*. A forte concentration, la lactoferrine agirait directement sur les cellules, alors qu'à faible concentration, la lactoferrine agirait par l'intermédiaire d'un facteur inhibiteur appelé LIF (« Leukocyte migration Inhibitor Factor »). Crouch et coll. (1992) ont ensuite établi que cet effet de la lactoferrine était indirect et interviendrait par inhibition de la synthèse de l'IL2, de l'IL1 et de TNF- α . En effet, le TNF- α et l'IL1 sont des régulateurs de l'activation des neutrophiles qui induisent l'augmentation de la production de molécules d'adhésion sur les leucocytes et les cellules endothéliales (Pohlman *et al.*, 1986 ; Moser *et al.*, 1989), menant à une augmentation de l'adhérence et de la diapédèse des cellules. Le TNF- α régule aussi la réponse des neutrophiles aux facteurs chimiotactiques (Klebanoff *et al.*, 1986) et stimule directement la dégranulation des granules spécifiques (Richter *et al.*, 1989). Ces résultats suggèrent que la lactoferrine relarguée des neutrophiles aux sites inflammatoires pourrait agir par un mécanisme de rétrocontrôle négatif afin de prévenir le recrutement et l'activation des leucocytes aux sites infectieux.

2. Modulation de l'activation des cellules immunitaires par les LPS

Les LPS des bactéries Gram- sont de puissants activateurs du processus inflammatoire (Levin *et al.*, 1994). En effet, ils activent les cellules immunitaires de l'organisme telles que les macrophages/monocytes et les neutrophiles, qui vont produire des quantités importantes de médiateurs. La présence de quantité abondante de LPS induit un relargage massif de ces médiateurs qui peut conduire au choc septique. La lactoferrine par sa capacité à lier le lipide A des LPS (Appelmelk *et al.*, 1994) par l'intermédiaire de son peptide 28-34 (Elass-Rochard *et al.*, 1995) pourrait entrer en interférence avec ce processus.

a. Modulation de l'activation des monocytes/macrophages

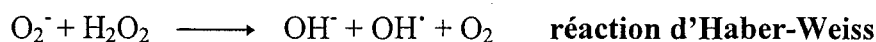
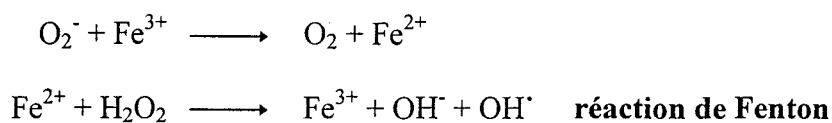
L'activation des monocytes/macrophages par les LPS passe par l'intermédiaire de la fixation du LPS sur une protéine plasmatique cationique appelée LBP ("LPS Binding Protein") (Mathison *et al.*, 1992) qui permet le transfert du LPS au récepteur CD14 présent à la surface des cellules (Wright *et al.*, 1990). La reconnaissance du complexe LBP/LPS par le CD14 conduit à l'activation des macrophages (Ulevitch et Tobias, 1994). Le CD14 existe également sous une forme soluble qui permet l'activation en présence de LPS de cellules ne présentant pas le CD 14 membranaire, telles que les cellules endothéliales (von Asmuth *et al.*, 1993). L'interaction de la lactoferrine avec les LPS est capable de bloquer la fixation des LPS induite par la LBP sur le CD14 membranaire et ainsi de moduler la réponse inflammatoire (Elass-Rochard *et al.*, 1998). De plus, la lactoferrine est impliquée dans la régulation négative de la myélopoïèse en supprimant le relargage de cytokines par les monocytes/macrophages. Les LPS en interagissant avec la lactoferrine bloquent son effet inhibiteur sur la myélopoïèse, situation qui apparaît probablement au cours d'une infection bactérienne (Miyazawa *et al.*, 1991).

b. Modulation de l'activation des neutrophiles

Les LPS activent les neutrophiles de la même manière que certaines cytokines inflammatoires telles que le TNF- α ou l'IL8 en augmentant la production et le relargage de superoxyde. La défense de l'organisme par ces cellules est très efficace mais pas sans dommage pour les tissus affectés. La lactoferrine par son affinité pour les LPS est capable d'inhiber indépendamment de son degré de saturation en fer l'activation des neutrophiles par les LPS, empêchant ainsi le relargage accru de superoxyde (Wang *et al.*, 1995). De plus, les LPS induisent la sécrétion de lactoferrine par les neutrophiles (Gutteberg *et al.*, 1990). Ainsi, cette interaction de la lactoferrine avec les LPS au niveau des muqueuses ou du compartiment vasculaire pourrait réduire l'étendue des dommages induits par le relargage abondant de radicaux libres oxygénés et de protéinases par les neutrophiles.

3. Modulation des dommages oxydatifs liés à l'activation des cellules phagocytaires

L'activation des neutrophiles par les LPS ou le TNF- α conduit à l'apparition de l'activité phagocytaire de ces cellules. Au cours de la phagocytose, les neutrophiles consomment une quantité accrue d'O₂ et le convertissent en espèces oxygénées réactives telles que l'anion superoxyde O₂⁻ par l'intermédiaire du complexe NADPH-oxydase (Root et Cohen, 1981 ; Clark, 1990) et le peroxyde d'hydrogène H₂O₂. L'association de ces deux composés conduit à la formation de radicaux libres qui induisent la peroxydation des lipides membranaires, permettant ainsi la destruction des agents pathogènes. Cependant, ils altèrent également les membranes des cellules avoisinantes de l'organisme. Le fer intervient en tant que catalyseur de la réaction d'Haber-Weiss qui aboutit à la formation des radicaux libres (Haber et Weiss, 1934).



La lactoferrine, en séquestrant le fer libre, pourrait inhiber la formation des radicaux libres par le superoxyde et l'H₂O₂ catalysée par le fer (Gutteridge *et al.*, 1981). De plus, la lactoferrine présente à l'intérieur des neutrophiles pourrait capter le fer des bactéries phagocytées par les cellules empêchant ainsi le relargage de fer libre au niveau des sites d'inflammation (Molloy et Winterbourn, 1990). Ward et coll. (1983) suggèrent que la lactoferrine présente à la surface des neutrophiles pourrait diriger les radicaux libres vers la membrane des bactéries à lyser. La lactoferrine partiellement saturée en fer présente aux sites inflammatoires pourrait limiter l'étendue des lésions causées par les radicaux libres aux cellules ou à la matrice extracellulaire, et en particulier prévenir la peroxydation des lipides de la membrane cellulaire (pour revue générale Britigan *et al.*, 1994).

Néanmoins, le rôle anti-oxydant de la lactoferrine est très controversé. Ainsi, Gahr et coll. (1991) ont montré que les neutrophiles exposés à la lactoferrine produisent plus de

superoxyde que les cellules non traitées. La lactoferrine saturée en fer agirait également en tant que catalyseur de la réaction de Fenton qui conduirait à la formation de radicaux libres (Ambruso et Johnston, 1981). Cependant, Winterbourn (1983) montre que la production de radicaux libres par l' H_2O_2 et le superoxyde ou l'acide ascorbique n'est pas augmentée en présence de lactoferrine saturée en fer. D'autres auteurs ont également montré que la lactoferrine saturée en fer était incapable de promouvoir la formation de radicaux libres *via* la réaction d'Haber-Weiss en absence de chélateurs (Aruoma et Halliwell, 1987) ou même en présence d'un puissant chélateur tel que l'EDTA (Baldwin *et al.*, 1984).

De plus, le fait que la lactoferrine présente *in vivo* soit majoritairement sous forme non saturée en fer (van Snick *et al.*, 1974) renforce l'hypothèse de son activité anti-oxydante *in vivo*. La présence de la lactoferrine ne semble donc pas être associée avec la production de radicaux libres par les neutrophiles activés mais plutôt avec la protection des tissus endommagés lors du processus inflammatoire.

4. Modulation de l'activation des monocytes/macrophages

Les monocytes/macrophages et les leucocytes granulocytes sont les cellules phagocytaires du système de l'immunité naturelle qui interviennent dans le processus inflammatoire. Contrairement aux granulocytes neutrophiles, les monocytes ne produisent pas de lactoferrine (Britigan *et al.*, 1988). Cependant, ces cellules sont capables d'interagir avec la lactoferrine exogène par l'intermédiaire de récepteurs de surface spécifiques, ce qui suggère une action de la lactoferrine sur les monocytes/macrophages (Britigan *et al.*, 1991).

En effet, Lima et Kierszenbaum (1987) ont montré que la fixation de la lactoferrine sous forme saturée ou non saturée en fer à la surface de macrophages péritonéaux de souris augmente l'activité phagocytaire de ces cellules vis-à-vis des bactéries. Par contre, seule la lactoferrine saturée en fer est capable d'accroître le mécanisme de destruction des agents pathogènes à l'intérieur des macrophages. De plus, l' H_2O_2 et le superoxyde semblent être impliqués dans l'activation par la lactoferrine de ce processus (Lima et Kierszenbaum, 1985). Cependant, cet effet de la lactoferrine sur les cellules monocytaires est très controversé. Ainsi, l'incubation des cellules phagocytaires en présence de lactoferrine, au préalable à la stimulation par la PMA, provoque une diminution de la production de

radicaux libres par les cellules traitées (Britigan *et al.*, 1991). D'autre part, la lactoferrine inhibe la sécrétion des prostaglandines E2 par les macrophages du lait, alors qu'elle n'a pas d'effet sur la production de radicaux libres (Bartal *et al.*, 1987). Gahr et coll. (1991), quant à eux, ne montrent aucune action de la lactoferrine sur les monocytes ou macrophages.

5. Implication dans l'hyposidérémie inflammatoire

Au cours de l'inflammation, la modification d'un grand nombre de paramètres régulant le métabolisme du fer conduit à une diminution de la concentration plasmatique en fer (De Sousa et Brock, 1989). L'hyposidérémie inflammatoire ainsi établie va permettre, par ferriprivation, de limiter la croissance bactérienne.

L'administration par voie intraveineuse de lactoferrine native non saturée en fer chez le rat ou la souris provoque une diminution de la concentration plasmatique en fer (van Snick *et al.*, 1974 ; Sawatski et Kubanek, 1983). Lors d'une infection, les leucocytes activés vont libérer le contenu de leurs granules secondaires dans la circulation et notamment une quantité importante de la lactoferrine sous forme non saturée en fer. Sa capacité de fixation du fer étant très importante, l'apolactoferrine libérée pourrait séquestrer l'excès de métal présent au niveau des sites inflammatoires (van Snick *et al.*, 1974) et contribuer aux mécanismes qui aboutissent à l'hyposidérémie inflammatoire.

6. Modulation de la production de cytokines

La réaction inflammatoire déclenchée par la reconnaissance de constituants bactériens par les cellules immunitaires induit la stimulation de cytokines inflammatoires incluant l'IL1, l'IL6, l'IL8, l'IL12 et le TNF- α . La lactoferrine semble être impliquée dans le processus de régulation qui contrôle la production de ces cytokines.

En effet, en présence de lactoferrine, la culture de macrophages isolés de moelle osseuse de rat provoque la production et la sécrétion de cytokines inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL8 et l'oxyde nitrique. La lactoferrine est ainsi capable d'activer *in vitro* les macrophages (Sorimachi *et al.*, 1997). Par contre, Crouch et coll. (1992) ont montré que la lactoferrine pouvait exercer un rétrocontrôle négatif sur la production de certaines

cytokines par des cultures mixtes de cellules lymphocytaires. Ainsi, elle est capable d'inhiber la libération de l'IL1, de TNF α et indirectement de celle de l'IL2. En effet, la production de l'IL2 par les lymphocytes T est dépendante de la sécrétion de l'IL1 par les monocytes (Durum *et al.*, 1984) et la lactoferrine est également capable d'inhiber la production d'IL1 par les macrophages (Zucali *et al.*, 1989). Ainsi, l'action inhibitrice de la lactoferrine sur la synthèse de l'IL2 par les lymphocytes T (Slater et Fletcher, 1987) pourrait passer par l'intermédiaire de l'inhibition de la libération de l'IL1.

L'action de la lactoferrine sur la production de cytokines semble être différente lorsque les cellules sont préalablement stimulées par des facteurs tels que les LPS. Ainsi, la lactoferrine exerce *in vitro* un effet inhibiteur sur la libération de l'IL6 par les cellules de la lignée monocyttaire THP-1 préalablement stimulées par les LPS ou le TNF- α (Mattsby-Baltzer *et al.*, 1996). L'administration par voie intraveineuse de lactoferrine chez la souris 24 heures avant une injection de LPS réduit significativement la libération de TNF- α (Machnicki *et al.*, 1993). De plus, l'ingestion de lactoferrine par des porcelets les protège contre l'administration d'une dose létale de LPS (Lee *et al.*, 1998). De même, Zagulski et coll. (1989) ont montré l'effet protecteur de l'administration de la lactoferrine chez la souris 24 heures avant le déclenchement d'une infection bactérienne expérimentale sévère induite par administration d'une dose létale d'*Escherichia coli*. Ces auteurs ont ensuite montré que le système de défense mis en œuvre par la lactoferrine *in vivo* chez la souris conduit à la mort des agents infectieux. L'activité protectrice de la lactoferrine devrait être en relation avec la participation des macrophages et des granulocytes dans la phagocytose et la mort de ces bactéries (Zagulski *et al.*, 1998). Cet effet protecteur de la lactoferrine pourrait également s'expliquer par la réduction du choc septique induit par le TNF- α . Elle posséderait ainsi des propriétés anti-inflammatoires en empêchant la libération de cytokines qui permettent le recrutement et l'activation des cellules immunitaires sur le lieu de l'inflammation. De plus, Wlaszczyk et coll. (1997) montrent que la lactoferrine pourrait servir de régulateur de l'expression du TNF- α . En effet, elle serait capable de moduler *in vitro* l'expression du TNF- α par les cellules mononucléées isolées du sang périphérique de patients en chirurgie cardiaque, en fonction de l'état immunitaire préopératoire des patients, en augmentant ou en diminuant sa production. Parallèlement, *in vivo* chez la souris, l'administration intraveineuse de lactoferrine 24 heures avant opération de type

thymectomie ou splénectomie réduit significativement le taux d'IL6 et de TNF- α présents dans le sérum des souris opérées (Zimecki *et al.*, 1998).

7. Modulation de l'activation du complément

Les bactéries responsables du déclenchement du processus inflammatoire sont éliminées de l'organisme à l'aide de cellules phagocytaires. Ce phénomène de phagocytose peut être augmenté par l'intermédiaire du complément. En effet, l'activation du complément provoque le dépôt de différents facteurs sur la surface des bactéries qui facilite la reconnaissance des agents infectieux par les cellules phagocytaires. Le système du complément est constitué d'un ensemble de protéines qui interagissent entre elles de façon séquentielle formant deux cascades enzymatiques reliées entre elles, appelées voie classique et voie alterne aboutissant toutes les deux à l'activation du facteur C3.

Plusieurs auteurs ont montré que la lactoferrine était capable de réguler l'activation du complément. En effet, la lactoferrine humaine isolée du lait (Morgan *et al.*, 1975) ou des larmes (Kijlstra et Jeurissen, 1982) inhibe l'activité hémolytique du complément. Elle est également capable d'inhiber la solubilisation dépendante du complément de complexes immuns précipités (Kulics et Kijlstra, 1987). La lactoferrine agit par l'intermédiaire de la voie classique en inhibant la formation de la convertase C4b2b. L'addition de fer ferrique au milieu de culture rétablit l'activité hémolytique du complément, suggérant que l'action de la lactoferrine serait liée à la présence de fer (Kijlstra et Jeurissen, 1982).

Par contre, la fixation de la lactoferrine bovine sur *Streptococcus agalactiae* est capable d'activer la voie classique du complément et d'induire l'opsonisation des bactéries (Rainard, 1993). Ces actions contradictoires de la lactoferrine sur l'activation du complément pourraient être dues à une spécificité d'espèce ou aux conditions expérimentales utilisées.

8. Modulation du processus de coagulation

La formation du thrombus plaquettaire est un des événements précoces du processus de coagulation. Ce thrombus apparaît à la suite de l'agrégation des plaquettes qui est

réalisée par l'intermédiaire du fibrinogène. Ce dernier se lie au récepteur GpIIbIIIa présent à la surface des plaquettes (Bennett, 1985). Le térapeptide RGDS du fibrinogène correspond au site de reconnaissance du récepteur plaquettaire GpIIbIIIa. La lactoferrine possède un peptide KRDS (résidus 39-42) homologue de cette séquence, localisé dans le lobe N-terminal.

Le peptide KRDS inhibe *in vitro* l'agrégation des plaquettes et la fixation du fibrinogène induite par l'ADP. Cependant, cette inhibition est plus importante que celle observée en présence du peptide RGDS (Mazoyer *et al.*, 1990). Le peptide KRDS n'agirait pas par l'intermédiaire du récepteur plaquettaire GpIIbIIIa, il semble donc que son mode d'action soit différent de celui du peptide RGDS (Mazoyer *et al.*, 1990). En effet, ce peptide inhibe la libération de sérotonine induite par la thrombine sur des plaquettes de patients déficients en récepteurs GpIIbIIIa, contrairement au peptide RGDS (Mazoyer *et al.*, 1990). Cet effet antithrombotique a également été confirmé *in vivo* sur différents modèles de thrombose artériolaire chez le rat et le cochon d'Inde (Drouet *et al.*, 1990). La lactoferrine et l'octodécapeptide (résidus 20-37) qui en dérive sont également capables d'inhiber l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP, mais de façon plus importante que le peptide KRDS (Leveugle *et al.*, 1993). Ce qui suggère que cet effet ne serait pas seulement dû à la présence de la séquence KRDS dans les molécules. L'activité anticoagulante de la lactoferrine est également indépendante du récepteur plaquettaire GpIIbIIIa et serait plutôt réalisée par l'intermédiaire de la fixation de la lactoferrine sur son récepteur spécifique présent à la surface des plaquettes (Leveugle *et al.*, 1993 ; Maneva *et al.*, 1993).

La lactoferrine pourrait également avoir un effet activateur de la coagulation en inhibant l'activité anticoagulante de l'héparine. En se fixant à l'héparine, la lactoferrine bloque l'activité de cette molécule et empêche ainsi l'inhibition de la thrombine, ce qui entraîne une prolongation de la coagulation (Wu *et al.*, 1995b). La lactoferrine, libérée au niveau des sites infectieux après la dégranulation des neutrophiles, pourrait réduire l'infection en permettant l'encapsulation du site à l'aide de la fibrine.

9. Conclusion

Il apparaît que la lactoferrine est capable d'interagir avec les cellules effectrices du processus inflammatoire. Elle semble agir sur ces cellules en modulant directement ou

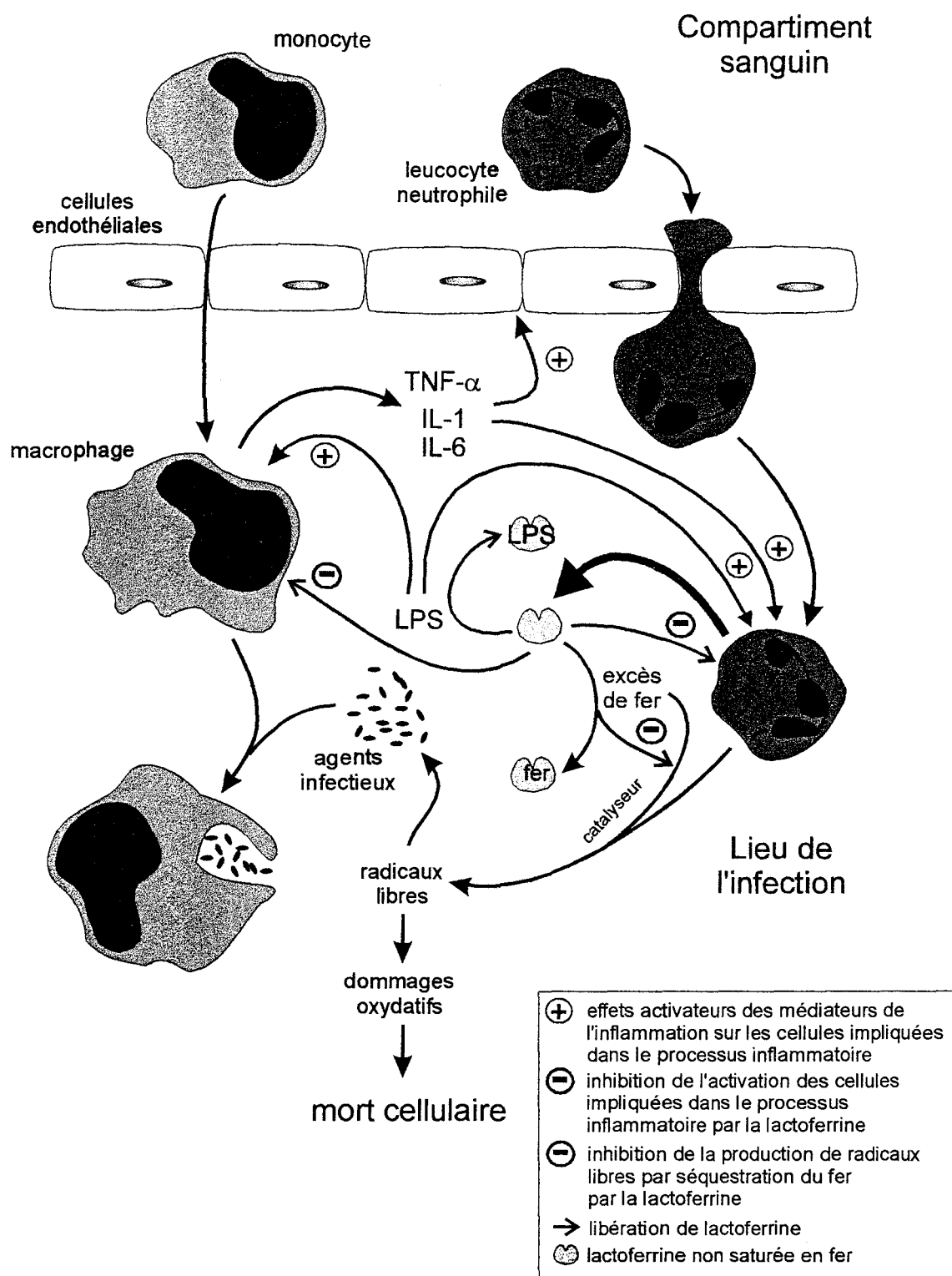


Figure 7 : Implication de la lactoferrine dans le processus inflammatoire.

indirectement leurs activités (figure 7, page 69). Cependant, ces effets restent controversés et les mécanismes d'actions sont encore souvent mal définis.

G. Lactoferrine et maladies neurodégénératives

Bien que l'expression de la lactoferrine dans le SNC augmente avec l'âge, elle reste cependant assez faible dans des conditions physiologiques (Kawamata *et al.*, 1993 ; Leveugle *et al.*, 1994). Par contre, dans le cas de différentes neuropathologies, la lactoferrine se trouve associée de manière très importante avec les lésions caractéristiques des différentes maladies neurodégénératives étudiées (Osmand et Switzer, 1991 ; Kawamata *et al.*, 1993 ; Leveugle *et al.*, 1994, 1996). Les circonstances de l'accumulation de la lactoferrine sont encore inconnues, ainsi que sa responsabilité dans la pathologie des processus neurodégénératifs.

Les maladies neurodégénératives présentent un certain nombre de caractéristiques rencontrées fréquemment dans plusieurs d'entre elles, par exemple une accumulation d'amyloïde, la suspicion d'intervention de radicaux libres ou encore un caractère héréditaire parfois très marqué. Les maladies neurodégénératives présentent une autre caractéristique commune indéniable : l'implication du processus inflammatoire au cours de ces pathologies.

1. Les processus neurodégénératifs

Les maladies neurodégénératives constituent un ensemble de pathologies caractérisées par des processus neurodégénératifs très lents, ayant le plus souvent débutés depuis de nombreuses années et qui vont le plus souvent jusqu'à la mort du patient. Parmi ces maladies, dont la plupart sont très connues, nous citerons dans le domaine moteur, la maladie de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique, dans le domaine cognitif, la maladie d'Alzheimer, et dans un domaine mixte, la chorée de Huntington.

Il apparaît que la mort neuronale qui suit le processus dégénératif est souvent en relation avec des mécanismes de type apoptotique (de la Monte *et al.*, 1998). C'est en particulier le cas de la maladie d'Alzheimer (Cotman, 1998), de la maladie de Parkinson (Hirsch *et al.*, 1999). Les processus cellulaires et moléculaires qui sont à la base de la

neurodégénérescence, et de sa spécificité territoriale, sont encore mal connus. Cependant, les données acquises au cours de ces toutes dernières années permettent de préciser la nature de certains mécanismes impliqués dans la mort neuronale. Ainsi, le peptide β -amyloïde semble fortement être impliqué dans la maladie d'Alzheimer, alors que le stress oxydatif et un excès de fer semblent être à l'origine de pathologies de type Parkinson.

a. Implication du peptide β -amyloïde dans la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par la présence de deux types de lésions cérébrales : les lésions neurofibrillaires et les plaques séniles. Les lésions neurofibrillaires sont formées de paires de filaments appariés en hélice (Kidd, 1963) qui sont constitués de protéines tau (Delacourte et Buée, 1997). Ces protéines tau sont des filaments du cytosquelette qui stabilisent les microtubules permettant les transports intraneuronaux. Anormalement phosphorylées au cours de la maladie d'Alzheimer (Hasegawa *et al.*, 1996), elles s'agrègent pour former les filaments des lésions. Les lésions neurofibrillaires envahissent souvent la totalité du cortex cérébral au cours de la maladie d'Alzheimer avec une prédilection pour la région de l'hippocampe et le cortex temporal.

Les plaques séniles, quant à elles, sont constituées d'une substance insoluble appelée substance amyloïde. Cette substance est composée d'un polypeptide d'environ 40 résidus d'acide aminés, le peptide β -amyloïde (Glennner et Wong, 1984). Ce peptide est présent dans les plaques séniles ainsi que dans des dépôts diffus de substance amyloïde, qui envahissent la presque totalité du cortex cérébral de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Yamaguchi *et al.*, 1988). L'amyloïdogenèse est un processus diffus, mal localisé, toutes les régions cérébrales peuvent être touchées à des degrés divers (Braak et Braak, 1991). Le peptide β -amyloïde est un produit de catabolisme de la protéine transmembranaire amyloïde (Kang *et al.*, 1987). Dans le cas de formes familiales de la maladie d'Alzheimer des mutations du gène codant cette protéine ont été découvertes. Ces mutations provoquent la modification du catabolisme de la protéine amyloïde en favorisant l'agrégation du peptide β -amyloïde (Sherrington *et al.*, 1995), faisant de ce peptide un acteur majeur dans la maladie d'Alzheimer. La substance amyloïde est vraisemblablement neurotoxique mais les preuves formelles manquent. Cette substance est associée à de nombreux autres constituants. Ces composés peuvent jouer un rôle catalyseur pour une

neurotoxicité éventuelle, ou un rôle de neuroprotection. Parmi ces facteurs nous pouvons citer le complément, les protéases et les anti-protéases, acteurs du processus inflammatoire (Aisen, 1997), ainsi que l'apolipoprotéine (Wisniewski *et al.*, 1995).

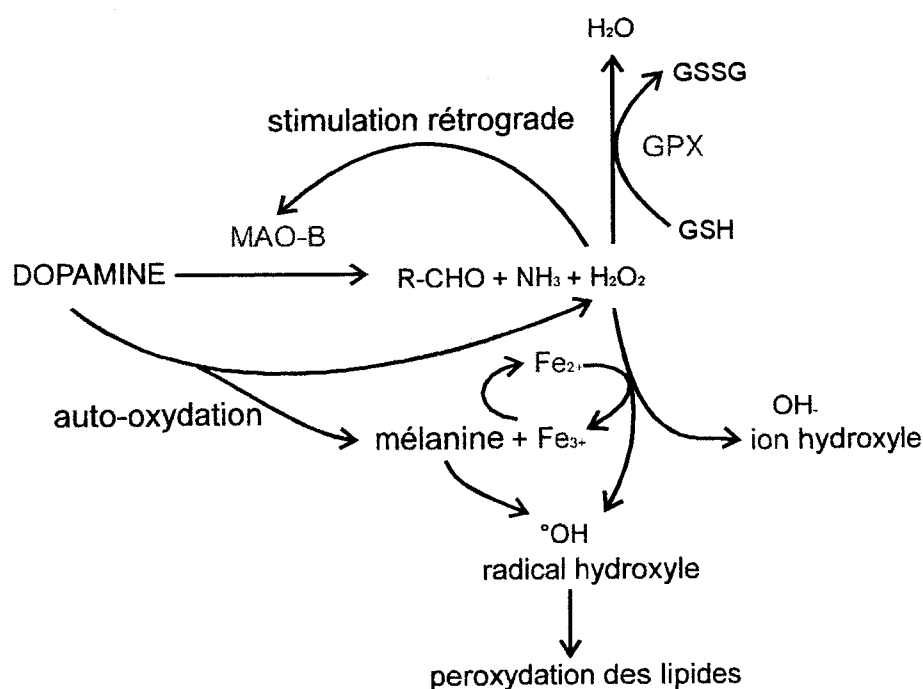
La cause précise de la dégénérescence des neurones au cours de la maladie d'Alzheimer est toujours inconnue, même s'il semble que la substance amyloïde y joue un rôle prépondérant. Ainsi, la neurotoxicité de la substance amyloïde et l'altération membranaire des neurones vulnérables paraissent être de bons candidats de la cause directe de la dégénérescence neuronale.

La lactoferrine a été localisée au niveau des plaques séniles mais également des lésions neurofibrillaires de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, plus précisément dans les régions précocement affectées par la maladie (Osmand et Switzer, 1991 ; Kawamata *et al.*, 1993 ; Leveugle *et al.*, 1994). Le rôle de la lactoferrine au niveau de ces lésions est inconnu, cependant, elle pourrait intervenir dans le mécanisme de neurotoxicité ou bien au contraire avoir une action neuroprotectrice.

b. Implication du fer et du stress oxydatif dans la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est caractérisée par la perte progressive des neurones catécholaminergiques du mésencéphale (Jellinger, 1989), se traduisant principalement par une lésion sévère de la voie dopaminergique nigrostriale. Néanmoins, d'autres voies sont également touchées : il s'agit des voies monoaminergiques (noradrénaline, sérotonine), cholinergiques et peptidergiques (Agid, 1989). Les symptômes moteurs de patients atteints de cette maladie neurodégénérative n'apparaissent que lorsque la destruction de la voie dopaminergique nigrostriale atteint un certain seuil de dénervation, de l'ordre de 70 % environ (Agid *et al.*, 1987). La dégénérescence des neurones dopaminergiques mélanisés de la substance noire et la déficience en dopamine qui en résulte dans le striatum sont les bases neuropathologiques de la maladie de Parkinson. Bien que le processus neurodégénératif qui est à l'origine de la perte sélective des neurones dopaminergiques pigmentés reste inconnu, il semble qu'il fasse intervenir des mécanismes cellulaires aboutissant à la formation de radicaux libres liée à un stress oxydatif (Gerlach *et al.*, 1994).

L'hypothèse du stress oxydatif est basée sur le dérèglement de l'équilibre existant entre la formation des réactifs oxydants et le processus anti-oxydant. Le stress oxydatif causé par un excès de formation de H_2O_2 et de radicaux libres oxygénés est responsable de dommages cellulaires dus à la peroxydation des lipides membranaires et à l'altération de la fluidité membranaire (Halliwell, 1992). L' H_2O_2 est produit par plusieurs enzymes, telles que la superoxyde dismutase et la monoamine oxydase (Halliwell, 1992). Dans les neurones dopaminergiques, il est en majorité produit par la monoamine oxydase lors de la désamination de la dopamine mais également de manière non enzymatique par auto-oxydation de cette dernière (figure 8). L' H_2O_2 devient toxique lorsqu'il interagit avec des ions métalliques tels que le Fe^{2+} ou le Cu^+ et est décomposé par l'intermédiaire de la réaction de Fenton en radicaux libres hautement réactifs.



MAO : monoamine oxydase
GPX : glutathion peroxydase

Figure 8 : Formation des radicaux libres dans les neurones dopaminergiques mélanisés (d'après Gerlach *et al.*, 1994).

Les données en faveur de la participation du stress oxydatif dans la perte des neurones dopaminergiques dans la maladie Parkinson se sont accumulées au cours des années. Ainsi, les concentrations en fer total et en Fe^{3+} mais pas en Fe^{2+} sont augmentées dans la substance noire de patients atteints de la maladie de Parkinson (Sofic *et al.*, 1988, 1991; Dexter *et al.*, 1989 ; Jellinger *et al.*, 1992 ; Riederer *et al.*, 1992). Cette augmentation non observée au niveau de la substance grise centrale suggère que le fer pourrait être sélectivement toxique pour les neurones dopaminergiques vulnérables de la substance noire (Hirsch *et al.*, 1991). Le rôle du fer dans la maladie de Parkinson semble donc fort probable (Youdim *et al.*, 1989 ; Ben-Shachar *et al.*, 1992 ; Morris *et al.*, 1992). En effet, en présence d'un excès de fer, le stress oxydatif provoqué par une combinaison des radicaux libres et du fer pourrait contribuer à la destruction sélective des neurones dopaminergiques mélanisés (Agid, 1991 ; Agid *et al.*, 1993). La diminution de l'activité d'enzymes anti-oxydantes, telles que la glutathion peroxydase et la catalase, ainsi que l'augmentation de celle de la SOD ont également été observées dans le cas de la maladie de Parkinson (Gerlach et Riederer, 1993).

Il semble qu'un dérèglement du métabolisme du fer soit responsable de l'augmentation de la concentration de fer observée lors de la maladie de Parkinson. Bien que le taux de ferritine augmente dans la substance noire (Riederer *et al.*, 1989), celui du récepteur de la transferrine reste inchangé. En effet, Faucheux et coll. (1993) n'ont pu mettre en évidence une différence significative entre le nombre de sites de fixation présents dans le mésencéphale de patients atteints de la maladie de Parkinson et de patients témoins. Par contre, ils ont montré que le nombre de ces sites est diminué sur les neurones mélanisés de la substance noire dans le cas de la maladie de Parkinson (Faucheux *et al.*, 1997). Le mécanisme par lequel le fer est prélevé par les neurones dopaminergiques reste donc inconnu. Mis à part son stockage dans la ferritine, le fer trouvé dans la substance noire pourrait être lié à d'autres molécules solubles telles que les catécholamines (Liu et Mori, 1993). La neuromélanine, complexe polymérique localisé dans les neurones catécholaminergiques principalement de la substance noire (Bogerts, 1981), serait un très bon candidat. La formation de la neuromélanine implique un processus oxydatif non enzymatique. La présence de quantité importante de neuromélanine dans ces neurones pourrait être à la base de la sélectivité du processus neurodégénératif qui intervient dans la maladie de Parkinson. En effet, ce composé est capable de fixer le Fe^{3+} (Ben-Shachar et Youdim, 1990 ; Ben-Shachar *et al.*, 1991). De plus, chez des patients atteints de la maladie

de Parkinson les neurones dopaminergiques fortement pigmentés sont plus vulnérables au processus neurodégénératif que les neurones dopaminergiques contenant peu de mélanine (Hirsch *et al.*, 1988). En conditions physiologiques normales, par sa capacité à fixer une quantité importante de métaux, la mélanine participerait à la détoxification en éliminant les métaux générateurs de radicaux libres (Scalia *et al.*, 1990). Cependant, dans certaines circonstances, lors d'une augmentation de la biodisponibilité du fer, la mélanine surchargée en ce métal n'exerçant plus son action protectrice pourrait alors potentialiser la formation de radicaux libres oxygénés (Pilas *et al.*, 1988). Les neurones dopaminergiques mélanisés seraient donc ainsi plus sensibles à la dégénérescence. Il semblerait que l'interaction de la neuromélanine avec le fer soit impliquée dans la pathogenèse de la maladie de Parkinson (Ben-Shachar *et al.*, 1991). La présence de quantité importante de neuromélanine dans les neurones dopaminergiques spécifiquement atteints lors de la maladie de Parkinson pourrait sensibiliser ces neurones au processus dégénératif.

La lactoferrine a été localisée au niveau de nombreux neurones dopaminergiques mélanisés du mésencéphale. Lors de la maladie de Parkinson, la population neuronale marquée par la lactoferrine diminue fortement, alors que l'intensité de marquage est augmentée (Leveugle *et al.*, 1996). Cette étude est en corrélation avec la distribution cellulaire de son récepteur qui est également augmentée dans les neurones survivants des patients atteints de la maladie de Parkinson (Faucheux *et al.*, 1995). Ces résultats suggèrent qu'il existe une relation entre la lactoferrine et le processus neurodégénératif qui est responsable de cette maladie. Connaissant le potentiel anti-oxydant de la lactoferrine (Britigan *et al.*, 1994), elle pourrait jouer un rôle de protection en captant l'excès de fer au niveau des neurones dopaminergiques mélanisés et en même temps réduire le stress oxydatif. L'augmentation de son taux au cours de la maladie de Parkinson conforte cette hypothèse.

2. Inflammation et maladies neurodégénératives

Le SNC a longtemps été considéré comme un site « immuno-privilegié » échappant à la surveillance du système immunitaire. Cette idée fut renforcée par la découverte de la BHE qui protège le SNC des conséquences léthales d'une inflammation périphérique. Cependant, de nombreuses données immunohistochimiques et moléculaires accumulées au

cours des dernières décennies indiquent que le SNC possède un système immunitaire endogène actif capable de répondre immédiatement aux agressions extérieures. Dans certains cas, la réaction inflammatoire peut être amplifiée, atteindre les tissus sains voisins et les altérer. Il s'ensuit une inflammation chronique du SNC qui pourrait également jouer un rôle important dans le processus de mort neuronale. L'augmentation de l'expression du facteur NF- κ B, régulateur central des réactions inflammatoires, a été observée au niveau des lésions spécifiques de la maladie d'Alzheimer (Terai *et al.*, 1996) et dans la substance noire de patients atteints de la maladie de Parkinson (Hunot *et al.*, 1997). Le SNC de patients atteints de différentes maladies neurodégénératives semble être le siège de réactions inflammatoires, localisées plus particulièrement au niveau des lésions caractéristiques de ces pathologies.

Il s'ensuit la mise en place d'un processus inflammatoire chronique lors de ces pathologies qui rend le SNC particulièrement vulnérable, les neurones perdus ne pouvant être remplacés. Les acteurs principaux sont les cellules microgliales et les astrocytes fonctionnant de façon coopérative afin d'établir un système de défense local du SNC. Les signaux inter-cellulaires n'ont pas encore été mis en évidence. Ces cellules, ainsi que les cytokines et le complément qu'elles produisent, pourraient jouer un rôle clé dans les processus inflammatoires du SNC.

a. Les cellules microgliales

Les cellules microgliales, de par leur appartenance au système monocyttaire, possèdent des propriétés analogues à celles des cellules de ce système (Gehrman *et al.*, 1995). Ainsi, des stimulus immunologiques ou autres sont capables d'activer les cellules microgliales. Comme tout macrophage, les cellules microgliales activées présentent une activité phagocytaire se traduisant par la production d'un flot de radicaux libres oxygénés neurotoxiques (Colton et Gilbert, 1993). Les cellules microgliales sont également capables de sécréter des facteurs de croissance, des facteurs angiogéniques, ainsi que des molécules de surface spécifiques du système monocyttaire dont l'expression augmente lors de l'activation des cellules (Gehrman *et al.*, 1995) et encore bien d'autres molécules, telles que des facteurs du complément et des cytokines inflammatoires comme l'IFN γ , l'IL1,

l'IL6, l'IL8 et le TNF- α témoins de la mise en place du processus inflammatoire (McGeer et McGeer, 1995 pour revue générale).

L'activation des cellules microgliales a été mise en évidence dans différentes maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Pick, la chorée de Huntington et la sclérose latérale amyotrophique, où un nombre important de cellules microgliales activées a été identifié au niveau des lésions caractéristiques des pathologies (Mc Geer et McGeer, 1995 pour revue générale). Dans tous les cas, cette activation est caractérisée par l'intermédiaire de l'expression de molécules du CMH. De plus, il semble clair que, dans la majorité des cas, ce processus soit une conséquence de la pathologie plutôt qu'une des causes potentielles. Ainsi, l'activation et la prolifération des cellules microgliales ne seraient pas spécifiques de ces pathologies, mais feraient partie intégrante du processus neurodégénératif.

Les cellules microgliales peuvent être activées par un nombre important de molécules, telles que le peptide β -amyloïde, qui est impliqué dans la formation des plaques amyloïdes lors de la maladie d'Alzheimer (Klegeris *et al.*, 1994). Des études *in vitro* ont montré que de nombreuses cytokines pouvaient activer les cellules microgliales (Imamura *et al.*, 1994 ; Anderson *et al.*, 1995). Les protéines du complément font également partie des facteurs qui sont à l'origine de l'activation des cellules microgliales (Klegeris et McGeer, 1997). En effet, ces cellules sont capables de produire des récepteurs du complément (Akiyama et McGeer, 1990).

b. Les astrocytes

Dans des conditions physiologiques, les astrocytes sont considérés comme étant les cellules chaperonnes des neurones, maintenant l'intégralité fonctionnelle des synapses et contribuant à la production des protéines de la matrice extracellulaire. Dans des conditions pathologiques, les astrocytes seraient en plus capables de stabiliser le tissu entourant un site endommagé du SNC et de participer au processus de réparation de ce tissu. La réponse des astrocytes, caractéristique de leur capacité à réagir à diverses atteintes neurologiques, apparaît rapidement et peut être détectée moins d'une heure après le trauma (Mucke *et al.*, 1991). Les astrocytes sont caractérisés par la présence d'une protéine du cytosquelette spécifique : la GFAP (« Glial Fibrillary Acidic Protein ») (Bignami *et al.*, 1972), dont

l'expression est fortement augmentée lors de leur activation (Bignami *et al.*, 1972). Les astrocytes sécrètent des molécules en rapport avec leur activité telles que des facteurs de croissance, des molécules de la matrice extracellulaire, des molécules d'adhésion comme la E-sélectine et l'ICAM-1 (Eddleston et Mucke, 1993) mais aussi produisent après activation des facteurs associés à l'inflammation, tels des molécules du CMH, des prostaglandines, des facteurs du complément ainsi que de nombreuses cytokines comme l'IFN γ , l'IL1, l'IL6 et le TNF- α (Eddleston et Mucke, 1993 pour revue générale).

Les astrocytes peuvent être activés par un nombre important de molécules, telles que le peptide β -amyloïde (Araujo et Cotman, 1992), le LPS et de nombreuses cytokines inflammatoires (Eddleston et Mucke, 1993 pour revue générale). L'activation des astrocytes a été observée lors de différents désordres neurologiques tels que la maladie d'Alzheimer (Delacourte, 1990) et la trisomie 21 (Griffin *et al.*, 1989). Il semble également que des enzymes anti-oxydantes soient produites par les astrocytes activés dans le cas de la maladie d'Alzheimer : SOD, catalase (Pappolla *et al.*, 1992) et MAO plus précisément au niveau des plaques séniles (Nakamura *et al.*, 1990).

c. Les cytokines pro-inflammatoires

Les cytokines qui sont présentes dans le SNC sont en majorité produites par les cellules microgliales et les astrocytes.

En général, une augmentation du taux de cytokines inflammatoires et de leurs récepteurs a été observée dans les tissus cérébraux et/ou le CSF de patients atteints de différentes maladies neurodégénératives (Mc Geer et McGeer, 1995 pour revue générale). Ces cytokines sécrétées pourraient stimuler les cellules neuronales ou gliales afin qu'elles produisent les facteurs neurotoxiques qui sont présents dans les lésions. Ainsi, l'augmentation de l'expression de cytokines telles que le TNF- α , l'IL1- β et l'IL6, est fortement observée dans le SNC de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de la maladie de Parkinson (Mc Geer et McGeer, 1997). Dans le cas de la maladie de Parkinson, des récepteurs du TNF- α ont également été trouvés sur les neurones dopaminergiques survivants de la substance noire (Mc Geer et McGeer, 1997). En ce qui concerne la sclérose latérale amyotrophique, une élévation du taux de l'IL6 a été reportée dans le LCR des patients.

d. Le complément

Le SNC est le siège d'une production des facteurs du complément (Terai *et al.*, 1997). Il semble que seule la voie classique soit mise en œuvre. Les messagers des facteurs du complément sont produits par plusieurs types cellulaires du SNC tels que les neurones pyramidaux de l'hippocampe et du cortex temporal, ainsi que par quelques cellules gliales (Shen *et al.*, 1997). Des études réalisées *in vitro* ont montré que les astrocytes et les cellules microgliales en culture sont capables de produire ces différents facteurs (Walker et McGeer, 1993 ; Walker *et al.*, 1995). Ainsi, la production et l'activation de la voie classique du complément dans le SNC sont des phénomènes locaux ne nécessitant pas l'aide d'éléments périphériques.

L'expression des facteurs du complément ainsi que leurs messagers est fortement augmentée dans le cas de la maladie d'Alzheimer (Shen *et al.*, 1997 ; Terai *et al.*, 1997). La présence des protéines du complément a également été mise en évidence sur les neurones dopaminergiques affectés par la maladie de Parkinson (Yamada *et al.*, 1992). Des niveaux élevés de facteurs du complément sont également présents dans le LCR de patients atteints de la sclérose latérale amyotrophique (Tsuboi et Yamada, 1994), ainsi que dans les régions affectées par cette pathologie sous forme de dépôts (Kawamata *et al.*, 1992).

e. Conclusion

Les pathologies neurodégénératives affectées par un processus inflammatoire ne sont pas des pathologies auto-immunes dans le sens classique du terme, impliquant la production d'anticorps dirigés contre les tissus de l'hôte ou le clonage de sous-populations spécifiques de cellules T. En effet, aucune de ces caractéristiques n'a été mise en évidence dans la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou d'autres maladies neurodégénératives (McGeer et McGeer, 1995 pour revue générale). Il semble donc que, quels que soient les facteurs ou atteintes qui déclenchent les pathologies neurodégénératives, l'inflammation résultante n'apparaît pas être la cause primaire des pathologies, mais plutôt une réaction secondaire, conséquence du processus dégénératif.

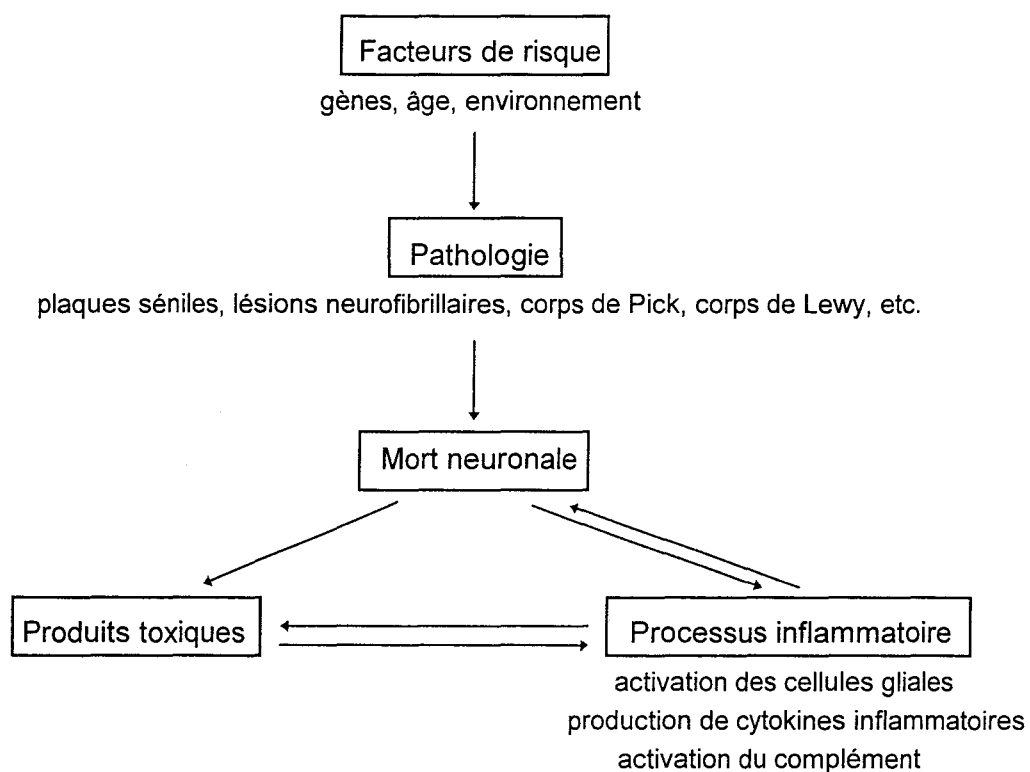


Figure 9 : Boucle hypothétique qui pourrait être responsable de la mort neuronale dans certaines maladies neurodégénératives (d'après McGeer et McGeer, 1995).

Les facteurs qui initient et développent de telles réactions inflammatoires ne sont pas encore bien connus. L'hypothèse selon laquelle les éléments, qui sont à l'origine des dommages neuronaux initiaux, pourraient provoquer secondairement la formation de débris cellulaires, sous forme de dépôts difficilement digérables par les cellules microgliales paraît plausible. Ce mécanisme serait responsable de l'initiation de la voie classique du complément et de l'activation des cellules gliales, se traduisant par la production de molécules toxiques. La libération de tels produits neurotoxiques à proximité de tissus sains mènerait à la mort de neurones supplémentaires qui en retour amplifierait la réaction inflammatoire. Ce phénomène pourrait résulter en un mécanisme entretenu par lui-même, dans lequel les attaques phagocytaires endommageraient les neurones spectateurs de telle façon que des lésions supplémentaires seraient produites (figure 9). Ce processus pourrait être généré et entretenu par les cellules gliales locales. Le SNC apparaît ainsi être capable

d'initier et de maintenir une réaction inflammatoire chronique en réponse aux différents processus dégénératifs responsables de certaines pathologies du SNC.

Les lésions neuropathologiques sont associées à une accumulation de molécules impliquées dans le processus inflammatoire, mais également à la lactoferrine. Cette protéine, présente tout le long du processus inflammatoire dans la circulation et les tissus périphériques (décrit dans la figure 7, page 69), semble fortement y être impliquée. Elle possède également un fort potentiel anti-oxydant (Britigan *et al.*, 1994 pour revue générale). La lactoferrine pourrait donc intervenir au niveau des lésions neuropathologiques afin de réduire les dommages potentiellement occasionnés aux cellules saines voisines et ainsi jouer un rôle important de protection au cours des maladies neurodégénératives affectées par un processus inflammatoire.

Ainsi, la lactoferrine semble être impliquée dans les maladies neurodégénératives au niveau des processus neurodégénératifs eux-mêmes, plus particulièrement lors de la maladie de Parkinson, mais également quelle que soit la pathologie au cours des réactions inflammatoires résultant de ces processus.

OBJECTIFS

La découverte de la lactoferrine dans notre laboratoire constitue le point de départ de nombreux travaux portant sur cette protéine. Ces travaux ont d'abord concerné la distribution de cette glycoprotéine dans l'organisme. La lactoferrine a été caractérisée dans un premier temps dans tous les milieux de sécrétion et plus particulièrement à la surface des muqueuses, puis dans un second temps dans le sang. La lactoferrine, stockée dans les granules secondaires de leucocytes neutrophiles (Masson *et al.*, 1969), est libérée dans la circulation après dégranulation des neutrophiles au niveau des sites inflammatoires. La concentration plasmatique de la lactoferrine est cependant maintenue à un taux très faible par la capture par le foie de la majorité de la lactoferrine relarguée.

Plus récemment, plusieurs auteurs ont mis en évidence une nouvelle localisation de la lactoferrine dans l'organisme. En effet, la lactoferrine est présente dans le SNC. La présence de la lactoferrine et de son récepteur a été découverte dans le mésencéphale de patients sains et plus précisément dans les neurones dopaminergiques de la substance noire et de l'aire tegmento-ventrale (Leveugle *et al.*, 1996 ; Faucheux *et al.*, 1995). D'autre part, chez des patients atteints de la maladie de Parkinson, le taux de ces deux protéines est augmenté dans les neurones dopaminergiques survivants (Leveugle *et al.*, 1996 ; Faucheux *et al.*, 1995). La lactoferrine est également accumulée au niveau des capillaires cérébraux et des lésions caractéristiques de différentes maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la trisomie 21, le syndrome de l'île de Guam, la maladie de Pick et la sclérose latérale amyotrophique (Leveugle *et al.*, 1994). Ces études montrent qu'une stimulation de l'apport et/ou de la production de la lactoferrine apparaît dans le SNC lors de pathologies. Le métabolisme de la lactoferrine pourrait donc être en relation avec les processus neurodégénératifs mais également avec les réactions inflammatoires qu'ils engendrent.

Ces découvertes posent des questions quant à l'origine et à la fonction biologique de la lactoferrine présente dans le SNC. Ses rôles dans le compartiment sanguin et au niveau des surfaces sécrétrices ne sont pas encore bien définis. Cependant, la lactoferrine est impliquée dans les mécanismes de défense de l'organisme et semble intervenir à chacune

des étapes clés du processus inflammatoire de manière à protéger les tissus bordant le foyer infectieux. Il pourrait bien exister un lien entre la fonction de la lactoferrine cérébrale et l'état inflammatoire ainsi que le stress oxydatif observés lors de certaines maladies neurodégénératives. Afin de répondre à ces questions, il était indispensable de mettre en évidence la ou les origines de la lactoferrine cérébrale et de définir les mécanismes qui aboutissent à l'accumulation de la lactoferrine spécifiquement au niveau des lésions neurodégénératives.

Ainsi, la lactoferrine cérébrale pourrait avoir deux origines différentes : une origine périphérique, par apport de la lactoferrine au SNC par la circulation, une origine locale, par synthèse *in situ* de la lactoferrine par des cellules spécialisées du SNC (figure 10, page 84).

Afin de mettre en évidence l'origine périphérique de la lactoferrine cérébrale, nous avons étudié son transport à travers la BHE. Connaissant le potentiel inflammatoire des lésions neuropathologiques menant à des modifications de la perméabilité de la BHE, il nous semblait intéressant d'étudier également ce transport en conditions inflammatoires. De manière à établir l'origine locale de la lactoferrine cérébrale, nous avons étudié l'expression de ses messagers dans le mésencéphale de patients sains. Les variations métaboliques engendrées par les processus neurodégénératifs nous ont amené à étendre cette étude aux cas pathologiques. Ainsi, nous avons utilisé des souris traitées au MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine), modèle animal expérimental bien connu de la maladie de Parkinson.

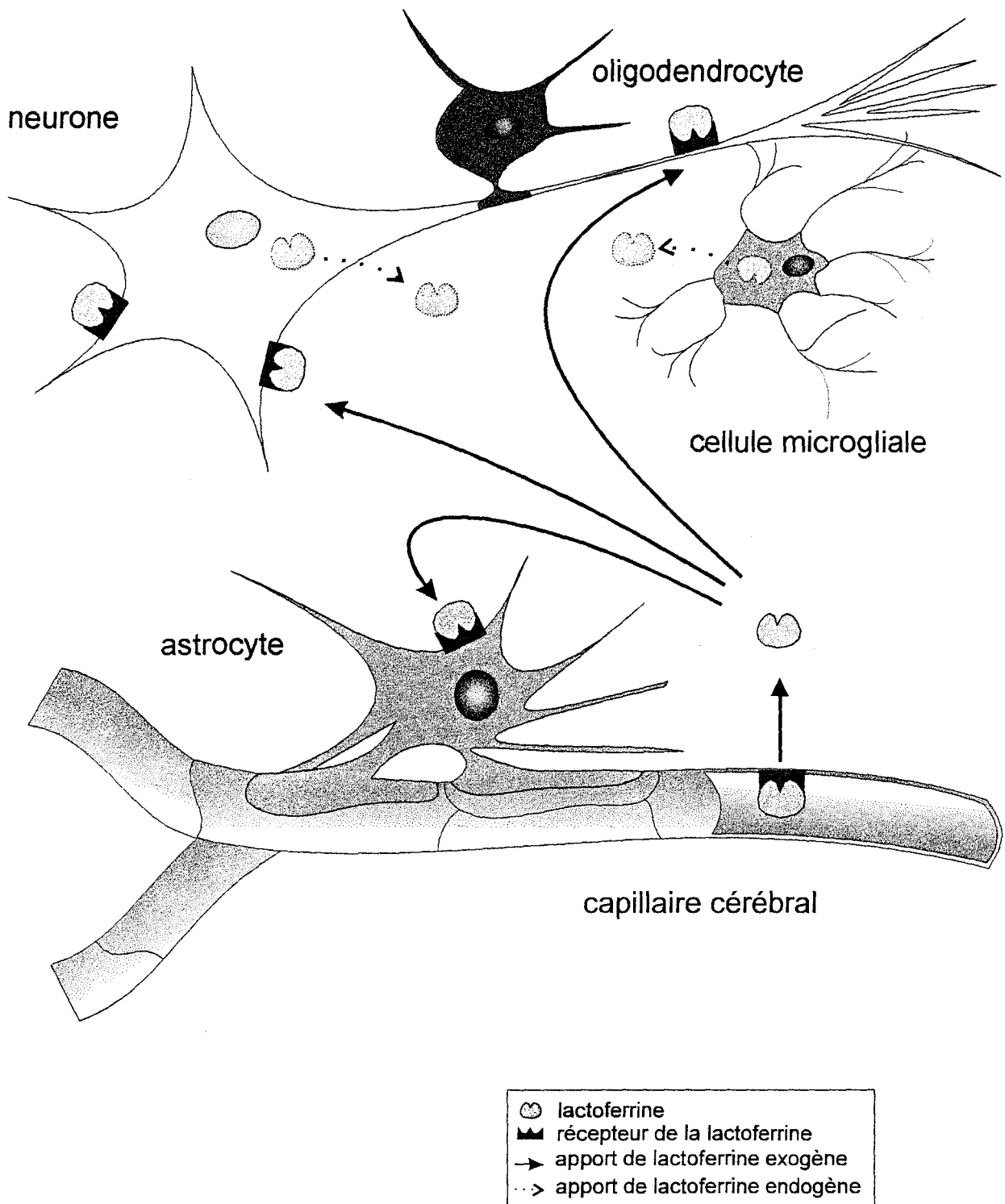


Figure 10 : Origines potentielles de la lactoferrine dans le système nerveux central sain.

TRAVAUX PERSONNELS

I. ETUDE DU TRANSPORT DE LA LACTOFERRINE A TRAVERS LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE

Introduction

La découverte de la distribution cérébrale de la lactoferrine, dans le LCR (Terent *et al.*, 1981), le parenchyme cérébral et tout particulièrement au niveau des capillaires cérébraux (Leveugle *et al.*, 1994) nous a amené à vérifier l'hypothèse selon laquelle la lactoferrine pourrait être apportée au SNC par la circulation. Cette hypothèse implique le passage de la lactoferrine à travers la BHE. Dans le cas de différentes maladies neurodégénératives, la distribution cérébrale de la lactoferrine est fortement augmentée et se trouve associée avec les lésions neuropathologiques (Osmand et Switzer, 1991 ; Kawamata *et al.*, 1993 ; Leveugle *et al.*, 1994). Cette augmentation pourrait être la conséquence d'un apport accru de la lactoferrine, impliquant l'augmentation de son passage à travers la BHE dans le cas de désordres dégénératifs du SNC.

La BHE est caractérisée par un certain nombre de propriétés qui lui ont conféré son nom de véritable « barrière » entre le sang et le cerveau. En effet, cette barrière permet de maintenir l'homéostasie des cellules du SNC, et fait de cet organe l'une des structures les mieux isolées du reste de l'organisme. Cependant, au cours de certaines maladies neurodégénératives, les propriétés de cette barrière peuvent être perturbées. Ils semblent que ces modifications soient liées au processus inflammatoire.

Avant d'étudier le mécanisme de transport de la lactoferrine à travers la BHE, il est important de rappeler les propriétés de cette barrière et les modifications qu'elle subit lors du processus inflammatoire.

A. La barrière hémato-encéphalique

Afin de protéger les cellules du SNC d'éventuelles modifications de la composition du plasma et par là même de maintenir les fonctions cérébrales, la nature a doté notre

organisme d'une barrière entre le sang et le cerveau : la barrière hémato-encéphalique. Les capillaires cérébraux constituent le support anatomique de cette barrière. Ces capillaires sont formés d'une monocouche de cellules endothéliales reposant sur une lame basale dans laquelle se trouve, par endroit, un second type cellulaire : les péricytes. Les capillaires ainsi constitués sont entourés d'un manchon ininterrompu de pieds astrocytaires (figure 11).

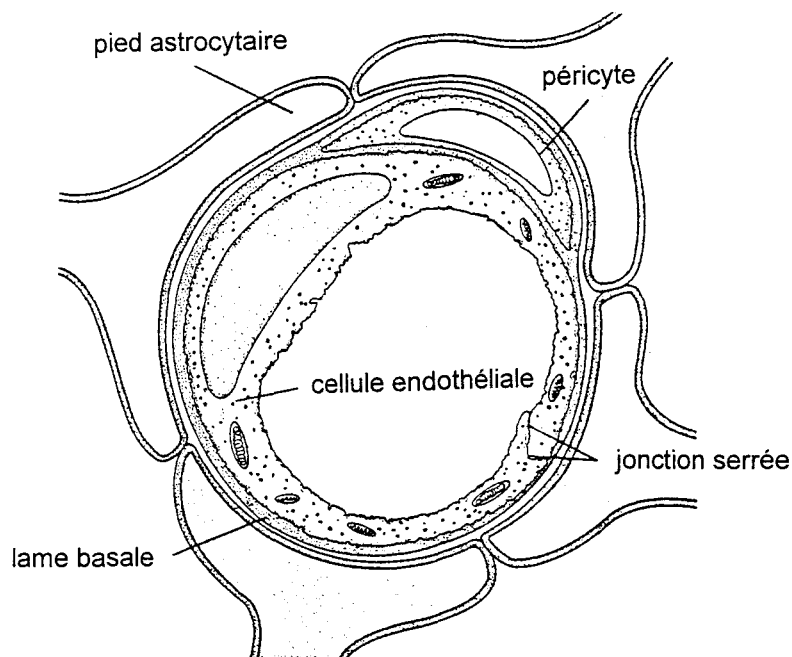


Figure 11 : Structure des capillaires cérébraux (Goldstein et Betz, 1986).

L'endothélium formant ces capillaires est de type continu et, de par ses caractéristiques structurales et métaboliques, il régule le passage des nutriments du sang vers le parenchyme cérébral. La présence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales, la rareté des vésicules de pinocytose et l'absence de fenestration sont les principales caractéristiques structurales de ces cellules. Elles présentent également des propriétés métaboliques spécifiques. L'environnement cérébral des capillaires cérébraux et plus particulièrement les astrocytes sont responsables de l'établissement des propriétés de barrière.

1. Les jonctions serrées

L'une des caractéristiques structurales majeures des cellules endothéliales de capillaires cérébraux est la présence d'un réseau de « zonula occludentes » ou jonctions serrées qui relie de façon continue chacune des cellules à ses voisines (Reese et Karnovski, 1967). Ainsi, l'endothélium des capillaires cérébraux, de par la présence de ces jonctions serrées, peut être considéré comme un endothélium de type continu. Ces jonctions vont considérablement restreindre la diffusion des ions (Hansen *et al.*, 1977) et le transport des substances hydrophiles non électrolytes (Olendorf, 1971). Elles vont aussi participer à l'élaboration et au maintien de la polarité des cellules en séparant les membranes basales et apicales et ainsi maintenir la distribution membranaire asymétrique des protéines (Betz *et al.*, 1980). En effet, certains auteurs ont constaté que la perte des jonctions serrées au niveau de tissus ou de cellules en culture entraîne une perte de polarisation de ceux-ci (Galli *et al.*, 1976).

La mise en place des jonctions serrées ferait intervenir de nombreuses protéines spécifiques de ces jonctions, telles que l'occludine qui est une protéine transmembranaire, la protéine ZO-1 qui est associée au feuillet cytoplasmique de la membrane plasmique et la protéine ZO-2 qui est associée à ZO-1, ainsi que des protéines classiquement retrouvées dans le cytoplasme comme les composants du cytosquelette (Mitic et Anderson, 1998).

2. Caractéristiques métaboliques

En plus de leurs caractéristiques structurales, les cellules endothéliales cérébrales possèdent des propriétés métaboliques particulières auxquelles participe la monoamine oxydase. Cette enzyme, exprimée par les cellules endothéliales de capillaires cérébraux et les péricytes (Betler *et al.*, 1966), empêche les amines circulantes de pénétrer dans le cerveau. En parallèle, elle inactive les neurotransmetteurs libérés dans le liquide interstitiel cérébral. En effet, les neurotransmetteurs monoaminergiques sont activement prélevés du côté abluminal puis catabolisés dans les capillaires cérébraux (Meyer *et al.*, 1973). La monoamine oxydase des cellules endothéliales de capillaires cérébraux participe à la « barrière métabolique », empêchant les échanges transcellulaires des neurotransmetteurs monoaminergiques et de leurs précurseurs.

Les propriétés métaboliques des capillaires cérébraux sont également caractérisées par la présence de la P-glycoprotéine. Cette protéine membranaire a été découverte à la surface de cellules de lignées tumorales aux phénotypes multi-résistants. Il a été montré que de nombreux agents antinéoplasiques susceptibles de traverser la BHE n'atteignent pas le parenchyme cérébral. Ce phénomène est lié à l'expression de la P-glycoprotéine par les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Tsuji *et al.*, 1992, 1993). Cette dernière fixerait ces composés et provoquerait leur expulsion de la cellule endothéliale. La P-glycoprotéine semble donc participer au maintien de l'homéostasie cérébrale.

3. Induction des propriétés de la BHE

Les astrocytes ont une situation stratégique au sein de la BHE. Ces cellules sont en contact avec les capillaires cérébraux par l'intermédiaire de leurs prolongements qui forment une gaine autour de la membrane basale des cellules endothéliales (figure 12, page 89). Il semble que les astrocytes jouent un rôle prépondérant dans l'établissement des propriétés de la BHE. En effet, ils seraient impliqués dans la formation des jonctions serrées (Janzer et Raff, 1987). Des études réalisées avec des cellules endothéliales cultivées en présence de milieu de culture d'astrocytes ont montré que celui-ci induit l'expression des jonctions serrées (Rubin *et al.*, 1991). De plus, il apparaît que les cocultures de cellules endothéliales et d'astrocytes permettent de recréer les conditions décrites *in vivo* et d'établir un endothélium ayant les caractéristiques de la BHE (Dehouck *et al.*, 1990, 1995). Il semble donc exister des échanges entre les astrocytes et les cellules endothéliales de capillaires cérébraux qui s'avèrent indispensables à l'élaboration des propriétés de la BHE.

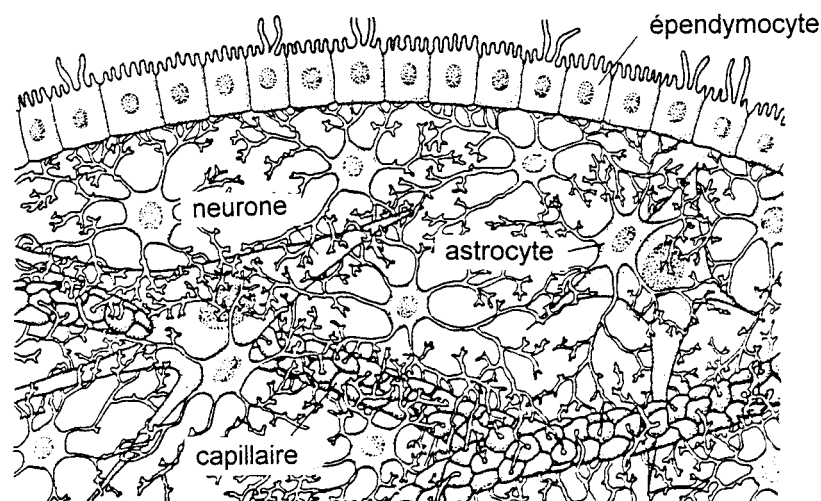


Figure 12 : Place stratégique des astrocytes au sein du SNC (Goldstein et Betz, 1986).

B. Les mécanismes de transport à travers la BHE

Contrairement aux capillaires des tissus périphériques, ceux localisés dans le SNC possèdent peu de vésicules de pinocytose et de canaux transendothéliaux, réduisant fortement les transports non spécifiques dits de « fluid phase » (Reese et Karnovski, 1967). Certaines molécules telles que le CO_2 , l' O_2 et les substances lipophiles traversent la BHE par simple diffusion, seul un gradient de concentration de la molécule étant nécessaire. Les molécules plasmatiques quant à elles en majorité anioniques ou hydrophiles ne le peuvent pas. Les molécules de petite taille, telles que le sucrose ou l'inuline, emprunteraient la voie paracellulaire pour traverser la BHE. Par contre, les molécules plasmatiques de haut poids moléculaire utilisent des transporteurs spécifiques présents à la surface des cellules endothéliales. Ces molécules pour atteindre le parenchyme cérébral doivent être transportées de la face luminale vers la face abluminale des cellules, les structures cellulaires impliquées dans ce trafic sont encore mal définies.

1. Transport des ions, du glucose et des acides aminés

Les ions jouent un rôle important dans la transmission de l'influx nerveux. C'est pourquoi leur concentration dans le liquide interstitiel cérébral est hautement régulée. Des transporteurs spécifiques présents au niveau des membranes lumineales et ablumineales des cellules endothéliales participent à cette régulation. En effet, il existe des transporteurs spécifiques des ions potassium situés sur la face abluminale des cellules endothéliales de capillaires cérébraux (Vigne *et al.*, 1994), ainsi que des systèmes de transport du sodium et du chlore (Betz, 1983) présents sur la face lumineale des cellules.

Le glucose est un élément essentiel au bon fonctionnement des cellules nerveuses. Le transport de cet élément à travers la BHE est facilité par la présence d'un transporteur spécifique au niveau des cellules endothéliales (Betz *et al.*, 1979). Bien qu'il soit situé à la fois sur les faces lumineales et ablumineales, le nombre de transporteurs est plus important sur la face abluminale des cellules (Farrel et Pardridge, 1991). Cette dissymétrie permettrait aux molécules de glucose ayant pénétré dans la cellule d'arriver rapidement vers les fluides baignant les neurones et les cellules gliales.

Le SNC a besoin d'un apport continu d'acides aminés. Il existe plusieurs systèmes de transporteurs des acides aminés à travers la BHE. Trois principaux systèmes de transport permettent le passage des acides aminés neutres à travers la BHE, correspondant aux : système A (alanine), système ASC (alanine, sérine, cystéine) et système L (leucine) (Goldstein et Betz, 1986).

2. Transport des peptides, protéines et lipoprotéines

Pardridge et coll. (1985a) ont montré, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, que contrairement à d'autres endothéliums, l'endothélium cérébral n'exprime pas de récepteur à l'albumine. Smith et Borhardt (1989) ont observé une endocytose de l'albumine de type « fluid phase » par les cellules endothéliales de capillaires cérébraux cultivées seules. En condition physiologique, une faible quantité d'albumine traverse donc les capillaires cérébraux par l'intermédiaire d'un mécanisme non spécifique.

L'insuline est transportée du sang vers le cerveau par l'intermédiaire d'un récepteur présent au niveau des cellules endothéliales de capillaires cérébraux (Pardrige *et al.*, 1985b). Cette hormone joue ainsi un rôle dans le développement du cerveau et notamment dans la maturation neuronale (Sara *et al.*, 1983). Les facteurs de croissance « insulin-like » (IGF-I et II), polypeptides voisins de l'insuline, peuvent également être transportés du sang vers le cerveau (Frank *et al.*, 1986).

Le fer est un élément essentiel pour le bon fonctionnement du SNC. Cet élément est distribué aux tissus de l'organisme par l'intermédiaire de la transferrine. La présence d'un nombre important de récepteurs de la transferrine a été mise en évidence au niveau des capillaires cérébraux (Jefferies *et al.*, 1984). Après endocytose, la transferrine fournit le fer nécessaire au métabolisme des cellules endothéliales mais également aux cellules du SNC. Des études réalisées, *in vivo* et *in vitro*, montrent qu'après internalisation de la transferrine par les cellules de la BHE, seul le fer est retrouvé dans le parenchyme cérébral (Roberts *et al.*, 1993 ; Raub et Newton, 1991). Par contre, d'autres études ont montré que l'endocytose de la transferrine par les cellules endothéliales de capillaires cérébraux est suivie d'une transcytose de celle-ci vers le cerveau (Fishman *et al.*, 1987 ; Descamps *et al.*, 1996).

L'existence du récepteur des LDL de type apo (B, E) a été mise en évidence au niveau des capillaires cérébraux. Ce récepteur permet l'endocytose *in vitro* des LDL par les cellules endothéliales de capillaires cérébraux (Méresse *et al.*, 1989). Son expression ainsi que le transport des LDL à travers les cellules endothéliales sont dépendants des besoins en cholestérol des cellules du compartiment cérébral (Dehouck *et al.*, 1994, 1997).

3. Structures cellulaires impliquées dans les transports spécifiques

Au moins deux types de structures possédant des morphologies différentes sont impliquées dans les mécanismes d'endocytose : les vésicules recouvertes de clathrine et en grande majorité les cavéoles.

Les vésicules recouvertes de clathrine sont de loin les plus connues et les mieux étudiées. La clathrine est disposée sur le versant cytoplasmique de la membrane plasmique

et du réseau transgolgien. Après leur formation, les vésicules perdent rapidement leur revêtement de clathrine (Schlossman *et al.*, 1984). La clathrine est alors recyclée vers la membrane plasmique et participe à la formation de nouvelles vésicules. Les vésicules quant à elles fusionnent avec des structures vésiculaires plus grandes appelées endosome primaire qui mènent soit au recyclage des molécules piégées dans la vésicule, soit à leur dégradation dans les lysosomes (Geuze *et al.*, 1983).

Depuis quelques années une attention toute particulière a été portée aux petites vésicules non recouvertes de clathrine appelées cavéoles. Bien que leur existence soit connue depuis plus de 40 ans, elles ont longtemps été considérées comme des vésicules n'intervenant que dans les phénomènes de transport non-spécifique. Contrairement à certains types cellulaires, les endothéliums de type continu (Schnitzer *et al.*, 1994) renferment un grand nombre de structures apparentées aux cavéoles et peu de vésicules recouvertes de clathrine. Schnitzer (1993) a montré que les cavéoles sont impliquées dans le transport de l'albumine native au niveau des cellules endothéliales de capillaires pulmonaires. Il semble que les cavéoles sont également impliquées dans le transport des LDL et de la transferrine au travers des cellules endothéliales de capillaires cérébraux (Dehouck *et al.*, 1997 ; Descamps *et al.*, 1997). Ces structures pourraient être responsables du transport des protéines qui ne suivent pas la voie de la dégradation.

C. BHE, inflammation et maladies neurodégénératives

Certaines pathologies du SNC telles que les maladies neurodégénératives présentent un caractère inflammatoire indéniable ainsi qu'une altération profonde de l'endothélium cérébral, qualifiée par les cliniciens de « rupture de la BHE ». Bien que les mécanismes d'induction de ce dysfonctionnement soient obscurs, des observations montrent clairement que celle-ci est associée au caractère inflammatoire de ces pathologies et notamment à la surexpression de cytokines pro-inflammatoires.

1. Cytokines et maladies neurodégénératives

Au cours des pathologies cérébrales, la surexpression tant au niveau périphérique que cérébral de cytokines pro-inflammatoires semble fortement impliquée dans l'aggravation des symptômes observés. Dans des conditions physiologiques, l'IL1, l'IL6 et le TNF- α sont exprimés de façon constitutive mais en quantité très faible au niveau du SNC (Schöbitz *et al.*, 1994). Par contre, cette synthèse est augmentée de façon importante au cours des neuropathologies.

Des patients atteints de la maladie d'Alzheimer présentent des taux sériques élevés de TNF- α (Fillit *et al.*, 1991). L'IL1 semble également être impliquée dans l'évolution de cette pathologie puisqu'elle induit la synthèse de l' α 1-antichymotrypsine, inhibiteur de protéases entraînant la polymérisation de la protéine β en filaments qui forment les dépôts amyloïdes caractéristiques de cette pathologie (Das et Potter, 1995).

En ce qui concerne la sclérose en plaque, le TNF- α et l'IL1 semblent être impliqués dans l'évolution de cette pathologie (Tsukada *et al.*, 1991). En effet, le TNF- α est retrouvé dans la majorité des cas dans le LCR et le plasma de patients atteints de sclérose en plaque. La production d'IL1 a également été observée dans des monocytes isolés de patients atteints de cette pathologie (Merrill *et al.*, 1989).

Des études réalisées chez des patients atteints de la maladie de Parkinson ont montré une augmentation des taux de TNF- α dans le sérum et le LCR de ces patients (Mogi *et al.*, 1994a). Des taux élevés d'IL1- β et d'IL6 ont également été observés dans le cerveau de ces patients (Mogi *et al.*, 1994b).

2. Origine des cytokines impliquées dans l'inflammation cérébrale

Les concentrations élevées de cytokines retrouvées dans le sang peuvent s'expliquer par une surexpression de ces médiateurs par les leucocytes qui en sont la source majeure. En revanche, leur présence au niveau du LCR suggère que les cytokines peuvent être synthétisées par les cellules du SNC.

Des observations issues d'études *in vivo* montrent que les cellules microgliales, considérées comme les macrophages résidents du SNC (Altman, 1994), les astrocytes et les cellules endothéliales cérébrales constituent une source importante de cytokines. Ainsi, la présence de TNF- α a été identifiée au niveau d'astrocytes situés à la périphérie des lésions présentes chez des patients atteints de la sclérose en plaque, suggérant que les astrocytes pourraient être la source de TNF- α (Hofman *et al.*, 1989). Le TNF- α est également détecté dans les macrophages présents au sein des lésions, mais aussi au niveau des cellules microgliales à l'extérieur des lésions (Canella et Raine, 1995). Des études *in vitro* ont également été réalisées et montrent que les astrocytes peuvent synthétiser des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL1, le TNF- α ou l'IL6 (Sharif *et al.*, 1993). Cependant, les cytokines sont produites en quantité plus importante par les cellules microgliales activées que par les astrocytes (Lee *et al.*, 1993).

Ces cytokines peuvent également avoir une origine périphérique et atteindre le parenchyme cérébral en franchissant la BHE par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques. En effet, l'IL1- α et l'IL1- β administrées par voie intraveineuse peuvent être transportées vers le cerveau sans dégradation par un mécanisme saturable (Banks *et al.*, 1991). Le TNF- α (Gutierrez *et al.*, 1993) et l'IL6 (Banks *et al.*, 1994) sont également transportés vers le SNC.

3. Cytokines et BHE

Au cours des maladies neurodégénératives présentant un caractère inflammatoire, la BHE est sujette à des dysfonctionnements importants qui se traduisent par l'infiltration de cellules immunocompétentes vers les sites inflammatoires et une « rupture de la BHE ».

Les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL1, le TNF- α et l'IFN- γ sont capables d'induire l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales de capillaires cérébraux et ainsi d'activer ces cellules (Fabry *et al.*, 1992). Récemment, Wong et coll. (1999) ont montré que le TNF- α augmente l'adhésion des cellules endothéliales de capillaires cérébraux et qu'il s'ensuit une augmentation de la migration de cellules lymphocytaires à travers la BHE.

Des dysfonctionnements des propriétés de la BHE ont été observés chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Meccoci *et al.*, 1991). De plus, certaines pathologies cérébrales sont caractérisées par de fortes concentrations en cytokines pro-inflammatoires dans les compartiments cérébral et sanguin. Il semble que le TNF- α et l'IL1- α soient impliqués dans les modifications de la perméabilité vasculaire cérébrale (Sharief et Thompson, 1992). En effet, l'injection de TNF- α dans le LCR entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire cérébrale à l'albumine chez le rat, et s'accompagne d'une infiltration de leucocytes au sein du SNC (Kim *et al.*, 1992). L'injection intraveineuse de TNF- α est également à l'origine d'une modification de la perméabilité à l'albumine chez le porc nouveau-né (Abraham *et al.*, 1996). Cependant, aucune modification de cette perméabilité n'a été observée après administration intraveineuse de TNF- α chez le rat (Kim *et al.*, 1992).

Les cytokines pro-inflammatoires et plus particulièrement le TNF- α semblent être impliqués dans les modifications de perméabilité vasculaire cérébrale observées dans le cas des maladies neurodégénératives.

Conclusion

La présence de récepteurs spécifiques de la transferrine et des LDL à la surface des cellules endothéliales permet le transport de ces molécules plasmatiques vers le parenchyme cérébral. Un tel mécanisme pourrait être envisagé dans le transport de la lactoferrine à travers la BHE. Les propriétés de cette barrière sont modifiées en conditions inflammatoires, et plus particulièrement au niveau de lésions neuropathologiques qui sont le siège de réactions inflammatoires. De telles modifications pourraient être à l'origine de l'accumulation de la lactoferrine au niveau de ces lésions. Ainsi, il était intéressant d'étudier le transport de la lactoferrine au travers des cellules endothéliales de capillaires cérébraux de manière à mettre en évidence son transport à travers la BHE. Ensuite, afin d'identifier le mécanisme responsable de l'accumulation de cette protéine en conditions pathologiques, il était intéressant d'étudier ce transport en conditions inflammatoires.

ARTICLE 1 :

TRANSCYTOSE DE LA LACTOFERRINE A TRAVERS LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE

Introduction

Nous avons entrepris l'étude de la transcytose de la lactoferrine en collaboration avec l'équipe du Professeur Roméo Cecchelli qui a mis au point un modèle *in vitro* de BHE. Ce modèle, qui consiste en une coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et d'astrocytes (figure 13), permet de recréer les conditions observées *in vivo*. Plusieurs études ont mis en évidence sur ce modèle le transport de nombreuses substances et ont montré qu'il existe une excellente corrélation entre les perméabilités observées *in vivo* et *in vitro* (Dehouck *et al.*, 1990, 1994, 1995 ; Descamps *et al.*, 1996).

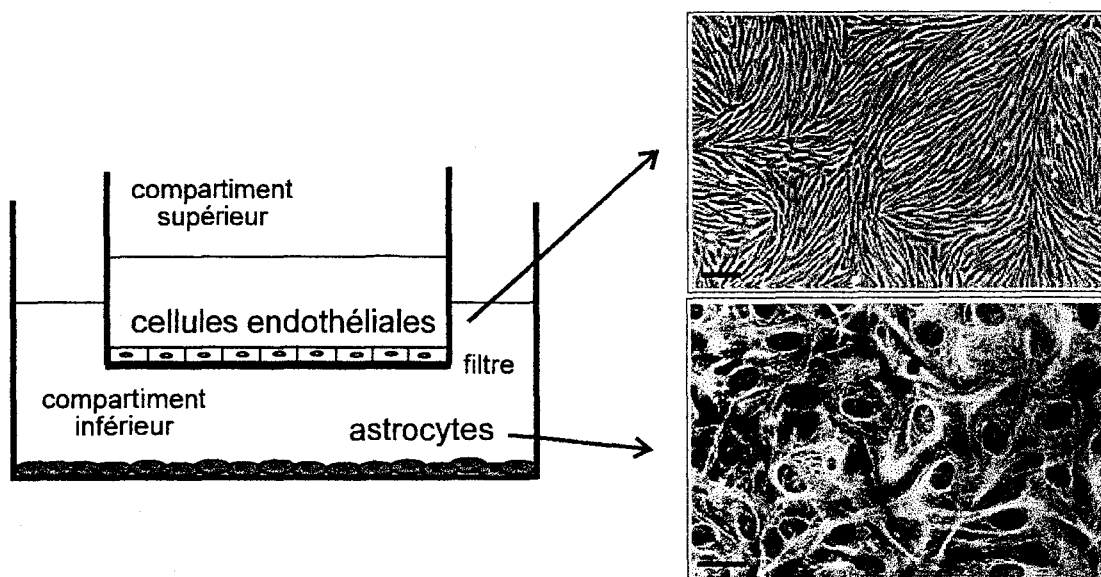


Figure 13 : Modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique : coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux (microscopie à contraste de phase) et d'astrocytes (immunomarquage fluorescent de la GFAP). Barres d'échelle = 100 μ m.

L'utilisation de ce modèle nous a permis d'étudier le passage de la lactoferrine à travers les cellules endothéliales de capillaires cérébraux. La première étape de cette étude a porté sur l'interaction de la lactoferrine avec les cellules endothéliales, et tout particulièrement en fonction de l'état de différenciation des cellules. En effet, la coculture des cellules endothéliales en présence d'astrocytes est indispensable à la différenciation des cellules et à l'établissement des propriétés de barrière du modèle (Rubin *et al.*, 1991), induisant l'expression de transporteurs spécifiques à la surface des cellules endothéliales. L'endocytose de la lactoferrine ainsi que sa transcytose ont ensuite été étudiées. Afin de mettre en évidence les molécules impliquées dans le passage de la lactoferrine à travers la BHE, nous avons utilisé des inhibiteurs connus de certains récepteurs de la lactoferrine. La deuxième étape de cette étude a concerné le devenir de la lactoferrine et de son fer au cours du transport.

Ce travail a fait l'objet de l'article suivant : « **Receptor-mediated transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier** », publié dans *The Journal of Biological Chemistry* (1999), 274, 7011-7017.

Receptor-mediated Transcytosis of Lactoferrin through the Blood-Brain Barrier*

(Received for publication, August 19, 1998, and in revised form, December 1, 1998)

Carine Fillebeen‡, Laurence Descamps§, Marie-Pierre Dehouck§, Laurence Fenart§, Monique Benaïssa‡, Geneviève Spik‡, Roméo Cecchelli¶, and Annick Pierce‡||

From the ‡Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille, Unité Mixte de Recherche 111, CNRS, 59655 Villeneuve d'Ascq, the §Service d'Etude et de Recherche sur les Lipoprotéines et l'Athérosclérose, INSERM, Unité 325, Institut Pasteur, 59019 Lille, and the ¶Université d'Artois, Faculté Jean Perrin, 62307 Lens, France

Lactoferrin (Lf) is an iron-binding protein involved in host defense against infection and severe inflammation; it accumulates in the brain during neurodegenerative disorders. Before determining Lf function in brain tissue, we investigated its origin and demonstrate here that it crosses the blood-brain barrier. An *in vitro* model of the blood-brain barrier was used to examine the mechanism of Lf transport to the brain. We report that differentiated bovine brain capillary endothelial cells exhibited specific high ($K_d = 37.5$ nM; $n = 90,000$ /cell) and low ($K_d = 2$ μ M; $n = 900,000$ sites/cell) affinity binding sites. Only the latter were present on nondifferentiated cells. The surface-bound Lf was internalized only by the differentiated cell population leading to the conclusion that Lf receptors were acquired during cell differentiation. A specific unidirectional transport then occurred via a receptor-mediated process with no apparent intraendothelial degradation. We further report that iron may cross the bovine brain capillary endothelial cells as a complex with Lf. Finally, we show that the low density lipoprotein receptor-related protein might be involved in this process because its specific antagonist, the receptor-associated protein, inhibits 70% of Lf transport.

Lactoferrin (Lf)¹ (1) is a mammalian cationic iron-binding glycoprotein belonging to the transferrin (Tf) family. Despite some striking differences, mainly in the glycan moiety, there are marked sequence and conformational homologies among Lfs from different species, as well as similar general functions (for review, see Ref. 2). Many physiological roles have been ascribed to Lf, particularly in the host defense against infection and severe inflammation (for review, see Ref. 3). This broad spectrum of biological functions relies on the interaction of Lf with numerous cells. The binding of Lf to cells is independent

of its degree of iron saturation and is mediated mainly via interaction of the cluster of basic amino acids at its NH₂ terminus with sulfated molecules (4, 5). However, Lf is also targeted to specific cell receptors, and only a few of these involved in its uptake have been clearly identified. The 105-kDa Lf receptor characterized on activated human T-cells (6) is expressed at the cell surface of platelets (7), megacaryocytes (8), dopaminergic neurons, and mesencephalon microvessels (9). Lf receptor internalizes Lf, which is subsequently degraded (30–40%), whereas the remaining fraction is recycled (10). In addition, the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) displays a high affinity for Lf and is responsible for its clearance (11–14). This is inhibited by RAP, the receptor-associated protein known to be an antagonist for LRP (15). Transcytosis of Lf was described for HT29 cells (16) and was a minor pathway, up-regulated during iron deprivation (17).

Lf is produced by exocrine glands (1, 18) and is widely distributed in the body fluids. It is stored in specific granules of neutrophilic leukocytes (19) and is released during the inflammatory process. In addition, the concentration of Lf present in cerebrospinal fluids is enhanced in cases of acute cerebrovascular lesions (20, 21). Moreover, as an iron-binding protein, Lf has been implicated in the pathogenesis of brain lesions. Although practically absent from the normal human cerebral cortex (22), Lf was found in brains associated with aging and, more importantly, in increased amounts in the specific regions adversely affected in neurodegenerative disorders (22–24). In the mesencephalon, Lf is concentrated mainly in the dopaminergic neurons; in the case of Parkinson's disease (25), the surviving neurons accumulate higher concentrations of Lf. The origin and function of Lf within either the normal or pathological brain are as yet uncharted.

In situ synthesis of Lf occurs in brain, and Lf transcripts were found in human (26) and mouse brain tissues (27). Moreover, we have shown that Lf expression was up-regulated in mouse brain tissues treated with the neurotoxic agent 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, which is used as a model for Parkinson's disease (27). Nevertheless, this up-regulation was slight and might not explain the large increase of Lf observed in the case of neurodegenerative disorders (22, 25). Moreover, the presence of Lf on the cerebral microvessels and its distribution in the vicinity of the inflammatory foci led us to investigate whether Lf may cross the blood-brain barrier (BBB).

The BBB is formed from specialized endothelial cells (ECs) that are sealed together by continuous complex tight junctions to form a polarized barrier that restricts the free exchange of most solutes between plasma and the extracellular fluid of the brain. Furthermore, even though brain capillary ECs contain no direct transendothelial passageways such as fenestrations

* This investigation was supported in part by CNRS Unité Mixte de Recherche 111 (Relations Structure-Fonction des Constituants Membranaires), by the Université des Sciences et Technologies de Lille I, by INSERM Unité 325 (Service d'Etude et de Recherche sur les Lipoprotéines et l'Athérosclérose), by the Institut Pasteur de Lille, and by grants from the Conseil Régional Nord-Pas de Calais (Axe régional: maladies neurodégénératives et vieillissement). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

|| To whom correspondence should be addressed: Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Tel.: 33-3-2033-7238; Fax: 33-3-2043-6555; Email: annick.pierce@univ-lille1.fr.

¹ The abbreviations used are: Lf, lactoferrin; bLf, bovine lactoferrin; Tf, transferrin; bTf, bovine transferrin; LRP, low density lipoprotein receptor-related protein; RAP, receptor-associated protein; BBB, blood-brain barrier; EC, endothelial cell; BBCEC, bovine brain capillary endothelial cell; P_p , permeability coefficient; LDL, low density lipoprotein.

Lactoferrin Transcytosis through the Blood-Brain Barrier

or channels, specific transport mechanisms located in the cerebral ECs ensure that the central nervous system receives an adequate supply of nutrients. Such receptors have already been identified for proteins (28–30) and lipoproteins (31).

We have used an *in vitro* model of the BBB which imitates the *in vivo* situation by means of the co-culture of bovine brain capillary ECs (BBCECs) on one side of a porous filter and astrocytes plated at the bottom of six-well dish (32, 33) to provide direct evidence that after binding to BBCECs, Lf crosses the endothelial monolayer from the apical to the abluminal surface. Lf transcytosis is receptor-mediated, and our results indicate that LRP might be involved in this transcellular transport across the brain endothelium.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture—BBCECs isolated and characterized as described previously (32, 33) were cloned, allowing us to obtain a pure EC population uncontaminated by pericytes. The cells were cultured in the presence of Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 15% (v/v) heat-inactivated calf serum (Hyclone Laboratories), 2 mM glutamine, 50 μ g/ml gentamycin, and 1 ng/ml basic fibroblast growth factor, added every other day. Nondifferentiated cells were obtained by growing BBCECs in the absence of astrocytes.

Primary cultures of mixed astrocytes were prepared from newborn rat cerebral cortex. After removing the meninges, the brain tissue was forced gently through a nylon sieve (34). Astrocytes were plated on six-well dishes (Nunc; Nunc A/S) at a concentration of 1.2×10^5 cells/ml in 2 ml of Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum (Hyclone Laboratories). The medium was changed twice a week. 3 weeks after the seeding was completed, the purity of the astrocyte population was checked (33). Stabilized cultures contained more than 95% astrocytes that were glial fibrillary acidic protein-positive and were used for co-culture.

Establishing the *in vitro* model of BBB was performed using a co-culture of BBCECs and astrocytes. Prior to cell culture, plate inserts (Millicell-CM 0.4 μ m; 30-mm diameter; Millipore Corp.) were coated on the upper side with rat tail collagen (35). They were then set in the six-multiwell dishes containing the astrocytes prepared as described above, and BBCECs were plated at a concentration of 4×10^5 cells/ml on the upper side of the filters in 1.5 ml of co-culture medium. This BBCEC medium was changed every other day. Under these conditions, differentiated BBCECs formed a confluent monolayer 7 days later ($400,000$ cells/cm²). Experiments were performed 5 days after confluence was reached. To be certain that differentiated BBCECs are a legitimate model for the BBB *in vitro*, the BBCEC phenotype was characterized and the tight junction network visualized. Cells were stained with a filamentous actin probe (28, 31), and the localization to the plasma membrane of the tight junction-associated protein ZO-1 was carried out as described (31). Endothelial permeability was checked in each experiment and the permeability coefficient (P_e , in cm/min) calculated as described previously (33).

Preparation and Labeling of Bovine Lf (bLf)—bLf was purified from bovine colostrum by ion-exchange chromatography as partially saturated bLf (36).

Fluorescent labeling of bLf on the glycan moiety was carried out by coupling 5-((2-(carbohydrazino)methyl)-thio)acetylaminofluorescein (Hyf) on aldehyde groups resulting from the mild periodate oxidation of *N*-acetylneuraminic acid residues (7).

Iodination of bLf was performed using the IODO-GEN reagent (Pierce). bLf (500 μ g) was dissolved in phosphate-buffered saline and incubated with 0.2 mCi of Na¹²⁵I (carrier-free, 100 mCi/ml, Amersham Pharmacia Biotech) for 15 min at 4 °C. Free iodine was removed on a Sephadex G-50 column (PD-10, Amersham Pharmacia Biotech). The specific activity range was 0.35–0.5 μ Ci/ μ g of protein; to avoid radiolysis, the iodinated protein was stored at 4 °C and used the same day.

Prior to ⁵⁹Fe labeling, bLf was fully desaturated in formiate buffer (0.2 M formic acid-sodium formiate; containing 0.5 M NaH₂PO₄ and 25 mM EDTA) at pH 3.8 to give apobLf. ⁵⁹Fe (18 nmol) (3–25 mCi/mg Fe, Amersham Pharmacia Biotech) was mixed with a solution containing 0.4 mM nitriloacetic acid and 0.05 M NaOH for 5 min at room temperature, and then the pH was adjusted to 8.2 with NaOH. ApobLf (37 nmol) dissolved in 0.1 M Tris-bicarbonate buffer (pH 7.6) was added to the iron solution and then incubated for 45 min at room temperature. Unbound ⁵⁹Fe was captured mainly by adding 50 μ l of Chelex 100 (Sigma) preequilibrated with 0.1 M Tris-bicarbonate buffer, and the remaining free ⁵⁹Fe was further removed on a PD-10 column. This

method gave an average specific activity of 5 μ Ci/mg protein and a yield of iron saturation equal to 99%.

For dual labeling of bLf, protein was first labeled with ⁵⁹Fe and further iodinated with 0.05 mCi of Na¹²⁵I for 500 μ g of ⁵⁹Fe-bLf, giving a specific activity of 0.1 μ Ci/ μ g protein for ¹²⁵I and 4 μ Ci/mg protein for ⁵⁹Fe.

Binding, Endocytosis, Internalization Kinetics, and Transcytosis—All of these studies were performed only with BBCECs to avoid any interference from the astrocyte population. Moreover, to eliminate endogenous bLf, BBCECs were always incubated before each experiment for 2 h in medium without serum. Because Tf has been described as an effective blocking component, able to prevent high levels of nonspecific Lf binding (37), all buffers contained 0.2% bTf (Sigma). Each point was done in triplicate, and the data are represented as the means \pm S.E. Nonspecific controls were carried out with a 100-fold excess of unlabeled protein.

Equilibrium binding was performed on differentiated and nondifferentiated BBCECs in Ringer-HEPES-bTf for 2 h at 4 °C, with a ¹²⁵I-bLf concentration ranging from 0.2 to 200 μ g/ml (2.5–2500 nM). The cells were washed carefully, and cell-associated radioactivity was determined by removing the membrane of the culture insert and counting it in a gamma counter. The results were analyzed using the Enzfitter nonlinear regression data analysis program (Elsevier-BIOSOFT, Cambridge, U. K.). Scatchard plots and kinetic analyses were performed using the same software.

Determination of the luminal uptake of Hyf-bLf was performed before cell fixation with 4% paraformaldehyde. The luminal compartment of the differentiated BBCECs was exposed to Hyf-bLf (50 μ g/ml; 625 nM) in Ringer-HEPES-bTf and left in contact with the cells for 45 min at 37 or 4 °C. Fluorescence microscopy experiments were carried out as already described (28).

The time course of internalization of ¹²⁵I-bLf by differentiated BBCECs was measured using ¹²⁵I-bLf (30 μ g/ml; 375 nM) which was presented to the luminal surface for 1 h at 4 °C prior to the experiment. After washing off the unbound bLf, filters covered with cells were incubated in prewarmed medium at 37 °C. At various times, filters were removed, and all subsequent steps were performed at 4 °C. The medium compartments were collected, and cells were treated with 0.1% Pronase E (Merck) in phosphate-buffered saline for 30 min at 4 °C. The surface-bound, internalized, released, and transported ¹²⁵I-bLf was counted in the Pronase-sensitive eluate, the cell extract, and the trichloroacetic acid-precipitable fractions of incubation media of the upper and lower compartments, respectively.

Transcytosis experiments were performed as follows. One insert covered with BBCECs was set into a six-well dish with 2 ml of Ringer-HEPES-bTf added to each well at 37 °C. ¹²⁵I-bLf (30 μ g/ml), ⁵⁹Fe-bLf (50 μ g/ml), and ¹²⁵I,⁵⁹Fe-double-labeled bLf (50 μ g/ml) were added to the upper side of the filter covered with cells. At various times, the insert was transferred to another well to avoid a possible reendocytosis of bLf by the abluminal side of the BBCECs. At the end of each experiment, intact bLf was assessed using trichloroacetic acid precipitation of lower media, and protein degradation was assessed with AgNO₃ precipitation. For ¹²⁵I-bLf studies, all results were expressed as ¹²⁵I-bLf equivalent flux (ng/cm²), which represents trichloroacetic acid-precipitable radioactivity recovered in the lower compartments. The ⁵⁹Fe equivalent flux (pg/cm²) corresponds to the total iron radioactivity found in the lower compartment.

The influence of temperature on the transport of ¹²⁵I-bLf (30 μ g/ml) was studied with the monolayers kept at 4 °C. In parallel, the paracellular passage of sucrose (0.1 μ Ci of [¹⁴C]sucrose) was assayed at 4 °C and 37 °C in the same conditions.

To demonstrate whether Lf transendothelial transport was directional, ¹²⁵I-bLf (30 μ g/ml) was added to the lower compartment of the wells, and the transcytosis experiment was conducted as above.

Effect of RAP on Lf Transcytosis—The effect of RAP on the transendothelial transport of ¹²⁵I-bLf across BBCECs was determined by adding 100 nM recombinant RAP to the upper side of the filter covered with cells for 1 h at 37 °C before experiments. Recombinant RAP was prepared in *Escherichia coli* as a fusion protein that contains the entire coding sequence of the 39-kDa protein fused to glutathione S-transferase (38). All experiments were then performed with ¹²⁵I-bLf as described above.

Electrophoretic Characterization of bLf After Transcytosis—After 2 h of transcytosis, the apical and basolateral compartment solutions were collected and analyzed by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. After electrophoresis, the gel was dried and exposed for autoradiography 2 h at –80 °C (Kodak X-Omat AR film).

Lactoferrin Transcytosis through the Blood-Brain Barrier

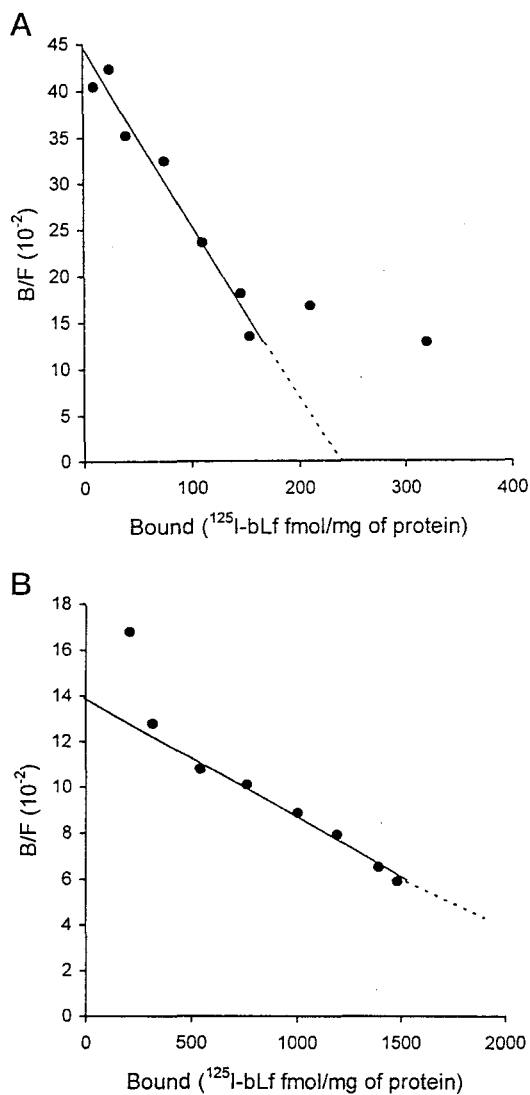


FIG. 1. Scatchard analysis of the binding of ^{125}I -bLf to differentiated BBCECs. bLf binding was performed on BBCECs at 4°C , and increased concentrations of ^{125}I -labeled bLf were added at the luminal side of the cells. Low (panel A) and high (panel B) concentration ranges of bLf were used. Specific binding was obtained after subtraction of the nonspecific binding in the presence of a 100-fold excess of unlabeled bLf from the total counts. The specific bound ^{125}I -bLf was analyzed by the Scatchard procedure. B/F , bound:free ratio.

RESULTS

Binding of bLf on BBCEC Monolayers—Binding experiments were performed both on differentiated and nondifferentiated BBCECs (cultured in the absence of astrocytes) using radioiodinated ligand. Only the binding data of differentiated cells are represented in Fig. 1. The binding was found to be concentration-dependent, saturable, and inhibited by approximately 85% in the presence of a 100-fold molar excess of unlabeled bLf, suggesting that it was reversible and specific. The binding data, analyzed by the method of Scatchard, were consistent with a two-component binding curve. Fig. 1 shows the Scatchard analysis of data from a single typical experiment (of five carried out). At a low range of ^{125}I -bLf concentrations, binding is determined primarily by high affinity sites (Fig. 1A). At a high range of ^{125}I -bLf concentrations (Fig. 1B), low affinity sites account for most of the binding. At intermediate concentrations, binding is effected by both high and low affinity sites. These data, summarized in Table I, are in agreement with the presence of two binding sites on differentiated BBCECs: a high affinity binding site with a K_d of about 37.5 nM and 90,000

TABLE I
Dissociation constants (K_d) and numbers of bLf binding sites/cell on BBCECs

Values are means \pm S.E. for two separate experiments conducted in triplicate.

Cells	K_d nM	Sites/cell
Differentiated BBCECs		
Site 1	37.5 ± 7	$90,000 \pm 16,000$
Site 2	$1,900 \pm 160$	$890,000 \pm 70,000$
Nondifferentiated BBCECs	$2,100 \pm 310$	$920,000 \pm 65,000$

sites/cell and a low affinity binding site with a K_d of about 1,900 nM and 890,000 sites/cell. Both sites were specific for bLf. bLf binding to nondifferentiated BBCECs was also investigated (Table I). Scatchard analysis revealed that the affinity of bLf for these cells ($K_d = 2,100$ nM) and the number of bLf binding sites (920,000/cell) were comparable to the low affinity binding site parameters found on the differentiated cells. These results suggest that only differentiated BBCECs are able to express high affinity binding sites for bLf.

Endocytosis of bLf in BBCEC Monolayers—To determine whether bLf was internalized from the luminal surface of the BBCECs, Hyf-bLf was first used as a probe. Staining visualized with a fluorescent microscope is shown in Fig. 2A. Hyf-bLf was found as small, individual vesicles throughout the differentiated cells. This uptake was completely inhibited at 4°C (Fig. 2B). The endocytosis process was then monitored using radio-labeled bLf. Cells were first incubated at 4°C for 1 h until the binding site occupancy reached a steady state. After washing off the unbound ligand, cells were incubated at 37°C and the distribution of surface-bound, internalized, released, and transported radioactivities was counted at various times. As shown in Fig. 3, the Pronase-resistant fraction increased rapidly and reached a maximum of 18% of the initially bound ^{125}I -bLf, 3 min after the start of the incubation. The Pronase-resistant fraction decreased slowly thereafter, as ^{125}I -bLf started to appear in the lower compartment a few minutes later, showing that transcytosis occurs. During the experiment, the Pronase-sensitive fraction decreased, and ^{125}I -bLf appeared in the upper compartment, suggesting a marked dissociation from the cell surface or a release of ^{125}I -bLf by the cells.

Apical to Basolateral Transport of bLf Across BBCEC Monolayers— ^{125}I -bLf was added to the luminal chamber of the culture, and its progressive transfer across the cell monolayer was followed for 90 min. A range of different bLf concentrations (10–100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was assayed, and no evidence of saturation was detected at concentrations lower than 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (data not shown). Fig. 4 shows the total, nonspecific and calculated specific bLf flux values as a function of time with a luminal concentration of 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bLf. Our results demonstrate that differentiated BBCECs are not a barrier for the passage of bLf. The transport of labeled bLf from the luminal to the abluminal compartment was reduced severely by an excess of unlabeled bLf, suggesting that bLf transport from the apical to the basal side of the cells was effected by specific receptor-mediated transport. The rate of transcytosis was evaluated, and about three to four bLf molecules were transported via one high affinity binding site in 1 h, suggesting that one bLf molecule crosses the BBCEC monolayer in 15–20 min. The possible toxicity of a high concentration of bLf (3 mg/ml) for the integrity of the BBCEC monolayer was assessed by calculating the permeability to sucrose. No leakiness in the barrier function occurred ($P_e = (0.65 \pm 0.02) \times 10^{-3}$ and $(0.67 \pm 0.03) \times 10^{-3}$ cm/min for the control and in the presence of 3 mg/ml of bLf, respectively).

The effect of temperature on bLf transport from the apical to

Lactoferrin Transcytosis through the Blood-Brain Barrier

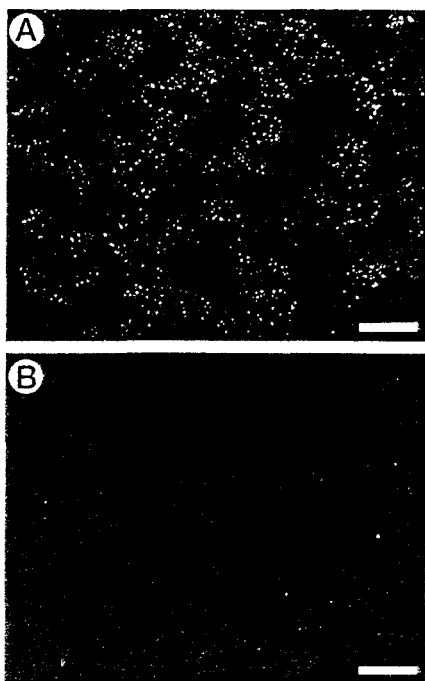


FIG. 2. Hyf-Labeled bLf endocytosis in BBCECs. BBCECs were incubated at 37 °C (panel A) or 4 °C (panel B) for 45 min with 50 μ g/ml Hyf-bLf. After washing, the cells were fixed and processed for fluorescence microscopy as described under "Experimental Procedures." Bar = 20 μ m.

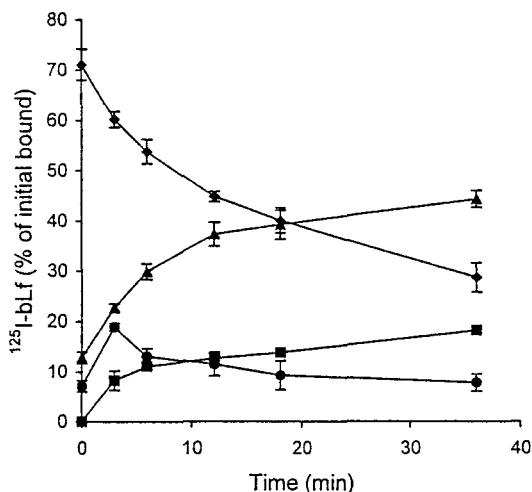


FIG. 3. Internalization kinetics of ^{125}I -bLf in BBCECs. The cells were incubated for 1 h at 4 °C in the presence of bLf (30 μ g/ml ^{125}I -bLf, 3 mg/ml unlabeled bLf). After washing off the unbound ligand, cells were incubated with ^{125}I -bLf at 37 °C. At the indicated times, filters were removed, and the amounts of surface-bound, internalized, released, and transcytosed radioactivity were counted. Ordinates represent the percentage of the total radioactivity initially bound to BBCECs at 4 °C, which was segregated within the cells (●) and released into the lower incubation medium (■) or into the upper incubation medium (▲) or associated with membranes (◆). The data are expressed as ng of ^{125}I -bLf transported/cm², which refers to the surface area of the cells. Each point is a mean of three different filters.

basal surfaces of BBCECs is shown in Fig. 5. A decrease in the incubation temperature from 37 °C to 4 °C slightly affected the paracellular passage of sucrose (Fig. 5A), whereas a dramatic decrease in the bLf transport through the monolayer was observed (Fig. 5B), indicating that bLf is directed to the abluminal compartment by a transcellular route and that this transport system requires active mechanisms such as receptor-mediated transcytosis.

Abluminal to luminal transport of bLf was assayed by added

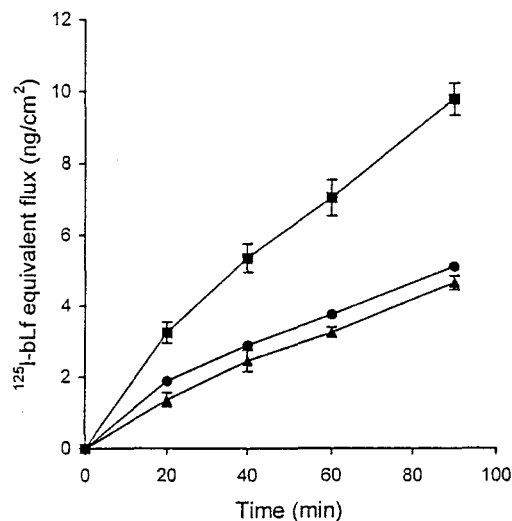


FIG. 4. Apical to basolateral transport of ^{125}I -bLf across BBCEC monolayers. bLf (30 μ g/ml ^{125}I -bLf, 3 mg/ml unlabeled bLf) was added to the luminal side of cells grown on porous filters coated with collagen. Intact ^{125}I -bLf transport from the upper to the lower sides of the filter represents radioactivity that was trichloroacetic acid-precipitable in the lower compartments. Specific transport (●) was calculated by subtracting the radioactivity obtained in the presence of native bLf (▲) from that obtained in the absence of native bLf (■). The data are expressed as ng of ^{125}I -bLf transported/cm², which refers to the surface area of the cells. Each point is a mean of three different filters.

^{125}I -bLf to the lower chamber of the culture. No specific transport of bLf was detected across the cell monolayer in these conditions (data not shown), showing that the transport of bLf across BBCECs is unidirectional.

Effect of RAP on the Transendothelial Transport of ^{125}I -bLf Across BBCECs—To determine whether LRP might be involved in the receptor-mediated transport of bLf, transcytosis experiments were performed in the presence of RAP. RAP is known to interact with LRP and block the binding of any kind of LRP ligand. The fusion molecule with glutathione *S*-transferase was used because it has been shown that LRP does not bind glutathione *S*-transferase (15, 39). The integrity of the monolayer was evaluated, and no increase in the permeability of sucrose in the presence of recombinant RAP was detected ($P_e = (0.52 \pm 0.02) \times 10^{-3}$ and $(0.55 \pm 0.03) \times 10^{-3}$ cm/min for the control and in the presence of 100 nM RAP, respectively). As shown in Fig. 6, recombinant RAP decreases the rate of the passage of bLf through the BBCEC monolayer. A decrease of 70% of the initial transcytosis was observed, suggesting the involvement of LRP in this intracellular traffic.

Characterization of bLf After Transcytosis—To determine whether bLf undergoes degradation within BBCECs during transcytosis, ^{125}I -bLf recovery was followed by counting the trichloroacetic acid precipitate, and ^{125}I -bLf degradation was followed by measuring the AgNO_3 precipitate in the upper and lower compartments. Controls were carried out with filters coated with collagen and without cells as above. The results showed that ^{125}I -bLf degradation was no more than $2 \pm 0.5\%$ either in the upper or in the lower compartment. Moreover, Fig. 7 shows that ^{125}I -bLf was recovered as an intact protein after its transport through the BBCEC monolayers. These results suggest that bLf was transported across BBCECs via a specialized pathway that does not lead to degradation.

Transendothelial Iron Transport Studies Using ^{59}Fe -bLf and ^{125}I - ^{59}Fe -Double-labeled bLf—To determine whether iron-bound Lf might reach brain tissues, iron transport was studied across BBCECs. Transcytosis experiments were repeated with ^{59}Fe -bLf. Fig. 8 represents specific transcytosis of ^{59}Fe through BBCECs. This transport was reduced by an excess of unlabeled

Lactoferrin Transcytosis through the Blood-Brain Barrier

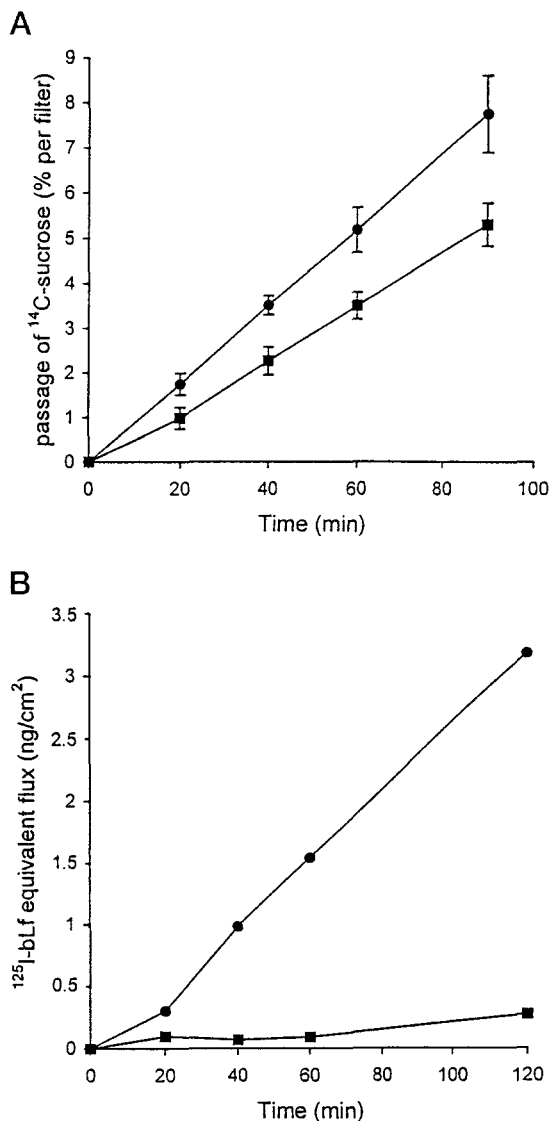


FIG. 5. Effect of a reduction in temperature from 37 °C (●) to 4 °C (■) on the transport of [^{14}C]sucrose (panel A) and ^{125}I -bLf (panel B) across BBCECs. Results are expressed as a percentage of sucrose recovered in the lower compartments. For bLf, data are expressed as an equivalent bLf flux (ng/cm²), and values are means of triplicate inserts.

bLf, suggesting that ^{59}Fe crosses the monolayer associated with bLf. To elucidate this point, experiments were then carried out with ^{125}I - ^{59}Fe -double labeled bLf, and the data are summarized in Table II. ^{59}Fe -bLf equivalent flux was calculated from ^{59}Fe flux because one molecule of bLf binds two molecules of iron. The ^{59}Fe -bLf equivalent flux (0.044 pmol cm⁻² h⁻¹), which is equal to one-half of the ^{59}Fe flux (0.088 pmol cm⁻² h⁻¹), was very close to that of the ^{125}I -bLf equivalent flux observed (0.046 pmol cm⁻² h⁻¹). These results suggest that iron found in the lower compartment crossed the BBCEC monolayers bound to bLf.

DISCUSSION

The purpose of the present study was to determine whether Lf was able to cross the BBB, which would explain its presence in brain tissues. We have demonstrated that Lf binding to BBCECs was followed by transcytosis of the protein from the luminal to the abluminal surface of brain capillary ECs in the absence of any demonstrable degradation. Using RAP as an antagonist of LRP, we have been able to show that this receptor might be involved in the intracellular traffic of Lf.

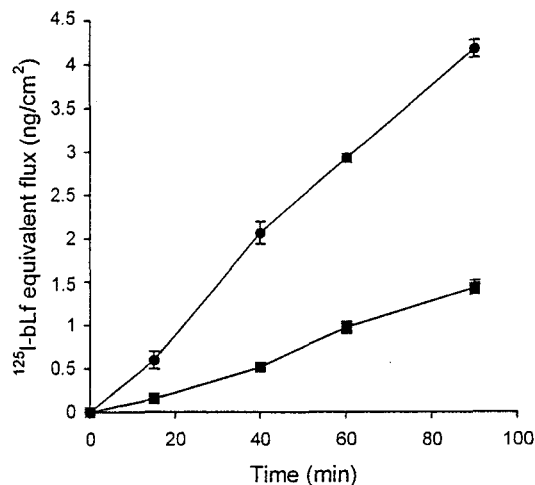


FIG. 6. Effect of RAP on the transport of ^{125}I -bLf across BBCEC monolayers. After incubation for 1 h at 37 °C with (■) or without (●) RAP (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$), bLf (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^{125}I -bLf, 3 mg/ml unlabeled bLf) was added to the luminal side of the cells. The data are expressed as ng of ^{125}I -bLf transported/cm². Each point is a mean of three different filters.

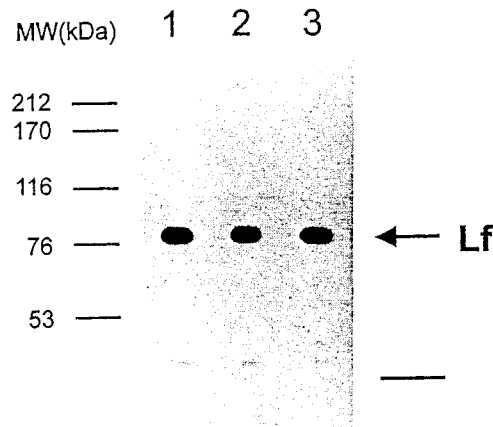


FIG. 7. Electrophoretic characterization of ^{125}I -bLf after transcytosis across BBCEC monolayers. bLf (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^{125}I -bLf) was added to the luminal side of cells for 2 h at 37 °C. Lane 1, medium of the luminal compartment after transcytosis experiment; lane 2, medium of abluminal compartment after transcytosis experiment; lane 3, ^{125}I -bLf before its addition to the luminal compartment. The arrow indicates the dye front.

We have used an *in vitro* BBB model consisting of a co-culture of brain capillary EC and astrocytes. When cultured on permeable supports, these cells form a well polarized monolayer that mimics the *in vivo* situation (28, 31, 33) and displays remarkable phenotypic similarities to the *in vivo* BBB with respect to the expression of specific markers and characteristics such as tight junctions, electrical resistance, low paracellular permeability, specific enzymatic activities, and carrier-mediated transport (40, 41).

The binding parameters of Lf have already been published for numerous cells. The BBCEC constants are within the same range as those reported (4, 6) because the apical surface of differentiated BBCEC cells exhibited 9×10^4 high specificity binding sites/cell for bLf with a dissociation constant of about 37.5 nM. These high affinity binding sites represent one-tenth of the total number of binding sites and were not present on the nondifferentiated BBCECs, demonstrating that Lf receptors were acquired during differentiation.

Our data are equally consistent with the existence of low affinity binding sites on both types of BBCEC cells with a K_d of 2 μM and approximately 9×10^5 binding sites/cell. As already shown, Lf binds to various specific ligands at the cell surface.

Lactoferrin Transcytosis through the Blood-Brain Barrier

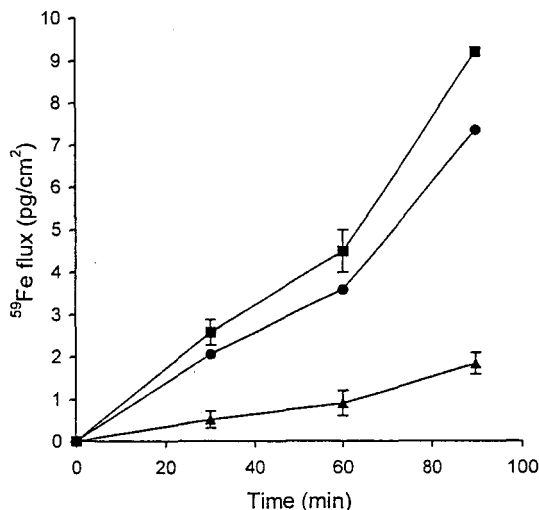


FIG. 8. Apical to basolateral transport of ^{59}Fe -labeled bLf on BBCEC monolayers. bLf (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^{59}Fe -bLf, 3 mg/ml unlabeled bLf) was added to the luminal side of the cells. Specific transport (●) was calculated by subtracting the radioactivity obtained in the presence of unlabeled bLf (▲) from that obtained with only labeled bLf (■). All values are means of triplicate inserts \pm S.E. (bars; $n = 3$).

TABLE II

^{125}I - ^{59}Fe -double-labeled Lf transport across BBCEC monolayers

Values are means \pm S.E. for three different experiments.

Passage	$\text{pmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$
^{59}Fe flux	0.088
^{59}Fe -Labeled bLf equivalent flux	0.044
^{125}I -Labeled bLf equivalent flux	0.046

Its clearance from the circulation involves at least two classes of binding sites, a large number of low affinity binding sites and a smaller number of high affinity binding sites including LRP (39). Two classes of binding sites have also been described for Lf on human lymphoblastic Jurkat cells because treatment with chlorate, which inhibits the sulfation of the carbohydrate residues on intact cells (42), resulted in a 40% decrease of the total number of binding sites for native Lf, suggesting that part of the sites consist of cell-associated sulfate groups (4). The low affinity binding components present in large numbers on BBCECs may also be sulfated molecules such as glucosaminoglycans or proteoglycans, which are known to trap biologically active molecules and retain them until they are targeted to their specific receptors (43).

In this study we have shown that after binding to the cell surface, Lf enters the differentiated BBCECs. This uptake is a very dynamic, receptor-mediated process followed by transcytosis. Furthermore the transcytosis process itself seems highly regulated in that it is both receptor-mediated and independent of a high concentration of Lf. Accumulation of Lf occurs at the abluminal side of the BBCECs, and the passage of Lf through the BBB therefore potentially corresponds to a source of brain Lf. Lf was also found at the luminal side of the cells, and this mechanism might be the result of either cell surface dissociation or recycling. Because of the large numbers of low affinity binding sites, Lf bound to these sites could dissociate rapidly on equilibrium with extensive washes.

We next investigated the possibility that Lf might be internalized via LRP, which is a member of the LDL receptor family involved in the internalization and subsequently degradation of remnant chylomicron particles. LRP is a multiligand receptor also responsible for the cellular internalization of many ligands such as Lf, α_2 -macroglobulin, *Pseudomonas* endotoxin, and both proteinases and proteinase-inhibitor complexes (for

review, see Refs. 44 and 45). The functional involvement of LRP in bLf uptake by BBCECs was tested by inhibition experiments in the presence of RAP, the LRP universal antagonist (15). RAP is an endoplasmic reticulum resident protein (46) that functions intracellularly as a molecular chaperone for LRP and maintains LRP in an inactive, non-ligand binding state along the secretory pathway (47). We demonstrated that Lf transcytosis was mediated by LRP because 70% of the Lf traffic was inhibited by RAP. The distribution of LRP on ECs was reported previously (48, 49). It has also been studied in the central nervous system and was found associated with neurons (50, 51), weakly on some glial cells, and discontinuously along the membranes of the capillaries (51). LRP was also associated with neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (52) and was found in increased concentrations in some neurons. LRP might therefore be responsible for Lf accumulation in some specific brain areas.

Lf endocytosis (10, 13) and transcytosis (16, 17) have been reported previously, and partial or complete degradation of Lf always occurs. Lf released during neutrophil activation has a rapid turnover, and its clearance by the liver keeps its level in the plasma very low. Lf internalized by Jurkat cells accumulates in the endosomal compartment, and then both intact and degraded Lf is released, suggesting that part of the Lf is recycled (10). Lf is also endocytosed by the intestinal epithelial cells HT-29. In this case, transcytosis of 10% of Lf occurred, whereas 90% of the Lf followed a major degradative pathway (16). In the present study, we report that Lf is taken up and transported through the BBCECs without any degradation. The nondegradation of Lf during the transcytosis indicates that the transcytotic pathway in BBCECs is different from the classical Lf receptor pathways described above. The existence of a receptor-mediated process that bypasses lysosomes seems to be a feature of ECs; the absence of degradation of proteins such as insulin (29), albumin (30), Tf (28), and lipoproteins such as LDL (31) through ECs was reported previously. Microscopy studies also confirmed that no accumulation of LDL was observed in lysosomes (31). The precise transcellular pathway for the passage of blood-borne molecules across the BBB is not yet elucidated. One of the characteristics of brain capillaries ECs is the paucity of clathrin-coated pits, and previous studies strongly support the involvement of caveolae in endocytosis (53, 54). These structures seemed responsible for the uptake and transcellular transport of albumin (55) and human Tf (28). They have recently been implicated in the traffic of LDL through the brain microvascular endothelia leading to LDL accumulation in early endosomes and in multivesicular body structures (31). To determine whether Lf transport through BBCECs is caveolae-dependent, electron microscopy investigations are currently under way.

Alterations in iron metabolism occur in neurodegenerative diseases which lead to excessive iron deposits (56–58). The causes and consequences of such deposits in the brain are unknown, as is the nature of the responsible iron complex. Conflicting results have been reported on the implication of the proteins responsible for maintaining brain iron homeostasis, but no significant variation in the levels of expression of Tf, transferrin receptor, and ferritin have been found in pathological brain tissues (59, 60), whereas changes in the distribution, the amount (22–25), and the level of expression (27) of Lf were observed. In the case of inflammatory responses, high plasma levels of Lf are available, and larger amounts of Lf may cross the BBB and accumulate in the inflammatory foci. This process might explain why a strong labeling of Lf was observed on cerebral microvessels located in the vicinity of the neurodegenerative lesions (22). On the other hand, in response to local

Lactoferrin Transcytosis through the Blood-Brain Barrier

tissue injury or inflammation, additional transport pathways for large molecules may be opened and existing pathways modified or made less restrictive. It was shown recently that the intracellular traffic kinetics of Tf and LDL are disturbed in BBCECs in the presence of tumor necrosis factor α (40).

The most striking characteristic of Lf is its high affinity for iron. In this study, we have been able to show that Lf crosses the BBB as both the iron-saturated and native forms. Under physiological conditions, Lf functions as a major specialized iron scavenger and acts as an antioxidant (61) rather than an iron donor. Sequestration of free iron by Lf may inhibit the iron-catalyzed formation of hydroxyl radicals, and the presence of Lf at sites where oxidative stress occurs may limit cell damage. Nevertheless, iron-saturated Lf may act as a prooxidant agent and contribute to cell injury (62). The precise role of Lf in the brain is not yet known, but we can hypothesize that in response to oxidative stress in brain tissue, Lf could have a beneficial effect in neurodegenerative disorders by capturing the iron in higher concentrations in some specific brain regions and act in this way as a natural scavenger of reactive oxidative species. Alternatively, its *in situ* synthesis at abnormal levels, its release from necrosing neurons, or its possible increased uptake and transcytosis by BBB ECs during the inflammatory process may exacerbate and amplify the lesions, leading to a cytotoxic effect resulting in an increase in neuronal death. Our current approach toward testing these conflicting hypotheses is to investigate Lf intracellular traffic in BBCECs in the presence of inflammatory mediators.

Acknowledgments—We are indebted to Prof. Manfred Hüttinger from the University of Vienna (Institute of Medical Chemistry, Währingerstrasse 10, A-1090 Vienna, Austria) who provided us with the recombinant RAP. We are grateful to Dr. R. J. Pierce for reviewing the manuscript.

REFERENCES

- Montreuil, J., Tonnelat, J., and Mullet, S. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 413–421
- Spik, G., Legrand, D., Leveugle, B., Mazurier, J., Mikogami, T., Montreuil, J., Pierce, A., and Rochard, E. (1993) in *New Perspectives in Infant Nutrition* (Renner, B., and Sawatzki, G., eds) pp. 77–83, Thieme Medical Publishers, New York
- Nuijens, J. H., van Berkel, P. H. C., and Schanbacher, F. L. (1996) *J. Mamm. Gland Biol. Neoplas.* **1**, 285–295
- Legrand, D., van Berkel, P. H. C., Salmon, V., van Veen, H. A., Slomianny, M. C., Nuijens, J. H., and Spik, G. (1997) *Biochem. J.* **327**, 841–846
- van Berkel, P. H. C., Geerts, M. E. J., van Veen, H. A., Mericskay, M., de Boer, H. A., and Nuijens, J. H. (1997) *Biochem. J.* **328**, 145–151
- Mazurier, J., Legrand, D., Hu, W. L., Montreuil, J., and Spik, G. (1989) *Eur. J. Biochem.* **179**, 481–487
- Leveugle, B., Mazurier, J., Legrand, D., Mazurier, C., Montreuil, J., and Spik, G. (1993) *Eur. J. Biochem.* **213**, 1205–1211
- Nillesse, N., Pierce, A., Lecocq, M., Benaïssa, M., and Spik, G. (1994) *Biol. Cell* **82**, 149–159
- Faucheux, B., Nillesse, N., Damier, P., Spik, G., Mouatt-Prigent, A., Pierce, A., Leveugle, B., Kubis, N., Hauw, J.-J., Agid, Y., and Hirsch, E. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 9603–9607
- Bi, B. Y., Lui, J. L., Legrand, D., Roche, A. C., Capron, M., Spik, G., and Mazurier, J. (1996) *Eur. J. Cell Biol.* **69**, 288–296
- Hüttinger, M., Retzer, H., Hermann, M., and Goldenberg, H. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 18551–18557
- Ziere, G. J., Bijsterbosch, M. K., and van Berkel, T. J. C. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 27069–27075
- Meilinger, M., Haumer, M., Szakmary, K. A., Steinböck, F., Scheiber, B., Goldenberg, H., and Hüttinger, M. (1995) *FEBS Lett.* **360**, 70–74
- Willow, T. E., Goldstein, J. L., Orth, K., Brown, M. S., and Hertz, J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 26172–26180
- Herz, J., Goldstein, J. L., Strickland, D. K., Ho, Y. K., and Brown, M. S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 21232–21238
- Mikogami, T., Heyman, M., Spik, G., and Desjeux, J. F. (1994) *Am. J. Physiol.* **267**, 308–315
- Mikogami, T., Marianne, T., and Spik, G. (1995) *Biochem. J.* **308**, 391–397
- Masson, P. L. (1970) in *La Lactoferrine* (Masson, P. L. ed) pp. 93–165, Arscia, Bruxelles
- Masson, P. L., Heremans, J. F., and Schöenne, E. (1969) *J. Exp. Med.* **130**, 643–658
- Terent, A., Hällgren, R., Venge, P., and Bergstöm, K. (1981) *Stroke* **12**, 40–46
- Hällgren, R., Terent, A., and Venge, P. (1982) *Inflammation* **6**, 291–304
- Leveugle, B., Spik, G., Perl, D. P., Bouras, C., Fillit, H. M., and Hof, P. R. (1994) *Brain Res.* **650**, 20–31
- Osmand, A. P., and Switzer, R. C., III (1991) in *Alzheimer's Disease: Basic Mechanisms, Diagnosis and Therapeutic Strategies* (Iqbal, K., McLachlan, D. R. C., Winblad, B., and Wisniewski, H. M., eds) pp. 219–228, John Wiley and Sons, New York
- Kawamata, T., Tooyama, I., Yamada, T., Walker, D. G., and McGeer, P. L. (1993) *Am. J. Pathol.* **142**, 1574–1585
- Leveugle, B., Faucheux, B. A., Bouras, C., Nillesse, N., Spik, G., Hirsch, E. C., Agid, Y., and Hof, P. R. (1996) *Acta Neuropathol.* **91**, 566–572
- Siebert, P. D., and Huang, B. C. B. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 2198–2203
- Fillebeen, C., Dexter, D., Mitchell, V., Benaïssa, M., Beauvillain, J. C., Spik, G., and Pierce, A. (1998) in *Advances in Lactoferrin Research* (Spik, G., Legrand, D., Mazurier, J., Perraudin, J. P., and Pierce, A., eds) pp. 296–300, Plenum Press, New York
- Descamps, L., Dehouck, M. P., Torpier, G., and Cecchelli, R. (1996) *Am. J. Physiol.* **270**, 1149–1158
- King, G. L., and Johnson, S. (1985) *Science* **227**, 1583–1586
- Schnitzer, J. E., and Oh, P. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 6072–6082
- Dehouck, B., Fenart, L., Dehouck, M. P., Pierce, A., Torpier, G., and Cecchelli, R. (1997) *J. Cell Biol.* **138**, 877–889
- Méresse, S., Dehouck, M. P., Delorme, P., Bensaid, M., Tauber, J. P., Delbart, C., Fruchart, J. C., and Cecchelli, R. (1989) *J. Neurochem.* **53**, 1363–1371
- Dehouck, M. P., Méresse, S., Delorme, P., Torpier, G., Fruchart, J. C., and Cecchelli, R. (1990) *Circ. Metab. Cerveau* **7**, 151–162
- Booher, J., and Sensenbrenner, M. (1972) *Neurobiology* **2**, 97–105
- Borstein, M. B. (1958) *Lab. Invest.* **7**, 134–139
- Chéron, A., Mazurier, J., and Fournet, B. (1977) *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **284**, 535–538
- Goavec, M., Mazurier, J., Montreuil, J., and Spik, G. (1985) *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **301**, 689–694
- Strickland, D. K., Ashcom, J. D., Williams, S., Battey, F., Behre, E., McTigue, K., Battey, J. F., and Argraves, W. S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 13364–13369
- Ziere, G. J., Kruijff, J. K., Bijsterbosch, M. K., and van Berkel, T. J. C. (1996) *Biochem. J.* **313**, 289–295
- Dehouck, B., Dehouck, M.-P., Fruchart, J.-C., and Cecchelli, R. (1994) *J. Cell Biol.* **126**, 465–473
- Descamps, L., Cecchelli, R., and Torpier, G. (1997) *J. Neuroimmunol.* **74**, 173–184
- Keller, K. M., Brauer, P. R., and Keller, J. M. (1989) *Biochemistry* **28**, 8100–8107
- Severs, N. J., and Simons, H. L. (1986) *Lab. Invest.* **55**, 295–307
- Gliemann, J., Nykjaer, A., Petersen, M. I., Joergensen, K. E., Nielsen, M., Andreasen, P. A., Christensen, E. I., Lookena, A., Olivcrona, G., and Moestrup, S. K. (1994) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **737**, 20–38
- Strickland, D. K., Kounnas, M. Z., Williams, S. E., and Argraves, W. S. (1994) *Fibrinolysis* **8**, 204–215
- Bu, G., Geuze, H. J., Strous, G. J., and Schwartz, A. L. (1995) *EMBO J.* **14**, 2269–2280
- Willnow, T. E., Rohlmann, A., Horton, J., Otani, H., Braun, J. R., Hammer, R. E., and Herz, J. (1996) *EMBO J.* **15**, 2632–2639
- Grobmyer, S. R., Kuo, A., Orishimo, M., Okada, S. S., Cines, D. B., and Barnathan, E. S. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 13291–13300
- Warshawsky, I., and Schwartz, A. L. (1996) *Eur. J. Cell Biol.* **69**, 156–165
- Bu, G., Maksymovitch, E. A., Nerbonne, J. M., and Schwartz, A. L. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 18521–18528
- Tooyama, I., Kawamata, T., Akiyama, H., Kimura, H., Moestrup, S. K., Gliemann, J., Matsuo, A., and McGeer, P. L. (1995) *Brain Res.* **691**, 235–238
- Rebeck, G. W., Harr, S. D., Strickland, D. K., and Hyman, B. T. (1995) *Ann. Neurol.* **37**, 211–217
- Schnitzer, J. A., Oh, P., Pinney, E., and Allard, J. (1994) *J. Cell Biol.* **127**, 1217–1232
- Lamaze, C., and Schmid, S. L. (1995) *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 573–580
- Milici, A. J., Watrous, N. E., Stukenbrok, H., and Palade, G. E. (1987) *J. Cell Biol.* **105**, 2303–2612
- Jenner, P. (1996) *Neurology* **47**, 161–170
- Sofic, E., Riederer, P., Heinsen, H., Beckmann, H., Reynolds, G. P., Hebenstreit, G., and Youdim, M. B. H. (1988) *J. Neural Transm.* **74**, 199–205
- Connor, J. R., Menzies, S. L., St. Martin, S. M., and Mufson, E. J. (1992) *J. Neurosci. Res.* **31**, 75–83
- Faucheux, B. A., Hirsch, E. C., Villares, J., Selimi, F., Mouatt-Prigent, A., Javoy-Agid, F., Hauw, J. J., and Agid, Y. (1993) *J. Neurochem.* **60**, 2338–2341
- Connor, J. R., and Benkovic, S. A. (1992) *Ann. Neurol.* **32**, 51–61
- Britigan, B. E., Hassett, D. J., Rosen, G. M., Hamill, D. R., and Cohen, M. S. (1989) *Biochem. J.* **264**, 447–455
- Ambruso, D. R., and Johnston, R. B. (1981) *J. Clin. Invest.* **67**, 352–360

Conclusion

L'utilisation du modèle *in vitro* de BHE nous a permis de mettre en évidence le transport spécifique unidirectionnel de la lactoferrine au travers de l'endothélium des capillaires cérébraux du sang vers le parenchyme cérébral.

Les cellules endothéliales, différenciées ou non différenciées, expriment des sites de fixation spécifiques de la lactoferrine. Cependant, seules les cellules endothéliales différenciées, qui ont été cultivées en coculture en présence d'astrocytes, sont capables d'exprimer des sites de fixation de haute affinité pour la lactoferrine (figure 1, article 1). Les expériences de fixation ont montré qu'il existe deux types de sites de fixation de la lactoferrine à la surface des cellules endothéliales différenciées, sites de haute affinité et de faible affinité (tableau 1, article 1). Les sites de fixation de faible affinité, apparentés à ceux présents sur les cellules endothéliales non différenciées, sont largement distribués sur les cellules indiquant qu'ils pourraient être de nature protéoglycannique. Les sites de fixation de haute affinité semblent quant à eux apparaître au cours de la différenciation des cellules.

La fixation de la lactoferrine à la face luminale des cellules endothéliales est suivie de son endocytose à l'intérieur des cellules. Cette entrée de la lactoferrine dans les cellules est réalisée par l'intermédiaire d'un mécanisme actif complètement inhibé à 4°C (figure 2, article 1). L'internalisation de la lactoferrine par les cellules endothéliales aboutit à son transport de la face luminale à la face abluminale des cellules (figures 3 et 4, article 1). Ce transport unidirectionnel ne résulte pas d'une simple diffusion paracellulaire, mais témoigne bien d'un transport transendothélial spécifique (figure 5, article 1). La protéine RAP, qui est un puissant compétiteur de tous les ligands du LRP, dont fait partie la lactoferrine, réduit fortement le transport de la lactoferrine (figure 6, article 1), suggérant que le LRP serait impliqué dans le trafic intracellulaire de la lactoferrine dans les cellules endothéliales.

Après son transport, aucune dégradation de la lactoferrine n'est observée (figure 7, article 1), indiquant que la lactoferrine emprunte une voie n'impliquant pas les compartiments lysosomiaux au cours de son passage au travers des cellules endothéliales. Les cavéoles, structures semblant être associées avec le transport de protéines qui ne

suivent pas les voies de dégradation, pourraient donc intervenir dans le passage de la lactoferrine.

Le fer de la lactoferrine est également transporté au niveau des cellules endothéliales (figure 8, article 1). Ce métal reste associé à la lactoferrine au cours du mécanisme de transport (tableau 2, article 1).

Le transport de la lactoferrine au travers des cellules de l'endothélium vasculaire cérébral explique la présence de cette protéine dans le SNC et tout particulièrement au niveau des capillaires cérébraux (figure 14).

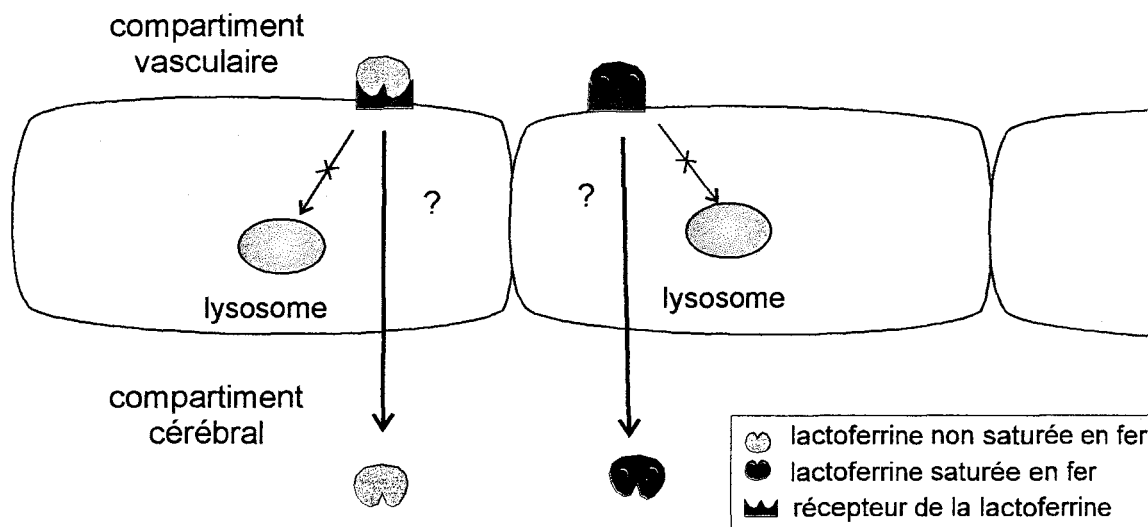


Figure 14 : Transport de la lactoferrine au niveau des cellules endothéliales de capillaires cérébraux.

Cependant, en conditions physiologiques la concentration de lactoferrine circulante est relativement peu élevée, ce qui limite son transport à travers la BHE et qui se traduit par le faible taux de lactoferrine présente dans le SNC de patients sains (Leveugle *et al.*, 1994).

En revanche, la lactoferrine s'accumule dans le SNC au cours de différentes maladies neurodégénératives, il reste donc à identifier les phénomènes qui aboutissent à cette accumulation. Ces pathologies sont caractérisées par des modifications de la BHE localisées au niveau des lésions caractéristiques du processus neurodégénératif. Ces variations aboutissent probablement à l'infiltration de cellules immunocompétentes dans le parenchyme cérébral et à des changements du transport de molécules plasmatiques, telles que la lactoferrine, vers le SNC. Les modifications des propriétés de l'endothélium vasculaire cérébral semblent être une conséquence de l'activation des cellules endothéliales lors du processus inflammatoire engendré au niveau des lésions. Ce mécanisme pourrait expliquer l'augmentation de la quantité de lactoferrine observée dans le SNC, tout particulièrement au niveau des lésions neuropathologiques.

ARTICLE 2 :

LE TNF- α AUGMENTE LE TRANSPORT DE LA LACTOFERRINE A TRAVERS LA BARRIERE HEMATO- ENCEPHALIQUE

Introduction

Les propriétés de barrière de l'endothélium cérébral sont modifiées au cours de pathologies dégénératives du SNC. Des études réalisées *in vivo* et *in vitro* ont montré que les cytokines pro-inflammatoires et notamment le TNF- α semblent être impliquées dans ces phénomènes. Le TNF- α est apporté par la circulation, mais également au niveau du compartiment cérébral par synthèse locale. Plusieurs études ont caractérisé l'effet d'une activation luminale des cellules endothéliales par le TNF- α sur la perméabilité du modèle *in vitro* de BHE (Deli *et al.*, 1995 ; Descamps *et al.*, 1997). Ces études n'ont pas montré de variations significatives de la perméabilité paracellulaire de la BHE pour une activation de 4 heures des cellules endothéliales par 250 U/ml de TNF- α ; en revanche, l'activation des cellules endothéliales a été mise en évidence par l'apparition de fibres de stress.

L'utilisation de ce modèle activé par le TNF- α (figure 15, page 109) nous a permis d'étudier le transport de la lactoferrine à travers la BHE en conditions inflammatoires. Dans un premier temps, nous avons vérifié l'effet d'une exposition luminale ou abluminale au TNF- α sur le modèle de la BHE. Ainsi, l'expression de différentes molécules d'adhésion par les cellules endothéliales a été caractérisée, ainsi que celle de plusieurs cytokines par la population astrocytaire. La première étape de cette étude a concerné la vérification des propriétés de barrière du modèle après activation par le TNF- α , en mesurant les paramètres de la perméabilité paracellulaire de ces cellules. Nous avons ensuite étudié le transport, la fixation et l'endocytose de la lactoferrine au niveau des cellules endothéliales après activation par le TNF- α .

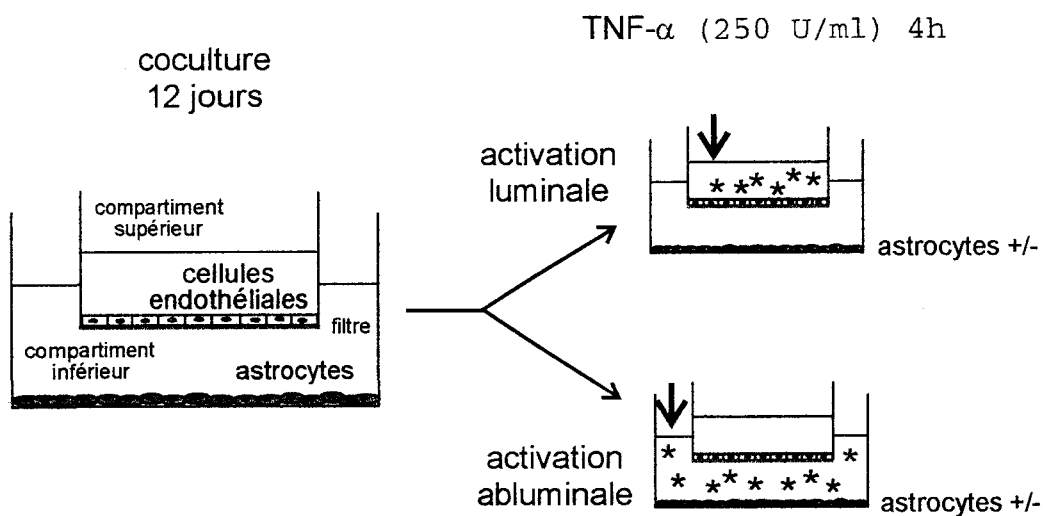


Figure 15 : Activation du modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique par la cytokine pro-inflammatoire TNF- α .

Ce travail a fait l'objet de l'article suivant : « **TNF- α increases lactoferrin transcytosis through the blood-brain barrier** », soumis à publication dans *The Journal of Neurochemistry*.

TNF- α Increases Lactoferrin Transcytosis through the Blood-Brain Barrier

*Carine Fillebeen, ‡Marie-Pierre Dehouck, *Isabelle Duthille, *Monique Benaissa,
‡||Roméo Cecchelli and *Annick Pierce

**Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille,
Unité Mixte de Recherche 8576, CNRS, Villeneuve d'Ascq, France; ‡Service d'Etude et de
Recherche sur les Lipoprotéines et l'Athérosclérose, INSERM, Unité 325, Institut Pasteur,
Lille, France and || E. A. 2465, Université d'Artois, Faculté Jean Perrin, Lens, France*

Address correspondence and reprint requests to Dr. A. Pierce at Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Tel.: 33-3-20-33-72-38; Fax: 33-3-20-43-65-55; Email: annick.pierce@univ-lille1.fr.

Abbreviations used: Lf, lactoferrin; Tf, transferrin; PD, Parkinson's disease; AD, Alzheimer's disease; TNF- α , tumor necrosis factor α ; IL, interleukin; IFN- γ , interferon- γ ; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphodehydrogenase; LRP, low density lipoprotein receptor-related protein; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; BBB, blood-brain barrier; EC, endothelial cell; BBCEC, bovine brain capillary endothelial cell.

ABSTRACT

Lactoferrin (Lf) is an iron-binding protein involved in host defence against infection and severe inflammation, which accumulates in the brain during neurodegenerative disorders. Prior to determining Lf function in pathological brain tissues, we investigated its transport through the blood-brain barrier (BBB) in inflammatory conditions. For this purpose, we used a reconstructed BBB model consisting of the coculture of bovine brain capillary endothelial cells (BBCEC) and astrocytes in the presence of TNF- α . Since TNF- α can be either synthesized by brain glial cells or present in circulating blood, BBCECs were exposed to this cytokine at their luminal or abluminal side. We have been able to demonstrate that in the presence of TNF- α , whatever the type of exposure, BBCECs were activated and Lf transport through the activated BBCECs was markedly increased. Lf was recovered intact at the abluminal side of the cells suggesting that increased Lf accumulation may occur in immune-mediated pathophysiology. This process was transient since 20 hours later, cells were in a resting state and Lf transendothelial traffic back to normal. The enhancement of Lf transcytosis seems not to involve the up-regulation of the Lf receptor but rather an augmentation of the kinetics of transendothelial transport.

Running title : TNF- α increased Lf traffic through BBB

Keywords : Lactoferrin, blood-brain barrier, TNF- α , inflammation, neurodegenerative disorders, transendothelial transport.

INTRODUCTION

Inflammatory processes play a key role in the pathogenesis of the degenerative changes and impairments associated with disorders such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD) and multiple sclerosis. This is particularly well documented for AD in which a subtle and chronic inflammatory reaction manifests itself as glial activation, deposition of components of the complement cascade and other indicators of an inflammatory response such as acute-phase proteins (McGeer and McGeer, 1995 ; Hull et al., 1996). Several lines of evidence indicated that this immune-mediated pathophysiology might contribute to neuronal loss (McGeer and McGeer, 1998).

The chronic activation of glia is mainly accompanied by a chronic elaboration of neuroactive cytokines responsible for cellular and molecular events leading to neuropathologies. The role of these compounds has been highlighted recently by epidemiological studies establishing that the use of anti-inflammatory agents is an important ameliorating factor in AD (Griffin et al., 1998). Among the proinflammatory cytokines involved, TNF- α produced mainly by macrophages but also by microglial cells and astrocytes, appears to play a critical role in AD (Fillit et al., 1991), PD (Mogi et al., 1994) and multiple sclerosis (Sharief and Thompson, 1992). In such diseases, TNF- α is found in the brain and/or in the CSF of patients in significantly higher concentrations than in controls, suggesting that this cytokine is involved in the development of the inflammatory reactions observed during the course of these pathologies.

Associated with the inflammatory events, alterations in blood-brain barrier (BBB) functions such as permeability perturbations and damage to cerebral endothelial cells occurred in the development of neurodegenerative disorders. BBB breakdown was described in multiple sclerosis (Kermode et al., 1990) and in various degenerative or vascular dementia (Mecocci et al., 1991). It was also observed in AD where an abnormal appearance of the microvasculature, excess basement membrane deposition and endothelial loss were reported (Kalaria and Hedera, 1995). In addition, proinflammatory cytokines seemed to be involved and TNF- α , which is a powerful activator of ECs (Pober, 1998), was implicated in the perturbations of BBB permeability (Deli et al., 1995). Moreover, a delayed effect of TNF- α on bovine brain capillary endothelial cells (BBCEC) led to a

significant dysregulation of the receptor-mediated endocytosis of low density lipoproteins (LDL) and transferrin (Tf) (Descamps et al., 1997).

Recently, the iron-binding glycoprotein lactoferrin (Lf) belonging to the Tf family has been implicated in neurodegenerative disorders. Practically absent from the normal human cerebral cortex (Leveugle et al., 1994), Lf was found in the mesencephalon mainly concentrated in the dopaminergic neurons (Leveugle et al., 1996). Changes in Lf distribution and concentration were observed in brains associated with aging and, more importantly, in the cerebral cortex adversely affected with AD, amyotrophic lateral sclerosis, Down's syndrome or Pick's disease (Osmand and Switzer, 1991; Kawamata et al., 1993; Leveugle et al., 1994). Lf was mainly observed on the cerebral microvessels and in the vicinity of inflammatory foci. In the case of PD (Leveugle et al., 1996; Faucheux et al., 1995) the surviving dopaminergic neurons accumulated higher concentrations of Lf.

Lf is produced by exocrine glands (Montreuil et al., 1960; Masson, 1970) and stored in neutrophilic leukocytes (Masson et al., 1969) from which it is released during the inflammatory process leading to an increased concentration of plasma Lf (Olofsson et al., 1977). Lf within the brain has a double origin. In situ synthesis of Lf occurs in human (Siebert and Huang, 1997) and mouse (Fillebeen et al., 1998) brain tissues where its expression was up-regulated after MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) treatment which was used as a model for PD (Fillebeen et al., 1998). Moreover, Lf crosses the BBB and using an in vitro model of the BBB (Mésresse et al., 1989; Dehouck et al., 1990), we demonstrated that Lf transendothelial transport was receptor-mediated and involved the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) (Fillebeen et al., 1999).

Lf participates in host defence mechanisms against infection and excessive inflammation and has been postulated to modulate the inflammatory response (reviewed in Nuijens et al., 1996; Baveye et al., 1999). It acts as a potent inflammatory mediator by its ability to bind LPS (Appelmelk et al., 1994; Ellass-Rochard et al., 1995), to prevent hydroxy-radical formation (Britigan et al., 1994) and the release of cytokines such as IL1, IL6 and TNF- α (Zagulski et al., 1989; Machnicki et al., 1993; Crouch et al., 1992; Mattsy-Baltzer et al., 1996). In order to elucidate the mechanism by which Lf may accumulate and act as an anti-inflammatory compound in the vicinity of inflammatory foci, we have studied the transport of Lf across the cerebral endothelium using the in vitro model of BBB submitted to TNF- α treatment. We have been able to demonstrate that in the presence of TNF- α , Lf transport through activated BBCECs was significantly increased

and that this process was transient. The enhanced traffic of Lf is due to a faster transport through the reconstructed BBB rather than an up-regulation of the expression of the Lf receptors. This might explain Lf accumulation in pathological brain tissues.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Isolated BBCECs, cloned in order to obtain a pure EC population uncontaminated by pericytes, were characterized and cultured as previously described (Méresse et al., 1989; Dehouck et al., 1990). Primary cultures of mixed astrocytes were prepared from newborn rat cerebral cortex and cultured as described (Dehouck et al., 1990). Three weeks after the seeding was completed, the purity of the astrocyte population was checked (Dehouck et al., 1990). Stabilized cultures containing more than 95% of astrocytes that were glial fibrillary acidic protein positive, were used for coculture. The establishment of the in vitro model of BBB is performed using a coculture of BBCECs and astrocytes. Prior to cell culture, plate inserts (Millicell-CM 0.4 μm ; 30-mm diameter; Millipore Corp.) were coated on the upper side with rat-tail collagen. They were then set in the six multiwell dishes containing the astrocytes prepared as described above, and BBCECs were plated at a concentration of 4×10^5 cells/ml on the upper side of the filters in 1.5 ml of coculture medium. This medium (BBCECs medium) was changed every other day and under these conditions, differentiated BBCECs formed a confluent monolayer 7 days later ($400,000$ cells/cm²). Experiments were performed 5 days after confluence was reached. Prior to all experiments, the integrity of the BBCEC monolayers was checked using [¹⁴C]-sucrose as tracer (Dehouck et al., 1990).

Preparation and labeling of bovine Lf

Bovine Lf was purified from bovine colostrum by ion-exchange chromatography as partially saturated bovine Lf (Chéron et al., 1977).

Fluorescent labeling of Lf on the glycan moiety was carried out by coupling 5-([2-(carbohydrazino)methyl]-thio}acetyl)amino-fluorescein (Hyf) on aldehyde groups resulting from the mild periodate oxidation of *N*-acetylneuraminic acid residues (Leveugle et al., 1993).

Iodination of Lf was performed using the Iodo-Gen reagent (Pierce). Lf (500 μg) was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with 0.2 mCi [¹²⁵I]Na (carrier-free, 100 mCi/ml, Amersham) for 15 min at 4°C. Free iodine was removed on a Sephadex G-50 column (PD-10, Pharmacia). The specific activity range was 0.35-0.5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ of

protein and to avoid radiolysis, the iodinated protein was stored at 4°C and used the same day.

Treatment of the reconstructed BBB with TNF- α

Both the time of treatment and the concentration of TNF- α had already been established by previous studies (Deli et al., 1995) showing that in these conditions TNF- α was not toxic to the reconstructed BBB since no alteration of the tight junction integrity was visible. Thus, after 12 days of coculture, BBCECs were incubated with 250 U/ml of TNF- α (Recombinant human TNF- α (2×10^7 U/mg), Sigma-Aldrich) in serum free Dulbecco modified Eagle's medium for 4 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and 95% air, exposed either at the luminal or the abluminal side of the cells. TNF- α treatment was performed on BBCECs either in the presence or absence of the astrocyte population. Delayed effects of TNF- α were studied without any re-exposure to TNF- α . For this purpose, after the 4 h TNF- α challenge in the absence of astrocytes, BBCECs were replaced in their original astrocyte-containing wells with fresh medium for 20 h.

RNA extraction and RT-PCR

Extraction of total RNA was performed using the guanidium thiocyanate/cesium chloride method (Sambrook et al., 1989). Five micrograms of each total RNA preparation were reverse transcribed into first strand cDNA using oligo dT primers (Stratagene) and 20 units of reverse transcriptase (Stratagene), then one twentieth of the mixture was amplified by PCR using primer pairs designed for the specific detection of bovine ICAM-1 (Lee et al., 1996, genbank U65789), bovine E-selectin (Nguyen et al., 1993) and human GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphodehydrogenase) (Tokunaga et al., 1987) DNA target sequences (Table 1). Human GAPDH was used since its nucleotide sequence is highly conserved between species. Primer pairs (Eurogentec) were carefully selected through computer analysis using Primer Premier Version 3.1 software (Biosoft International). First strand cDNA sequences were amplified by PCR using the Tfl Polymerase (Promega) in a PTC-100TM thermal cycler (MJ Research) programmed for the following steps : an initial denaturation at 94°C for 5 min, multiple cycles consisting of denaturation at 94°C for 5 min, annealing at the optimal temperature for 1 min and a primer extension step at 74°C for 1 min, which were followed by final extension step at 74°C for 5 min. Experimental conditions are described for each primer pair in Table 1. PCR assays were performed in

TABLE 1. *Primer pairs used in the RT-PCR reactions and experimental conditions*

cDNA targets	Primer sequences	PCR product in bp	Annealing temperature in °C	Number of RT-PCR cycles
bovine ICAM-1	[S] 5'-GCTCGGAACAGACCCTGAAG-3' [AS] 5'-TCCAGGGAAGGTGGGTGTAG-3'	486	70	26
bovine E-selectin	[S] 5'-CTTTGCCTTCAAGTCATCCT-3' [AS] 5'-CTTGTGCTCCTGATTCCTTT-3'	520	60	30
human GAPDH	[A] 5'-GGTGGACCTGACCTGCCGTCTA-3' [AS] 5'-GAGGTCCACCACCCTGTTGCTG-3'	255	55	20

S = sense primer; AS = anti-sense primer

triplicate. Ten microliters of each PCR reaction were loaded on a 1.5% agarose gel stained with 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide, photographed and analysed by computerised densitometric scanning of the image using a Hewlett-Packard ScanJet 4c Scanner, the Deskan II software and the Quantiscan program (Biosoft International, Polo Alto, USA). Amplification products were subcloned in TA-cloning vector (Invitrogen BV, Leek, The Netherlands) and sequenced to confirm the specificity of the PCR products.

Multi-probe RNase protection assay

The ribonuclease protection assay (RPA) was performed using the RiboQuant kit (PharMingen) and the rCK-1 template set. This set allowed the synthesis of radiolabeled anti-sense RNA probes targeting rat mRNAs encoding IL1- α , IL1- β , IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10, IFN- γ , TNF- α , TNF- β as well as two rat house-keeping gene products : L32 and GAPDH. The latter products were included to permit assessments of total RNA levels to normalize sampling. Probes were synthesized using 10 μl of [α - ^{32}P]-UTP (3000 Ci/mmol, Amersham Life Science, UK) and 20 units of T7 RNA polymerase. After purification, 8×10^5 cpm of the generated probe were hybridized to 2.5 μg of total RNA. RNase treatments were then performed before Proteinase K digestion. After purification, the remaining RNA-protected samples were resolved on a 5% polyacrylamide gel according to their size and imaged by autoradiography. The identity of each mRNA species was established by comparison with the undigested probe used as a migration marker. Quantification was done after analysis of the autoradiographic bands by computerised densitometric scanning as described above.

Effect of TNF- α on BBCEC paracellular permeability

Permeability studies of the BBCEC monolayers were performed using labeled compounds [^{14}C]-sucrose (MW 342 Da) and [^3H]-inulin (MW 5 kDa) : 0.1 μCi and 0.625 μCi /per filter, respectively (Dehouck et al., 1990). In each experiment, permeability studies on collagen-coated inserts were performed. The endothelial permeability coefficient (P_e , in cm/min) was calculated as previously described (Dehouck et al., 1990) and the statistical analyses were performed using the Mann-Whitney non parametric test. Osmotic shock experiments were performed in the presence of 1.4 M mannitol added with the tracers to the upper compartment of the filters covered by the cells (Descamps et al., 1997).

Transcytosis, binding and endocytosis experiments

All these studies were performed only with BBCECs to avoid any interference from astrocytes. Since Tf has been described as an effective blocking component able to prevent high levels of nonspecific Lf binding (Goavec et al., 1985), all buffers contained 0.2% bovine Tf (Sigma-Aldrich). Each point was done in triplicate and the data are represented as means \pm SEM. Nonspecific controls were carried out with a 100-fold excess of unlabeled protein.

Transcytosis experiments were performed as previously reported (Fillebeen et al., 1999). BBCECs were incubated in Ringer-HEPES-Tf at 37°C in the presence of 30 $\mu\text{g/ml}$ ^{125}I -Lf at the luminal side. At various times, the insert was transferred to another well to avoid a possible reendocytosis of Lf by the abluminal side of the BBCECs. At the end of each experiment, intact Lf was assessed using trichloroacetic acid precipitation of lower media, whereas protein degradation was assessed with AgNO_3 precipitation. Results were expressed as ^{125}I -Lf equivalent flux (ng/cm^2), which represents trichloroacetic acid-precipitable radioactivity recovered in the lower compartments.

Binding experiments were performed as previously described (Fillebeen et al., 1999). Briefly, BBCECs were incubated in Ringer-HEPES-Tf for two hours at 4°C in the presence of 1 $\mu\text{g/ml}$ ^{125}I -Lf at the luminal compartment. The cells were washed carefully, and cell-associated radioactivity was determined by removing the membrane of the culture insert and counting it in a gamma counter.

Determination of the luminal uptake of Hyf-Lf was performed before cell fixation with 4% paraformaldehyde. The luminal compartment of the differentiated BBCECs was exposed to Hyf-bLf (50 $\mu\text{g/ml}$; 625 nM) in Ringer-HEPES-Tf and left in contact with the cells for 45 min at 37 or 4°C. Fluorescence microscopy experiments were carried out as already described (Descamps et al., 1996).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Student's *t*-test as appropriate.

RESULTS

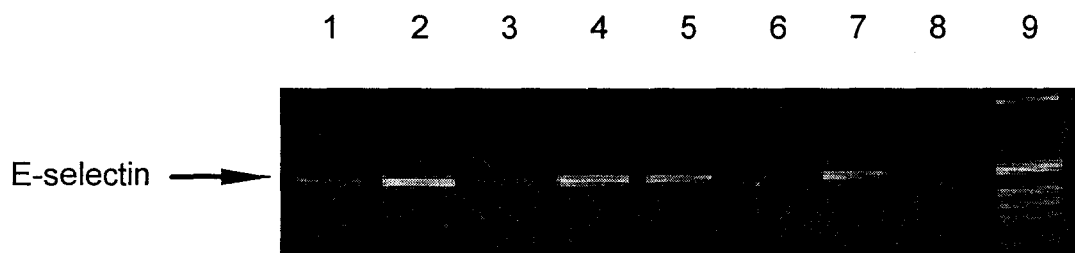
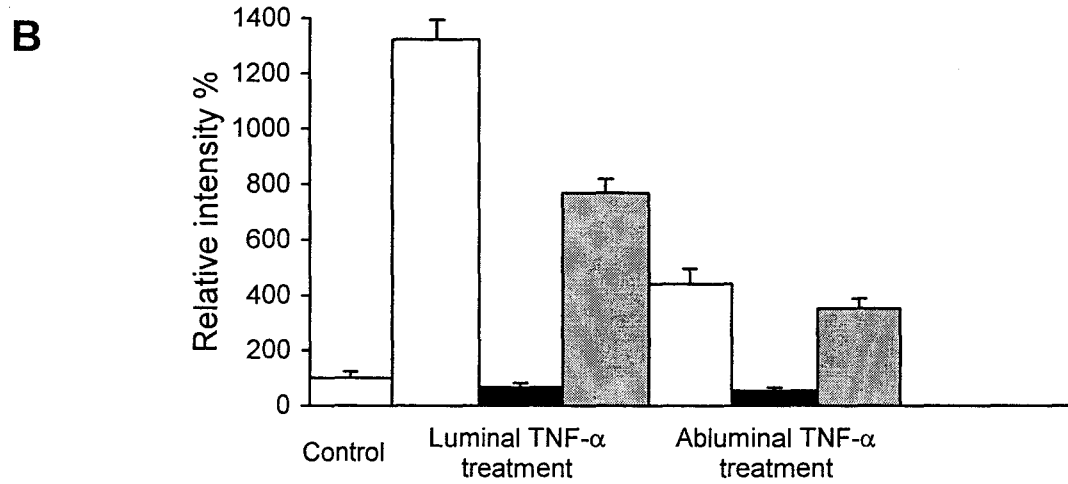
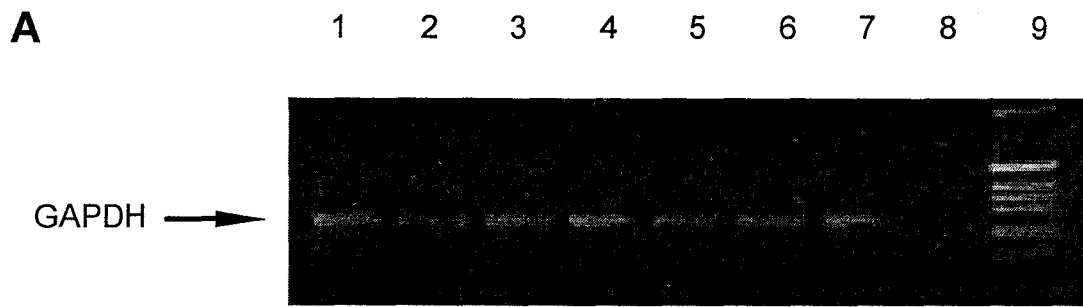
Activation of the reconstructed BBB by TNF- α

Expression of adhesion molecules by BBCECs- TNF- α is known to be a powerful activator of the endothelium. In order to determine whether BBCECs were activated after TNF- α treatment, the level of the expression of a selectin and an adhesin were followed by RT-PCR. Bovine E-selectin and ICAM-1 were used as markers for EC activation. The constitutively expressed house-keeping gene GAPDH was used as an internal control. Similar GAPDH signals in all experiments indicate the use of identical amounts of cDNA in each RT-PCR reaction (Fig. 1, A). The BBCECs constitutively expressed a baseline level of E-selectin (Fig. 1, B) and ICAM-1 (Fig. 1, C) transcripts. Expression of the E-selectin transcripts was detected after 30 cycles of RT-PCR amplification, whereas ICAM-1 transcripts needed only 26 cycles of RT-PCR amplification to be observed. The expressions of E-selectin and ICAM-1 by BBCECs were both markedly increased after the luminal TNF- α treatment and rise to about 13 and 12 fold, respectively over the baseline level of expression. Enhanced expressions of E-selectin and ICAM-1 transcripts were also detected in BBCECs after abluminal TNF- α treatment. These expressions increased about 5 fold compared to those obtained with the untreated cells. Activation of BBCECs occurs whatever the type of TNF- α presentation suggesting that it may occur with TNF- α released either by brain or blood cells.

Twenty hours after TNF- α treatment, the increased expression of E-selectin and ICAM-1 transcripts were followed by a return almost to the baseline level, showing that the effect of TNF- α on the expression of these messengers was transient.

A modulation of the expression of ICAM-1 and E-selectin transcripts occurs in the presence of astrocytes. A decrease in the synthesis of E-selectin (40%) and ICAM-1 (30%) mRNAs was observed when cells were exposed to a luminal presentation of TNF- α (Fig.1, B,C). Presentation of TNF- α at the abluminal side of BBCECs also led to a decrease of about 25% in the expression of both E-selectin and ICAM-1 mRNAs. In the presence of the astrocyte population, BBCEC activation is inhibited.

Expression of cytokines by the astrocytes- In order to determine whether TNF- α also stimulated the astrocytes we checked their ability to produce cytokines. After a TNF- α treatment of the coculture of BBCECs and astrocytes either at the luminal or abluminal



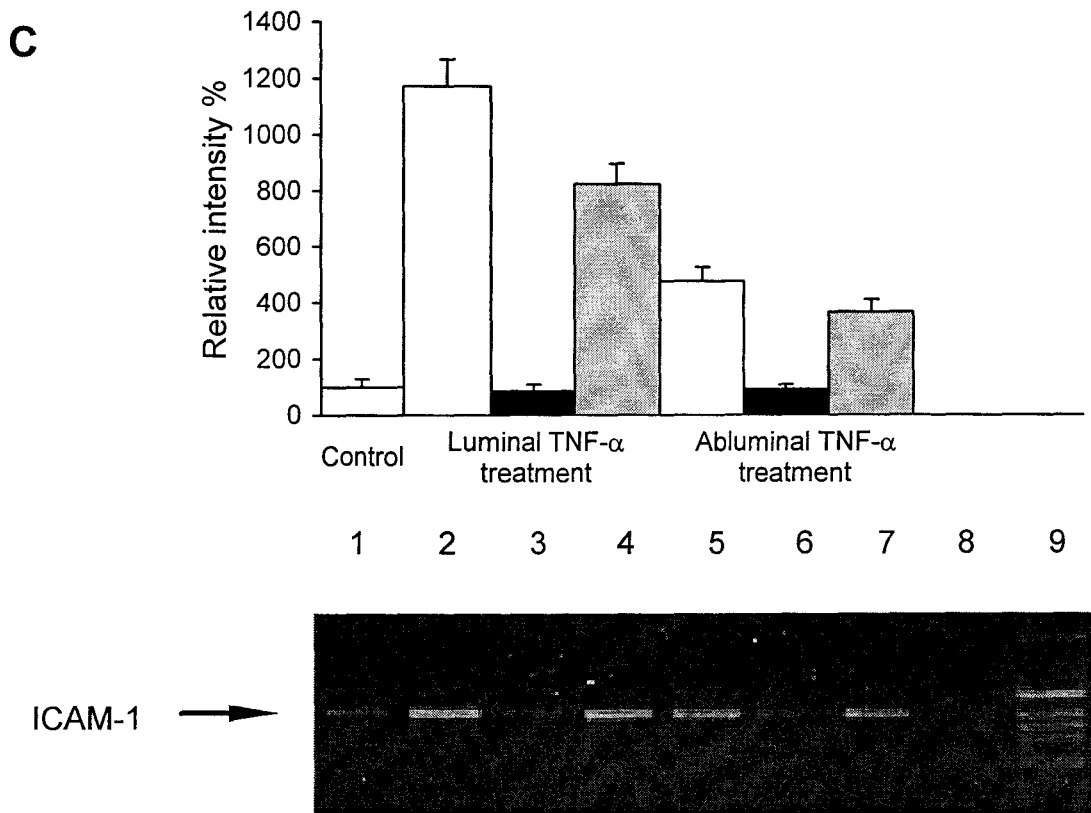


FIG. 1. Effect of TNF- α on the expression of adhesion molecules by BBCECs. BBCECs were exposed for 4 h at the luminal or abluminal side to 250 U/ml of TNF- α in the absence of astrocytes. Total RNA extractions were performed immediately (white columns) or 20 h (black columns) after the TNF- α treatment. BBCECs were also exposed to 4 h TNF- α treatment in the presence of astrocytes (hatched columns) and total RNA extraction performed. Shown at the arrowheads are bands of the expected sizes of RT-PCR products of human GAPDH (A) which was used as an internal control, bovine E-selectin (B) and bovine ICAM-1 (C) and. Lane 1 : product of control BBCEC cDNA; Lanes 2-4 : products of luminal TNF- α -treated BBCEC cDNA; Lanes 5-7 products of abluminal TNF- α -treated BBCEC cDNA; Lanes 2,5 : products of TNF- α -treated BBCEC cDNA in the absence of astrocytes; Lanes 3,6 : products of TNF- α -treated BBCEC cDNA after 20 h; Lanes 4,7 : products of TNF- α -treated BBCEC cDNA in the presence of astrocytes; Lane 8 : control reaction without cDNA template; Lane 9 : Molecular weight marker. Each amplified RT-PCR product was integrated by Quantiscan software and expressed as relative intensity of control cases. Each column is the mean of three measures \pm SEM (bars).

side of the BBCECs, astrocyte messengers were extracted and a multi-probe RNase protection assay performed. Expression of the rat house-keeping gene L32 was monitored in each sample. Protected mRNA for cytokines were expressed as relative intensity of protected mRNA with the L32 mRNA level arbitrarily defined as 100 %.

Astrocytes did not synthesize cytokines in the absence of activation. TNF- α activation led to the expression of four cytokine transcripts: IL1- α , IL1- β , IL6 and TNF- α . IL1- β and TNF- α were the most abundant transcripts produced whereas the induction of IL1- α and IL6 mRNAs was minimal (Table 2). Variations in the expression of these cytokines were observed depending on TNF- α presentation to the reconstructed BBB. The cytokine mRNAs were expressed at lower levels in the case of a luminal exposition to TNF- α except for the TNF- α mRNAs which were up-regulated, suggesting that a paracrine regulation of TNF- α synthesis might take place. The stimulation of the astrocytes was transient since no up-regulation was observed after 20 h.

Effect of TNF- α on BBCEC paracellular permeability

TNF- α may or may not disrupt the BBB, depending on the dose, the vehicle and the route of administration. In order to verify the integrity of the BBCEC monolayers as a functional barrier in the presence of TNF- α , their permeability was tested with sucrose and inulin as tracers. Previous work has shown that the luminal treatment of BBCECs with 250 U/ml of TNF- α up to 4 h produced no significant changes in BBB permeability (Deli et al., 1995; Descamps et al., 1997).

Disruption of the BBB occurred after an osmotic shock in presence of 1.4 M of mannitol and BBCEC permeability increased 14 fold and 10 fold for sucrose and inulin, respectively compared to control cells (Table 3). Data contained in Table 3 confirmed that TNF- α treatment of BBCECs caused no significant changes in the permeability to low molecular weight molecules in either the case of luminal or abluminal exposure. Moreover, variations in this permeability were not observed 20 h after the treatment (Table 3).

Effect of TNF- α treatment on Lf transendothelial traffic

In order to determine whether Lf transport across the BBCEC monolayers was modified after TNF- α treatment, transcytosis, binding and endocytosis experiments were performed.

TABLE 2. *Synthesis of cytokine transcripts by the astrocyte population exposed to TNF- α*

Cytokine mRNAs *		IL1- α	IL1- β	IL6	TNF- α
untreated		0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
4 h TNF- α treatment	luminal	2.7 \pm 0.3	17.8 \pm 2.6	1.0 \pm 0.0	6.7 \pm 0.5
	abluminal	4.1 \pm 0.3	24.5 \pm 1.7	1.8 \pm 0.0	3.8 \pm 0.2
4 h TNF- α treatment + 20 h	luminal	0.3 \pm 0.0	2.3 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
	abluminal	0.2 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0

* Protected mRNA for IL1- α , IL1- β , IL6, TNF- α were expressed as relative intensity of protected mRNA for L32 arbitrary defined as 100 %. Each value is the mean of three measures \pm SEM.

TABLE 3. *Effect of TNF- α treatment on the BBCEC permeability to sucrose and inulin*

		Pe [14 C]-sucrose (cm/min) $\times 10^{-3}$	Pe [3 H]-inulin (cm/min) $\times 10^{-3}$
Control		0.45 \pm 0.08	0.13 \pm 0.03
Control + 1.4 M mannitol		6.45 \pm 0.78	1.52 \pm 0.18
4 h TNF- α treatment	luminal	0.64 \pm 0.09	0.20 \pm 0.03
	abluminal	0.58 \pm 0.12	0.21 \pm 0.06
4 h TNF- α treatment + 20 h	luminal	0.50 \pm 0.12	0.16 \pm 0.05
	abluminal	0.48 \pm 0.09	0.17 \pm 0.04

Each value is mean of three different filters \pm SEM and are representative of at least four experiments.

Transcytosis of Lf was conducted and monitored on TNF- α activated BBCECs. Whatever the type of TNF- α exposure: at the luminal or abluminal side of the ECs, Lf transport was markedly increased compared to controls (Fig. 2). A three to four fold enhancement was observed after a 4h challenge with TNF- α . Lf transcytosis was reduced to baseline transport 20 h later. The presence of astrocytes modulated the effect of TNF- α on the BBCECs and led to a two fold reduction in the transendothelial transport of Lf compared to that observed in the absence of astrocytes. These results suggested that the passage of Lf may depend of the activation state of the BBCECs.

Trichloroacetic acid precipitation followed by AgNO₃ precipitation confirmed that no degradation of Lf occurred during its transport across the TNF- α treated cells (data not shown), as was observed for the untreated cells. The fact that Lf crosses the TNF- α treated BBCECs as an intact molecule suggested that its transendothelial pathway is similar to that already described in our previous work (Fillebeen et al., 1999).

Since two binding sites of different affinities were described for Lf on differentiated BBCECs ($K_{d1} = 37.5$ nM; $n_1 = 90,000$ sites/cell ; $K_{d2} = 2$ μ M; $n_2 = 900,000$ sites/cell), 1 μ g/ml of ¹²⁵I-labeled Lf was used to saturate the high affinity binding sites responsible for Lf transcytosis. Lf binding was found to be reversible and specific since it was inhibited by approximately 90% in the presence of 100-fold molar excess of unlabeled Lf. This experiment clearly showed that TNF- α treatment of the BBCEC monolayers caused no significant changes in the specific binding of Lf to the luminal side of the cells (Fig. 3). Both lumenally and ablumenally TNF- α treated cells exhibited the same amount of membrane-associated ¹²⁵I-Lf. These results suggested that TNF- α had no effect on Lf binding to BBCECs and indicated that the expression of the Lf receptor was not up-regulated by TNF- α .

Untreated BBCECs significantly endocytosed Hyf-Lf and Lf accumulation could be observed within the fixed cells (Fig. 4, A). The 4 h TNF- α challenge led to a significant decrease in Lf accumulation in BBCECs compared to controls in the case of luminal (Fig. 4, B) and abluminal (data not shown) exposure. Twenty hours after the exposure of the BBCECs to TNF- α , the accumulation of Lf within the cells was as high as it was for the untreated BBCECs (Fig. 4, C). When TNF- α activation of the BBCECs was performed in the presence of astrocytes, the decrease in Lf accumulation was less marked than that obtained in the absence of astrocytes (Fig. 4, D). These results suggested that TNF- α

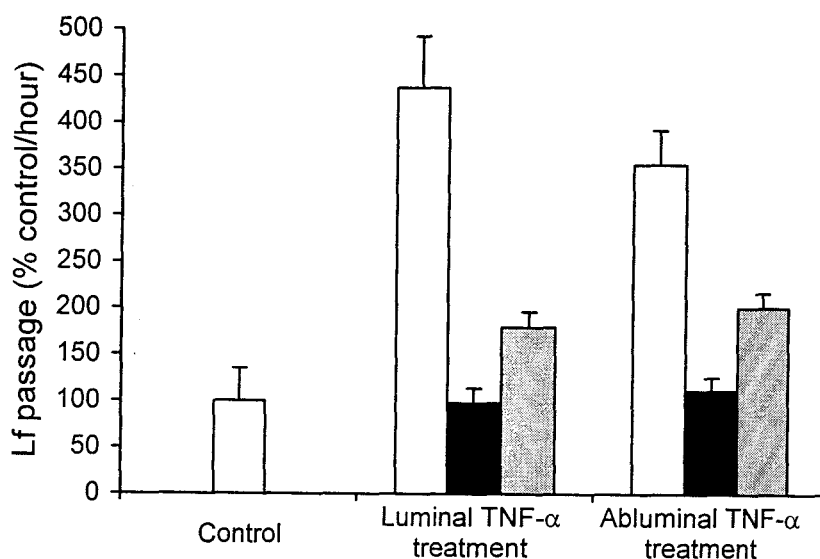


FIG. 2. Effect of TNF- α treatment on the transport of Lf across BBCECs. Lf ($30 \mu\text{g/ml}$ ^{125}I -Lf, $\pm 3 \text{ mg/ml}$ unlabeled Lf) was added to the luminal side of the cells. Transendothelial transport studies were performed immediately after the TNF- α treatment in the absence (white columns), or presence (hatched columns) of astrocytes and 20 h later (black columns). Results are expressed as percentage of the control. Each column is the mean of triplicate inserts \pm SEM (bars) and are representative of at least three different experiments.

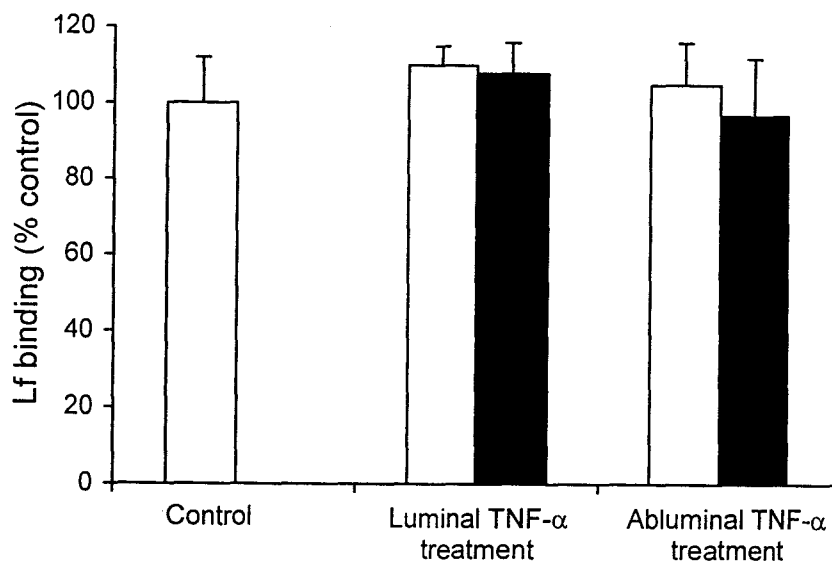


FIG. 3. Effect of TNF- α treatment on the binding of Lf to BBCECs. $1 \mu\text{g/ml}$ of ^{125}I -bLf were added to the luminal side of the cells for 2 h at 4°C , immediately (white columns) or 20 h (black columns) after the TNF- α treatment. Results are expressed as a percentage of the control. Each column is the mean of triplicate inserts \pm SEM (bars) and are representative of at least three different experiments.

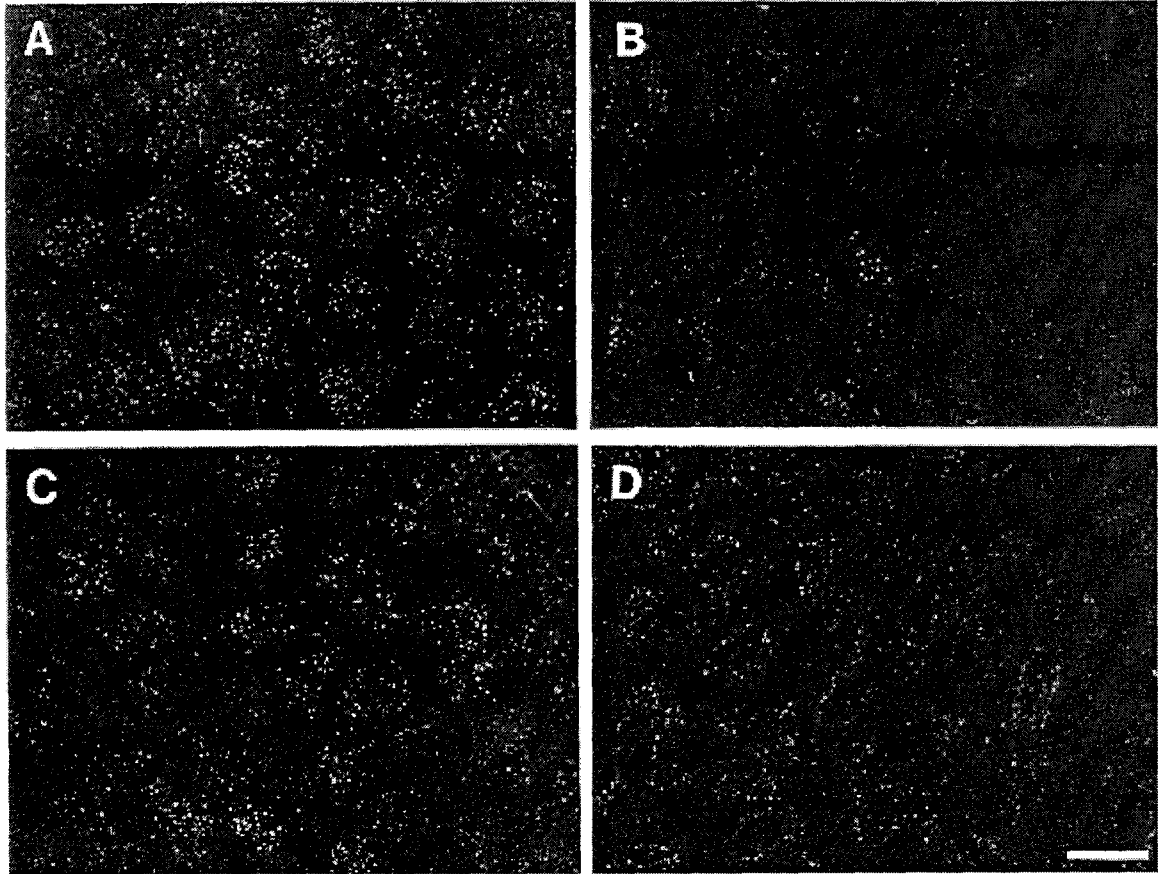


FIG. 4. Effect of TNF- α treatment on Hyf-Lf traffic through BBCECs. Hyf-Lf (50 μ g/ml) was added to the luminal side of the cells for 45 min at 37°C immediately (**B**) or 20 h (**C**) after the TNF- α treatment. BBCECs were also exposed to 4 h TNF- α treatment in the presence of astrocytes (**D**) and luminal uptake of Hyf-Lf performed. After washing, the cells were fixed and processed for fluorescence microscopy. (**A**) Control. Bar = 20 μ m.

treatment disturbed the endocytosis process of Lf within the BBCECs. Since no increase in Lf receptor expression was observed, these modifications of Lf uptake may be due to a faster endocytosis and/or transport through BBCECs suggesting that changes in kinetics of the intracellular traffic occurred.

DISCUSSION

Inflammatory processes contribute to CNS disorders and are marked by local increases in cytokines, in particular TNF- α . Lf, which seems to act as an anti-inflammatory agent, was recently implicated in neurodegenerative disorders and found in enhanced amounts in the microvasculature environment as well as in the vicinity of inflammatory foci. In the present study we demonstrated that activation of BBCECs by TNF- α led to a transient increase in Lf transendothelial transport and that Lf passage depends on the activation state of the endothelial cell population. The increased Lf traffic is not due to an up-regulation of the expression of Lf receptors but to a faster transendothelial transport through the BBCECs. Lf was recovered intact at the abluminal side of the cells suggesting that Lf may accumulate in the cerebral compartment during the inflammatory process.

The development (Dehouck et al., 1990; Descamps et al., 1996; Dehouck et al., 1997) of an *in vitro* model of BBB enabled us to reconstruct some of the complexities of its *in vivo* cellular environment. Thus, BBCECs cocultured with astrocytes expressed specific markers and characteristics such as tight junctions, electrical resistance, low paracellular permeability, specific enzymatic activities and carrier-mediated transport (Dehouck et al., 1990; Descamps et al., 1996). The behaviour and the phenotype of the reconstructed BBB during pathogenesis such as inflammation remains unknown but it seems clear that both endothelial cells and astrocytes play a very active role in the amplification and maintenance of this process.

Among the proinflammatory cytokines, TNF- α is described as a key pathogenic mediator in several immune-mediated neuropathologies. Thus, prior to investigating Lf traffic through BBCECs in inflammatory conditions, we first studied the effect of TNF- α on the reconstructed BBB partners. Astrocytes produce proinflammatory cytokines when activated by TNF- α (Sharif et al., 1993) and in our study we confirmed that IL1- α , IL1- β , IL6 and TNF- α mRNAs were synthesized in response to TNF- α activation. TNF- α is also a powerful activator of ECs (Pober, 1998) and induces the expression of different adhesion molecules at their cell surfaces which can be used as markers for EC activation. Among these adhesion molecules E-selectin and ICAM-1 were shown to be expressed on brain capillary ECs (Wong, 1992). Their expression on ECs from several species such as humans (Brayton et al., 1998), mice (Mc Carron et al., 1993) and rats (Defazio et al., 1998)

were markedly up-regulated by TNF- α stimulation. In our studies, we demonstrated that BBCECs constitutively expressed E-selectin and ICAM-1 transcripts and that upregulation of their expression was induced by TNF- α .

We further investigated the permeability of the activated BBCECs to small or large molecules and first showed that activation of BBCECs with TNF- α led to a non significant increase in permeabilities for sucrose and inulin compared to those observed when osmotic shock is performed. These results are in agreement with those previously described where no significant (Deli et al., 1995) or a very slight significant increase (Descamp et al., 1997) in the paracellular permeability can be observed. In our experimental conditions TNF- α has no influence on the transendothelial passage of small molecular weight substances.

On the other hand, TNF- α modified receptor-mediated transcytosis. Stimulation of transcytosis by TNF- α has already been described for macromolecules such as Tf and LDL (Descamps et al., 1997) and here we showed that Lf transendothelial transport was also increased. Nevertheless, there were differences and specific uptake and routing of these compounds might occur. Tf and Lf transports were highly increased compared to their respective controls but Lf intracellular traffic returned to normal within 24 hours whereas stimulation of Tf transcytosis was still efficient at this time. LDL transcytosis was stimulated after 4 h of TNF- α treatment at a lower level but reached a 10 fold increase 24 h later. All these results showed that TNF- α differentially affects the transendothelial transport of Lf, and that the stimulation of transcytosis paralleled BBCEC activation.

Lf enters BBCECs via a receptor-mediated process and only differentiated BBCECs expressed high affinity binding sites for Lf. The surface-bound Lf was then internalized and a specific unidirectional transport occurred *via* LRP (Fillebeen et al., 1999). In our present study, we showed that TNF- α has no effect on the expression of Lf specific binding sites on BBCECs. These results are in accordance with those previously described for Tf and LDL where an increased transcytosis through the BBB also occurred without an enhanced level of expression of their respective receptors (Descamps et al., 1997).

In parallel, Lf uptake was followed in TNF- α treated cells and a decrease in Lf accumulation within the cells was observed. Since Lf accumulation within the cells was less visible, transcytosis was increased and specific binding sites were not upregulated in the activated ECs, it appeared that the intracellular traffic kinetics might be modified. This change in transport kinetics might be a characteristic feature of the activated ECs since

similar results were obtained with Tf and LDL (Descamps et al., 1996). Therefore in inflammatory conditions, in parallel to upregulation of adhesion molecules and synthesis and/or release of cytokines, the stimulation of the intraendothelial traffic leads to a faster transport of macromolecules across the BBB.

Lf crosses BBB through non-activated BBCECs as already shown (Fillebeen et al., 1999) and its traffic was markedly enhanced when BBCECs were activated. In the presence of astrocytes, we further showed that BBCEC markers of activation were less highly expressed suggesting that the activation of the BBCECs might be less optimal. This led to a 50 % decrease in the Lf passage through the cells suggesting that the intracellular crosstalk between BBB partners may lead to a release of soluble factors modulating the BBB response to TNF- α . We then showed that activation by TNF- α was transient since no activation of the adhesion molecule and cytokine mRNA syntheses was observed 20 h later. In these conditions, Lf passage through BBCECs returned to baseline. These results suggest that Lf transendothelial passage through the BBCECs depends on the activation state of the BBCECs.

Released from circulating blood constituents (Banks et al., 1995) and/or synthesised by microglia and astrocytes (Sawada et al., 1989; Yamabe et al., 1994), TNF- α can reach and interact with the cerebral ECs at their luminal or abluminal sides or both. We therefore studied the presentation of TNF- α to BBCECs and showed first that it influences the activation state of both BBB partners. The level of ICAM-1 and E-selectin expression was three times higher when exposure to TNF- α occurs at the luminal side of the BBCECs. On the other hand, the production of the cytokine mRNAs for IL1- α , IL1- β and IL6 by astrocytes was half as elevated when TNF- α was presented luminally rather than abluminally, the exception being TNF- α transcripts for which a paracrine regulation might take place. The observed variation of the cellular responses to TNF- α might be explained either by a non-specific absorption of TNF- α to the porous filters meaning that the concentration delivered to cells was not optimal or by a differential distribution pattern of the TNF- α receptors. These receptors have already been described on ECs but their respective localisation on each side of the cell surface is not known. Nevertheless, whatever the TNF- α exposure route, activation of the reconstructed BBB occurs. In our conditions a marked increase in the transport of Lf through the BBCECs was observed. A slight difference was found when TNF- α was abluminally presented to BBCECs

corresponding to a 20 % decrease in the Lf passage. These results suggest that TNF- α released either from blood or brain cells lead to BBB activation allowing a faster crossing of Lf leading to its accumulation in immune-pathological brain tissue.

Lf has been considered as an index of inflammation and its capacity to interact with immune functions widely explored (reviewed in Nuijens et al., 1996; Baveye et al., 1999). Moreover the biological importance of Lf in host defence has been emphasized by the susceptibility of subjects with congenital or acquired Lf deficiency to recurrent infections (Boxer et al., 1982). Nevertheless, the role of Lf in modulating inflammation is not well understood, particularly in brain tissues where a marked elevation in Lf has been noted in pathological disorders.

The passage of intact Lf through the BBB in non-pathological conditions may correspond to one of the main sources of brain Lf since *in situ* synthesis of Lf occurs at a very low level (Siebert and Huang, 1997; Fillebeen et al., 1998). A marked increase in Lf distribution and concentration appears in immunopathological disorders (Terent et al., 1981; Osmand and Switzer, 1991; Kawamata et al., 1993; Leveugle et al., 1994) and here we showed that in inflammatory conditions, Lf transendothelial transport is enhanced four fold. Lf is released by leukocytes during inflammatory responses, and the Lf plasma concentration, initially close to 1 mg/l (Olofsson et al., 1977) rises to 20 mg/l (Bennett and Mohla, 1976). High plasma levels of Lf are then available and larger amounts of Lf may therefore cross the BBB. The augmentation of Lf concentration in the vicinity of the ECs and the enhanced transport of Lf through these cells may explain the accumulation of Lf in inflammatory foci. In addition, an acute increase in blood levels of neutrophils subsequent to the inflammatory process occurs. Adhesion molecules participate in the infiltration of leukocytes into inflammatory loci and the degranulation of neutrophils with release of Lf occurs which would also contribute to accumulation of Lf in the brain.

Thus, plasma Lf might be part of the first wave of anti-inflammatory defence mechanisms and be transcytosed as faster as possible through the BBB. Then Lf released from infiltrated neutrophils might take over. The anti-inflammatory role of Lf in pathological brain tissue now has to be investigated.

Acknowledgments: This investigation was supported in part by the CNRS Unité Mixte de Recherche 8576 (Glycobiologie structurale et fonctionnelle), the Université des Sciences et Technologies de Lille I, INSERM Unité 325 (Service d'Etude et de Recherche sur les Lipoprotéines et l'Athérosclérose), the Institut Pasteur de Lille and grants from the Conseil Régional Nord-Pas de Calais (Axe régional : maladies neurodégénératives et vieillissement). We are grateful to Dr. R. J. Pierce for reviewing the manuscript.

REFERENCES

- Appelmelk B. J., An Y. Q., Geerts M., Thijs B. G., de Boer H. A., MacLaren D. M., de Graaff J., and Nuijens J. H. (1994) Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infect. Immun.* **62**, 2628-2632.
- Banks W. A., Kastin A. J., and Broadwell R. D. (1995) Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation* **2**, 241-248.
- Baveye S., Ellass E., Mazurier J., Spik G., and Legrand D. (1999) Lactoferrin : A multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. *Clin. Chem. Lab. Med.* **37(3)**, 281-286.
- Bennett R. M. and Mohla C. (1976) A solid-phase radioimmunoassay for the measurement of lactoferrin in human plasma : variations with age, sex, and disease. *J. Lab. Clin. Med.* **88**, 156-166.
- Brayton J., Qing Z., Hart M. N., VanGilder J. C., and Fabry Z. (1998) Influence of adhesion molecule expression by human brain microvessel endothelium on cancer cell adhesion. *J. Neuroimmunol.* **89**, 104-112.
- Britigan B. E., Serody J. S., and Cohen M. S. (1994) The role of lactoferrin as an anti-inflammatory molecule. *Adv. Exp. Med. Biol.* **357**, 143-156.
- Chéron A., Mazurier J., and Fournet B. (1977) Chromatographic fractionation and studies on microheterogeneity of cow lactotransferrin prepared by an original procedure. *C. R. Acad. Sci. Paris* **284**, 585-588.
- Crouch S. P., Slater K. J., and Fletcher J. (1992) Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. *Blood* **80**, 235-240.
- Defazio G., Trojano M., Ribatti D., Nico B., Giorelli M., De Salvia R., Russo G., Roncali L., and Livrea P. (1998) ICAM-1 expression and fluid phase endocytosis of cultured brain microvascular endothelial cells following exposure to interferon β -1a and TNF- α . *J. Neuroimmunol.* **88**, 13-20.
- Dehouck B., Fenart L., Dehouck M. -P., Pierce A., Torpier G., and Cecchelli R. (1997) A new function for the LDL receptor : Transcytosis of LDL across the BBB. *J. Cell Biol.* **138**, 877-889.
- Dehouck M. -P., Méresse S., Delorme P., Torpier G., Fruchart J. C., and Cecchelli R. (1990) The blood-brain barrier in vitro : Coculture of brain capillary endothelial cells and astrocytes. *Circ. Metab. Cerveau* **7**, 151-162.

- Deitch E. A. (1992) Multi organ failure : pathophysiology and potential future therapy. *Ann. Surg.* **216**, 117-134.
- Deli M. A., Descamps L., Dehouck M. -P., Cecchelli R., Joo F., Abraham C. S., and Torpier G. (1995) Exposure of tumor necrosis factor- α to luminal membrane of bovine brain capillary endothelial cells cocultured with astrocytes induces a delayed increase of permeability and cytoplasmic stress fiber formation of actin. *J. Neurosc. Res.* **41**, 717-726.
- Descamps L., Dehouck M. -P., Torpier G., and Cecchelli R. (1996) Receptor-mediated transcytosis of transferrin through blood-brain barrier endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **270**, 1149-1158.
- Descamps L., Cecchelli R., and Torpier G. (1997) Effects of tumor necrosis factor on receptor-mediated endocytosis and barrier functions of bovine brain capillary endothelial cell monolayers. *J. Neuroimmunol.* **74**, 173-184.
- Elass-Rochard E., Roseanu A., Legrand D., Trif M., Salmon V., Motas C., Montreuil J., and 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.
- Faucheux B., Nillesse N., Damier P., Spik G., Mouatt-Pringent A., Pierce A., Leveugle B., Kubis N., Hauw J.-J., Agid Y., and Hirsch E. (1995) Expression of lactotransferrin receptors is increased in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 9603-9607.
- Fillebeen C., Dexter D., Mitchell V., Benaïssa M., Beauvillain J. -C., Spik G., and Pierce A. (1998) Lactoferrin is synthesized by mouse brain tissue and its expression is increased after MPTP treatment. *Adv. Exp. Med. Biol.* **443**, 296-300.
- Fillebeen C., Descamps L., Dehouck M. -P., Fenart L., Benaïssa M., Spik G., Cecchelli R., and Pierce A. (1999) Receptor mediated-transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.*, **274**, 7011-7017.
- Fillit H., Ding W., Buée L., Kalman J., Altsiel L., Lawlor B., and Wolf-Klein G. (1991) Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **129**, 318-320.
- Goavec M., Mazurier J., Montreuil J., and Spik G. (1985) Role of glycans in the binding of human serotransferrin and lactotransferrin to human alveolar macrophages. *C. R. Acad. Sci. Paris* **301**, 689-694.

- Griffin W. S., Sheng J. G., Royston M. C., Gentleman S. M., McKenzie J. E., Graham D. I., Roberts G. W., and Mrak R.E. (1998) Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease : the potential role of a cytokine cycle in disease progression. *Brain Pathol.* **8**, 65-72.
- Hull M., Strauss S., Berger M., Volk B., and Bauer J. (1996) Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease. *Eur. Arch. Psych. Clin. Neurosci.* **246**, 124-128.
- Kalaria R. N. and Hedera P. (1995) Differential degeneration of the cerebral microvasculature in Alzheimer's disease. *Neuroreport* **6**, 477-480.
- Kawamata T., Tooyama I., Yamada T., Walker D. G., and McGeer P. L. (1993) Lactotransferrin immunocytochemistry in Alzheimer and normal human brain. *Am. J. Pathol.* **142**, 1574-1585.
- Kermode A. G., Thompson A. J., Tofs P., Mac Manus D. G., Kendall B. E., Kingsley D. P. E., Moseley I. F., Rudge P., and Mc Donald W. I. (1990) Breakdown of the blood-brain barrier precedes symptoms and other MRI signs of new lesions in multiple sclerosis. Pathogenic and clinical implications. *Brain* **113**, 1477-1489.
- Leveugle B., Mazurier J., Legrand D., Mazurier C., Montreuil J., and Spik G. (1993) Lactotransferrin binding to its platelet receptor inhibits platelet aggregation. *Eur. J. Biochem.* **213**, 1205-1211.
- Leveugle B., Spik G., Perl D. P., Bouras C., Fillit H. M., and Hof P. R. (1994) The iron-binding protein lactotransferrin is present in pathologic lesions in a variety of neurodegenerative disorders : a comparative immunohistochemical analysis. *Brain Res.* **650**, 20-31.
- Leveugle B., Faucheux B. A., Bouras C., Nillesse N., Spik G., Hirsch E. C., Agid Y., and Hof P. R. (1996) Immunohistochemical analysis of the iron-binding protein lactotransferrin in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* **91**, 566-572.
- Machnicki M., Zimecki M., and Zagulski T. (1993) Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 in vivo. *Int. J. Exp. Pathol.* **74**, 433-439.
- Masson P. L. (1970) La lactoferrine (Masson P.L., ed.), pp 93-165, Arscia, Bruxelles.
- Masson P. L., Heremans J. F., and Schöenne, E. (1969) Lactoferrin an iron binding protein in neutrophilic leukocytes. *J. Exp. Med.* **130**, 643-658.

- Mattsby-Baltzer I., Roseanu A., Motas C., Elverfors J., Engberg I., and Hanson L. A. (1996) Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells. *Pediatr Res* **40**, 257-262.
- McCarron R. M., Wang L., Racke M. K., McFarlin D. E., and Spatz M. (1993) Cytokine-regulated adhesion between encephalitogenic T lymphocytes and cerebrovascular endothelial cells. *J. Neuroimmunol.* **43**, 23-30.
- McGeer P.L. and McGeer E.G. (1995) The inflammatory response system of brain : implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res. Rev.* **21**, 195-218.
- McGeer E.G. and McGeer P.L. (1998) The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. *Exp.Gerontol.* **33**, 371-378.
- Mecocci P., Parnetti L., Reboldi G. P., Santucci C., Gaiti A., Ferri C., Gernini I., Romagnoli M., Cadini D., and Senin U. (1991) Blood-brain barrier in a geriatric population : Barrier function in degenerative and vascular dementias. *Acta Neurol. Scand.* **84**, 210-213.
- Méresse S., Dehouck M. -P., Delorme P., Bensaïd M., Tauber J. P., Delbart C., Fruchart J. C., and Cecchelli, R. (1989) Bovine brain capillary endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture. *J. Neurochem.* **53**, 1363-1371.
- Mogi M., Harad M., Riederer P., Narabayashi H., Fujita K., and Nagatsu, T. (1994) Tumor necrosis factor a increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from Parkinsonian patients. *Neurosci. Lett.* **165**, 208-210.
- Montreuil J., Tonnelat J., and Mullet S. (1960) Préparation et propriétés de la lactosidérophiline (lactotransferrine) du lait de Femme. *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 413-421.
- Nguyen M., Strubel N. A., and Bischoff J. (1993) A role for sialyl Lewis-X/A glycoconjugates in capillary morphogenesis. *Nature* **365**, 267-269.
- Nuijens J. H., van Berkel P. H. C., and Schanbacher F. L. (1996) Structure and biological actions of lactoferrin. *J. Mamm. Gland Biol. Neoplas.* **1**, 285-295.
- Olofsson T., Olsson I., and Venge P. (1977) Myeloperoxidase and lactoferrin of blood neutrophils and plasma in chronic granulocytic leukemia. *Scand. J. Haematol.* **18**, 113-120.

- Osmand A. P. and Switzer III R. C. (1991) Differential distribution of lactoferrin and Alzheimer's immunoreactivities in neuritic plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease, in *Alzheimer's Disease : Basic Mechanisms, Diagnosis and Therapeutic Strategies* (Iqbal, K., McLachlan, D. R. C., Winblad, B. and Wisniewski, H. M., eds), pp. 219-228, John Wiley & Sons Ltd.
- Pober J. S. (1998) Activation and injury of endothelial cells by cytokines. *Path. Biol.* **46**, 159-163.
- Sambrook J., Fritsch E. F., and Maniatis T., eds. (1989) *Molecular Cloning : A laboratory Manual* : Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sawada M., Kondo N., Suzumura A., and Marunouchi T. (1989) Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res.* **491**, 394-397.
- Schubert P., Ogata T., Miyazaki H., Marchini C., Ferroni S., and Rudolphi K. (1998) Pathological immuno-reactions of glial cells in Alzheimer's disease and possible sites of interference. *J. Neural. Transm. Suppl.* **54**, 167-174.
- Sharief M. K. and Thompson E. J. (1992) In vivo relationship of tumor necrosis factor- α to blood-brain barrier damage in patients with active multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **38**, 27-34.
- Sharif S. F., Hariri R. J., Chang V. A., Barie P. S., Wang R. S., and Ghajar J. B. (1993) Human astrocyte production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and interleukin-6 following exposure to lipopolysaccharide endotoxin, *Neurol. Res.* **15**, 109-112.
- Siebert P.D. and 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. U.S.A.* **94**, 2198- 2203.
- Terent A., Hallgren R., Venge P., and Bergstrom K. (1981) Lactoferrin, lysozyme, and beta 2-microglobulin in cerebrospinal fluid. Elevated levels in patients with acute cerebrovascular lesions as indices of inflammation. *Stroke* **12**, 40-46.
- Tokunaga K., Nakamura Y., Sakata K., Fujimori K., Ohkubo M., Sawada K., and Sakiyama S (1987) Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers. *Cancer Res.* **47**, 5616-5619.
- Wong D. (1992) Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. *J. Neuroimmunol.* **39**, 11-21.

- Yamabe T., Dhir G., Cowan E. P., Wolf A. L., Bergey G. K., Krumholz A., Barry E., Hoffman P. M., and Dhib-Jalbut S. (1994) Cytokine-gene expression in measles-infected adult human glial cells. *J. Neuroimmunol.* **49**, 171-179.
- Zagulski T., Lipinski P., Zagulska A., Broniek S., and 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.

Conclusion

L'activation du modèle *in vitro* de BHE par la cytokine pro-inflammatoire TNF- α nous a permis de mettre en évidence l'augmentation du transport de la lactoferrine au travers de l'endothélium des capillaires cérébraux sous l'action de cette cytokine. Ce mécanisme d'accumulation dépend du trafic intracellulaire de la molécule et non de l'augmentation de l'expression des récepteurs de la lactoferrine à la surface des cellules.

Ainsi, l'incubation des cellules endothéliales avec le TNF- α entraîne une forte augmentation de l'expression des ARNm de la E-sélectine et de l'ICAM-1, ces deux molécules d'adhésion étant produites lors de l'activation des cellules endothéliales. Cette augmentation apparaît aussi bien après une exposition luminale qu'abluminale au TNF- α . Cependant, elle varie en fonction de ce mode d'exposition. L'activation qui en résulte est transitoire, puisque l'expression des molécules d'adhésion retrouve son niveau de base 20 heures après le traitement (figure 1, article 2). Cette activation est également modulée en condition de coculture en présence des astrocytes. La sensibilité de la population astrocytaire au TNF- α a également été testée. Ainsi, l'exposition luminale ou abluminale au TNF- α des cocultures induit l'expression des ARNm de quatre cytokines pro-inflammatoires par les astrocytes : l'IL1- α , l'IL1- β , l'IL6 et le TNF- α (tableau 2, article 2). L'activation des astrocytes par le TNF- α est également transitoire et modulée en fonction du mode d'exposition des cellules à la cytokine.

L'activation par le TNF- α n'induit pas de variation de la perméabilité des cellules endothéliales au sucrose et à l'inuline (tableau 3, article 2), ce qui montre que la perméabilité paracellulaire des cellules endothéliales n'est pas affectée par l'effet du TNF- α .

L'activation des cellules endothéliales par le TNF- α entraîne une forte augmentation du transport de la lactoferrine (figure 2, article 2). Ce phénomène est transitoire et semble être modulé par la population astrocytaire. Par contre, le TNF- α n'exerce aucune action sur l'expression des récepteurs de la lactoferrine qui reste inchangée après le traitement (figure 3, article 2). L'accumulation de la lactoferrine dans les cellules endothéliales, quant à elle, est fortement diminuée sous l'action du TNF- α (figure 4, article 2). Ces résultats suggèrent que l'action du TNF- α perturbe le processus d'endocytose de la lactoferrine à l'intérieur

des cellules endothéliales. Ce phénomène n'étant pas provoqué par une augmentation de l'expression des récepteurs de la lactoferrine, il pourrait être dû à un mécanisme d'endocytose ou de transcytose plus rapide de la lactoferrine à travers les cellules endothéliales, suggérant des modifications dans le trafic intracellulaire.

L'augmentation du transport de la lactoferrine au travers des cellules endothéliales de capillaires cérébraux en conditions inflammatoires aboutit à une accumulation de la lactoferrine dans le compartiment cérébral des cellules endothéliales. Cette accumulation pourrait expliquer l'augmentation du taux de lactoferrine observée dans le SNC de patients atteints de différentes maladies neurodégénératives, précisément au niveau de leurs lésions qui sont le siège de foyers inflammatoires importants (figure 16).

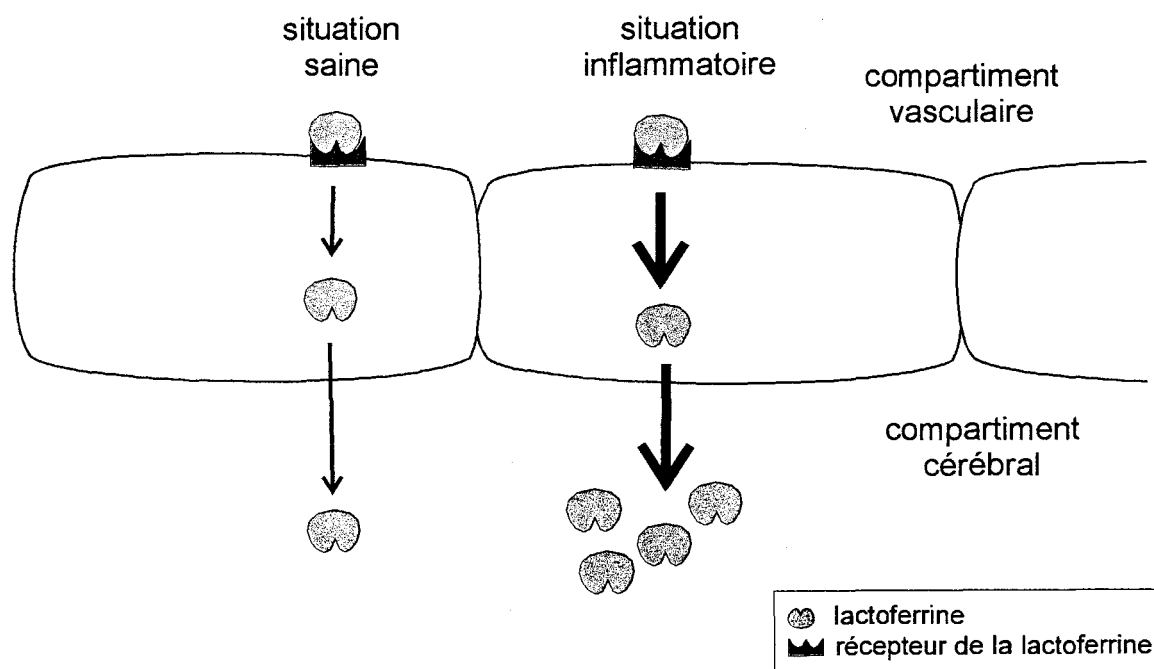


Figure 16 : Processus d'accumulation de la lactoferrine dans le parenchyme cérébral au niveau de lésions neuropathologiques à caractère inflammatoire.

Cependant cette accumulation de la lactoferrine au niveau des foyers infectieux n'explique pas sa présence importante dans des populations cellulaires très spécialisées, telles que les neurones dopaminergiques ou les cellules microgliales. Sa capture ou sa synthèse par ces cellules spécialisées permettraient d'expliquer cette localisation.

II. ETUDE DE LA SYNTHÈSE *IN SITU* DE LA LACTOFERRINE DANS LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

Introduction

La lactoferrine est présente dans le SNC au niveau de lésions neuropathologiques caractéristiques de différentes maladies neurodégénératives mais également dans des populations cellulaires très spécialisées du SNC. Ainsi, sa présence a été décrite dans les neurones dopaminergiques mélanisés et dans d'autres cellules non identifiées dont la morphologie ressemble à celle des cellules microgliales (Leveugle *et al.*, 1996). Certains récepteurs de la lactoferrine ont également été localisés à la surface des cellules du SNC, tels que le LRP au niveau des neurones et de quelques cellules gliales (Bu *et al.*, 1994 ; Tooyama *et al.*, 1995), et le récepteur lymphocytaire au niveau des neurones dopaminergiques mélanisés et de cellules gliales (Faucheux *et al.*, 1995). La présence de la lactoferrine et de son récepteur dans ces cellules nous a amené à vérifier l'hypothèse selon laquelle la lactoferrine pourrait être synthétisée par ces cellules ou captée par l'intermédiaire d'un mécanisme d'endocytose. Dans le cas de la maladie de Parkinson, le taux de lactoferrine et de son récepteur est fortement augmenté dans les cellules marquées (Leveugle *et al.*, 1996 ; Faucheux *et al.*, 1995), impliquant une augmentation de synthèse ou de capture.

Il est donc important de rappeler les caractéristiques des cellules qui sont susceptibles de synthétiser ou de capter la lactoferrine dans le SNC : les neurones dopaminergiques mélanisés et/ou les cellules microgliales.

A. Les neurones dopaminergiques mélanisés

Les neurones dopaminergiques mélanisés sont localisés dans les régions de la substance noire et de l'aire tegmento-ventrale du mésencéphale (Saper et Petito, 1982). Ces régions, de types catécholaminergiques, sont en relation très étroites avec les corps striés formant la voie nigro-striatale qui intervient dans le système moteur extrapyramidal (figure 17).

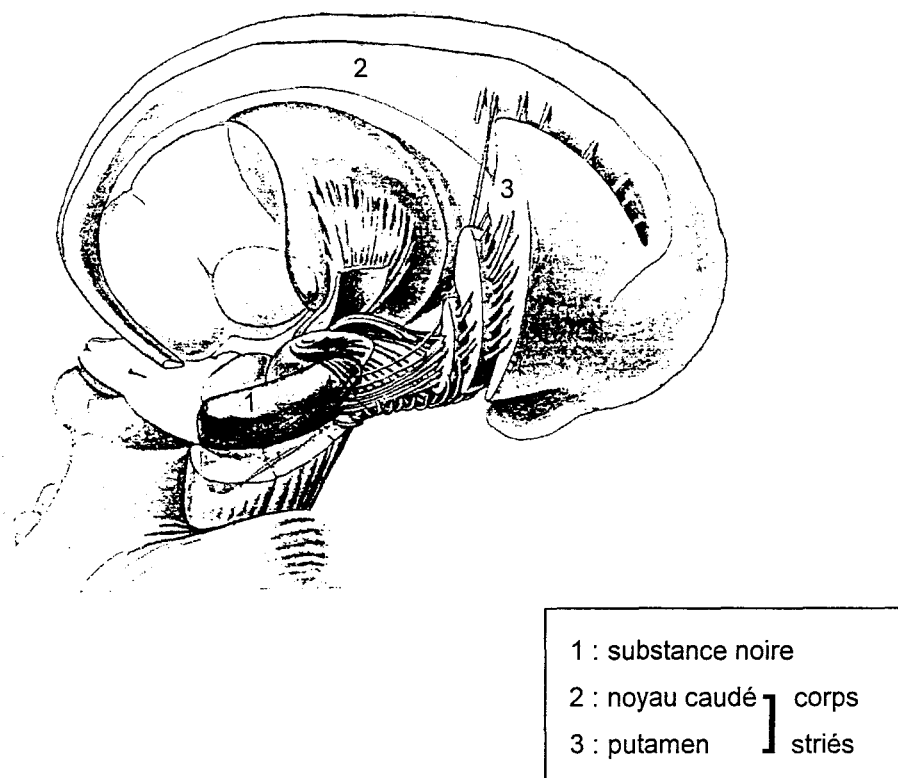


Figure 17 : Coupe latérale du SNC humain présentant le système nigro-striatal qui est à la base des relations existant entre le striatum et la substance noire.

1. Caractéristiques des neurones dopaminergiques mélanisés

La substance noire est généralement subdivisée en une zone riche en corps cellulaires appelée la *pars compacta*, et une zone moins dense appelée la *pars réticulata*. Les neurones dopaminergiques mélanisés sont situés principalement dans la *pars compacta*. Ces neurones de grande taille ont un diamètre moyen de 50 μm et présentent de 2 à 6 dendrites. Ils contiennent également des quantités variables de neuromélanine. Ce composé est facilement identifiable dans les neurones qui expriment la tyrosine hydroxylase. En effet, les neurones dopaminergiques synthétisent cette enzyme dont le marquage est situé dans le cytoplasme mais également dans l'axone et les dendrites. Bien que la superposition des corps cellulaires pigmentés par la neuromélanine et les cellules immunoréactives pour la tyrosine hydroxylase ne soit pas absolue, la démarcation des noyaux mésencéphaliques catécholaminergiques et spécialement la partie dopaminergique de la substance noire peut être fondée sur la seule présence de la neuromélanine (Saper et Petitto, 1982).

2. La neuromélanine

La neuromélanine est une mélanine à dopamine, qui résulte de la déviation lente et continue du métabolisme de la dopamine vers des voies oxydatives non enzymatiques (figure 18, page 146). La biosynthèse de la neuromélanine part de composés simples, tels que la tyrosine, la dopamine et la sérotonine, qui subissent des oxydations aboutissant à la formation d'espèces réactives, telles que la 5-S-cystéinyldopamine et la dopamine quinone. Ces composés ayant tendance à s'oligomériser vont s'accumuler pour former les agrégats de neuromélanine (d'Ischia et Prota, 1997). Ce pigment possède une forte affinité pour le fer (Ben-Shachar *et al.*, 1991), et il semble que le fer ainsi que les peroxydes pourraient jouer un rôle dans le couplage oxydatif de la dopamine à la cystéine lors de la formation de la 5-S-cystéinyldopamine (Palumbo *et al.*, 1995). Le mécanisme de mélanogenèse du SNC est un processus différent de celui observé dans les mélanocytes et les cellules épithéliales pigmentées de la rétine qui se traduit par la formation d'organites particuliers, les prémélanosomes puis les mélanosomes (Schraermeyer, 1996, pour revue générale). Ces organites sont totalement absents des neurones dopaminergiques mélanisés et sont

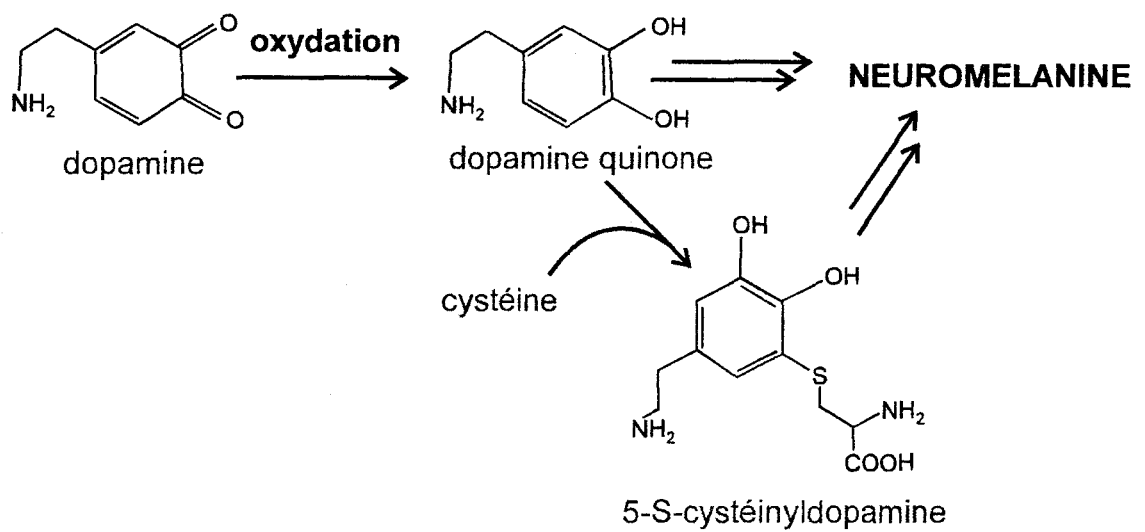


Figure 17 : Mécanisme hypothétique de la formation de la 5-S-cystéinyldopamine et de l'accumulation de neuromélanine.

remplacés par des structures granulaires plus ou moins denses. La neuromélanine est un marqueur naturel des neurones catécholaminergiques dans le SNC adulte humain (Saper et Petit, 1982). Comme d'autres pigments formés par oxydation, la neuromélanine s'accumule au cours du temps et est donc fortement associée avec le vieillissement.

3. Fonction de la substance noire

La substance noire fait partie du système moteur extrapyramidal qui intervient dans les mouvements involontaires et l'amorce rapide d'un mouvement (Jung et Hassler, 1960). Lors de l'exécution d'un mouvement volontaire plusieurs groupes musculaires sont activés de façon concomitante, cette régulation vise le maintien de l'équilibre statique et de l'attitude du corps permettant l'exécution correcte du mouvement. Ces actions musculaires d'accompagnement, qui souvent se réduisent à une augmentation du tonus ou au relâchement de certains groupes musculaires, ne sont ni volontaires ni conscientes. Elles sont toutefois nécessaires à tout mouvement coordonné. Le système extrapyramidal contrôle ces mouvements et fonctionne de façon comparable à un système d'assistance qui faciliterait de façon inconsciente tous les mouvements conscients. La dérégulation de ce système entraîne une rigidité musculaire, un tremblement de repos, une abolition des mouvements associés et une mimique figée. Ce système est particulièrement perturbé lors de la maladie de Parkinson qui se traduit par une lésion sévère de la voie dopaminergique nigro-striatale (Jellinger, 1989).

Le système moteur extrapyramidal fait intervenir un groupe de noyaux riches en fer comprenant : les corps striés avec le putamen et le noyau caudé, le pallidum, le noyau subthalamique, le noyau rouge et la substance noire, ainsi que des centres d'intégrations, tels que le cervelet et les noyaux thalamiques. Les centres extrapyramidaux sont unis entre eux par de nombreux circuits neuronaux, tels les connexions afférentes et efférentes existantes entre le striatum et la substance noire. Ainsi, la partie antérieure de la substance noire reçoit le faisceau strio-nigral issu du noyau caudé, des fibres cortico-nigrales émanant du cortex frontal. La partie caudale de la substance noire quant à elle reçoit des fibres du putamen. Les fibres nigro-striées relient la *pars compacta* aux corps striés, des fibres issues de la *pars réticulata* remontent vers le thalamus. La majeure partie des fibres efférentes

remonte vers les corps striés, avec lesquels la substance noire a des relations fonctionnelles étroites par l'intermédiaire du système nigro-striatal. Les axones des neurones dopaminergiques de la substance noire transportent la dopamine jusqu'au putamen où elle est stockée dans les boutons terminaux. La section de la voie nigro-striée entraîne au niveau du putamen une diminution de la concentration en dopamine.

Lors de la maladie de Parkinson la voie nigro-striatale est fortement affectée. Le processus neurodégénératif qui est à la base de la perte sélective des neurones dopaminergiques mélanisés est toujours inconnu. Cependant, il semble que l'association d'un excès de fer, la présence abondante de neuromélanine et le stress oxydatif soient impliqués dans ce mécanisme (Gerlach *et al.*, 1994).

B. Les cellules microgliales

Les cellules microgliales, macrophages résidents du SNC, sont impliquées dans le système de défense endogène du SNC et permettent ainsi de lutter contre les agressions extérieures. Elles sont également indispensables à l'élimination de déchets cellulaires ou de cellules mortes.

1. Caractéristiques des cellules microgliales

Les cellules microgliales représentent 20 % des cellules gliales du SNC. Les cellules microgliales quiescentes du SNC normal ont une morphologie dendritique ; cependant, lorsque les cellules rencontrent un stimulus, elles peuvent acquérir une forme arrondie dépourvue de dendrites, semblable à celle d'un macrophage. Les cellules microgliales quiescentes ou activées ont de nombreuses caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles qui sont similaires à celles des cellules de lignées monocytaires. Ainsi, les cellules microgliales expriment à leur surface des marqueurs macrophagiques, tels que le CD11c et le CD68, mais également les récepteurs du complément (CR1, CR2, CR3) qui permettent la phagocytose et des récepteurs spécifiques des fragments Fc des anticorps (Ulvestad *et al.*, 1994). Les cellules microgliales sont également les principales cellules présentatrices d'antigènes du SNC (Streit *et al.*, 1989).

2. Origine des cellules microgliales

Les cellules microgliales, contrairement aux autres types cellulaires du SNC, ont une origine périphérique (Gehrman *et al.*, 1995). Elles sont produites dans la moelle osseuse en tant que monocytes, puis migrent au cours de la vie embryonnaire jusqu'au SNC, où elles résideront définitivement (Ling et Wong, 1993). Les cellules microgliales résidentes sont ensuite remplacées chez l'adulte par un renouvellement très lent, ainsi que par l'entrée de monocytes circulants dans le SNC qui est suivie de leur transformation en cellules microgliales (Lassmann *et al.*, 1993).

3. Fonction des cellules microgliales

Les cellules microgliales vont tout d'abord être indispensables au développement normal de l'embryon au cours de la vie foetale. Elles semblent sécréter des facteurs de croissance importants pour la formation du système nerveux central et assurent une fonction de nettoyage. En effet, les cellules microgliales vont éliminer les cellules mortes produites inutilement au cours du développement foetal. A ce stade les cellules microgliales immatures n'ont pas encore leur forme ramifiée (Ling et Wong, 1993).

Lorsque le SNC est achevé, les cellules microgliales se mettent au repos et adoptent leur forme ramifiée. Cette conformation leur permet de contrôler l'état de nombreuses cellules avoisinantes. Les autres fonctions des cellules microgliales quiescentes sont encore inconnues, mais elles semblent libérer de faibles quantités de facteurs de croissance qui participeraient à la survie des neurones matures et des cellules gliales, tels que le FGF et le NGF permettant la régénération neuronale (Blinzinger et Kreutzberg, 1968).

Les cellules microgliales au repos réagissent rapidement aux perturbations de leur environnement se préparant à entourer les cellules endommagées. Cette activation se manifeste par une rétraction des ramifications (Streit *et al.*, 1988) et l'augmentation de l'expression des gènes du CMH (Streit *et al.*, 1989). Les cellules activées n'acquièrent pas nécessairement la capacité de phagocyter d'autres cellules. Quand la lésion détectée est légère ou réversible, les cellules retournent à l'état de repos. Au contraire, lorsque la lésion est grave et détruit les cellules, les cellules microgliales agissent en tant que macrophages

et phagocytent les débris cellulaires et les cellules mortes. Les cellules microgliales activées produisent, comme d'autres macrophages, des protéases, des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1 et le TNF- α (McGeer et McGeer, 1995 pour revue générale), mais également des radicaux oxygénés réactifs, tels que l'ion superoxyde, le radical hydroxyl et le peroxyde d'hydrogène (Colton et Gilbert, 1993). Ces radicaux détruisent les agents pathogènes mais risquent également d'endommager les différents composants cellulaires des neurones et des cellules gliales voisines du site de libération de ces radicaux. Ces réactions mises en place au niveau de lésions caractéristiques de maladies neurodégénératives pourraient aggraver ces pathologies (McGeer et McGeer, 1995 pour revue générale).

Conclusion

La présence de la lactoferrine dans les neurones dopaminergiques mélanisés et les cellules microgliales, fortement impliqués dans le processus neurodégénératif responsable de la maladie de Parkinson, nous a amené à étudier l'expression de cette protéine dans le SNC sain et pathologique. Les travaux nous ont permis de préciser le lieu de synthèse de la lactoferrine et de relier son accumulation au processus neurodégénératif.

ARTICLE 3 :

ETUDE DE L'EXPRESSION DE LA LACTOFERRINE DANS LE MESENCEPHALE DE PATIENTS SAINS

Introduction

Leveugle et coll. (1996) ont décrit la présence de la lactoferrine dans les neurones dopaminergiques mélanisés de la substance noire et de l'aire tegmento-ventrale. D'autres cellules non identifiées présentant un marquage pour la lactoferrine ont également été mises en évidence dans ces deux régions du mésencéphale. La présence de la lactoferrine dans différentes populations cellulaires du SNC sain et notamment dans le mésencéphale pourrait s'expliquer par sa synthèse dans ces cellules ou sa capture par l'intermédiaire d'un mécanisme d'endocytose. Ainsi, il était important de connaître précisément la nature des cellules qui présentent un marquage pour la lactoferrine et le lieu de synthèse de cette protéine. Madame le Professeur Ruchoux nous a permis de réaliser cette étude en nous donnant accès à des coupes *post-mortem* de matériel humain.

Matériels et méthodes

Préparation des coupes de cerveau humain

Le cerveau de plusieurs patients ne présentant pas de désordres neuropathologiques a été fixé pendant 45 jours dans un tampon formol, 10 % PBS (Labonor). Après dissection, la région du mésencéphale est alors déshydratée par passages successifs dans des bains d'éthanol à concentrations croissantes, puis dans un bain de toluène avant d'être incluse dans la paraffine. Des coupes horizontales de 8 μm ont ensuite été coupées au microtome (Reicher-Jung 2030) et, fixées sur des lames gélatinées par chauffage 1 minute à 90°C. Préalablement à toute étude, les coupes ont été déparaffinées dans un bain de toluène

pendant 15 min, elles ont ensuite été hydratées par passages successifs dans des bains d'éthanol à concentration décroissante jusqu'à un bain final dans de l'eau distillée.

Immunohistochimie

Avant de réaliser des marquages immunohistochimiques à simple ou double détection, les coupes de cerveau humain ont subi plusieurs traitements. La présence de neuromélanine, qui empêche la lecture des marquages étant donné la persistance de sa coloration en technique classique, nécessite la réalisation de traitements spécifiques des lames et notamment une démélanisation. Les coupes de cerveau humain ont ainsi été démélanisées par un traitement au KMnO_4 à 0,25 % pendant 20 min, suivi de l'incubation dans une solution d'acide oxalique à 1 % et de bisulfite de sodium à 1 % pendant 4 min et de lavages successifs de plusieurs heures dans de l'eau distillée, puis dans le tampon PBS. De manière à éliminer les interactions non spécifiques des anticorps, les coupes ont été placées dans le tampon PBS, Triton X100 0,25 % (tampon d'incubation) contenant 5 % de sérum pré-immun d'âne (DAKO) pendant 15 min à température ambiante.

Pour la détection de simples marquages, les coupes placées dans une chambre humide sont alors incubées pendant une nuit à température ambiante, dans le tampon d'incubation en présence d'anticorps KP-1 (Chemicon) dirigés contre le CD68, marqueur des lignées macrophagiques activées. Après trois lavages dans le tampon PBS, les coupes sont révélées par le système AEC (DAKO) qui aboutit à une coloration rouge des immunomarquages. Les coupes sont ensuite observées par microscopie photonique (Axiophot, Zeiss). Pour la détection de doubles marquages, les coupes sont incubées dans les mêmes conditions en présence d'anticorps dirigés contre la lactoferrine humaine, additionnés soit d'anticorps dirigés contre la tyrosine hydroxylase humaine soit d'anticorps MAC-1 dirigés contre le récepteur CR1 du complément (les caractéristiques des différents anticorps et réactifs utilisés sont décrites dans le tableau 1, article 3). De manière à révéler le marquage de la lactoferrine, après trois lavages dans le tampon PBS, les coupes ont été incubées pendant 90 min à température ambiante en présence d'anticorps biotinylés correspondants. Puis trois nouveaux lavages sont ensuite effectués et les coupes mises en présence d'avidine marquée au rouge Texas pendant 90 min à température ambiante. Afin de révéler ensuite le marquage de la tyrosine hydroxylase ou du récepteur CR1 du

complément, après trois lavages supplémentaires, les coupes sont incubées pendant 90 min à température ambiante en présence d'anticorps secondaires correspondants marqués au FITC. Après trois derniers lavages, les coupes sont montées dans le mélange PBS, 75 % glycérol, 10 mM para-phénylènediamine et recouvertes d'une lamelle. Les coupes sont ensuite observées au microscope à fluorescence (DMRB, Leica).

protéine détectée	système de révélation	espèce	provenance	dilution utilisée
lactoferrine	• anticorps dirigé contre la lactoferrine humaine	lapin	produit au laboratoire	500 ^{ème}
	• anticorps dirigé contre les Ig de lapin biotinylé	âne	DAKO	150 ^{ème}
	• avidine marquée au rouge Texas		DAKO	200 ^{ème}
tyrosine hydroxylase	• anticorps dirigé contre la tyrosine hydroxylase humaine	mouton	Chemicon	500 ^{ème}
	• anticorps dirigé contre les Ig de mouton marqué au FITC	âne	Sigma	150 ^{ème}
récepteur CR1 du complément	• anticorps MAC-1	souris	Serotec	100 ^{ème}
	• anticorps dirigé contre les Ig de souris marqué au FITC	âne	Sigma	150 ^{ème}

Tableau 1 : Caractéristiques des différents anticorps et réactifs utilisés pour la détection des doubles marquages.

Hybridation *in situ*

La technique d'hybridation *in situ* décrite dans l'article 4 (page 176) a été utilisée sur les coupes de cerveau humain. Les hybridations ont été réalisées avec des ribosondes sens et antisens spécifiques de la lactoferrine humaine. Une ribosonde antisens spécifique de la transferrine humaine, protéine produite dans le SNC par les oligodendrocytes, a également été utilisée dans le but de vérifier la conservation des coupes de cerveau humain. L'ADNc de la lactoferrine humaine et l'ADNc partiel de la transferrine humaine ont été clonés dans le plasmide pBluescript (Stratagene). Le plasmide contenant l'ADNc de la lactoferrine humaine a été linéarisé par l'enzyme de restriction *BsmI* (Eurogentec), le fragment généré,

correspondant aux nucléotides 1719 à 2166 de l'ADNc de la lactoferrine humaine, a été utilisé pour la synthèse des ribosondes. L'ARN polymérase T3 (Stratagene) a permis la synthèse de la ribosonde antisens, alors que l'ARN polymérase T7 (Stratagene) a été utilisé pour la synthèse de la ribosonde sens. En ce qui concerne le plasmide contenant l'ADNc partiel de la transferrine humaine, il a été linéarisé par l'enzyme de restriction *Bam*HI (Eurogentec), le fragment généré, correspondant aux nucléotides 1099 à 1922 de l'ADNc de la transferrine humaine, a été utilisé pour la synthèse de la ribosonde antisens, à l'aide de l'ARN polymérase T7 (Stratagene).

Préparation et marquage de la lactoferrine humaine

La lactoferrine humaine (Lf) a été purifiée et marquée à l'iode [¹²⁵I] selon les techniques décrites dans l'article 1 (page 99).

Fixation de la lactoferrine humaine sur mélanine immobilisée

La mélanine synthétique (Sigma-Aldrich) a été fixée dans les puits d'une plaque de microtitration de 96 puits (Nunc) à une concentration de 100 µg/ml (10 µg/puits) dans un tampon Na₂HCO₃ 10 mM pH 9,6 pendant une nuit à 4°C. Les puits sont alors saturés dans le tampon PBS, Tween 20 (Merck) 0,01 % (tampon d'incubation et de lavages) contenant de la gélatine à 2 % pendant 1 h à 37°C. Après trois lavages, les puits contenant la mélanine immobilisée sont incubés avec de la lactoferrine marquée à l'¹²⁵iode à des concentrations croissantes allant de 0,5 à 200 µg/ml (6,5 à 2500 nM) dans le tampon d'incubation en présence de 0,2 % de transferrine humaine (Sigma-Aldrich) pendant 1 h à température ambiante, la transferrine permettant de limiter l'adsorption non spécifique de la lactoferrine (Goavec *et al.*, 1985). La fixation non spécifique de la lactoferrine est déterminée par des expériences en parallèle en présence de 100 excès molaire de lactoferrine native non marquée. Après trois lavages des puits, la radioactivité associée avec chacun des puits a été déterminée par comptage dans un compteur gamma (LKB). La fixation spécifique de la lactoferrine sur la mélanine a été calculée par soustraction de la fixation non spécifique à la fixation totale. La constante de dissociation (K_d) et le nombre de sites de fixation ont été déterminés par la méthode de Scatchard (Scatchard, 1949).

Après fixation de la mélanine synthétique dans les puits d'une plaque de microtitration de 96 puits, saturation et lavages, une étude préliminaire de la nature de la fixation de la lactoferrine a été réalisée. Les puits contenant la mélanine immobilisée ont ainsi été incubés avec 50 µg/ml (650 nM) de lactoferrine marquée à l'¹²⁵Iode en présence de lactoferrine non marquée ou de protamine, en concentrations croissantes allant de 0,65 à 6500 nM dans le tampon d'incubation, 0,2 % transferrine humaine pendant 1 h à température ambiante. Après trois lavages des puits, la radioactivité associée à chacun des puits a été déterminée par comptage dans un compteur gamma (LKB).

Résultats

Localisation cellulaire de la lactoferrine dans le mésencéphale

Afin de déterminer précisément la localisation cellulaire de la lactoferrine dans le mésencéphale, des expériences immunohistochimiques de double marquage ont été réalisées à l'aide d'anticorps dirigés contre la lactoferrine et contre différents marqueurs spécifiques des populations cellulaires du SNC. Ainsi, la lactoferrine a été localisée dans deux populations cellulaires différentes du mésencéphale caractérisées par une forme et une taille différentes (figure 1, A et D, article 3). La première population cellulaire, de taille importante, correspond aux neurones dopaminergiques qui ont été mis en évidence par la détection de tyrosine hydroxylase dans les cellules (figure 1, A, B et C, article 3). La deuxième population cellulaire, quant à elle de taille plus petite, correspond à des cellules microgliales activées mises en évidence par la présence du récepteur CR1 du complément à leur surface (figure 1, D, E et F, article 3). En effet, dans le SNC, seules ces cellules expriment le CR1. Le marquage de la lactoferrine au niveau des neurones dopaminergiques, contrairement à celui de la tyrosine hydroxylase (figure 1, B et C, article 3), n'est pas réparti sur toute la superficie des cellules mais seulement dans des zones granulaires des cellules correspondant aux agrégats de neuromélanine (figure 1, A et C, article 3). Au niveau des cellules microgliales, le marquage de la lactoferrine est différent de celui observé dans les neurones dopaminergiques, il n'est pas restreint à des structures

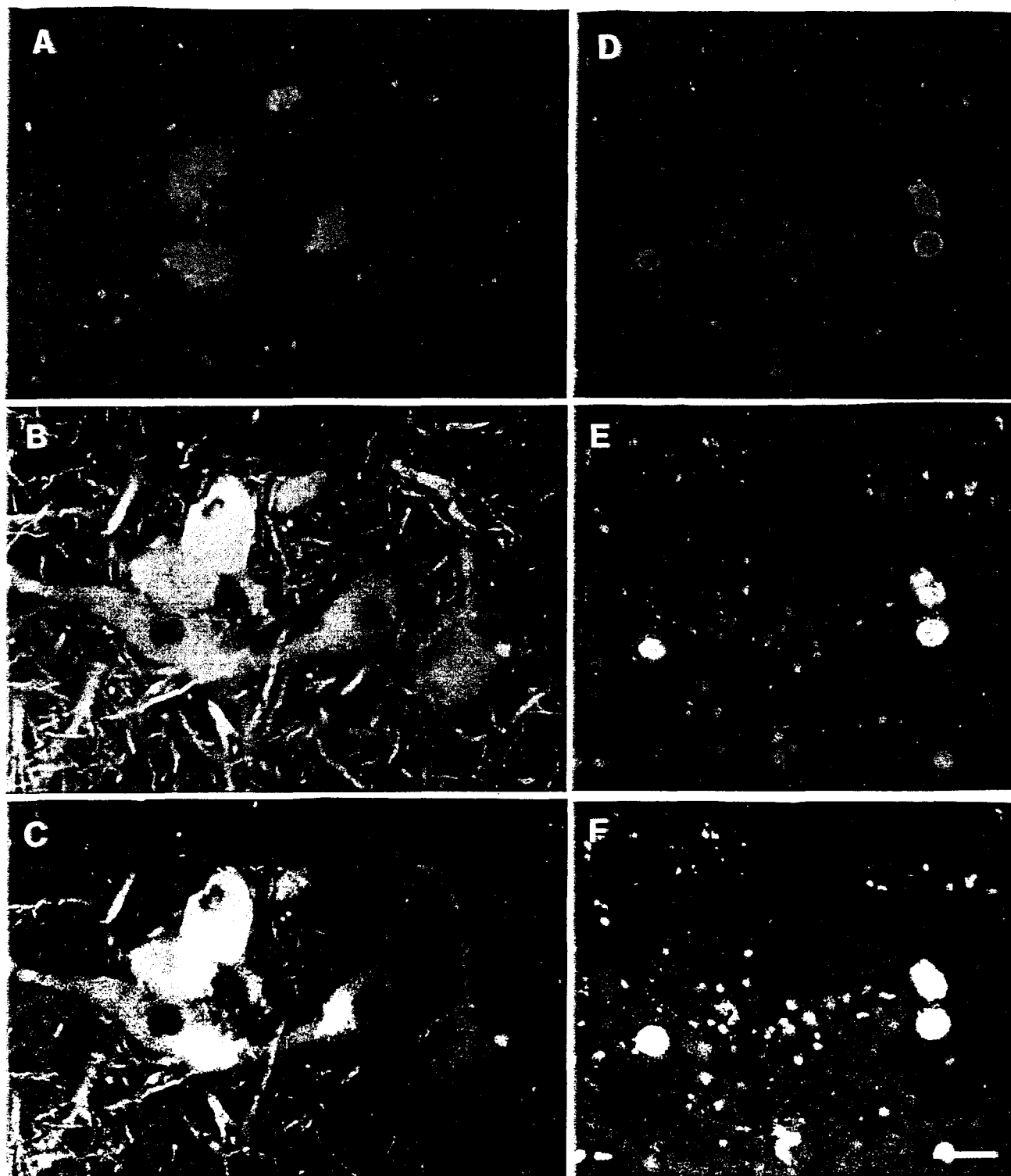


Figure 1 : Localisation cellulaire de la lactoferrine dans le mésencéphale humain. La détection des doubles marquages immunohistochimiques a été réalisée par fluorescence. A, B, C : marquage de la lactoferrine (rouge) et de la tyrosine hydroxylase (vert) dans les neurones dopaminergiques ; D, E, F : marquage de la lactoferrine (rouge) et du récepteur CR1 du complément (vert) dans les cellules microgliales. La coloration blanche est due à la co-localisation des deux marquages (C, F). Barre d'échelle = 16 μ m.

particulières mais semble être réparti sur toute la surface des cellules (figure 1, D et F, article 3). Cependant, il est difficile de déterminer si ce marquage est extracellulaire et/ou intracellulaire. A part quelques granulocytes neutrophiles localisés dans les capillaires, le marquage de la lactoferrine n'a été observé sur aucun autre type cellulaire de cette région. Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle la lactoferrine est présente dans les neurones dopaminergiques et montrent également que cette protéine est localisée dans une population de cellules gliales identifiées comme étant des cellules microgliales.

Expression de la lactoferrine dans le mésencéphale

Après la détermination précise de la localisation cellulaire de la lactoferrine dans le mésencéphale, l'expression de ses messagers a été étudiée dans cette région à l'aide de la technique d'hybridation *in situ*. Préalablement à cette étude, l'état de conservation des coupes a été vérifié quant à leur contenu en messenger de la transferrine, protéine largement produite par la population oligodendrocytaire du SNC. Ainsi, de nombreux oligodendrocytes (tête de flèche) expriment les messagers de la transferrine (figure 2, C, article 3). L'hybridation de la ribosonde antisens spécifique de la lactoferrine humaine montre que les messagers de la lactoferrine sont également exprimés dans cette région (flèches), ils sont quant à eux localisés dans un type cellulaire différent, d'une part, des oligodendrocytes identifiés par les messagers de la transferrine, et d'autre part, des neurones dopaminergiques (flèche fine) identifiés par la présence de neuromélanine (figure 2, A, article 3). La spécificité de cette hybridation a été vérifiée par l'utilisation d'une ribosonde sens spécifique de la lactoferrine humaine qui ne montre aucune hybridation avec les cellules du mésencéphale (figure 2, B, article 3). Les cellules qui expriment les messagers de la lactoferrine présentent certaines particularités, telles que des granulations denses importantes de coloration jaune, une taille proche de celle des cellules microgliales et leur distribution localisée uniquement autour de la zone des neurones dopaminergiques.

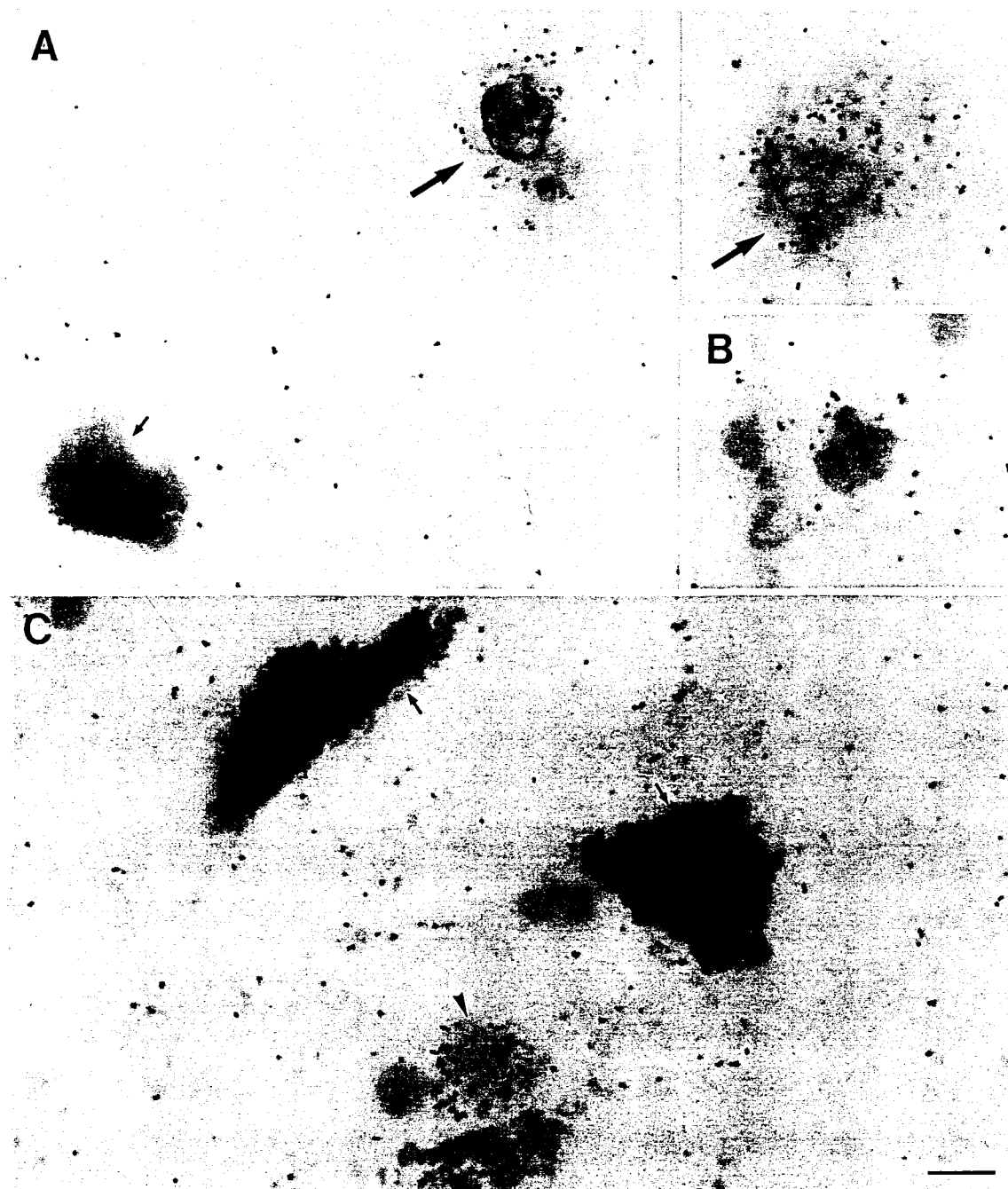


Figure 2 : Expression des messagers de la lactoferrine humaine et de la transferrine humaine dans le mésencéphale humain. Après hybridation avec les [35 S]-ribosondes, les coupes ont été révélées puis contre-colorées avec le bleu azur. A : expression des messagers de la lactoferrine humaine (flèches) (hybridation avec la ribosonde antisens spécifique de la lactoferrine humaine) ; B : contrôle (hybridation avec la ribosonde sens spécifique de la lactoferrine humaine) ; C : expression des messagers de la transferrine humaine dans un oligodendrocyte (tête de flèche) (hybridation avec la ribosonde antisens spécifique de la transferrine humaine). Flèches fines : neurones dopaminergiques mélanisés. Barre d'échelle = 40 μ m.

Identification des cellules qui expriment les messagers de la lactoferrine dans le mésencéphale

Les granulations pigmentées présentes dans les cellules qui expriment les messagers de la lactoferrine semblent caractéristiques de ces cellules et permettent de les repérer facilement. Des expériences immunohistochimiques de simple marquage ont été réalisées à l'aide d'anticorps dirigés contre une batterie de marqueurs spécifiques des différents types cellulaires présents dans le SNC. Ainsi, cette étude montre que les cellules exprimant les messagers de la lactoferrine ne sont pas marquées ni par des anticorps dirigés contre la GFAP ("Glial Fibrillary Acidic Protein"), marqueur des astrocytes, ni par ceux dirigés contre le neurofilament, marqueur des neurones. La technique de fixation utilisée ne nous a pas permis de tester de marqueurs oligodendrocytaires. En revanche, les cellules qui expriment les messagers de la lactoferrine sont marquées par le CD68 (figure 3, article 3). Ce marqueur de surface spécifique des cellules de lignées macrophagiques activées est un témoin de l'activité phagocytaire de ces cellules. Ces résultats confirment que la lactoferrine est bien présente dans le mésencéphale au niveau de cellules microgliales activées et indiquent qu'elle est produite par des cellules microgliales activées particulières situées à proximité des neurones dopaminergiques et présentant des granulations pigmentées importantes.

La présence de la lactoferrine dans les neurones dopaminergiques, et tout particulièrement au niveau des agrégats de neuromélanine, pourrait s'expliquer par la libération de cette protéine par les cellules microgliales aux alentours des neurones dopaminergiques et sa capture par ces cellules neuronales.

Interaction de la lactoferrine avec la mélanine

Dans les neurones dopaminergiques, la lactoferrine est distribuée de façon similaire aux agrégats de neuromélanine, une interaction entre la lactoferrine et la mélanine à l'intérieur de ces cellules pourrait être à l'origine de la co-localisation de ces deux molécules. Afin de vérifier cette hypothèse, la fixation de la lactoferrine humaine marquée à l'¹²⁵Iode a été étudiée sur la mélanine immobilisée. Les propriétés physico-chimiques de la mélanine synthétique sont très proches de celles de la neuromélanine isolée de la

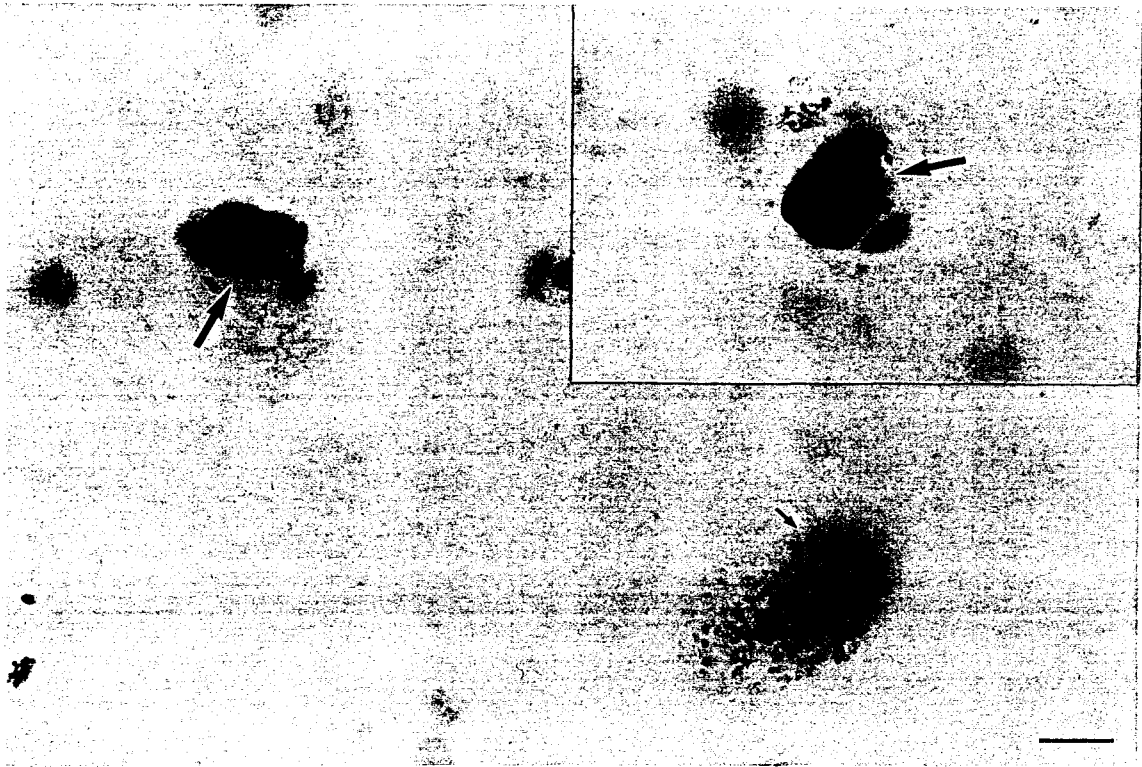


Figure 3 : Détection du marqueur de surface CD 68 sur les cellules qui expriment les messagers de la lactoferrine. La révélation du marquage immunohistochimique a été réalisée par le système AEC. Ce marquage est localisé en surface des cellules (flèches). Flèche fine : neurone dopaminergique mélanisé. Barre d'échelle = 40 μ m.

substance noire, c'est pourquoi nous avons utilisé la mélanine synthétique pour notre étude. La fixation de la lactoferrine sur la mélanine immobilisée est dépendante de la concentration, saturable et inhibée à 90 % en présence d'un excès de lactoferrine native non marquée (figure 4, A, article 3), suggérant que l'interaction de la lactoferrine avec la mélanine est spécifique. La représentation de Scatchard (figure 4, B, article 3) indique la présence d'un seul type de sites de fixation. La constante de dissociation est égale à 100 ± 9 nM et le rapport de fixation est de l'ordre de $1,4 \pm 0,03$ ng de lactoferrine/ μ g de mélanine immobilisée.

La nature de l'interaction de la lactoferrine avec la mélanine a été étudiée de façon préliminaire par des expériences de compétition en présence de la lactoferrine native non marquée ou de protamine (figure 5, article 3). Comme attendu, la fixation de la lactoferrine marquée est spécifiquement réduite jusqu'à 50 % en présence de 100 excès molaire de lactoferrine non marquée. Par contre, cette fixation n'est pas affectée en présence de concentrations élevées de protamine. La protamine, de même que la lactoferrine, est bien connue pour ses capacités d'interaction avec des molécules anioniques. Le fait que la protamine n'ait aucun effet sur la fixation de la lactoferrine sur la mélanine exclut une interaction de nature anionique entre ces deux molécules.

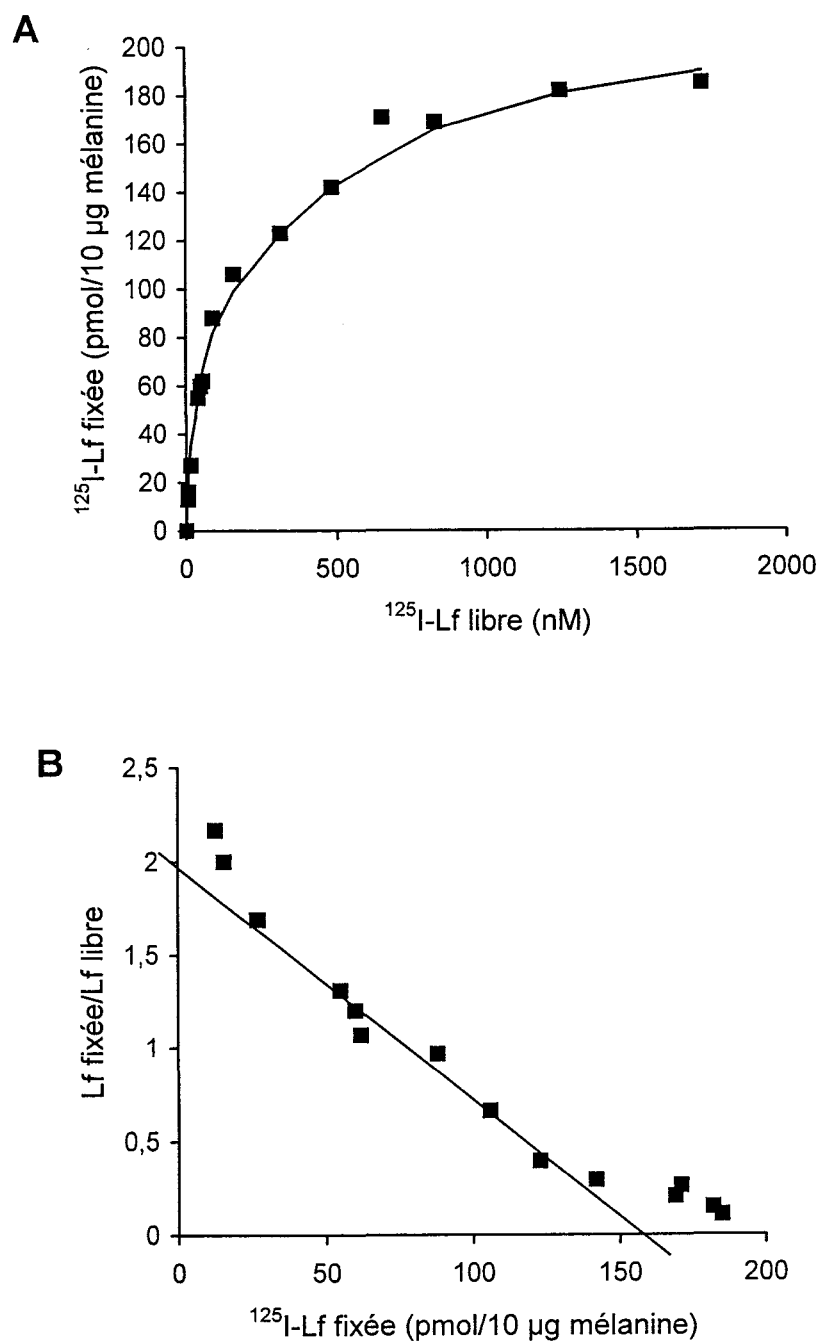


Figure 4 : Fixation de la [^{125}I]-Lf sur mélanine immobilisée. La fixation de la lactoferrine a été étudiée en incubant la mélanine immobilisée pendant 1 heure à température ambiante avec des concentrations croissantes de [^{125}I]-Lf. La fixation spécifique a été obtenue par soustraction de la fixation non-spécifique de la fixation totale. A : courbe de saturation ; B : représentation de Scatchard. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences en triple (\pm SEM).

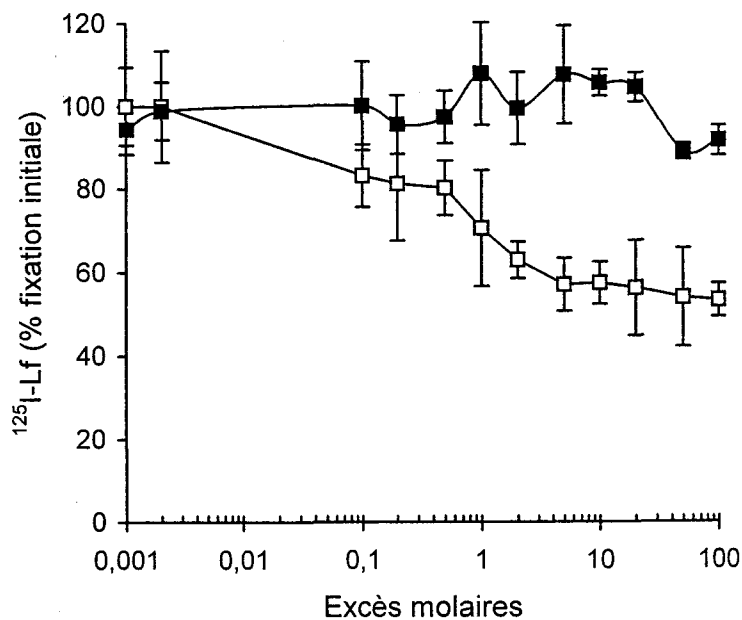


Figure 5 : Compétition de la fixation de la [^{125}I]-Lf sur mélanine immobilisée.

Ces expériences ont été réalisées en incubant la mélanine immobilisée en présence de 650 nM [^{125}I]-Lf et de concentration croissante de Lf non marquée (□) ou de protamine (■). Après 1 heure d'incubation, l'excédent est éliminé par lavage et la radioactivité associée à la mélanine est comptée et exprimée en % de la fixation de la Lf marquée en absence de compétiteur. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences en triple (\pm SEM).

Conclusion

Leveugle et coll. (1996) ont été les premiers à décrire la présence de plusieurs populations cellulaires immunomarquées par la lactoferrine dans la région du mésencéphale. La technique d'immunohistochimie à double marquage nous a permis d'identifier précisément ces cellules. Ainsi, la lactoferrine est localisée dans les neurones dopaminergiques à l'intérieur desquels elle semble être concentrée au niveau des agrégats de neuromélanine. Elle est également présente dans les cellules microgliales, où elle semble être répartie sur toute leur surface. La compartimentation différente de la lactoferrine dans ces deux populations cellulaires est vraisemblablement due au fait qu'elle emprunte des voies différentes : soit de synthèse conduisant à la sécrétion, soit d'endocytose suivie d'accumulation.

L'expression des messagers de la lactoferrine a ensuite été étudiée. Il existe bien une population cellulaire du mésencéphale qui exprime les messagers de la lactoferrine, cependant cette population est différente des neurones dopaminergiques. Nous pouvons donc tout d'abord en conclure que la lactoferrine présente dans les neurones dopaminergiques n'est pas synthétisée par ces cellules mais provient d'un mécanisme de capture qui aboutit à l'accumulation de la lactoferrine au niveau des agrégats de neuromélanine. Cette hypothèse est renforcée par l'existence de récepteurs spécifiques de la lactoferrine à la surface de ces cellules (Faucheux *et al.*, 1995). Ces mêmes récepteurs, mis en évidence sur les cellules lymphocytaires activées isolées du sang périphérique (Mazurier *et al.*, 1989) puis sur les cellules de la lignée lymphoblastique T Jurkat (Bi *et al.*, 1994) sont à la base d'un mécanisme d'endocytose de la lactoferrine dans les cellules de la lignée lymphoblastique T Jurkat (Bi *et al.*, 1996). Les récepteurs de la lactoferrine qui sont présents à la surface des neurones dopaminergiques pourraient ainsi permettre la fixation de la lactoferrine à la surface des cellules puis son endocytose à l'intérieur des neurones dopaminergiques. Cependant, le devenir de la lactoferrine après endocytose est différent selon le type cellulaire. Dans le cas des cellules Jurkat, le trafic intracellulaire de la lactoferrine fait intervenir les vésicules recouvertes de clathrine et aboutit au recyclage de la majorité des molécules endocytées, seulement 30 % étant dégradé (Bi *et al.*, 1996). La lactoferrine reste intacte dans les cellules endothéliales qui permettent son transport à travers la BHE (Fillebeen *et al.*, 1999). Par contre, lors de son transport à travers les

cellules de la lignée HT29 la lactoferrine est majoritairement dégradée (Mikogami *et al.*, 1994). Aucun processus de stockage n'a encore été décrit pour la lactoferrine après internalisation. Ainsi, le mécanisme qui permet l'accumulation de la lactoferrine spécifiquement au niveau des agrégats de neuromélanine dans les neurones dopaminergiques reste à être identifié.

Les messagers de la lactoferrine sont produits par des cellules du mésencéphale qui expriment à leur surface le marqueur CD68, indiquant que la lactoferrine est produite par des cellules microgliales activées présentant une activité phagocytaire. Ces cellules situées à proximité des neurones dopaminergiques mélanisées présentent également des granulations pigmentées particulières. Ainsi, toutes les cellules microgliales n'expriment pas les messagers de la lactoferrine, indiquant que la lactoferrine associée avec les cellules microgliales non pigmentées ne provient pas d'une synthèse *in situ*. Cette lactoferrine est donc apportée à ces cellules par l'intermédiaire d'un mécanisme d'internalisation. De nombreux auteurs ont décrit l'interaction des monocytes/macrophages ou des cellules de lignées macrophagiques avec la lactoferrine (Bennett et Davis, 1981 ; Campbell, 1982 ; Birgens *et al.*, 1983 ; Goavec *et al.*, 1985 ; Ismail et Brock, 1993), et bien que la nature de cette interaction soit encore mal définie, il semble que les cellules macrophagiques soient capables d'endocyter la lactoferrine (Van Snick *et al.*, 1977 ; Birgens *et al.*, 1988). Un mécanisme apparenté pourrait expliquer le marquage de surface de la lactoferrine et sa présence à l'intérieur des cellules microgliales non pigmentées.

Seules les cellules microgliales activées présentant des granulations pigmentées sont capables de synthétiser les messagers de la lactoferrine. Les cellules microgliales ont une origine périphérique monocyttaire, lors de la vie foetale elles ont migré jusqu'au SNC où elles se sont ensuite différenciées tout en conservant leurs caractéristiques macrophagiques (Ling et Wong, 1993). Siebert et Huang (1997) ont décrit la présence des messagers de la lactoferrine humaine dans le SNC, mais également dans les cellules de la lignée promyélocytaire HL60 qui ont la capacité d'être différenciées en macrophages. Il semble donc que plusieurs lignées de cellules macrophagiques soient capables d'exprimer les messagers de la lactoferrine. La nature particulière des cellules microgliales exprimant les messagers de la lactoferrine montre que la synthèse de cette protéine apparaît au cours de l'activation de ces cellules qui acquièrent ainsi leur activité phagocytaire. Ce phénomène est probablement en relation avec la présence de granulations pigmentées à l'intérieur des

cellules. Les cellules microgliales, de par leur appartenance au système macrophagique, possèdent des propriétés analogues à celles des cellules de ce système (Gehrman *et al.*, 1995). Ainsi, les cellules microgliales activées présentent une activité phagocytaire se traduisant par la production d'un flot de radicaux libres oxygénés neurotoxiques (Colton et Gilbert, 1993). La lactoferrine possède des propriétés anti-oxydantes qui lui permettraient de protéger les tissus périphériques situés à proximité du lieu de libération de ces radicaux libres (Gutteridge *et al.*, 1981). Ainsi, la lactoferrine produite par les cellules microgliales activées pourrait être libérée de ces cellules de manière à limiter les dommages occasionnés aux cellules saines voisines.

Les cellules qui expriment les messagers de la lactoferrine se trouvent à proximité des neurones dopaminergiques mélanisés. Après libération des cellules microgliales activées, cette lactoferrine pourrait être captée par les neurones dopaminergiques. Ces neurones de par leur rôle dans le métabolisme de la dopamine sont soumis à un stress oxydatif important et continu. Le taux de fer dans la substance noire est un des plus importants de l'organisme, ce qui rend les cellules de cette région fortement sensibles aux agents oxydants. Les neurones dopaminergiques mélanisés étant particulièrement vulnérables au stress oxydatif pourraient capter la lactoferrine afin qu'elle les protège contre ce stress.

Bien que le mécanisme qui permet, après endocytose, l'accumulation de la lactoferrine à l'intérieur des neurones dopaminergiques spécifiquement au niveau des agrégats de neuromélanine soit inconnu, nous pouvons supposer que l'interaction de la lactoferrine avec la neuromélanine intervient dans ce processus. En effet, nous avons mis en évidence l'existence d'interactions spécifiques entre la lactoferrine et la mélanine. Il semble également que cette interaction ne soit pas de nature anionique. Cependant le site d'interaction de la lactoferrine avec la neuromélanine reste à être défini précisément. La neuromélanine est capable de fixer les métaux, tels que le fer (Ben-Shachar *et al.*, 1991). Une augmentation de la concentration en fer a été observée dans la substance noire de patients atteints de la maladie de Parkinson (Dexter *et al.*, 1989). En présence d'un excès de fer, le stress oxydatif provoqué par une combinaison de radicaux libres et de ce métal pourrait contribuer à la destruction sélective des neurones dopaminergiques mélanisés (Agid, 1991 ; Agid *et al.*, 1993). De plus, chez des patients atteints de la maladie de Parkinson, les neurones dopaminergiques contenant des quantités importantes de

neuromélanine sont plus vulnérables au processus neurodégénératif que les neurones contenant peu de neuromélanine (Hirsch *et al.*, 1988). Après avoir endocyté la lactoferrine, les neurones dopaminergiques mélanisés pourraient ensuite l'adresser spécifiquement vers les agrégats de neuromélanine de manière à limiter le stress oxydatif. Ce mécanisme pourrait être amplifié dans le cas de la maladie de Parkinson où une augmentation du taux de lactoferrine a été détectée dans les neurones survivants (Leveugle *et al.*, 1996).

Chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, l'augmentation du processus d'accumulation de la lactoferrine dans les neurones dopaminergiques mélanisés survivants pourrait être due à une capture plus importante de cette protéine par les cellules. Ce phénomène pourrait être lié à une libération ou une production accrue par les cellules microgliales activées de lactoferrine. En effet, lors de cette maladie de nombreuses cellules microgliales activées ont été observées dans les régions affectées par le processus neurodégénératif (McGeer et McGeer, 1995). L'augmentation du nombre de cellules microgliales activées ainsi qu'une élévation de la sécrétion de lactoferrine pourraient donc contribuer à un relargage accru de cette protéine à proximité des neurones dopaminergiques en dégénérescence. Les neurones sains situés aux alentours pourraient quant à eux capter une quantité plus importante de lactoferrine de manière à se protéger. Ces mécanismes restent néanmoins à être vérifiés. Il serait donc intéressant d'étudier l'expression de la lactoferrine chez des patients atteints de la maladie de Parkinson.

ARTICLE 4 :

LA LACTOFERRINE EST SYNTHETISEE PAR LE SNC DE LA SOURIS ET SON EXPRESSION EST AUGMENTEE APRES UN TRAITEMENT AU MPTP

Introduction

Afin d'étudier l'expression de la lactoferrine dans le SNC pathologique et tout particulièrement dans le cas de la maladie de Parkinson, nous avons entrepris une étude sur un modèle animal.

La découverte du MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine) a ouvert de nouvelles voies d'étude de la maladie de Parkinson. Cette neurotoxine détruit sélectivement les neurones dopaminergiques de la voie nigro-striatale (Davis *et al.*, 1979), ce qui aboutit à une chute de la production de dopamine. Elle altère également l'activité de plusieurs enzymes anti-oxydantes, telles que la catalase, la superoxyde dismutase et la gamma-glutamylcystéine synthétase (Hung *et al.*, 1998). La toxicité du MPTP apparaît après sa conversion par la monoamine oxydase en MPP⁺ (Chiba *et al.*, 1984) qui mène à la production massive de radicaux libres oxygénés (Knight, 1997) (figure 19, page 169). Cette neurotoxine, qui est la plus utilisée de nos jours pour la mise au point de modèles animaux expérimentaux de la maladie de Parkinson, est capable de reproduire les différentes atteintes de cette maladie chez certains animaux. Les souris traitées au MPTP constituent un bon modèle bien documenté (Gerlacht *et al.*, 1996), qui nous a permis d'étudier l'expression de la lactoferrine dans le SNC sain et pathologique.

Dans un premier temps, nous avons étudié le niveau d'expression de la lactoferrine dans le SNC de souris saines. Cette étude a tout d'abord permis de connaître la distribution de la lactoferrine, plus particulièrement en fonction de l'âge des animaux. Elle a ensuite porté sur la mise en évidence de l'expression des messagers de la lactoferrine.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression de la lactoferrine dans le SNC de souris traitées au MPTP. Préalablement à cette étude, nous avons vérifié l'effet toxique du MPTP, en déterminant le niveau de dopamine et de ses métabolites dans le striatum des souris traitées. Afin de suivre le processus de détoxification mis en place à la suite des dommages occasionnés par l'agent neurotoxique, nous avons étudié l'expression de différentes enzymes anti-oxydantes, ainsi que celle de la lactoferrine, au cours des jours qui suivent l'administration du MPTP.

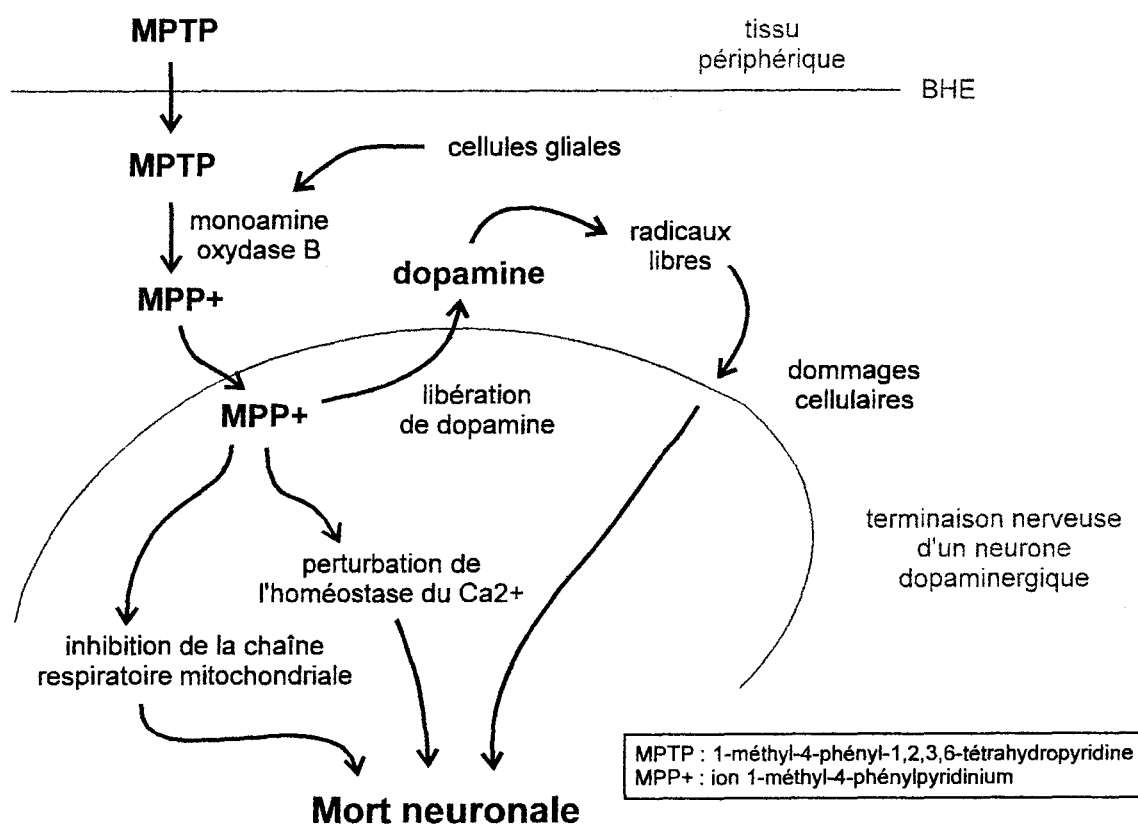


Figure 19 : Mécanismes potentiels de l'action neurotoxique du MPTP sur les neurones dopaminergiques (d'après Gerlach *et al.*, 1996).

Ce travail a fait l'objet de l'article suivant : « **Lactoferrin is synthesized by mouse brain tissue and its expression is enhanced after MPTP treatment** », accepté pour publication dans *Molecular Brain Research*.

Lactoferrin is synthesized by mouse brain tissue and its expression is enhanced after MPTP treatment

Carine Fillebeen^a, Valérie Mitchell^b, David Dexter^c, Monique Benaissa^a, Jean-Claude Beauvillain^b, Geneviève Spik^a and Annick Pierce^{a*}

^aLaboratoire de Chimie Biologique, UMR CNRS 111, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

^bLaboratoire de Neuroendocrinologie et Physiopathologie Neuronale, INSERM U 422, Place de Verdun, F-59045 Lille, France

^cParkinson's Disease Research Unit, Department of Neurodegenerative Disorders, Division of Neuroscience and Psychological Medicine, Imperial College School of Medicine, Charring Cross Hospital, Fulham Palace Road, London W6 8RF, United Kingdom

* Corresponding author. Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.
Fax : +333-2043-6555 ; E-mail : a.pierce@univ-lille1.fr

This work was supported by the Université des Sciences et Technologies de Lille I, the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR CNRS 111), the Ministère de l'Éducation Nationale and the Région Nord-Pas-de-Calais (Axe régional : maladies neurodégénératives et vieillissement).

Abbreviations : Lf, lactoferrin; Tf, transferrin; LfR, lactoferrin receptor; TfR, transferrin receptor; LRP, low density lipoprotein receptor-related protein; SOD, superoxide dismutase; IRE, iron responsive element; IRE-BP, iron responsive element binding protein; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; DO, dopamine; DOPAC, dihydroxyphenyl acetic acid; HVA, homovanillic acid; PCR, polymerase chain reaction; ROS, radical oxygen species; BBB, blood-brain-barrier.

ABSTRACT

The presence of iron in brain tissue in increased concentrations in Parkinson's disease cases, where it might be responsible for oxidative stress and the parallel observation that the iron transporter lactoferrin was present in increased amounts in surviving neurons, led us to study the synthesis of lactoferrin in a mouse model of Parkinson's disease. In this context the origin and expression of brain lactoferrin in normal, aged and MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)-treated mice were investigated.

Lactoferrin immunostaining was observed mainly on microvessels in the cerebral cortex of the adult mice and to a greater extent in older mice. Lactoferrin immunoreactivity was also present in the hippocampus only in the aged mouse brains, associated with structures which seemed to be pyramidal neurons and fibers. After RT-PCR, lactoferrin transcripts were found in mouse brain tissue whatever the age of the animals studied but the level of their expression was very low. No up-regulation of lactoferrin was detectable during aging.

Lactoferrin distribution and expression in the MPTP-induced parkinsonian mouse model were also investigated. A marked depletion of dopamine and its metabolites; dihydroxyphenyl acetic acid and homovanillic acid occurred in the high dose MPTP-treated mice. The level of lactoferrin expression was found to be markedly increased in the same animals but lactoferrin protein levels, as indicated by lactoferrin immunoreactivity detected in the same brain region, were not altered in the areas affected by the treatment. This up-regulation occurred on the first day after MPTP administration, as was the case for antioxidant enzymes such as catalase and gamma-glutamylcysteine synthetase.

Classification terms : Molecular Brain Research

Theme J : Disorders of the nervous system

Topic : Degenerative disease : Parkinson's

Keywords : lactoferrin, iron, MPTP, neurodegenerative disorders, oxidative stress

INTRODUCTION

The etiology of Parkinson's disease remains the subject of much controversy: neurotoxins, mitochondrial dysfunction and environmental factors such as heavy metals have been implicated. Iron is an abundant transition metal in the brain and plays a central role in neuronal development as an essential component of oxidative metabolism and as a co-factor for numerous enzymes. It is particularly abundant in the *basal ganglia* where its concentration nearly doubles in Parkinson's disease cases [10]. Excessive iron deposits occur in normal aging and in various neurodegenerative diseases [7,59] and contribute to the cascade of events involved in neuronal death [26]. Iron has a well documented ability to initiate oxidative stress via the generation of cytotoxic hydroxyl radicals through the Fenton reaction. Its intracellular concentration is tightly regulated via the IRE-IRE/BP system which plays a crucial role in maintaining brain iron homeostasis. Iron chelators and their receptors may also play a part in controlling its toxicity, but no significant variation in the levels of expression of transferrin (Tf), transferrin receptor (TfR) and ferritin have been found in pathological brain tissue although conflicting results have also been reported [7,10,12]. In parallel, the expression of other iron transport proteins such as melanotransferrin, ceruloplasmin and the divalent cation transporter has been investigated and their putative involvement in iron accumulation studied in brain tissue [49]. Despite these studies, the causes and consequences of the excessive iron deposits in the brain are unknown, as is the nature of the responsible iron complex. Recently, another iron-binding protein, lactoferrin (Lf) was found to be associated with aging and particularly with neurodegenerative disorders [28,33,34,46].

Lf is a mammalian cationic monomeric glycoprotein belonging to the transferrin family which displays considerable structural homology with Tf. Both proteins are constituted by two lobes each possessing one iron-binding site with the capacity to bind reversibly one ferric iron [1] but Lf binds iron more tightly and in this way acts as a powerful iron chelator with antioxidant properties [4,6,56]. Lf also has distinct biological functions and is particularly involved in host defense against infection and severe inflammation [reviewed in 44].

Lf has been isolated primarily from human milk [41] and is localized at the mucosal surface where it is secreted by glandular epithelial cells [36]. It is also expressed in immune cells where it is detected in the secondary granules of neutrophils from which it is released

during the inflammatory process [37]. Lf is also found in cerebral fluid where its concentration is enhanced in cases of acute cerebrovascular lesions [22,61] and meningitis [19]. Lf is practically absent from the normal human cerebral cortex [33] but is present in the mesencephalon mainly concentrated in the nigrostriatal dopaminergic neurons [34]. Its distribution and concentration change during aging and in neurodegenerative disorders [28,33,34,46]. Lf is present in the hippocampus and inferior temporal cortex in cases of Alzheimer's disease, Pick's disease and amyloid lateral sclerosis associated with the characteristic lesions such as senile plaques, neurofibrillary tangles or Pick bodies [33]. In the mesencephalon in the case of Parkinson's disease [34] where the loss of Lf-stained cells parallels the decrease in the total neuronal population, the surviving cells have a higher Lf concentration than normal neurons. Lf seems always to be associated with the inflammatory foci and its concentration is more markedly increased in the specific brain regions adversely affected by the neurodegenerative lesions. In parallel, the expression of the 105 kDa protein described as the T-lymphocyte Lf receptor (LfR) [39] has been studied in the mesencephalon and was found associated to neurons, the cerebral microvasculature and in some cases on glial cells [13]. In Parkinson's patients the LfR immunoreactivity was enhanced and more pronounced in those areas where the loss of the dopaminergic neurons was severe [13].

The functions of Lf within either the normal or pathological brain are unknown. The distribution of Lf in the vicinity of microvessels led us first to investigate the origin of this Lf and we recently demonstrated that Lf crosses the blood-brain-barrier (BBB) via a receptor-mediated pathway involving the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) [14]. Nevertheless, the presence of Lf transcripts in human brain tissue [58] and the high concentration of Lf in the *basal ganglia* which increases in pathological process are in favor of an *in situ* synthesis of Lf. In order to determine whether Lf expression might be up-regulated in pathogenic conditions and specifically during oxidative stress, we have used MPTP-treated mice as an animal model for Parkinson's disease [27] and in this context, we investigated the origin and level of expression of Lf found in normal, aged and MPTP-treated mouse brain tissues. MPTP is a remarkably selective neurotoxin and its systemic administration to experimental animals produces extensive destruction of nigrostriatal dopaminergic neurons [9]. MPTP, which is known to alter the activity of some antioxidant enzymes such as catalase, Cu/Zn superoxide dismutase (CuZnSOD) and gamma-glutamylcysteine synthetase [24], might also influence Lf expression. Its toxicity is

produced by its conversion to MPP⁺ by mitochondrial monoamine oxidase B [5] which leads to free radical generation [29]. Cell damage is provoked when these free radicals react with transition metals such as iron, with the creation of even more reactive radical species [20,64]. This supports the importance of iron in causing cell damage through oxidative stress, and the possible protective action of iron chelators such as Lf.

Here we observed that Lf is mainly associated with microvessels in adult mouse brain tissue with the highest levels of labeling seen in aged mice. Lf appears in the hippocampus with aging associated with structures such as pyramidal neurons and fibers. We also show that mouse cerebral Lf is synthesized *in situ*. We have further been able to demonstrate that this synthesis is up-regulated in response to oxidative stress since its level of expression was increased in MPTP-treated mouse brains. We discuss these results in the context of Lf function as an iron chelator and antioxidant compound.

MATERIALS AND METHODS

Animal

Young 1 week old, adult 2 month old, aged 18 month old male and lactating C57/black mice were purchased from CERJ (Le Genest Saint Isle, France). The animals were housed in a well-ventilated room at an ambient temperature of 20°C, with a day/night cycle : 8.00 a.m.- 8.00 p.m. and with food and water *ad libitum*. Animal care was in accordance with institutional guidelines. A group of four animals was used for each set of experiments.

MPTP administration

MPTP was given at 2 or 20 mg/kg (MPTP-HCl) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) for a total of 4 doses (8 or 80 mg/kg total) intra-peritoneally in 0.2 ml of 0.9 % saline at 2 h intervals to adult male C57/black mice (25-30g). Control mice received saline only. Animals were sacrificed at days 1, 3, 5 or 7 after the treatment.

Tissue preparation

The animals were anesthetized with ketamine 20 mg/kg, zylazine 0.2 ml/kg and then subjected to intra-cardiac perfusion with 0.9 % saline at room temperature for 1 min followed by 4 % paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 20 min. The lactating mammary gland and the brain were dissected and immersed in the same fixative for 2 h. The tissues were then washed overnight in 0.05 M Coons veronal buffer, pH 7.4, containing 20 % sucrose, embedded in Tissue Tek (Miles Laboratories, USA), and rapidly frozen in liquid nitrogen. Sections of 12 μ m thickness were cut on a cryostat and thaw-mounted onto gelatin-coated slides. They were briefly air-dried and stored at -80°C until use.

Immunohistochemistry

The sections were warmed to room temperature and washed in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) for 10 min and subsequently placed in PBS containing 1% normal goat serum and 0.25 % Triton X-100 (incubation buffer) for 15 min. Endogenous biotin was eliminated from the sections by saturation with avidin using a blocking kit (Vector, Burlingame, USA), prior to immunohistochemistry. The sections were then incubated overnight in a humidified chamber with rabbit polyclonal anti-Lf antibodies (dilution 1:500) diluted in the incubating buffer at room temperature. The sections were then washed

in PBS, incubated with biotinylated secondary antibodies (dilution 1:150) in incubation buffer for 90 min at room temperature, followed by an amplification with the avidin/oxidase complex (Vectastain ABC kit, Vector, Burlingame, USA) for 90 min at room temperature. The reaction was developed with 0.5 mg/ml 3,3'-diaminobenzidine (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) dissolved in 100 mM Tris-HCl, pH 7.6, containing 0.01 % (v/v) H₂O₂ for 3 min.

In situ hybridization

Probe labeling

cRNA ³⁵S-labeled probes for the mouse Lf were prepared as follows. cDNA of mouse Lf [47] was sub-cloned into pBluescript and linearized with NcoI. This fragment corresponding to nucleotides 1466-2200 of the mouse Lf cDNA was used as a template for antisense riboprobe synthesis. This riboprobe was prepared from 100 ng of plasmid by transcription with 20 units of T7 RNA polymerase (Stratagene, USA) in the presence of 200 μCi α-³⁵S-CTP (Amersham Life Science, UK). Sense riboprobe was prepared in the same conditions with T3 RNA polymerase (Stratagene, USA). The labeled probes were separated from the unincorporated nucleotides on a Sephadex G-25 column (Stratagene, USA).

In situ hybridization

Slides warmed to room temperature were washed in 0.1 M glycine, 0.2 M Tris-HCl, pH 7.4, for 10 min prior to digestion with proteinase-K (1 μg/ml, in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA) for 15 min at 37°C, and rinsed in distilled water. The slides were postfixed with 4 % paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at room temperature for 15 min, rinsed in 0.1 M phosphate buffer and then acetylated with 0.25 % acetic anhydride, 0.1 M triethanol amine, pH 8.0 for 10 min at room temperature. After dehydration in an ascending ethanol series, the sections were air-dried. Hybridization was carried out in a buffer containing 50 % formamide, 0.3 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 10 % dextran sulphate, 1 x Denhardt's solution, 0.5 mg/ml *E. coli* tRNA, 100 mM dithiothreitol (DTT). The riboprobe, preheated at 80°C for 10 min in 0.1 M DTT, was added to the hybridization buffer at 4 x 10⁴ dpm/μl. The hybridization solution was applied to the sections which were then covered with a coverslip. After incubation in a humid chamber at 55°C for 16 h, the slides were immersed to remove the coverslips, twice at room

temperature in 4 x SSC, 10 mM DTT for 30 min and 1 h respectively. The sections were then washed in 50 % formamide, 0.3 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,5 mM EDTA, 100 mM DTT at 60°C for 30 min before treatment with 20 µg/ml ribonuclease A in 0.5 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M EDTA for 30 min at 37°C, followed by an additional wash in 2 x SSC and 0.1 x SSC at 60°C for 15 min. After dehydration the slides were dipped in photographic NTB-2 emulsion (Kodak, Eaubonne, France), dried and stored at room temperature. After exposure for 30 days, the slides were developed in D-19 developer (Kodak, Eaubonne, France), fixed in 30 % sodium-thiosulfate and counterstained with 0.1 % azur blue to localize cell nuclei. They were examined with an Axiophot microscope equipped with dark-field and bright-field condensers (Zeiss, Göttingen, Germany).

RNA extraction

After sacrifice of the animals, lactating mammary gland, liver and brain tissues were rapidly dissected and total RNA was extracted. Extraction of RNA was performed using the guanidium thiocyanate/cesium chloride method [54].

RT-PCR

Five micrograms of each total RNA preparation were reverse transcribed into first strand cDNA using oligo-dT primers (Stratagene, USA) and 20 units of reverse transcriptase (Stratagene, USA), then one twentieth of the mixture was amplified by PCR using primer pairs designed for specific detection of the mouse glyceraldehyde-3-phosphodehydrogenase (GAPDH) [53], Lf [51], catalase [55], Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn SOD) [3], tyrosine hydroxylase [25], gamma-glutamylcysteine synthetase [Andersen, J. K. and Kang, Y. S., unpublished work, AC : U85414] DNA target sequences (Table 1). Primer pairs were selected using Primer Premier Version 3.1 software (Biosoft International, Polo Alto, USA) and were located on distinct exons to avoid amplification of contaminating genomic DNA. The oligonucleotides were synthesized and purified by Eurogentec (Seraing, Belgium). First strand cDNA sequences were amplified by PCR using the Tfl Polymerase (Promega, Charbonnieres, France) in a PTC-100TM thermal cycler (MJ Research, Watertown, USA) programmed for the following steps : an initial denaturation at 94°C for 5 min, 35 cycles consisting of denaturation at 94°C for 5 min, annealing at 55°C for 1 min and primer extension step at 74°C for 1 min, which were followed by final extension step at 74°C for 5 min. Nested-PCR was performed on Lf products using internal

Table 1

Primer pairs used in the RT- and nested PCR reactions

Mouse Proteins	Primer sequences *	PCR product in bp
Lf	[S] 5'-AGTGAGGAGAAGCGCAAGTGTG-3' [AS] 5'-AGCCCCAGTGTAGCCTTGGTAT-3'	533
Lf nested	[S] 5'-TCCAGTCTTGGCAGAGAACCAG-3' [AS] 5'-TGGGAGCACACTTGTTCTCACC-3'	328
GAPDH	[S] 5'-TCCTGCACCACCAACTGCTTAG-3' [AS] 5'-TGGGTGGTCCAGGGTTTCTTAC-3'	575
Catalase	[A] 5'-TTTGGCCTCACAAGGACTACCC-3' [AS] 5'-CCTGCGTGTAGGTGTGAATTGC-3'	638
CuZnSOD	[A] 5'-AAGCGGTGAACCAGTTGTGTTG-3' [AS] 5'-GCTCCCAGCATTTCAGTCTTT-3'	354
Tyrosine hydroxylase	[A] 5'-CAGTTCTGTGCGTCGGGTGTCT-3' [AS] 5'-GGTCAGCCAACATGGGTACGTG-3'	589
Gamma-glutamylcysteine synthetase	[A] 5'-TCGGAGAGGAGAAAAGGTTGTC-3' [AS] 5'-CCACGAATACCACATAGGCAGA-3'	751

* S = sense primer; AS = anti-sense primer

nested-primer pairs (Table 1), 2 μ l of primary PCR mixture was diluted 10-fold and submitted to 20 or 35 secondary PCR cycles using the same temperature profile. PCR assays were performed in triplicate. Ten microliters of each PCR reaction were loaded on a 2 % agarose gel stained with 0.5 μ g/ml ethidium bromide, photographed and analysed by computerised densitometric scanning of the image using a Hewlett-Packard ScanJet 4c Scanner, the Deskan II software and the Quantiscan program (Biosoft International, Polo Alto, USA). Amplification products were subcloned using the TA cloningTM kit (Invitrogen, Groningen, The Netherlands), subsequent purification of plasmid DNA obtained was performed using the Nucleon kit (Amersham Life Science, UK) and sequence analyses were used to confirm the specificity of the PCR products by DNA sequencing using the Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing kit and α -³⁵S-dATP (Amersham Life Science, UK).

Determination of monoamine levels

Striatal levels of dopamine (DO), homovanillic acid (HVA) and dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) were determined by HPLC as previously described [52,63]. Briefly, the striated region of a half-brain was dissected out, weighed and sonicated in 10 vol of 0.4 M perchloric acid containing 1 mM EDTA and 0.5 % sodium metabisulphite by a Microson tissue disrupter. Dihydroxybenzyl amine (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) at 1 μ g/ml was added to the resulting homogenate (1: 9 ; v/v) as an internal standard. An aliquot of the supernatant was injected onto a Spherisorb ODS-2 reverse-phase column and chromatographic peaks detected by a BAS LC-4B amperometric detector with a thin-layer electrochemical cell fitted with a glass carbon working electrode and an Ag/AgCl reference electrode.

RESULTS

Lf distribution and expression in normal and aged mouse brain tissue

The investigation was performed on mouse brain tissues from young, adult and aged mice. Each brain was screened for the presence of Lf using sets of ten slides of four 12 μ m-sections which were representative of a whole mouse brain.

Lf immunoreactivity was observed in adult and aged mice and was not present in the brains of young animals. Of the areas studied, only the cortex and the hippocampus were stained. Lf immunoreactivity was found in the cerebral cortex with a stronger intensity of staining appearing in the oldest mice. In the hippocampus, Lf immunoreactivity was only present in the aged mice.

In the cerebral cortex, only microvessels displayed Lf immunoreactivity which appeared as dense deposits along the walls of small blood vessels (Fig. 1A). In the hippocampus Lf labeling was associated with specific cells which were scattered in the pyramidal layer. The morphology and size of these cells suggested that they were pyramidal neurons (Fig. 1,B). Lf immunoreactivity was also detectable on some granular structures in the hippocampus which may be fibers (Fig. 1,C). In parallel, Lf staining was studied in the mouse lactating mammary gland, which was used as a positive control and where a high level of Lf immunostaining was observed on most of the glandular epithelial cells which bordered the mammary secretory ducts (Fig. 2,A).

In situ hybridization was performed on the adult and aged mouse brain tissue and no *in situ* synthesis of Lf was observed in the different mouse brain sections analysed nor in any of the specific brain areas screened (data not shown). In the same conditions, the expression of the Lf mRNA was strongly present in the mouse lactating mammary gland which was used as a positive control. Lf mRNA was widely distributed in the lactating mammary gland and epithelial cells expressing this mRNA were found throughout the luminal duct (Fig. 2,B). This staining was not observed with the sense probe.

In order to determine whether mouse cerebral Lf was synthesized *in situ*, the presence of the Lf mRNA was first assayed using an amplification method. RT-PCR was carried out on the total RNA extracted from the young, adult and aged mouse brain tissues. The mouse lactating mammary gland total RNA was used as a positive control and the mouse liver total RNA as a negative control since this tissue does not produce Lf. The constitutively expressed house-keeping gene GAPDH was used as an internal control. Levels of GAPDH

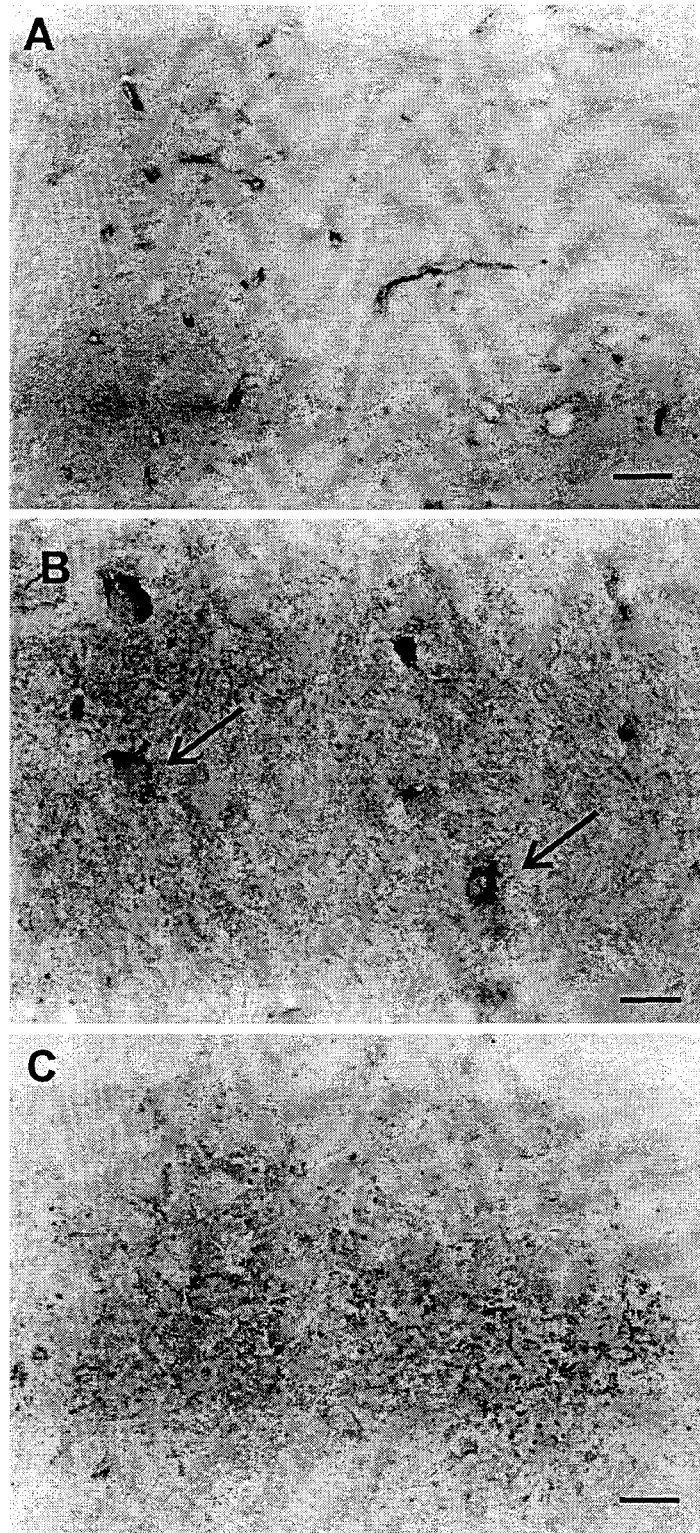


Fig. 1. Distribution of Lf immunoreactivity in the mouse brain tissue of a 18 month old mouse. A : photomicrograph of the cerebral cortex with staining for Lf associated with microvessels; B : photomicrograph of the hippocampus, Lf staining in the pyramidal layer associated with pyramidal neurons (arrows); C : photomicrograph of the hippocampus, Lf immunoreactivity associated with granular structures such as fibers. Bars: A = 16 μm ; B = 47 μm ; C = 40 μm .

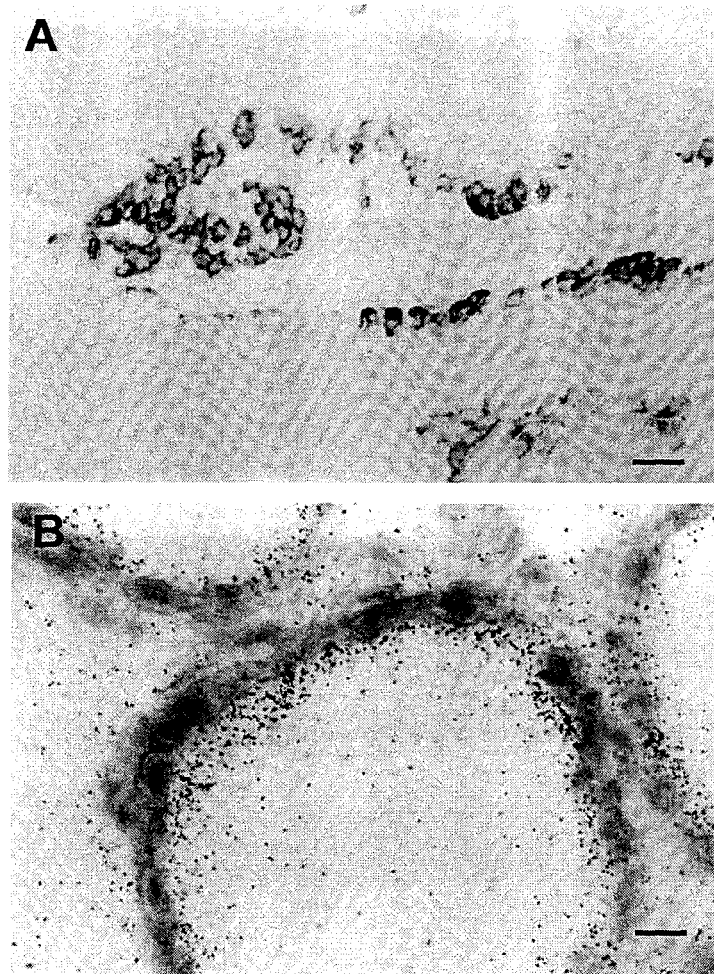


Fig. 2. Distribution of Lf and its mRNA in the mouse lactating mammary gland. A: photomicrograph of Lf immunoreactivity associated with glandular epithelial cells bordering a mammary secretory duct; B: photomicrograph of a photoemulsion-coated section counterstained with azur blue and hybridized with the antisense riboprobe of mouse Lf showing Lf synthesis by the epithelial cells. Bars: A = 16 μm ; B = 40 μm .

expression were constant in all the mouse tissues studied (Fig. 3,B). Thirty five cycles of amplification were sufficient to allow the visualization of the Lf messenger in the mouse lactating mammary gland, whereas nested-PCR had to be performed in the case of the mouse brain cDNA and 35 additional cycles with internal oligonucleotides were needed to obtain a visible signal for Lf mRNA (Fig. 3,A). No amplification was visible after 70 cycles of nested-PCR with total liver RNA.

Thus Lf is synthesized in the mouse brain tissues since both Lf protein and mRNA were detected. No up-regulation of Lf synthesis occurs with aging since no significant variation of Lf gene-expression was observed (Fig. 3). Lf mRNA was detected at a very low level in this tissue compared to the lactating mammary gland which explains why Lf transcripts were not detectable by ISH.

Lf distribution and expression in MPTP-treated mouse brain tissue

In order to determine whether Lf synthesis is up-regulated in pathological situations, MPTP treatment of mice was used as a model for parkinsonian pathology. Corresponding experiments were performed on mice seven days after the treatment.

The determination of monoamine levels was carried out to confirm the toxic effect of MPTP. The extent of the MPTP-induced lesions was calculated by comparing DO, DOPAC and HVA concentrations in a sample of striatal tissue of the treated and untreated animals. In Figure 4, decreases in the levels of DO and its metabolites were evident after the injection of the higher dose of MPTP (80 mg/kg). A very marked depletion of DO occurred with only 1 % of the initial amount remaining after the high dose, whereas about 90 % remained after the low dose (8 mg/kg). No significant change occurred in the DOPAC and HVA contents after a low dose of MPTP, but both were significantly reduced after the higher dose, about 20 % of each remaining (Fig. 4).

MPTP-treated mouse brain sections exhibited similar patterns of Lf immunoreactivity to those found in the adult and aged animals. Lf was seen predominantly associated with the microvasculature and Lf staining was also evident on pyramidal neurons. No specific immunoreactivity was found associated with the areas specifically affected by the pathological process such as the *substantia nigra* (data not shown). *In situ* hybridization was also performed on MPTP treated-mouse brain sections and Lf mRNA was not observed in the different MPTP treated-mouse brain regions analysed (data not shown).

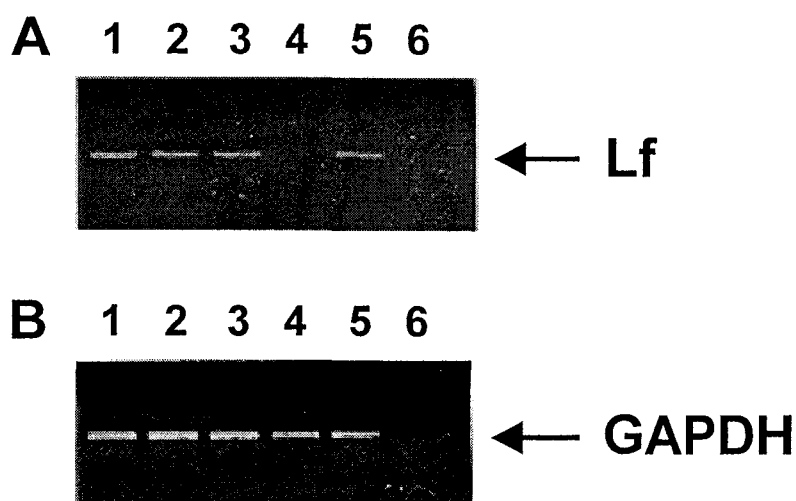


Fig. 3. Expression of Lf mRNA in different mouse tissues using RT-PCR or RT-nested PCR. Amplified PCR products obtained with mRNA after reverse transcription were size-fractionated on a 2% agarose gel, the gel was stained with ethidium bromide and PCR products were observed under UV light. Shown at the arrowheads were bands of the expected sizes of nested RT-PCR products of mouse Lf (A) and RT-PCR products of mouse GAPDH (x 35 PCR cycles) (B) which was used as an internal control. Lanes 1-3 : products of young, adult, aged mouse brain tissue cDNA respectively after 70 cycles of nested-amplification ; lane 4 : products of mouse liver cDNA after 70 cycles of nested-amplification ; lane 5 : products of lactating mouse mammary gland cDNA after 35 cycles of amplification ; lane 6 : control reaction without cDNA template after 70 cycles of nested-amplification.

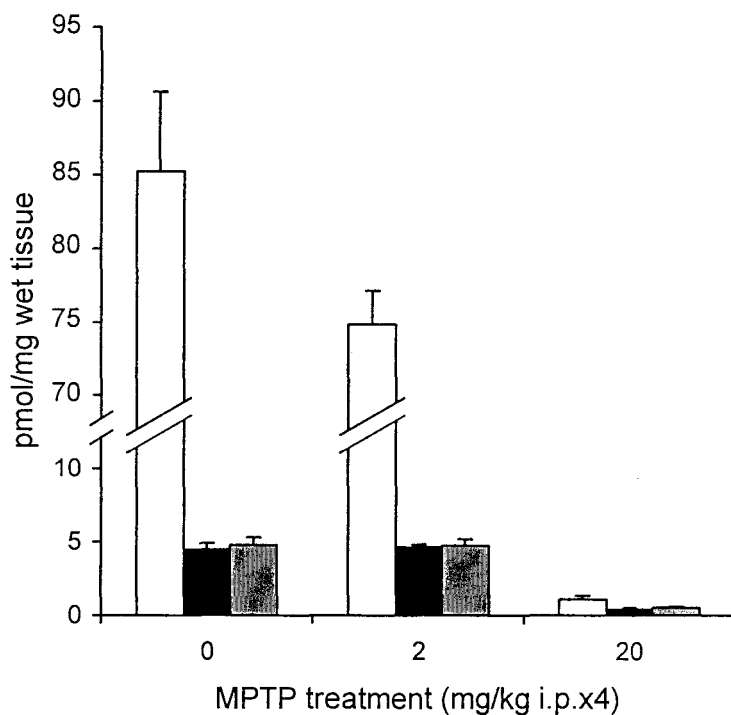


Fig. 4. Mouse responses to MPTP treatment seven days after drug administration. MPTP treatment was given as 8 or 80 mg/kg (MPTP-HCl) intraperitoneally (i.p.). Control mice received saline only. Striatal levels of dopamine (DO) (white columns), dihydroxy phenylacetic acid (DOPAC) (black columns) and homovanillic acid (HVA) (single hatched columns) were determined and expressed in pmol/mg wet tissue. Each column is a mean of four individual measures \pm SEM.

The level of expression of Lf mRNA was studied using RT-PCR. The level of the expression of the murine GAPDH mRNA was constant in all the treated and untreated brains (Fig. 5,C). The data obtained are shown in Fig. 5 and correspond to individual mice. They confirmed our previous results since 35 secondary PCR cycles of nested-amplification were necessary to obtain an Lf signal in the untreated mice (Fig. 5,A). The animals treated with the low dose of MPTP gave an Lf signal similar to that obtained for the untreated mice, in line with the minimal changes seen in levels of DO and its metabolites at this dose. However, only twenty secondary PCR cycles of nested-amplification were necessary to obtain an Lf signal in brains from animals treated with the higher dose of MPTP (Fig. 5,B), indicating that Lf transcription is up-regulated in these mice. Thus, despite this up-regulation in the case of mice receiving the high dose of MPTP, the level of transcription was still not high enough to obtain a signal by ISH.

Wide individual variations were visible, reflecting individual susceptibility to the drug. Strikingly, the relative intensity of the Lf PCR signals obtained corresponded to the individual levels of reduction in DO levels observed (Table 2), supporting the conclusion that the two parameters are closely linked.

In order to determine whether Lf is synthesized in response to oxidative stress, the kinetics of Lf up-regulation were followed and the level of its expression at days 1, 3, 5 and 7 after MPTP treatment was assayed. In parallel, the level of expression of some key enzymes involved in oxidative stress detoxification and catecholamine synthesis were assayed. Total brain mRNA was analyzed by RT-PCR for the presence of Lf, catalase, CuZnSOD, gamma-glutamylcysteine synthetase and tyrosine hydroxylase. The initial semi-quantification of each gene expression involved calculating the ratio of the peak areas obtained from the Quantiscan data of the different PCR products to the internal GAPDH standard product (x 20 cycles) for each sample. Values obtained for four mice were averaged to quantify differences in expression between the four groups of samples. The data obtained for the PCR products from untreated mice corresponded to the basal levels of expression of each gene and were defined as 100 % of expression. The comparative gene expression values for the MPTP-treated mice were then expressed as a % of the control value. Since nested-PCR was necessary to obtain a signal, the expression of Lf at day 1 after the MPTP-treatment was considered as 100 %. According to this criterion, no significant variation was observed in the level of expression of CuZnSOD (Fig. 6,A) whereas an up-regulation was observed at day 1 for catalase (Fig. 6,B), gamma-

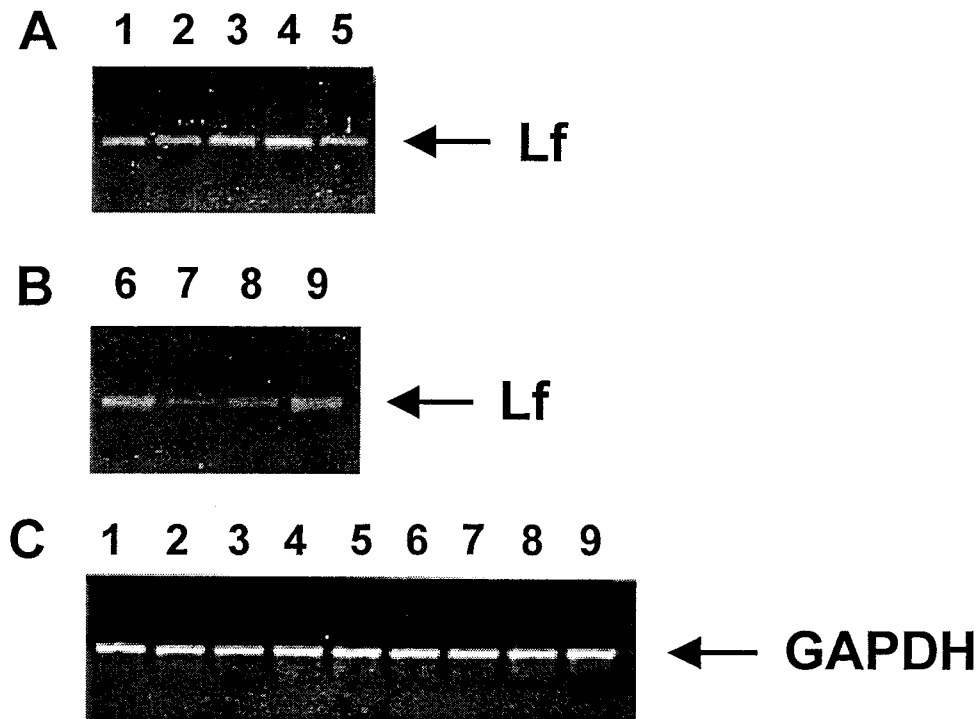


Fig. 5. Individual expression of Lf mRNA detected by RT-nested PCR on MPTP-treated mouse brain tissue after seven days of treatment. Amplified PCR products were obtained as described in material and methods. Shown at the arrowheads are bands of the expected sizes for nested RT-PCR products of mouse Lf (A,B) and RT-PCR products of mouse GAPDH (x 35 PCR cycles) (C) which was used as an internal control. Lane 1 : product of control mouse brain cDNA after 70 cycles of nested-amplification; lanes 2-5 : products of low-dose treated mouse brain cDNA after 70 cycles of nested-amplification ; lanes 6-9 : products of high-dose treated mouse brain cDNA after 55 cycles of nested-amplification.

Table 2

Individual correlation between Lf gene expression and DO content in the mouse striatum in response to the administration of a high-dose of MPTP (80 mg/kg).

Mouse	Relative intensities of Lf PCR products*	DO**
6	57.99	0.54
7	5.81	1.89
8	11.49	1.13
9	34.85	0.69

* The initial semi-quantification of each gene expression involved calculating the ratio of the peak areas obtained from the Quantiscan data of the different PCR products to the internal GAPDH standard product for each sample.

** Concentrations of DO are expressed in pmol/mg wet tissue 7 days after the treatment.

glutamylcysteine synthetase (Fig. 6,C) and tyrosine hydroxylase (Fig. 6,D). Catalase gene-expression in mouse brain showed an approximate threefold increase compared to the control. This level of expression slightly decreased to nearly reach the level observed in the untreated animals after 7 days. The same profile was obtained for tyrosine hydroxylase gene-expression. Gamma-glutamylcysteine synthetase gene-expression was highly up-regulated and was still four fold higher than the basal level at day 7. After 55 cycles of nested-PCR, Lf transcripts were observed at day 1, suggesting that it is up-regulated subsequent to the MPTP treatment (Fig. 6,E). This level of expression had increased at least threefold by day 7. Lf up-regulation is concomitant on the oxidative stress generated by the MPTP treatment and parallels the increased expression of catalase and gamma-glutamylcysteine synthetase.

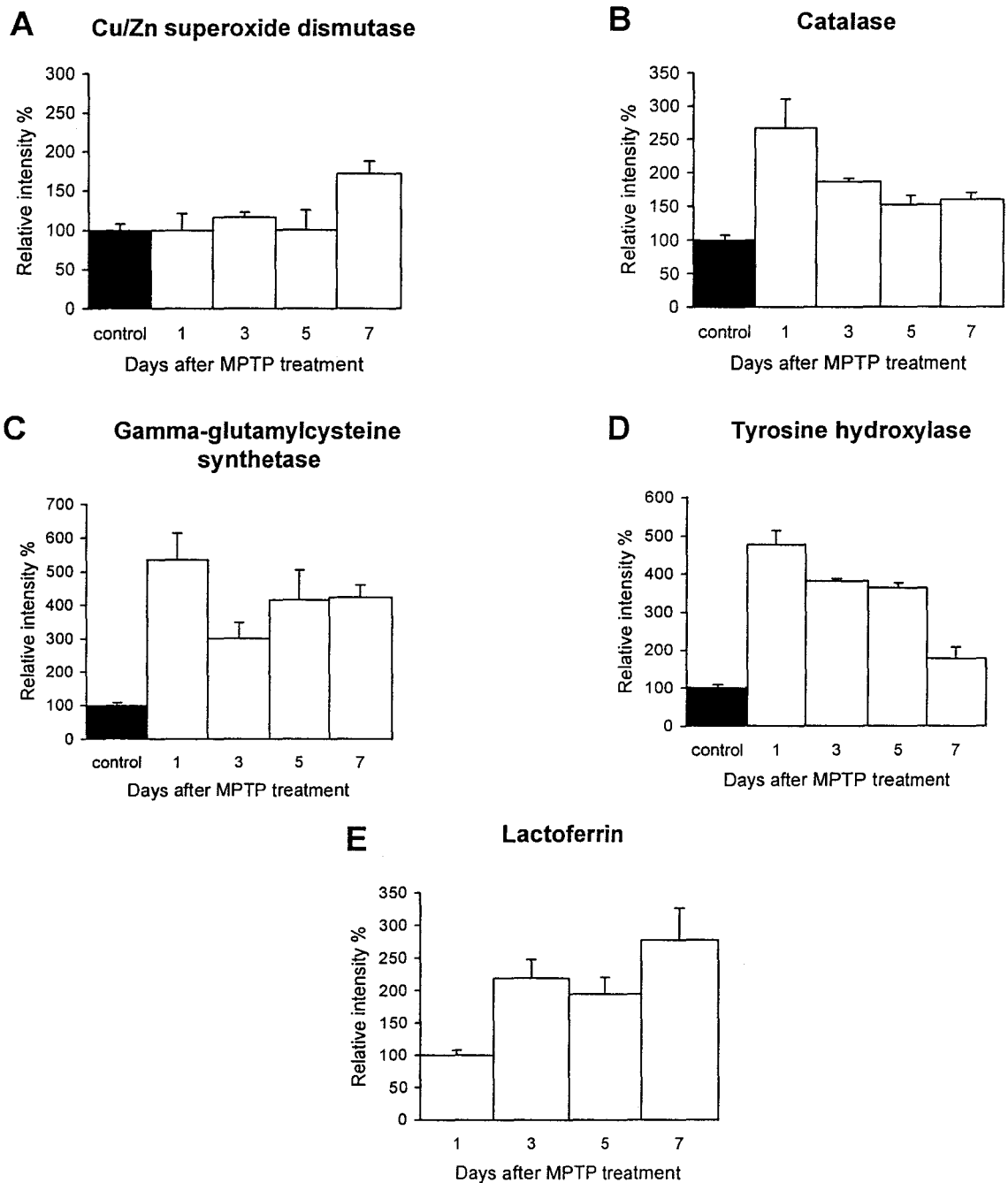


Fig. 6. Kinetics of expression of Lf mRNA and mRNAs encoding different enzymes involved in oxidative stress detoxification and catecholamine synthesis detected by RT-PCR on MPTP-treated mouse brain tissue at days 1, 3, 5, 7 after the MPTP treatment. Semi-quantification was performed as described in the appropriate results section. The kinetic expression of mRNAs are as follows : CuZnSOD (x 30 PCR cycles) (A), catalase (x 35 PCR cycles) (B), gamma-glutamyl cysteine synthetase (x 35 PCR cycles) (C), tyrosine hydroxylase (x 35 PCR cycles) (D) and Lf (x 55 PCR cycles) (E). Each column is the mean of four individual measures \pm SEM.

DISCUSSION

The present report shows the distribution of Lf in mouse brain tissues, demonstrates that the *in situ* synthesis of Lf is up-regulated in case of MPTP-treatment and that this is paralleled by the up-regulation of certain antioxidant enzymes.

Structural changes in the mouse brain with aging have been widely assessed and it appears that in some fundamental aspects murine brain aging parallels that of human brains [27]. Mouse brain tissue might therefore provide a model to study Lf distribution during the aging process. Lf was not present in young animals but appeared with aging as already described for humans [33]. In Man, Lf was observed in the cerebral cortex and more specifically on capillaries and in the case of elderly patients, an increased labeling of the cerebral microvessels was observed [33]. In agreement with this, Lf was found associated with blood vessels in the mouse cerebral cortex and an increase in the amount of Lf-labeled capillaries was also observed in the 18 month old mice which were close to senescence. The presence of Lf on the cerebral microvessels supports the hypothesis that Lf may cross the BBB since endothelial cells did not synthesize Lf. Using an *in vitro* model of BBB we recently demonstrated that Lf indeed crosses the cerebral endothelium [14]. Plasma Lf concentrations are markedly increased in inflammatory processes [15] suggesting that in some specific pathologies, Lf accumulation may occur in some particular brain areas. Lf uptake through the BBB is a receptor-mediated process involving LRP [14]. Among Lf receptors, LRP and LfR have already been described in the human brain. LRP is present in the central nervous system associated with neurons, glial cells and capillaries [62] and is also implicated in neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease [50] where it was found in increased concentrations in some neurons. LfR [39] has also been found in the mesencephalon on some glial cells, capillaries and more specifically on the nigrostriatal dopaminergic neurons where its concentration increases in cases of Parkinson's disease [13]. Thus, both LRP and LfR might be responsible for Lf accumulation in specific brain areas.

Lf immunoreactivity was also observed in the hippocampus only in aged mice where it was probably associated with pyramidal neurons and fibers. These results paralleled previous findings since Lf was visible in this particular region only in human patients presenting neurodegenerative disorders and for elderly patients, the intracellular Lf staining increasing with age [28,33,46]. Since human Lf might be a molecule highly expressed or

accumulated in neuronal and glial cell bodies with aging, RT-PCR and *in situ* hybridization were performed to detect Lf expression in mouse brain tissues. Recently using RT-PCR, Siebert and Huang [58] have shown that synthesis of Lf occurred in human brain tissue. In our study, nested RT-PCR had to be performed to demonstrate the presence of Lf mRNA in mouse brain tissue whatever the age of the animal studied. No up-regulation of Lf synthesis occurs with aging. Since Lf synthesis in the mouse brain tissue occurs at a very low level, it may not be responsible for the accumulation of Lf in the case of aging and as discussed above, Lf transcytosis through the endothelial cells of the BBB is more probably the cause [14].

In situ hybridization was then performed on mouse brain tissues with a particular attention to each specific brain area where Lf had been observed. Lf expression was undetectable by ISH although Lf protein was present in the hippocampus. This impossibility to localise Lf mRNA is due to the very low level of expression of Lf in this tissue since control ISH on the mouse lactating mammary gland was positive. Whereas Lf was found associated with the cerebral cortex and the hippocampus, its distribution in adult and aged mice is not wholly comparable to that found in humans since it was not detected in the mouse mesencephalon. Those dopaminergic neurons containing large amounts of Lf in humans, seemed to lack any Lf synthesis or uptake in the mouse.

Changes in the expression of Lf were described in Parkinson's disease patients [34] with higher immunolabeling of Lf found in the surviving neurons in the *substantia nigra*. This observation suggested that an increase in the expression of Lf mRNA might occur in Parkinson's disease and an up-regulation of Lf gene-expression be expected in the mouse model. We therefore chose to study a mouse model of Parkinson's disease. The latter is one of human diseases which does not appear to have spontaneously arisen in animals. Neurotoxic agents imitate more or less closely the characteristic features of Parkinson's disease and among the different models, the use of MPTP reproduces most accurately all aspects of the disease [27,32]. In the present study, we have been able to show that after MPTP treatment Lf gene-expression is up-regulated. Nevertheless, this up-regulation was weak and ISH was again negative.

MPTP induces the degeneration of the dopaminergic nigrostriatal neurons and in this study we also observed a substantial depletion of DO in the striatum of the affected mice as previously shown [8]. This marked decrease of the DO content provokes an increased DO turnover which leads to an augmentation of the oxidative stress process and an increased

lipid peroxidation in the striatum [21,45]. This damage may become acute when the turnover of DO [60] is elevated. This involves the enzyme tyrosine hydroxylase, the activity of which is increased in the case of Parkinson's disease [40]. We have been able to show that 24 h after MPTP administration (80 mg/kg) tyrosine hydroxylase is up-regulated in the mouse brain. This process seems concomitant with the first signs of injury observed on the dopaminergic neurons which starts on the first day after the MPTP treatment [30]. As dopaminergic cells die, this might be a compensatory mechanism to offset the loss of DO [23].

It appears likely that the nigrostriatal toxicity of MPTP is in part mediated via the reactive oxygen species (ROS) [26] and cytotoxicity was decreased in the presence of antioxidants, most notably SOD and catalase. In order to determine whether Lf is directly synthesized in response to MPTP administration and might be part of the antioxidant process, the kinetics of Lf up-regulation were followed as well as those of some antioxidant enzymes such as gamma-glutamylcysteine synthetase, catalase and CuZnSOD. The activity of gamma-glutamylcysteine synthetase, a key enzyme in glutathione metabolism has variously been shown to be increased [48] or unaltered [57] in Parkinson's disease patients. In our hands, the up-regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase started at day 1 after MPTP administration. This enzyme, which is the first and rate-limiting enzyme involved in glutathione synthesis, was expected to be up-regulated since an antioxidant response element was identified in its gene [42]. This increase of the level of expression leads to the maintenance of the glutathione redox state. An MPTP-induced increase in the activity of catalase and SOD in the mouse *substantia nigra* on the seventh day has previously been observed [43]. We also found that catalase was up-regulated 24 h after the treatment confirming that the intracellular antioxidant system provides a means for the damaged cells to counteract directly the actions of the free radicals, thereby attempting to maintain the essential cell functions. Strikingly CuZnSOD was not up-regulated after MPTP administration. However, CuZnSOD transcripts were already present in high amounts since 30 PCR cycles were sufficient to produce a detectable signal whereas 35 cycles were necessary to obtain PCR products for catalase and gamma-glutamylcysteine synthetase.

Lf was also up-regulated 24 h after MPTP administration. By its function as an iron chelator [4,6,56], Lf might also be considered as an oxidative stress detoxificant. The *substantia nigra* of Parkinson's patients reveals evidence of an increased total iron concentration [10] as well as an increased Lf concentration in the surviving dopaminergic

neurons [34]. This transition metal is capable of catalyzing non-enzymatic oxidative reactions and especially the conversion of hydrogen peroxide to hydroxyl radical. Its capture by Lf might be one of the first mechanisms leading to iron detoxification as was shown for other iron chelators which retard the degeneration of the dopaminergic neurons and protect MPTP-treated mice [31,38]. Nevertheless, the level of Lf expression in the MPTP-mouse brain, even though it is up-regulated, is still very low.

Neuromelanin, a product of DO autoxidation, serves as a reservoir for iron and also promotes the generation of oxyradicals [18]. It has been suggested that neuromelanin-iron complexes contribute to dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's disease [16]. The absence of neuromelanin in rodent brains [2,35] leads to some extent to a lesser oxidative stress activity in some specific brain areas and might explain why, compared to humans, mouse Lf is absent or so feebly present in the dopaminergic neurons. Apart from the lack of neuromelanin, iron levels are ten fold lower in the *substantia nigra* of the mouse compared to humans [11]. The requirement for Lf would be much greater in the human brain and might also explain the small increase in mouse Lf expression after MPTP administration.

Our present data suggest that during normal aging as well as in case of an oxidative stress reaction, the levels of Lf in the brain could be significantly increased. We can hypothesize that Lf up-regulation is an initial response to oxidative stress in brain tissue. By capturing the iron in higher concentrations in some specific brain regions, Lf may act as a natural scavenger of ROS. Alternatively its synthesis at abnormal levels or its release from necrosing neurons in neurodegenerative diseases may exacerbate and amplify the lesions. Further studies will be necessary to elucidate Lf function in the brain.

Acknowledgment

We thank Dr. C. Teng from the NIH, Research Triangle Park, North Carolina for providing the mouse Lf cDNA. We also sincerely acknowledge Dr R. J. Pierce for reviewing the manuscript. We like to thank S. Benamrouche and Dr. M.-A. Recchi for their help in some of the PCR analyses.

REREFENCES

1. E.N. Baker, B.F. Anderson, H.M. Baker, C.L. Day, M. Haridas, G.E. Norris, S.V. Rumball, C.A. Smith, D.H. Thomas, Three-dimensional structure of lactoferrin in various functional states, *Adv. Exp. Med. Biol.* 357 (1994) 1-12.
2. H. Barden, S. Levine, Histochemical observations on rodent brain melanin, *Brain Res. Bull.* 10 (1983) 847-851.
3. G.C. Bewley, cDNA and deduced amino acid sequence of murine Cu-Zn superoxide dismutase, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 2728-2728.
4. B.E. Britigan, D.J. Hasset, G.M. Rosen, D.R. Hamill, M.S. Cohen, Neutrophil degranulation inhibits potential hydroxy-radical formation. Relative impact of myeloperoxidase and lactoferrin release on hydroxy-radical production by iron-supplemented neutrophils assessed by spin-trapping techniques, *Biochem. J.* 264 (1989) 447-455.
5. K. Chiba, A. Trevor, N. Castagnoli, Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 102 (1984) 574-578.
6. M.S. Cohen, J. Mao, T. Rasmussen, J.S. Serody, B.E. Britigan, Interaction of lactoferrin and lipopolysaccharide (LPS) : Effects on the antioxidant property of lactoferrin and the ability of LPS to prime human neutrophils for enhanced superoxide formation, *J. Infect. Dis.* 166 (1992) 1375-1378.
7. J.R. Connor, S.L. Menzies, S.M. St Martin, E. Mufson, A histochemical study of iron, transferrin and ferritin in Alzheimer's disease brains, *J. Neurosci. Res.* 31 (1992) 75-83.
8. I. Date, D.L. Felten, S.Y. Felten, Long-term effect of MPTP in the mouse brain in relation to ageing : neurochemical and immunocytochemical analysis, *Brain Res.* 519 (1990) 266-276.
9. G.C. Davis, A.C. Williams, S.P. Markey, M.H. Ebert, E.D. Caine, C.M. Reichert, I.J. Kopin, Chronic Parkinson secondary to intravenous injection of meperidine analogues, *Psychiat. Res.* 1 (1979) 249-254.
10. D.T. Dexter, A. Carayon, F. Javoy-Agid, Y. Agid, F. Wells, S. Daniel, A.J. Lees, P. Jenner, C.D. Marsden, Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals

- in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia, *Brain* 114 (1991) 1953-1975.
11. D.T. Dexter, P. Jenner, Alterations in iron in neurodegenerative disorders : Implications and possible therapeutic agents. In : M. Yasui, M. Strong, K. Ota, M.A. Verity (Eds.), *Minerals and metal neurotoxicology*, CRC Press, New York, 1997, pp365-379.
 12. B.A. Faucheux, E.C. Hirsch, J. Villares, F. Selimi, A. Mouatt-Prigent, F. Javoy-Agid, J.J. Hauw, Y. Agid, Distribution of ^{125}I ferrotransferrin binding sites in the mesencephalon of control subjects and patients with Parkinson's disease, *J. Neurochem.* 60 (1993) 2338-2341.
 13. B. Faucheux, N. Nillesse, P. Damier, G. Spik, A. Mouatt-Prigent, A. Pierce, B. Leveugle, N. Kubis, J-J. Hauw, Y. Agid, E. Hirsch, Expression of lactotransferrin receptors is increased in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 9603-9607.
 14. C. Fillebeen, L. Descamps, M-P. Dehouck, L. Fenart, M. Benaïssa, G. Spik, R. Cecchelli, A. Pierce, Receptor mediated-transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier, *J. Biol. Chem.* (1999), in press.
 15. M. Gahr, C.P. Speer, B. Damereau, G. Sawatzki, Influence of lactoferrin on the function of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes, *J. Leukoc. Biol.* 49 (1991) 427-433.
 16. M. Gerlach, D. Ben-Shachar, P. Riederer, M.B.H. Youdim, Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases ? *J. Neurochem.* 63 (1994) 793-807.
 17. M. Gerlach, P. Riederer, Animal models of Parkinson's disease : an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man, *J. Neural Trans.* 103 (1996) 987-1041.
 18. P. Good, C.W. Olanow, D.P. Perl, Neuromelanin-containing neurons of the substantia nigra accumulate iron and aluminium in Parkinson's disease : a LAMMA study, *Brain Res.* 593 (1992) 343-346.
 19. T.G. Gutterberg, T. Flaegstad, T. Jorgensen, Lactoferrin, C-reactive protein, alpha-1-antitrypsin and immunoglobulin A in cerebrospinal fluid in meningitis, *Acta Paediatr. Scand.* 75 (1986) 569-572.
 20. B. Halliwell, Reactive oxygen species and the central nervous system, *J. Neurochem.* 59 (1992) 1609-1623.

21. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases, *Mol. Asp. Med.* 8 (1985) 89-193.
22. R. Hällgren, A. Terent, P. Venge, Lactoferrin, lysozyme, and β_2 -microglobulin levels in cerebrospinal fluid, *Inflammation* 6 (1982) 291-304.
23. O. Hornykiewicz, Parkinson's disease : from brain homogenate to treatment, *Fed. Proc.* 32 (1973) 183-190.
24. H.C. Hung, E.H. Lee, MPTP produces differential oxidative stress and antioxidative responses in the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways, *Free Rad. Biol. Med.* 24 (1998) 76-84.
25. S. Ichikawa, T. Sasaoka, T. Naagatssu, Primary structure of mouse tyrosine hydroxylase deduced from its cDNA, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 176 (1991) 1610-1616.
26. P. Jenner, M.D. Olanow, Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease, *Neurology* 47 (1996) 161-170.
27. M. Jucker, D.K. Ingram, Murine models of brain aging and age-related neurodegenerative diseases, *Behav. Brain Res.* 85 (1997) 1-25.
28. T. Kawamata, I. Tooyama, T. Yamada, D.G. Walker, P.L. McGeer, Lactotransferrin immunocytochemistry in Alzheimer and normal human brain, *Am. J. Pathol.* 142 (1993) 1574-1585.
29. J.A. Knight, Reactive oxygen species and neurodegenerative disorders, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 27 (1997) 11-25.
30. M. Kohutnicka, E. Lewandowska, I. Kurkowska-Jastrzebska, A. Czlonkowski, A. Czlonkowska, Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), *Immunopharmacol.* 39 (1998) 167-180.
31. J. Lan, D.H. Jiang, Desferrioxamine and vitamin E protect against iron and MPTP-induced neurodegeneration in mice, *J. Neural. Transm.* 104 (1997) 469-481.
32. J.W. Langston, The etiology of Parkinson's disease with emphasis on the MPTP story, *Neurology* 47 (1996) 153-160.
33. B. Leveugle, G. Spik, D.P. Perl, C. Bouras, H.M. Fillit, P.R. Hof, The iron-binding protein lactotransferrin is present in pathologic lesions in a variety of neurodegenerative disorders : a comparative immunohistochemical analysis, *Brain Res.* 650 (1994) 20-31.

34. B. Leveugle, B. Faucheux, C. Bouras, N. Nillesse, G. Spik, E.C. Hirsch, Y. Agid, P.R. Hof, Immunohistochemical analysis of the iron-binding protein lactotransferrin in Parkinson's disease, *Acta Neuropathol.* 91 (1996) 566-572 .
35. A. Lyden, U. Bondesson, B.S. Larsson, N.G. Lindquist, L.I. Olsson, Autoradiography of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) : uptake in the monoaminergic pathways and in melanin containing tissues, *Acta Pharmacol. Toxicol.* 57 (1985) 130-135.
36. P.L. Masson, J.F. Heremans, C.H. Dive, An iron binding protein common to many external secretions, *Clin. Chim. Acta* 14 (1966) 735-739.
37. P.L. Masson, J.F. Heremans, E. Schöenne, Lactoferrin an iron binding protein in neutrophilic leukocytes, *J. Exp. Med.* 130 (1969) 643-658.
38. E.R. Matarredona, M. Santiago, J. Cano, A. Machado, Involvement of iron in MPP+ toxicity in substantia nigra : protection by desferrioxamine, *Brain Res.* 773 (1997) 76-81.
39. 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.
40. M. Mogi, M. Harada, K. Kiuchi, K. Kojima, T. Kondo, H. Narabayashi, D. Rausch, P. Riederer, K. Jellinger, T. Nagatsu, Homospecific activity (activity per enzyme protein) of tyrosine hydroxylase increases in Parkinson's brain, *J. Neural. Transm.* 72 (1988) 77-81.
41. J. Montreuil, J. Tonnelat, S. Mullet, Préparation et propriétés de la lactosidérophiline (lactotransferrine) du lait de Femme, *Biochim. Biophys. Acta* 45 (1960) 413-421.
42. R.M. Mulcahy, J.J. Gipp, Identification of a putative antioxidant response element in the 5'-flanking region of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 209 (1995) 227-233.
43. D. Muralikrishnan, K.P. Mohanakumar, Neuroprotection by bromocriptine against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in mice, *FASEB J.* 12 (1998) 905-912.
44. J.H. Nuijens, P.H.C. van Berkel, F.L. Schanbacher, Structure and biological actions of lactoferrin, *J. Mamm. Gland Biol. Neoplas.* 1 (1996) 285-295.
45. C.W. Olanow, Oxidation reactions in Parkinson's disease, *Neurology* 40 (1990) 37-39.

46. A.P. Osmand, R.C. III Switzer, Differential distribution of lactoferrin and Alz-50 immunoreactivities in neuritic plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease, in : Alzheimer's Disease : Basic mechanisms, diagnosis and therapeutic strategies, (K. Iqbal, D.R.C. McLachlan, B. Winblad, H.M. Wisniewski, eds.) John Wiley & Sons, 1991, pp. 219-228.
47. B.T. Pentecost, C.T. Teng, Lactotransferrin is the major estrogen inducible protein of mouse uterine secretions, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 10134-10139.
48. S. Peuchen, J.P. Bolanos, S.J.R. Heales, A. Almeida, M.R. Duchon, J.B. Clark, Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system, *Progress Neurobiol.* 52 (1997) 261-281.
49. Z.M. Qian, Q. Wang, Expression of iron transport proteins and excessive iron accumulation in the brain in neurodegenerative disorders, *Brain Res. Rev.* 27 (1998) 257-267.
50. G.W. Rebeck, S.D. Harr, D.K. Strickland, B.T. Hyman, Multiple, diverse senile plaque-associated proteins are ligands of an apolipoprotein E receptor, the alpha2-macroglobulin receptor/low-density-lipoprotein receptor-related protein, *Ann. Neurol.* 37 (1995) 211-217.
51. M.W. Rey, S.L. Woloshuk, H.A. Deboer, F.R. Piepper, Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin, *Nucleic Acids Res.* 18 (1990) 5288.
52. S. Rose, M. Nomoto, P. Jenner, Transient depletion of nucleus accumbens dopamine content may contribute to initial akinesia induced by MPTP in common marmosets, *Biochem. Pharmacol.* 38 (1989) 3677-3681.
53. D.E. Sabath, H.E. Broome, M.B. Prystowsky, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA is a major interleukin 2-induced transcript in a cloned T-helper lymphocyte, *Gene* 91 (1990)185-191.
54. J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis (Eds.), *Molecular Cloning : A laboratory Manual* : Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
55. J.B. Shaffer, K.E. Preston, Molecular analysis of an acatalasemic mouse mutant, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173 (1990) 1043-1050.
56. H. Shinmoto, S. Dosako, I. Nakajima, Anti-oxidant activity of bovine lactoferrin on iron/ascorbate induced lipid peroxidation, *Biosci. Biotech. Biochem.* 56 (1992) 2079-2080.

57. J. Sian, D.T. Dexter, A.J. Lees, S. Daniel, P. Jenner, C.D. Marsden, Glutathione-related enzymes in brain in Parkinson's disease, *Ann. Neurol.* 36 (1994) 356-361.
58. 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. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 2189-2203.
59. E. Sofic, P. Riederer, H. Heinsen, H. Beckmann, G.P. Reynolds, G. Hebenstreit, M.B.H. Youdim, Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of Parkinsonian brain, *J. Neural Trans.* 74 (1988) 199-205.
60. M.B. Spina, G. Cohen, Dopamine turnover and glutathione oxidation : implications for Parkinson's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86 (1989) 1398-1440.
61. A. Terent, R. Hällgren, P. Venge, K. Bergström, Lactoferrin, lysozyme, and β_2 -microglobulin in cerebrospinal fluid, *Stroke* 12 (1981) 40-46.
62. I. Tooyama, T. Kawamata, H. Akiyama, H. Kimura, S.K. Moestrup, J. Gliemann, A. Matsuo, P.L. McGeer, Subcellular localization of the low density lipoprotein receptor-related protein (alpha 2-macroglobulin receptor) in human brain, *Brain Res.* 691 (1995) 235-238.
63. R. Ward, D. Dexter, A. Florence, F. Aouad, R. Hider, P. Jenner, B. Crichton, Brain iron in the ferrocene-loaded rat: its chelation and influence on dopamine metabolism, *Biochem Pharmacol.* 49 (1995) 1821-1826.
64. B.P. Yu, Cellular defenses against damage from reactive oxygen species, *Physiol. Rev.* 74 (1994) 139-162.

Conclusion

Nous avons mis en évidence l'expression des messagers de la lactoferrine dans le SNC de la souris. Cette expression est augmentée lorsque l'animal est soumis à un traitement au MPTP et suit le profil d'expression de certaines enzymes anti-oxydantes qui interviennent dans le processus de détoxification.

Dans des conditions non pathologiques, la lactoferrine a été détectée dans le SNC de souris adultes au niveau du cortex, et de souris âgées au niveau du cortex et de l'hippocampe. Dans le cortex cérébral, le marquage de la lactoferrine, localisé sur des capillaires, augmente en intensité et en quantité chez les souris âgées. Dans l'hippocampe, la lactoferrine est présente sur des neurones pyramidaux, ainsi que sur des fibres traversant la couche pyramidale de cette région (figure 1, article 4). Les variations de distribution de la lactoferrine en fonction de l'âge des animaux suggèrent que cette protéine s'accumule au cours du temps.

La technique d'hybridation *in situ* ne nous a pas permis de localiser le lieu de synthèse de la lactoferrine cérébrale (figure 2, article 4). Par contre, à l'aide de la technique de RT-PCR, nous avons mis en évidence l'expression des messagers de la lactoferrine dans le SNC de la souris (figure 3, article 4). Cette synthèse est très faible et n'est pas augmentée avec l'âge des animaux, alors que le taux de lactoferrine croît. Ces résultats suggèrent que le taux de synthèse de la lactoferrine est constant en condition non pathologique, et que cette production continue mais faible mène à l'accumulation de la lactoferrine dans le SNC au cours du temps.

En ce qui concerne les conditions pathologiques, la chute du niveau de dopamine et de ses métabolites dans le striatum des souris traitées au MPTP montre que cet agent est bien sélectivement toxique pour les neurones dopaminergiques (figure 4, article 4). Le niveau d'expression de la lactoferrine quant à lui est augmenté dans le SNC des souris ayant reçu la plus forte dose de MPTP (figure 5, article 4). De plus, l'augmentation de l'expression des messagers de la lactoferrine semble correspondre pour chaque animal à la diminution du niveau de dopamine qui traduit une susceptibilité individuelle au MPTP (tableau 2, article 4), suggérant que ces deux paramètres sont liés.

D'autre part, l'étude comparative du niveau d'expression de la lactoferrine et de différentes enzymes anti-oxydantes, au cours des jours qui suivent l'administration de MPTP, montre que l'expression des messagers de la lactoferrine est augmentée 24 heures après le traitement (figure 6, article 4), et présente un profil similaire de celui observé pour l'expression de la catalase et de la gamma-glutamylcystéine synthétase. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression de la lactoferrine soit concomitante de celles de plusieurs enzymes anti-oxydantes qui sont produites en réponse au stress oxydatif généré par l'administration du MPTP.

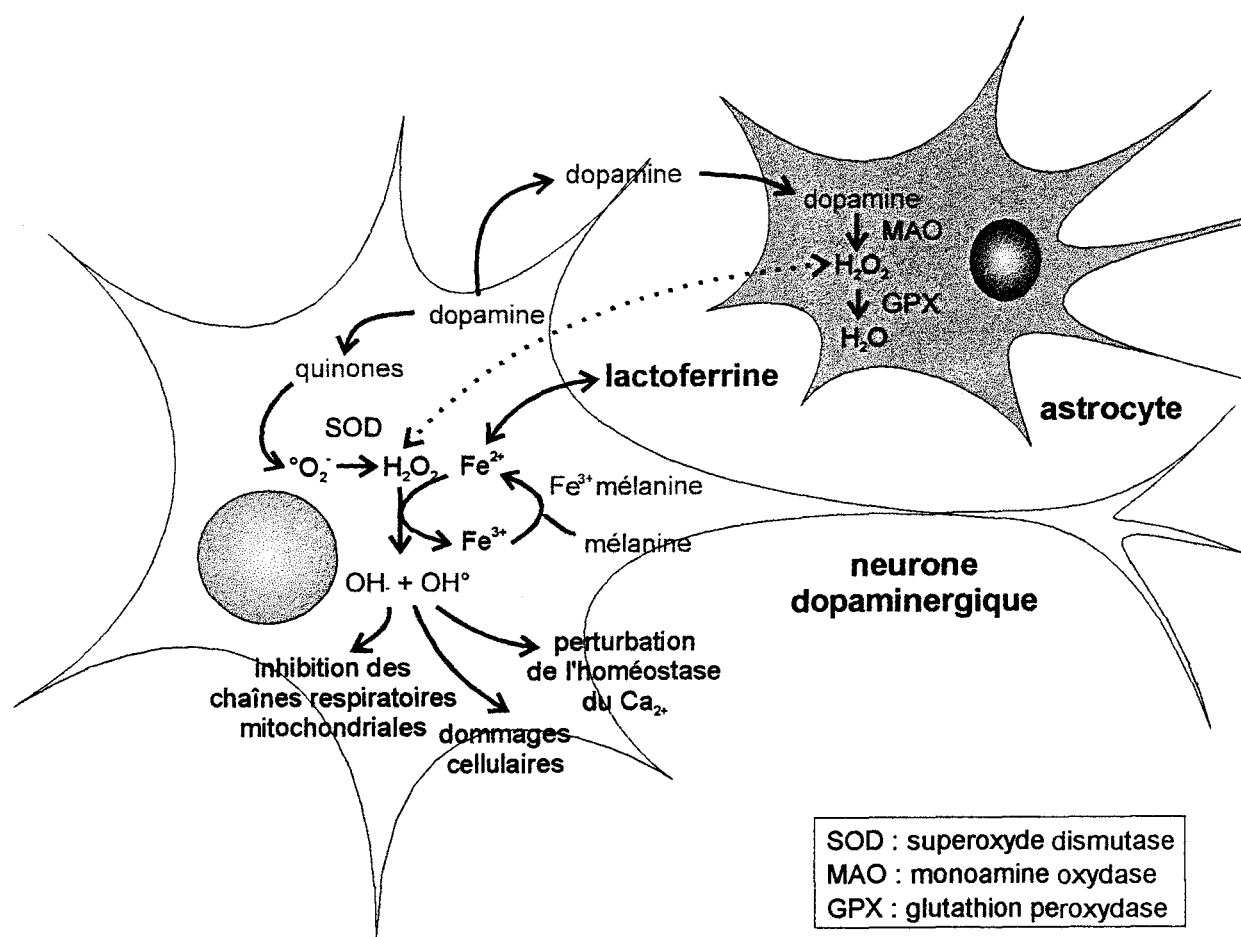


Figure 20 : Rôle potentiel de la lactoferrine dans le processus de détoxification mis en place afin de lutter contre le stress oxydatif généré par le processus neurodégénératif.

L'augmentation de l'expression des messagers de la lactoferrine dans le SNC de souris traitées au MPTP montre que la production de cette protéine est stimulée en conditions pathologiques mimant la maladie de Parkinson. La lactoferrine, qui possède des propriétés anti-oxydantes, pourrait donc être impliquée dans le processus de détoxification mis en place en réponse au stress oxydatif produit par le processus neurodégénératif (figure 20, page 204). Cependant, bien que cette expression soit augmentée en conditions pathologiques elle reste relativement faible. La distribution de la lactoferrine dans le SNC de la souris est également faible par rapport à celle observée chez l'homme. De plus, d'importantes modifications de cette distribution apparaissent dans le SNC humain au cours de pathologies. Ces variations observées entre l'homme et la souris pourraient être dues à l'absence de neuromélanine chez les rongeurs qui pourrait aboutir à la réduction du stress oxydatif dans leurs neurones dopaminergiques. Ainsi, le processus de détoxification mis en oeuvre chez la souris pourrait être moins important, et pourrait se traduire par un taux de synthèse inférieur de lactoferrine. Afin de préciser le rôle de la lactoferrine, il nous sera donc nécessaire d'étudier sa distribution et son expression chez des patients atteints de la maladie de Parkinson.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le vieillissement de la population est devenu depuis plusieurs décennies un véritable problème de santé publique lié au développement de maladies neurodégénératives diverses. Ces pathologies, en raison de leur apparition tardive et de leur évolution inexorable, sont une priorité pour la recherche médicale dans nos sociétés. Cependant, les processus neurodégénératifs impliqués dans ces maladies sont encore très mal connus.

La distribution cérébrale de la lactoferrine au niveau des lésions caractéristiques de différentes maladies neurodégénératives témoigne de l'importance du rôle de cette protéine dans les processus neurodégénératifs. La découverte de l'origine de la lactoferrine cérébrale, et plus particulièrement des mécanismes qui aboutissent à son accumulation au niveau des régions affectées par les lésions neuropathologiques, permettrait de mieux appréhender la fonction biologique de la lactoferrine dans le SNC et surtout au cours des maladies neurodégénératives.

La lactoferrine qui est localisée au sein du SNC pouvait avoir deux origines : une origine périphérique et/ou une origine locale.

Afin de mettre en évidence l'origine périphérique de la lactoferrine cérébrale, qui implique l'apport de la lactoferrine présente dans la circulation au parenchyme cérébral, nous avons étudié son transport à travers la BHE. Le modèle *in vitro* de BHE, qui consiste en la coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et d'astrocytes, présente de nombreuses caractéristiques de la BHE *in vivo* (Dehouck *et al.*, 1990).

Ainsi, l'utilisation de ce modèle nous a permis de montrer le transport de la lactoferrine au travers des cellules endothéliales de capillaires cérébraux. Ce transport ne résulte pas d'une simple diffusion paracellulaire, mais témoigne bien d'un transport transendothélial spécifique unidirectionnel du compartiment vasculaire au compartiment cérébral des cellules endothéliales. Il semble que le LRP, un des récepteurs connus de la lactoferrine, soit impliqué dans le trafic intracellulaire de la lactoferrine dans les cellules endothéliales. La lactoferrine est retrouvée intacte après son passage, ce qui montre que les compartiments lysosomiaux ne sont pas impliqués dans ce transport. Le fer de la lactoferrine peut également être transporté au travers des cellules endothéliales en restant associé à cette dernière.

Ainsi, le transport de la lactoferrine au travers des cellules de l'endothélium vasculaire cérébral explique la présence de cette protéine dans le SNC et tout particulièrement au niveau des capillaires cérébraux.

Ces résultats encourageants nous ont amené à poursuivre ces travaux, et à étudier le transport de la lactoferrine à travers la BHE en conditions pathologiques. Les maladies neurodégénératives sont caractérisées par des variations de la perméabilité de la BHE. Des études ont montré que les cytokines pro-inflammatoires et notamment le TNF- α semblent être impliquées dans ce phénomène. Le modèle *in vitro* de BHE exposé au TNF- α nous semblait donc bien adapté à l'étude du transport de la lactoferrine à travers la BHE en conditions pathologiques.

Ainsi, l'exposition luminale ou abluminale au TNF- α du modèle *in vitro* de BHE entraîne une forte augmentation de l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales, témoignant de l'activation de ces cellules, ainsi que l'expression de cytokines pro-inflammatoires par la population astrocytaire. L'activation de ces deux types cellulaires est transitoire et dépend du mode d'exposition au TNF- α . Cette cytokine n'affecte pas la perméabilité paracellulaire des cellules endothéliales. Par contre, le TNF- α entraîne une forte augmentation du transport de la lactoferrine et une diminution de son accumulation dans les cellules endothéliales, mais aucune action sur l'expression des récepteurs de la lactoferrine. Ces résultats suggèrent que le TNF- α perturbe le trafic intracellulaire de la lactoferrine aboutissant à une augmentation de son transport au travers des cellules endothéliales de capillaires cérébraux.

L'augmentation du transport de la lactoferrine au travers des cellules endothéliales de capillaires cérébraux en conditions pathologiques aboutit à une accumulation de la lactoferrine dans le compartiment cérébral des cellules endothéliales. Cette accumulation pourrait expliquer la variation du taux de lactoferrine observée dans le SNC de patients atteints de différentes maladies neurodégénératives précisément au niveau des lésions.

De manière à mettre en évidence l'origine locale de la lactoferrine cérébrale, qui implique sa synthèse par des cellules spécialisées du SNC, nous avons étudié l'expression

de la lactoferrine dans le SNC, et tout particulièrement dans la région du mésencéphale qui présente de nombreuses cellules marquées par la lactoferrine (Leveugle *et al.*, 1996).

Ainsi, nous avons tout d'abord identifié précisément les cellules qui sont immunomarquées par la lactoferrine dans le mésencéphale. La lactoferrine est localisée, d'une part, dans les neurones dopaminergiques mélanisés à l'intérieur desquels elle est concentrée au niveau des agrégats de neuromélanine et, d'autre part, dans les cellules microgliales activées. Les cellules qui expriment les messagers de la lactoferrine sont des cellules microgliales activées particulières présentant des granulations pigmentées et situées à proximité des neurones dopaminergiques mélanisés. Ainsi, après libération la lactoferrine pourrait être captée par les neurones dopaminergiques, internalisée puis accumulée spécifiquement au niveau des agrégats de neuromélanine. La lactoferrine est capable d'interagir avec la mélanine, suggérant que cette interaction pourrait être à l'origine de son accumulation au niveau des agrégats de neuromélanine.

L'expression des messagers de la lactoferrine par une population particulière de cellules microgliales activées explique sa présence dans ces cellules. Cependant, la lactoferrine qui est localisée dans d'autres types cellulaires spécialisés, tels que les neurones dopaminergiques mélanisés, provient quant à elle d'un mécanisme de capture sélectif.

Le mésencéphale est le siège de la maladie de Parkinson. En effet, cette maladie affecte sélectivement la population des neurones dopaminergiques mélanisés de cette région (Agid *et al.*, 1987). Le processus neurodégénératif qui est à l'origine de cette maladie est mal connu, mais il semble qu'il fasse intervenir un stress oxydatif. Il était donc intéressant d'étudier l'expression de la lactoferrine au cours de cette maladie. Ainsi, nous avons entrepris cette étude sur un modèle animal. Ce modèle, qui utilise le MPTP, puissant neurotoxique sélectif des neurones dopaminergiques, est capable de reproduire les différentes atteintes de cette maladie chez la souris.

Dans des conditions non pathologiques, la lactoferrine a tout d'abord été détectée dans le SNC de souris, dans le cortex cérébral au niveau de capillaires, et dans l'hippocampe. Les variations de distribution de la lactoferrine en fonction de l'âge des

animaux suggèrent que cette protéine s'accumule au cours du temps. Nous avons ensuite montré la faible expression des messagers de la lactoferrine dans le SNC quel que soit l'âge des souris, suggérant que son taux de synthèse est très faible mais constant, et que cette production mène à l'accumulation de la lactoferrine dans le SNC au cours du temps.

Dans des conditions pathologiques, nous avons tout d'abord dosé la dopamine et ses métabolites, marqueurs de la toxicité du MPTP. Le niveau d'expression de la lactoferrine quant à lui est augmenté dans le SNC des souris traitées au MPTP. Cette augmentation est concomitante de celles de plusieurs enzymes anti-oxydantes qui sont produites afin de lutter contre le stress oxydatif généré par l'administration du MPTP, suggérant que la lactoferrine est immédiatement produite en réponse à ce stress et pourrait avoir une action dans le processus de détoxification.

L'augmentation de l'expression des messagers de la lactoferrine dans le SNC de souris traitées au MPTP montre que la production de cette protéine est stimulée en conditions pathologiques mimant la maladie de Parkinson. La lactoferrine, qui possède des propriétés anti-oxydantes, pourrait donc être impliquée dans le processus de détoxification mis en place en réponse au stress oxydatif généré par le processus neurodégénératif.

L'ensemble de nos travaux a donc permis de montrer que :

- l'origine de la lactoferrine cérébrale est double, elle est apportée au sein du SNC par transport à travers la BHE et est également synthétisée *in situ* par une population particulière de cellules microgliales activées ;
- la lactoferrine s'accumule ensuite soit en réponse au stress oxydatif, soit au cours des réactions inflammatoires générés par les processus neurodégénératifs.

Cependant, un point important reste à élucider : le rôle de la lactoferrine cérébrale.

- Elle pourrait jouer un rôle dans les mécanismes de détoxification mis en place afin de lutter contre les processus neurodégénératifs,
- et avoir une action anti-inflammatoire qui expliquerait son expression lors de l'activation des cellules microgliales.

Ces différents travaux entrepris auront pour but de préciser le rôle de la lactoferrine au sein du SNC et tout particulièrement dans le cas de maladies neurodégénératives. Son action protectrice pourrait limiter les dommages occasionnés par les processus neurodégénératifs qui sont à l'origine des pathologies.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abraham C.S., Deli M., Joo F., Megyeri P. & Torpier G. (1996) Effects of intracarotid tumor necrosis factor- α administration on the blood-brain barrier permeability in cerebral cortex of the newborn pig : quantitative aspects of double-labelling studies and confocal laser scanning analysing. *Neurosci. Lett.* **208** : 85-88.
- Agid Y., Javoy-Agid F. & Ruberg M. (1987) Biochemistry of neurotransmitters in Parkinson's disease. In *Movement disorders 2* (Marsden C.D. & Fahn S. eds). London, Butterworth. 166-230.
- Agid Y. (1989) Maladie de Parkinson : quelques aspects physiopathologiques et pratique clinique. *Rev. Prat.* **39** : 641-646.
- Agid Y. (1991) Parkinson's disease. *The Lancet* **337** : 1321-1324.
- Agid Y., Ruberg M., Javoy-Agid F., Hirsch E., Raisman-Vozari R., Vyas S., Faucheux B., Michel P., Kastner A., Blanchard V., Damier P., Villares J. & Zhang P. (1993) Are dopaminergic neurons selectively vulnerable to Parkinson's disease? *Adv. Neurol.* **60** : 148-164.
- Aisen P. & Leibman A. (1972) Lactoferrin and transferrin : a comparative study. *Biochim. Biophys. Acta* **257** : 314-323.
- Aisen P. & Listowsky I. (1980) Iron transport and storage protein. *Ann. Rev. Biochem.* **49** : 357-393.
- Aisen P.S. (1997) Inflammation and Alzheimer's disease: mechanisms and therapeutic strategies. *Gerontology* **43** : 143-149.
- Akiyama H. & McGeer P.L. (1990) Brain microglia constitutively express β -2 integrins. *J. Neuroimmunol.* **30** : 81-93.
- Alexander L.J., Levine W.B., Teng C.T. & Beattie C.W. (1992) Cloning and sequencing of the porcine lactoferrin cDNA. *Anim. Genet.* **23** : 251-256.
- Altman J. (1994) Microglia emerge from the fog. *TINS.* **17** : 47-49.
- Ambruso D.R. & Johnston Rb J.R. (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 colon adenocarcinoma cell line--comparison with transferrin. *In Vitro* **20** : 543-548.
- Anderson B.F., Baker H.M., Dodson E.J., Norris G.E., Rumball S.V., Waters J.M. & Baker E.N. (1987) Structure of human lactoferrin at 3.2 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **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., Baker H.M., Norris G.E., Rumball S.V. & Baker E.N. (1990) Apolactoferrin structure demonstrates ligand-induced conformational change in transferrins. *Nature* **344** : 784-787.
- 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 forms. *Adv. Exp. Med. Biol.* **357** : 227-230.

- Anderson W.R., Martella A., Drake Z.M., Hu S., Peterson P.K. & Chao C.C. (1995) Correlative transmission and scanning electron microscopy study of microglia activated by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in vitro. *Pathol. Res. Pract.* **191** : 1016-1022.
- Antonsen S. (1993) Within-subject variation of elastase/alpha 1-protease inhibitor complexes and lactoferrin in plasma. *Scand. J. Clin. 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, adult blood donors. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **53** : 133-144.
- Appelmek B.J., An Y.Q., Geerts M., Thijs B.G., de Boer H.A., MacLaren D.M., de Graaff J. & Nuijens J.H. (1994) Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infect. Immun.* **62** : 2628-2632.
- Araujo D.M. & Cotman C.W. (1992) Beta-amyloid stimulates glial cells *in vitro* to product growth factors that accumulate in senile plaques in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **569** : 141-145.
- Aruoma O.I. & Halliwell B. (1987) Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Are lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl-radical generation ? *Biochem. J.* **241** : 273-278.
- Azuma N., Mori 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.

B

- Bagby Gc J.R., Rigas V.D., Bennett R.M., Vandenbark A.A. & Garewal H.S. (1981) Interaction of lactoferrin, monocytes, and T lymphocyte subsets in the regulation of steady-state granulopoiesis in vitro. *J. Clin. Invest.* **68** : 56-63.
- Bagby Gc J.R., McCall E., Bergstrom K.A. & Burger D. (1983a) A monokine regulates colony-stimulating activity production by vascular endothelial cells. *Blood* **62** : 663-668.
- Bagby Gc J.R., 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.
- Baker E.N., Rumball S.V. & Anderson B.F. (1987) Transferrins: insights into structure and function from studies on lactoferrin. *TIPS* **12** : 350-353.
- Baker E.N., Anderson B.F., Baker H.M., Haridas M., Jameson G.B., Norris G.E., Rumball S.V. & Smith C.A. (1991) Structure, function and flexibility of human lactoferrin. *Int. J. Biol. Macromol.* **13** : 122-129.
- Baldwin D.A., Jenny E.R. & Aisen P. (1984) The effect of human serum transferrin and milk lactoferrin on hydroxyl radical formation from superoxide and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **259** : 13391-13394.
- 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.
- Balmer S.E. & Wharton BA (1989) Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. *Arch. Dis. Child* **64** : 1672-1677.

- Banks W.A., Ortiz L., Plotkin S.R. & Kastin A.J. (1991) Human interleukin (IL)-1 α , murine IL-1 α and murine IL-1 β are transported from the blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism. *J. Pharmac. Exp. Ther.* **259** : 988-996.
- Banks W.A., Kastin A.J. & Gutierrez E.G. (1994) Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neurosc. Lett.* **179** : 53-56.
- Bartal L., Padeh S. & Passwell J.H. (1987) Lactoferrin inhibits prostaglandin E2 secretion by breast milk macrophages. *Pediatr. Res.* **21** : 54-57.
- Baynes R.D., Bezwoda W.R., Khan Q. & Mansoor N. (1986) Relationship of plasma lactoferrin content to neutrophil regeneration and bone marrow infusion. *Scand. J. Haematol.* **36** : 79-84.
- Bellamy W., Takase M., Wakabayashi H., Kawase K. & Tomita M. (1992a) Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J. Appl. Bacteriol.* **73** : 472-479.
- Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K. & Tomita M. (1992b) 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.
- Bennett D.J. & McAbee D.D. (1997) Identification and isolation of a 45-kDa calcium-dependent lactoferrin receptor from rat hepatocytes. *Biochemistry* **36** : 8359-8366.
- Bennett 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., Eddie-Quartey A.C. & Holt P.J. (1973) Lactoferrin-an iron binding protein in synovial fluid. *Arthritis Rheum.* **16** : 186-190.
- Bennett R.M. & Mohla C. (1976) A solid-phase radioimmunoassay for the measurement of lactoferrin in human plasma : variations with age, sex, and disease. *J. Lab. Clin. Med.* **88** : 156-166.
- Bennett R.M. & Kokocinski T. (1979) Lactoferrin turnover in man. *Clin. Sci.* **57** : 453-460.
- Bennett R.M. & Davis J. (1981) Lactoferrin binding to human peripheral blood cells : an interaction with a B-enriched population of lymphocytes and a subpopulation of adherent mononuclear cells. *J. Immunol.* **127** : 1211-1216.
- Bennett R.M., 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.
- Bennett R.M., Merritt M.M. & Gabor G. (1986) Lactoferrin binds to neutrophilic membrane DNA. *Br. J. Haematol.* **63** : 105-117.

- Ben-Shachar D. & Youdim M.B.H. (1990) Selectivity of melanized nigro-striatal dopamine neurons to degeneration in Parkinson's disease may depend on iron-melanin interaction. *J. Neural. Transm.* **29** : 251-258.
- Ben-Shachar D., Riederer P. & Youdim M.B.H. (1991) Iron-melanin interaction and lipid peroxidation : implications for Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **57** : 1609-1614.
- Ben-Shachar D., Eshel G., Riederer P. & Youdim M.B.H. (1992) Role of iron and iron chelation in dopaminergic-induced neurodegeneration : implications for Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **32** : S105-S110.
- Betler A., Falck B., Owman C. & Rosengren E. (1966) The localization of monoaminergic blood-brain mechanisms. *Pharmacol. Rev.* **18** : 369-385.
- Betz A.L., Csejtey J. & Goldstein G.W. (1979) Hexose transport and phosphorylation by capillaries isolated from rat brain. *Am. J. Physiol.* **236** : C96-C102.
- Betz A.L., Firth J.A. & Goldstein G.W. (1980) Polarity of the blood-brain barrier : distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Res.* **192** : 17-28.
- Betz A.L. (1983) Sodium transport from blood to brain : inhibition by furosemide and amiloride. *J. Neurochem.* **41** : 1158-1164.
- Bezault J., 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.
- 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 the lactotransferrin receptor on the 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.
- Bi B.Y., Lefebvre A.M., Dus D., Spik G. & Mazurier J. (1997) Effect of lactoferrin on proliferation and differentiation of the Jurkat human lymphoblastic T cell line. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **45** : 315-320.
- Bignami A., Eng L.F., Dahl D. & Uyeda C.T. (1972) Localization of glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res.* **43** : 429-435.
- Birgens H.S., Hansen N.E., Karle H. & Kristensen L.O. (1983) Receptor binding of lactoferrin by human monocytes. *Br. J. Haematol.* **54** : 383-391.
- Birgens H.S., Karle H., Hansen N.E. & Kristensen L.O. (1984) Lactoferrin receptors in normal and leukaemic human blood cells. *Scand. J. Haematol.* **33** : 275-280.
- Birgens H.S., Kristensen L.O., Borregaard N., Karle H. & Hansen N.E. (1988) Lactoferrin-mediated transfer of iron to intracellular ferritin in human monocytes. *Eur. J. Haematol.* **41** : 52-57
- Blackberg L. & Hernell O. (1980) Isolation of lactoferrin from human whey by a single chromatographic step. *FEBS Lett.* **109** : 180-183.
- Blinzinger K. & Kreutzberg G. (1968) Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z. Zellforsch* **85** : 145-157.
- Boesman-Finkelstein M. & Finkelstein R.A. (1985) Antimicrobial effects of human milk : inhibitory activity on enteric pathogens. *FEMS Microbiol. Immunol.* **27** : 167-174.

- Bogerts B. (1981) A brainstem atlas of catecholaminergic neurons in man using melanin as a natural marker. *J. Comp. Neurol.* **197** : 63-80.
- Boxer L.A., Haak R.A., Yang H.H., Wolach 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.
- Braak H. & Braak E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* **82** : 239-259.
- Breitman T.R., Selonick S.E. & Collins S.J. (1980) Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **77** : 2936-2940.
- Britigan B.E., Coffman T.J., Adelberg D.R. & Cohen M.S. (1988) Mononuclear phagocytes have the potential for sustained hydroxyl radical production. Use of spin-trapping techniques to investigate mononuclear phagocyte free radical production. *J. Exp. Med.* **168** : 2367-2372.
- 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.
- Britigan B.E., Serody J.S. & Cohen M.S. (1994) The role of lactoferrin as an anti-inflammatory molecule. *Adv. Exp. Med. Biol.* **357** : 143-156.
- 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 M.S., Herz J., Kowal R.C. & Goldstein L. (1991) The low density lipoprotein receptor-related protein: double agent or decoy? *Curr. Opin. Lipidol.* **2** : 65-72.
- Broxmeyer H.E., Smithyman A., Eger R.R., Meyers P.A. & de Sousa M. (1978) Identification of lactoferrin as the granulocyte-derived inhibitor of colony-stimulating activity production. *J. Exp. Med.* **148** : 1052-1067.
- 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., Juliano L., Waheed A. & Shaddock R.K. (1985) Release from mouse macrophages of acidic isoferritins that suppress hematopoietic progenitor cells is induced by purified L cell colony stimulating factor and suppressed by human lactoferrin. *J. Immunol.* **135** : 3224-3231.
- Broxmeyer H.E., Williams D.E., Boswell H.S., Cooper S., Shaddock R.K., Gillis S., Waheed A. & Urdal D.L. (1986) The effects in vivo of purified preparations of murine macrophage colony stimulating factor-1, recombinant murine granulocyte-macrophage colony stimulating factor and natural and recombinant murine interleukin 3 without and with pretreatment of mice with purified iron-saturated human lactoferrin. *Immunobiology* **172** : 168-174.
- Broxmeyer H.E., Williams D.E., Hangoc G., Cooper S., Gentile P., Shen R.N., Ralph P., Gillis S. & Bicknell D.C. (1987) The opposing actions in vivo on murine myelopoiesis of purified preparations of lactoferrin and the colony stimulating factors. *Blood Cells* **13** : 31-48.
- Bruns C.M., Nowalk A.J., Arvai A.S., Mc Tigue M.A., Vaughan K.G., Mietzner T.A. & McRee D.E. (1997) Structure of haemophilus influenzae Fe³⁺-binding protein reveals convergent evolution within a superfamily. *Nat. Struct. Biol.* **4** : 919-924.

- Bruns R.R. & Palade G.E. (1968) Studies on blood capillaries. II. Transport of ferritin molecules across the wall of muscle capillaries. *J. Biol. Cell* **37** : 277-299.
- Bu G., Maksymovitch E.A., Nerbonne J.M. & Schwartz A.L. (1994) Expression and function of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in mammalian central neurons. *J. Biol. Chem.* **269** : 18521-18528.
- Bu G., Geuze H.J., Strous G.J. & Schwartz A.L. (1995) 39 kDa receptor-associated protein is an ER resident protein and molecular chaperone for LDL receptor-related protein. *EMBO J.* **14** : 2269-2280.
- Bu G. & Rennke S. (1996) Receptor-associated protein is a folding chaperone for low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* **271** : 22218-22224.
- 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.
- Butler T.W., Grossi C.E., Canessa A., Pistoia V. & Barton J.C. (1990) Immunoreactive lactoferrin in resting, activated, and neoplastic lymphocytes. *Leuk. Res.* **14** : 441-447.
- Byatt J.C., Schmuke J.J., Comens P.G., Johnson D.A. & Collier R.J. (1990) The effect of bovine lactoferrin on muscle growth in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173** : 548-553.

C

- 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.
- Canella B. & Raine C.S. (1995) The adhesion molecule/cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* **37** : 424-435.
- Cardin A.D. & Weintraub H.J. (1989) Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* **9** : 21-32.
- Chiba K., Trevor A. & Castagnoli N. (1984) Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **102** : 574-578.
- Clark R.A. (1990) The human neutrophil respiratory burst oxidase. *J. Infect. Dis.* **161** : 1140-1147.
- Close M.J., Howlett A.R., Roskelley C.D., Desprez P.Y., Bailey N., Rowning B., Teng C.T., Stampfer 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.
- Colton C.A. & Gilbert D.L. (1993) Microglia, an in vivo source of reactive oxygen species in the brain. *Adv. Neurol.* **59** : 321-326.
- Compton T., Nowlin D.M. & Cooper N.R. (1993) Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulphate. *Virology* **193**: 834-841.
- Cotman C.W. (1998) Apoptosis decision cascades and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **19** : S29-S32.

- 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.
- Crouch S.P., 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.

D

- 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.
- Das S. & Potter H. (1995) Expression of the Alzheimer amyloid-promoting factor antichymotrypsin is induced in human astrocytes by IL 1. *Neuron*. **14** : 447-456.
- Davidson L.A. & Lönnerdal B. (1988) Specific binding of lactoferrin to brush-border membrane : ontogeny and effect of glycan chain. *Am. J. Physiol.* **254** : G580-G585.
- Davidson L.A., Litov R.E. & Lönnerdal B. (1990) Iron retention from lactoferrin-supplemented formulas in infant rhesus monkeys. *Pediatr. Res.* **27** : 176-180.
- Davis G.C., Williams A.C., Markey S.P., Ebert M.H., Caine E.D., Reichert C.M. & Kopin I.J. (1979) Chronic Parkinson secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiat. Res.* **1** : 249-254.
- Debanne M.T., Regoeczi E., Sweeney G.D. & Krestynski F. (1985) Interaction of human lactoferrin with the rat liver. *Am. J. Physiol.* **248** : G463-G469.
- Dehouck B., Dehouck M.P., Fruchart J.C. & Cecchelli R. (1994) Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier : Intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J. Cell Biol.* **126** : 465-473.
- Dehouck B., Fenart L., Dehouck M. P., Pierce A., Torpier G. & Cecchelli R. (1997) A new function for the LDL receptor : Transcytosis of LDL across the BBB. *J. Cell Biol.* **138** : 877-889.
- Dehouck M.P., Méresse S., Delorme P., Torpier G., Fruchart J.C. & Cecchelli R. (1990) The blood-brain barrier in vitro : Coculture of brain capillary endothelial cells and astrocytes. *Circ. Metab. Cerveau* **7** : 151-162.
- Dehouck, M.P., Dehouck B., Schlupe C., Fruchart, J.C., Lemaire M. & Cecchelli, R. (1995) Drug transport to the brain: comparison between in vitro and in vivo models of the blood-brain barrier. *Eur. J. Pharm. Sci.* **3** : 357-365.
- Delacourte A. (1990) General and dramatic glial reaction in Alzheimer brains. *Neurology* **40** : 33-37.
- Delacourte A. (1997) Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. *Médecine Thérapeutique* **3** : 369-376.
- Delacourte A. & Buée L. (1997) Normal and pathological tau proteins as factors for microtubule assembly. *Int. Rev. Cytol.* **171** : 167-224.

- de la Monte S.M., Sohn Y.K., Ganju N. & Wands J.R. (1998) P53- and CD95-associated apoptosis in neurodegenerative diseases. *Lab. Invest.* **78** : 401-411.
- Deli M.A., Descamps L., Dehouck M.P., Cecchelli R., Joo F., Abraham C.S. & Torpier G. (1995) Exposure of tumor necrosis factor- α to luminal membrane of bovine brain capillary endothelial cells cocultured with astrocytes induces a delayed increase of permeability and cytoplasmic stress fiber formation of actin. *J. Neurosc. Res.* **41** : 717-726.
- Derisbourg P., Wieruszeski J.M., Montreuil J. & Spik G. (1990) Primary structure of glycans isolated from human leucocyte lactotransferrin. Absence of fucose residues questions the proposed mechanism of hyposideraemia. *Biochem. J.* **269** : 821-825.
- Descamps L., Dehouck M.P., Torpier G. & Cecchelli R. (1996) Receptor-mediated transcytosis of transferrin through blood-brain barrier endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **270** : 1149-1158.
- Descamps L., Cecchelli R. & Torpier G. (1997) Effects of tumor necrosis factor on receptor-mediated endocytosis and barrier functions of bovine brain capillary endothelial cell monolayers. *J. Neuroimmunol.* **74** : 173-184.
- De Sousa M. & Brock J.H. (1989) Iron. In *Immunity Cancer and Inflammation* (De Sousa M., Brock J.H., Wiley J. & Sons Eds.). Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Dexter D.T., Wells F.R., Lees A.J., Agid F., Agid Y., Jenner P. & Marsden C.D. (1989) Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **52** : 1830-1836.
- Dhaenens L., Szczebara F. & Husson M.O. (1997) Identification, characterization, and immunogenicity of the lactoferrin-binding protein from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **65** : 514-518.
- d'Ischia M. & Protá G. (1997) Biosynthesis, structure, and function of neuromelanin and its relation to Parkinson's disease: a critical update. *Pigment Cell. Res.* **10** : 370-376.
- 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.
- 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.
- Duncan R.L. Jr. & McArthur W.P. (1981) Lactoferrin-mediated modulation of mononuclear cell activities. I. Suppression of the murine in vitro primary antibody responses. *Cell Immunol.* **63** : 308-320.
- Durum S.K., Higushi C. & Ron Y. (1984) Accessory cells and T cell activation: the relationship between two components of macrophage accessory cell function. *Immunology* **168** : 217-219.

E

- Eda S., Kikugawa K. & Beppu M. (1996) Binding characteristics of human lactoferrin to the human monocytic leukemia cell line THP-1 differentiated 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.
- Eddleston M. & Mucke L. (1993) Molecular profile of reactive astrocytes – implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* **54** : 15-36.
- Elass A., Vergoten G., Legrand D., Mazurier J., Elass-Rochard E. & Spik G. (1996a) Processes underlying interactions of human lactoferrin with the Jurkat human lymphoblastic T-cell line receptor. I- Quantitative structure-affinity relationships 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 lactoferrin with the Jurkat 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.
- Elass-Rochard E., Legrand D., Salmon V., Roseanu A., Trif M., Tobias P.S., Mazurier J. & Spik G. (1998) Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide-binding protein. *Infect. Immun.* **66** : 486-491.
- 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⁺. *J. 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.
- Ellison R.T. (1994) The effects of lactoferrin on gram-negative bacteria. *Adv. Exp. Med. Biol.* **357** : 71-90.
- Erdei J., Forsgren A. & Naidu A.S. (1994) Lactoferrin binds to porins OmpF and OmpC in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **62** : 1236-1240.

F

- Fabry Z., Waldschmidt M.M., Hendrickson D., Keiner J., Love-Homan L., Takei F. & Hart M.N. (1992) Adhesion molecules on murine brain microvascular endothelial cells; expression and regulation of ICAM-1 and Lgp55. *J. Neuroimmunol.* **36** : 1-11.
- 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.
- Farrell C.L. & Pardirge W.M. (1991) Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrical distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal plasma membrane : An electron microscopic immunogold study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** : 5779-5783.

- Faucheux B.A., Hirsch E.C., Villares J., Selimi F., Mouatt-Prigent A., Javoy-Agid F., Hauw J.J., Agid Y. (1993) Distribution of ^{125}I -ferrotransferrin binding sites in the mesencephalon of control subjects and patients with Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **60** : 2338-2341.
- Faucheux B.A., Nillesse N., Damier P., Spik G., Mouatt-Prigent A., Pierce A., Leveugle B., Kubis N., Hauw J.J., Agid Y. & Hirsch E.C. (1995) Expression of lactoferrin receptors is increased in the mesencephalon of patients with Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** : 9603-9607.
- Faucheux B.A., Hauw J.J., Agid Y. & Hirsch E.C. (1997) The density of ^{125}I -transferrin binding sites on perikarya of melanized neurons of the substantia nigra is decreased in Parkinson's disease. *Brain Res.* **749** : 170-174.
- Fillebeen C., Descamps L., Dehouck M.P., Fenart L., Benaïssa M., Spik G., Cecchelli R. & Pierce A. (1999) Receptor mediated-transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.* **274** : 7011-7017.
- Fillit H., Ding W., Buée L., Kalman J., Altsiel L., Lawlor B. & Wolf-Klein G. (1991) Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **129** : 318-320.
- Fishman J.B., Rubin J.B., Handrahan J., Connor J.R. & Fine R.E. (1987) Receptor-mediated transcytosis of transferrin across the blood-brain barrier. *Neurosci. Res.* **18** : 299-304.
- Felgenhauer K. (1974) Protein size and cerebrospinal fluid composition. *Klin. Wochenschr.* **52** : 1158-1164.
- Franck H.J.L., Pardridge W.M., Morris W.L., Rosenfeld R.C. & Choi T.B. (1986) Binding and internalization of insulin-like growth factors by isolated brain microvessels. *Diabet.* **35** : 654-661.
- Fransson G.B. & Lönnerdal B. (1980) Iron in human milk. *J. Pediatr.* **96** : 380-384.

G

- 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.
- Galli P., Brenna A., De Camilli P. & Meldolesi J. (1976) Extracellular calcium and the organization of tight junctions in pancreatic animal cells. *Exp. Cell Res.* **99** : 173-178.
- Ganrot-Norlin K. (1978) Relative concentrations of albumin and IgG in cerebrospinal fluid in health and acute meningitis. *Scand. J. Infect. Dis.* **10** : 57-60.
- 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.
- Gerlach M. & Riederer P. (1993) The pathophysiological basis of Parkinson's disease. In *Inhibitors of monoamine oxidase B. Pharmacology and clinical use in neurodegenerative disorders* (Szelenyi I., Ed). Birkhäuser, Basel. 793-807.
- Gerlach M., Ben-shachar D., Riederer P. & Youdim M.B.H. (1994) Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J. Neurochem.* **63** : 793-807.
- Gerlach M. & Riederer P. (1996) Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J. Neural. Transm.* **103** : 987-1041.
- Gehrman J., Matsumoto Y. & Kreutzberg G W. (1995) Microglia : intrinsic immunoeffector cell of the brain. *Brain Res. Rev.* **20** : 269-287.

- Geuze H.J., Slot J.W., Strous G.J., Lodish H.F. & Schwartz A.L. (1983) Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling : double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis. *Cell* **32** : 277-287.
- Ghio A.J., Carter J.D., Samet J.M., Reed W., Quay J., Dailey L.A., Richards J.H. & Devlin R.B. (1998) Metal-dependent expression of ferritin and lactoferrin by respiratory epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **274** : L728-L736.
- Glennner G.G. & Wong C.W. (1984) Alzheimer's disease : initial report of the purification and characterization of a novel cerebro-vascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120** : 885-890.
- Glennner G.G. (1992) Alzheimer's disease. *J. Intern. Med.* **232** : 533-534.
- Gnezditskaya E.V., Bukhova V.P., Zakharova N.A. & Malkina L.A. (1987) Lactoferrin induced stimulation of Fc- μ and Fc- γ receptor expression on the surface of human thymus lymphocytes *in vitro*. *Bull. Exp. Biol. Med.* **4** : 447-449.
- Goavec M., Mazurier J., Montreuil J. & Spik G. (1985) Role of glycans in the binding of human serotransferrin and lactotransferrin to human alveolar macrophages. *C. R. Acad. Sci. Paris (III)* **301** : 689-694.
- Goldstein G.W. & Betz A.L. (1986) The blood-brain barrier. *Sci. Am.* **255** : 74-83.
- Goodman R.E. & Schanbacher F.L. (1991) Bovine lactoferrin mRNA : sequence, analysis, and expression in the mammary gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180** : 75-84.
- Gray-Owen S.D. & Schryvers A.B. (1996) Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol.* **4** : 185-191.
- Green M.R. & Pastewka J.V. (1978) Lactoferrin is a marker for prolactin response in mouse mammary explants. *Endocrinology* **103** : 151-103.
- Griffin W.S., Stanley L.C., Ling C., White L., MacLeod V., Perrot L.J., White C.L. & Araoz C. (1989) Brain interleukin 1 and s-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 7611-7615.
- Grove M.L. (1960) The isolation of a red protein from milk. *J. Amer. Chem. Soc.* **82** : 3345-3350.
- Gutierrez E.G., Banks W.A. & Kastin A.J. (1993) Murine tumor necrosis factor alpha is transported from the blood to brain in the mouse. *J. Neuroimmunol.* **47** : 169-176.
- Gutteberg T.J., Flaegstad T. & Jorgensen T. (1986) Lactoferrin, C-reactive protein, alpha-1-antitrypsin and immunoglobulin GA in cerebrospinal fluid in meningitis. *Acta Paediatr. Scand.* **75** : 569-572.
- Gutteberg T.J., Dalaker K. & Vorland L.H. (1990) Early response in neonatal septicemia. The effect of *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* and tumor necrosis factor on the generation of lactoferrin. *Apmis* **98** : 1027-1032.
- Gutteridge J.M., Paterson S.K., Segal A.W. & Halliwell B. (1981) Inhibition of lipid peroxidation by the iron-binding protein lactoferrin. *Biochem. J.* **199** : 259-261.

H

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

- 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. Biotechnol. Biochem.* **59** : 1875-1881.
- Hällgren R., Terent A. & Venge P. (1982) Lactoferrin, lysozyme, and β_2 -microglobulin levels in cerebrospinal fluid. *Inflammation* **6** : 291-304.
- Halliwell B. (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* **59** : 1609-1623.
- Hammarström M.L., Mincheva-Nilsson L. & Hammarström S. (1995) Functional lactoferrin receptors on activated human lymphocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **371A** : 47-53.
- Hangoc G., Falkenburg J.H. & Broxmeyer H.E. (1991) Influence of T-lymphocytes and lactoferrin on the survival-promoting effects of IL-1 and IL-6 on human bone marrow granulocyte-macrophage and erythroid progenitor cells. *Exp. Hematol.* **19** : 697-703.
- Hansen A., Lund-Anderson H. & Crone C. (1977) K^+ -permeability of the blood-brain barrier investigated by aid of a K^+ -sensitive microelectrode. *Acta Physiol. Scand.* **101** : 435-445.
- Haridas M., Anderson B.F. & Baker E.N. (1995) Structure of human diferric lactoferrin refined at 2,2 Å resolution. *Acta Cryst.* **D51** : 629-646.
- Harmen 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.
- 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.
- Hasegawa K., Motsuchi W., Tanaka S. & Dosako S. (1994) Inhibition with lactoferrin of in vitro infection with human herpes virus. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **47** : 73-85.
- Hasegawa M., Jakes R., Crowther R.A., Lee V.M.Y., Ihara Y. & Goedert M. (1996) Characterization of mAb AP422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against Tau protein. *FEBS Lett.* **384** : 25-30.
- Hashizume S., Kuroda K. & Murakami H. (1983) Identification of lactoferrin as an essential growth factor for human lymphocytic cell lines in serum-free medium. *Biochim. Biophys. Acta* **763** : 377-382.
- 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. (1968) 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.
- Herz J., Goldstein J.L., Strickland D.K., Ho Y.K., Brown M.S. (1991) 39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *J. Biol. Chem.* **266** : 21232-21238.

- Hirai Y., Kawakata 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.
- Hirata R.K., Chen S.T. & Weil S.C. (1993) Expression of granule protein mRNAs in acute promyelocytic leukemia. *Hematol. Pathol.* **7** : 225-238.
- Hirsch E., Graybiel A.M. & Agid Y. (1988) Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* **334** : 345-348.
- Hirsch E.C., Brandel J.P., Galle P., Javoy-Agid F. & Agid Y. (1991) Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: an X-ray microanalysis. *J. Neurochem.* **56** : 446-451.
- Hirsch E.C., Hunot S., Faucheux B., Agid Y., Mizuno Y., Mochizuki H., Tatton W.G., Tatton N. & Olanow W.C. (1999) Dopaminergic neurons degenerate by apoptosis in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **14** : 383-385.
- Hofman F.M., Hinton D.R., Johnson K. & Merrill J.E. (1989) Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J. Exp. Med.* **170** : 607-612.
- 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.
- Hu W.L., Mazurier J., Sawatzki G., Montreuil J. & Spik G. (1988) Lactotransferrin receptor of mouse small-intestinal brush border. Binding characteristics of membrane-bound and triton X-100-solubilized forms. *Biochem. J.* **249** : 435-441.
- Hu W.L., Mazurier J., Montreuil J. & Spik G. (1990) Isolation and partial characterization of a lactotransferrin receptor from mouse intestinal brush border. *Biochemistry* **29** : 535-541.
- Hu W.L., Regoeczi E., Chindemi P.A. & Bolyos M. (1993) Lactoferrin interferes with uptake of iron from transferrin and asialotransferrin by the rat liver. *Am. J. Physiol.* **264** : G112-G117.
- Huettinger M., Retzek H., Eder M. & Goldenberg H. (1988) Characteristics of chylomicron remnant uptake into rat liver. *Clin. Biochem.* **21** : 87-92.
- Huettinger M., Retzek H., Hermann M. & Goldenberg H. (1992) Lactoferrin specifically inhibits endocytosis of chylomicron remnants but not alpha-macroglobulin. *J. Biol. Chem.* **267** : 18551-18557.
- Hung H.C. & Lee E.H. (1998) MPTP produces differential oxidative stress and antioxidative responses in the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways. *Free Rad. Biol. Med.* **24** : 76-84.
- Hunot S., Brugg B., Ricard D., Miche P.D., Muriel M.-P., Ruberg M., Faucheux B.A., Agid Y. & Hirsch E.C. (1997) Nuclear translocation of NK- κ B is increased in dopaminergic neurons of patients with Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** : 7531-7536.
- 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.

I

- Imamura K., Suzumura A., Sawada M., Mabuchi C. & Marunouchi T. (1994) Induction of MHC class II antigen expression on murine microglia by interleukin-3. *J. Neuroimmunol.* **55** : 119-125.
- Imber M.J. & Pizzo S.V. (1983) Clearance and binding of native and defucosylated lactoferrin. *Biochem. J.* **212** : 249-257.
- Ismail M. & Brock J.H. (1993) Binding of lactoferrin and transferrin to the human promonocytic cell line U937. Effect on iron uptake and release. *J. Biol. Chem.* **268** : 21618-21625.
- Iyer S. & Lönnnerdal B. (1993) Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. *Eur. J. Clin. Nutr.* **47** : 232-241.

J

- Janzer R.C. & Raff M.C. (1987) Astrocytes induce blood-brain properties in endothelial cells. *Nature* **325** : 253-257.
- Jefferies W.A., Brandon M.R., Hunt S.V., Williams A.F., Gatter K.C. & Mason D.Y. (1984) Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature* **312** : 162-163.
- Jellinger K. (1989) Pathology of Parkinson's syndrome. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Calne D.B., Ed). Springer, Berlin. **88** : 47-112.
- Jellinger K., Kienzl E., Rumpelmair G., Riederer P., Stachelberger H., Ben-Shachar D. & Youdim M.B. (1992) Iron-melanin complex in substantia nigra of parkinsonian brains: an x-ray microanalysis. *J. Neurochem.* **59** : 1168-1171.
- Johnston J.J., Rintels P., Chung J., Sather J., Benz Ej J.R. & Berliner N. (1992a) Lactoferrin gene promoter: structural integrity and nonexpression in HL60 cells. *Blood* **79** : 2998-3006.
- Johnston J.J., Boxer L.A. & Berliner N. (1992b) Correlation of messenger RNA levels with protein defects in specific granule deficiency. *Blood* **80** : 2088-2091.
- Jorieux S., Mazurier J., Montreuil J. & Spik G. (1984) Characterization of lactotransferrin complexes in human milk. *Prot. Biol. Fluids* **1** : 115-118.
- Jung R. & Hassler R. (1960) The extrapyramidal motor system. In *Handbook of Physiology* (Fields J., Magoun H.W. & Hall V.E. Eds.). Amer. Physiol. Soc. Washington D.C.. Section 1, tome 2.

K

- Kang J., Lemaire H.G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters C.L., Grzeschik K.H., Multhaup G., Beyreuther K. & Muller-Hill B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325** : 733-736.
- Kawakami H. & Lönnnerdal B. (1991) Isolation and function of a receptor for human lactoferrin in human fetal intestinal brush-border membranes. *Am. J. Physiol.* **261** : G841-G846.
- Kawamata T., Akiyama H., Yamada T. & McGeer P.L. (1992) Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord. *Am. J. Pathol.* **140** : 691-707.

- Kawamata T., Tooyama I., Yamada T., Walker D.G. & McGeer P.L. (1993) Lactotransferrin immunocytochemistry in Alzheimer and normal human brain. *Am. J. Pathol.* **142** : 1574-1585.
- 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.
- Kenneth M., Peterson M. & Alderete J.F. (1984) Iron uptake and increased intracellular enzyme activity follow host lactoferrin binding by *Trichomonas vaginalis* receptors. *J. exp. med.* **160** : 398-410.
- Khanna-Gupta A., Zibello T., Kolla S., Neufeld E.J. & Berliner N. (1997) CCAAT displacement protein (CDP/cut) recognizes a silencer element within the lactoferrin gene promoter. *Blood* **90** : 2784-2795.
- Kidd M. (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* **197** : 192-193.
- Kijlstra A. & Jeurissen S.H. (1982) Modulation of classical C3 convertase of complement by tear lactoferrin. *Immunology* **47** : 263-270.
- Kijlstra A. & Broersma L. (1984) Lactoferrin stimulates the production of leucocyte migration inhibitory factor by human peripheral mononuclear leucocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **55** : 459-464.
- Kim K.S., Wass C.A., Cross A.S. & Opal S.M. (1992) Modulation of blood-brain barrier permeability by tumor necrosis factor and antibody to tumor necrosis factor in the rat. *Lymphokine Cytokine Res.* **11** : 293-298.
- Klebanoff S.J., Vadas M.A., Harlan J.M., Sparks L.H., Gamble J.R., Agosti J.M. & Waltersdorff A.M. (1986) Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J. Immunol.* **136** : 4220-4225.
- Klegeris Y., Walker D.G. & McGeer P.L. (1994) Activation of macrophages by Alzheimer β amyloid peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199** : 984-991.
- Klegeris Y. & McGeer P.L. (1997) Inhibition of respiratory burst in macrophages by complement receptor blockade. *Eur. J. Pharmacol.* **260** : 273-277.
- Kliwer S.A., Umesono K., Heyman R.A., Mangelsdorf D.J., Dyck J.A. & Evans R.M. (1992) Retinoid X receptor-COUP-TF interactions modulate retinoic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** : 1448-1452.
- Knight J.A. (1997) Reactive oxygen species and neurodegenerative disorders. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **27** : 11-25.
- Kulics J. & Kijlstra A. (1987) The effect of lactoferrin on complement mediated modulation of immune complex size. *Immunol. Lett.* **14** : 349-353.
- Kurose I., Yamada T., Wolf R. & Granger D.N. (1994) P-selectin-dependent leukocyte recruitment and intestinal mucosal injury induced by lactoferrin. *J. Leukoc. Biol.* **55** : 771-777.

L

- Lassmann H., Schmied M., Vass K. & Hickey W.F. (1993) Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. *Glia* **7** : 19-24.

- Lee M.O., Liu Y. & Zhang X.K. (1995) 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 S.C., Liu W., Dickson D.W., Brosman C.F. & Berman J.W. (1993) Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. *J. Immunol.* **150** : 2659-2667.
- Lee W.J., Farmer J.L., Hilty M. & Kim Y.B. (1998) The protective effects of lactoferrin feeding against endotoxin lethal shock in germfree piglets. *Infect. Immun.* **66** : 1421-1426.
- Legrand D., Mazurier J., Aubert J.P., Loucheux-Lefebvre M.H., Montreuil J. & Spik G. (1986) Evidence for interactions between the 30 kDa N- and 50 kDa C-terminal tryptic fragments of human lactotransferrin. *Biochem. J.* **236** : 839-844.
- Legrand D., Mazurier J., Maes P., Rochard E., Montreuil J. & Spik G. (1991) Inhibition of the specific binding of human lactotransferrin to human peripheral-blood phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes by fluorescein labelling and location of the binding site. *Biochem. J.* **276** : 733-738.
- Legrand D., Mazurier J., Ellass A., Rochard E., Vergoten G., Maes P., Montreuil J. & Spik G. (1992) Molecular interactions between human lactotransferrin and the phytohemagglutinin-activated human lymphocyte lactotransferrin receptor lie in two loop-containing regions of the N-terminal domain I of human lactotransferrin. *Biochemistry* **31** : 9243-9251.
- Legrand D., Van Berkel P.H., 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 sulphated molecules but not with the receptor present on Jurkat human lymphoblastic T-cells. *Biochem. J.* **327** : 841-846.
- Levy P.F. & Viljoen M. (1995) Lactoferrin: a general review. *Haematologica* **80** : 252-267.
- 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.
- Leveugle B., Spik G., Perl D.P., Bouras C., Fillit H.M. & Hof P.R. (1994) The iron-binding protein lactotransferrin is present in pathologic lesions in a variety of neurodegenerative disorders: a comparative immunohistochemical analysis. *Brain Res.* **650** : 20-31.
- Leveugle B., Faucheux B.A., Bouras C., Nillesse N., Spik G., Hirsch E.C., Agid Y. & Hof P.R. (1996) Cellular distribution of the iron-binding protein lactotransferrin in the mesencephalon of Parkinson's disease cases. *Acta Neuropathol.* **91** : 566-572.
- Levin J., Van Deventer S.J.H., Van Der Poll T. & Stark A. (1994) Bacterial endotoxins. Basic science to anti-sepsis strategies. In *Progress in clinical and biological research*. Vol. 388 John Wiley and Sons, Inc.
- Lima M.F. & Kierszenbaum F. (1985) Lactoferrin effects on phagocytic cell function. I. Increased uptake and killing of an intracellular parasite by murine macrophages and human monocytes. *J. Immunol.* **134** : 4176-4183.
- Lima M.F. & Kierszenbaum F. (1987) Lactoferrin effects of phagocytic cell function. II. The presence of iron is required for the lactoferrin molecule to stimulate intracellular killing by macrophages but not to enhance the uptake of particles and microorganisms. *J. Immunol.* **139** : 1647-1651.
- Ling E.A. & Wong W.C. (1993) The origin and nature of ramified amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* **7** : 5-8.
- Liu J. & Mori A. (1993) Monoamine metabolism provides an antioxidant defense in the brain against

- oxidant- and free radical-induced damage. *Arch. Biochem. Biophys.* **302** : 118-127.
- Liu Y.H. & Teng C.T. (1991) Characterization of estrogen-responsive mouse lactoferrin promoter. *J. Biol. Chem.* **266** : 21880-21885.
- Liu Y. & Teng C.T. (1992) Estrogen response module of the mouse lactoferrin gene contains overlapping chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor and estrogen receptor-binding elements. *Mol. Endocrinol.* **6** : 355-364.
- Liu Y., Yang N. & Teng C.T. (1993) COUP-TF acts as a competitive repressor for estrogen receptor-mediated activation of the mouse lactoferrin gene. *Mol. Cell Biol.* **13** : 1836-1846.
- 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. *J. Clin. Invest.* **83** : 514-519.
- Lönnerdal B. (1985) Biochemistry and physiological function of human milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* **42** : 1299-1317.
- 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. & Iyer S. (1995) Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu. Rev. Nutr.* **15** : 93-110.
- 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., Bennett C., Coombes R.C. & Paterson I.M. (1991) Expression of lactoferrin in human stomach. *Int. J. Cancer* **49** : 684-687.
- Lydon J.P., O'Malley B.R., Saucedo O., Lee T., Headon D.R. & Conneely O.M. (1992) Nucleotide and primary amino acid sequence of porcine lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **1132** : 97-99.

M

- Machnicki M., Zimecki M. & Zagulski T. (1993) Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 in vivo. *Int. J. Exp. Pathol.* **74** : 433-439.
- Maneva A., Sirakov L.M. & Manev V.V. (1983) Lactoferrin to neutrophilic polymorphonuclear leucocytes. *Int. J. Biochem.* **15** : 981-984.
- 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.
- 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.
- Marchetti M., Pisani S., Antonini G., Valenti P., Seganti L. & Orsi N. (1998) Metal complexes of bovine lactoferrin inhibit in vitro replication of herpes simplex virus type 1 and 2. *Biometals* **11** : 89-94.

- Mason D.Y. & Taylor C.R. (1978) Distribution of transferrin, ferritin, and lactoferrin in human tissues. *J. Clin. Pathol.* **31** : 316-327.
- Masson P., Heremans J.F. & Prignot J. (1965) Immunohistochemical localization of the iron-binding protein lactoferrin in human bronchial glands. *Experientia* **21** : 604-605.
- Masson P.L., Heremans J.F. & Dive C.H. (1966) An iron binding protein common to many external secretions. *Clin. Chim. Acta* **14** : 735-739.
- Masson P.L., Heremans J.F. & Ferin J. (1968) Presence of an iron-binding protein (lactoferrin) in the genital tract of the human female. I. Its immunohistochemical localization in the endometrium. *Fertil. Steril.* **19** : 679-689.
- Masson P.L., Heremans J.F. & Schonke E. (1969) Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J. Exp. Med.* **130** : 643-658.
- Masson P.L. & Heremans J.F. (1971) Lactoferrin in milk from different species. *Comp. Biochem. Physiol.* **39** : 119-129.
- Mathison J.C., Tobias P.S., Wolfson E. & Ulevitch R.J. (1992) Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. A key component in macrophage recognition of gram-negative LPS. *J. Immunol.* **149** : 200-206.
- 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. *Pediatr. Res.* **40** : 257-262.
- Mazoyer E., Levy-Toledano S., Rendu F., Hermant L., Lu H., Fiat A.M., Jolles P. & Caen J. (1990) KRDS, a new peptide derived from human lactotransferrin, inhibits platelet aggregation and release reaction. *Eur. J. Biochem.* **194** : 43-49.
- Mazurier J. & Spik G. (1980) Comparative study of the iron-binding properties of human transferrins. I. Complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactotransferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **629** : 399-408.
- Mazurier J., Lhoste J.M., Montreuil J. & Spik G. (1983) Comparative study of the iron-binding properties of human transferrins. II. Electron paramagnetic resonance of mixed metal complexes of human lactotransferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **745** : 44-49.
- Mazurier J., Montreuil J. & Spik G. (1985) Visualization of lactotransferrin brush-border receptors by ligand- blotting. *Biochim. Biophys. Acta* **821** : 453-460.
- Mazurier J., Legrand D., Hu W.L., Montreuil J. & Spik G. (1989) Expression of human lactotransferrin receptors in phytohemagglutinin- stimulated human peripheral blood lymphocytes. Isolation of the receptors by antiligand-affinity chromatography. *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.
- McAbee D.D. (1995) Isolated rat hepatocytes acquire iron from lactoferrin by endocytosis. *Biochem. J.* **311** : 603-609.

- McAbee D.D. & Ling Y.Y. (1997) Iron-loading of cultured adult rat hepatocytes reversibly enhances lactoferrin binding and endocytosis. *J. Cell Physiol.* **171** : 75-86.
- McCombs J.L., Teng C.T., Pentecost B.T., Magnuson V.L., Moore C.M. & McGill J.R. (1988) Chromosomal localization of human lactotransferrin gene (LTF) by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell. Genet.* **47** : 16-17.
- McCormick J.A., Markey G.M. & Morris T.C. (1991) Lactoferrin-inducible monocyte cytotoxicity for K562 cells and decay of natural killer lymphocyte cytotoxicity. *Clin. Exp. Immunol.* **83** : 154-156.
- McGeer P.L. & McGeer E.G. (1995) The inflammatory response system of brain : implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res. Rev.* **21** : 195-218.
- McGeer E.G. & McGeer P.L. (1997) Inflammatory cytokines in the CNS. *CNS Drugs* **7** : 214-228.
- McGill J.R., Naylor S.L., Sakaguchi A.Y., Moore C.M., Boyd D., Barrett K.J., Shows T.B. & Drysdale J.W. (1987) Human ferritin H and L sequences lie on ten different chromosomes. *Hum. Genet.* **76** : 66-72.
- Mead P.E. & Tweedie J.W. (1990) cDNA and protein sequence of bovine lactoferrin. *Nucleic Acids Res.* **18** : 7167.
- Mecocci P., Parnetti L., Reboldi G.P., Santucci C., Gaiti A., Ferri C., Gernini I., Romagnoli M., Cadini D. & Senin U. (1991) Blood-brain barrier in a geriatric population : Barrier function in degenerative and vascular dementias. *Acta Neurol. Scand.* **84** : 210-213.
- Meilinger M., Haumer M., Szakmary K.A., Steinbock F., Scheiber B., Goldenberg H. & Huettinger M. (1995) Removal of lactoferrin from plasma is mediated by binding to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor and transport to endosomes. *FEBS Lett.* **360** : 70-74.
- Méresse S., Dehouck M. P., Delorme P., Bensaïd M., Tauber J. P., Delbart C., Fruchart J. C. & Cecchelli, R. (1989) Bovine brain capillary endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture. *J. Neurochem.* **53** : 1363-1371.
- Merrill J.E., Strom S.R., Ellison G.W. & Myers L.W. (1989) *In vitro* study of mediators of inflammation in multiple sclerosis. *J. Clin. Immunol.* **9** : 84-96.
- Metz-Boutigue M.H., Jolles J., Mazurier J., Schoentgen F., Legrand D., Spik G., Montreuil J. & Jolles P. (1984) Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur. J. Biochem.* **145** : 659-676.
- Meyer J.S., Stoica E. & Paxu I. (1973) Catecholamine concentration in CSF and plasma of patients with cerebral infarction and haemorrhage. *Brain Res.* **96** : 277-288.
- Mikogami T., Heyman M., Spik G. & Desjeux J.F. (1994) Apical-to-basolateral transepithelial transport of human lactoferrin in the intestinal cell line HT-29cl.19A. *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 HT29-18-C1. *Biochem. J.* **308** : 391-397.
- Mincheva-Nilsson L., Hammarström S. & Hammarström M.L. (1997) Activated human gamma delta T lymphocytes express functional lactoferrin receptors. *Scand. J. Immunol.* **46** : 609-618.
- Mitic L.L. & Anderson J.M. (1998) Molecular architecture of tight junctions. *Annu. Rev. Physiol.* **60** : 121-142.

- Miyauchi J., Watanabe Y., Enomoto Y. & Takeuchi K. (1983) Lactoferrin-deficient neutrophil polymorphonuclear leucocytes in leukaemias: a semiquantitative and ultrastructural cytochemical study. *J. Clin. Pathol.* **36** : 1397-1405.
- 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.
- Miyauchi J. & Watanabe Y. (1987) Immunocytochemical localization of lactoferrin in human neutrophils. An ultrastructural and morphometrical study. *Cell Tissue Res.* **247** : 249-258.
- Miyazawa K., Mantel C., Lu L., Morrison D.C. & Broxmeyer H.E. (1991) Lactoferrin-lipopolysaccharide interactions. Effect on lactoferrin binding to monocyte/macrophage-differentiated HL-60 cells. *J. Immunol.* **146** : 723-729.
- Mogi M., Harada M., Riederer P., Narabayashi H., Fujita K. & Nagatsu T. (1994a) Tumor necrosis factor alpha increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci. Lett.* **165** : 208-210.
- Mogi M., Harada M., Kondo T., Riederer P., Inagaki H., Minami M. & Nagatsu T. (1994b) Interleukin (IL)-1-beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **211** : 13-16.
- 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* (Spik G., Montreuil J., Crichton R.R. & Mazurier J. Eds). Elsevier. 199-202.
- Moguilevsky N., Masson P.L. & Courtoy P.J. (1987) Lactoferrin uptake and iron processing into macrophages: a study in familial haemochromatosis. *Br. J. Haematol.* **66** : 129-136.
- Molloy A.L. & Winterbourn C.C. (1990) Release of iron from phagocytosed *Escherichia coli* and uptake by neutrophil lactoferrin. *Blood* **75** : 984-989.
- Montreuil J. & Mullet S. (1960) Isolement de la lactosidérophiline du lait. *C. R. Acad. Sci. Paris* **250** : 1736-1737.
- Montreuil J., Mazurier J., Legrand D. & Spik G. (1985) Human lactotransferrin: structure and function. In *Proteins of iron storage and transport* (Spik G., Montreuil J., Crichton R.R. & Mazurier J. Eds). Elsevier. 25-38.
- Montreuil J., Spik G. & Mazurier J. (1997) Transferrin superfamily. An outstanding model for studying biochemical evolution. In *Glycoprotein II, New comprehensive Biochemistry* (Montreuil J., Vligenthart J.F.G. & Schachter H. Eds). Elsevier Sciences. Vol 29b, 203-242.
- Morgan O.S., Bankay J. & Quash G.A. (1975) The effect of lactoferrin, an iron-binding protein on complement activity. *West Indian Med. J.* **24** : 46-54.
- Morris C.M., Candy J.M., Keith A.B., Oakley A.E., Taylor G.A., Pullen R.G.L., Bloxham C.A., Gocht A. & Edwardson J.A. (1992) Brain iron homeostasis. *J. Inorg. Biochem.* **47** : 257-265.
- Moser R., Schleiffenbaum B., Groscurth P. & Fehr J. (1989) Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate human vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage. *J. Clin. Invest.* **83** : 444-455.
- Mucke L., Oldstone M.B.A., Morris J.C. & Nerenberg M.I. (1991) Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-lacZ transgene by focal injury. *New. Biol.* **3** : 465-474.

N

- Nakamura S., Kawamata T., Akiguchi I., Kameyama M., Nakamura M. & Kimura H. (1990) Expression of monoamine oxidase B activity in astrocytes of senile plaques. *Acta Neuropath.* **80** : 419-425.
- Nelson K.G., Takahashi T., Bossert N.L., Walmer D.K. & McLachlan J.A. (1991) Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** : 21-25.
- Newbold R.R., Teng C.T., Beckman Wc J.R., Jefferson W.N., Hanson R.B., Miller J.V. & McLachlan J.A. (1992) Fluctuations of lactoferrin protein and messenger ribonucleic acid in the reproductive tract of the mouse during the estrous cycle. *Biol. Reprod.* **47** : 903-915.
- Nichols B.L., McKee K.S., Henry J.F. & Putman M. (1987) Human lactoferrin stimulates thymidine incorporation into DNA of rat crypt cells. *Pediatr. Res.* **21** : 563-567.
- Nichols B.L., McKee K., Putman M., Henry J.F. & Nichols V.N. (1989) Human lactoferrin supplementation of infant formulas increases thymidine incorporation into the DNA of rat crypt cells. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **8** : 102-109.
- Nikawa H., Samaranayake L.P., Tenovuo J., Pang K.M. & Hamada T. (1993) The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Arch. Oral Biol.* **38** : 1057-1063.
- Nikawa H., Samaranayake L.P., Tenovuo J. & Hamada T. (1994) The effect of antifungal agents on the in vitro susceptibility of *Candida albicans* to apo-lactoferrin. *Arch. Oral Biol.* **39** : 921-923.
- Nillesse N., Pierce A., Lecocq M., Benaïssa M. & Spik G. (1994) Expression of the lactotransferrin receptor during the differentiation process of the megakaryocyte Dami cell line. *Biol. Cell.* **82** : 149-159.
- Nishiya K. & Horwitz D.A. (1982) Contrasting effects of lactoferrin on human lymphocyte and monocyte natural killer activity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* **129** : 2519-2523.

O

- Oberg G., Hallgren R. & Venge P. (1987) Beta 2-microglobulin, lysozyme and lactoferrin in cerebrospinal fluid in patients with lymphoma or leukaemia: relationship to CNS involvement and the effect of prophylactic intrathecal treatment with methotrexate. *Br. J. Haematol.* **66** : 315-322.
- Oguchi S., Walker W.A. & Sanderson I.R. (1995) Iron saturation alters the effect of lactoferrin on the proliferation and differentiation of human enterocytes (Caco-2 cells). *Biol. Neonate* **67** : 330-339.
- Olendorf W.K. (1971) Brain uptake of radiolabeled aminoacids, amines, and hexoses after arterial injection. *Am. J. Physiol.* **221** : 1629-1639.
- Olsson I., Lantz M., Persson A.M. & Arnljots K. (1988) Biosynthesis and processing of lactoferrin in bone marrow cells, a comparison with processing of myeloperoxidase. *Blood* **71** : 441-447.
- Oria R., Alvarez-Hernandez X., Liceaga J. & Brock J.H. (1988) Uptake and handling of iron from transferrin, lactoferrin and immune complexes by a macrophage cell line. *Biochem. J.* **252** : 221-225.

- Oseas R., Yang H.H., Baehner R.L. & Boxer L.A. (1981) Lactoferrin: a promoter of polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. *Blood* **57** : 939-945.
- Osmand A.P. & Switzer R.C. (1991) Differential distribution of lactoferrin and Alz-50 immunoreactivities in neuritic plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. In *Alzheimer's Disease: Basic Mechanisms Diagnosis and Therapeutic* (Iqbal K., McLachlan D.R.C., Winblad B. & Wisniewski H.M. Eds.). John Wiley & sons, Ltd. 219-228.
- Otto B.R., Verweij-Van Vught A.M. & MacLaren D.M. (1992) Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **18** : 217-233.

P

- Palumbo A., d'Ischia M., Misuraca G., De Martino L. & Prota G. (1995) Iron- and peroxide-dependent conjugation of dopamine with cysteine : oxidative routes to the novel brain metabolite 5-S-cysteinyldopamine. *Biochim. Biophys. Acta.* **1245** : 255-261.
- Panella T.J., Liu Y.H., 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.
- Pappolla M.A., Omar R.A., Kim K.S. & Robakis N.K. (1992) Immunohistochemical evidence of antioxidant stress in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **140** : 621-628.
- Pardridge W.M., Eisenberg J. & Cefalu W.T. (1985a) Absence of albumin receptor on brain capillaries in vivo or in vitro. *Am. J. Physiol.* **249** : E264-E267.
- Pardridge W.M., Eisenberg J. & Yang J. (1985b) Human blood-brain insulin receptor. *J. Neurochem.* **44** : 1771-1778.
- 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.
- Penco S., Pastorino S., Bianchi-Scarra G. & Garré C. (1995) Lactoferrin down-modulates the activity of the granulocyte macrophage colony-stimulating factor promoter in interleukin-1 beta-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.
- Peyrat J.P., Hondermarck H., Louchez M.M. & Boilly B. (1991) Demonstration of basic fibroblast growth factor high and low affinity binding sites in human breast cancer cell lines. *Cancer Comm.* **3** : 323-329.
- Pierce A., Colavizza D., Benaïssa M., Maes P., Tartar A., Montreuil J. & Spik G. (1991) Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* **196** : 177-184.
- Pilas B., Sarna T., Kalyanarman B. & Swartz H.M. (1988) The effect of melanin on iron-associated decomposition of hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **4** : 285-293.
- Pohlman T.H., Stanness K.A., Beatty P.G., Ochs H.D. & Harlan J.M. (1986) An endothelial cell surface factor(s) induced in vitro by lipopolysaccharide, interleukin 1, and tumor necrosis factor-alpha increases neutrophil adherence by a CDw18-dependent mechanism. *J. Immunol.* **136** : 4548-4553.

- Powell M.J. & Ogden J.E. (1990) Nucleotide sequence of human lactoferrin cDNA. *Nucleic Acids Res.* **18** : 4013.
- Pratt C.W. (1993) General features of the heparin-binding serpins antithrombin, heparin cofactor II and protein C inhibitor. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* **4** : 479-490.
- 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 Paediatr. Scand.* **78** : 505-512.

R

- Rado T.A., Bollekens J., St Laurent G., Parker L. & Benz Ej J.R. (1984) Lactoferrin biosynthesis during granulocytopoiesis. *Blood* **64** : 1103-1109.
- Rado T.A., Wei X.P. & Benz Ej J.R. (1987) Isolation of lactoferrin cDNA from a human myeloid library and expression of mRNA during normal and leukemic myelopoiesis. *Blood* **70** : 989-993.
- Rainard P. (1993) Activation of the classical pathway of complement by binding to unencapsulated *Streptococcus agalactiae*. *Immunology* **79** : 648-652.
- Raub T.J. & Newton C.R. (1991) Recycling kinetics and transcytosis of transferrin in primary cultures of bovine brain microvessel endothelial cells. *J. Cell Physiol.* **149** : 141-151.
- Rebeck G.W., Harr S.D., Strickland D.K. & Hyman B.T. (1995) Multiple, diverse senile plaque-associated proteins are ligands of an apolipoprotein E receptor, the alpha 2-macroglobulin receptor/low-density-lipoprotein receptor-related protein. *Ann. Neurol.* **37** : 211-217.
- Reese T.S. & Karnovski M.J. (1967) Fine structure localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell. Biol.* **34** : 207-217.
- 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.
- Richter J., Andersson T. & Olsson I. (1989) Effect of tumor necrosis factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on neutrophil degranulation. *J. Immunol.* **142** : 3199-3205.
- Riederer P., Sofic E., Rausch W.D., Schmidt B., Reynolds G.P., Jellinger K. & Youdim M.B. (1989) Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J. Neurochem.* **52** : 515-520.
- Riederer P., Dirr A., Goetz M., Sofic E., Jellinger K. & Youdim M.B. (1992) Distribution of iron in different brain regions and subcellular compartments in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **32** : S101-S104.
- Roberts R.L., Fine R.E. & Sandra A. (1993) Receptor-mediated endocytosis of transferrin at the blood-brain barrier. *J. Cell Sci.* **104** : 521-532.
- Rochard E., Legrand D., Mazurier J., Montreuil J. & Spik G. (1989) The N-terminal domain I of human lactotransferrin binds specifically to phytohemagglutinin-stimulated peripheral blood human lymphocyte receptors. *FEBS Lett.* **255** : 201-204.

- Rochard E., Legrand D., Lecocq M., Hamelin R., Crépin 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** : 2047-2051.
- Roiron D., Amouric M., Marvaldi J. & Figarella C. (1989) Lactoferrin-binding sites at the surface of HT29-D4 cells. Comparison with transferrin. *Eur. J. Biochem.* **186** : 367-373.
- Roiron-Lagroux D. & Figarella C. (1990) Evidence for a different mechanism of lactoferrin and transferrin translocation on HT 29-D4 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170** : 837-842.
- Roiron-Lagroux D. & Figarella C. (1994) Further evidence of different lactoferrin and transferrin binding sites on human HT29-D4 cells. Effects of lysozyme, fucose and cathepsin G. Comparison with transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **1224** : 441-444.
- Root R.K. & Cohen M.S. (1981) The microbicidal mechanisms of human neutrophils and eosinophils. *Rev. Infect. Dis.* **3** : 565-598.
- Rubin L.L., Hall D.E., Porter S., Barbu K., Cannon C., Horner H.C., Janatpour M., Liaw C.W., Manning K., Morales J., Tanner L.I., Tomaselli K.J. & Bard F. (1991) A cell culture model of the blood-brain barrier. *J. Cell. Biol.* **115** : 1725-1735.

S

- 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 H., Miyakawa H., Tamura Y., Shimamura S. & Tomita M. (1991) Potent bactericidal activity of bovine lactoferrin hydrolysate produced by heat treatment at acidic pH. *J. Dairy Sci.* **74** : 3724-3730.
- Saito K. & Nakanuma Y. (1992) Lactoferrin and lysozyme in the intrahepatic bile duct of normal livers and hepatolithiasis. An immunohistochemical study. *J. Hepatol.* **15** : 147-153.
- Saito N., Takemori N., Hirai K., 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.
- Sallmann F.R., Baveye-Descamps S., Pattus F., Salmon V., Branza N., Spik G. & Legrand D. (1999) Porins OmpC and PhoE of *Escherichia coli* as specific cell-surface targets of human lactoferrin: binding characteristics and biological effects. *J. Biol. Chem.* sous presse.
- Samaranayake Y.H., Samaranayake L.P., Wu P.C. & So M. (1997) The antifungal effect of lactoferrin and lysozyme on *Candida krusei* and *Candida albicans*. *Apmis* **105** : 875-883.
- Saper C.B. & Petitto C.K. (1982) Correspondence of melanin-pigmented neurons in human brain with A1-A14 catecholamine cell groups. *Brain* **105** : 87-101.
- Sara V.R., Hall K., Misaki M., Fryklund L., Christensen N. & Wetterberg L. (1983) Ontogenesis of somatomedin and insulin receptor in the human fetus. *J. Clin. Invest.* **71** : 1084-1094.
- Sato K., Shinmoto H., Tanimoto M., Dosako S. & Nakajima I. (1990) Uptake and resecretion of human lactoferrin by B-lymphocytes. *Agric. Biol. Chem.* **54** : 1275-1279.

- Sawatzki G. & Kubanek B. (1983) Isolation and ELISA of mouse and human lactoferrin. In *Structure and Function of Iron Storage and Transport Proteins, 1* (Urushizaki et al. eds.). Elsevier Science Publishers B.V. 441-443.
- Scalia M., Geremia E.V.C., Santoro C., Baratta D. & Sichel G. (1990) Lipid peroxidation and unpigmented liver tissues: protective role of melanin. *Pigment Cell Res.* **3** : 115-119.
- Scatchard G. (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51** : 660-672.
- Schade A.L. & Caroline L. (1946) An iron binding component of human blood plasma. *Science*, **104** : 340-341.
- Schraermeyer U. (1996) The intracellular origin of the melanosome in pigment cells: a review of ultrastructural data. *Histol. Histopathol.* **11** : 445-462.
- Schlossman D.M., Schmid S.L., Braell W.A. & Rothman J.E. (1984) An enzyme that removes clathrin coats : purification of an uncoating ATPase. *J. Cell Biol.* **99** : 722-733.
- Schnitzer J.E. (1993) Update on the cellular and molecular basis of capillary permeability. *TCM.* **3(4)** : 124-130.
- Schnitzer J.E., Oh P., Pinney E. & Allard J. (1994) Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium : reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J. Cell Biol.* **127** : 1217-1232.
- Schöbitz B., Kloet E.R. & Holsboer F. (1994) Gene expression and function of interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in the brain. *Prog. Neurobiol.* **44** : 397-432.
- 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., Iigo 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 aberrant crypt foci and enhanced natural killer activity in male rats administered bovine lactoferrin concomitantly with azoxymethane. *Cancer Lett.* **121** : 211-216.
- Sharief M.K. & Thompson E.J. (1992) In vivo relationship of tumor necrosis factor- α to blood-brain barrier damage in patients with active multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **38** : 27-34.
- Sharif S.F., Harini R.J., Chang V.A., Barie P.S., Wang R.S. & Ghajar J.B.G. (1993) Human astrocyte production of TNF- α , interleukin-1 β , interleukin-6 following exposure to lipopolysaccharide endotoxin. *Neurol. Res.* **15** : 109-112.
- 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.
- Shen Y., Li R., McGeer E.G. & McGeer P.L. (1997) Neuronal expression of mRNAs for complement proteins of the classical pathway in Alzheimer brain. *Brain Res.* **769** : 391-395.
- Sherrington R., Rogaev E.I., Liang Y., Rogaeva E.A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K., et al., (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **375** : 754-760.
- Shi H. & Teng C.T. (1994) Characterization of a mitogen-response unit in the mouse lactoferrin gene promoter. *J. Biol. Chem.* **269** : 12973-12980.

- Shi H. & Teng C. (1996) Promoter-specific activation of mouse lactoferrin gene by epidermal growth factor involves two adjacent regulatory elements. *Mol. Endocrinol.* **10** : 732-741.
- Shimizu K., Matsuzawa 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 myeloperoxidase gene. *Gene* **110** : 229-233.
- Siebert P.D. & Huang B.C. (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.
- Slater K. & Fletcher J. (1987) Lactoferrin derived from neutrophils inhibits the mixed lymphocyte reaction. *Blood* **69** : 1328-1333.
- Smith K.R. & Borchardt R.T. (1989) Permeability and mechanism of albumin, cationized albumin, and glycosylated albumin transcellular transport across monolayers of cultured bovine brain capillary endothelial cells. *Pharm. Res.* **6** : 466-473.
- Sofic E., Riederer P., Heinsen H., Bekmann H., Reynolds G.P., Hebenstreit G. & Youdim M.B.H. (1988) Increase iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brains. *J. Neural. Transm.* **74** : 199-205.
- Sofic E., Paulus W., Jellinger K., Riederer P. & Youdim M.B.H. (1991) Selective increase of iron in substantia nigra zona compacta of parkinsonian brains. *J. Neurochem.* **56** : 978-982.
- Sørensen M. & Sørensen S.P.L. (1939) The protein in whey. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, **23** : 55-99.
- Sorimachi K., Akimoto K., Hattori Y., Ieiri T. & Niwa A. (1997) Activation of macrophages by lactoferrin: secretion of TNF-alpha, IL-8 and NO. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **43** : 79-87.
- Soukka T., Lumikari M. & Tenovuo J. (1991) Combined inhibitory effect of lactoferrin and lactoperoxidase system on the viability of *Streptococcus mutans*, serotype c. *Scand. J. Dent. Res.* **99** : 390-396.
- Soukka T., Tenovuo J. & Lenander-Lumikari M. (1992) Fungicidal effect of human lactoferrin against *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **69** : 223-228.
- Spik G., Strecker G., Fournet B., Bouquelet S., Montreuil J., Dorland L., Van Halbeek H. & Vliegthart J.F. (1982) Primary structure of the glycans from human lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* **121** : 413-419.
- Spik G. & Montreuil J. (1983) Rôle de la lactotransferrine dans les mécanismes moléculaires de la défense antibactérienne. *Bull. Europ. Physiopath. Resp.* **19** : 123-130.
- Spik G. (1988) Rôle de la lactotransferrine dans la nutrition martiale du nourisson. *Médecine et Nutrition* **23** : 121-125.
- Spik G., Coddeville B., Mazurier J., Bourne Y., Cambillaut C. & Montreuil J. (1994) Primary and three-dimensional structure of lactotransferrin (lactoferrin) glycans. *Adv. Exp. Med. Biol.* **357** : 21-32.
- Streit W.J., Graeber M.B. & Kreutzberg G.W. (1988) Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* **1** : 301-307.

- Streit W.J., Graeber M.B. & Kreutzberg G.W. (1989) Peripheral nerve lesion produces increased levels of major histocompatibility complex antigens in the central nervous system. *J. Neuroimmunol.* **21** : 117-123.
- Superti F., Ammendolia M.G., Valenti P. & Seganti L. (1997) Antiroviral activity of milk proteins: lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29. *Med. Microbiol. Immunol.* **186** : 83-91.
- Sykes J.A., Thomas M.J., Goldie D.J. & Turner G.M. (1982) Plasma lactoferrin levels in pregnancy and cystic fibrosis. *Clin. Chim. Acta* **122** : 385-393.

T

- Teng C.T., Pentecost B.T., Marshall A., Solomon A., Bowman B.H., Lalley P.A. & Naylor S.L. (1987) Assignment of the lactotransferrin 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., Newbold R.R., Eddy E.M. & McLachlan J.A. (1989) Lactotransferrin gene expression in the mouse uterus and mammary gland. *Endocrinology* **124** : 992-999.
- Teng C.T., Liu Y., 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. (1995) Mouse lactoferrin gene: a marker for estrogen and epidermal growth factor. *Environ. Health Perspect.* **103 Suppl 7** : 17-20.
- Terai K., Matsuo A. & McGeer P.L. (1996) Enhancement of immunoreactivity for NF- κ B in the hippocampal formation and cerebral cortex of Alzheimer's disease. *Brain Res.* **735** : 159-168.
- Terai K., Walker D.G., McGeer E.G. & McGeer P.L. (1997) Neurons express proteins of the classical complement cascade pathway in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **769** : 385-390.
- Terent A., Hallgren R., Venge P. & Bergstrom K. (1981) Lactoferrin, lysozyme, and beta 2-microglobulin in cerebrospinal fluid. Elevated levels in patients with acute cerebrovascular lesions as indices of inflammation. *Stroke* **12** : 40-46.
- Tomita M., Takase M., Wakabayashi H. & Bellamy W. (1994) Antimicrobial peptides of lactoferrin. *Adv. Exp. Med. Biol.* **357** : 209-218.
- Tooyama I., Kawamata T., Akiyama H., Kimura H., Moestrup S.K., Gliemann J., Matsuo A. & McGeer P.L. (1995) Subcellular localization of the low density lipoprotein receptor-related protein (alpha 2-macroglobulin receptor) in human brain. *Brain Res.* **691** : 235-238.
- Tsuboi Y. & Yamada T. (1994) Increased concentration of C4d complement in CSF in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **57** : 859-861.
- Tsuji A., Terasaki T., Takabatake Y., Tenda Y., Tamai I., Yamashita T., Moritani S., Tsuruo T. & Yamashita J. (1992) P-glycoprotein as the drug efflux pump in primary cultured bovine brain capillary endothelial cells. *Life Sci.* **51** : 1427-1437.
- Tsuji A., Tamai I., Sakata A., Tenda Y. & Terasaki T. (1993) Restricted transport of cyclosporin A across the blood-brain barrier by multidrug transporter, P-glycoprotein. *Biochem. Pharmacol.* **46** : 1096-1099.

- Tsukada N., Miyagi K., Matsuda M., Yanagisawa N. & Yone K. (1991) Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the CSF and sera of patients with multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **102** : 230-234.
- 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.

U

- Ulevitch R.J. & Tobias P.S. (1994) Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signaling. *Curr. Opin. Immunol.* **6** : 125-130.
- Ulvestad E., Williams K., Bjerkvig R., Tiekotter K., Antel J. & Matre R. (1994) Human microglial cells have phenotypic and functional characteristics in common with both macrophages and dendritic antigen-presenting cells. *J. Leukoc. Biol.* **56** : 732-740.

V

- Van Berkel P.H., Van Veen H.A., Geerts M.E., de Boer H.A. & Nuijens J.H. (1996) Heterogeneity in utilization of N-glycosylation sites Asn624 and Asn138 in human lactoferrin: a study with glycosylation-site mutants. *Biochem. J.* **319** : 117-122.
- Van de Rijn M., Geurts Van Kessel A.H., Kroezen V., Van Agthoven A.J., Verstijnen K., Terhorst C. & Hilgers J. (1983) Localization of a gene controlling the expression of the human transferrin receptor to the region q12 leads to qter chromosome 3. *Cytogenet. Cell Genet.* **36** : 525-531.
- Van Snick J.L., Masson P.L. & Heremans J.F. (1974) The involvement of lactoferrin in the hyposideremia of acute inflammation. *J. Exp. Med.* **140** : 1068-1084.
- Van Snick J.L. & Masson P.L. (1976) The binding of human lactoferrin to mouse peritoneal cells. *J. Exp. Med.* **144** : 1568-1580.
- Van Snick J.L., Markowetz B. & Masson P.L. (1977) The ingestion and digestion of human lactoferrin by mouse peritoneal macrophages and the transfer of its iron into ferritin. *J. Exp. Med.* **146** : 817-827.
- Vash B., Phung N., Zein S. & DeCamp D. (1998) Three complement-type repeats of the low-density lipoprotein receptor-related protein define a common binding site for RAP, PAI-1, and lactoferrin. *Blood* **92** : 3277-3285.
- Vigne P., Farre A.L. & Frelin C. (1994) Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter of brain capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **269** : 19925-19930.
- von Asmuth E.J., Dentener M.A., Bazil V., Bouma M.G., Leeuwenberg J.F. & Buurman W.A. (1993) Anti-CD14 antibodies reduce responses of cultured human endothelial cells to endotoxin. *Immunology* **80** : 78-83.

W

- Walker D.G. & McGeer P.L. (1993) Complement gene expression in neuroblastoma and astrocytoma cell lines of human origin. *Neurosci. Lett.* **157** : 99-102.

- Walker D.G., Kim S.U. & McGeer P.L. (1995) Complement and cytokine gene expression in cultured microglia derived from postmortem human brains. *J. Neurosci. Res.* **40** : 478-493.
- Walmer D.K., Wrona M.A., Hughes C.L. & Nelson K.G. (1992) Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology* **131** : 1458-1466.
- Wang D., Pabst K.M., Aida Y. & Pabst M.J. (1995) Lipopolysaccharide-inactivating activity of neutrophils is due to lactoferrin. *J. Leukoc. Biol.* **57** : 865-874.
- Ward P.A., Till G.O., Kunkel R. & Beauchamp C. (1983) Evidence for role of hydroxyl radical in complement and neutrophil-dependent tissue injury. *J. Clin. Invest.* **72** : 789-801.
- Willnow T.E., Goldstein J.L., Orth K., Brown M.S. & Herz J. (1992) Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance. *J. Biol. Chem.* **267** : 26172-26180.
- Willnow T.E., Rohlmann A., Horton J., Otani H., Braun J.R., Hammer R.E. & Herz J. (1996) RAP, a specialized chaperone, prevents ligand-induced ER retention and degradation of LDL receptor-related endocytic receptors. *EMBO J.* **15** : 2632-2639.
- Winterbourn C.C. (1983) Lactoferrin-catalysed hydroxyl radical production : additional requirement for a chelating agent. *Biochem. J.* **210** : 15-19.
- Wisniewski T., Lalowski M., Golabek A., Vogel T. & Frangione B. (1995) Is Alzheimer's disease an apolipoprotein E amyloidosis ? *Lancet* **345** : 956-958.
- Wlaszczyk A., Zimecki M., Adamik B., Durek G. & Kubler A. (1997) 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.* **45** : 201-212.
- Wong D., Prameya R. & Dorovini-Zis K. (1999) In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **58** : 138-152.
- Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J. & Mathison J.C. (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249** : 1431-1433.
- Wu H.F., Lundblad R.L. & Church F.C. (1995a) Neutralization of heparin activity by neutrophil lactoferrin. *Blood* **85** : 421-428.
- Wu H.F., Monroe D.M. & Church F.C. (1995b) Characterization of the glycosaminoglycan-binding region of lactoferrin. *Arch. Biochem. Biophys.* **317** : 85-92.

Y

- Yamada T., McGeer P.L. & McGeer E.G. (1992) Lewy bodies in Parkinson's disease are recognized by antibodies to complement proteins. *Acta Neuropathol.* **84** : 100-104.
- Yamaguchi H., Hirai S., Morimatsu M., Shoji M. & Ihara Y. (1988) A variety cerebral amyloid deposits in the brains of the Alzheimer-type dementia demonstrated by beta protein immunostaining. *Acta Neuropathol.* **76** : 541-549.

- Yamauchi K., Tomita M., Giehl T.J. & Ellison R.T. (1993) Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infect. Immun.* **61** : 719-728.
- Yang F., Lum J.B., McGill J.R., Moore C.M., Naylor S.L., van Bragt P.H., Baldwin W.D. & Bowman B.H. (1984) Human transferrin: cDNA characterization and chromosomal localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** : 2752-2756.
- 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.
- Youdim M.B., Ben-Shachar D. & Riederer P. (1989) Is Parkinson's disease a progressive siderosis of substantia nigra resulting in iron and melanin induced neurodegeneration ? *Acta Neurol. Scand. Suppl.* **126** : 47-54.

Z

- 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.
- Zagulski T., Lipinski P., Zagulska A. & Jarzabek Z. (1998) Antibacterial system generated by lactoferrin in mice in vivo is primarily a killing system. *Int. J. Exp. Pathol.* **79** : 117-123.
- Ziere G.J., Van Dijk M.C., Bijsterbosch M.K. & Van Berkel T.J. (1992) Lactoferrin uptake by the rat liver. Characterization of the recognition site and effect of selective modification of arginine residues. *J. Biol. Chem.* **267** : 11229-11235.
- Ziere G.J., Bijsterbosch M.K. & Van Berkel T.J. (1993) Removal of 14 N-terminal amino acids of lactoferrin enhances its affinity for parenchymal liver cells and potentiates the inhibition of beta-very low density lipoprotein binding. *J. Biol. Chem.* **268** : 27069-27075.
- Ziere G.J., Kruijt J.K., Bijsterbosch M.K. & Van Berkel T.J. (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** : 119-123.
- Zimecki M., Mazurier J., Spik G. & Kapp J.A. (1995) Human lactoferrin induces phenotypic and functional changes in murine splenic B cells. *Immunology* **86** : 122-127.
- Zimecki M., Wlasczyk A., Zagulski T. & Kubler A. (1998) Lactoferrin lowers serum interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in mice subjected to surgery. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **46** : 97-104.
- Zou S., Magura C.E. & Hurley W.L. (1992) Heparin-binding properties of lactoferrin and lysozyme. *Comp. Biochem. Physiol.* **103** : 889-895.

